

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ  
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

**BRNO 2016**

**Bc. Ondřej Macoszek**

**Mendelova univerzita v Brně**  
**Agronomická fakulta**  
**Ústav CEITEC MENDELU**

---



**Agronomická  
fakulta**

**Mendelova  
univerzita  
v Brně**



**Vliv transportu auxinu na regulaci vyrůstání  
kotylárních pupenů hrachu**

Diplomová práce

*Vedoucí práce:*  
Ing. Jozef Balla, Ph.D.

*Vypracoval:*  
Bc. Ondřej Macoszek

---

Brno 2016

## ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: vypracoval samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Jsem si vědom, že se na moji práci vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzavření licenční smlouvy a užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

Dále se zavazuji, že před sepsáním licenční smlouvy o využití díla jinou osobou (subjektem) si vyžádám písemné stanovisko univerzity, že předmětná licenční smlouva není v rozporu s oprávněnými zájmy univerzity, a zavazuji se uhradit případný příspěvek na úhradu nákladů spojených se vznikem díla, a to až do jejich skutečné výše.

V Brně dne:.....

.....  
podpis

## **PODĚKOVÁNÍ**

Rád bych poděkoval vedoucímu diplomové práce Ing. Jozefu Ballovi, Ph.D. za trpělivost a čas strávený při konzultacích. Dále děkuji Ing. Michaele Opletalové za nesčetné rady a pomoc při realizaci experimentů.

Také chci poděkovat své rodině za možnost studovat na Mendelově univerzitě v Brně a svým blízkým za podporu v průběhu studia.

## **ABSTRAKT**

Macoszek, O. *Vliv transportu auxinu na regulaci vyrůstání kotylárních pupenů hrachu*. Diplomová práce. Brno 2016.

Cílem této diplomové práce bylo studium role polárního transportu auxinu v regulaci vyrůstání kotylárních pupenů hrachu setého (*Pisum sativum* L.) v souvislosti s kompetitivní kanalizací auxinových zdrojů. Dekapitací růstového vrcholu jako primárního zdroje auxinu byly kotylární pupeny uvolněny z inhibice. Toto uvolnění bylo provázeno zvýšenou expresí genů auxinových přenašečů *PsPIN1* a *PsAUX1* a poklesem exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1* spojovaných s dormantním stavem rostlinného pletiva. V další fázi byly provedeny různé způsoby exogenní aplikace auxinu na pahýly dekapitovaných rostlin a dynamika růstu kotylárních výhonů. Aplikace auxinu shora místo dekapitovaného růstového vrcholu zabzdila vyrůstání kotylárních pupenů, jeho jednostranná boční aplikace na stonkový pahýl brzdila vyrůstání kotyláru na straně aplikace. Oboustranná aplikace auxinu vyrůstání kotylárů nebrzdila, dokud nebyly tyto zdroje izolovány plastovým insertem, což mělo za následek výraznou inhibici růstu obou kotylárů. Při oboustranné aplikaci zdroje auxinu si tyto vzájemně brání v kanalizaci, zatímco při jejich izolaci plastovým insertem byla kanalizace pozorována a došlo ke vzniku dvou nezávislých auxinových kanálů. Analogii této kompetice lze předpokládat i v případě kotylárních pupenů, tedy dvou potenciálních zdrojů auxinu.

**Klíčová slova:** auxin, apikální dominance, kompetitivní kanalizace, polární transport auxinu, *PsPIN1*, *PsAUX1*, *PsDRM1*, *PsBRC1*

## ABSTRACT

Macoszek, O. *Effect of auxin transport in regulation of cotyledonary bud outgrowth in pea plants*. Thesis. Brno 2016.

The diploma thesis was aimed on role of polar auxin transport in regulation of cotyledonary bud outgrowth in pea plants (*Pisum sativum* L.) in relation to competitive canalization of auxin sources. Decapitation of growth apex, as primary source of auxin, causes release of cotyledonary buds from inhibition. This was followed by increased expression of genes for auxin transport proteins *PsPIN1* and *PsAUX1* and decrease in *PsDRM1* and *PsBRI* gene expression that are related to dormant state of plant tissues. In the next phase, different types of exogenous auxin application on decapitated stumps and cotyledonary bud growth dynamic were carried out. Auxin application on decapitated stump caused inhibition of cotyledonary bud growth, its application on right or left side of the stump inhibits cotyledonary bud on the side of application. If auxin on the both sides of stump was applied, cotyledonary bud growth was not inhibited, on contrary to their separation with a plastic sheet, which resulted in significant growth inhibition of both buds. In case of both-sided application, these sources of auxin prevents each other in canalization. If these two sources of auxin were separated with a plastic sheet, canalization of auxin flow was observed and two independent auxin channels were formed. Analogy of this competition can be expected in the case of cotyledonary buds, as two potential auxin sources.

**Key words:** auxin, apical dominance, competitive canalization, polar auxin transport, *PsPIN1*, *PsAUX1*, *PsDRM1*, *PsBRC1*

## OBSAH

1 ÚVOD.....	8
2 CÍL PRÁCE .....	9
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED .....	10
3.1 Auxin .....	10
3.1.1 Historie objevu auxinu.....	10
3.1.2 Biosyntéza auxinu.....	11
3.1.3 Přirozené a syntetické auxiny .....	12
3.1.4 Fyziologické účinky auxinu.....	14
3.2 Signalizace auxinu .....	16
3.2.1 Auxinem zprostředkovaná regulace transkripce.....	17
3.2.2 Receptory auxinu .....	18
3.2.3 Model signální dráhy .....	19
3.3 Transport auxinu .....	20
3.3.1 Chemiosmotická hypotéza .....	21
3.3.2 Proteiny AUX/LAX.....	22
3.3.3 PIN proteiny.....	23
3.3.4 ABCB transportní proteiny.....	26
3.4 Apikální dominance.....	28
3.4.1 Historie výzkumu apikální dominance .....	29
3.4.2 Teorie kompetitivní kanalizace toku auxinu.....	30
4 MATERIÁL A METODIKA.....	33
4.1 Rostlinný materiál.....	33

4.2	Genová exprese proteinů transportujících auxin .....	33
4.2.1	Založení experimentu a odběr vzorků .....	33
4.2.2	Izolace RNA .....	33
4.2.3	Měření koncentrace RNA .....	34
4.2.4	Reverzní transkripce (RT) .....	34
4.2.5	Kvantitativní PCR.....	36
4.3	Růstové křivky kotylárních pupenů/výhonů.....	37
4.3.1	Založení experimentů a průběžné měření .....	37
4.4	Imunoanalýza PIN1 proteinu .....	38
4.4.1	Založení experimentu a odběr vzorků .....	38
4.4.2	Fixace.....	39
4.4.3	Odvodnění segmentů a jejich zalévání do parafínu .....	39
4.4.4	Řezání segmentů .....	40
4.4.5	Odparafínování a následná rehydratace .....	40
4.4.6	Blokování a inkubace s 1. protilátkou .....	40
4.4.7	Blokování a inkubace s 2. protilátkou .....	41
4.4.8	Zalévání skel a finální úpravy.....	41
5	VÝSLEDKY .....	42
5.1	Růstové křivky.....	42
5.2	Expres vybraných genů .....	46
	<i>PsPIN1</i> .....	46
	<i>PsAUX1</i> .....	47
	<i>PsDRM1</i> .....	47
	<i>PsBRC1</i> .....	48
5.3	Imunolokalizace PIN1 proteinu .....	49



5.3.1 Model dekapitace, plast a aplikace IAA .....	49
5.3.2 Kotylární pupeny a výhony.....	51
6 DISKUSE.....	52
7 ZÁVĚR.....	54
8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY .....	56
9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK .....	65
10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	66

# 1 ÚVOD

Celá nadzemní část těla rostlin vzniká z primárního meristému stonku, ten neustále produkuje nové struktury, např. stonkové buňky a primordia listů, ze kterých se vyvinou listy a v jejichž úžlabí se vytvoří sekundární stonkové meristémy. Z těchto sekundárních meristémů se vytvářejí pupeny, které obsahují základy listů a terciálních meristémů. Celistvost a plasticita vývoje těl rostlin je tedy z velké části umožněna právě díky stonkovému primárnímu meristému.

Apikální dominance je regulační mechanismus, ve kterém primární stonkový apikální meristém kontroluje růst meristémů vyšších řádů. Rostlinný hormon auxin, který se tvoří ve vrcholu stonku a v mladých listech, je s tímto jevem nejvíce spojován. Transport auxinu je lokalizován v buňkách xylémového parenchymu, jeho směr je bazipetální a je zprostředkován pomocí membránových přenašečů. Vstupními přenašeči auxinu jsou AUX1/LAX proteiny, jeho výstup je pak zprostředkován proteiny rodiny PIN. Tento hlavní tok auxinu znemožňuje export auxinu z postranních meristémů a udržuje je tak v růstové inhibici.

Pokud během života rostliny dojde ke ztrátě růstového vrcholu nad dělohami, je jeho funkce nahrazena meristémy kotylárních pupenů, které jsou uvolněny z inhibice a jsou schopny produkovat vlastní auxin a stávají se tak jeho novým zdrojem. V další fázi se jeden z nich stává novým růstovým vrcholem a obnoví se tak počáteční stav.

V této práci byla pomocí různých experimentálních přístupů sledována kompetice kotylárních pupenů po jejich uvolnění z růstové inhibice. Dále exprese genů *PsPIN1*, *PsAUX1*, potřebných pro syntézu membránových přenašečových proteinů auxinu a exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1*, které plní funkci markeru dormance. Také byla sledována problematika polarizace proteinů PIN1.

## **2 CÍL PRÁCE**

1. Seznámení se s problematikou studia imunolokalizace proteinů a genové exprese u rostlin.
2. Zpracování dostupných literárních zdrojů, především problematiku signalizace, transport auxinu a jeho úlohu v apikální dominanci.
3. Praktické provedení experimentů s porušením apikální dominance spojené s dekapitací klíčnicích rostlin, aplikací IAA na různá místa a použití izolovaných zářezů. Dále studium změny exprese vybraných genů v kotylárních pupenech hrachu setého a imunolokalizace proteinu PIN1.
4. Zpracování a diskutování vlastních výsledků do závěrečné práce.

## 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

### 3.1 Auxin

Termín auxin je odvozen z řeckého slova auxein, které v překladu znamená růst, prodlužovat se. Má zásadní vliv ve vývojových a morfogenetických procesech založených na prodlužování buněk a diferenciálním dělení. Auxin je produkován v nadzemních částech těl rostlin, především pak v mladých vrcholových tkáních. Na buněčné úrovni se podílí na regulaci buněčného cyklu, stimulaci elongace, regulaci diferenciace (vodivá pletiva) a pravděpodobně i na založení a udržení buněčné polarity. Jeho orgánové a meziorgánové funkce jsou udržení apikální dominance, stimulace rhizogeneze, tropismy (fototropismus a gravitropismus stonku- podporuje růst stonku na straně vyšší koncentrace, gravitropismus kořene- zde naopak stimuluje růst strany kořene s nižší koncentrací).

Auxin řadíme mezi morfogeny, protože jeho regulační účinky závisí na konkrétní dávce. V regulaci rostlinného růstu a vývoje zaujímá klíčové postavení mezi fytohormony, má svůj význam také v odpovědích na změny podmínek vnějšího prostředí (Tromas a Rechenmann, 2010). Jeho biosyntéza je regulována environmentálními a vývojovými signály (Zhao, 2010).

Hladina auxinu v rostlinách se v průběhu životního cyklu a napříč jejich tělem dramaticky mění. Dochází tak ke vzniku gradientů, tyto jsou pak klíčovým komponentem účinku auxinu v rostlinách. Hladina auxinu v buňce se může měnit v závislosti na jeho metabolismu a transportu. Oba tyto procesy jsou zapojeny do mechanismu modulace rostlinného vývoje auxinem (Petrášek a Friml, 2009). Rostliny si vyvinuly složité regulační sítě s velkou redundancí a plasticitou, aby byly schopny zabezpečit dostatečnou hladinu auxinu pro odpověď na změny environmentálních a vývojových podmínek.

#### 3.1.1 Historie objevu auxinu

Jedním z prvních vědců zabývajících se studiem rostlinných růstových regulací byl Charles Darwin, který ve své knize *The power of movement in plants* popsal vliv světla na ohyb koleoptilí klíčnicích rostlin trav (*Phalaris canariensis*). Na Darwinovi experimenty navázal Boysen-Jensen (1913), který po odstranění špiček koleoptilí sledoval zastavení růstu rostliny. Předpokládal existenci určité látky ve špičce koleoptile, která

kontroluje rostlinný růst, a následně pomocí experimentů s máslem dokázal, že se tato látka rozpouští ve vodě, ale v tucích ne. Protože použití platinové fólie růst také zastavilo, usoudil, že signál bude povahy chemické, nikoliv elektrické. Dále na experimenty s koleoptilemi navázal Paál (1918), který studoval růst koleoptilí ve tmě a předpokládal, že špička produkuje látku, která putuje směrem dolů, stimuluje růst a světlo způsobí akumulaci této látky na stinné straně koleoptile. V roce 1926 Went izoloval onu látku do agarového bločku, který umístil na určitý čas pod koleoptile. Následně umístil bloček na vrchol dekapitované rostliny a ta pokračovala v růstu. V roce 1931 Kögl a Haagen-Smit izolovali z lidské moči látku auxin A. Později v roce 1933 Kögl našel v lidské moči další látky strukturou a funkcí podobné auxinu A, jednou z nich byla kyselina indolyl-3-octová (IAA). Její přítomnost ve vyšších rostlinách byla prokázána až v roce 1946. Výbor rostlinných fyziologů v roce 1954 charakterizoval auxiny, jako látky tvořené rostlinami, mající podobnou aktivitu jako IAA - první auxin izolovaný z rostliny (shrnutí v Arteca, 1996).

### 3.1.2 Biosyntéza auxinu

V pochopení biosyntézy, transportu a signalizace auxinu byl v posledních letech učiněn velký pokrok. Biosyntéza auxinu je procesem velmi komplexním. Auxin v rostlinách vzniká *de novo* několika způsoby a může být také uvolněn z konjugátů hydrolytickým štěpením IAA-aminokyselin, IAA-cukrů (především glukózy) nebo IAA-metyl esteru (Zhao, 2010). Poznatky o biosyntetických drahách auxinu pochází z metod se značenými izotopy. U rostlin rozlišujeme dvě hlavní biosyntetické dráhy auxinu: na tryptofanu (Trp)-závislou a na Trp-nezávislou (Woodward a Bartel, 2005). U Trp-nezávislé dráhy je prekurzorem IAA pravděpodobně indol-3-glycerolfosfát nebo indol, ale o tomto způsobu syntézy IAA prozatím mnoho nevíme. Důkazem existence této dráhy jsou mutantní rostliny s deficientní syntézou Trp.

*De novo* syntéza auxinu je chápána jako syntéza indolového heterocyklu z nearomatického prekurzoru. Jediným známým přírodním zdrojem látek obsahujících indolový kruh jsou látky šikimátové metabolické dráhy. Aminokyselina Trp obsahuje všechny uhlíky a strukturální prvky nezbytné pro tvorbu IAA (Normanly *et al.* 2004).

U Trp-závislých drah je Trp syntetizován ve chloroplastu. U rostlin můžeme najít evolučně konzervované jádro mechanismu syntézy auxinu, protože IAA je nezbytná

v jejich životním cyklu. Jednotlivé druhy rostlin si však vyvinuly své vlastní strategie a modifikace pro optimalizaci jejich metabolických drah (Mano a Nemoto, 2012).

Rostliny mohou přeměňovat tryptofan na IAA několika různými způsoby. Momentálně jsou popsány čtyři různé dráhy biosyntézy IAA, které nejsou zcela oddělené, obsahují různé meziprodukty a také se v některých fázích prolínají. Rozlišujeme dráhu tryptaminovou (TAM), indolyl-3-acetamidovou (IAM), indolyl-3-pyruvátovou (IPA) a indolyl-3-acetaldoximovou (IAOX). Dráha IAOX, není v rostlinné říši příliš rozšířena, ale můžeme ji nalézt například u *Arabidopsis thaliana* (Zhao, 2010).

Dráha IAM je známa u velkého počtu druhů rostlin a některých fytopatogenních bakterií, např. *Agrobacterium tumefaciens*. Mechanismus přeměny indolyl-3-acetamidu na IAA není zcela objasněn. K jeho přeměně dochází pravděpodobně pomocí amidázy 1.

Mezi vyššími rostlinami je pravděpodobně nejrozšířenější dráhou IPA. V tomto případě je Trp přeměněn na kyselinu indolyl-3-pyrohroznovou enzymem aminotransferázou 1 (TAA1). Následnou dekarboxylací vznikne indolyl-3-acetaldehyd, tento je dále oxidován až na IAA (Mashiguchi *et al.* 2011).

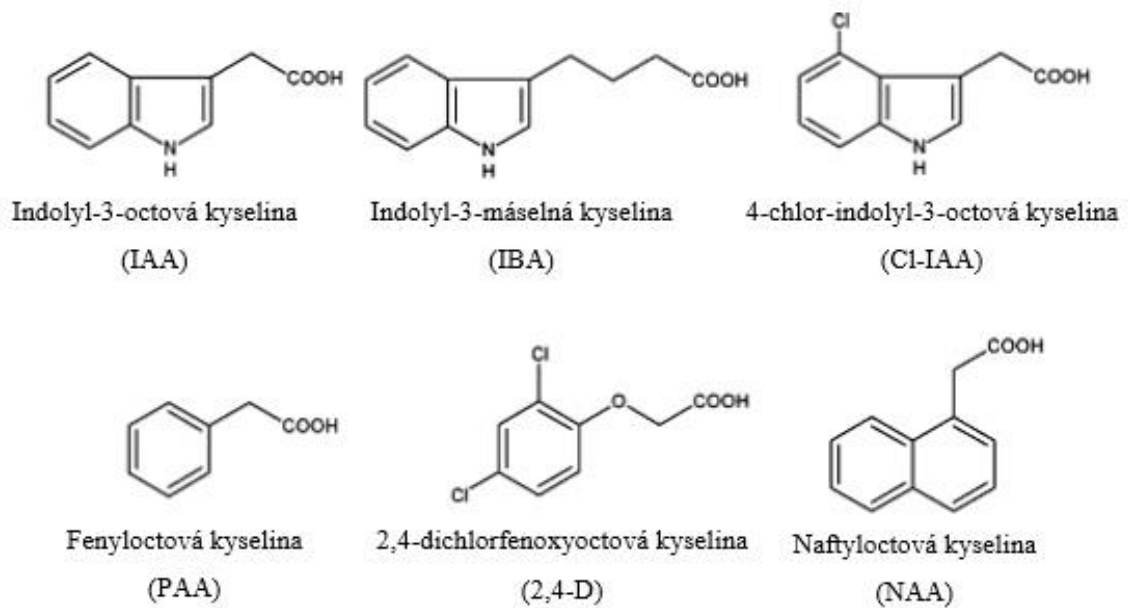
Dráha TMA je díky dobře popsané genové regulaci a její souvislosti s geny YUCCA v posledních letech drahou, ke které se upírá největší zájem vědců. Zde je zprvu Trp dekarboxylován na tryptamin enzymem tryptofandekarboxylázou. Dále dojde k hydroxylaci aminové skupiny tryptaminu, toto se děje díky účasti produktů genů YUCCA a vzniká tak N-hydroxyl-tryptamin. Následně dojde k finální modifikaci a ke vzniku IAA (Woodward a Bartel, 2005).

### **3.1.3 Přírodní a syntetické auxiny**

V rostlinách se podařilo nalézt mnoho sloučenin indolu, které byly i často metabolicky spojeny s IAA. Tyto sloučeniny avšak postrádaly biologickou aktivitu, proto byla IAA po dlouhou dobu považována za jediný přírodní auxin. Další přírodní auxiny byly v rostlinách identifikovány až po zavedení citlivějších analytických metod, konkrétně 4-chlor-IAA a kyselina indolyl-3-máselná (IBA). Halogenovaný derivát 4-Cl-IAA, nalezen v hrachu (jiných zástupcích čeledi bobovité, semenech borovice), má v mnoha biologických testech větší aktivitu než IAA. Byl popsán jeho klíčový význam při vývoji

lusků hrachu, kde pravděpodobně stimuluje syntézu giberelinů (Ngo *et al.* 2002). IBA byla díky své schopnosti výrazně stimulovat růst adventivních kořenů používána komerčně k vegetativnímu rozmnožování rostlin, díky její vlastnosti lépe odolávat katabolickým reakcím než IAA (Bartel *et al.* 2001). Mezi další přirozené auxiny řadíme i kyselinu fenyloctovou (PAA), která není přítomna ve všech rostlinách, oproti IAA je její účinnost značně nižší a koncentrace řádově vyšší. Nejvyšší obsah PAA byl nalezen v plodech ovocných dřevin (Procházka *et al.* 1998).

Při dalším výzkumu látek vykazujících růstově regulační aktivitu byly nalezeny některé syntetické látky, které mají podobné účinky jako IAA. Obecně jsou tyto látky nazývány syntetické auxiny. V jejich struktuře nalezneme aromatický kruhový systém (neplatí pro alkyltiokarbamáty), který v postranním řetězci obsahuje karboxylovou skupinu nebo skupinu na ni snadno převeditelnou. Jsou to slabé organické kyseliny, přičemž se mezi karboxylovou skupinou a aromatickým kruhem musí nacházet nejméně jeden atom uhlíku nebo kyslíku. Syntetické auxiny můžeme rozdělit do několika skupin: naftalenové kyseliny - nejdůležitější je  $\alpha$ -naftyl-octová kyselina (NAA); chlorfenoxykyseliny - kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D), kyselina 2,4,5-trichlorfenoxyoctová (2,4,5-T) a 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina (MCPA); benzoové kyseliny- 2,3,6-trichlorbenzoová kyselina a dicamba; poslední skupinu tvoří deriváty kyseliny pikolinové- picloram (Procházka *et al.* 1998).



Obr. 3.1 Struktury vybraných auxinů. Upraveno podle Bajguz a Piotrowska (2009).

### 3.1.4 Fyziologické účinky auxinu

#### *Stimulace prodlužovacího růstu*

Jednou z nejvýraznějších rostlinných odpovědí na hormonální signál je auxinem stimulovaný prodlužovací růst buněk. V izolovaných stoncích a koleoptilích se odpověď dostaví během deseti minut po přidání auxinu a rychlost růstu se zvýší pět až desetkrát. Je třeba podotknout, že auxin není jediným hormonem podílejícím se na iniciaci prodlužovacího růstu - gibereliny a brasinosteroidy jsou klíčové pro maximální prodloužení buněk, zatímco etylén a cytokininy mohou tento jev zpomalit. Efekt auxinu na prodlužovací růst nemusí být vždy pozitivní, v kořeni jeho přítomnost prodlužovací růst zpomaluje (Evans *et al.* 1994). Proces růstu buňky je spojen se dvěma navzájem spojenými procesy - příjmem vody osmózou, který je poháněn gradientem vodního potenciálu napříč plazmatickou membránou a roztažením buněčné stěny, které je poháněno turgor-generovaným stresem uvnitř buňky. Aby mohl auxin ovlivnit prodlužovací růst, musí se navázat na receptor, který se nachází na plasmatické membráně, tedy uvnitř buňky. Pro zvětšení objemu buňky je třeba rozvolnění buněčné stěny, které je lokalizováno vně buňky. Musí tedy existovat chemické signály, které zprostředkují komunikaci mezi buňkou a buněčnou stěnou, tyto nazýváme faktory rozvolňování buněčné stěny (WLF-



wall- loosening factor) a později objevené proteiny rozvolňující buněčnou stěnu (WLP) např. expansin (Cosgrove, 2002). Jako WLF byly popsány protony, dále pravděpodobně hydroxylový radikál. Toto rozvolnění důsledkem okyselení však nevysvětluje celý proces, musí tedy existovat i jiné faktory nebo proteiny (Cleland, 1992).

### ***Fototropismus***

Jedná se o ohyb, ke kterému došlo následkem jednostranného působení světla. Rozhodující je zde rozdíl v intenzitě osvětlení orgánu a jeho vlnová délka, nikoliv směr světla (Procházka *et al.* 1998). Chlodny-Wentova teorie předpokládala, že při jednostranném osvětlení dojde k transportu auxinu směrem do strany neosvětlené. To má za následek vyšší koncentraci auxinu na stinné straně, než na straně osvětlené. Tato nerovnoměrná distribuce auxinu zapříčiní odpověď - ohyb (Arteca, 1996).

### ***Geotropismus***

Geotropismus je ohyb části rostlinného těla vyvolaný gravitací. Pokud rostlinu umístíme ve vodorovném směru, stonek se ohne nahoru proti směru gravitace- negativní geotropismus, naopak kořen se ohne dolů (po směru gravitace) - pozitivní geotropismus. Rostliny jsou schopny vnímat tyto změny gravitace pomocí statolitů- plastidů obsahujících škrobová zrna. Buňky obsahující statolity pak nazýváme statocyty. Tyto buňky jsou lokalizovány hlavně v kořenové špičce, její ztráta následně vede ke ztrátě schopnosti reagovat na změny zemské tíže. Chlodny-Wentova teorie geotropismu předpokládá, že auxin se akumuluje na spodní straně, ve stonku jeho vyšší koncentrace stimuluje růst spodní strany a to způsobí ohyb směrem nahoru. U kořene má auxin schopnost inhibice růstu, předpokládá se tedy, že jeho vyšší koncentrace na spodní straně zapříčiní inhibici růstu této strany, zatímco horní strana pokračuje v růstu normální rychlostí. Toto má za následek ohyb kořene směrem dolů (Evans, 1985).

### ***Růst plodů***

Růst plodů je z velké míry způsoben zvětšující se velikostí buněk. O auxinech je známo, že hrají podstatnou roli v procesu buněčného růstu a mají klíčový podíl ve specifickém růstu plodu. Prvním důkazem pro tuto hypotézu je korelace mezi vývojem semene a finální velikostí a tvarem plodu. Druhým důkazem je vliv auxinu na některé druhy plodů ve specifických fázích vývoje. Výborným příkladem je experiment, při kterém odstraníme nažky u jahody a pozorujeme zastavení růstu, pokud však nažky odstraníme a aplikujeme na jejich místo auxin, dojde k normálnímu růstu (Nitsch, 1950).

### ***Iniciace růstu kořenů***

Prvním člověkem, který předpokládal, že se v mladých listech a rostoucích pupenech tvoří přenosná látka, která stimuluje tvorbu kořenů, byl Julius von Sachs (1880). V tomto spočívá praktické využití auxinů, jako stimulatorů zakořeňování stonkových segmentů. Prodlužovací růst kořene je však inhibován, dokud koncentrace auxinu neklesne. Tato inhibice byla spojována se schopností auxinu stimulovat produkci etylénu, bylo ale prokázáno, že tento inhibiční jev je možno pozorovat beze změn syntézy etylénu (Eliasson *et al.* 1989).

Auxin má vliv na mnoho dalších fyziologických a vývojových procesů, např. stimulace dělení kambiálních buněk, zpoždění senescence listů, opad plodů a listů, schopností mladých plodů atrahovat asimiláty, zrání plodů, podpora kvetení (Broméliovitých) a další. Problematice diferenciac vaskulárních svazků a fenoménu apikální dominance byla v této práci věnována zvláštní kapitola, proto zde nejsou popsány.

## **3.2 Signalizace auxinu**

Pro pochopení problematiky vlivu rostlinných hormonů na vývoj rostlin je důležité popsat mechanismus jejich účinku, tedy popsat, jaké děje v rostlinách vyvolávají. V obecném modelu je signální dráha aktivována v momentu, kdy buňka zaznamená přítomnost hormonu, v tomto případě auxinu. Toto je možno díky receptorům, které jsou rozmístěny napříč buňkou, popř. na povrchu buňky. Receptory tedy mají za úkol rozpoznat auxin a vázat ho specificky a s vysokou afinitou. Tato vazba receptor-hormon vyvolá sérii biochemických a molekulárních procesů, které následně vedou k pozorovatelné růstové odpovědi (Davies, 2004).

V životním cyklu rostlin můžeme najít pouze několik vývojových procesů, které nejsou nikterak ovlivněny auxinem. Okolo roku 1980 bylo popsáno, že auxin reguluje transkripci mnoha genů (Quint a Gray, 2006). Ačkoliv kompletní molekulární mechanismus rozpoznání auxinu a přenosu jeho signálu není zcela objasněn, podařilo se v posledních letech identifikovat několik klíčových regulačních komponent této signální dráhy (Hagen *et al.* 2004), které vedly k pokroku v pochopení celé problematiky.

### 3.2.1 Auxinem zprostředkovaná regulace transkripce

Z dřívějších dob je známa schopnost auxinu výrazně a také efektivně ovlivňovat transkripci mnoha genů. Změna jejich exprese je pozorovatelná velmi rychle a odpověď na exogenně aplikovaný auxin se dostaví řádově mezi dvěma až patnácti minutami (Abel *et al.* 1994). Tyto označujeme jako geny primární odpovědi na auxin a můžeme je rozdělit do tří hlavních skupin: *SAUR* (*small auxin-up RNA*), *GH3* a *AUX/IAA*.

#### ***SAUR***

Geny *SAUR* jsou schopny vyvolat jednu z nejrychlejších auxinem indukovaných odpovědí, jakou můžeme u rostlin najít. Tyto geny byly objeveny v sóji a zvýšení jejich transkripce po exogenní aplikaci auxinu můžeme pozorovat už za dvě až pět minut. Jejich fyziologická funkce zatím není zcela objasněna, ale byla popsána schopnost *SAUR* proteinů vázat v závislosti na hladině vápníku kalmodulin (Yang a Poovaiah, 2000). *SAUR* transkripty jsou vysoce nestabilní, za tuto vlastnost může pravděpodobně DST element, který se nachází v jejich nepřepisované oblasti. Často jsou uspořádány na chromozómu v klastrech za sebou, u *Arabidopsis* je popsáno asi sedmdesát genů *SAUR* (Hagen a Guilfoyle, 2002).

#### ***GH3***

Původně byly identifikovány jako auxin inducibilní geny v hypokotylech sóji. Geny *GH3* kódují enzym, který katalyzuje konjugaci auxinu s aminokyselinami a tímto vznikne inaktivovaná zásobní forma auxinu (Gee *et al.* 1991). Tento *GH3* enzym je odpovědný za homeostatickou zpětnovazebnou regulační „smyčku“, která kontroluje vnitrobuněčnou hladinu auxinu (Hayashi, 2012), je lokalizován v cytoplasmě a je poměrně stabilní. Byla popsána jejich role v propojení signalizace auxinu a kyseliny jasmonové a také ve světelném signalingu (Hsieh *et al.* 2000).

#### ***AUX/IAA***

*AUX/IAA* sekvence byly poprvé popsány v sóji a hrachu jako mRNA, jejichž hladina se zvýšila mezi deseti až dvaceti minutami po exogenní aplikaci auxinu. Bylo lokalizováno několik *AUX/IAA* proteinů v jádrech buněk u hrachu. Tyto proteiny přežívají asi šest až osmdesát minut a hrají klíčovou roli v signální dráze auxinu zprostředkované regulací genové exprese (Hayashi, 2012). *AUX/IAA* geny tedy kódují krátce žijící jaderné proteiny, které fungují jako nestabilní represory regulující auxinem indukovanou genovou

expresi (Worley *et al.* 2000). Většina AUX/IAA proteinů je složena ze čtyř konzervovaných motivů, označovaných jako domény I, II, III, IV, přičemž každá z nich se skládá ze sedmi až čtyřiceti aminokyselin. Další výzkum odhalil, že jednotlivé domény mají specifické funkce (Guilfoyle a Hagen, 2001). AUX/IAA proteiny mohou tvořit dimery, sami se sebou nebo s faktory auxinové odpovědi ARF (auxine response factors), díky motivům na C-koncích domén III a IV. Motiv nacházející se v doméně II funguje jako signál pro degradaci proteinu a doména I kontroluje represorovou aktivitu AUX/IAA proteinu (Tiwari *et al.* 2001).

Promotory několika genů, jejichž exprese je ovlivněna auxinem, byly detailněji studovány. V promotorech tří hlavních skupin auxinem regulovaných genů byly nalezeny elementy auxinové odpovědi - AuxRE (Auxin-responsive elements). V genu *AUX/IAA* u hrachu byl nalezen AuxRE se sekvencí GTCCCAT. V promotoru genu *GH3* u sóji byly nalezeny tři nezávislé AuxRE, obsahující motiv TGTCTC, v genech *SAUR* sóji byly nalezeny oba tyto motivy. Díky těmto poznatkům byl s pomocí syntetického AuxRE obsahujícího opakující se sekvence TGTCTC izolován protein, který se specificky váže na DNA, tento byl pojmenován Auxin Response Factor 1 (Ulmasov *et al.* 1997). ARF proteiny nasedají na promotory genů, které svou expresí odpovídají na auxin a podporují nebo stimulují expresi cílových genů. Smyčku uzavírají AUX/IAA proteiny, které jsou produkty auxinem indukovaných genů, tyto proteiny mohou přímo nasedat na ARF a tímto inhibovat expresi ARF indukovaných genů (Woodward a Bartel, 2005).

### **3.2.2 Receptory auxinu**

První byl izolován protein, který specificky a s vysokou afinitou vázal auxin, tento byl pojmenován auxin vázající protein ABP1 (auxin-binding protein 1). ABP1 byl nalezen v mnoha rostlinných druzích včetně rýže a *Arabidopsis* (Paciorek a Friml, 2006). Navzdory jeho schopnosti vázat auxin není jeho fyziologická funkce zcela objasněna, protože hodně ABP1 je lokalizováno v endoplasmatickém retikulu, kde je pH příliš vysoké pro efektivní vazbu auxinu (Henderson *et al.* 1997). Ačkoliv část ABP1 je lokalizována na plazmatické membráně a pomocí experimentů s protilátkami byla nalezena jeho spjitost s auxinem zprostředkovaným zvětšováním buňky, nehraje roli ve změnách exprese genů regulovaných auxinem (Quint a Gray, 2006).

S využitím genetických přístupů byly získány mutantní rostliny, které byly rezistentní k inhibičnímu efektu auxinu prodlužovat kořeny rostlin. Prvním popsáným genem odpovídajícím za daný efekt je *AXR1* (auxin resistant1), který nekóduje přímo receptor, ale protein spojený s ubiquitinem aktivovanou degradací (Leyser *et al.* 1993). Z těchto výsledků se dalo předpokládat, že proteolýza hraje důležitou roli v odpovědi rostlin na auxin.

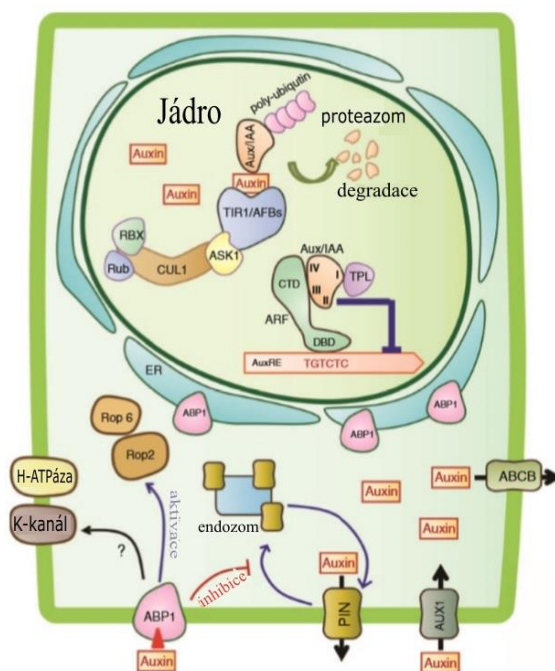
Primárním receptorem auxinu je TIR1 (transport inhibitor response 1) ze skupiny F-box proteinů (Dharmasiri *et al.* 2005a; Kepinski a Leyser, 2005). F-box proteiny determinují substrátovou specifitu Skp1/Cullin/F-box (SCF) komplexů, které ubiquitinují cílové proteiny, tyto budou následně degradovány proteazomem. Auxin tedy stimuluje ubiquitinaci AUX/IAA prostřednictvím SCF<sup>TIR1</sup> komplexu, následně dojde k degradaci AUX/IAA, uvolnění ARF z inhibice a k transkripci auxinem indukovaných genů. TIR1 není jediným receptorem auxinu. Funkci receptoru auxinu plní i několik dalších F-box proteinů, např. AFB2, AFB4, AFB6 (Dharmasiri *et al.* 2005b).

Některé proteiny plazmatické membrány, včetně výstupních přenašečů auxinu, neustále recyklují ve vezikulech mezi cytoplazmatickou membránou a endozomálními kompartmenty. Existují látky, které jsou schopny tento proces zablokovat, např. brefeldin A-BFA (Geldner *et al.* 2001). Z experimentů tohoto typu lze předpokládat, že existuje ještě jiná TIR1 nezávislá signální dráha, která zprostředkovává netranskripční efekty auxinu. Kandidátem na receptor této dráhy, neovlivňující expresi genů, je již dříve zmíněný ABP1, který se pravděpodobně účastní v lokalizaci proteinů PIN, které kontrolují výstup auxinu z buňky (Hayashi, 2012). U *Arabidopsis* byla popsána funkce ABP1 proteinu v aktivaci Rho GTPázy ROP2 a ROP6 (Li *et al.* 2001). Dále aktivovat kanály kationtů draslíku a H-ATPázy a indukovat tak rychlou odpověď na auxin (Hayashi, 2012).

### 3.2.3 Model signální dráhy

Schéma signalizace auxinu zobrazené na obr. 3.2 popisuje děje, které auxin vyvolá v rostlinné buňce. Pokud auxin není navázán na svůj receptor, protein AUX/IAA se váže na ARF a celý tento dimer je připojený na AuxRE v promotoru genů auxinové odpovědi a přepis těchto genů je takto inhibován. Receptorem auxinu je tedy TIR1/AFB protein z rodiny F-box, který formuje SCF E3 ubiquitin ligázový komplex mezi SKP (AKK1) a kulinem1 (CUL1). Za přítomnosti auxinu katalyzuje SCF<sup>TIR1</sup> ubiquitinaci

proteinů AUX/IAA, které svou vazbou blokují aktivitu transkripčních faktorů ARF. Pokud se auxin naváže na TIR1, způsobí tak proteolytickou degradaci AUX/IAA repressoru, uvolnění ARF z inhibice a následnou transkripci genů auxinové odpovědi (Hayashi, 2012).



Obr. 3.2 Model signalizace auxinu v buňce. Upraveno podle Hayashi 2012.

### 3.3 Transport auxinu

Auxin je v rostlinách syntetizován lokálně v mladých rostoucích orgánech, hlavně ve stonkových vrcholech, mladých listech a vyvíjejících se semenech. Distribuce přirozených auxinů (IAA) v rostlinném organismu je realizována dvěma způsoby, poměrně rychlým, nesměrovaným transportem auxinu ve floému (transport na dlouhé vzdálenosti) a pomalejším, směrovaným, tzv. polárním transportem z buňky do buňky (Friml a Palme, 2002). Transport auxinu na dlouhé vzdálenosti byl dokázán pomocí radioaktivně značených molekul auxinu (Morris a Thomas, 1978). Experimenty s rostlinami hrachu ukázaly, že radioaktivně značený auxin ve floému byl později detekován i v polárním transportu auxinu (PAT). Toto zjištění naznačuje, že oba typy transportu mohou být propojeny (Cambridge a Morris, 1996).

Oproti floémovému transportu je PAT specifický pro volný aktivní auxin, pomalejší – asi  $10 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$  (Goldsmith, 1977), probíhá z buňky do buňky a má jednosměrný charakter. Transport ve stonku probíhá bazipetálně, tedy z apexu směrem k bázi. Pomocí metod s radioaktivně značeným auxinem byl tento transport lokalizován v kambiu a v přilehlých buňkách, částečně diferenciovaném xylému (Morris a Thomas, 1978). V kořeni PAT pokračuje akropetálně směrem ke kořenové špičce, kde je část auxinu přesměrována a transportována bazipetálně napříč epidermálními buňkami do elongační zóny kořene. Další poznatky ukázaly, že PAT vyžaduje energii a je citlivý k inhibitorům syntézy proteinů, dala se tedy předpokládat existence transportních proteinů. Tyto objevy vedly k formulaci koherentního modelu auxinu, tzv. chemiosmotické hypotézy (Rubery a Sheldrake, 1974).

Koordinovaný transport auxinu tvoří základ flexibilní sítě, která zprostředkovává odpověď na mnoho vývojových a environmentálních změn. Synergická a nezávislá aktivita jednotlivých auxinových transportérů může být regulována na různých úrovních, z evolučního hlediska je možno popsat funkce rozdílných skupin transportérů v rostlinném vývoji. Pro udržení směru toku auxinu napříč orgány a tkáněmi, jsou nezbytné transportní proteiny, které se mohou lišit funkcí nebo lokalizací (Zažímalová *et al.* 2010).

### 3.3.1 Chemiosmotická hypotéza

Jedná se o model transportu auxinu, který byl navržen v polovině sedmdesátých let (Rubery a Sheldrake, 1974). Pro pochopení mechanismu, který umožňuje molekulám auxinu prostoupit přes plazmatickou membránu, je důležitá fyzikálně-chemická povaha molekul auxinu. Protože všechny auxiny jsou slabé kyseliny, jejich molekulární forma (nedisociovaná nebo disociovaná) a také jejich schopnost prostupovat přes plazmatickou membránu, závisí na pH. Na plazmatické membráně se nacházejí protonové pumpy, díky kterým je hodnota pH apoplastu a symplastu rozdílná.

V poměrně kyselém prostředí buněčné stěny ( $\text{pH}=5,5$ ) se molekuly auxinu (hodnota disociační konstanty  $\text{pK}_a=4,85$ ) nachází pouze v částečně disociované formě. Molekuly se nachází v rovnovážném stavu, přičemž 83% je ve formě disociované (aniontové  $\text{IAA}^-$ ) a 17% ve formě nedisociované (proton-asociované  $\text{IAAH}$ ). Ačkoliv hydrofobní povaha indolové skupiny  $\text{IAA}$  umožňuje asociaci molekuly s povrchem plazmatické membrány, negativní náboj disociované karboxylové skupiny zabrání molekule v přechodu

přes membránu. V případě proton-asociované formy IAAH je umožněn přechod přes plazmatickou membránu na základě koncentračního gradientu pasivní difúzí, bez asistence přenašečového proteinu.

V cytoplazmě rostlinné buňky je průměrná hodnota pH=7. V tomto případě jsou téměř všechny molekuly IAA v disociované formě. Molekuly auxinu se tedy nemohou dostat přes plazmatickou membránu a buňka funguje jako slabá aniontová past, dokud nejsou disociované molekuly transportovány ven z buňky pomocí výstupních přenašečů. Polarita toku auxinu je tedy dána jeho asymetrickou distribucí v buňkách. Tento koncept je základem chemiosmotické polární difuze či chemiosmotického modelu (shrnutí v Zažímalová *et al.* 2010). Cesty auxinu ven z buňky mohou být ovlivněny použitím inhibitorů výstupu auxinu, např. kyselina 1-N-naftylftalamová a kyselina 2,3,5-trijodbenzoová (TIBA).

Hlavní poznatky problematiky PAT pochází z genetického výzkumu, především analýzy mutantních rostlin *Arabidopsis*. Bylo popsáno několik genů, souvisejících s PAT. Geny *RCN1* pravděpodobně kontrolují úroveň fosforylace a tedy i aktivitu některých komponentů PAT; gen *PID*, jehož produktem je serin-threonin protein kináza, která ovlivňuje negativně signalizaci auxinu a pozitivně jeho transport (Friml a Palme, 2002).

### 3.3.2 Proteiny AUX/LAX

Poprvé byla existence vstupních přenašečů auxinu zmíněna v roce 1974 Ruberym a Sheldrakem. Předpokládalo se, že příjem IAA je aktivní proces, řízený proton-motivními silami a že transport IAA do buňky probíhá symportem s protony. Další experimenty ukázaly, že syntetický auxin 2,4-D je substrátem pro přenašeče auxinu, zatímco lipofilní NAA může do buňky prostoupit pouze difúzí (Delbarre *et al.* 1996). V roce 1996 byl izolován gen *AUX1* a odvozeny mutantní rostliny *Arabidopsis- aux1*, které vykazují agravitropní reakci a rezistenci ke 2,4-D (Bennett *et al.* 1996). Gen *AUX1* je podobný genům kódujícím membránové přenašeče aminokyselin a IAA je strukturně podobná k tryptofanu. Tyto dva fakty vedly k hypotéze, že produktem genu *AUX1* je permeáza odpovědná za vstup auxinu do buňky. Později bylo dokázáno, že *AUX1* je vstupním přenašečem auxinu, který váže IAA v závislosti na pH, přičemž nejvyšší vaznost vykazuje při hodnotách pH=5-6 (Carrier *et al.* 2008).



Rodina transportérů AUXIN1/LIKE-AUX1 (AUX/LAX) je přenašeči auxinu do buňky a její homology byly nalezeny v celé rostlinné říši. Vzhledem k objevu sekvencí podobných AUX/LAX v jednobuněčných a některých kolonie formujících organismech, vznikly pravděpodobně dříve, než se vyvinuly suchozemské rostliny (De Smet *et al.* 2011). U *Arabidopsis AUX1* patří do malé genové rodiny, tvořené ze čtyř vysoce konzervovaných genů (*AUX1*, *LAX1*, *LAX2*, *LAX3*), které kódují trans-membránové proteiny. Ačkoliv díky jejich podobnosti lze předpokládat, že se vyvinuly z jednoho společného předchůdce, jejich exprese a funkce v rostlinném organismu jsou orgánově i tkáňově specifické (Swarup a Péret, 2012).

Nejlépe je popsána klíčová funkce AUX1 v gravitropické reakci kořene rostlin. AUX1 je hojně exprimován ve tkáních zapojených do vnímání zemské tíže, přenosu signálu a následné růstové odpovědi. Pomocí konfokální mikroskopie a pH sensorů bylo prokázáno, že dochází ke zvýšení pH apoplastu kořene, čemuž následuje větší výskyt IAA v disociované formě. Ve tkáních exprimujících AUX1 je pak příjem IAA aktivně pomocí přenašečů patnáctkrát vyšší než prostřednictvím pasivní difúze (Swarup *et al.* 2005).

Dále byla popsána funkce AUX/LAX proteinů při vývoji laterálních kořenů. Iniciací růstu laterálních kořenů začne ve chvíli, kdy se dvě sousedící buňky pericyklu začnou asymetricky vyvíjet a vytvoří tak primordium. Tento děj je spojen s vytvořením lokálního auxinového maxima v těchto buňkách, přičemž mutanti *aux1* mají o 50% méně laterálních kořenů než planá forma (Benková *et al.* 2003). Funkce AUX/LAX byla prokázána v mnoha dalších vývojových procesech, např. při vývoji kořenových vlásků, buněčné organizaci embrya, vaskulárním vývoji, vývoji apikálního háčku a v neposlední řadě při biotických interakcích (shrnutí v Swarup a Péret, 2012).

### 3.3.3 PIN proteiny

Proteiny rodiny PIN (PIN-FORMED) jsou spojovány s PAT od devadesátých let minulého století, ačkoliv první zmínky o mutantních rostlinách *pin-formed 1* (*pin1*) pochází z let padesátých (shrnutí v Zažimalová *et al.* 2010). Mutanty *pin1* vykazují především abnormální vývoj květů (needle-like inflorescence), dále také listů. Fenotyp charakteristický pro *pin1* rostliny je velmi podobný fenotypu plané formy, na který byly aplikovány chemické inhibitory transportu auxinu. Jelikož tyto mutanty vykazují i silnou redukci

bazipetálního transportu auxinu, dalo se předpokládat, že PIN1 je zapojený do procesu výstupu auxinu z buňky (Okada *et al.* 1991).

Gen *PIN1* kóduje transmembránový protein specifický pro rostliny, s topologií velmi podobnou ostatním přenašečovým proteinům. Proteiny PIN řadíme do skupiny sekundárních přenašečů, přenášejících látky přes membránu za využití energie elektrochemického gradientu na membráně samotné (Gälweiler *et al.* 1998). Byly izolovány homologní geny *PIN2*, *EIR1*, *AGR1*, *PIN3*, *PIN4* a *PIN7* (shrnutí v Michniewicz *et al.* 2007).

U *Arabidopsis* bylo popsáno osm sekvencí řazeným mezi PIN proteiny (Zažímalová *et al.* 2007). Tyto můžeme rozdělit do dvou podskupin, lišících se délkou hydrofilní smyčky uprostřed jejich polypeptidových řetězců. „Dlouhé“ proteiny PIN1-4 a PIN7, které se nachází na plazmatické membráně polárně lokalizovány a byla popsána jejich funkce - určovat směr toku auxinu (Wisniewska *et al.* 2006). Tyto „dlouhé“ PIN proteiny neustále cyklují mezi plazmatickou membránou a endozómy. V odpovědi na environmentální vlivy byla popsána jejich rychlá změna lokalizace mechanismem transcytózy (Zažímalová *et al.* 2010).

Ačkoliv všechny PIN proteiny hrají roli v transportu auxinu, mají jednotlivé PINy různou funkci ve vývojových procesech rostlin. Organogenezi a diferenciaci cévního pletiva zprostředkovává u *Arabidopsis* PIN1. PIN2 ovlivňuje gravitropickou reakci a PIN3 zprostředkovává fototropickou odpověď, resp. diferenciální růst stonku. Aktivita kořenového meristému je řízena PIN4 a v raném vývoji embrya je uplatněn PIN7. Zároveň vyřazení jedné skupiny PIN proteinů může být do určité míry kompenzováno ektopickou expresí jiné skupiny. Mutace více skupin PIN proteinů už často nemohou být takto kompenzovány a mohou být letální. Tato schopnost rostlin, kompenzovat deficit jedné skupiny PIN proteinů jinými, výrazně napomáhá plasticitě jejich vývoje (Vieten *et al.* 2005).

Kromě výše zmíněných „dlouhých“, existuje druhá podskupina PIN proteinů, jejichž centrální hydrofilní smyčka je částečně (PIN6) nebo značně (PIN5 a 8) redukována. Tyto „krátké“ PINy se nenacházejí na plazmatické membráně, ale jsou lokalizovány na vnitřních membránách, především PIN5 na endoplazmatickém retikulu. Toto vypovídá o jejich funkci při vnitrobuněčné distribuci auxinu a regulaci jeho homeostáze uvnitř

buňky. Kontrolují tedy dostupné množství aktivního auxinu pro různé vnitrobuněčné procesy (Mravec *et al.* 2009).

Podobně jako u ostatních proteinů může být aktivita proteinů PIN regulována na několika úrovních, např. regulace genové exprese, syntézy a maturace proteinů, stability proteinu uvnitř membrány, kompetitivní a nekompetitivní inhibice, post-translační modifikace (fosforylace a defosforylace) a degradace samotného proteinu (Zažímalová *et al.* 2007).

### ***Polární lokalizace proteinů PIN***

Jedná se o klíčový prvek při směřování PAT v průběhu embryogeneze a organogeneze, je kontrolována a regulována několika způsoby. Proteiny PIN neustále cyklují mezi plazmatickou membránou a endozomálními kompartmenty. Tohoto procesu se účastní protein GNOM, kódující guanin nukleotidové výměnné faktory pro malé G-proteiny skupiny ARF. Tento protein pravděpodobně hraje roli při tvorbě exocytických vezikul na endozómech zodpovědných za včlenění proteinů PIN do plazmatické membrány (Vieten *et al.* 2007). GNOM je citlivý k BFA a pravděpodobně se neúčastní cyklování všech PIN proteinů. Cyklování bazálně lokalizovaného PIN1 je GNOM závislé, naopak cyklování apikálně lokalizovaného PIN2 je GNOM nezávislé (zde hraje roli protein SORTING NEXIN 1, který je také citlivý k BFA), (Jaillais *et al.* 2006).

Polární lokalizace proteinů PIN je dále ovlivněna proteinem PINOID (PID), serin-threonin protein kinázou. PINOID funguje jako dvoupolohový přepínač. Pokud je jeho hladina v podprahových hodnotách, směřuje PIN proteiny bazálně (směrem ke kořenové špičce). V opačném případě, pokud je jeho hladina nad prahovou hodnotou, lokalizuje PIN proteiny apikálně. Mechanismem účinku je zde míra fosforylace (Zažímalová *et al.* 2007). Některé aspekty mutantních rostlin se ztrátou funkce genu *pinoid* se podobaly mutantům *pin1* (poruchy fyloxy a vývoje květů). Mutace vykazující zvýšenou expresi genu *PID* má za následek narušení toku auxinu a následně kolaps meristému primárního kořene (Friml *et al.* 2004).

Složení samotné plazmatické membrány podmiňuje vhodné prostředí pro proteinové interakce a může tak ovlivnit efektivitu transportu auxinu přes membránu. Skladba membránových sterolů, která závisí především na aktivitě enzymů STEROL-METHYL TRANSFERÁZY (STM1) a CYKLOPROPYL IZOMERÁZY 1 (CPI1), je klíčová pro

umístění některých PIN proteinů napříč membránou (Petrášek a Friml, 2009). Mutantní rostliny *stm1* vykazují poruchy distribuce auxinu, meristémové aktivity a buněčné polarity (Willemsen *et al.* 2003).

### 3.3.4 ABCB transportní proteiny

Skupina proteinů ABC tvoří jednu z nejpočetnějších rodin transportérových proteinů a jejich činnost je spojena s pohybem široké škály malých molekul, živin a xenobiotik (Verrier *et al.* 2008). Rostlinné ortology savčích ATP-binding cassette proteinů podrodiny B (ABCB) se řadí mezi transportéry rodiny multi-drug resistance/phosphoglycoprotein (ABCB/MDR/PGP).

I přesto, že některé proteiny této rodiny (ABCB1, ABCB4 a ABCB19) vykazují afinitu k inhibitorům auxinového transportu, především pak ke kyselině 1-naftylftalamové (Murphy *et al.* 2002), nedá se mutace genů *PGP* napodobit aplikací tohoto inhibitoru, jak je tomu možné u proteinů rodiny PIN (Noh *et al.* 2001). MDR1 (také známý jako PGP19) byl původně objeven v *Arabidopsis* a byl spojován s funkcí iontových kanálů, ale analýza mutantů *mdr1* a jeho blízkého homologu PGP1 odhalila jeho úlohu při transportu auxinu. Mutace genů *PGP* způsobí různé vývojové defekty, které jsou spojeny se změnou auxinové signalizace a distribuce, např. redukci dlouhivého růstu, poruchy apikální dominance a změnu odpovědi v tropických reakcích (Zažímalová *et al.* 2010).

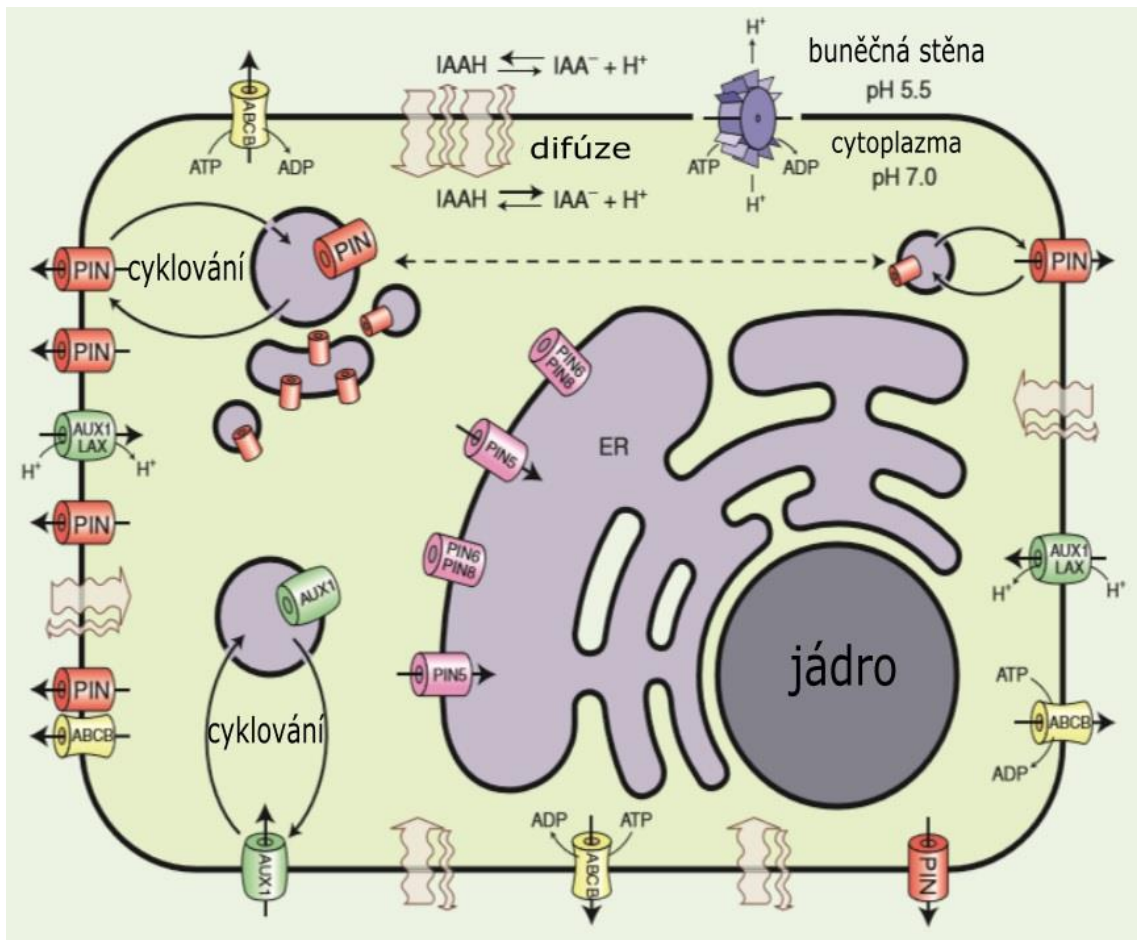
Proteiny ABCB/PGP přímo transportující auxin jsou stabilně většinou nepolárně lokalizovány na plazmatické membráně, za určitých okolností byla však zaznamenána jejich polární distribuce (Vieten *et al.* 2007).

ABCB1/PGP1 a ABCB19/PGP19 se chovají jako výstupní auxinové přenašeče, zatímco ABCB4 se transportu účastní komplexněji. Je popsána funkce proteinu ABCB4 měnit svou funkci v závislosti na množství auxinu v buňce. Pokud je hladina auxinu nízká, funguje ABCB4 jako vstupní přenašeč. Pokud se hladina auxinu zvýší, jeho funkce se změní zpět na výstupní (Yang a Murphy, 2009).

Proteiny PIN a ABCB nepracují nutně nezávisle na sobě, byla popsána spolupráce mezi ABCB19/PGP19 a PIN1 proteinem, která zvyšuje jejich celkovou substrátovou specifi-

tu v některých tkáních a za specifických vývojových podmínek. Protein ABCB stabilizuje PIN proteiny v mikrodoménách plazmatické membrány (Mravec *et al.* 2008).

Transport zprostředkovaný ABCB/PGP proteiny je závislý na ATP, je tedy důležitý v situacích, kdy se snižuje chemiosmotický gradient nebo je třeba transport auxinu proti směru tohoto gradientu. Tento systém je naopak nevýhodný v rychle rostoucích pletivech, ve kterých dochází k vyčerpání energie, zde se uplatňuje především transport auxinu zprostředkovaný proteiny PIN a AUX/LAX (Zažimalová *et al.* 2010).



Obr. 3.3 Transport auxinu. Upraveno podle Zažimalová 2010.

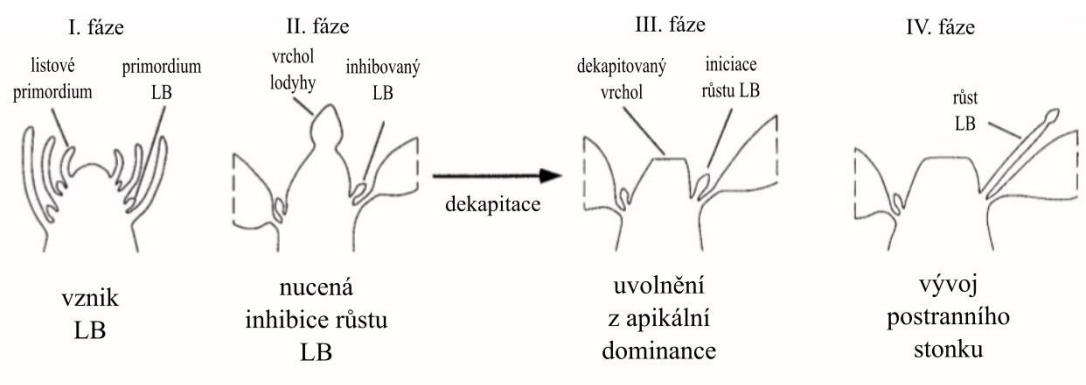
Na obr. 3.3 je znázorněn model transportu auxinu v rostlinné buňce, především rozmístění přenašečových proteinů. Červeně vyznačené proteiny PIN označují PIN1, 2, 3, 4 a 7, zatímco růžově vyznačené reprezentují PIN5, 6 a 8. Zeleně jsou vyznačeny vstupní přenašeče AUX/LAX. ER značí endoplazmatické retikulum. ER a endozómy mají šedou barvu. Zakřivené tučné plné šipky značí neustálé cyklování proteinů, přerušované

šipky znázorňují transcytózu. Možná spolupráce mezi proteiny ABCB a PIN je vyjádřena jejich umístěním blízko sebe.

### 3.4 Apikální dominance

Apikální dominanci (AD) můžeme definovat jako nadvládu vrcholu lodyhy nad postranními pupeny, případ vývojové korelace, kde jeden rostlinný orgán působí na vývoj jiného orgánu (Sachs, 1991), někdy také zvaný korelativní inhibice (Hillman, 1984). Tento jev je znám poměrně dlouho, protože regulace větvení lodyhy byla vždy v zájmu šlechtitelů a pěstitelů. Různé druhy rostlin mohou vykazovat různý stupeň AD. U některých druhů se projevuje přirozený sklon k normálnímu rozvětvení, zatímco u jiných (např. *Pisum sativum* L.) vrcholový pupen zcela zadržuje postranní pupeny. Bytel (*Kochia trichophylla*) nemá naopak AD vyvinutou vůbec (Procházka *et al.* 1998). U některých druhů rostlin je možno pozorovat prodlužování postranních pupenů už po několika hodinách po odstranění stonku, v jiných případech může být tato prodleva delší, v závislosti na stupni inhibice a fázi buněčného cyklu (Tamas, 1987).

Mechanismus vývoje a následného růstu postranních pupenů, popsany na obr. 3.4, můžeme rozdělit na čtyři základní fáze, tyto se mohou lišit v závislosti na druhu rostliny a platí především pro rostliny dvouděložné.



Obr. 3.4 Vývojová stádia apikální dominance. Upraveno podle Cline 1997.

Ačkoliv se tyto čtyři fáze mohou více či méně překrývat, každá z nich zahrnuje několik rozdílných procesů. Přechody mezi jednotlivými fázemi jsou spojeny s rozdílnou aktivitou rostlinných hormonů, především auxinů a cytokininů, jejichž hladina se výrazně

mění po odstranění lodyžního vrcholu. Dekapitace má tedy podstatnou úlohu při studiu AD (Cline, 1997).

### **3.4.1 Historie výzkumu apikální dominance**

#### ***Nutritivní teorie AD***

Od počátku studia AD bylo vysloveno několik teorií více či méně popisujících tento proces. Nutritivní teorie, která byla aktuální na přelomu 19. a 20. století předpokládá, že soutěžení o výživu mezi meristémy vrcholových a postranních pupenů je faktorem určujícím lodyžní AD. Předpokládalo se, že postranní pupeny nejsou schopny růstu, protože jsou ochuzovány o živiny pupeny vrcholovými, které tyto živiny atrahují ve svůj prospěch. Zastáncem této teorie byl např. Goebel, který ve svých experimentech odstraňoval listy a považoval množství živin za rozhodující faktor (Procházka *et al.* 1998).

#### ***Korelačně inhibiční vlivy***

Pokusy prováděné na hrachu, bobu a fazolu vedly k hypotéze, že za AD jsou odpovědné látky inhibiční povahy. Dostál (1908) vycházel z experimentů, při kterých dekapitoval rostliny hrachu (*Pisum sativum*) a sledoval uvolnění kotylárů z inhibice. Následným odstraněním jedné z děloh sledoval obnovení AD růstem kotyláru dělohy odříznuté. Pokud by o růstových korelacích rozhodovaly pouze faktory výživy, rostl by kotylár dělohy ponechané, předpokládal tedy přítomnost inhibičních látek v ponechané děloze. Následně byla dokázána existence specifických inhibičních látek korelačně brzdících růst postranních pupenů (Snow, 1925).

#### ***Teorie přímé/nepřímé auxinové inhibice***

Thimann a Skoog (1933, 1934) napodobili korelačně inhibiční vliv vycházející z růstového vrcholu a brzdící růst postranních pupenů pomocí aplikace IAA na dekapitovaný epikotyl bobu obecného (*Vicia faba*). Dále zjistili, že místem syntézy IAA je vrcholový pupen a mladé listy, nikoliv starší orgány. Byla tedy vyslovena hypotéza, že bazipetálně proudící auxin, vycházející z vrcholu stonku, je přímo odpovědný za inhibici růstu postranních pupenů tím, že v nich inhibuje syntézu IAA.

Oproti této teorii však stojí výsledky Snowa (1925, 1937), který se snažil prokázat, že AD způsobují látky regulační povahy, odlišné od auxinu. Auxin, který se nachází v lodyze, ji podle něj pouze chrání před inhibicemi. Toto je formulováno jako tzv. teorie nepřímé auxinové inhibice, která popisuje schopnost růstu vrcholové části lodyhy díky

vysoké hladině auxinu. Oproti tomu postranní pupeny jsou na auxin chudší, nejsou tedy chráněny před inhibičními látkami a nerostou.

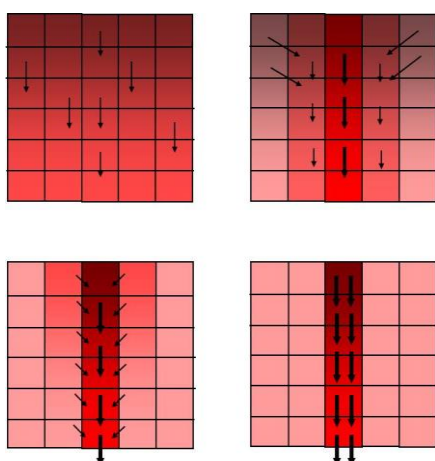
### ***Nutričně diverzní teorie***

V roce 1936 Went modifikoval nutriční teorii na tzv. nutričně diverzní teorii, podle které auxin tvořený v apexu (popř. exogenně aplikovaný) způsobí tok látek významných pro růst směrem k místu tvorby, popř. aplikace. Předpokládal tedy, že u intaktních rostlin je tok nutričních látek usměrněn proti toku auxinu z lodyžního vrcholu a teprve po dekapitaci vrcholu je umožněn tok živin k axilárům. Předpokládá tedy existenci růstového a metabolického sinku v místech s vysokou hladinou auxinu, a že bazipetální transport auxinu je schopen vyvolat akropetální transport živin.

### ***Teorie o vaskulárních spojeních***

Z nutričně diverzní teorie a teorie o přímé auxinové inhibici vychází teorie o vaskulárních spojeních, která předpokládá funkci auxinu jako korelačního inhibitoru, bránícího toku látek pro růst významných do postranních pupenů. Tento děj se pravděpodobně děje díky schopnosti auxinu ovlivňovat vaskulární diferenciaci mezi lodyhou a postranními pupeny. Následně byla také popsána absence vaskulárních spojení mezi hlavním stonkem a postranním pupenem druhého nodu u šestidenních rostlin, zatímco 9 a 13denní rostliny už vaskulární spojení vytvořeny měly (Tepper, 1993).

### **3.4.2 Teorie kompetitivní kanalizace toku auxinu**



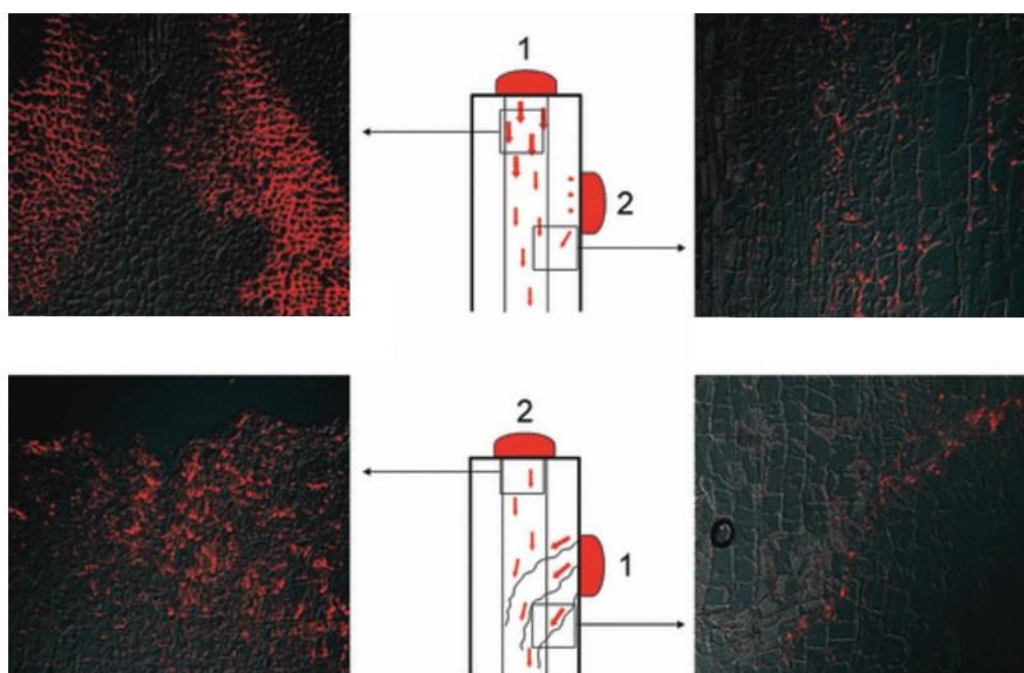
Obr. 3.5 Kanalizace toku auxinu. Upraveno podle Leyser 2003.

Na základě mnoha experimentů byl popsán účinek auxinu, jako klíčového elementu při organogenezi a vzniku vaskulatury. Pozorování regenerace vaskulárních svazků po mechanickém poškození stonku vedlo k vyslovení tzv. kanalizační teorie (Sachs, 1981). Tato teorie předpokládá polarizační účinek auxinu na tkáň, který je založen na zpětnovazebném efektu auxinu vyvolaném polarizací jeho transportu na úrovni jedné buňky. Po mechanickém poškození vaskulárního systému jsou všechny buňky schopny transportovat auxin stejně. V průběhu



několika dní se některé buňky specializují na transport auxinu, diferencují se v provaskulární pletivo a stávají se auxinovými kanály (Sauer *et al.* 2006).

Pokud existují dva blízké zdroje auxinu, dochází mezi nimi ke kompetici, přičemž může jeden ze zdrojů inhibovat vznik auxinového kanálu ze zdroje druhého (Sachs, 1968). U rostlin se silně vyvinutou AD zabraňuje přítomnost primárního zdroje auxinu exportu a kanalizaci auxinu ze sekundárního auxinového zdroje (obr. 3.6). Kanalizace auxinu z laterálního zdroje (pupeny) je umožněna pouze za předpokladu, že je primární zdroj auxinu odstraněn nebo oslabený. Pokud rostlinu dekapitujeme (odstraníme růstový vrchol), narušíme PAT v hlavním stonku. Toto vede k distribuci auxinu z axilárních pupenů na základě polarizace PIN1 proteinů a k vytvoření auxinového kanálu. Dále vzniknou vaskulární svazky, které jsou nezbytné pro růst postranních pupenů (Balla *et al.* 2011).



Obr. 3.6 Kompetitivní kanalizace mezi dvěma zdroji auxinu. Upraveno podle Balla *et al.* 2011.

Na obr. 3.6 je znázorněna kompetice mezi auxinem aplikovaným na dekapitovaný pahýl a laterálně. Primárním zdrojem auxinu a místem tvorby auxinového kanálu se stane ten,

který je aplikovaný dříve. Podobné výsledky popsal i Prusinkiewicz *et al.* (2009) prostřednictvím matematického modelu a počítačové simulace.

Důležitou roli v mechanismu AD hrají i jiné rostlinné hormony, zvláště cytokininy (CK), které na rozdíl od auxinu růst postranních pupenů stimulují (exogenní aplikace CK na inhibovaný pupen ho uvolní z inhibice). CK také stimulují transport auxinu z postranních pupenů (Müller *et al.* 2015). Dále byl popsán efekt rostlinného hormonu strigolaktonu, který také ovlivňuje větvení rostlin, pravděpodobně prostřednictvím tvorby auxinových maxim (Waldie *et al.* 2014).

## 4 MATERIÁL A METODIKA

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty byly použity rostliny hrachu setého – *Pisum sativum* L., odrůda Vladan (Semo a.s., Smržice, ČR). Z důvodu lepší klíčivosti se nechala semena hrachu nejdříve bobtnat ve vodě po dobu 24 hodin při laboratorní teplotě. Následně byla tato semena vyseta do vlhkého perlitu, kde bylo možno po 3-4 dnech pozorovat jejich klíčení. Dále byly klíčící rostliny přesazeny do kultivačních nádob s perlitem a byly pěstovány za využití Richterova živného roztoku. Kultivace probíhala v klimaboxu při teplotě 20/18 °C s fotoperiodou 16/8 hodin (den/noc) a při světelné intenzitě 150  $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ .

### 4.2 Genová exprese proteinů transportujících auxin

#### 4.2.1 Založení experimentu a odběr vzorků

Pro vlastní experiment byly použity sedm dní staré rostliny hrachu (počítáno ode dne bobtnání) pěstované v kultivačních nádobách. Rostliny byly následně dekapitovány přibližně 10 mm nad dělohami.

Pro stanovení genové exprese transportních proteinů auxinu byly pomocí skalpelu odebrány vzorky – kotylární pupeny v časových intervalech 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 120 hodin po dekapitaci, přičemž 1 vzorek byl tvořen pupeny 20 rostlin a zastoupen ve třech opakováních. Tyto vzorky byly v konečné fázi podrobeny analýze exprese genů: *PsAUX1*, *PsPIN1*, *PsBRC1*, *PsDRM1*, jejichž exprese byla porovnávána vůči konstitutivním genům: *PsEF1- $\alpha$* , *PsActin* a *Ps $\beta$ -tubulin*.

Ihned po odebrání byly pupeny v mikrozkuvkách skladovány v tekutém dusíku a následně byly uloženy do hlubokomrazícího boxu MDF-U3286S (Sanyo, Japonsko) při teplotě -77 °C, kde byly uchovány do dalšího zpracování.

#### 4.2.2 Izolace RNA

Ještě před začátkem izolace byly pracovní plochy, pipety a centrifuga očištěny pomocí RNase Zap (Sigma-Aldrich, USA) kvůli zamezení degradace RNA všudypřítomnými aktivními ribonukleázami. V průběhu celé izolace byly používány sterilní nitrilové rukavice, sterilní mikrozkuvky a sterilní špičky.

Izolace RNA byla provedena podle návodu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Použitý typ izolace funguje na principu selektivních vazebných vlastností silikonové membrány ve spojení s centrifugací. Biologický materiál byl nejprve homogenizován za přítomnosti vysoce denaturujícího pufru obsahujícího guanidin thiokyanát a merkaptotanol. Následné přidání etanolu zajistilo potřebné podmínky pro vazbu RNA na membránu a vymytí kontaminantů. Použití DNázy při izolaci zabezpečilo potřebnou čistotu izolované RNA, kterou je možno použít pro následující reakce. Po promytí byla RNA eluována do příslušného roztoku.

Vyizolovaná RNA byla rozpuštěna v konečném objemu 32  $\mu\text{l}$  RNáz prosté vody. Následně byla u všech vzorků změřena koncentrace RNA a poté byly vzorky RNA umístěny zpět do hlobokomrazícího boxu.

#### **4.2.3 Měření koncentrace RNA**

Koncentrace RNA všech vzorků byla stanovena měřením absorbance pomocí spektrofotometru - přístrojem Picodrop Pico100 (Picodrop, Spojené království) při vlnové délce 260 nm. Princip měření je založen na specifické absorpci UV záření nukleovými kyselinami prostřednictvím konjugovaných elektronů, které se nachází nad a pod rovinou heterocyklických bází v struktuře RNA. Intenzitu absorpce RNA je možno změřit spektrofotometrem, kdy míra specifické absorpce odpovídá koncentraci RNA ve vzorku. Výsledná koncentrace byla vypočtena využitím vztahu  $A_{260\text{nm}} = 1$ , přičemž hodnotě 1 odpovídá roztok RNA o koncentraci 40  $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ .

#### **4.2.4 Reverzní transkripce (RT)**

Vyizolovaná RNA z kotylárních pupenů rostlin hrachu byla pomocí reverzní transkripce přepsána do cDNA. Pro daný účel byl využit kit SuperScript<sup>®</sup> III Reverse Transcriptase, (Invitrogen, USA).

Reverzní transkripce probíhala ve dvou fázích. V první fázi bylo do popsáných mikrokumavek napipetováno vypočítané individuální množství RNA a  $\text{H}_2\text{O}$ , do reakce byla přidána RNA o výsledné koncentraci 0,5  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  a celkový objem vody a RNA byl 23,7  $\mu\text{l}$  (viz tabulka 4.1), složení celé reakční směsi první fáze RT je znázorněno v tabulce 4.2. Oligo dT<sub>20</sub> se váže na polyadenylovaný konec mRNA a funguje jako primer pro druhou fázi RT. Namíchaná směs pro první fázi reakce byla v mikrokumavkách krátce

protřepána pomocí vortexu. Dále byly vzorky a směs krátce centrifugovány a vloženy do termocyklieru- T3 Thermocycler Biotron T3 Thermoblock (Biometra, Německo), kde byl nastaven program číslo 12 (teplota 72 °C po dobu 10 minut). V průběhu první fáze reakce dochází k denaturaci sekundární struktury RNA a připojení primeru oligo dT<sub>20</sub>. V mezičase byla připravena reakční směs pro druhou fázi RT podle tabulky 4.3.

Po dokončení první fáze byla směs pro druhou fázi rozpipetována po 12,3 µl do každého vzorku. Následně byly vzorky opět krátce centrifugovány a umístěny do termocyklieru s programem číslo 13 (42 °C po dobu 50 minut a 72 °C 10 minut). V druhé fázi RT dochází k přepisu původního řetězce RNA do cDNA pomocí enzymu reverzní transkriptázy, která je získána z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT).

Tab. 4.1: Koncentrace RNA a přepočet objemu vstupujícího do reakce

čas odběru	1. biologické opakování				2. biologické opakování				3. biologické opakování			
	koncentrace RNA		dopočítané množství		koncentrace RNA		dopočítané množství		koncentrace RNA		dopočítané množství	
	ng/µl	µg/µl	µl RNA	µl H <sub>2</sub> O	ng/µl	µg/µl	µl RNA	µl H <sub>2</sub> O	ng/µl	µg/µl	µl RNA	µl H <sub>2</sub> O
0 h	342,3	0,3423	1,460707	22,239293	184,4	0,1844	2,711497	20,988503	236,1	0,2361	2,117747	21,582253
1h	289,9	0,2899	1,724733	21,975267	170,2	0,1702	2,93772	20,76228	308,8	0,3088	1,619171	22,080829
3 h	325,9	0,3259	1,534213	22,165787	258,7	0,2587	1,932741	21,767259	697,6	0,6976	0,716743	22,983257
6 h	225,4	0,2254	2,218279	21,481721	236,6	0,2366	2,113271	21,586729	510,4	0,5104	0,979624	22,720376
12 h	384,4	0,3844	1,300728	22,399272	565,7	0,5657	0,883861	22,816139	359,2	0,3592	1,391982	22,308018
24 h	584,1	0,5841	0,856018	22,843982	704,3	0,7043	0,709925	22,990075	294,6	0,2946	1,697217	22,002783
48 h	742,9	0,7429	0,673038	23,026962	741,3	0,7413	0,674491	23,025509	831,4	0,8314	0,601395	23,098605
120 h- R	749,3	0,7493	0,667289	23,032711	845,9	0,8459	0,591086	23,108914	745,4	0,7454	0,670781	23,029219
120 h- I	843,1	0,8431	0,593049	23,106951	755,9	0,7559	0,661463	23,038537	649,7	0,6497	0,769586	22,930414

Tab. 4.2: Složení reakční směsi pro RT (1. fáze)

složení reakční směsi	objem [µl]
voda	individuální
RNA	individuální
dNTPS	2
oligo dT	2
<b>celkový objem</b>	<b>27,7</b>

Tab. 4.3: Složení reakční směsi pro RT (2. fáze)

složení reakční směsi	objem [µl]
pufř (5 x FS Buffer)	8
DTT	4
cAMV transkriptáza	0,3
<b>celkový objem</b>	<b>12,3</b>

#### 4.2.5 Kvantitativní PCR

Reverzní transkripce získaná cDNA byla následně podrobena kvantitativní polymerázové řetězové reakci (Real-Time PCR, qPCR). Při běžné PCR se analyzuje až výsledný produkt pomocí elektroforézy. U qPCR se analyzuje každý cyklus PCR v reálném čase na principu fluorescence (interkalační barvivo, fluorescenčně značený primer či sonda), je tedy nutno použít termocykler, který je schopen vzorek ozařovat excitačním zářením. V tomto případě bylo použito interkalační barvivo Sybr Green (může se vmezeřit mezi dva sousední nukleotidové páry DNA), tento byl součástí Sybr Green Mastermixu v kitu Light Cycler<sup>®</sup> 480 SYBR Green I (ROCHE, Diagnostics GmbH, Německo).

Získaná cDNA byla nejprve naředěna v poměru 1:10 do výsledného objemu 100  $\mu$ l (90  $\mu$ l vody a 10  $\mu$ l cDNA), tento objem byl dostatečný pro 50 reakcí, přičemž do každé z nich byly přidány 2  $\mu$ l takto naředěné cDNA (tedy 0,2  $\mu$ l původní cDNA). Následně byly namíchány mixy pro jednotlivé geny. Všechny varianty experimentu (zastoupeny třemi biologickými opakováními), konkrétně 0 h, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h, 48 h, 120 h-R, 120 h-I od dekapitace, byly realizovány ve třech technických opakováních pro každý gen. Pro každý gen bylo také napipetováno 6 negativních kontrol (místo cDNA byla napipetována čistá voda). Celkem bylo tedy pro každý gen napipetováno 87 reakcí, jejich složení viz tabulka 4.4.

Tab. 4.4: Složení reakční směsi pro qPCR

objem na 1 reakci [ $\mu$ l]	
Sybr Green Mastermix	5
Primery (F+R)	1,6
H <sub>2</sub> O	1,4
cDNA (voda u neg. kontroly)	2
celkový objem reakce	10

Reakce byly napipetovány na destičku Hard-Shell<sup>®</sup> PCR Plates 96-Well WHT/CLR (Bio-Rad laboratories, Spojené státy americké). Destička byla následně přelepena adhezivním těsněním Microseal<sup>®</sup> 'B' Seal (Bio-Rad, USA) a centrifugována 30 sekund při 2000 rpm, pro odstranění bublinek v jamkách, na centrifuze Z 366 (Hermle, Německo). Vlastní reakce pak probíhala v termocykleru C1000<sup>™</sup> Thermal Cycler/CFX96<sup>™</sup> Real-Time Systém (Bio-Rad). U jednotlivých destiček byly popsány pozice vzorků pro jednodušší orientaci při vyhodnocování výsledků. Jednotlivé destičky byly uloženy a popsány v programu Bio-Rad-CFX Manager. Následně byl spuštěn protokol pro specifickou PCR. V tabulce 4.5 jsou popsány podmínky této reakce.

Specifické primery byly poskytnuty pracovištěm CEITEC MENDELU.

Tab. 4.5: Seznam genů *Pisum sativum* L., primerů a podmínky jednotlivých qPCR reakcí

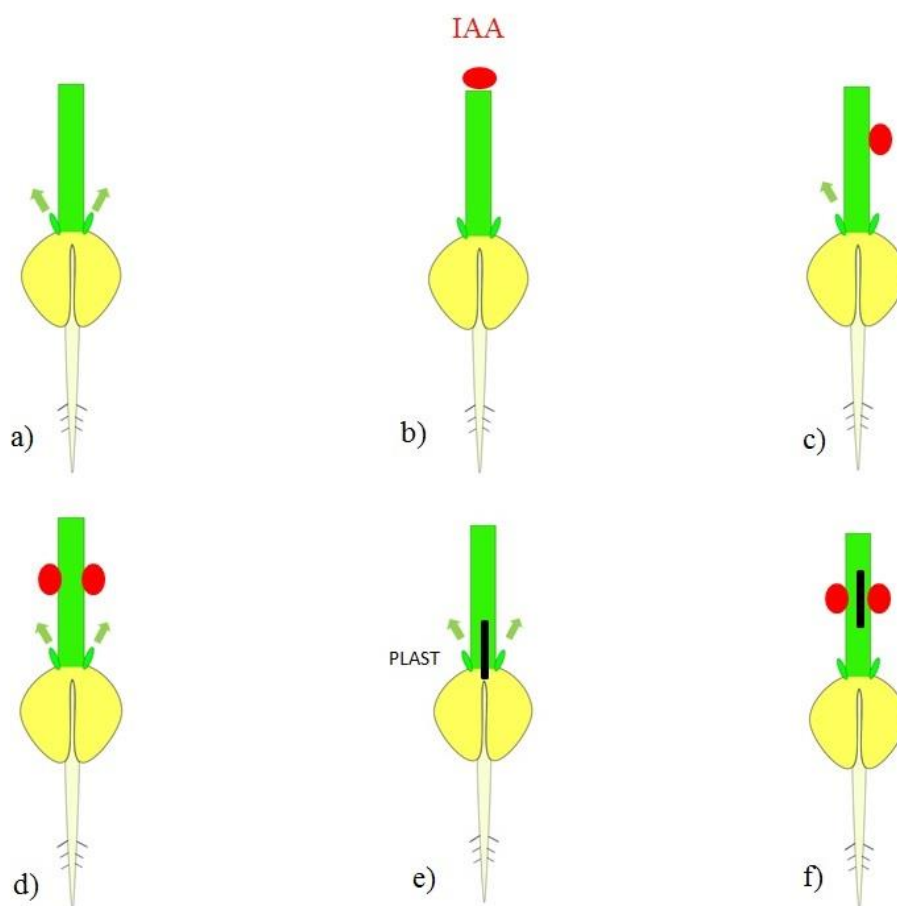
Gen	Primer	Sekvence primeru	Reakční podmínky
DRM1	DRM1-F DRM1-R	5'-AAC TCA CCA CCA CCC TCA AAG ATG-3' 5'-GAT GTA GAC ACG EGG CAG AAG ATG-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 58°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
AUX1	AUX1-F AUX1-R	5'-GGG TTT GGG TTT GGA GGA TGG TC-3' 5'-TGG TGG TGG AGG CTT GCA TTG G-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 58°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
β-tub	TB-F TB-R	5'-GCT CCC AGC AGT ACA GGA CTC T-3' 5'-TGG CAT CCC ACA TTT GTT GA-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 58°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
EF1-α	EF1-F EF1-R	5'-CTG TCA TGG ATG CAC CT-3' 5'-TCC TTA GAG ATA CCG GCT T-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 58°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
BRC1	BRC1-F BRC1-R	5'-AGG CAA GAG AAA GAG CAA GG-3' 5'-TTG CAT TGC TTT GAG TTT GA-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 62°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
PIN1	PIN-F PIN-R	5'-CTG CGT CCG ACA ATA TAG AT-3' 5'-AGT TAT GCC ACC AGC TAG T-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 55°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C
Actin	ACTIN-F ACTIN-R	5'-TGT CAG CCA CAC TGT CCC TAT C-3' 5'-CAA GAC GAA GGA TGG CAT GT-3'	95°C/10' → 40x(95°C/15'' → 58°C/15'' → 72°C/15'') → 72°C/30'' → 70°C/1'' → tání 50-93°C

## 4.3 Růstové křivky kotylárních pupenů/výhonů

### 4.3.1 Založení experimentů a průběžné měření

Pro experiment byly použity sedm dnů staré rostliny (počítáno od bobtnání), které byly kultivovány stejně jako v případě rostlin pro genovou expresi. Experiment byl proveden v několika variantách (schematicky viz obr. 4.1) a vždy ve třech biologických opakováních, kde 1 opakování obsahovalo 20 rostlin. U všech variant experimentu byla pravítkem měřena délka kotylárních výhonů každý den, až do pátého dne.

Naměřené hodnoty byly zpracovány a byly z nich vytvořeny růstové křivky. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny vypočtením hodnot směrodatné odchylky a průkaznost rozdílů byla testována Studentovým testem v programu MS Excel.



Obr. 4.1 Experimentální modely pro měření délky kotylárních výhonů: a) dekapitace, b) dekapitace + 0,5% IAA na pahýl, c) dekapitace + 0,5 % -IAA aplikovaná na pravou stranu pahýlu, d) dekapitace + 0,5% IAA aplikovaná na obě strany pahýlu, e) dekapitace + zářez stonkem a následné vložení plastu do zářezu mezi kotyláry, f) dekapitace + 0,5 % -IAA po obou stranách zářezu s plastem.

## 4.4 Imunoanalýza PIN1 proteinu

### 4.4.1 Založení experimentu a odběr vzorků

Pro experiment byly opět použity sedm dnů staré rostliny, které byly kultivovány stejným způsobem jako v případě rostlin pro genovou expresi. Experimenty byly provedeny v několika variantách- dekapitace, dekapitace + plast, dekapitace + plast + 0,5 % -



IAA aplikovaná po obou stranách plastu, z těchto byly odebrány vzorky. Dále byly odebrány vzorky apexů děložních pupenů v časech 0 a 24 hodin po dekapitaci a apexy děložních výhonů 5 dní po dekapitaci ve variantách inhibovaný a rostoucí pupen. Vzorky v podobě segmentů o velikosti přibližně 5 mm byly ihned po odebrání zafixovány pomocí fixačního činidla, aby se zamezilo degradaci proteinů.

#### 4.4.2 Fixace

Odebrané segmenty byly po odběru až do následujícího dne inkubovány ve fixační směsi tvořené metanolem a kyselinou octovou v poměru 3:1 při teplotě -20 °C. Dále byly segmenty promyty v PBS pufru o hodnotě pH 7,4 (složení viz tabulka 4.6). Promývání bylo provedeno třikrát, přičemž jedno promývání trvalo 15 minut, takto byly ze vzorku odstraněny zbytky fixačního činidla.

Tab. 4.6: Složení PBS pufru

chemikálie	množství
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	1,0 g
NaCl	9,0 g
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	0,21 g
ultračistá voda	doplněno na celkový objem 1000 ml

#### 4.4.3 Odvodnění segmentů a jejich zalévání do parafínu

Segmenty byly odvodněny využitím vzestupné etanolové řady. Byly použity koncentrace etanolu 10/30/50/70/90 %, kdy v každé z koncentrací byly vzorky uchovány 15 minut. Dále byly vzorky umístěny dvakrát po dobu 45 minut v 96 % etanolu a dvakrát 45 minut v 100 % etanolu. Následně byly segmenty infiltrovány se xylénem v těchto roztocích:

- etanol : xylén v poměru 3 : 1 po dobu 60 minut
- etanol : xylén v poměru 1 : 1 po dobu 60 minut

- etanol : xylén v poměru 1 : 3 po dobu 60 minut
- 100 % xylén po dobu 60 minut
- 100 % xylén přes noc

Do keramických kelímků, do kterých byly segmenty umístěny v xylénu, byl postupně přidáván parafin Paraplast Plus (Kendall, USA) s teplotou tání 56 °C. Zprvu byl xylén s parafinem a segmenty 12 hodin inkubován při pokojové teplotě. Následně byl opět přidán parafin a kelímky byly inkubovány 12 hodin při teplotě 42 °C a 4 hodiny při teplotě 58 °C. Dále byl z kelímků odebírán roztok xylénu a parafinu a tento roztok byl nahrazován čistým rozpuštěným parafinem. Tento postup byl opakován, dokud vzorky nebyly převedeny do čistého parafinu. Nakonec byly jednotlivé segmenty zality parafinem do bločků, kde byly vhodně orientovány. Bločky byly rychle ochlazeny na ledu a uchovávány v mrazničce při teplotě -20 °C.

#### **4.4.4 Řezání segmentů**

Bločky parafinu byly řezány na rotačním mikrotomu Leica RM2255 (Leica biosystems, Německo), přičemž řezy o tloušťce 12 μm byly spojovány do pásků. Tyto pásky tvořené asi 15 řezy byly dále umístěny na hladinu vodní lázně při teplotě 42 °C, aby zde došlo k jejich vyrovnání (vyžehlení). Z vodní lázně byly pásky umístěny na podložní skla s pozitivním nábojem Super Frost Plus (Menzel-Gläser, Německo). Skla s nařezanými vzorky byla následně temperována několik hodin při teplotě 42 °C.

#### **4.4.5 Odparafínování a následná rehydratace**

Nejprve byla podložní skla vložena na 20 minut do 100 % xylénu, dále na 10 minut do roztoku xylén : etanol v poměru 1 : 1 a nakonec na 10 minut do 100 % etanolu. Po vysušení proběhla selekce vhodných skel se vzorky (poškozená a nekvalitní byla vyřazena). Vybrané vzorky na sklech byly následně rehydratovány pomocí sestupné etanolové řady 90/70/50/30/10 %, přičemž v každé z koncentrací byly 7 minut. Nakonec byly vzorky na sklech umístěny po dobu 10 minut do PBS pufru.

#### **4.4.6 Blokování a inkubace s 1. protilátkou**

Na podložní skla bylo napipetováno 500 μl blokovacího roztoku (3 % bovinní sérový albumin rozpuštěn v PBS pufru o hodnotě pH 7,4). Takto byla skla v klidu ve tmě po-

nechána po dobu 60 minut. Dále byl ze skel odstraněn blokovací roztok a na skla bylo napipetováno 100  $\mu$ l roztoku s primární protilátkou anti-PIN1 (poskytnuta laboratoří vývojové a buněčné biologie rostlin -IST Rakousko), přičemž byla protilátka naředěna blokovacím roztokem v poměru 1 : 1000). Nakonec byla skla přikryta parafilmem M (Sigma, USA), aby nevyschla a inkubována přes noc při laboratorní teplotě, ve tmě a ve vlhkém prostředí. Následující den byl ze skel odstraněn parafilm, blokovací roztok s první protilátkou a skla byla třikrát promyta po dobu 10 minut v PBS pufru, který obsahoval 0,2 % Tween-20 (Sigma, USA).

#### **4.6.7 Blokování a inkubace s 2. protilátkou**

Zprvu bylo na každé sklo napipetováno 500  $\mu$ l blokovacího roztoku a skla byla inkubována ve vlhkém prostředí ve tmě po dobu 30 minut. Dále byl odstraněn blokovací roztok a na skla bylo napipetováno 100  $\mu$ l roztoku sekundární protilátky konjugované se fluorescenčním barvivem- polyklonální Cy3-antirabbit (Dianova, Německo), která byla předem naředěna s blokovacím roztokem v poměru 1 : 500. Následně byla skla opět přikryta parafilmem a inkubována 4 hodiny při teplotě 37 °C, ve tmě a ve vlhkém prostředí. Nakonec byla ze skel odstraněna sekundární protilátka a skla byla třikrát promyta v PBS pufru obsahujícím 0,2 % Tween-20, při pokojové teplotě po dobu 10 minut.

#### **4.6.8 Zalévání skel a finální úpravy**

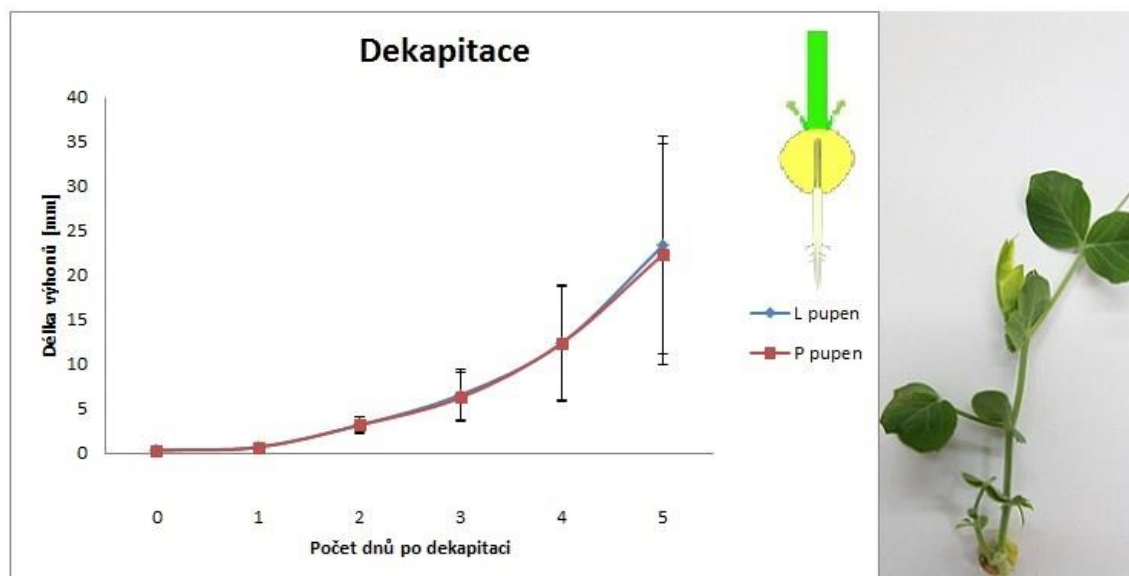
Posledním krokem bylo zalití skel zalévacím médiem Citiflour AF1 (AgarScientific, Spojené království) a přikrytí objektů krycími skly. Mikroskopování objektů bylo provedeno na konfokálním laserovém mikroskopu BX 60 LSM Fluoview 300 (Olympus, Japonsko), za použití krypton-argonového laseru o vlnové délce 568 nm a bariérového filtru BA 585IF.

## 5 VÝSLEDKY

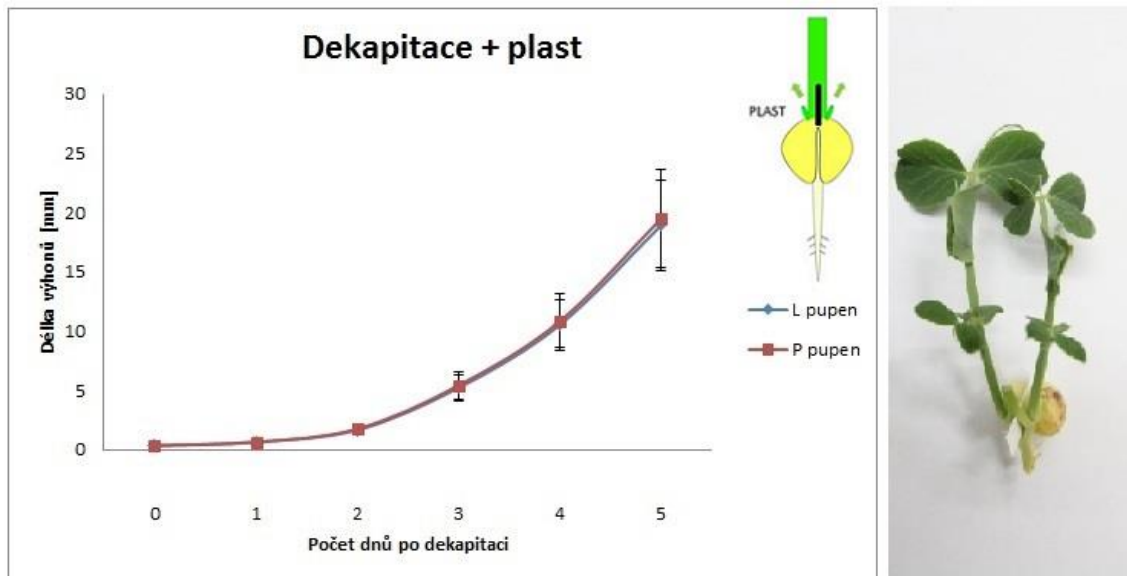
Rostlinné hormony a jejich vzájemné interakce jsou jedním z důležitých faktorů, které regulují růst a vývoj rostlin. Jsou přenašeči vnějších a vnitřních signálů, které umožňují rostlinám reagovat na konkrétní životní podmínky a optimalizovat tak utváření jejich těla. V této práci byla blíže studována apikální dominance, především schopnost rostlinného hormonu auxinu udržovat kotylární pupeny hrachu v růstové inhibici v kombinaci s dalšími experimentálními zásahy.

### 5.1 Růstové křivky

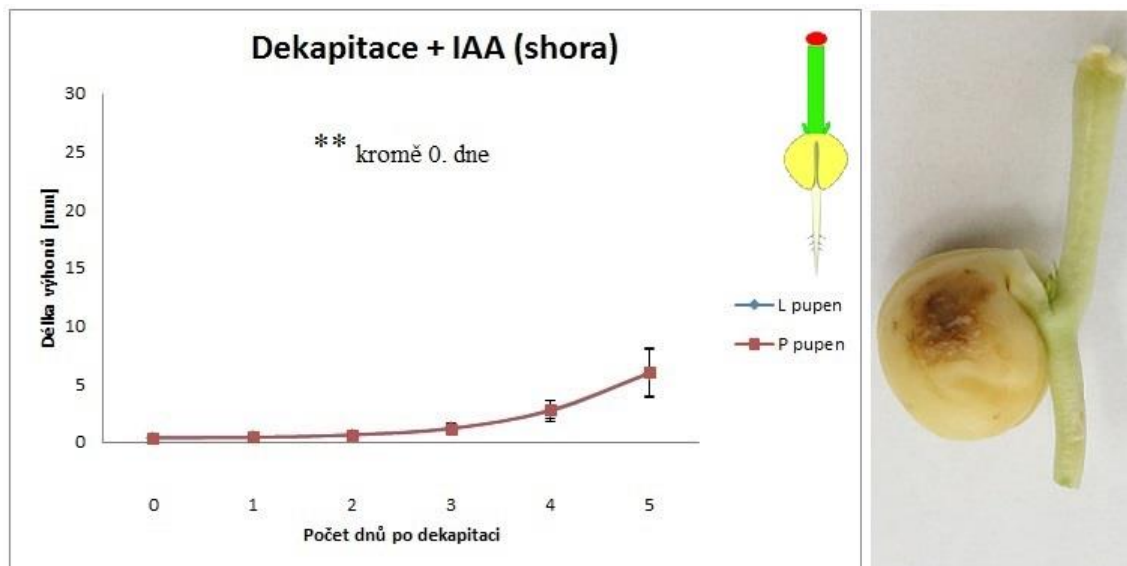
V následujících grafech je zachycena průměrná délka kotylárních výhonů v mm, měřená každý den od přesazení rostlin (0. den) až do 5. dne. Graf vždy rozlišuje levý a pravý výhon (pohled zepředu na dělohy) a popisuje každou experimentální variantu zvlášť. Směrodatné odchylky jsou vyznačeny chybovými úsečkami, průkaznost byla ověřena Studentovým T-testem, kdy  $\alpha = 0.05^*$  a  $\alpha = 0.01^{**}$



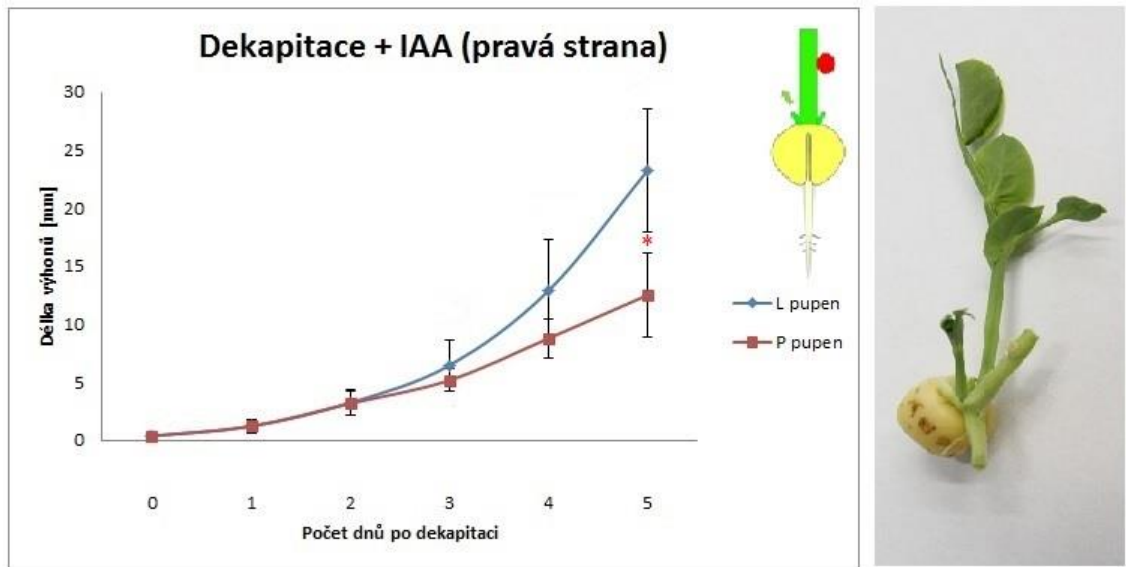
Obr. 5.1 Dekapitace. Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Napravo je přiložen snímek ošetřené rostliny. Tato varianta následně sloužila jako kontrolní. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Ze snímku 14 dní staré rostliny napravo vidět kompetice mezi pupeny, resp. je již patrný rozdíl mezi kotylárními výhony, kde jeden výhon je rostoucí a druhý inhibovaný.



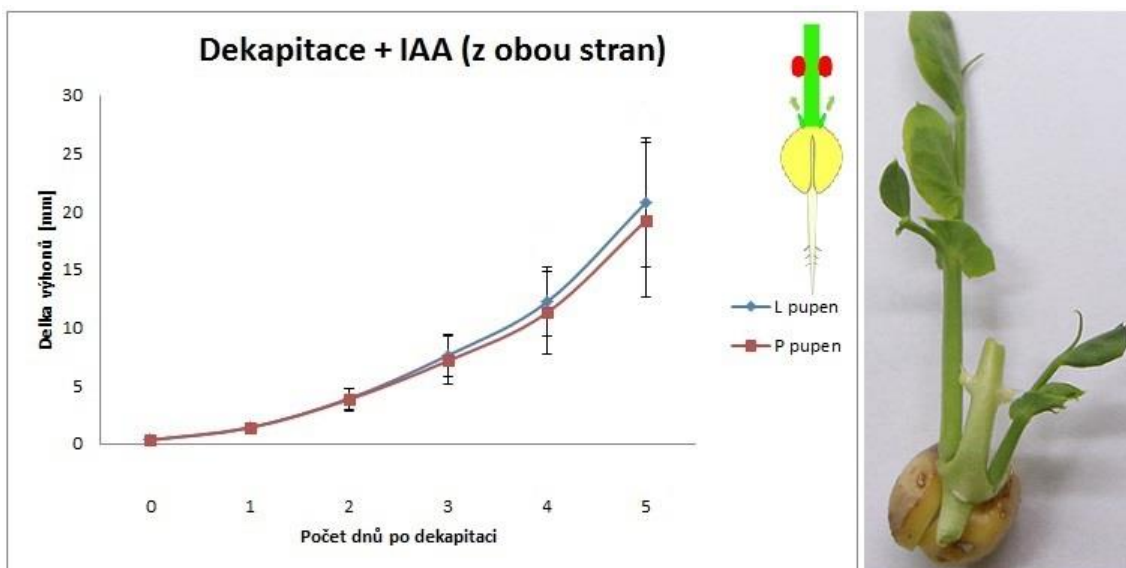
Obr. 5.2 Dekapitace + plast. Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu. Plasto-  
vý insert byl vložen do zářezu vedeného středem pahýlu mezi kotylární pupeny. V pravém horním rohu je  
zobrazeno schéma experimentu. Napravo je přiložen snímek rostliny 10 dní po ošetření. Zde nebyla pozoro-  
rována kompetice mezi kotylárními výhony jako v případě dekapitace bez plastu, výhony rostly stejně na  
obou stranách.



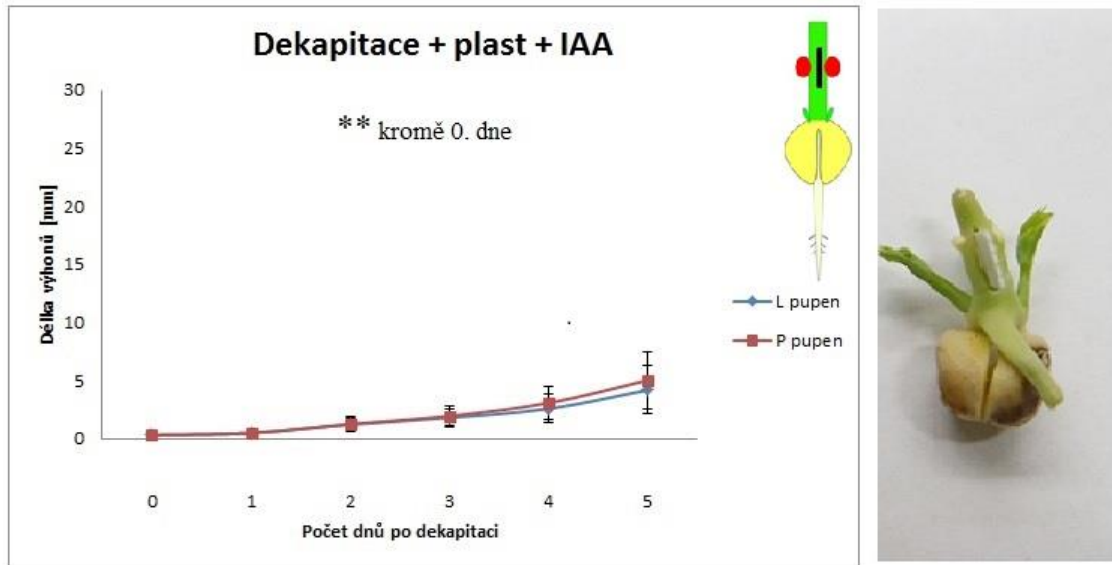
Obr. 5.3 Dekapitace + IAA (shora). Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu.  
Zde bylo pozorováno výrazné zpomalení rychlosti růstu výhonů oproti kontrolní variantě- pouze dekapiti-  
tace. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Snímek napravo od grafu zobrazuje rost-  
linu 7 dní po ošetření.



Obr. 5.4 Dekapitace + IAA (pravá strana). Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Snímek napravo od grafu zobrazuje rostlinu 7 dní po ošetření. Aplikace auxinu způsobila výrazné zpomalení růstu pravého kotylárního výhonu oproti kontrolní variantě- pouze dekapitace.



Obr. 5.5 Dekapitace + IAA (z obou stran). Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Snímek napravo od grafu zobrazuje rostlinu 7 dní po ošetření. Aplikace auxinu nezpůsobila výrazné zpomalení vyrůstání kotyláru oproti kontrolní variantě- pouze dekapitace. Navíc je patrný rozdíl mezi kotylárními výhony, kde jeden výhon je rostoucí a druhý inhibovaný.

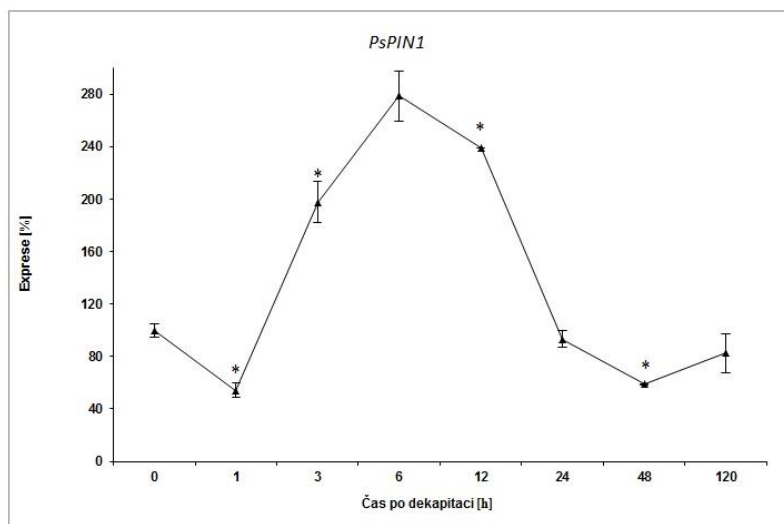


Obr. 5.6 Dekapitace + plast + IAA. Graf zobrazující délky levého (L) a pravého (P) kotylárního výhonu. V pravém horním rohu je zobrazeno schéma experimentu. Snímek napravo od grafu zobrazuje rostlinu 7 dní po ošetření. Aplikace auxinu způsobila v kombinaci s plastovým insertem výrazné zpomalení rychlosti růstu kotyláru oproti kontrolní variantě- pouze dekapitace, srovnatelné s variantou aplikace auxinu shora na pahýl.

## 5.2 Expresa vybraných genů

U 7 dnů starých rostlin hrachu (od bobtnání osiva) byla provedena dekapitace růstového vrcholu a sledována změna exprese genů souvisejících s růstem pupenů uvolněných z inhibice. Získané hodnoty byly přepočítány na procenta vztahující se k expresi kontrolních rostlin jednotlivých variant. Tyto hodnoty byly normalizovány na expresi tří konstitutivních genů *PsEF1-α*, *PsActin* a *Psβ-tubulin*, pro dosažení přesnějších výsledků. Následně byly vytvořeny grafy zachycující změny exprese genů v čase. Směrodatné odchylky jsou vyznačeny chybovými úsečkami, průkaznost byla ověřena Studentovým T-testem, kdy  $\alpha = 0.05^*$  a  $\alpha = 0.01^{**}$ .

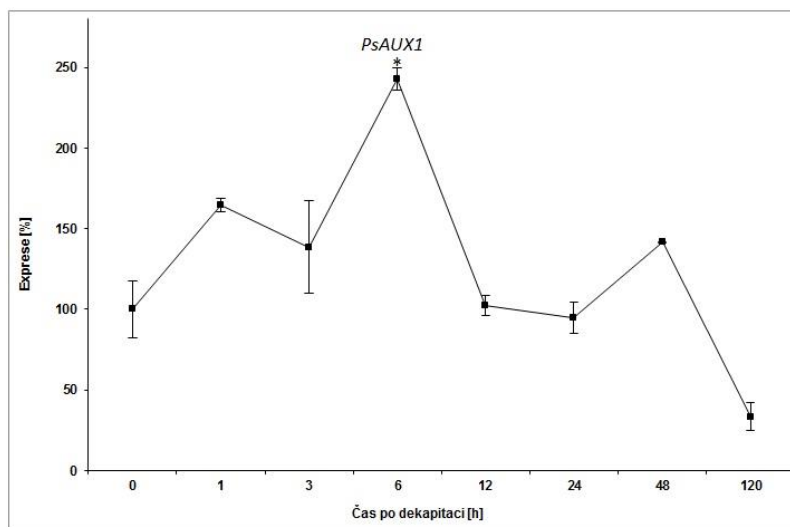
### *PsPIN1*



Obr. 5.7 Expresa genu *PsPIN1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny. V kotylárních pupenech rostlin hrachu se exprese genu *PsPIN1* po přechodném snížení v první hodině od dekapitace výrazně zvýšila s maximem v šesti hodinách po dekapitaci (zvýšení o 170 %). Od šesté hodiny se exprese snižuje a vrací se na původní úroveň.

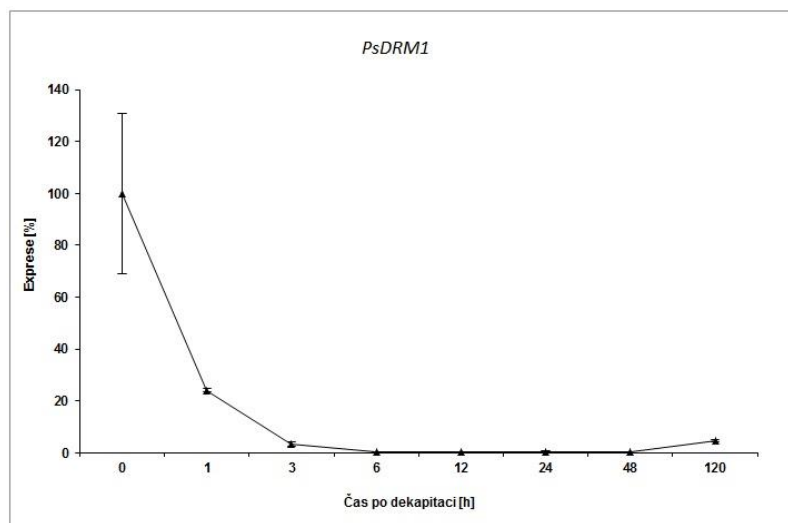


## *PsAUX1*



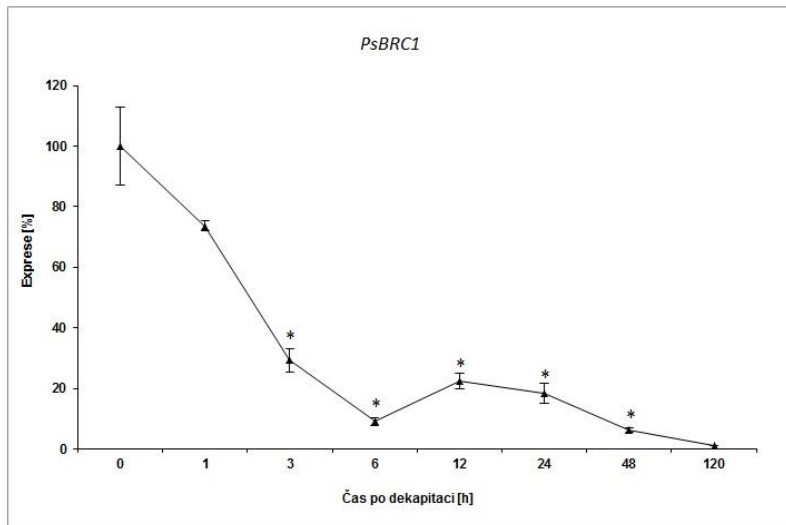
Obr. 5.8 Expres genu *PsAUX1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny. Expres genu *PsAUX1* se postupně zvyšovala až na maximum v šesti hodinách po dekapitaci. Po šesté hodině expres genu klesá stejně jako v případě *PsPIN1* téměř na původní úroveň.

## *PsDRM1*

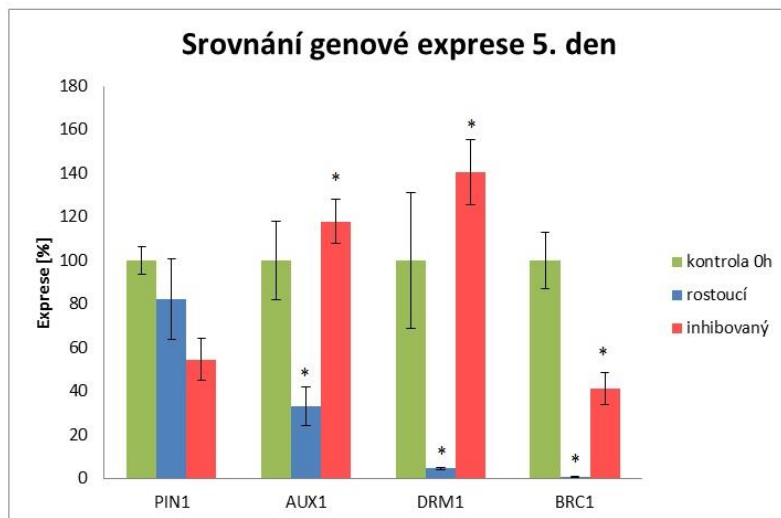


Obr. 5.9 Expres genu *PsDRM1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny. Expres genu *PsDRM1* klesala velmi rychle během první hodiny po dekapitaci na úroveň 25 % oproti kontrolní variantě. Následně se dále snižovala, přičemž od šesté hodiny byla hladina exprese téměř nulová. Mírný nárůst exprese 120 hodin po dekapitaci může být způsoben tím, že některé části kotylárního výhonu mohou již být ve stavu slabé dormance.

## *PsBRC1*



Obr. 5.10 Expresce genu *PsBRC1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny. Expresce genu *PsBRC1* po dekapitaci oproti kontrolní variantě 0 h výrazně snížila, její úroveň se k nulovým hodnotám se přiblížila v čase 120 h po dekapitaci.

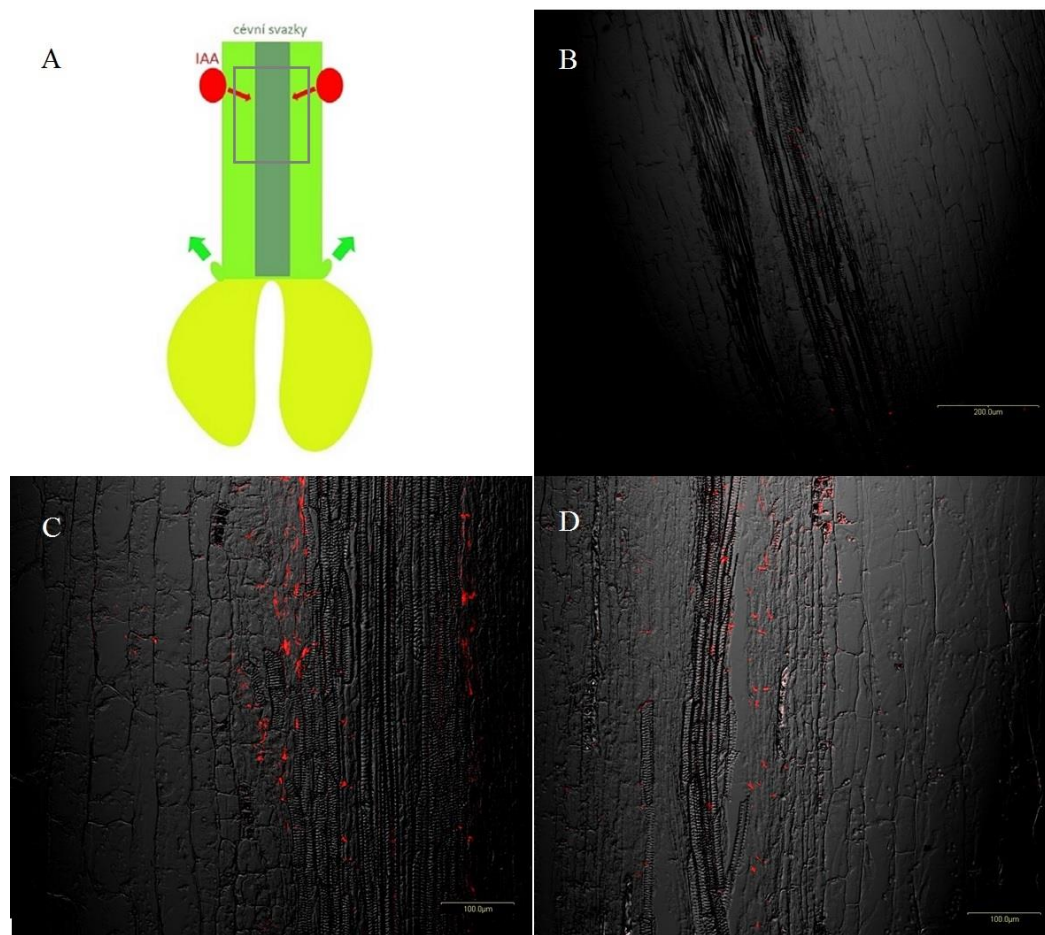


Obr. 5.11 Srovnání exprese genů 5. den po dekapitaci v inhibovaném a rostoucím výhonu. Srovnání exprese studovaných genů v inhibovaném a rostoucím výhonu pět dní po dekapitaci. Obzvláště u genů *PsDRM1* a *PsBRC1* je možno pozorovat velký rozdíl v expresích. U genu *PsAUX1* bychom očekávali jeho nižší expresi v inhibovaném výhonu podobně jako u *PsPIN1*, tento nárůst je však možno vysvětlit navrácením úrovně exprese na její původní hladinu, podobnou kontrolní variantě.

### 5.3 Imunolokalizace PIN1 proteinu

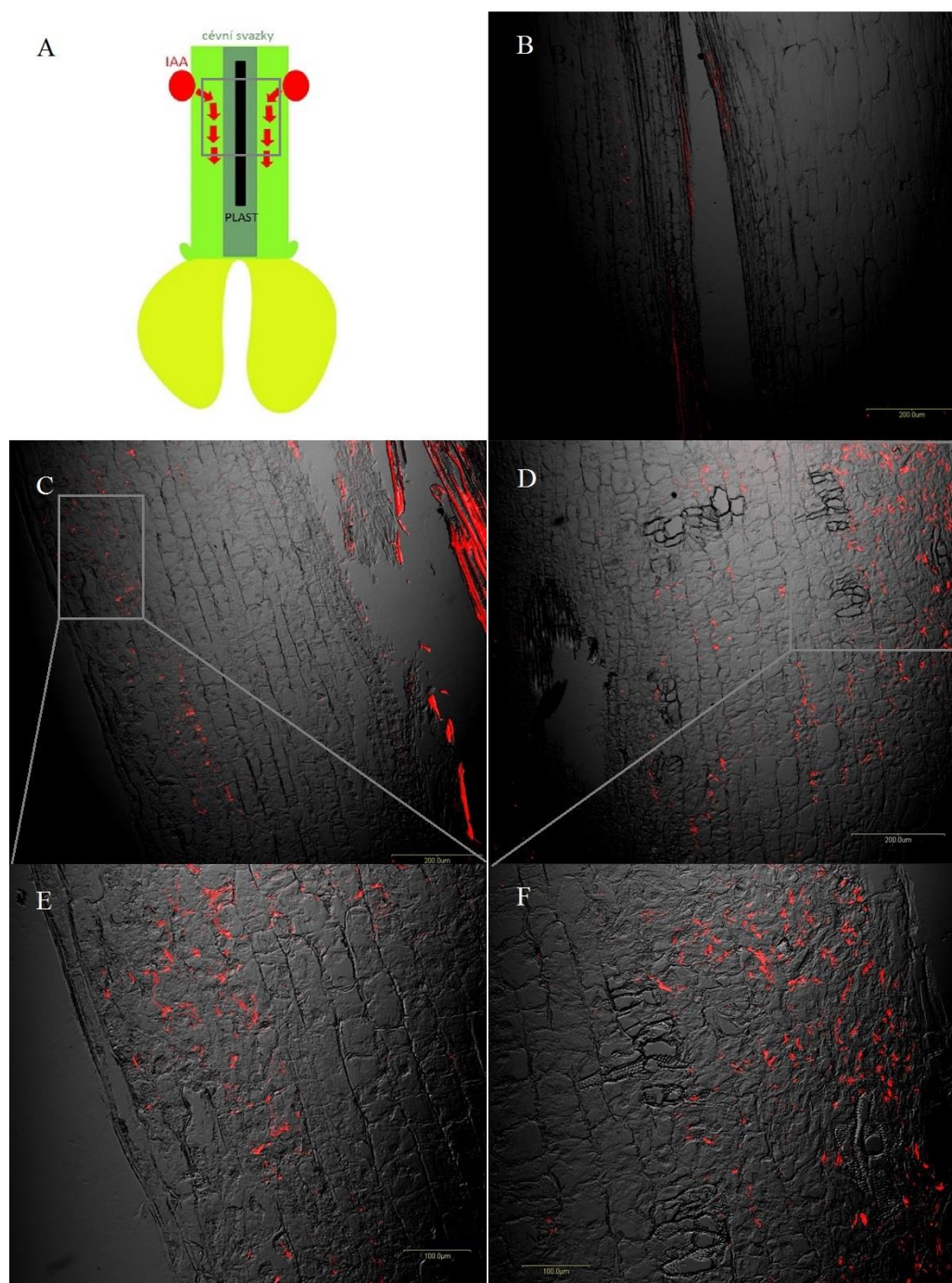
Imunoanalýza proteinů PIN1 byla provedena pro bližší pochopení mechanismu transportu auxinu ve stonku pro varianty růstových křivek kotylárních výhonů dekapitace + IAA a dekapitace + plast + IAA a vlivu tohoto transportu na růst kotylárních pupenů. Dále byly imunoanalýze podrobeny apexy kotylárních výhonů dekapitovaných rostlin (5 dnů po dekapitaci), z důvodu ověření rozdílů mezi rostoucím a inhibovaným výhonem, který bylo možno pozorovat vizuálně i v rámci genových expresí. Na závěr byly podrobeny analýze také kotylární pupeny dekapitovaných rostlin v časech 0 hodin a 24 h po dekapitaci, kde bylo možno pozorovat rozdíly v lokalizaci PIN1 proteinů, které byly způsobeny přechodem pupenu ze stavu růstové inhibice do stavu růstu.

#### 5.3.1 Model dekapitace, plast a aplikace IAA



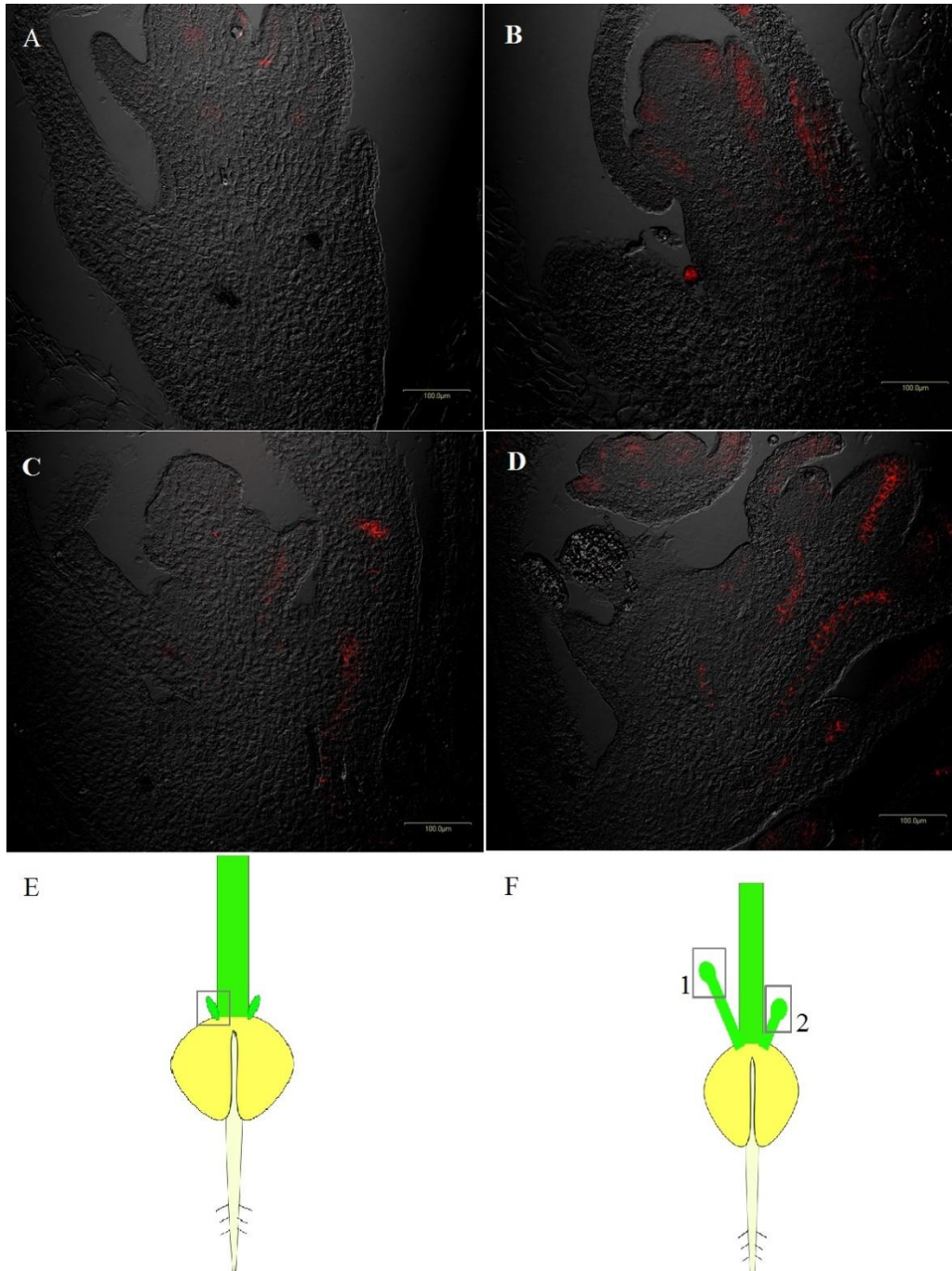
Obr. 5.12 Imunoanalýza stonkového segmentu po oboustranné aplikaci auxinu. Schéma experimentu (A) a detailní snímky stonkových segmentů 24 h a 5. den po dekapitaci rostlin a aplikaci auxinu na levou i

pravou stranu dekapitovaného pahýlu (B zvětšeno 10x, C, D- 20x). Na snímcích C a D lze pozorovat lateralizaci proteinů PIN1.



Obr. 5.13 Imunoanalýza stonkového segmentu po oboustranné aplikaci auxinu a umístění plastu doprostřed pahýlu. Schéma experimentu (A) a detailní snímky stonkových segmentů 24 h a 5. den po dekapitaci rostlin, umístění plastu doprostřed pahýlu a aplikaci auxinu na levou i pravou stranu pahýlu (B-D zvětšeno 10x, E a F- 20x). Zde lze pozorovat lateralizované PIN1 proteiny, které tvoří kanály pro transport auxinu a vznik xylémových buněk podél těchto kanálů.

### 5.3.2 Kotylární pupeny a výhony



Obr. 5.14 Imunoanalýza kotylárních pupenů a výhonů. Snímky kotylárních pupenů v čase 0h (A) a 24 h po dekapitaci (B), snímky apexu inhibovaného (C) a rostoucího (D) kotylárního výhonu, zvětšeno 20x. Snímek E představuje schéma pokusu pro imunoanalýzu kotylárních pupenů (A, B). Snímek F pak zachycuje schéma pokusu pro imunoanalýzu apexu kotylárních výhonů, kde (1) rostoucí výhon (D) a (2) inhibovaný výhon (C).

## 6 DISKUSE

Je již dlouho známo, že dekapitace růstového vrcholu nad dělohami rostliny má za následek uvolnění kotylárních pupenů z růstové inhibice a následně růst kotylárních výhonů. Tyto výhony zpočátku rostou oba stejně, po několika dnech však můžeme pozorovat, že jeden výhon zůstane ve stavu růstové inhibice a druhý dál roste a převezme tak úlohu nového vrcholu. Přechodu pupenu z inhibovaného do rostoucího stavu dochází již po několika hodinách, což ukazuje výrazné snížení exprese genů *PsDRMI* – markeru dormance a *PsBRC1*. Podobné snižování exprese *PsDRMI* genu bylo popsáno i v axilárních pupenech hrachu (Stafstrom *et al.* 1998, Kalousek *et al.* 2010). Gen *PsBRC1* také hraje roli ve větvení stonku hrachu. Ztráta jeho funkce totiž vede k nadměrnému větvení (Braun *et al.* 2012). Další možností úlohy genu *BRC1* může být ovlivňování akumulace PIN1 proteinu tím, že při své zvýšené expresi stabilizuje pupen v inaktivovaném stavu udržováním nízké hladiny exportu auxinu z pupenu (Shinohara *et al.* 2013). Pro iniciaci růstu pupenu je nezbytný právě export auxinu z pupenu (Balla *et al.* 2011). K tomuto účelu slouží transmembránové přenašeče auxinu, vstupní přenašeč AUX1 a výstupní přenašeč PIN1. Jelikož exprese genů *PsAUX1* a *PsPIN1* do šesté hodiny rostla, můžeme předpokládat *de novo* syntézu těchto transportních proteinů, které následně umožní export auxinu z pupenu. Podobné výsledky byly popsány i na axilárních pupenech hrachu (Kalousek *et al.* 2010). Imunoanalýza kotylárních pupenů intaktních rostlin ukázala, že v apikální oblasti pupene PIN1 proteiny lokalizovány nebyly, zatímco 24 hodin po dekapitaci již vykazovaly polární uspořádání, z čehož je možné předpokládat již probíhající export auxinu z vyrůstajících kotylárních pupenů, podobně jako u vyrůstajících axilárních pupenů (Balla *et al.* 2011). Po uvolnění kotylárních pupenů dekapitací si začínají konkurovat, výsledkem čehož je výhon rostoucí (dominantní) a druhý opět inhibovaný. Imunoanalýzou rostoucího a inhibovaného kotylárního výhonu byly pozorovány rozdíly v polarizaci PIN1 proteinů. Polarizace PIN1 byla v apikální oblasti inhibovaného výhonu viditelná v menší míře oproti rostoucímu výhonu. Morris (1977) popisuje, že radioaktivně značený auxin aplikovaný na apex rostoucího kotylárního výhonu je tímto výhonem transportován, avšak stejná aplikace na apex inhibovaného kotylárního výhonu k transportu auxinu nevede. Vysvětlením pozorovaného polárního uspořádání PIN1 proteinů i v nerostoucím inhibovaném výhonu může

být jejich defosforylace. Byla popsána neschopnost defosforylovaných PIN proteinů řídit vývojové procesy spojené s transportem auxinu (Zhang *et al.* 2010).

Proces růstu kotylárních výhonů můžeme do značné míry ovlivnit exogenní aplikací auxinu (Šebánek, 1975). Jeho aplikace na stonkový pahýl shora nebo z boku (zprava, popř. zleva) způsobila výraznou inhibici růstu kotylárních výhonů, resp. výhonu na straně aplikace. Tato inhibice výhonů naopak nebyla pozorována u oboustranné boční aplikace auxinu na stonkový pahýl. Vysvětlením tohoto jevu může být, že se proces kanalizace auxinu z dvou proti sobě aplikovaných bodů vzájemně narušuje, zdroje soupeří mezi sebou a nedojde ke kanalizaci ani k toku auxinu, který by mohl držet kotylární pupeny inhibované. Na snímcích z imunoanalýzy bylo možno pozorovat pouze přemístění PIN1 proteinů na laterální stranu cytoplazmatické membrány buněk. K určitému transportu auxinu tedy zřejmě docházelo, tento však nebyl zdaleka dostatečný pro výrazné zabrždění růstu kotylárních výhonů. Pokud se však doprostřed zářezu na dekapitovaném pahýlu vložil plast, který oddělil jeho levou a pravou stranu a následně se aplikoval auxin na levou i pravou stranu tohoto pahýlu, neproběhlo vzájemné rušení kanalizace mezi dvěma zdroji auxinu. Auxin byl kanalizován směrem dolů k dělohám a způsobil tak brždění růstu kotylárních výhonů podobně, jako aplikace auxinu na pahýl shora. Kanalizaci toku auxinu pozoroval ve své práci Sauer *et al.* (2006). Imunoanalýzou této experimentální varianty se podařilo pozorovat vznik polarizovaných PIN1 kanálů, podél kterých se následně začaly tvořit nové xylémové elementy. Obdobně, pokud mezi kotylární pupeny umístíme plast, dojde k vyřazení jejich vzájemné kompetice a pupeny rostou oba, aniž by se jeden z nich stal dominantním a druhý inhibovaným.

## 7 ZÁVĚR

V této práci bylo studováno uvolnění kotylárních pupenů hrachu setého (*Pisum sativum* L.), rostliny s velmi silně vyvinutou apikální dominancí, z růstové inhibice a spojitost tohoto děje s transportem auxinu a různými experimentální zásahy do integrity rostlin. Získané výsledky z růstových křivek korelují s výsledky genových expresí a imunoanalýzy proteinů PIN1.

Po uvolnění kotylárních pupenů z inhibice odstraněním růstového vrcholu dochází k formování kotylárních výhonů. Toto uvolnění je na jedné straně doprovázeno významným snížením exprese markerů dormance *PsDRM1* a *PsBRC1* a na straně druhé zvýšením exprese genů kódujících transportní proteiny auxinu – *PsAUX1* a *PsPIN1*. Syntéza nových transportních proteinů auxinu umožňuje pupenům masivně exportovat auxin, což je předpokladem jejich dalšího růstu. Imunoanalýza PIN1 proteinů v kotylárních pupenech ukázala, že intaktní rostliny nemají detekovatelné PIN1 proteiny v apikální oblasti. PIN1 proteiny v těchto oblastech bylo možno pozorovat 24 hodin po uvolnění pupenů z inhibice odstraněním růstového vrcholu, kdy již vykazovaly polární uspořádání, z čehož je možné předpokládat probíhající export auxinu. Při vyrůstání však mezi kotylárními pupeny probíhá i kompetice, výsledkem které se jeden výhon dostane do stavu růstové inhibice, zatímco druhý dál roste a převezme úlohu odstraněného apexu. Zajímavé je, že k této kompetici nedochází, pokud jsou kotylární pupeny odděleny plastovým insertem. Imunoanalýza PIN1 proteinu v apikálních oblastech rostoucích a znovu inhibovaných kotylárních výhonů ukázala, že PIN1 proteiny jsou v obou výhonech polárně uspořádány, i když inhibované výhony nerostou a tudíž se v nich nepředpokládá ani transport auxinu. Tento pozorovaný jev můžeme vysvětlit defosforylovací PIN1 proteinů, což může způsobit jejich nefunkčnost, i když jsou stále na buněčných membránách polárně uspořádány.

V další fázi byl studován vliv různých způsobů exogenní aplikace auxinu na pahýly dekapitovaných rostlin a dynamika růstu kotylárních výhonů. Při aplikaci auxinu shora místo odstraněného růstového vrcholu byla pozorována inhibice vyrůstání kotylárních pupenů. Jeho boční aplikace na jednu stranu stonkového pahýlu sice nezpůsobila výraznou inhibici vyrůstání kotylárů, ale zasahovala do jejich kompetice tak, že znovu inhibovaný kotylární výhon byl vždy ten, který byl na straně aplikace. Pokud byly apliko-



vány dva zdroje auxinu na stonek rostliny proti sobě, opět nedocházelo k inhibici vyrůstání kotylárních pupenů. Výsledky imunoanalýzy PIN1 proteinů ukázaly, že mezi těmito zdroji auxinu pravděpodobně probíhalo vzájemné rušení procesu kanalizace. Pokud ovšem byly dva zdroje auxinu aplikované na stonek rostliny proti sobě odděleny plastovým insertem, k inhibici vyrůstání kotylárních pupenů již docházelo. Imunoanalýza PIN1 proteinů v stonkových segmentech takto ošetřených rostlin ukázala nerušený průběh kanalizace exogenních auxinových zdrojů.

Výsledky této diplomové práce jsou v souladu s teorií kompetitivní kanalizace auxinových zdrojů a přinášejí další poznatky o dané problematice i ve spojitosti s kotylárními pupeny.

## 8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

**Abel, S., Oeller, P.W., Theologis, A.** (1994) Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 326-330.

**Arteca, R.N.** (1996) Plant growth substances: principles and applications. New York: Chapman & Hall, 332 s.

**Bajguz, A., Piotrowska, A.** (2009) Conjugates of auxin and cytokinin. *Phytochemistry*, **70**, 957-69.

**Balla, J., Kalousek, P., Reinöhl, V., Friml, J., Prochazka, S.** (2011) Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J.*, **65**, 571-577.

**Bartel, B., LeClere, S., Magidin, M., Zolman, B.K.** (2001) Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: De novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid b-oxidation. *J. Plant Growth Regul.*, **20**, 198-216.

**Benková, E., Michniewicz, M., Sauer, M., Teichmann, T., Seifertová, D., Jürgens, G., et al.** (2003) Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, **115**, 591-602.

**Bennett, M.J., Marchant, A., Green, H.G., May, S.T., Ward, S.P., Millner, P.A., et al.** (1996) Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science*, **273**, 948-950.

**Braun N., de Saint Germain A., Pillot J. P., Boutet-Mercey S., Dalmais M., Antoniadis I., et al.** (2012) The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.*, **158**, 225-238.

**Cambridge, A., Morris, D.** (1996) Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, **199**, 583-588.

**Carrier, D., Abu Bakar, N., Swarup, R., Callaghan, R., Napier, R., Bennett, M.J., et al.** (2008) The binding of auxin to the Arabidopsis auxin influx transporter AUX1. *Plant Physiol.*, **148**, 529-535.

- Cleland, R.E.** (1992) Auxin-induced growth of *Avena* coleoptiles involves two mechanisms with different pH optima. *Plant Physiol.*, **99**, 1556-1561.
- Cline, M.G.** (1997) Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, **84** (9), 1064-1069.
- Cosgrove, D.J., Li, L.C., Cho, H.T., Hoffmann-Benning, S., Moore, R.C., Blecker, D.** (2002) The Growing world of expansins. *Plant Cell Physiol.*, **43**, 1436-1444.
- Davies, P.J.** (2004) *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 750 s.
- De Smet, I., Voß, U., Lau, S., Wilson, M., Shao, N., Timme, R., et al.** (2011) Unraveling the evolution of auxin signaling. *Plant Physiol.*, **155**, 209-221.
- Delbarre, A., Muller, P., Imhoff, V., Guern, J.** (1996) Comparison of mechanisms controlling uptake and accumulation of 2, 4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid, and indole-3-acetic acid in suspensioncultured tobacco cells. *Planta*, **198**, 532-541.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Estelle, M.** (2005a). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 441-445.
- Dharmasiri, N., Dharmasiri, S., Weijers, D., Lechner, E., Yamada, M., Hobbie, L., Ehrismann, J.S., Juergens, G., Estelle, M.** (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Dev. Cell.*, **9**, 109-119.
- Dostál, R.** (1908) Correlation relationships in germinating plants of Papilionaceae. *Rozpravy české Akademie*, II, **17** (25), 1-44.
- Eliasson, L., Bertell, G., Bolander, E.** (1989) Inhibitory action of auxin on root elongation not mediated by ethylene. *Plant Physiol.*, **91**, 310-314.
- Evans, M.L.** (1985) The action of auxin on plant cell elongation. *Critical Rev. Plant Sci.*, **2**, 317-365.
- Evans, M.L., Ishikawa, H., Estelle, M.A.** (1994) Responses of Arabidopsis roots to auxin studied with high temporal resolution - comparison of wild-type and auxin-response mutants. *Planta*, **194**, 215-222.

- Friml, J., Palme, K.** (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Mol. Biol.*, **49**, 273-274.
- Friml, J., Yang, X., Michniewicz, M., Weijers, D., Quint, A., Tietz, O., Benjamins, R., Ouwerkerk, P.B.F., Ljung, K., Sandberg, G., Hooykaas, P.J.J., Palme, K., Offringa, R.** (2004) A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, **306**, 862-865.
- 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**, 2226-2230.
- Gee, M.A., Hagen, G., Guilfoyle, T.J.** (1991) Tissue-specific and organ-specific expression of soybean auxin-responsive transcripts GH3 and SAURs. *Plant Cell*, **3**, 419-430.
- Geldner, N., Friml, J., Stierhof, Y.D., Jurgens, G., Palme, K.** (2001) Auxin transport inhibitors block PIN1 cycling and vesicle trafficking. *Nature*, **413**, 425-428.
- Goldsmith, M.H.M.** (1977) The polar transport of auxin. *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **28**, 439-478).
- Guilfoyle, T.J., Hagen, G.** (2001). Auxin response factors. *J. Plant Growth Regul.*, **10**, 281-291.
- Hagen, G., Guilfoyle, T.** (2002) Auxin-responsive gene expression: genes, promoters and regulatory factors. *Plant Mol. Biol.*, **49**, 373-385.
- Hagen, G., Guilfoyle, T., Gray, W.M.** (2004) Auxin signal transduction. In *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*, 3rd ed. Dordrecht: Springer, 750 s.
- Hayashi, K.** (2012) The Interaction and Integration of Auxin Signaling Components. *Plant Cell Physiol.*, **53**, 965-975.
- Henderson, J., Baulry, J.M., Ashford, D.A., Oliver, S.C., Hawes, C.R., Lazarus, C.M., Venis, M.A. and Napier, R.M.** (1997) Retention of maize auxin-binding protein

in the endoplasmic reticulum: quantifying escape and the role of auxin. *Planta*, **202**, 313-323.

**Hillman, J.** (1984) Apical dominance. *Advanced plant physiology*, 127-148. Pitman, London.

**Hsieh, H.L., Okamoto, H., Wang, M., Ang, L.H., Matsui, M., Goodman, H., Deng, X.W.** (2000) FIN219, an auxin-regulated gene, defines a link between phytochrome A and the downstream regulator COP1 in light control of Arabidopsis development. *Genes Dev.*, **14**, 1958-1970.

**Jaillais, Y., Fobis-Loisy, I., Miege, C., Rollin, C., Gaude, T.** (2006) AtSNX1 defines an endosome for auxin-carrier trafficking in Arabidopsis. *Nature*, **443**, 106-109.

**Kalousek, P., Buchtová, D., Balla, J., Reinöhl, V., Procházka, S.** (2010) Cytokinins and polar transport of auxin in axillary pea buds. *Magazine Acta Universitatis Agriculturae et Silviculturae Mendeleianae Brunensis*, **0;58**, 79-88.

**Kepinski, S., Leyser, O.** (2005). The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature*, **435**, 446-451.

**Leyser, H.M. O., Lincoln, C.A., Timpste, C.S., Lammer, D., Turner, J.C., Estelle, M.** (1993) Arabidopsis auxin-resistance gene AXR1 encodes a protein related to ubiquitin-activating enzyme E1. *Nature*, **304**, 161-164.

**Leyser, O., Day, S.** (2003) Mechanisms in plant development. Oxford: Blackwell, 241 s.

**Li, H., Shen, J.J., Zheng, Z.L., Lin, Y., Yang, Z.** (2001) The Rop GTPase switch controls multiple developmental processes in Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **126**, 670-684.

**Madoka, Y., Mori, H.** (2000) Two novel transcripts expressed in pea dormant axillary buds. *Plant Cell Physiol.*, **41**, 274-281.

**Mano, Y., Nemoto, K.,** (2012) The pathway of auxin biosynthesis in plants. *Journal of Experimental Botany*, **63**, 2853-2872.

**Mashiguchi, K., Tanaka, K., Sakai, T., Sugawara, S., Kawaide, H., Natsume, M., Hanada, A., Yaeno, T., Shirasu, K., Yao, H., et al.** (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 18512-18517.

- Michniewicz, M., Brewer, P.B., Friml, J.** (2007) Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, **5**:e0108. doi:10.1199/tab.0108.
- Morris, D.A.** (1977) Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings (*Pisum sativum* L.): some implications in polarity and apical dominance. *Planta*, **136**, 91-96.
- Morris, D.A., Thomas, A.G.** (1978) A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. *J. Exp. Bot.*, **29**, 147-157.
- Mravec, J., Kubeš, M., Bielach, A., Gaykova, V., Petrášek, J., Skupa, P., Chand, S., Benková, E., Zažímalová, E., Friml, J.** (2008) Interaction of PIN and PGP transport mechanisms in auxin distribution-dependent development. *Development*, **135**, 3345-3354.
- Mravec, J., Skůpa, P., Bailly, A., Hoyerová, K., Křeček, P., Bielach, A., Petrášek, J., Zhang, J., Gaykova, V., Stierhof, Y-D, et al.** (2009) Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, **459**, 1136-1140.
- Müller, D., Waldie, T., Miyawaki, K., To, J.P., Melnyk, C.W., Kieber, J.J., Leyser, O.** (2015) Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *Plant J.*, **82**, 874-886.
- Murphy, A.S., Hoogner, K.R., Peer, W.A., Taiz, L.** (2002). Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane associated aminopeptidases from Arabidopsis. *Plant Physiol.*, **128**, 935-950.
- Ngo, P., Ozga, J.A., Reinecke, D.M.** (2002) Specificity of auxin regulation of gibberellin 20-oxidase gene expression in pea pericarp. *Plant. Mol. Biol.*, **49**, 439-448.
- Nitsch, J.P.** (1950) Growth and morphogenesis of the strawberry as related to auxin. *American Journal of Botany*, **37**, 211-215.
- Noh, B., Murphy, A.S., Spalding, E.P.** (2001) Multidrug resistance-like genes of Arabidopsis required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell*, **13**, 2441-2454.

- Normanly, J., Slovin, J.P., Cohen, J.D.** (2004) Auxin Metabolism. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 3rd ed. Dordrecht: Springer, 750 s.
- Okada, K., Ueda, J., Komaki, M.K., Bell, C.J., Shimura, Y.** (1991) Requirement of the auxin polar transport system in the early stages of Arabidopsis floral bud formation. *Plant Cell*, **3**, 677-684.
- Paciorek, T., Friml, J.** (2006) Auxin signaling. *J. of Cell Science*, **119**, 1199-1202.
- Petrášek, J., Friml, J.** (2009) Auxin transport routes in plant development. *Development*, **136**, 2675-2688.
- Procházka, S., Macháčková, I., Krekule, J., Šebánek, J. a kol.** (1998) Fyziologie rostlin. Academia Praha, 484 s.
- Prusinkiewicz, P., Crawford, S., Smith, R.S., Ljung, K., Bennett, T., Ongaro, V., Leyser, O.** (2009) Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 17431-17436.
- Quint, M., Gray, W.M.** (2006) Auxin signaling. *Curr. Opin. Plant. Biol.*, **9**, 448-453.
- Rubery, P.H., Sheldrake, A.R.** (1974) Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, **118**, 101-121.
- Sachs, T.** (1968) On determination of pattern of vascular tissue in peas. *Ann. Bot.*, **32**, 781-790.
- Sachs, T.** (1981) The control of the patterned differentiation of vascular tissues. *Adv. Bot. Res.*, **9**, 151-262.
- Sachs, T.** (1991) Pattern formation in plant tissues. *Cambridge University Press*, New York, NY.
- 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 Dev.*, **20**, 2902-2911.

- Shinohara, N., Taylor, C., Leyser, O.** (2013) Strigolactone can promote or inhibit shoot branching by triggering rapid depletion of the auxin efflux protein PIN1 from the plasma membrane. *PLoS Biol.*, **11**: e1001474.
- Snow, R.** (1925) The correlative inhibition of the growth of axillary buds. *Ann. Bot.*, **39**, 841-859.
- Snow, R.** (1937) On the nature of correlative inhibition. *New Phytologist*, **36**, 283-300.
- Stafstrom, J.P., Ripley, B.D., Devitt, M.L., Drake, B.** (1998) Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. Cloning and expression of PsDRM1 and PsDRM2. *Planta*, **205**, 547-552.
- Swarup, R., Kramer, E.M., Perry, P., Knox, K., Leyser, H.M., Haseloff, J., et al.** (2005) Root gravitropism requires lateral root cap and epidermal cells for transport and response to a mobile auxin signal. *Nat. Cell Biol.*, **7**, 1057-1065.
- Swarup, R., Péret B.** (2012) AUX/LAX family of auxin influx carriers-an overview. *Front. Plant Sci.*, **3**: 225.
- Šebánek, J.** (1975) Někteřé pokusně morfologické rostlinné modely prof. Rudolfa Doštála. Vysoká škola zemědělská Brno, 227s.
- Tamas, I. (1987) Hormonal regulation of apical dominance. In *Plant hormones and their role in plant growth and development*. Dordrecht: Springer, 732s.
- Tepper, H.B.** (1993) Developmental features accompanying the imposition and release of apical dominance in pea. *Journal of Plant Physiology*, **142**, 722-729.
- Thimann, K.V., Skoog, F.** (1933) Studies on the growth hormones of plants. III. The inhibition of growth substances on bud development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **19**, 714-716.
- Thimann, K.V., Skoog, F.** (1934) On the inhibition of bud development and other function of growth substances in *Vicia faba*. *Proceedings of Royal Society, London*, **114**, 317-339.



- Tiwari, S.B., Wang, X.J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J.** (2001). Aux/IAA proteins are active repressors and their stability and activity are modulated by auxin. *Plant Cell*, **13**, 2809-2822.
- Tromas, A., Rechenmann, C.P.** (2010) Recent progress in auxin biology. *Comptes Rendus Biologies*, **333**, 297-306.
- Ulmasov, T., Hagen, G., Guilfoyle T.J.** (1997) ARF1, a transcription factor that binds auxin response elements. *Science*, **276**, 1865-1868.
- Verrier, P.J., Bird, D., Buria, B., Dassa, E., Forestier, C., Geisler, M., Klein, M., Kolukisaoglu, U., Lee, Y., Martinoia, E., et al.** (2008) Plant ABC proteins- a unified nomenclature and updated inventory. *Trends Plant Sci.*, **13**, 151-159.
- Vieten, A., Sauer, M., Brewer, P.B., Friml, J.** (2007) Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends Plant Sci.*, **12**, 160-168.
- Vieten, A., Vanneste, S., Wisniewska, J., Benková, E., Benjamins, R., Beeckman, T., Luschnig, C., Friml, J.** (2005) Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression. *Development*, **132**, 4521-4531.
- Waldie, T., McCulloch, H., Leyser, O.** (2014) Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *Plant J.*, **79**, 607-622.
- Willemsen, V., Friml, J., Grebe, M., van den Toorn, A., Palme, K., Scheres, B.** (2003) Cell polarity and PIN protein positioning in Arabidopsis require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *Plant Cell*, **15**, 612-625.
- Wisniewska, J., Xu, J., Seifertová, D., Brewer, P.B., Růžička, K., Blilou, I., Rouquié, D., Benková, E., Scheres, B., Friml, J.** (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, **312**, 883.
- Woodward A.W., Bartel B.** (2005) Auxin: regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, **95**, 707-735.

- Worley, C.K., Zenser, N., Ramos, J., Rouse, D., Leyser, O., Theologis, A. et al.** (2000) Degradation of Aux/IAA proteins is essential for normal auxin signalling. *Plant J.*, **21**, 553-562.
- Yang, H., Murphy, A.S.** (2009) Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant J.*, **59**, 179-191.
- Yang, T., Poovaiah, B.W.** (2000) Molecular and biochemical evidence for the involvement of calcium/calmodulin in auxin action., *J. Biol. Chem.*, **275**, 3137-3143.
- Zažímalová, E., Křeček, P., Skupa, P., Hoyerová, K., Petrášek, J.** (2007) Polar transport of the plant hormone auxin – the role of PIN-FORMED (PIN) proteins. *Cell. Mol. Life Sci.*, **64**, 1621-1637.
- Zažímalová, E., Murphy, A.S., Yang, H., Hoyerová, K., Hošek, P.** (2010) Auxin transporters- why so many? *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.*, **2**:a001552.
- Zhang, J., Nodzynski, T., Pencik, A., Rolcik, J., Friml, J.** (2010) PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 918-922.
- Zhao, Y.** (2010) Auxin biosynthesis and its role in plant development. *Annu. Rev. Plant Biol.*, **61**, 49-64.

## 9 SEZNAM OBRÁZKŮ A TABULEK

Obr. 3.1	Struktury vybraných auxinů	14
Obr. 3.2	Model signalizace auxinu v buňce	20
Obr. 3.3	Transport auxinu	27
Obr. 3.4	Vývojová stádia apikální dominance	28
Obr. 3.5	Kanalize toku auxinu	30
Obr. 3.6	Kompetitivní kanalizace mezi dvěma zdroji auxinu	31
Obr. 4.1	Experimentální modely pro měření délky kotylárních výhonů	38
Obr. 5.1	Dekapitace	42
Obr. 5.2	Dekapitace + plast	43
Obr. 5.3	Dekapitace + IAA (shora)	43
Obr. 5.4	Dekapitace + IAA (pravá strana)	44
Obr. 5.5	Dekapitace + IAA (z obou stran)	44
Obr. 5.6	Dekapitace + plast + IAA	45
Obr. 5.7	Exprese genu <i>PsPIN1</i> v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny	46
Obr. 5.8	Exprese genu <i>PsAUX1</i> v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny	47
Obr. 5.9	Exprese genu <i>PsDRM1</i> v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny	47
Obr. 5.10	Exprese genu <i>PsBRC1</i> v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny	48
Obr. 5.11	Srovnání exprese genů 5. den po dekapitaci (inhibovaný a rostoucí výhon)	48
Obr. 5.12	Imunoanalýza stonkového segmentu po oboustranné aplikaci auxinu	49
Obr. 5.13	Imunoanalýza stonkového segmentu po oboustranné aplikaci auxinu a umístění plastu doprostřed pahýlu	50
Obr. 5.14	Imunoanalýza kotylárních pupenů a výhonů	51
Tab. 4.1:	Koncentrace RNA a přepočet objemu vstupujícího do reakce	35
Tab. 4.2:	Složení reakční směsi pro RT (1. fáze)	35
Tab. 4.3:	Složení reakční směsi pro RT (2. fáze)	35
Tab. 4.4:	Složení reakční směsi pro qPCR	36
Tab. 4.5:	Seznam genů <i>Pisum sativum</i> L., primerů a podmínky jednotlivých qPCR reakcí	37
Tab. 4.6:	Složení PBS pufri	39

## 10 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

IAA	kyselina indolyl-3-octová
Trp	tryptofan
IAM	indolyl-3-acetamidová dráha
IPA	indolyl-3-pyruvátová dráha
IAOX	indolyl-3-acetaldoximová dráha
TAM	tryptaminová dráha
IBA	kyselina indolyl-3-máselná
PAA	kyselina fenylactová
NAA	$\alpha$ -naftyl-octová kyselina
2,4-D	2,4-dichlorfenoxycetová kyselina
2,4,5-T	2,4,5-trichlorfenoxycetová kyselina
MCPA	2-metyl-4-chlorfenoxycetová kyselina
WLF	faktory rozvolňování buněčné stěny
ARF	faktory auxinové odpovědi (auxin response factors)
BFA	brefeldin A
PAT	polární transport auxinu (polar auxin transport)
TIBA	kyselina 2,3,5-trijodbenzoová
AD	apikální dominance
CK	cytokininy
RT	reverzní transkripce