

Mendelova univerzita v Brně

Agronomická fakulta

CEITEC MENDELU



**Interakcia auxínov a cytokinínov v apikálnej
dominancii**

Dizertačná práca

Školiteľ:

prof. Ing. Stanislav Procházka, DrSc.

Školiteľ špecialista:

Ing. Jozef Balla, Ph.D.

Vypracovala:

Ing. Zuzana Medved'ová

Brno 2016

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som dizertačnú prácu **Interakcia auxínov a cytokinínov v apikálnej dominancii** vypracovala samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách v znení neskorších predpisov a v súlade s platnou *Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

Som si vedomá, že sa na moju prácu vzťahuje zákon č. 121/2000 Sb., autorský zákon, a že Mendelova univerzita v Brně má právo na uzatvorenie licenčnej zmluvy a použitie tejto práce ako školského diela podľa § 60 odst. 1 autorského zákona.

Ďalej sa zaväzujem, že pred spísaním licenčnej zmluvy o využití diela inou osobou (subjektom) si vyžiadam písomné stanovisko univerzity, že predmetná licenčná zmluva nie je v rozpore s oprávnenými záujmami univerzity, a zaväzujem sa uhradiť príspevok na úhradu nákladov spojených so vznikom diela, a to až do ich skutočnej výšky.

V Brne dňa:

Podpis

Pod'akovanie

Ďakujem školiteľovi dizertačnej práce prof. Ing. Stanislavovi Procházkovi, DrSc. za odborné vedenie, cenné podnety a čas, ktorý venoval konzultáciám potrebným k efektívnemu smerovaniu experimentov prezentovaných v tejto práci. Ďakujem školiteľovi špecialistovi Ing. Jozefovi Ballovi, Ph. D. za odborné informácie a konzultácie pri spracovávaní práce. Ďalej ďakujem Dr. Colinovi Turnbullovi za odborné konzultácie počas zahraničnej stáže na Imperial College London, Ing. Petrovi Kalouskovi, Ph.D. za užitočné rady a spoluprácu pri realizácii experimentov s [³H] značeným auxínom. Ďakujem tiež mojim najbližším a rodine za podporu počas celého doktorského štúdia.

Spracovaná dizertačná práca bola finančne podporená z prostriedkov špecifického vysokoškolského výskumu prostredníctvom projektu Agronomickej fakulty Mendelovej univerzity v Brně "IGA AF MENDELU" (IP 14/2013)", ďalej z prostriedkov projektu "CEITEC - Central European Institute of Technology" (CZ.1.05/1.1.00/02.0068), Ministerstvom školství, mládeže a tělovýchovy ČR v rámci projektu "CEITEC 2020 (LQ1601)" a z prostriedkov projektu "Podpora mezinárodní spolupráce - multidisciplinární témata ve vědách o živé a neživé přírodě" (CZ.1.07/2.4.00/17.0045).

ABSTRAKT

Predkladaná práca bola za použitia dvoj-nódového modelového systému hrachu (*Pisum sativum* L.) zameraná na vyrastanie axilárnych pupeňov po odstránení stonkového apexu dekapitáciou. V práci bola zároveň sledovaná dôležitosť polárneho toku auxínu v hlavnej stonke v inhibícii vyrastania pupeňov. Rozdielne experimentálne prístupy potvrdili nevyhnutnosť auxínového toku v hlavnej stonke rastliny v udržaní apikálnej dominancie a zabránení vyrastania axilárnych pupeňov, vzhľadom na to, že prerušenie polárneho auxínového toku v hlavnej stonke či už mechanicky alebo inhibítorom polárneho transportu auxínu viedlo k iniciácii rastu axilárnych pupeňov. Výsledky uvedené v práci tiež ukazujú, že medzi jednotlivými pupeňmi dochádza po dekapitácii ku kompetícii o vytvorenie nového zdroja auxínu a dominujúceho výhonu. Na základe vykonaných experimentov bolo ďalej zistené, že po iniciácii rastu axilárneho pupeňa je pre formovanie potenciálne nového dominujúceho laterálneho výhonu potrebný sústavný export auxínu z daného pupeňa. Tieto výsledky, v súlade s teóriou kanalizácie auxínového transportu, potvrdzujú kľúčovú úlohu auxínu v apikálnej dominancii.

Ďalšia časť práce je zameraná na účasť cytokinínov v regulácii stonkového vetvenia na lokálnej a aj na systémovej úrovni. Na základe vykonaných experimentov bolo odhalené, že exogénne aplikovaný cytokinín benzyladenín (BA) urýchľuje polárnu lokalizáciu PIN1 proteínov, čím dochádza k stimulácii auxínového transportu. Na systémovej úrovni celej rastliny bolo zistené, že zvýšená hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte (X-CK) stimuluje stonkové vetvenie, zatiaľ čo hladina X-CK môže byť významne znížená auxínom exogénne aplikovaným v podobe kyseliny indoly-3-octovej (IAA), čo súčasne vedie k inhibícii alebo prinajmenšom obmedzeniu stonkového vetvenia. Tieto výsledky sú ďalším dôkazom významnej role auxínu v udržaní apikálnej dominancie a zároveň antagonistického vzťahu auxínov a cytokinínov v utváraní stonkovej architektúry. Na základe použitia mutantných línií hrachu *ramosus* (*rms1* a *rms2*) bolo tiež potvrdené, že v rámci celého procesu apikálnej dominancie je auxín primárnym regulačným faktorom. Avšak pre harmonické utváranie morfológických štruktúr nadzemnej časti rastliny v odpovedi na podmienky okolitého prostredia je potrebné koordinované spolupôsobenie auxínu nielen s cytokinínom, ale tiež s rastlinným hormónom strigolaktónom.

Kľúčové slová: auxín, cytokinín, apikálna dominancia, polárny transport auxínu

ABSTRACT

This work is focused on axillary bud outgrowth after removal of the shoot apex by decapitation using two-nodal model system of pea plants (*Pisum sativum* L.). Moreover, in this work importance of polar auxin transport in the main stem in inhibition of axillary bud outgrowth was observed. Interruption of the polar auxin transport in the stem performed mechanically or chemically by polar auxin transport inhibitor led to initiation of axillary bud outgrowth. The different experimental procedures proved essential role of auxin flow in the main stem in apical dominance maintenance and in inhibition of axillary bud outgrowth. This work also showed that axillary buds after decapitation compete with each other to establish new auxin source and new dominant branch. After axillary bud activation and initiation of its growth, sustained auxin export from this bud is crucial for forming the new dominant lateral branch. These results, which are in accordance with auxin transport canalization theory confirmed the central role of auxin in apical dominance.

Next part of this work is focused on implication of hormone cytokinin in shoot branching regulation on local and also on systemic level. Based on the performed experiments was revealed that exogenously applied cytokinin benzyladenin (BA) accelerates polarization of PIN1 proteins which promotes auxin transport. On the systemic level of whole plant was found that increased endogenous level of cytokinins in xylem exudate (X-CK) stimulated shoot branching, while decreased cytokinins level by exogenously applied auxin indolyl-3-acetic acid (IAA) led to inhibition or at least limited shoot branching. These findings proved important role of auxin in maintenance of apical dominance and also antagonistic relationship between auxin and cytokinin in formation of shoot architecture.

Based on the experiments with mutant lines of pea plants *ramosus* (*rms1* and *rms2*) was confirmed that in developmental processes of apical dominance auxin represents the primary regulation factor. However, highly coordinated interaction of auxin with cytokinin and also with plant hormone strigolactone is necessary for optimal formation of morphological structures of shoot in response to different environmental conditions.

Key words: auxin, cytokinin, apical dominance, polar auxin transport

OBSAH

1 ÚVOD.....	9
2 CIEĽ PRÁCE.....	10
3 LITERÁRNY PREHĽAD	11
3.1 Fytohormonálna regulácia apikálnej dominancie.....	11
3.2 Auxíny.....	12
3.2.1 Endogénne auxíny	13
3.2.2 Syntetické auxíny	14
3.2.3 Metabolizmus auxínu v rastlinách	14
<i>Biosyntéza auxínu</i>	15
<i>Ireverzibilná konjugácia a oxidácia IAA</i>	16
<i>Reverzibilná konjugácia IAA</i>	16
3.2.4 Hladina auxínu v rastlinách	17
3.2.5 Transport auxínu v rastlinách	18
3.2.6 Polárny transport auxínu	19
<i>Chemiosmotická hypotéza</i>	19
3.2.7 AUX1/LAX transportné proteíny	19
3.2.8 PIN transportné proteíny	21
<i>Faktory určujúce lokalizáciu PIN proteínov</i>	23
<i>Fosforylácia PIN proteínov</i>	23
<i>Zapojenie ARF-GEF GNOM v polárnom recyklovaní PIN proteínov</i>	25
<i>Kompozícia membránových lipidov</i>	26
3.2.9 ABCB transportné proteíny	26
3.2.10 Inhibítory polárneho transportu auxínu	28
<i>Kyselina 1-N-naftyľftalámová</i>	28
<i>Kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA)</i>	29
<i>Brefeldín A</i>	30
3.3 Cytokiníny.....	31
3.3.1 Metabolizmus cytokinínov v rastlinách.....	32
<i>Biosyntéza cytokinínov</i>	32
<i>Konjugácia a degradácia cytokinínov</i>	33
<i>Hladina cytokinínov v rastlinách</i>	33
<i>Transport cytokinínov v rastlinách</i>	34
3.4 Strigolaktóny	34
3.4.1 Biosyntéza strigolaktónu	35
3.4.2 Transport strigolaktónu	37
3.5 Apikálna dominancia.....	38
3.5.1 Nutritívna teória apikálnej dominancie	40

3.5.2	Teória priamej auxínovej inhibície.....	40
3.5.3	Teória nepriamej auxínovej inhibície.....	40
3.5.4	Nutrične diverzná teória.....	41
3.5.5	Teória o vaskulárnych spojeniach.....	41
3.5.6	Teória autoinhibície.....	41
3.5.7	Systémová regulácia apikálnej dominancie.....	42
	<i>Teória kanalizácie auxínového transportu.....</i>	<i>43</i>
	<i>Teória sekundárnych poslov.....</i>	<i>46</i>
3.5.8	Regulácia apikálnej dominancie na lokálnej úrovni.....	50
4	MATERIÁL A METÓDY.....	52
4.1	Stanovenie gébovej expzie v axilárnych pupeňoch.....	52
4.1.1	Rastlinný materiál a kultivačné podmienky.....	52
4.1.2	Ošetrenie rastlín inhibítormi a hormónmi.....	52
4.1.2	Izolácia RNA, reverzná transkripcia, real-time PCR.....	56
4.1.3	Imunolokalizácia PIN1 proteínov.....	60
	<i>Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrenie inhibítormi a hormónmi.....</i>	<i>60</i>
	<i>Fixácia vzoriek.....</i>	<i>63</i>
	<i>Odvodenie a zalievanie vzoriek do parafínu.....</i>	<i>63</i>
	<i>Priprava mikroskopických preparátov.....</i>	<i>64</i>
	<i>Deparafinácia a rehydratácia vzoriek.....</i>	<i>64</i>
	<i>Blokovanie a inkubácia s primárnou protilátkou.....</i>	<i>65</i>
	<i>Blokovanie a inkubácia so sekundárnou protilátkou.....</i>	<i>65</i>
	<i>Finálna úprava preparátov a mikroskopické pozorovanie objektov.....</i>	<i>65</i>
4.1.4	Analýza transportu auxínu [³ H] značenou IAA.....	66
	<i>Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrenie hormónmi a analýza exportu IAA.....</i>	<i>66</i>
4.1.5	Analýza hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte.....	68
	<i>Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrenie hormónmi.....</i>	<i>68</i>
	<i>Odber xylémového exsudátu.....</i>	<i>69</i>
	<i>Analýza cytokinínov.....</i>	<i>70</i>
4.1.6	Hodnotenie dĺžky axilárnych pupeňov a laterálnych výhonov.....	70
	<i>Rastlinný materiál a kultivačné podmienky.....</i>	<i>70</i>
5	VÝSLEDKY A DISKUSIA.....	72
5.1	Apex reguluje vetvenie stonky u hrachu.....	72
5.2	Dĺžka ponechanej dekapitovanej stonky ovplyvňuje rýchlosť uvoľnenia axilárnych pupeňov z dormancie.....	78
5.3	Prerušenie polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke uvoľňuje axilárne pupene z dormancie.....	82
5.4	Prerušenie polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke medzi pupeňmi uvoľňuje prvý pupeň z dormancie.....	85

5.5 Inhibícia polárneho transportu auxínu z druhého axilárneho pupeňa uvoľňuje prvý axilárny pupeň z dormancie	89
5.6 Cytokiníny stimulujú polárny transport auxínu, čím uvoľňujú axilárne pupene z dormancie	99
5.7 Polárny transport auxínu v stonke reguluje hladinu cytokinínov v xyléme	104
5.8 Auxín reguluje vetvenie u mutantných rastlín hrachu <i>rms2</i>	112
5.9 Auxín reguluje vetvenie u mutantných rastlín <i>rms1</i> s deficitnou biosyntetickou dráhou strigolaktónu	122
5.10 Súhrnná diskusia	129
6 ZÁVER	133
7 POUŽITÁ LITERATÚRA	136
8 ZOZNAM OBRÁZKOV	166
9 ZOZNAM TABULIEK	174
10 ZOZNAM SKRATIEK.....	175

1 ÚVOD

Rastliny sú bez možnosti pohybu počas celého svojho životného cyklu vystavované neustále sa meniacim podmienkam okolitého prostredia. Aj keď rastliny nemajú schopnosť uniknúť z podmienok málo vhodných pre svoj rast, majú unikátnu schopnosť s týmito nepriaznivými podmienkami sa vyrovnat' a prispôbiť sa. Jedným takýmto rysom vývojevej flexibility rastlín je aj ich schopnosť dynamicky meniť architektúru nadzemnej časti prostredníctvom regulácie stonkového vetvenia. Zmeny a optimalizácia stonkovej architektúry v závislosti od rýchlo sa meniacich okolitých podmienok sa deje v rámci fyziologického procesu apikálnej dominancie, ktorý je pozorovaný, študovaný a využívaný už počas desaťročí. Veľký význam apikálnej dominancie z agronomického hľadiska z dôvodu možnosti zvyšovania výnosov hospodársky významných plodín viedol k záujmu a úsiliu pochopiť podstatu a mechanizmus procesu apikálnej dominancie.

Stonkové vetvenie má pre určovanie architektúry rastlinného tela dôležitý význam, vzhľadom na to, že predstavuje vysoko plastickú determinantu, ktorá umožňuje rastlinám odpovedať na zmeny v okolitom prostredí. Stonkové vetvenie je kontrolované komplexom vzájomných interakcií medzi hormonálnymi, vývojovými, genetickými a environmentálnymi faktormi. Na základe mnohých štúdií bolo zistené, že vo vývojom procese apikálnej dominancie hrá z hormonálnych faktorov dôležitú úlohu rastlinný hormón auxín. Postupom času bolo pozorované, že v rámci regulácie stonkového vetvenia a vyrastania pupeňov je tiež významná interakcia auxínu s ďalšími rastlinnými hormónmi a rastovými regulátormi. V priebehu času boli navrhované a formulované viaceré hypotézy a teórie, v snahe objasniť mechanizmus tohto fyziologického procesu. Mnohými pozorovaniami a rôznymi experimentálnymi prístupmi sa znalosti o mechanizme regulácie stonkového vetvenia a apikálnej dominancie stále rozširujú, avšak pre presné definovanie hormonálnej podstaty apikálnej dominancie, ktorá stále zostáva otvorenou otázkou, sú potrebné ešte ďalšie experimentálne podložené doklady.

2 CIEĽ PRÁCE

1. Získanie nových poznatkov o regulácii fyziologického procesu apikálnej dominancie a stonkového vetvenia rastlinnými hormónmi.
2. V rámci experimentálnej časti vykonanie experimentov a analýz zameraných na štúdium úlohy rastlinného hormónu auxínu v procese apikálnej dominancie, jeho účasti v regulácii vyrastania axilárnych pupeňov a stonkového vetvenia.
3. Sledovanie zapojenia rastlinného hormónu cytokinínu do procesu apikálnej dominancie a jeho interakcie s rastlinným hormónom auxínom prostredníctvom odlišných experimentálnych prístupov.
4. Spracovanie získaných výsledkov z vykonaných experimentov a analýz do záverečnej práce.

3 LITERÁRNY PREHĽAD

3.1 Fytohormonálna regulácia apikálnej dominancie

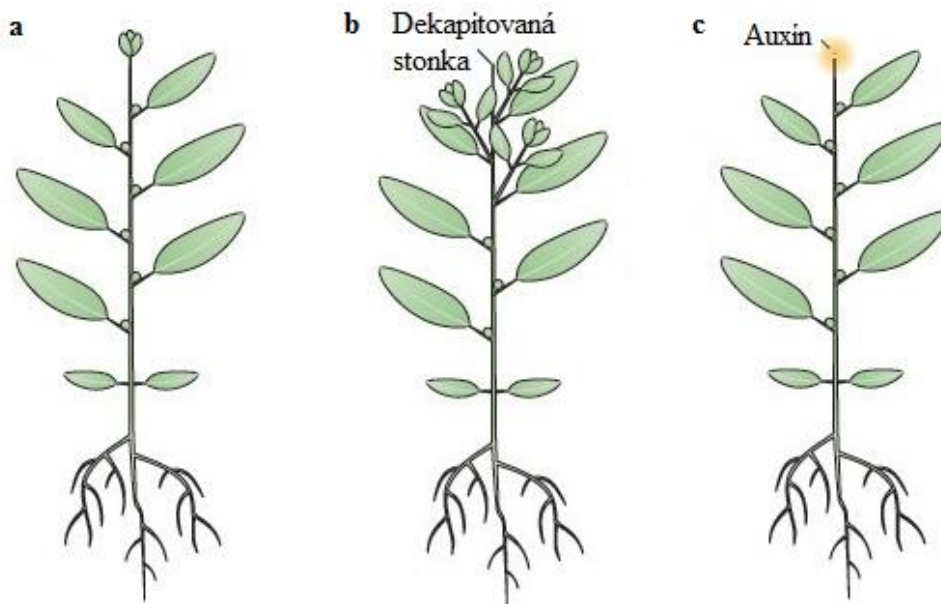
Rastliny, ako usadlé organizmy, ktorým chýba schopnosť uniknúť zo stále sa meniacich či nepriaznivých podmienok svojho prostredia, sú známe typickým vysokým stupňom plasticity. Táto plasticita, nutná pre prežitie rastlín sa prejavuje schopnosťou maximálne prispôbiť vývojový program odpovedí rastliny k zmenám v okolitom prostredí.

Počas embryogenézy je u rastlín zakladaná hlavná stavba rastlinného tela zahrňujúca apikálno-bazálnu osu, ktorá je definovaná stonkovým apikálnym meristémom na apexe osi a koreňovým apikálnym meristémom na bazálnom konci osi (Weijers *et al.*, 2006). Aktivita obidvoch meristémov vedie v priebehu postembryonálneho vývoja, k formovaniu špecifických stonkových či koreňových orgánov a sekundárnych meristémov, ktoré môžu mať ten istý vývojový potenciál ako primárne meristémy. Vývojový plán pre architektúru rastlinného tela je takto kontinuálne modifikovaný počas celého životného cyklu rastliny, umožňujúc prispôbenie sa prevládajúcim podmienkam prostredia (Laux a Jürgens, 1997; De Smet a Jürgens, 2007).

Typickým príkladom vývojovej plasticity u rastlín je kontrola stonkového vetvenia. Počas tohto procesu sú v úžľabí každého listu v podobe axilárnych pupeňov vytvárané sekundárne stonkové meristémy (axilárne meristémy) s potenciálom formovať laterálne výhony. Tieto axilárne pupene môžu byť neskôr aktivované a dať základ pre rast laterálneho výhonu alebo môžu zostať v dormantnom stave (Stafstrom a Sarup, 2000; Rameau *et al.*, 2002). Konečný počet výhonov nadzemnej časti rastliny je preto definovaný počtom axilárnych meristémov a aktivitou axilárnych pupeňov. Väčšina vývojovej plasticity v rámci stonkového vetvenia však pochádza z regulácie aktivity axilárnych pupeňov a regulácie ich vyrastania. Dormancia či aktivácia pupeňov pritom môže byť kontrolovaná a zabezpečovaná predovšetkým endogénnymi signálmi - rastlinnými hormónmi, a tiež exogénnymi signálmi pochádzajúcimi z okolitého prostredia, ktoré vedú k internálnym zmenám v statuse pupeňa (Lang *et al.*, 1987).

V rámci rastlinnej biológie a fyziológie je regulácii vyrastania axilárnych pupeňov z dôvodu dôležitosti jej uplatnenia v rastlinnej produkcii pri zvyšovaní výnosov venovaná veľká pozornosť. Špecifický dôraz je pritom kladený na fenomén apikálnej dominancie. Je známe, že hlavný stonkový vrchol má inhibičný efekt

na aktivitu axilárnych pupeňov umiestnených pod ním, pričom odstránenie apexu vedie k aktivácii pupeňov (Snow, 1929) (obr. 1a, 1b). Ďalšie štúdie umožnili identifikáciu inhibičnej substancie, ktorá je produkovaná v stonkovom vrchole a v je stonke transportovaná bazipetálne, smerom ku koreňu. Touto substanciou bola kyselina indolyl-3-octová, člen triedy rastlinných hormónov známych ako auxíny. V prípade, že je auxín aplikovaný na dekapitovanú plochu stonky, dokáže nahradiť efekt prítomného stonkového apexu a obnoviť represiu vyrastania pupeňov (Thimann a Skoog, 1933) (obr. 1c). Z tohto dôvodu sa rastlinnému hormónu auxínu pripisuje hlavná a kľúčová úloha v regulácii procesu apikálnej dominancie, pričom auxín tento fyziologický proces kontroluje a reguluje za súčinnosti ďalších rastlinných hormónov, predovšetkým cytokinínov a strigolaktónov.



Obr. 1: Klasické fyziologické experimenty demonštrujúce existenciu apikálnej dominancie. Stonkový apex inhibuje vyrastanie axilárnych pupeňov (a). Odstránenie stonkového apexu dekapitáciou spôsobuje aktiváciu axilárnych pupeňov a formovanie laterálnych výhonov (b). Aplikácia auxínu namiesto apexu na dekapitovanú stonku vedie k obnove inhibície stonkového vetvenia (c) (upravené podľa Domagalska a Leyser, 2011).

3.2 Auxíny

Auxín je najdlhšie známym rastlinným hormónom, kľúčovým pre množstvo aspektov vývoja a rastu rastlín na embryonálnej i postembryonálnej úrovni (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003; Zhao, 2010). Pre vlastný objav auxínu bolo základom štúdium

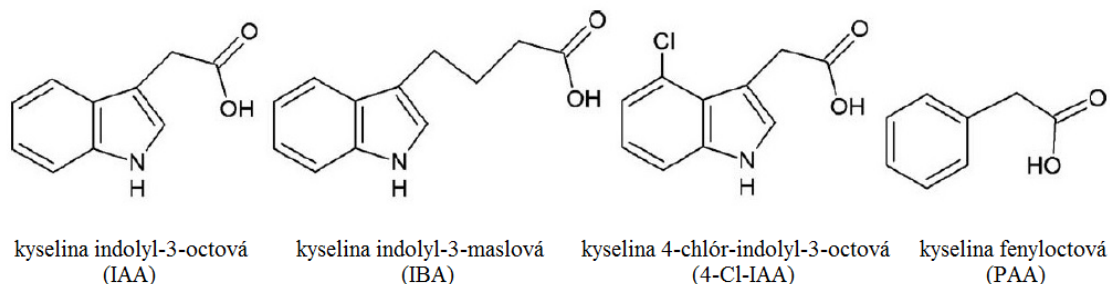
fototropizmu a gravitropizmu, na ktorom pracoval už Charles Darwin. Pre potvrdenie existencie auxínu boli najdôležitejšie tie experimenty, v ktorých Darwin pozoroval ohýbanie koleoptílí klíčnych rastlín lesknice kanárskej (*Phalaris canariensis* L.) po aplikácii jednosmerného svetla. Podobne aj Went (1926) na základe ďalších experimentov s rastlinami ovsa (*Avena sativa* L.) preukázal, že zo špičiek koleoptílí ovsa difunduje do agaru látka nimi vytváraná, ktorá má stimulujúci účinok na predlžovací rast. Následne sa začal Kōgl zaoberať chemickou povahou tejto substancie, ktorá v pozorovaniach s koleoptile ovsa (*Avena sativa* L.) vykazovala aktivitu a v roku 1933 z ľudského moču izoloval látku pomenovanú heteroauxín, identifikovanú ako kyselinu indolyl-3-octovú (IAA).

3.2.1 Endogénne auxíny

Najdôležitejšieho zástupcu signálnych molekúl zo skupiny auxínov predstavuje kyselina indolyl-3-octová (IAA), ktorá bola dlhú dobu jediným známym prirodzene sa vyskytujúcim auxínom v rastlinách. Až následne zavedením novších citlivejších metód boli v rastlinách zistené i ďalšie endogénne auxíny ako je kyselina indolyl-3-maslová (IBA) (Ludwig-Müller a Epstein, 1991; Ludwig-Müller, 2000), kyselina fenyloctová (PAA) (Wightman a Lightly, 1982) a kyselina 4-chlór-indolyl-3-octová (4-Cl-IAA) (Reinecke, 1999) (obr. 2).

IBA pritom tvorí približne 25-30 % podiel celkového auxínu prítomného v rastlinách arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) (Ludwig-Müller *et al.*, 1993), pričom IBA môže byť konvertovaná na IAA, čím predstavuje dôležitý zdroj IAA pre reguláciu vývojových procesov (Epstein a Ludwig-Müller, 1993; Zolman *et al.*, 2008).

PAA je v rámci štyroch známych endogénnych auxínov (obr. 2) jediným fenylovým derivátom a v porovnaní s IAA vykazuje slabší efekt (Procházka *et al.*, 1983; Small a Morris, 1990). Naopak 4-Cl-IAA, ako ďalší endogénny auxín, ktorý je aktívny v rôznych, s auxínom súvisiacich fyziologických odpovediach, môže vykazovať silnejšiu aktivitu než IAA v prípade, že je aplikovaná exogénne (Porter a Thimann, 1965; Reinecke, 1999).



Obr. 2: Chemická štruktúra endogénnych auxínov.

3.2.2 Syntetické auxíny

Medzi syntetické auxíny sa zaraďujú slabé organické kyseliny, ktoré majú podobné rastové účinky ako IAA a sú delené do 5 skupín (Macháčková, 2003):

1. indolové kyseliny: kyselina indolyl-3-propionová (IPA),
2. naftalénové kyseliny: α -naftyloctová (α NAA), β -naftyloctová (β NAA),
3. chlórfenoxykyseliny: 2,4-dichlórfenoxyoctová (2,4-D),
2,4,5-trichlórfenoxyoctová (2,4,5-T), 2-metyl-4chlórfenoxyoctová (MCPA),
4. benzoové kyseliny: 2,3,6- a 2,4,5- trichlórbenzoová, dicamba,
5. deriváty kyseliny pikolinovej: picloram.

3.2.3 Metabolizmus auxínu v rastlinách

Rastliny majú vyvinutý dômyselný systém pre kontrolu koncentrácie auxínu s časovou a priestorovou presnosťou v odpovedi k stimulom z okolitého prostredia a k vývojovým signálom na úrovni biosyntézy rovnako ako aj na úrovni degradácie. Kyselina indolyl-3-ocotvá (IAA) ako hlavný prirodzene sa vyskytujúci auxín, môže byť v rastlinách produkovaná prostredníctvom *de novo* biosyntézy. Ďalej môže byť voľná IAA, ktorá je považovaná za aktívnu formu, tiež uvoľňovaná z IAA konjugátov zahrňujúcich IAA estery, IAA-aminokyseliny a IAA-sacharidy. Tretím pravdepodobným spôsobom tvorby IAA je jej vznik enzymatickou premenou z kyseliny indolyl-3-maslovej (IBA). V prípade, že rastliny potrebujú hladinu auxínu znížiť, aktivujú niekoľko mechanizmov deaktivujúcich IAA, pričom IAA môže byť rýchlo konvertovaná na IAA-konjugáty, ktoré predstavujú prvý krok v prípadnej konečnej degradácie (Normanly, 2010).

Biosyntéza auxínu

Biosyntéza auxínu vychádza z chorizmátu, pričom v bode, kedy dochádza k premene na indol sa dráha vetví. Následné dráhy biosyntézy IAA sú klasifikované ako dráhy závislé na tryptofáne, v rámci ktorých je IAA odvodená cez metabolizmus tryptofánu a na dráhy na tryptofáne nezávislé, kedy dochádza k tvorbe IAA cez kyselinu indolyl-3-pyrúátovú (Normanly, 2010).

Tryptofán predstavuje prekurzor pre mnohé metabolity (indolyl-3-pyrúát, tryptamín, indolyl-3-acetaldoxim, indolyl-3-acetamid, indolyl-3-acetonitril), ktoré môžu mať auxínovú aktivitu alebo môžu byť následne v rastlinách premieňané na IAA. Rastliny arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) podobne ako mnohé ďalšie rastliny majú schopnosť produkovať všetky tieto intermediáty v daných vývojových štádiách (Ouyang *et al.*, 1999; Sugawara *et al.*, 2009).

Na základe genetických a biochemických štúdií vykonaných práve na rastlinách arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) bola ako hlavná biosyntetická dráha auxínu stanovená TAA/YUC dvojkroková dráha závislá na tryptofáne, ktorá je v rámci rastlinnej ríše vysokokonzervovaná. V tejto dráhe je tryptofán najprv premieňaný na indolyl-3-pyrúát (IPA) pomocou TAA (Tryptofan Aminotransferase of Arabidopsis) rodiny aminotransferáz a následne je kyselina indolyl-3-octová (IAA) produkovaná z IPA za účasti YUCCA (YUC) rodiny flavínových monooxygenáz v procese oxidatívnej dekarboxylácie (Mashiguchi *et al.*, 2011; Stepanova *et al.*, 2011; Won *et al.*, 2011; Dai *et al.*, 2013; Zhao, 2012).

Gény *YUCCA* (*YUC*) boli identifikované ako kľúčové gény kódujúce enzýmy flavínové monooxygenázy (FMO), katalyzujúce krok v biosyntéze auxínu, ktorý limituje jej rýchlosť (Zhao *et al.*, 2001). Genóm arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) zahrňuje 11 členov *YUC* génovej rodiny, pričom zvýšená expresia prvého identifikovaného génu *YUC1* rovnako ako aj zvýšená expresia ďalších *YUC* génov vedie u rastlín arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) k fenotypu typickému pre nadprodukcii auxínu. *YUC* gény sa vo svojej funkcii vzájomne prekrývajú a inaktivácia jedného génu nespôsobuje žiadne zrejme vývojové defekty. Analýza viacnásobných *yuc* mutantných rastlín arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) však odhalila, že aktivita *YUC* génov je podstatná pre väčšinu hlavných vývojových procesov, akými sú embryogenéza, klíčenie, tvorba vaskulárnych spojení alebo formovanie rastlinnej architektúry (Cheng *et al.*, 2006; Cheng *et al.*, 2007).

Gény *Tryptofan Aminotransferase of Arabidopsis (TAA)* kódujú rodinu aminotransferáz, ďalších kľúčových enzýmov v biosyntéze auxínu. *taa* mutantné rastliny všeobecne produkujú výrazne menej voľnej IAA v porovnaní so štandardným typom, čo môže viesť k nedostatkom vo formovaní vaskulárnych spojení a vývoji kvetov, ktoré vykazujú *taa1* mutantné rastliny arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) (Stepanova *et al.*, 2008; Tao *et al.*, 2008; Yamada *et al.*, 2009).

Ireverzibilná konjugácia a oxidácia IAA

Oxidatívna degradácia auxínu hrá základnú úlohu v udržiavaní auxínovej homeostázy v rastlinách a v regulácii vývoja rastlín. Katabolizmus IAA môže prebiehať enzymatickou oxidáciou indolového kruhu IAA, kedy je vytváraná ox-IAA forma alebo ox-IAA-konjugáty, alebo oxidatívnou dekarboxyláciou IAA postranného reťazca (Normanly, 2010).

Vzhľadom na to, že IAA nemôže byť z konjugátov formovaných z IAA a glutamátu (IAA-Glu) alebo z IAA a aspartátu (IAA-Asp) hydrolýzou uvoľnená, predstavuje táto dráha konjugácie katabolický proces vedúci k degradácii IAA (Ostin *et al.*, 1998; Tam *et al.*, 2000; Kowalczyk a Sandberg, 2001).

Ďalšou možnosťou pre zníženie hladiny auxínu a udržanie jeho homeostázy v rastlinných bunkách je ireverzibilná oxidácia IAA na ox-IAA, ktorá predstavuje hlavnú katabolickú dráhu v metabolizme IAA (Ostin *et al.*, 1998; Kowalczyk a Sandberg, 2001).

Reverzibilná konjugácia IAA

Okrem ireverzibilnej konjugácie sa v rastlinách vyskytuje aj reverzibilný spôsob premeny IAA na konjugáty, ktorých hydrolýza na aktívnu IAA má dôležitý význam v udržiavaní homeostázy auxínu v rastlinných bunkách. Počas tohto procesu dochádza k reakcii medzi IAA a ďalšou, najčastejšie nízkomolekulárnou látkou. Väčšina reakcií IAA-konjugát podlieha spätoväzbovej regulácii prostredníctvom IAA. Proces konjugácie IAA je zvyšovaný za vysokej hladiny IAA v bunke, zatiaľ čo hydrolýza konjugátov je podporovaná nízkymi hladinami voľnej IAA. Najčastejšie je rozšírená reverzibilná konjugácia IAA s aminokyselinami ako je alanín (IAA-Ala) alebo leucín (IAA-Leu) a glukózou (Bialek a Cohen, 1986). Okrem toho môže byť IAA tiež vytváraná konverziou sprostredkovanou peroxizomálnymi β -oxidačnými enzýmami

z kyseliny indolyl-3-maslovej (IBA), ktorá predstavuje stabilnú zásobnú formu IAA (Epstein a Ludwig-Müller, 1993; Woodward a Bartel, 2005; Zolman *et al.*, 2008).

Uvoľnenie IAA z jej konjugovaných foriem a z IBA tak okrem *de novo* biosyntézy a transportu auxínu z okolitých buniek predstavuje ďalší spôsob zabezpečenia dostupnej voľnej IAA v danej bunke (Woodward a Bartel, 2005).

Dôležitosť konjugátov bola zistená napríklad pri klíčení obilky kukurice (*Zea mays* L.), počas ktorého sú konjugáty IAA hydrolyzované, čím predstavujú významný zdroj auxínu pre rast stonky (Normanly, 2010). Rovnako významná je aj konverzia IAA z IBA u klíčnych rastlín arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) v procese expanzie buniek klíčnych listov a elongácie koreňových vláskov (Strader *et al.*, 2010).

Súhrnne, reverzibilné konjugáty IAA predstavujú biologicky inaktívnu, zásobnú a transportnú formu auxínu, prostredníctvom ktorej je IAA chránená pred degradáciou (Normanly, 2010).

3.2.4 Hladina auxínu v rastlinách

Auxín reguluje morfogénu rastlín prostredníctvom pletivovo-špecifických koncentračných gradientov, ktoré sú formované procesmi auxínovej biosyntézy, konjugácie a degradácie (Normanly, 2010), ako aj intracelulárnou (Petrášek a Friml, 2009) a intercelulárnou distribúciou auxínu (Mravec *et al.*, 2009). IAA má v tomto procese úlohu ako chemický prenášač širokého spektra externálnych a internálnych signálov.

IAA uplatňuje svoj efekt formovaním lokálnych gradientov a maxím/miním IAA, s cieľom dosiahnuť rôzne bunkové odpovede, ktoré sú základom pre zachovanie súvislých rastových a vývojových procesov a tiež pre rýchle prispôbenie sa rastliny k meniacim sa okolitým podmienkam. Z tohoto dôvodu je regulácia IAA koncentrácie kľúčová v mnohých rastových a vývojových procesoch rastlín. Koncentračné gradienty IAA v pletivách arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) sú podobne ako aj v pletivách ďalších rastlín nevyhnutné pre embryogénu (Friml *et al.*, 2003), organogénu koreňa i nadzemnej časti rastliny, zahrňujúc aj proces apikálnej dominancie (Reinhardt *et al.*, 2000; Benková *et al.*, 2003; Dubrovsky *et al.*, 2008), vývoj vaskulárnych pletív (Mattsson *et al.*, 2003) a rozdielny rast počas tropických odpovedí (Friml *et al.*, 2002b).

Založenie auxínového maxima závisí na lokálnej biosyntéze IAA a vo veľkej miere aj na uvoľňovaní IAA z konjugátov v jednej alebo niekoľkých málo bunkách, následkom čoho v nich dochádza k lokálnej akumulácii auxínu. Aj keď je významný podiel IAA syntetizovaný v mladých listoch, takmer každé pletivo arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) vykazuje schopnosť *de novo* biosyntézy IAA (Ljung *et al.*, 2001). Okrem toho, nielen auxínová akumulácia, ale aj vytvorenie minima IAA v niekoľkých bunkách pomocou IAA konjugácie alebo degradácie môže mať kľúčový význam v auxínom regulovaných vývojových odpovediach (Sorefan *et al.*, 2009).

Metabolizmus IAA významne prispieva k formovaniu auxínových gradientov dôležitých pre efektívny rast a vývoj rastlín. Hlavnú determinujúcu úlohu vo vytváraní gradientu IAA avšak má rozdielna distribúcia auxínu, ktorá sa uskutočňuje prostredníctvom aktívneho intercelulárneho auxínového transportu, kontrolovaného rozmanitými environmentálnymi a vývojovými signálmi (Vanneste a Friml, 2009).

3.2.5 Transport auxínu v rastlinách

V rastlinách prevažuje polárny spôsob distribúcie auxínu, ktorý predstavuje veľmi aktívny proces vyžadujúci energiu. V rámci založenej apikálno-bazálnej osy rastliny sa auxín pohybuje v stonke bazipetálne a v koreni akropetálne. Auxínový transport je dosiahnutý pohybom auxínu od bunky k bunke, pričom sú pre tento aktívny transport vyžadované auxín-transportujúce proteíny vyskytujúce sa na cytoplazmatickej membráne, sprostredkujúce vstup auxínu do bunky, rovnako ako aj jeho výstup z bunky (Bennett *et al.*, 1996; Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998).

Ako tri hlavné rodiny proteínov zabezpečujúcich prenos auxínu boli identifikované AUXIN-RESISTANT1 (AUX1)/AUX1-LIKE (LAX) proteíny pre vstup auxínu do bunky (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008; Jones *et al.*, 2009), PIN-FORMED (PIN) proteíny (Petrášek *et al.*, 2006; Yang a Murphy, 2009) a niekoľko ATP-binding-cassette B (ABCB)/P-glykoproteín (PGP) členov pre umožnenie výstupu auxínu z bunky (Geisler *et al.*, 2005; Petrášek *et al.*, 2006; Cho *et al.*, 2007a). Ďalším typom auxín-transportných proteínov sú PIN-likes (PILS) proteíny, ktoré sú zapojené do intracelulárneho transportu auxínu (Barbez *et al.*, 2012).

Aktívny polárny transport auxínu prebieha vo vaskulárnom meristéme a vo vaskulárnych pletivách, konkrétne v prokambiu, v kambiu a v parenchymatických bunkách xylému, (Gälweiler *et al.*, 1998; Aloni, 2001; Booker *et al.*, 2003).

Auxín môže byť tiež v menšej miere transportovaný aj nepolárne floémom z listov do ďalších častí rastliny spoločne s asimilátmi, pričom sa jedná o tzv. rýchly transport. Tento nepolárny auxínový tok nie je možné blokovať inhibítormi auxínového transportu (Morris a Thomas, 1978; Cambridge a Morris, 1996).

3.2.6 Polárny transport auxínu

Základnou podstatou polárneho transportu auxínu ako jedinečného mechanizmu pre prenos priestorových a časových signálov, na ktorých závisí rast a vývoj rastlín v danom prostredí, je jeho presne kontrolované smerovanie od bunky k bunke (Gälweiler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2003; Sorefan *et al.*, 2009).

Smerovanie polárneho auxínového toku je definované predovšetkým subcelulárnou lokalizáciou PIN1 proteínov (Petrášek *et al.*, 2006; Wisnievska *et al.*, 2006). V priebehu odpovede rastliny na rôzne vývojové či environmentálne signály sa môže polárna lokalizácia PIN proteínov dynamicky meniť s cieľom upraviť smerovanie toku auxínu, a tým zabezpečiť vhodnú odpoveď rastliny k zmenám v okolitom prostredí (Friml *et al.*, 2002b; Benková *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Heisler *et al.*, 2010).

Chemiosmotická hypotéza

Na úrovni jednej bunky je polárny transport auxínu vysvetľovaný chemiosmotickou hypotézou (Rubery a Sheldrake, 1974; Raven, 1975). V slabokyslom prostredí bunkovej steny (približná hodnota pH 5,5) sa okolo 15 % IAA vyskytuje v jej protonovanej (nedisociovannej) forme (IAAH). Táto nenabitá, lipofilná molekula prechádza cez cytoplazmatickú membránu pasívne difúziou, bez účasti transportných proteínov. V prostredí cytoplazmy, s približnou hodnotou pH 7,0, tieto molekuly IAAH disociujú na aniónovú (disociovanú) formu (IAA⁻), ktorá nemôže voľne prestupovať cez cytoplazmatickú membránu. Z tohoto dôvodu sú pre výstup auxínu z bunky potrebné transportné proteíny, ktorých asymetrická lokalizácia v bunke určuje smerovanie toku auxínu (Goldsmith, 1977; Petrášek a Friml, 2009).

3.2.7 AUX1/LAX transportné proteíny

Zatiaľ čo sa okolo 15 % IAA v prostredí apoplastu vyskytuje v nedisociovannej forme, väčšina IAA molekúl (takmer 85 %) je disociovaných. Pre vstup tejto formy auxínu

do bunky je preto potrebný aktívny transport, ktorý je možný vďaka aktivite AUX1/LAX malej rodine auxínových proteínov podobných permeázam (Yang *et al.*, 2006; Kerr a Bennett, 2007; Péret *et al.*, 2012).

Genóm arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) kóduje jeden AUXIN RESISTANT 1 (AUX1) a tri LIKE AUXIN RESISTANT 1 (LAX1, LAX2 a LAX3) proteíny, pričom AUX1 a LAX majú sekvenčnú podobnosť aminokyselín približne 80 % (Parry *et al.*, 2001). Vďaka týmto transportným proteínom vstupujú disociované molekuly auxínu do bunky cez H⁺symport (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2008).

AUX1/LAX sú zapojené do auxínom regulovaných biologických funkcií ako je koreňový gravitropizmus, formovanie laterálnych koreňov, rast koreňových vláskov alebo tvorba vaskulárnych spojení (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2001; Cho *et al.*, 2007b; Jones *et al.*, 2009; Péret *et al.*, 2012). Aj keď strata funkcie génu *AUX1* nemá zásadný vplyv na vývoj embrya (Swarup *et al.*, 2004), mutácie v *AUX1* vedú k viacerým vývojovým defektom poukazujúcim na význam AUX1 proteínu v auxínovom transporte. Mutantné jedince *aux1* vykazujú agravitropizmus a znížený počet laterálnych koreňov (Swarup *et al.*, 2001).

Zatiaľ čo sú AUX1 proteíny lokalizované buď polárne alebo nepolárne v závislosti na bunkovom type (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2001), LAX proteíny nevykazujú polárnu lokalizáciu (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2012). Transport auxínu na dlhé vzdialenosti je zo stonky do koreňa zaisťovaný AUX1 proteínmi, naopak primárnou funkciou LAX proteínov je udržanie lokálnych auxínových gradientov (Swarup *et al.*, 2002, 2004, 2008).

Najčastejšie študovaný AUX1 proteín z rodiny AUX1/LAX je väčšinou lokalizovaný antagonisticky k PIN proteínu. V koreňových protofloémových bunkách je AUX1 umiestnený na apikálnej strane bunky, kde zohráva kľúčovú úlohu pri výstupe auxínu z nepolárneho transportného systému - floému do AUX1- PIN závislého polárneho systému a bazálne je AUX1 lokalizovaný v koreňovej čiapočke laterálnych koreňov (Bennett *et al.*, 1996; Swarup *et al.*, 2001). Naopak, v L1 vrstve apikálneho meristému je AUX1 na tej istej strane buniek ako PIN1, kde môže pôsobiť proti laterálnej difúzii a obmedziť prechod auxínu do vonkajšej bunkovej vrstvy, v ktorej dochádza k zakladaniu fylotaxie (Vieten *et al.*, 2007).

Na subcelulárnej úrovni sa AUX1 proteín vyskytuje nielen na cytoplazmatickej membráne, ale tiež v internálnych kompartmentoch ako je Golgi aparát a endozómy (Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Zacielenie AUX1 proteínu na konkrétne miesto

cytoplazmatickej membrány v bunke je na rozdiel od PIN proteínov sprostredkované odlišnou dráhou, pre ktorú je vyžadovaný AUXIN-RESISTANT 4 (AXR4) proteín endoplazmatického retikula (Dharmasiri *et al.*, 2006). Súčasne je pre zabezpečenie potrebnej vnútrobunkovej dynamiky proteínu AUX1 striktne vyžadovaný aktínový cytoskelet, pričom udržiavanie apikálneho umiestnenia AUX1 v bunke je tiež závislé na obsahu sterolov v cytoplazmatickej membráne (Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

Transport auxínu do bunky sprostredkovaný aktivitou AUX1 proteínu môže byť špecificky blokovaný kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA), kyselinou 1-naftoxyacetovou (1-NOA) a kyselinou 2-naftoxyacetovou (2-NOA) (Parry *et al.*, 2001; Kleine-Vehn *et al.*, 2006; Yang *et al.*, 2006).

3.2.8 PIN transportné proteíny

PIN-FORMED (PIN) proteíny sú integrálnymi membránovými proteínmi, ktoré sú kódované *PIN* génmi. Charakterizované boli na základe *pin-formed1* (*pin1*) mutantných rastlín arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) a s polárnym transportom auxínu boli spojené koncom 20. storočia (Gälweiler *et al.*, 1998). Práve na základe charakterizácie týchto mutantných jedincov *pin1* bolo zistené, že PIN proteíny majú základnú a kľúčovú úlohu v zabezpečení výstupu auxínu z bunky (Okada *et al.*, 1991; Gälweiler *et al.*, 1998). Navyše, mutantné rastliny *pin1* vykazujú zreteľné abnormality hlavne v zložení kvetu, ale aj listu a fylotaxii. Rovnaké zmeny vo vývojových procesoch boli navodené aplikáciou chemických inhibítorov transportu auxínu, čo viedlo k záveru, že polárny auxínový transport, determinovaný PIN proteínmi, je nevyhnutný pre správny vývoj celistvej rastliny (Okada *et al.*, 1991). Podobne aj ďalšie experimenty ukázali (Blakeslee *et al.*, 2004; Friml *et al.*, 2003; Petrášek *et al.*, 2006), že transportná funkcia PIN proteínov spoločne s ich asymetrickou subcelulárnou lokalizáciou na cytoplazmatickej membráne určuje smerovanie lokálnej auxínovej distribúcie ako základ vývojových procesov v rastlinách.

U arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) bolo identifikovaných 8 členov PIN rodiny proteínov (Gälweiler *et al.*, 1998; Müller *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002a; Friml *et al.*, 2002b; Friml *et al.*, 2003; Mravec *et al.*, 2009), ktoré sa rozdeľujú na dve podtriedy rozdielne v dĺžke hydrofilnej slučky, ktorá sa nachádza v strede ich polypeptidového reťazca. Medzi týmito dvoma podtriedami PIN proteínov bola zistená

vysoká sekvenčná homológia, čo znamená, že počas diverzifikácie oboch tried došlo len k málo výrazným zmenám v celkovej štruktúre (Mravec *et al.*, 2009).

Všetky PIN proteíny majú dve sady piatich transmembránových slučiek v N-terminálnej a C-terminálnej oblasti vzájomne spojených rozdielne dlhou centrálnou hydrofilnou slučkou v závislosti na type PIN proteínu (Ganguly *et al.*, 2010; 2012a; 2012b; Křeček *et al.*, 2009).

Tzv. "dlhé" PIN proteíny, PIN1 - PIN4 a PIN7 majú dlhú hydrofilnú slučku a vykazujú predovšetkým asymetrickú polárnu lokalizáciu na cytoplazmatickej membráne v rôznych typoch buniek. Smerovanie toku auxínu a formovanie auxínových gradientov je primárne závislé na subcelulárnej lokalizácii týchto "dlhých" PIN transportných proteínov v každej bunke, ktorá auxín transportuje (Petrášek *et al.*, 2006; Wisniewska *et al.*, 2006, Yang a Murphy, 2009).

Napriek polárnemu umiestneniu PIN proteínov na cytoplazmatickej membráne, sa v tejto ich danej pozícii nevyskytujú stabilne. Naopak dochádza k dynamickému konštitutívnemu cyklovaniu PIN proteínov, ktoré prebieha medzi cytoplazmatickou membránou a endozomálnymi kompartmentami spôsobom závislým na aktínovom cytoskelete (Geldner *et al.*, 2001). Toto konštitutívne cyklovanie určuje množstvo PIN proteínov, ktoré sa vyskytuje na cytoplazmatickej membráne. Súčasne je endocytický krok cyklovania regulovaný samotným auxínom, ktorý tento krok konštitutívneho cyklovania inhibuje, následkom čoho dochádza k zvýšeniu množstva PIN proteínov na cytoplazmatickej membráne. Týmto dochádza k regulácii hladiny auxínu vystupujúceho z bunky, počas ktorej sa PIN proteíny orientujú smerom k vysokej koncentrácii auxínu (Paciorek *et al.*, 2005).

Druhá podtrieda tzv. "krátkych" PIN proteínov, PIN5, PIN6 a PIN8 má centrálnu hydrofilnú slučku výrazne redukovanú. Táto skupina PIN proteínov je lokalizovaná predovšetkým v internálnych kompartmentoch ako je endoplazmatické retikulum (Křeček *et al.*, 2009; Mravec *et al.*, 2009; Ganguly *et al.*, 2010; Ding *et al.*, 2012), čo znamená ich účasť pri transporte auxínu z cytozolu do lumen endoplazmatického retikula. Týmto sa znižuje hladina auxínu prístupná pre výstup z bunky sprostredkovaný proteínmi na cytoplazmatickej membráne.

Na základe pozorovanej rozdielnej lokalizácie dvoch podtried PIN proteínov je predpokladané, že hydrofilná slučka zahŕňa špecifické sekvencie pre intracelulárne smerovanie PIN proteínov. Hydrofilná slučka "dlhých" PIN proteínov pritom pravdepodobne obsahuje rôzne sekvencie pre klatrinom sprostredkovanú endocytózu,

ubiquitináciu a fosforyláciu, ktoré dohromady modulujú zacielenie, stabilitu a subcelulárnu polaritu PIN proteínov (Grunewald a Friml, 2010; Kleine-Vehn *et al.*, 2011; Ganguly *et al.*, 2012b).

Faktory určujúce lokalizáciu PIN proteínov

Subcelulárna polarita PIN proteínov determinuje smerovanie toku auxínu von z danej bunky, a tým koordinuje PIN lokalizáciu v rámci celého reťazca buniek transportujúcich auxín (Wisniewska *et al.*, 2006; Dhonukshe *et al.*, 2008, Dhonukshe *et al.*, 2010). Z tohto dôvodu je polárna lokalizácia PIN proteínov základným a nevyhnutným faktorom pre determinovanie smerovania polárneho transportu auxínu počas embryogenézy i organogenézy (Benková *et al.*, 2003; Friml *et al.*, 2003; Reinhardt *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2008), pričom práve PIN proteíny predstavujú primárny nástroj pre dynamické presmerovávanie auxínového toku, nevyhnutné pre sprostredkovanie rýchlych a plastických rastových odpovedí (Friml *et al.*, 2002b; Blakeslee *et al.*, 2004; Robert a Friml, 2009).

Rýchla a dynamická cyklóza PIN proteínov zahŕňa ich internalizáciu z cytoplazmatickej membrány klatrínom sprostredkovanou endocytickou dráhou a recyklovanie späť na cytoplazmatickú membránu cez ARF-GEF regulované polárne recyklovanie (Geldner *et al.*, 2001; Friml *et al.*, 2002a; Dhonukshe *et al.* 2008; Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

Proteínová fosfatáza 2A (PP2A) a serín/treonínová proteínová kináza PINOID sú jednými z hlavných determinantov určujúcich polárnu lokalizáciu PIN proteínov (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001; Michniewicz *et al.*, 2007; Dhonukshe *et al.*, 2010). Okrem toho sú do intracelulárneho smerovania PIN proteínov zapojené aj ďalšie proteíny a signálne molekuly, ktoré dohromady modulujú polárnu lokalizáciu auxínových transportérov (Geldner *et al.*, 2003; Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

Fosforylácia PIN proteínov

Fosforylácia proteínov má v regulácii transportu auxínu zásadný význam. V bunkách tabakovej suspenzie je inhibítor proteínovej kinázy schopný inhibovať výstup auxínu z bunky a inhibítor fosfatázy je okrem výstupu auxínu z bunky schopný inhibovať aj vstup auxínu do bunky (Delbarre *et al.*, 1998).

Proteínová fosfatáza 2A (PP2A) má u arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) negatívny efekt na auxínový transport (Rashotte *et al.*, 2011), zatiaľ čo PINOID (PID) serín/treonínová proteínová kináza pozitívne ovplyvňuje auxínový export z bunky (Lee a Cho, 2006), čo znamená, že fosforylácia PIN1 proteínov sprostredkovaná PID-kinázou je v antagonistickom vzťahu k PP2A (Michniewicz *et al.*, 2007).

PINOID (PID) je primárny auxín-responzívny gén kódujúci serín/treonínovú proteínovú kinázu, ktorá sa podieľa na polárnom zacielení PIN proteínov na cytoplazmatickú membránu. Expresia génu *PID* je indukovaná exogénnym auxínom a zároveň funguje ako pozitívny regulátor polárneho transportu auxínu (Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001). *PID* mRNA sa najviac vyskytuje v mladých kvetných pupeňoch, v pletivách vaskulárnych cievnych zväzkov mladých listov, v parenchymatických bunkách xylému a endodermis obklopujúcej vaskulatúru (Benjamins *et al.*, 2001).

Mutácia v *PID* serín/treonínovej proteínovej kináze je spojená so silnými defektami v auxínovom transporte a spôsobuje fenotyp podobný fenotypu mutantných jedincov *pin1*, ktorý vzniká v dôsledku narušenia toku auxínu (Bennett *et al.*, 1995; Christensen *et al.*, 2000; Benjamins *et al.*, 2001). U mutantných jedincov *pin1* a *pid* nedochádza k iniciácii orgánov počas reprodukčnej fázy, majú narušené formovanie kľúčnych listov a vykazujú defekty vo formovaní laterálnych orgánov (Furutani *et al.*, 2004). Podobne ako *pin1* mutant, tak aj *pid* má redukovaný polárny transport auxínu v stonke (Bennett *et al.*, 1995). Vzájomné fungovanie génu *PID* a génu *PIN1* je vo veľkej miere zodpovedné za bilaterálnu symetriu rastlinného tela a vyrastanie kľúčnych listov (Furutani *et al.*, 2004).

Aktivita *PID* proteínu v bunke determinuje apikálne alebo bazálne zacielenie *PIN1*, *PIN2* a *PIN4* proteínov v koreňových bunkách arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) (Friml *et al.*, 2004) na základe fosforylácie špecifických motívov v hydrofilnej slučke (Dhonukshe *et al.*, 2010; Huang *et al.*, 2010), čím je sprostredkované smerovanie polárneho transportu auxínu (Friml *et al.*, 2004). *PID* je tiež súčasťou spätnej väzby medzi auxínovou signalizáciou a transportom auxínu v dôsledku čoho je expresia *PID* regulovaná a kontrolovaná auxínom (Benjamins *et al.*, 2001).

U *pid* mutantných línií sú PIN proteíny preferenčne zacielené na bazálnu stranu cytoplazmatickej membrány (Friml *et al.*, 2004), zatiaľ čo strata funkcie PP2A fosfatázy vedie k preferenčne apikálnemu smerovaniu PIN proteínov v embryách a koreňoch

arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) (Michniewicz *et al.*, 2007). Fosforylácia PIN proteínu PID proteínovou kinázou preto vedie k zacieleniu na apikálnu stranu, defosforylácia sprostredkovaná PP2A fosfatázou smeruje PIN proteíny na bazálnu stranu bunky (Michniewicz *et al.*, 2007). Antagonistický význam proteínovej fosfatázy PP2A a PID kinázy na fosforyláciu PIN proteínov a ovplyvňovanie ich apikálno-bazálnej lokalizácie demonštruje tiež apikálne zacielenie PIN proteínov spôsobené mutáciou génu kódujúceho PP2A alebo zvýšenou expresiou PID kinázy. Naopak *pid* mutanti alebo mutácie vedúce k strate fosforylácie PIN proteínov indukujú bazálnu polarizáciu PIN proteínov (Friml *et al.*, 2004; Michniewicz *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010).

Miera fosforylácie PIN proteínov zároveň ovplyvňuje ich senzitivitu k cytokinínom, ktorá koreluje so stupňom fosforylácie PIN proteínov, pričom so zvyšujúcim sa stupňom fosforylácie PIN1 proteínov sa ich citlivosť k cytokinínom znižuje. Cytokiníny zvyšujú vyprázdnenie PIN1 proteínov zo špecifických polárnych domén cytoplazmatickej membrány, čím reorganizujú PIN1 bunkovú lokalizáciu, a tým priamo regulujú smerovanie auxínového toku. Miera senzitivity PIN proteínov k cytokinínom primárne závisí viac na PIN polárnej lokalizácii, než na type bunky v rámci rastlinného pletiva alebo vývojovom kontexte. V bunkách koreňa arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) dochádza v dôsledku pôsobenia cytokinínov k znižovaniu množstva PIN1 proteínov lokalizovaných na bazálnej, ale nie na apikálnej strane membrány, čím cytokiníny selektívne podporujú degradáciu PIN1 proteínov z bazálnej strany cytoplazmatickej membrány. U mutantných línií, u ktorých je zvýšená fosforylácia PIN1 proteínov, a tým pádom aj apikálna lokalizácia, je degradácia PIN1 proteínov menej senzitivná k cytokinínom (Marhavý *et al.*, 2014).

Zapojenie ARF-GEF GNOM v polárnom recyklovaní PIN proteínov

GNOM (*GN*) kóduje brefeldin A (BFA) senzitivne guanín-nuklotidové výmenné faktory (GEF) pre GTPázy ARF triedy, ktoré zabezpečujú formovanie exocytických vezikul na endozómoch, nevyhnutných pri implementácii PIN1 proteínov predovšetkým na bazálnej strane cytoplazmatickej membrány (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2003; Vieten *et al.*, 2007). *GNOM* proteíny sa vyskytujú na cytoplazmatickej membráne i v endozómoch (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2003) a vyskytujú sa v blízkosti PIN proteínov. Transcytóza PIN proteínov závislá na *GNOM* regulácii je

klúčová pre skorú bunkovú polarizáciu. Genetickým potlačením ARF-GEF aktivity alebo chemickou inhibíciou hubovým brefeldínom A (BFA), ktorý je inhibítorom pre GNOM (Steinmann *et al.*, 1999), dochádza k blokovaniu konštitutívneho cyklovania PIN proteínov. Týmto je tiež inhibovaný klúčový krok transportu auxínu, ktorý je predpokladom pre rýchle zmeny v PIN proteínovej lokalizácii (Geldner *et al.*, 2001, Friml *et al.*, 2003).

Správna funkcia GNOM je klúčová predovšetkým pre bazálne zacielenie PIN proteínov, vzhľadom na to, že apikálne sprostredkované smerovanie je u *gnom* mutantným línií významne menej ovplyvnené (Kleine-Vehn *et al.*, 2008). Podobne nie je u *gnom* mutantných línií ovplyvnené ani apikálne zacielenie AUX1 proteínov potrebných pre transport auxínu do bunky (Dharmasiri *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Zatiaľ čo po ošetrení buniek brefeldínom A sa AUX1 akumuluje v BFA-kompartmentoch, čo znamená, že pre transport AUX1 proteínov na cytoplazmatickú membránu je potrebná ARF-GEF dráha senzitívna k BFA, avšak nezávislá na GNOM (Grebe *et al.*, 2002; Fischer *et al.*, 2006; Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

Kompozícia membránových lipidov

Ďalším faktorom zúčastňujúcim sa kontroly lokalizácie PIN proteínov na cytoplazmatickej membráne sú STEROL METHYLTRANSFERASE1 (SMT1) transferáza a CYCLOPROPYLSTEROL ISOMERASE1 (CPI1) izomeráza, ktoré sú potrebné pre syntézu hlavných membránových sterolov. Práve kompozícia sterolov v cytoplazmatickej membráne má dôležitý význam pri určovaní PIN polarita. Mutantné jedince *stm1* a *cpi1* vykazujú poruchy v bunkovej polárnej lokalizácii PIN proteínov, distribúcii auxínu a následnom, auxínom regulovanom vývoji (Willemsen *et al.*, 2003; Men *et al.*, 2008; Carland *et al.*, 2010).

3.2.9 ABCB transportné proteíny

Rodina rastlinných ATP-binding cassette (ABC) transportných proteínov tvorí najväčšiu skupinu membránových transportérov, ktorej jednotliví členovia môžu byť zapojení do procesov, akými sú rezistencia voči chorobám či transport rozličných substrátov. Všeobecne sú ABC transportné proteíny spojené s pohybom rôznych malých molekúl, živín a xenobiotík. Malá podtrieda ABC rodiny, ABC-B/multidrug resistance/P-glycoprotein (ABCB/MDR/PGP) zahŕňa 21 členov, z ktorých najmenej

päť je spojených s transportom auxínu alebo auxínovými derivátmi. U arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) je táto podtrieda, v súvislosti so zapojením do auxínového transportu, najlepšie reprezentovaná ABCB1, ABCB4 a ABCB19 proteínmi (Noh *et al.*, 2001; Multani *et al.*, 2003; Geisler *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007b), pričom sa aj ABCB14 a ABCB15 proteíny pravdepodobne podieľajú na transporte auxínu (Titapiwatanakun a Murphy, 2009). V rastlinných bunkách tieto zástupcovia ABCB proteínov fungujú predovšetkým ako prenášače auxínu von z bunky (Geisler *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2007b; Kubeš *et al.*, 2012).

ABCB proteíny, podobne ako aj PIN proteíny, sa priamo podieľajú na transporte auxínu z bunky. Aktivita PIN1 proteínu však nie je výhradne závislá na funkcii ABCB proteínov, čo viedlo k záveru, že PIN a ABCB tvoria dva odlišné transportné systémy (Petrášek *et al.*, 2006; Sieberer *et al.*, 2006; Mravec *et al.*, 2008). Súčasne napríklad ABCB19 môže ovplyvňovať zaciľovanie PIN1 proteínu na cytoplazmatickú membránu a zároveň stabilizovať PIN1 proteín v mikrodoménach cytoplazmatickej membrány (Titapiwatanakun *et al.*, 2009).

Auxín transportujúce ABCB proteíny sú na cytoplazmatickej membráne konzistentne lokalizované predovšetkým nepolárnym spôsobom, aj keď v určitých bunkách môže byť lokalizácia ABCB transportérov aj polárna (Geisler *et al.*, 2005; Blakeslee *et al.*, 2007; Cho *et al.*, 2007b, 2012; Mravec *et al.*, 2008). Vďaka primárne nepolárnemu výskytu môžu ABCB auxín transportujúce proteíny kontrolovať množstvo auxínu dostupné pre jeho polárny transport sprostredkovaný PIN proteínmi (Mravec *et al.*, 2008). Medzi ABCB a PIN proteínmi pritom môže dochádzať k priamej interakcii v koordinácii polárneho auxínového transportu (Blakeslee *et al.*, 2007), pričom táto interakcia je dôležitá v embryogenéze rovnako ako aj v organogenéze (Mravec *et al.*, 2008).

Funkcia ABCB proteínov môže byť inhibovaná napríklad inhibítorom transportu auxínu kyselinou 1-N-naftylftalámovou (NPA), avšak na rozdiel od PIN proteínov sú ABCB proteíny k inhibícii NPA menej senzitivne (Sieberer *et al.*, 2006). V porovnaní s PIN proteínmi, ktoré majú dynamicky udržiavané cyklovanie, sú nepolárne lokalizované ABCB proteíny, ktoré naopak nevyžadujú aktívne recyklovanie, rezistentné voči pôsobeniu inhibítora brefeldínu A (BFA) (Geisler *et al.*, 2005; Cho *et al.*, 2012).

3.2.10 Inhibítory polárneho transportu auxínu

Inhibítory polárneho transportu auxínu predstavujú nenahraditeľný nástroj, prostredníctvom ktorého je možné sledovať práve úlohu a dôležitosť polárneho transportu auxínu v regulácii rastu a vývoja rastlín.

Exogénna aplikácia látok inhibujúcich buď vstup auxínu do bunky alebo jeho výstup z bunky vedie k interferencii inhibítorov s auxínovou distribúciou. Týmto je polárny transport silne inhibovaný, v dôsledku čoho dochádza k rôznym rastovým a vývojovým abnormalitám (Horton, 1993; Scanlon, 2003; Elhiti a Stasolla, 2011; Amijima *et al.*, 2014). Inhibítory polárneho transportu auxínu pritom primárne nespôsobujú zmeny v základnej bunkovej ultraštruktúre a ich efekt je tiež úplne reverzibilný (Dhonukshe *et al.*, 2008).

Transport auxínu do bunky môže byť špecificky blokovaný kyselinou 1-naftoxyoctovou (1-NOA), kyselinou 2-naftoxyoctovou (2-NOA) alebo kyselinou 3-chloro-4-hydroxyfenyloctovou (CHPAA) (Parry *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006). Kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA), kyselina 1-N-naftylftalámová (NPA) či brefeldín A (BFA) spôsobujú inhibíciu transportu auxínu von z bunky, pričom výstup auxínu z bunky narušujú bez toho, aby priamo interagovali so samotnými prenášačmi (Geldner *et al.*, 2001; Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

Kyselina 1-N-naftylftalámová

Kyselina 1-N-naftylftalámová (NPA) je klasifikovaná ako syntetický fytotropín, ktorý silne inhibuje rast rastlín (Morgan, 1964; Katekar a Geissler, 1980) na základe efektívnej redukcie transportu auxínu v nadzemnej časti rastliny i v koreni (Benková *et al.*, 2003; Bhalerao *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003).

NPA sa s vysokou afinitou viaže na špecifické miesto asociované s aktívnym cytoskeletom, lokalizované na cytoplazmatickej membráne, tvorené NPA-väzbovým periférnym membránovým proteínom (Bernasconi *et al.*, 1996; Muday a DeLong, 2001; Muday a Murphy, 2002). NPA touto väzbou spôsobuje akumuláciu auxínu v bunke v dôsledku blokovania jeho výstupu z bunky, ktorý je sprostredkovaný predovšetkým PIN proteínmi (Petrášek *et al.*, 2002; Paciorek *et al.*, 2005). Pritom sa však predpokladá, že PIN proteíny nefungujú ako vlastné NPA-väzbové proteíny (Rojas-Pierce *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2010), vzhľadom na to, že auxínový transportný komplex pre výstup auxínu von z bunky je pravdepodobne zložený z najmenej dvoch proteínov:

integrálneho membránového transportného proteínu a NPA-väzbovej regulačnej podjednotky (Michalke *et al.*, 1992; Cox a Muday, 1994; Bernasconi *et al.*, 1996). Auxínový transport pritom môže byť inhibovaný napríklad u koleoptile kukurice (*Zea mays* L.) už v priebehu 1 minúty od aplikácie NPA (Thomson *et al.*, 1973).

Aplikácia NPA vedie k podobnému fenotypu ako strata funkcie *PIN1* génu u *pin* mutantných rastlín arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) (Okada *et al.*, 1991), na základe čoho bolo navrhované, že NPA blokuje polárny transport auxínu ovplyvňovaním zaciľovania vezikúl a cyklovania auxínových transportných proteínov ako je práve *PIN1* (Geldner *et al.*, 2001). NPA inhibuje internalizáciu proteínov lokalizovaných na cytoplazmatickej membráne, aj keď NPA cyklovanie *PIN1* proteínov neovplyvňuje priamo (Geldner *et al.*, 2001; Petrášek *et al.*, 2003) a na rozdiel od TIBA, NPA neovplyvňuje endoplazmatické retikulum, aktínový cytoskelet bunky, a primárne ani na mikrotubuly (Petrášek *et al.*, 2003; Dhonukshe *et al.*, 2008).

Avšak okrem *PIN* transportného auxínového mechanizmu ovplyvňuje NPA čiastočne aj výstup auxínu z bunky sprostredkovaný ABCB proteínmi (Mravec *et al.*, 2008), vzhľadom na to, že ABCB1 a ABCB19 boli tiež identifikované ako cieľové proteíny pre NPA (Geisler *et al.*, 2005; Rojas-Pierce *et al.*, 2007; Nagashima *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

Na základe narušenej distribúcie auxínu vznikajú u rastlín ako následok aplikácie NPA významné embryonálne abnormality, ako je napríklad neurčitá apikálno-bazálna os (Friml *et al.*, 2003). Podobne sú aplikáciou NPA narušené aj vývojové procesy na postembryonálnej úrovni, kedy dochádza k zabráneniu bunkového delenia alebo diferenciácii xylémových elementov (Yoshida *et al.*, 2009) či inhibícii gravitropickej odpovede koreňa a blokovaniu ďalších fyziologických aspektov rastlín kontrolovaných polárnym transportom auxínu (Thomson *et al.*, 1973; Burton *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2010).

Kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA)

Kyselina 2,3,5-trijódbenzoová (TIBA) ako inhibítor polárneho transportu auxínu (Morris *et al.*, 1973; Katekar a Geissler, 1980) zabraňuje na jednej strane internalizácii *PIN1* proteínov lokalizovaných na cytoplazmatickej membráne a na strane druhej inhibuje zaciľovanie internalizovaných *PIN1* proteínov na cytoplazmatickú membránu (Geldner *et al.*, 2001). Pohyb vezikúl obsahujúcich *PIN1* proteíny je blokován ako

následok stabilizácie aktínových filament, pričom TIBA pravdepodobne pôsobí na faktor stabilizujúci aktín alebo inaktivuje aktínový depolymerizačný faktor. Týmto TIBA významne narušuje bunkovú dynamiku a pohyb vezikúl s PIN1 proteínmi, v dôsledku čoho dochádza k redukcii odtoku auxínu z bunky (Dhonukshe *et al.*, 2008). Aplikácia TIBA súčasne okrem konštitutívnej endocyklózy a zaciľovania PIN1 proteínov na membránu blokuje aj subcelulárne zaciľovanie AUX1 proteínov. Práve subcelulárne cyklovanie AUX1 proteínu závislé na aktínovom cytoskelete je výrazne citlivejšie k pôsobeniu TIBA než endocyklóza PIN1 proteínu (Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

Zároveň sa predpokladá, že TIBA sa viaže k odlišnému receptorovému miestu než NPA, vzhľadom na to, že TIBA nesúťažá s NPA o špecifické NPA-väzbové miesto, čo znamená pravdepodobnú existenciu rôznych väzobných miest pre rôzne triedy inhibítorov polárneho transportu auxínu (Sussman a Goldsmith, 1981).

Rovako ako aplikácia iných inhibítorov transportu auxínu, tak aj aplikácia TIBA vedie k blokovaniu mnohých fyziologických prejavov a odpovedí u rastlín regulovaných polárne transportovaným auxínom (Thomson *et al.*, 1973; Liu *et al.*, 1993; Fujita a Syono, 1997), pričom TIBA, podobne ako NPA inhibuje auxínový transport veľmi rýchlo po aplikácii, už v priebehu 1-20 minút (Thomson *et al.*, 1973).

Brefeldín A

Fungálny toxín brefeldín A (BFA) inhibuje aktivitu ARF-GEF GNOM faktoru, na ktorom je závislé subcelulárne cyklovanie a endocytóza PIN proteínov smerom k bazálnej strane cytoplazmatickej membrány koreňových buniek. Pôsobenie BFA vedie k vytrateniu PIN1 proteínov z cytoplazmatickej membrány a ich intracelulárnej akumulácii v tzv. BFA-kompartmentoch, pričom tento efekt brefeldínu A je reverzibilný (Steinmann *et al.*, 1999; Geldner *et al.*, 2001; Geldner *et al.*, 2003; Paciorek *et al.*, 2005; Kleine-Vehn *et al.*, 2008).

Distribúcia a zaciľovanie AUX1 proteínu na cytoplazmatickú membránu je na rozdiel od PIN1 proteínu BFA-insenzitívne (Kleine-Vehn *et al.*, 2006). Aj keď je pre subcelulárnu dynamiku translokácie AUX1 proteínu tiež potrebná aktivita BFA-senzitívneho ARF-GEF faktoru (Grebe *et al.*, 2002), vzhľadom na to, že sa AUX1 proteín tiež reverzibilne agreguje v BFA kompartmentoch, nie je translokácia AUX1 závislá na funkcii GNOM faktore (Kleine-Vehn *et al.*, 2006).

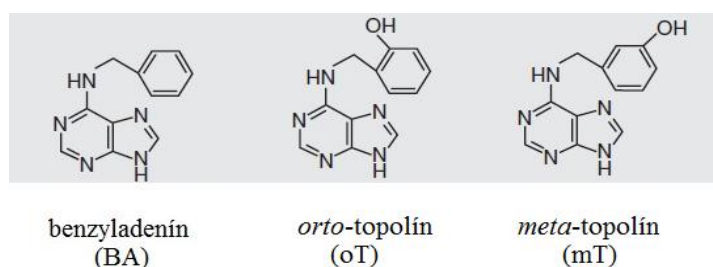
Aplikácia brefeldínu A dokáže viesť k veľmi rýchlej akumulácii IAA v bunke (Delbarre *et al.*, 1998; Morris a Robinson, 1998). Rovnako ako TIBA, tak ani v prípade BFA nedochádza k väzbe k špecifickému NPA-väzbovému miestu, čo poskytuje ďalší dôkaz o tom, že NPA-väzbový proteín je odlišný proteín od proteínu zabezpečujúceho transport auxínu z bunky (Robinson *et al.*, 1999).

Centrálna úloha v procese apikálnej dominancie je pripisovaná hormónu auxínu. Aj keď je jeho funkcia v regulácii stonkového vetvenia kľúčová, auxín je nedeliteľnou súčasťou celého komplexu vzájomne interagujúcich prvkov kontrolujúcich tento proces, zahrňujúci predovšetkým ďalšie rastlinné hormóny cytokiníny a strigolaktóny.

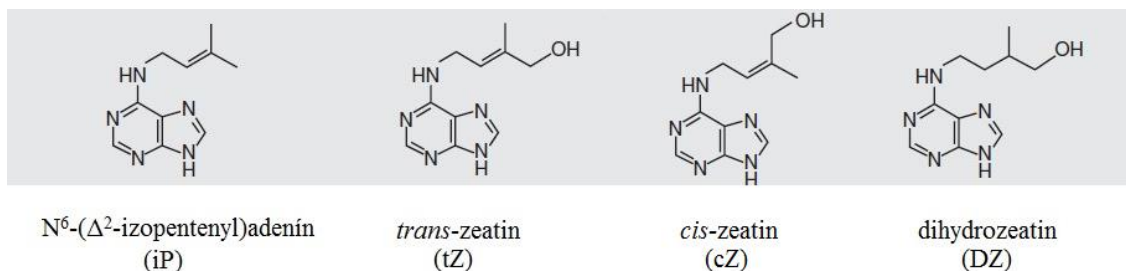
3.3 Cytokiníny

Izoláciou aktívnej substancie v roku 1955 (Miller *et al.*, 1955), pomenovanou kinetín a následnou identifikáciou *trans*-zeatínu (Letham, 1963) bola objavená ďalšia trieda rastlinných hormónov – cytokinínov, nazvaných podľa ich schopnosti podporovať cytokinézu.

Cytokiníny sú fytohormóny odvodené od adenínu s postranným reťazcom v polohe N^6 . Prirodzene sa vyskytujúce cytokiníny sú všeobecne rozdeľované do dvoch tried podľa typu postranného reťazca na izoprenoidné a na aromatické, ktoré sú v rastlinách vzácnejšie (obr. 3) (Strnad *et al.*, 1997; Mok a Mok, 2001). Izoprenoidné cytokiníny, ktoré sa v rastlinách vyskytujú častejšie, sa rozdeľujú na dva typy - izopentenyladenínový typ, ktorý má v polohe N^6 adenínu izopentenylový postranný reťazec, a zeatínový typ, s hydroxylovaným izopentenylovým postranným reťazcom v polohe N^6 adenínu (obr. 4). Vlastná aktivita *trans*-zeatínu (*tZ*) a *cis*-zeatínu (*cZ*) je pritom ovplyvňovaná pozíciou hydroxylovej skupiny, pričom *tZ* sa vyznačuje významne vyššou biologickou aktivitou než *cZ* (Letham *et al.*, 1983).



Obr. 3: Chemická štruktúra vybraných aromatických cytokinínov.



Obr. 4: Chemická štruktúra vybraných izoprenoidných cytokinínov.

Cytokiníny sa v rastlinách vyskytujú vo forme voľných báz, ribozidov alebo ribotidov. Za biologicky aktívne sú považované predovšetkým voľné bázy, ktoré na rozdiel od cytokinínových konjugátov ribozidov a ribotidov vykazujú vyššiu schopnosť priamej väzby na cytokinínový receptor (Yamada *et al.*, 2001; Spíchal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006). Medzi syntetické cytokiníny sa zaraďuje napríklad difenylmočovina a jej deriváty, napríklad thidiazuron (TDZ), ktoré vykazujú cytokinínovú aktivitu (Thomas a Katterman, 1986; Mok a Mok, 2001).

Cytokiníny majú kľúčovú úlohu v regulácii proliferácie a diferenciácie rastlinných buniek, regulujú v rastlinách mnoho vývojových a rastových procesov ako je odd'ľovanie senescencie (Gan a Amasino, 1995), kontrola rovnováhy medzi nadzemnou a podzemnou časťou rastliny (Werner *et al.*, 2001; Werner *et al.*, 2003), a tiež sú zapojené do procesu apikálnej dominancie (Cline, 1991; Kalousek *et al.*, 2010).

3.3.1 Metabolizmus cytokinínov v rastlinách

Biosyntéza cytokinínov

Kľúčovú úlohu v biosyntéze cytokinínov má enzým kódovaný génom *ISOPENTENYL TRANSFERASE (IPT)*, ktorý katalyzuje prenos izopentenylu z dimetylallyldifosfátu (DMAPP) na N^6 pozíciu adenosin-5'-fosfátu (AMP, ADP alebo ATP). Na rozdiel od niektorých fytopatogénnych mikroorganizmov (napr. *Agrobacterium tumefaciens*), u ktorých je hlavným akceptorom izopentenylu AMP (Sakakibara, 2006), u vyšších rastlín (napr. *Arabidopsis thaliana* L.) IPT katalyzuje prenos izopentenylu predovšetkým na ADP a ATP (Takei *et al.*, 2001). Práve u arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) môže byť enzým IPT kódovaný deviatimi génmi z génovej rodiny *ISOPENTENYL TRANSFERASE (AtIPT1-9)* (Kakimoto, 2001; Takei *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2003).

Ďalším spôsobom biosyntézy izoprenoidných cytokinínov u rastlín je tRNA prenylácia adenínu katalyzovaná enzýmom tRNA-izopentenyltransferázou na 3' konci antikodónu (Golovko *et al.*, 2002), pričom u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) môže byť tRNA-IPT kódovaná dvomi génmi *AtIPT2* a *AtIPT9* (Miyawaki *et al.*, 2006).

Konjugácia a degradácia cytokinínov

Metabolizmus cytokinínov je klasifikovaný do dvoch skupín, z ktorých prvá súvisí s adenínovým kruhom a druhá s postranným reťazcom. Dynamické uvoľňovanie najaktívnejších foriem cytokinínov - ich voľných báz, prostredníctvom enzymatickej aktivity z nukleozidových či nukleotidových foriem, ako aj ich opätovné vytváranie predstavuje dôležitú súčasť udržiavania potrebnej hladiny aktívnych cytokinínov v rastlinných bunkách (Allen *et al.*, 2002).

Hladina aktívnych cytokinínov môže byť ďalej regulovaná vytváraním konjugátov (*N*- alebo *O*-glukozidov). V procese *N*-glykozilácie sú ireverzibilne formované biologicky neaktívne formy cytokinínov, s výnimkou čiastočne aktívnych *N*³-glukozidov. Naopak proces *O*-glykozilácie je reverzibilný, pričom deglykozilácia je katalyzovaná enzýmom β -glukozidázou (Brzobohatý *et al.*, 1993).

Hladina cytokinínov v rastlinách

Všeobecne je biosyntéza a homeostáza cytokinínov kontrolovaná internými a externými faktormi. Medzi tieto faktory patrí pletivovo a orgánovo špecifická regulácia expresie *IPT* génov, regulácia expresie kľúčových génov pre metabolizmus cytokinínov ďalšími rastlinnými hormónmi - auxínom a kyselinou abscisovou alebo regulácia v závislosti na dostupnosti živín (Miyawaki *et al.*, 2004; Takei *et al.*, 2004).

Homeostáza aktívnych cytokinínov v rastlinných bunkách je determinovaná pomerom medzi uvoľňovaním cytokinínových báz z konjugovaných foriem, degradáciou cytokinínov a inaktivujúcou konjugáciou. Cytokinínová oxidáza/dehydrogenáza (CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE; CKX) katalyzuje ireverzibilnú degradáciu odštiepením postranného reťazca (Schmülling *et al.*, 2003; Galuszka *et al.*, 2004), zatiaľ čo glykosyltransferázy inaktivujú cytokiníny glykoziláciou (Hou *et al.*, 2004).

Transport cytokinínov v rastlinách

Cytokiníny sú syntetizované buď v koreni, z ktorého sa pohybujú v rámci apikálno-bazálnej osi rastliny akropetálne do stonky xylémom (Bangerth, 1994) alebo sú syntetizované lokálne, pričom hlavným subcelulárnym kompartmentom biosyntézy cytokinínov sprostredkovanej IPT sú plastidy (Faiss *et al.*, 1997; Schmölling, 2002; Kasahara *et al.*, 2004).

Vzhľadom na to, že biosyntéza cytokinínov katalyzovaná IPT je bunkovo a pletivovo špecifická, je potrebné, aby boli cytokiníny transportované na cieľové miesto buď difúziou alebo selektívnym transportným systémom. Predstava selektívneho transportu vychádza z poznatkov, že rastlinné bunky sú schopné prijímať cytokinínové bázy a nukleozidy, rovnako ako aj akumulovať *tZ*-typ a *iP*-typ cytokinínov v xyléme a floéme (Lejeune *et al.*, 1994; Bürkle *et al.*, 2003; Corbesier *et al.*, 2003).

U arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) boli identifikované dva gény *AtPUP1* a *AtPUP2* kódujúce purínové permeázy, ktoré sprostredkovávajú transport cytokinínových báz (Gillissen *et al.*, 2000; Bürkle *et al.*, 2003).

Najčastejším typom cytokinínu vyskytujúcim sa v xyléme je *tZR* (Beck a Wagner, 1994; Lejeune *et al.*, 1994), zatiaľ čo listové exsudáty obsahujú predovšetkým *iP*-typ cytokinínov (Corbesier *et al.*, 2003).

3.4 Strigolaktóny

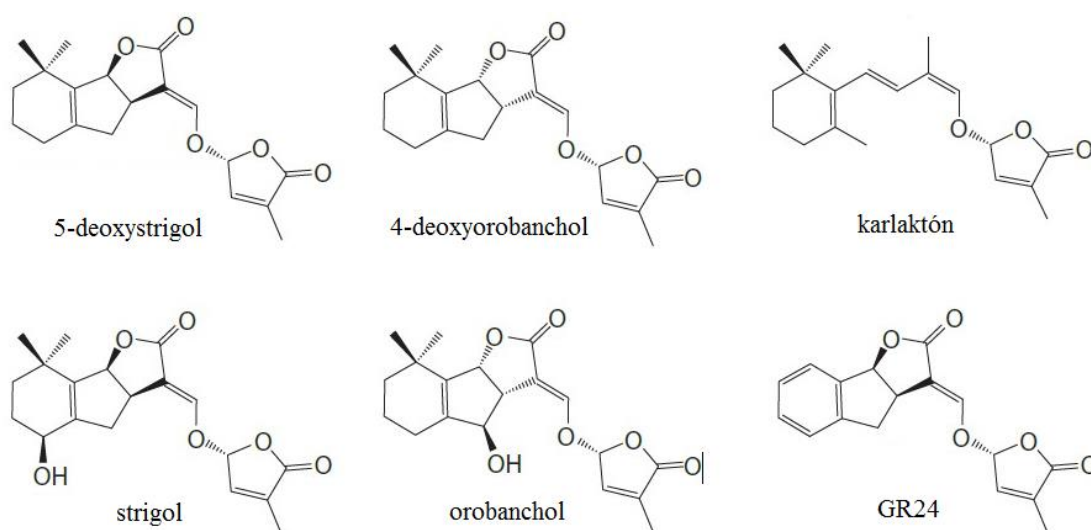
Strigolaktóny, ako sekundárne metabolity predstavujú nový typ rastlinných hormónov, ktoré majú význam ako stimulátory klíčenia parazitických rastlín zahrňujúcich rody *Striga*, *Orobancha*, *Alectra* a *Phelipanche* (Xie *et al.*, 2010). Prvý prirodzene sa vyskytujúci strigolaktón, strigol, stimuluje klíčenie parazitickej rastliny *Striga lutea* L., bol prvý krát izolovaný z koreňového exsudátu bavlíku (Cook *et al.*, 1966). Následne bolo zistené, že strigolaktóny sú produkované a exsudované predovšetkým práve koreňmi v širokom spektre druhov rastlín (Kohlen *et al.*, 2011; Delaux *et al.*, 2012; Yoneyama *et al.*, 2013). Okrem toho bola aktivita strigolaktónov tiež zistená v rámci ďalších interakcií rastlín - stimulujú hyfálne vetvenie symbiotických arbuskulárnych mykorhizálnych húb (Xie *et al.*, 2010) a podporujú symbiotické interakcie medzi rastlinami a baktériami rodu *Rhizobium* (Soto *et al.*, 2010; Foo a Davies, 2011).

Ďalšiu úlohu, ktorú strigolaktóny ako rastlinné hormóny majú je regulácia stonkového vetvenia. Táto funkcia bola prvý krát zistená na základe sledovania prenosného signálu u mutantných rastlín so zvýšeným vetviacim fenotypom (Beveridge *et al.*, 1997b; Stirnberg *et al.*, 2002). Len nedávno bol tento nový signál definovaný ako strigolaktón, čo potvrdilo, že strigolaktóny sú endogénne regulátory rastu a vývoja rastlín (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

Ďalšie funkcie, ktoré strigolaktóny majú sú kontrola sekundárneho rastu kambia (Agusti *et al.*, 2011), utváranie koreňovej architektúry (Ruyter-Spira *et al.*, 2011), formovanie adventívnych koreňov (Rasmussen *et al.*, 2012) či regulácia vývoja listov (Beveridge *et al.*, 1996; Snowden *et al.*, 2005). Väčšina týchto vplyvov strigolaktónu na rast a vývoj rastlín je spojená s procesmi závislými na činnosti auxínu (Shinohara *et al.*, 2013).

3.4.1 Biosyntéza strigolaktónu

Prirodzene sa vyskytujúce strigolaktóny sú zlúčeniny pozostávajúce z butenolidového kruhu (kruh D) spojeného enol-éterovým mostíkom s menej konzervovanou sekundárnou časťou. Práve na základe sekundárnej časti sú strigolaktóny rozdeľované do dvoch skupín na: (a) tricyklické laktóny s ABC kruhom zahrňujúce zlúčeniny ako je strigol a orobanchol a (b) strigolaktóny bez tricyklického laktónového kruhu ako je napríklad karlaktón (Ueno *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2013) (obr. 5).



Obr. 5: Štruktúra strigolaktónov strigolového, orobancholového a karlaktónového typu.

Na základe izolácie mutantných rastlín *ramosus (rms)* u hrachu (*Pisum sativum* L.), *more axillary growth (max)* u arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.), *dwarf (d)/high tillering dwarf (htd)* u ryže (*Oriza sativa* L.) a *decreased apical dominance (dad)* u peptúnie (*Petunia hybrida* L.), ktoré vykazujú zvýšený počet laterálnych stonkových výhonov a trpasličí vzrast, boli identifikované gény *MAX*, *RMS*, *D* a *DAD* (tab. 1), kódujúce enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónov (Beveridge *et al.*, 1996, 1997; Sorefan *et al.*, 2003; Brooker *et al.*, 2004, 2005; Zou *et al.*, 2005, 2006; Brewer *et al.*, 2013; Ruyter-Spira *et al.*, 2013) (tab. 1).

Tab. 1: Prehľad génov kódujúcich enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónu (upravené podľa Al-Babili a Bouwmeester, 2015).

Funkcia proteínu	Názov génu			
	arábovka	hrach	ryža	petúnia
9- <i>cis/trans</i> - β -karoténová izomeráza	<i>AtD27</i>	-	<i>D27</i>	-
Karotenoidy štiepiaca dioxygenáza 7 (CCD7)	<i>MAX3</i>	<i>RMS5</i>	<i>HTD1/D17</i>	<i>DAD3</i>
Karotenoidy štiepiaca dioxygenáza 8 (CCD8)	<i>MAX4</i>	<i>RMS1</i>	<i>D10</i>	<i>DAD1</i>
Cytochróm P450, cytochróm 711 (CYP711)	<i>MAX1</i>	-	-	<i>PhMAX1</i>

Strigolaktóny sú v rastlinách odvodené od karotenoidových prekursorov (Matusova *et al.*, 2005) prostredníctvom aktivity niekoľkých enzýmov, zahrňujúc karotenoidovú izomerázu (DWARF27; D27) a dve, karotenoidy štiepiace dioxygenázy (CCD; CCD7 (MAX3, RMS5, D17/HTD1) a CCD8 (MAX4, RMS1, D10)), činnosťou ktorých vzniká produkt nazvaný karlaktón (Lin *et al.*, 2009; Alder *et al.*, 2012). Následnú kľúčovú premenu karlaktónu na aktívne strigolaktóny katalyzuje ďalší enzým, pravdepodobne cytochróm P450 monooxygenáza, cytochróm 711 (CYP711) kódovaný u arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) génom *MAX1* (Booker *et al.*, 2005; Waters *et al.*, 2012; Seto *et al.*, 2014).

V súčasnej dobe je známych viacero strigolaktónových analógov s biologickou aktivitou (Prandi *et al.*, 2011; Zwanenburg a Pospíšil, 2013). Najznámejším syntetickým a biologicky aktívnym strigolaktónom je GR24 (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008).

3.4.2 Transport strigolaktónu

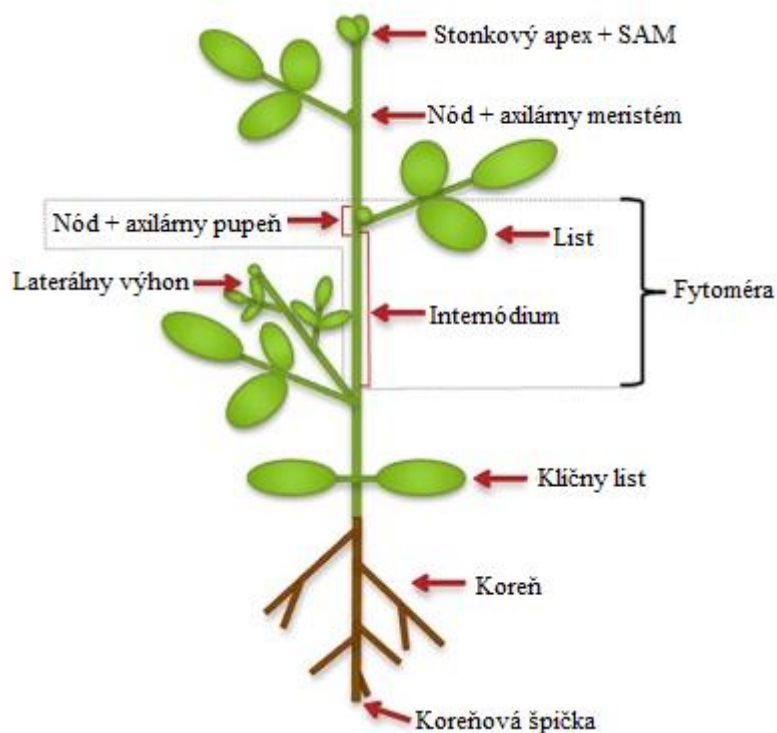
Strigolaktóny sú v rastlinách syntetizované predovšetkým v koreňoch (Sorefan *et al.*, 2003; Bainbridge *et al.*, 2005; Brooker *et al.*, 2005) a súčasne môžu byť produkované aj v časti stonky (Morris *et al.*, 2001). Následne môžu byť strigolaktóny z koreňa v rastlinách transportované aktívne (Kretschmar *et al.*, 2012) akropetálne, do nadzemnej časti rastliny, čo bolo potvrdené na základe prítomnosti niektorých známych strigolaktónov, predovšetkým orobancholu v xylémovej šľave arábovky Thalovej (*Arabidopsis thaliana* L.) a rajčiaku jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Prostredníctvom týchto experimentov s vrúbľovanými mutantnými rastlinami a rastlinami štandardného typu bola tiež demonštrovaná inhibícia stonkového vetvenia u strigolaktón-deficientných vrúbľov navrúbľovaných na koreni štandardného typu, čo opäť poukazuje na transport strigolaktónov alebo strigolaktónových derivátov z koreňa do stonky (Kohlen *et al.*, 2011, Kohlen *et al.*, 2012).

Okrem strigolaktónov transportovaných z koreňa do stonky je pravdepodobne rovnakým spôsobom ako strigolaktóny translokovaný aj intermediát karlaktón, vznikajúci v biosyntetickom kroku dráhy strigolaktónu katalyzovanom enzýmom MAX4. Toto ukázali experimenty, v ktorých koreň resp. podzemná časť mutantnej rastliny *max1* je schopná zvrátiť vetviaci fenotyp navrúbľovaných nadzemných častí mutantných rastlín *max3* a *max4* (Brooker, *et al.*, 2005). Tieto zistenia boli potvrdené stanovením lokalizácie transkriptov biosyntetického génu *MAX4* u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), ktorý vykazuje vysokú hladinu expresie v koreni, zatiaľ čo expresia *MAX4* v pletivách v oblasti axilárnych pupeňov je nízka a v pupeňoch samotných nedetekovateľná (Sorefan *et al.*, 2003; Bainbridge *et al.*, 2005). Naopak expresia génu *MAX1* dosahuje vysokých hladín predovšetkým v axilárnych oblastiach listov a kvetov a v pletivách asociovaných s vaskulatúrou. Expresia génu *MAX1* je detekovateľná v koreni len v centrálnom valci nad zónou diferenciácie, čo je v súlade s konceptom, podľa ktorého má *MAX1* úlohu mobilného substrátu transportovaného cez xylém (Brooker, *et al.*, 2005).

Okrem transportu strigolaktónov z koreňa do nadzemnej časti rastliny môžu byť tiež strigolaktóny uvoľňované v rámci aktívneho transportného procesu do rhizosféry, kde pôsobia ako faktory podporujúce symbiotické interakcie s arbuskulárnymi mykorhizálnymi hubami napr. s *Glomus intraradices* (Kretschmar *et al.*, 2012).

3.5 Apikálna dominancia

Vývoj rastlín závisí na aktivite stonkového apikálneho meristému, ktorý je lokalizovaný na vrchu stonkovej osi – stonkový apex. Rast nadzemnej časti rastliny sa deje ako dôsledok kontinuálnej aktivity stonkového apikálneho meristému. Tento postupne produkuje základné funkčné jednotky pozostávajúce zo stonkových segmentov s pridruženými listami a axilárnymi meristémami, ktoré sú položené v úžľabí listov. Miesto pripojenia listu k hlavnej stonke sa označuje ako nód a internódium je úsek stonky medzi jednotlivými nódmi (obr. 6). Axilárne meristémy sú sekundárne stonkové apikálne meristémy s rovnakým vývojovým potenciálom ako primárne stonkové meristémy. Axilárny meristém sa postupne vyvíja na axilárne pupene, ktoré môžu buď zostať v dormancii alebo sa môžu stať aktívnymi - vyrastať a vytvárať výhony. Proces, v ktorom sú axilárne meristémy formované a aktivované sa označuje ako stonkové vetvenie. Stonkové vetvenie, a tým aj výsledná architektúra rastliny sú determinované práve frekvenciou aktivácie sekundárnych meristémov, kontrolou vyrastania axilárnych pupeňov, rovnako ako aj následnou dynamikou rastu laterálneho výhonu. Tieto základné parametre sa môžu meniť v závislosti na druhu rastliny a genetickej predispozícii, a tiež môžu byť charakteristicky modifikované v priebehu odpovedi k okolitým environmentálnym podmienkam. Kľúčovým faktorom počas týchto modifikácií je aktivita axilárnych pupeňov, pričom stonkové vetvenie je potlačované alebo aspoň redukované stonkovým apexom prostredníctvom komplexného regulačného systému nazvaného apikálna dominancia (Dostál, 1908; Šebánek, 1971; Stafstrom a Sussex, 1988; Cline, 1991; Procházka a Truska, 1999; Shimizu-Sato a Mori, 2001; Sussex a Kerk, 2001; Bennett a Leyser, 2006).



Obr. 6: Architektúra dvojkličnolistovej rastliny (upravené podľa Teichmann a Muhr, 2015).

Existencia a základné princípy apikálnej dominancie boli demonštrované klasickými fyziologickými experimentami na základe odstránenia stonkového apexu dekapitáciou, ktoré vedie práve k aktivácii a vyrastaniu axilárnych pupeňov (Snow, 1929; Thimann a Skoog, 1933). Termín apikálna dominancia označuje fyziologický proces vývojovej korelácie rastlín, v ktorom stonkový apex kontroluje vyrastanie laterálnych pupeňov (Cline, 1997). V prípade, že je u niektorých druhov rastlín apex stonky odstránený alebo inhibovaný, jeden alebo viac axilárnych pupeňov je uvoľnených z vplyvu apikálnej dominancie a začnú vyrastať (Hillman, 1984). Následne, už niekoľko hodín po dekapitácii, sa dĺžka aktivovaného axilárneho pupeňa zväčšuje, postupne dochádza k jeho elongácii a vývoju na laterálny výhon (Tamas, 1987; Turnbull *et al.*, 1997). Tieto zmeny nastávajú v priebehu štyroch vývojových štádií: formovanie laterálneho pupeňa (1. štádium), inhibícia rastu axilárneho pupeňa v dôsledku pôsobenia apikálnej dominancie (2. štádium), uvoľnenie axilárneho pupeňa po dekapitácii z apikálnej dominancie a iniciácia jeho rastu (3. štádium), elongácia axilárneho pupeňa a vývoj laterálneho výhonu (4. štádium) (Cline, 1997).

Prechod každým štádiom je presne regulovaný odlišnou činnosťou rastlinných hormónov, predovšetkým auxínov, cytokinínov a strigolaktónov, ktorých zapojenie do mechanizmu apikálnej dominancie bolo navrhované v postupne navrhovaných

teóriách snažiacich sa objasniť podstatu tohto fyziologického procesu. Vzhľadom na to, že dekapitáciou je apikálna dominancia najlepšie demonštrovaná, predstavuje tento experimentálny prístup východisko pre štúdium vyrastania axilárnych pupeňov a práve na základe experimentov s dekapitovanými rastlinami boli formulované klasické teórie o podstate apikálnej dominancie.

3.5.1 Nutritívna teória apikálnej dominancie

Podľa jednej z prvých teórií o apikálnej dominancii, ktorú formuloval Goebel (1900), dochádza medzi stonkovým apexom a axilárnymi pupeňmi k súťaženiu o základné nutričné látky. Stonkový apex pritom v rámci nutritívnej teórie predstavuje centrum, ktoré priťahuje živiny, čím sú axilárne pupene v dôsledku nedostupnosti týchto výživných látok oslabené a preto neschopné rastu.

3.5.2 Teória priamej auxínovej inhibície

Postupne bolo na základe ďalších experimentov s rastlinami hrachu (*Pisum sativum* L.) predpovedané, že nadvláda stonkového apexu môže byť spôsobená nielen vplyvmi nutričnými, ale aj vplyvmi hormonálnymi (Dostál, 1908). Následne Thimann a Skoog (1933, 1934) za použitia dekapitovaných rastlín a substancií aplikovaných namiesto odstráneného apexu demonštrovali, že apikálna dominancia môže byť sprostredkovaná rastlinným hormónom auxínom a vyslovili teóriu priamej auxínovej inhibície. V tejto teórii navrhujú, že auxín syntetizovaný v stonkovom apexe je z neho transportovaný v hlavnej stonke bazipetálne k axilárnym pupeňom, do ktorých auxín vstupuje a zabezpečuje ich inhibíciu rastu.

3.5.3 Teória nepriamej auxínovej inhibície

Dôkaz o pôsobení auxínu na dlhé vzdialenosti viedol v návrhu teórie nepriamej auxínovej inhibície, podľa ktorej auxín inhibuje vyrastanie axilárnych pupeňov tak, že reguluje produkciu tzv. „druhého posla“, ktorý je potom transportovaný do axilárneho pupeňa a zabraňuje jeho vyrastaniu (Snow, 1937). Snow (1937) v tejto teórii navrhuje, že „druhým poslom“ je látka rozdielna od auxínu, pôsobiaca na rast axilárnych pupeňov ako špecifický inhibítor, pred ktorej inhibičným vplyvom je apex stonky bohatý

na auxín chránený týmto vlastným auxínom, zatiaľ čo axilárne pupene, na auxín chudobnejšie, inhibičnému vplyvu „druhého posla“ podliehajú a nevyrastajú.

3.5.4 Nutrične diverzná teória

Teóriu nutrične diverznú prvý krát formuloval Went (1936). V tejto hypotéze, ktorá predstavovala modifikáciu teórie nutričnej, navrhol, že látky výživné sú prednostne translokované do oblastí rastliny s vysokou koncentráciou auxínu. Na rozdiel od nutričnej teórie, podľa ktorej sú živiny v rastline prepravované výhradne v závislosti na koncentračnom gradiente, sú živiny podľa teórie nutrične diverznej translokované na základe fyziologických efektov auxínu smerujúcich tok metabolitov a zároveň efektov odlišných od tých, ktoré podporujú rast.

3.5.5 Teória o vaskulárnych spojeniach

Na základe ďalších experimentov s dekapitovanými rastlinami bolo predpokladané, že inhibícia vyrastania axilárnych pupeňov je spôsobená účinkom auxínu na vaskulárne spojenia medzi hlavnou stonkou a axilárnym pupeňom (Van Overbeek, 1938).

Následne bolo zistené, že diferenciácia xylémových elementov medzi axilárnym pupeňom a hlavnou stonkou je skutočne ovplyvňovaná pôsobením IAA, čím je ovplyvňovaná distribúcia výživných látok do pupeňa dôležitých pre jeho rast (Sorokin a Thimann, 1964).

Neskôr Tepper (1993) zistil, že zatiaľ čo 6-dňové rastliny hrachu (*Pisum sativum* L.) nemali medzi stonkou a axilárnym pupeňom druhého nódu vytvorené žiadne vaskulárne spojenia, 9-dňové a 13-dňové rastliny už mali tieto spojenia medzi pupeňom a stonkou formované. Aj napriek vytvoreným vaskulárnym spojeniam axilárne pupene nezačali vyrastať a zostávali naďalej inhibované. Na základe tohto Tepper (1993) predpokladal, že v axilárnych pupeňoch dochádza k pomalejšej diferenciácii vaskulárnych spojení než v hlavnej stonke rastliny, čím sú pupene izolované od výživných látok transportovaných v hlavnej stonke.

3.5.6 Teória autoinhibície

Teória autoinhibície bola formulovaná na predpoklade, že polárny transport auxínu z primárne indukovaného alebo iným spôsobom dominujúceho orgánu zabraňuje

exportu auxínu z orgánov indukovaných neskôr alebo orgánov inhibovaných (Bangerth, 1989). Touto inhibíciou polárneho transportu auxínu medzi dominantným (stonkový apex) a subordinovaným orgánom (axilárny pupeň) dochádza k zamedzeniu auxínového toku zo zainhibovaného orgánu, ktorým je napríklad axilárny pupeň, čím auxín podľa tejto hypotézy predstavuje korelačne inhibičný signál. Bangerth (1989) zároveň predpokladá, že transport auxínu z daného orgánu má pre jeho rast kľúčový význam. V prípade, že je export auxínu inhibovaný v dôsledku autoinhibície, k iniciácii rastu príslušného orgánu nedochádza alebo je jeho rast podstatne redukovaný.

3.5.7 Systémová regulácia apikálnej dominancie

Rastliny majú vyvinutý špecializovaný transportný systém, ktorý umožňuje pohyb rôznorodých signálnych molekúl medzi jednotlivými pletivami a orgánmi. Tento transport na dlhé vzdialenosti je významnou cestou pre prenos informácií medzi orgánmi, čím koordinuje vývojové procesy medzi koreňom a nadzemnou časťou, zahrňujúc reguláciu stonkovej architektúry. Rastlinné hormóny sú prominentné v rámci signálov transportovaných touto dráhou. Ich systémové fungovanie je nevyhnutné pre kontrolu vetvenia (Wolters a Jürgens, 2009), pričom do regulácie vyrastania axilárnych pupeňov sú zapojené predovšetkým tri skupiny fytohormónov: auxíny, cytokiníny a strigolaktóny. Auxín transportovaný bazipetálne v polárnom auxínovom toku inhibuje vetvenie stonky nepriamo (Snow, 1929; Thimann a Skoog, 1933), zatiaľ čo cytokiníny syntetizované hlavne v koreni, transportované akropetálne v xyléme majú v procese regulácie stonkového vetvenia funkciu ako aktivátori vyrastania pupeňov (Sachs a Thimann, 1967; Chen *et al.*, 1985; Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). Strigolaktóny, syntetizované rovnako ako cytokiníny predovšetkým v koreni a tiež na báze stonky, sú transportované v xyléme akropetálne s cieľom reprimovať aktivitu pupeňov (Beveridge *et al.*, 1996; Beveridge *et al.*, 1997; Morris *et al.*, 2001; Napoli, 1996; Simons *et al.*, 2007; Turnbull *et al.*, 2002; Sorefan *et al.*, 2003; Booker *et al.*, 2004; Booker *et al.*, 2005; Umehara *et al.*, 2008, Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Kohlen *et al.*, 2011).

Na základe mnohoročných fyziologických experimentov, genetických a biochemických a analýz, ako aj predchádzajúcich teórií o postate apikálnej dominancie sú v súčasnej dobe v rámci systémovej regulácie apikálnej dominancie a stonkového vetvenia navrhované dva hlavné hypotézy pre proces iniciácie rastu

axilárnych pupeňov, pričom žiadna z týchto hypotéz zatiaľ nebola jednoznačne potvrdená, avšak ani vyvrátená:

1. Teória kanalizácie auxínového transportu

- podľa tejto prvej hypotézy môže auxínový transport v hlavnej stonke inhibovať vyrastanie axilárnych pupeňov reguláciou schopnosti axilárneho pupeňa založiť svoj vlastný polárny transport auxínu za účelom exportovať auxín do hlavnej stonky (Li a Bangerth, 1999).

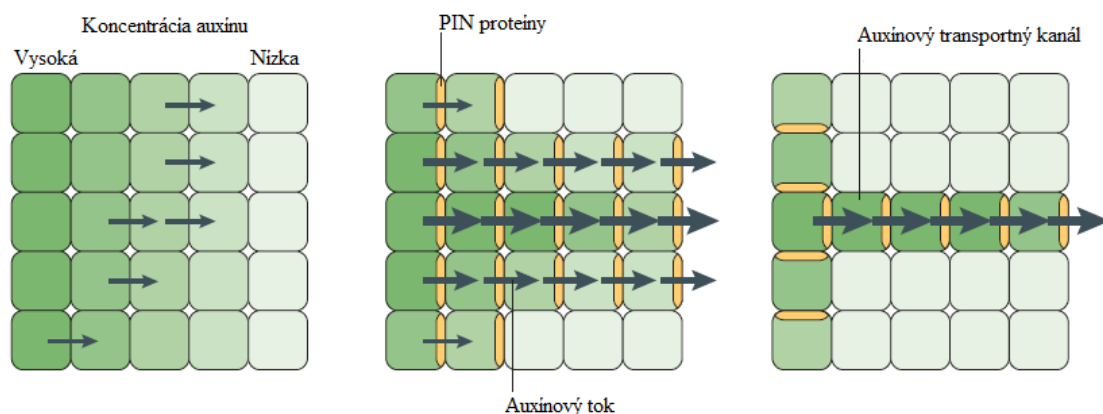
2. Teória sekundárnych poslov

- podľa druhej hypotézy má auxín úlohu v regulácii hladiny vzostupného mobilného signálu - tento signál potom na rozdiel od auxínu vstupuje do pupeňa a môže priamo regulovať jeho aktivitu (Snow, 1929; Sachs a Thimann, 1967; Bangerth, 1994).

Teória kanalizácie auxínového transportu

Teória kanalizácie auxínu bola pôvodne navrhovaná Sachsom (1981) na základe sledovania polárnej, jednosmernej diferenciácie provaskulárnych zväzkov, ktorá následne viedla k formovaniu vaskulárnych elementov s cieľom objasniť proces formovania vaskulárnych spojení napríklad v listovej žilnatinе alebo počas obnovovania vaskulárnych spojení prerušených poranením. Podľa teórie kanalizácie auxínového transportu je iniciálny tok auxínu zo zdroja do sinku postupne kanalizovaný do súborov buniek s vysokou schopnosťou transportovať auxín (obr. 7). Proces kanalizácie závisí na kontrole pozitívnej spätnej odpovede: auxínový tok zintenzívňuje a polarizuje svoj vlastný transport v smere svojho toku (Sachs, 1981). Toto vedie k formovaniu súborov buniek s vysokým stupňom auxínového transportu polarizovaného smerom k auxínovému sinku. Tieto bunkové súbory fungujú ako auxínové transportné kanály spájajúce zdroj auxínu s jeho sinkom, pričom tieto súbory buniek sa neskôr môžu diferencovať na vaskulárne spojenia. Súčasne bolo na základe pozorovaní regenerácie vaskulárnych pletív okolo mechanicky vykonaného poranenia v stonke zistené, že proces kanalizácie auxínového toku postupuje cez niekoľko krokov: najprv všetky bunky v oblasti poranenia a narušenia cievneho systému predstavujú ekvivalentné transportéry auxínu, postupne niektoré bunky vykazujú vyššiu schopnosť transportovať auxín a ich kapacita rastie s auxínovým tokom, následne sú bunky transportujúce auxín indukované k diferenciácii na provaskulárne pletivá, čím sú determinované ako prioritné auxínové kanály. Tento proces nakoniec vedie k oddeleniu súboru buniek

schopných prenášať tok induktívneho auxínového signálu. Auxín je z okolitých buniek vyčerpaný, čo následne vedie k zabráneniu ich diferenciácii na vodivé pletivá (Sachs, 1981; Nelson a Denglar, 1997). Na bunkovej úrovni sú regulácia a smerovanie auxínového toku realizované auxínom indukovanými zmenami v polarite PIN1 proteínov a stabilizáciou PIN1 na cytoplazmatickej membráne (Sauer *et al.*, 2006).



Obr. 7: Model kanalizácie auxínového transportu (upravené podľa Domagalska a Leyser, 2011).

Práve identifikácia PIN proteínov (Sauer *et al.*, 2006; Scarpella *et al.*, 2006) silne podporila hypotézu kanalizácie auxínu, vzhľadom na to, že je možné sledovať progresívne zvyšovanie počtu a polarizácie PIN proteínov, generujúce súbory auxín-transportujúcich buniek, ktoré spájajú auxínový zdroj s jeho sinkom. Kontrola spätnej pozitívnej odpovede medzi auxínom a jeho transportom tiež prebieha na úrovni zvyšovania expresie *PIN* génov a inhibície odstraňovania PIN proteínov z cytoplazmatickej membrány (Heisler *et al.*, 2005; Paciorek *et al.*, 2005; Vieten *et al.*, 2005; Robert *et al.*, 2010).

V kontexte aktivácie pupeňov predstavuje založenie auxínového exportu z pupeňa a auxínová kanalizácia hlavný mechanizmus kontrolujúci apikálnu dominanciu, a tým aj stonkové vetvenie rastlín. V prípade, že majú byť pupene aktivované, je práve export auxínu z axilárneho meristému nevyhnutný pre umožnenie novej iniciácie listov a ich následnej expanzie (Bayer *et al.*, 2009). Súčasne je podľa teórie kanalizácie auxínového transportu celý proces regulovaný polárnym auxínovým transportným tokom (PAT) v hlavnej stonke a pozitívnou koreláciou medzi aktivitou pupeňa a PAT tokom v príslušnej stonke axilárneho pupeňa (Li and Bangerth, 1999). Sústavný export auxínu z pupeňa vyžaduje založenie PAT toku do stonky pupeňa. Auxín je syntetizovaný v mladých expandujúcich listoch, preto sú axilárne pupene potenciálnym auxínovým zdrojom s primárnou hlavnou stonkou fungujúcou ako

auxínový sink vzhľadom k jej schopnosti transportovať auxín ku koreňu. Pokiaľ je auxínový tok z pupeňa dostatočný, bude dochádzať aj k dostatočnej pozitívnej odpovedi v zdroji kanalizačného procesu, k zosilneniu tohoto iniciálne slabého toku a k formovaniu polárneho auxínového transportu smerom z pupeňa, ktorého výsledkom bude spojenie pupeňa s PAT tokom v hlavnej stonke. V prípade, že nedochádza k amplifikácii nízkeho počiatočného auxínového toku, nebude dochádzať ani ku kanalizácii auxínu a pupeň zostane v dormantnom stave (Sachs, 1981; Sachs, 2000; Paciorek *et al.*, 2005; Vernoux *et al.*, 2010).

Dôležitosť optimálnej úrovne PAT v aktivácii pupeňa bola tiež zistená za použitia rastlín arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) mutantných v strigolaktónovej biosyntetickej dráhe *more axillary growth (max)*. Tieto mutantné línie vykazujú zvýšenú mieru vetvenia, ale zároveň majú aj zvýšený PAT v hlavnej stonke, rovnako ako aj zvýšené množstvo PIN proteínov (Bennett *et al.*, 2006, Prusinkiewicz *et al.*, 2009). Thimann a Skoog (1933), rovnako ako aj Snyder (1949), vo svojich experimentoch naopak pozorovali, že zvýšené vetvenie korelovalo s redukovaným auxínovým transportom v stonke. Tiež zistili, že blokovanie PAT zvyšuje počet vetví, zatiaľ čo obnovenie auxínového toku zo stonkového apexu inhibuje stonkové vetvenie. Pre tieto pozorovania, že zvýšená i znížená hladina auxínového transportu môže viesť k zvýšenému vetveniu stonky, poskytuje práve teória kanalizácie auxínového transportu zodpovedajúce vysvetlenie, pretože podľa tejto teórie koncentrácia auxínu v hlavnej stonke determinuje silu jeho sinku, a tým aj rozsah počiatočného toku auxínu z pupeňa do stonky. Auxín, ktorý je už v hlavnej stonke v polárnom auxínovom transportnom toku (PAT) je exportovaný z už aktívneho rastúceho stonkového apexu, redukuje silu sinku v stonke pre dodatočný auxín z ďalšieho zdroja. Týmto zabraňuje axilárnym pupeňom v exporte ich vlastného auxínu. V prípade dekapitácie alebo oslabenia stonkového apexu je apikálny zdroj auxínu odstránený, čo vedie k zvýšeniu sily sinku v stonke. Výsledkom toho je, že môže dochádzať ku kanalizácii auxínu transportovaného z axilárnych pupeňov a pupene tak môžu začať vyrastať. Tento systém umožňuje apikálne odvodenému auxínu pohybovať sa v hlavnej stonke smerom dole ku koreňu a regulovať aktiváciu pupeňov nepriamym spôsobom. Navyše teória kanalizácie auxínového transportu súčasne navrhuje, že pokiaľ sú založené dva zdroje auxínu, dochádza medzi nimi ku kompetícii, pričom jeden zdroj môže inhibovať tvorbu auxínového kanálu zo zdroja druhého. Súčasne, pokiaľ je prítomný primárny zdroj auxínu, zabraňuje tento primárny zdroj v priebehu vývoja a rastu rastliny exportu

auxínu z potenciálneho sekundárneho auxínového zdroja. Export a kanalizácia auxínu zo sekundárneho zdroja môže prebiehať jedine ak je primárny auxínový zdroj odstránený alebo oslabený (Balla *et al.*, 2011).

Dva axilárne pupene, ako dva potenciálne zdroje auxínu, medzi sebou súťažia o prístup k hlavnej dráhe PAT toku smerovaného ku koreňu. V rámci kompetitívnej kanalizácie auxínu toto znamená, že pokiaľ nie sú pupene aktivované takmer zároveň, pupeň, v pupeni, ktorý bol aktivovaný ako prvý založí auxínový export do hlavnej stonky a zabraňuje ďalším pupenom v aktivácii a exporte auxínu. V prípade, že je rastlina dekapitovaná, transport auxínu sa z aktivovaných pupenov rýchlo zvyšuje. Tento auxínový export je sprevádzaný postupnou polarizáciou PIN1 proteínov v aktivovanom pupeni, ktoré určujú zakladanie smerovaného auxínového toku von z pupeňa. Bunkové súbory exprimujúce PIN1 proteíny spájajúce axilárny pupeň s PAT tokom hlavnej stonky označujú budúce vaskulárne spojenia medzi pupenom a stonkou. Dôležité je, že prítomnosť silného auxínového zdroja, podobne akým je aj intaktný stonkový apex alebo auxín aplikovaný na dekapitovanú plochu stonky, zabraňuje polarizácii PIN1 proteínov, auxínovému exportu a aktivácii ďalšieho pupeňa (Balla *et al.*, 2011).

Teória sekundárnych poslov

Podľa klasického modelu sekundárnych poslov, auxín kontroluje hladinu signálov prenášaných z koreňa do stonky, následne transportovaných priamo do axilárneho pupeňa s cieľom regulovať jeho aktivitu (Snow, 1929; Sachs a Thimann, 1967). Za hlavných sekundárnych poslov, pomocou ktorých je auxínový signál prenášaný, sú považované rastlinné hormóny cytokiníny a strigolaktóny (Cline, 1991; Brewer *et al.*, 2009). Regulácia hladín strigolaktónov a cytokinínov auxínom je pritom sprostredkovaná prostredníctvom AXR1 - AFB (AUXIN RESITANCE PROTEIN 1 - AUXIN SIGNALLING F-BOX PROTEIN) dependentnej auxínovej signálnej dráhy (Nordström *et al.*, 2004; Hayward *et al.*, 2009).

Zapojenie cytokinínov do vyrastania pupenov a regulácie apikálnej dominancie bolo prvý krát zistené na základe exogénnej aplikácie cytokinínov priamo na dormantný pupeň, ktorá viedla k vyrastaniu ošetrovaného pupeňa (Wickson a Thimann, 1958; Sachs a Thimann, 1967). Týmto cytokiníny predstavujú zatiaľ jedinú triedu rastlinných hormónov, o ktorej je známe, že priamo podporuje vyrastanie axilárnych pupenov

dokonca aj v prípade, keď je rastlina intaktná a auxín produkovaný apexom je prítomný (Sachs a Thimann, 1967).

Mechanizmus, ktorým cytokiníny pupene aktivujú zatiaľ nie je presne známy. Je však jasné, že lokálne zmeny v biosyntéze alebo katabolizme cytokinínov v príslušnom nóde pupeňa, a tiež zvýšenie hladiny cytokinínov v axilárnom pupeni korelujú s aktivitou pupeňa. Navyše exogénna aplikácia cytokinínov na pupeň koreluje so zvýšením hladiny auxínu v pupeni, a tým aj s exportom auxínu z axilárneho pupeňa (Li a Bangerth, 2003), čo pravdepodobne poskytuje spojenie medzi cytokinínmi z teórie sekundárnych poslov a teóriou kanalizácie auxínového transportu. V rámci regulácie hladiny cytokinínov auxínom, auxín môže regulovať hladinu cytokinínov zvyšovaním expresie génu *CYTOKININ OXIDASE 2 (CKX2)*, ktorý kóduje proteín katalyzujúci degradáciu aktívnych cytokinínov (Shimizu-Sato *et al.*, 2009). Naopak auxín redukuje biosyntézu cytokinínov reguláciou expresie členov génovej rodiny *ISOPENTENYL TRANSFERASE (IPT)*, ktoré majú kľúčový význam v biosyntéze cytokinínov (Turnbull *et al.*, 1997; Werner *et al.*, 2001; Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006). U hrachu (*Pisum sativum* L.) bola zistená silná korelácia medzi hladinou transkriptu *PsIPT* génov v danom nóde stonky a vyrastaním pupeňa tomuto nódu príslušného (Ferguson a Beveridge, 2009). V kontexte apikálnej dominancie je expresia dvoch génov *PsIPT1* a *PsIPT2* u hrachu rapídne zvyšovaná v internódiách stonky po dekapitácii, ktorá koreluje už v priebehu 3-6 hodín po odstránení apexu so zvýšením hladiny cytokinínov najprv v internódiách a až potom v axilárnych pupeňoch. Na základe tohto je predpokladané, že cytokiníny sú do dormantného pupeňa transportované zo stonky s cieľom stimulovať jeho vyrastanie. K tomuto zvyšovaniu, či už expresie *IPT* génov alebo vlastnej hladiny cytokinínov, nedochádza, pokiaľ je na plochu dekapitovanej stonky aplikovaný auxín (Tanaka *et al.*, 2006). Vplyvom aplikácie cytokinínu na axilárny pupeň hrachu dochádza tiež k zmenám v expresii génov *PsAUX1* a *PsPIN1*, ktorá sa po ošetrovaní rýchlo zvyšuje, čo je spojené aj s polarizáciou *PsPIN1* proteínov v prokambiónych bunkách (Kalousek *et al.*, 2010). Okrem toho, cytokiníny tiež stimulujú export IAA z apikálnych aj z laterálnych pupeňov, regulujú celkový auxínový tok a jeho kapacitu a ovplyvňujú polarizáciu *PIN* proteínov, čím modifikujú smerovanie auxínového toku (Marhavý *et al.*, 2014). Po aplikácii cytokinínu na apikálny vrchol dochádza k zvýšeniu koncentrácie IAA nielen v ošetrovanom vrchole, ale aj v internódiách stonky pod apexom. Export a transportná kapacita auxínu sa zvyšuje v prítomnosti cytokinínov, preto cytokiníny pôsobia vo vzťahu k auxínu skôr ako

stimulačný faktor, než ako antagonista (Li a Bangerth, 2003). Všeobecne sa však predpokladá, že predovšetkým vzájomný pomer hladín týchto dvoch hormónov, auxínu a cytokinínu, skôr než absolútna koncentrácia samostatne jedného z nich je rozhodujúcim faktorom, na ktorom vyrastanie axilárnych pupeňov závisí (Emery *et al.*, 1998; Shimizu-Sato a Mori, 2001).

Na rozdiel od cytokinínov môžu strigolaktóny aplikované priamo na pupeň u hrachu (*Pisum sativum* L.) a arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) vyrastanie pupeňa inhibovať. Tento efekt strigolaktónu je v súlade s teóriou sekundárnych poslov (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Brewer *et al.*, 2009; Dun *et al.*, 2013), a súčasne tiež s teóriou kanalizácie auxínového transportu. Práve na základe modelu kanalizácie auxínového transportu je navrhované, že strigolaktóny aplikované na pupeň dekapitovaných rastlín môžu z tohto ošetrovaného pupeňa vytvárať slabšieho kompetitora v porovnaní s ďalšími axilárnymi pupeňmi v kontexte schopnosti auxínového exportu, čím je vysvetľovaná schopnosť strigolaktónu zabraňovať vyrastaniu pupeňa (Prusinkiewicz *et al.*, 2009). Preto nemá bazálna aplikácia strigolaktónu na izolovaný stonkový segment nesúci len jediný pupeň žiadny vplyv na aktiváciu a vyrastanie tohto pupeňa, zatiaľ čo v prípade, že sú na stonkovom segmente ponechané dva pupene, môže byť pozorovaný rast jedného z nich (Crawford *et al.*, 2010; Liang *et al.*, 2010). Je predpokladané, že strigolaktón ako jeden z hlavných navrhovaných sekundárnych poslov hrá zároveň aj v súlade s teóriou kanalizácie auxínového transportu úlohu v regulácii akumulácie PIN proteínov na cytoplazmatickej membráne. Táto hypotéza bola testovaná posúdením fenotypu strigolaktónových mutantných línií *max1*, *max3* a *max4* u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.). V súlade s touto hypotézou, bolo zistené, že strigolaktón redukuje auxínový transport v stonkových segmentoch a tiež redukuje akumuláciu PIN proteínov na bazálnej strane cytoplazmatickej membrány parenchymatických buniek xylému (Crawford *et al.*, 2010), a tiež, že mutantné línie arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) a ryže (*Oryza sativa* L.) v strigolaktónovej dráhe vykazujú zvýšený auxínový transport (Bennet *et al.*, 2006; Lazar a Goodman, 2006; Li *et al.*, 2009). Na základe tohto je predpokladané, že strigolaktóny systematicky znižujú PAT, čo vedie k zvyšovaniu kompetície medzi pupeňmi pre ich spoločný auxínový sink. Pokiaľ je celková hladina strigolaktónov v rastline nízka, môže byť aktivovaných viacero pupeňov, ktoré môžu exportovať auxín. Naopak, v prípade, že je hladina strigolaktónov vysoká, pupene, ktoré sú aktivované ako prvé budú exportovať auxín a následne dominovať systému, čím budú zabraňovať ďalším pupeňom v aktivácii. Rozhodnutie,

ktorý pupeň bude aktivovaný ako prvý závisí na lokálnej konkurencieschopnosti pupeňa, čo je pravdepodobne determinované lokálne vývojovým štádiom pupeňa v závislosti na genetických a tiež environmentálnych faktoroch. Toto umožňuje rastline kontrolovať celkové množstvo pupeňov, ktoré budú aktivované a budú vytvárať výhony. Vzhľadom na to, že všetky meristémy na rastline sú spojené auxínovým transportným a signálnym systémom, strigolaktóny môžu ovplyvňovať tento systém globálne, čím sa môžu podieľať na úrovni kompetície medzi auxínovými zdrojmi (Crawford *et al.*, 2010). Na základe rôznych štúdií je jasné, že funkcia auxínu a strigolaktónu je úzko spojená spätnoväzbovou odpoveďou, v ktorej strigolaktóny inhibujú auxínový transport a auxín podporuje expresiu strigolaktónových biosyntetických génov. Tieto vzájomne prepojené hormonálne dráhy vedú k zvýšeniu produkcie strigolaktónov, čo naopak môže viesť k redukcii auxínového toku. Produkcia strigolaktónov je apikálne odvodeným auxínom regulovaná cez zvyšovanie transkripcie *MAX3* a *MAX4* biosyntetických génov u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) (u hrachu homológy *RMS3* a *RMS5*), čo vedie k následnému zvýšeniu vlastnej biosyntézy strigolaktónov (Sorefan *et al.*, 2003; Foo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Arite *et al.*, 2007; Foo *et al.*, 2007; Brewer *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2009; Liang *et al.*, 2010). Naopak odstránenie primárneho zdroja auxínu dekapitáciou spôsobí silné zníženie hladiny transkriptov týchto strigolaktónových biosyntetických génov, a tým aj zníženie v produkcii samotných strigolaktónov (Foo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Arite *et al.*, 2007; Brewer *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2009).

Obidva navrhované mechanizmy regulácie apikálnej dominancie, v teórii kanalizácie auxínového transportu a teórii sekundárnych poslov, môžu byť aktívne a funkčne súčasne, čím dohromady vytvárajú vysoko komplexný systém pre kontrolu stonkového vetvenia. Zatiaľ čo teória kanalizácie auxínového transportu definuje dôležitý centrálny mechanizmus pre reguláciu aktivácie axilárnych pupeňov, teória sekundárnych poslov navrhuje kontrolu na ďalšej úrovni regulácie, ktorej cieľom je udržanie celého systému vo vyváženom a optimálne fungujúcom stave. Regulácia hladiny cytokinínov a strigolaktónov auxínom je považovaná za súčasť spätno-väzbovej odpovede s tým, že aktivita axilárnych pupeňov je kontrolovaná založením auxínového transportu von z pupeňa, pričom exportovaný auxín ďalej reguluje biosyntézu cytokinínov a strigolaktónov. Navyše je biosyntéza všetkých troch hormónov pod vlastnou negatívnou spätno-väzbovou kontrolou, vzhľadom na to, že u mutantných línií s narušenou signálnou dráhou dochádza k akumulácii daného hormónu (Ljung

et al., 2001; Foo *et al.*, 2005; Arite *et al.*, 2007; Umehara *et al.*, 2008; Hayward *et al.*, 2009).

3.5.8 Regulácia apikálnej dominancie na lokálnej úrovni

Okrem regulácie stonkového vetvenia na systémovej úrovni sprostredkovanej signálmi transportovanými na dlhé vzdialenosti, ako je auxín, cytokinín a strigolaktón, prispieva ku kontrole apikálnej dominancie a aktivácii pupeňa aj regulácia na úrovni lokálnej, priamo v axilárnom pupeni.

V súčasnej dobe je jediným dobre popísaným, pupeňovo špecifickým regulátorom gén *TEOSINTE BRANCHED 1 (TB1)*, ktorý bol pôvodne popísaný u kukurice (Doebly *et al.*, 1997). Následne boli identifikované jeho homológy u ďalších rastlinných druhov zahrňujúc arábovku (*Arabidopsis thaliana* L.) (*BRANCHED 1 (BRC1 a BRC2)*) (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007), hrach (*Pisum sativum* L.) (*PsBRC1*) (Braun *et al.*, 2012), sóju (*Glycine max* L.) (*SbTB1*) (Kebrom *et al.*, 2006), ryžu (*Oryza sativa* L.) (*FINE CULM 1/OsTB1 (FC1)*) (Takeda *et al.*, 2003) a rajčiak (*Solanum lycopersicum* L.) (*SLBRC1a a SLBRC1b*) (Martin-Trillo *et al.*, 2011). Tieto gény kódujú transkripčné faktory s TCP (TB1 CYCLOIDEA PCF) doménou. Expresia *TB1*, *BRC1*, *BRC2* a *FC1* génov je významne špecifická pre axilárne meristémy a pupene, na základe čoho je predpokladané, že majú priamu regulačnú úlohu v regulácii aktivácie pupeňov (Doebly *et al.*, 1997; Takeda *et al.*, 2003; Kebrom *et al.*, 2006; Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). V súlade s týmto vedie strata funkcie génov *TB1*, *BRC1*, *BRC2* a *FC1* k vyrastaniu axilárnych pupeňov a vetveniu, zatiaľ čo zvýšená expresia spôsobuje inhibíciu tvorby laterálnych výhonov. Toto ukazuje na negatívnu koreláciu medzi aktivitou pupeňov a expresiou génov *TB1*, *BRC1* alebo *BRC2*, a tiež na nevyhnutnosť expresie týchto génov pre inhibíciu vyrastania pupeňov (Doebly *et al.*, 1997; Hubbard *et al.*, 2002; Takeda *et al.*, 2003; Kebrom *et al.*, 2006; Aguilar-Martínez *et al.*, 2007; Minakuchi *et al.*, 2010).

Zároveň je gén *BRC1* považovaný za hlavný integrátor endogénnych a environmentálnych signálov zapojených do regulácie stonkového vetvenia. V axilárnych pupeňoch hrachu (*Pisum sativum* L.) je hladina transkriptu *PsBRC1* zvyšovaná strigolaktónmi a znižovaná cytokinínmi (Braun *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2014). Expresia *PsBRC1* je pritom strigolaktónmi zvyšovaná bez akejkoľvek *de novo* syntézy proteínov, na základe čoho je predpokladané, že *PsBRC1* je primárnym génom

v strigolaktónovej odpovedi (Dun *et al.*, 2012). Hladina transkriptu *BRC1* je ďalej redukovaná v *max* mutantných rastlinách arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), a tiež po odstránení apikálneho vrcholu stonky dekapitáciou. Naopak, množstvo transkriptu sa zvyšuje v prípade, že rastliny rastú v porastoch s vysokou hustotou rastlín na jednotku plochy alebo v podmienkach s nízkym pomerom R:FR červeného svetla, čo vedie k inhibícii stonkového vetvenia (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007; Gonzalez-Grandio *et al.*, 2013). Rastliny arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) mutantné súčasne v génoch *BRC1* a *MAX* nemajú zvýšený stupeň vetvenia v porovnaní s jednoduchými mutantnými rastlinami (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007), a exogénnou aplikáciou strigolaktónu nie je možné vetvenie u *brc1* a *fc1* mutantných rastlín potlačiť (Brewer *et al.*, 2009; Minakuchi *et al.*, 2010). *BRC1* sa tak stáva súčasťou modelu sekundárnych poslov, v rámci ktorého je predpokladaná jeho funkcia v súlade a nadväznosti s funkciou strigolaktónu v lineárnej signálnej dráhe.

4 MATERIÁL A METÓDY

4.1 Stanovenie génovej expresie v axilárnych pupeňoch

4.1.1 Rastlinný materiál a kultivačné podmienky

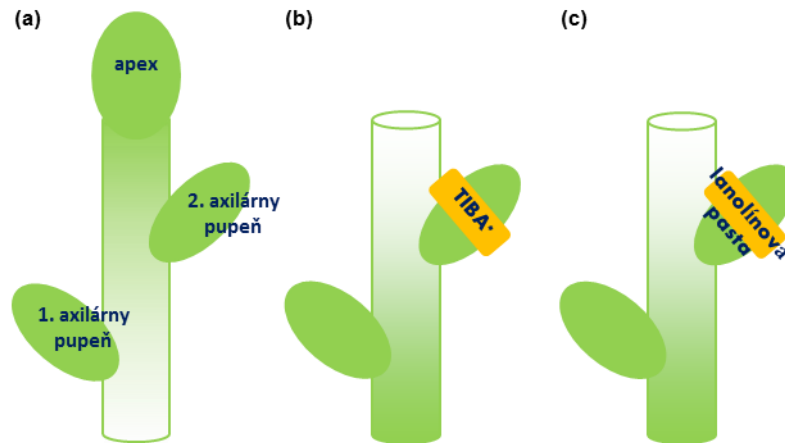
Pre časť experimentov boli použité rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan (Semo a.s., Smržice). Semená najprv namočené počas 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli vysiate do perlitu, v ktorom 3 až 4 dni klíčili. Po klíčení boli rastliny presadené do kultivačných nádob s perlitom a Richterovým živným roztokom, v ktorých boli pestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Za účelom získania rastlín s predĺženými internódiami pre experimentálny variant, v ktorom bol sledovaný vplyv dĺžky dekapitovanej stonky na rýchlosť zmien v génovej expresii, boli rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) najprv 7 dní kultivované v zatemnených podmienkach v prostredí klimaboxu a následne za účelom deetiolozácie 3 dni pri teplote 20 °C, intenzite svetla 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a fotoperióde 16/8 hod (deň/noc).

Ďalší typ experimentov bol vykonaný na mutantných rastlinách *rms1* a *rms2* na pozadí štandardného typu hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Parvus (Imperial College London). Semená najprv namočené počas 12 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli následne vysiate a pestované v kultivačných nádobách v zmesi rašelina : vermikulit (3 : 1). Kultivácia rastlín prebiehala v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

4.1.2 Ošetrovanie rastlín inhibítormi a hormónmi

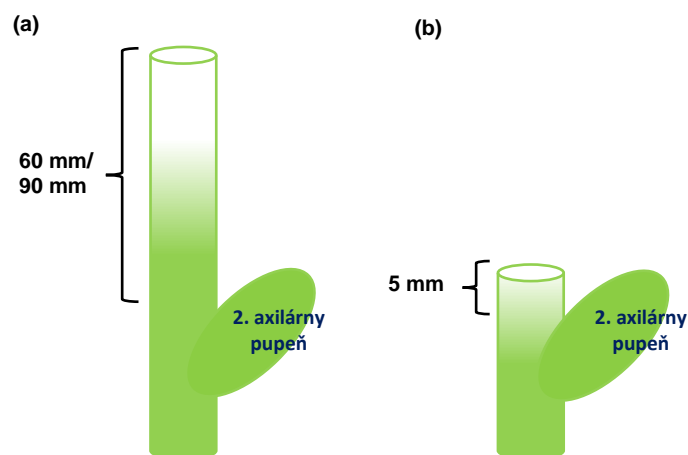
Kompetícia medzi dvomi axilárnymi pupeňmi bola sledovaná na základe stanovenia expresie vybraných génov v axilárnych pupeňoch 7-dňových (počítané od výsevu) dekapitovaných rastlín. Na druhý axilárny pupeň (axilárny pupeň v rámci apikálno-bazálnej osi stonky rastliny bližšie k apexu stonky, obr. 8a) bola v závislosti od experimentálneho variantu aplikovaná lanolínová pasta buď s 1 % kyseliny 1-N-naftylftalámovej (NPA, Sigma-Aldrich), 1 % kyseliny 2,3,5-trijódbenzoovej (TIBA, Sigma-Aldrich), 1 % brefeldínom A (BFA, Sigma-Aldrich) alebo 1 % cykloheximidom (CHX, Sigma-Aldrich) (obr. 8b) alebo čistá lanolínová pasta ako kontrolný variant (obr. 8c). Aplikácia inhibítorov na druhý pupeň bola vykonaná 4 hodiny pred dekapitáciou

rastliny, pričom prvý axilárny pupeň (axilárny pupeň v rámci apikálno-bazálnej osi stonky rastliny bližšie k báze stonky, obr. 8a) ošetrený nebol. Následne boli odoberané prvé neošetrené axilárne pupene a ošetrené druhé axilárne pupene v časových intervaloch 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodín po dekapitácii.



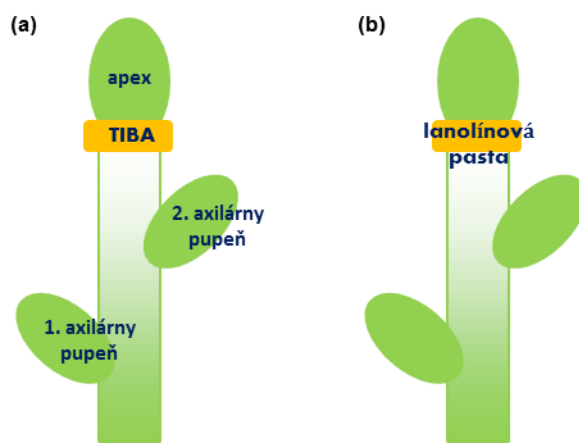
Obr. 8: Schéma experimentu: intaktná neošetrená rastlina s prvým a druhým axilárnym pupeňom (a), dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným axilárnym pupeňom a s druhým axilárnym pupeňom ošetreným lanolínovou pastou s 1 % TIBA. Hviezdička indikuje aplikáciu lanolínovej pasty s 1 % NPA, 1 % BFA alebo 1 % CHX na druhý pupeň pre ďalšie experimentálne varianty (b), dekapitovaná rastlina s neošetreným prvým pupeňom a druhým pupeňom ošetreným čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (c).

Pre sledovanie vplyvu dĺžky dekapitovanej stonky na expresiu vybraných génov v axilárnych pupeňoch boli použité 10-dňové (počítané od výsevu) deetiolované rastliny. Deetiolované rastliny boli v závislosti od experimentálneho variantu dekapitované buď 60 mm, 90 mm (obr. 9a) alebo tesne (5 mm) nad druhým axilárnym pupeňom (obr. 9b). Pre stanovenie expresie vybraných génov boli odoberané druhé axilárne pupene v časových intervaloch 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodín po dekapitácii.



Obr. 9: Schéma experimentu: deetiolované rastliny dekapitované 60 mm/90 mm nad druhým axilárnym pupeňom (a) a deetiolované rastliny hrachu dekapitované 5 mm nad druhým axilárnym pupeňom (b).

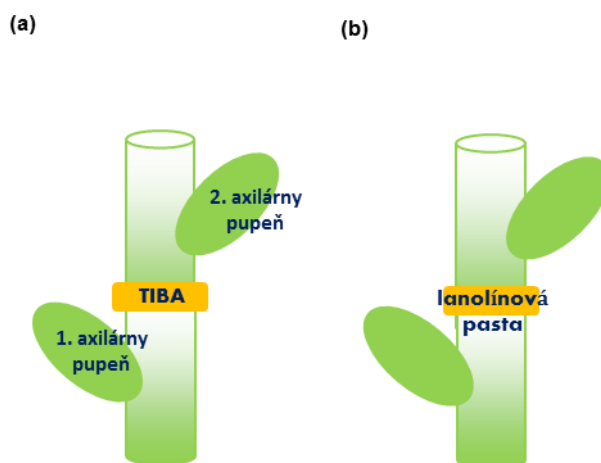
Pre sledovanie dôležitosti polárneho toku auxínu v hlavnej stonke v inhibícii vyrastania axilárnych pupeňov bola expresia vybraných génov sledovaná v prvom a druhom axilárnom pupeňi 7-dňových (počítané od výsevu) intaktných rastlín. Rastliny boli ošetrené pod apexom stonky prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (Sigma-Aldrich) (obr. 10a) alebo čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (obr. 10b). Axilárne pupene boli odoberané v časových intervaloch 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodín po aplikácii TIBA-lanolínovej pasty.



Obr. 10: Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.

Podobne bol vplyv prerušenia auxínového toku v hlavnej stonke na vyrastanie axilárnych pupeňov sledovaný aj na 7-dňových (počítané od výsevu) dekapitovaných

rastlinách ošetrených prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (Sigma-Aldrich) na stonke medzi dvomi axilárnymi pupeňmi (obr. 11a), pričom aplikácia TIBA-lanolínovej pasty bola vykonaná 4 hodiny pred dekapitáciou rastliny. U rastlín pre kontrolný variant bol aplikovaný prstenec lanolínovej pasty bez pridania inhibítora transportu auxínu TIBA (obr. 11b). Prvé a druhé axilárne pupene boli odoberané v časových intervaloch 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodín po aplikácii TIBA-lanolínovej pasty a dekapitácii.

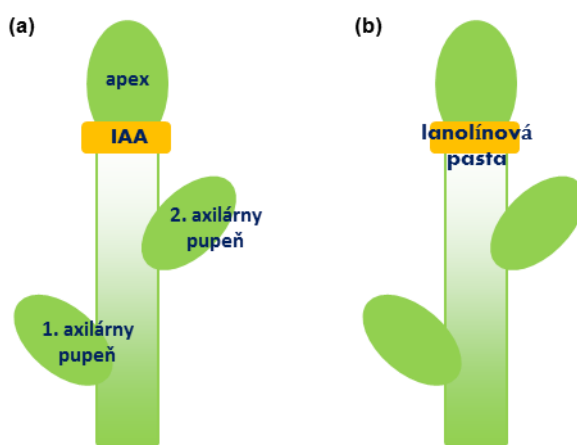


Obr. 11: Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom.

Pre každú vzorku jedného biologického opakovania jednotlivých, vyššie uvedených, experimentálnych variantov boli odoberané axilárne pupene z 30 rastlín, pričom analyzované boli dve biologické opakovania v technických duplikátoch. Odobrané pupene v mikroskúmavkách zo všetkých experimentálnych variantov boli ihneď po odobraní zmrazené v tekutom dusíku a následne uložené do hlbokomraziaceho boxu pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Vplyv hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte na vyrastanie resp. na dormantný stav axilárnych pupeňov bol sledovaný prostredníctvom stanovenej expresie vybraných génov v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných mutantných rastlín *rms1* a *rms2*, ošetrených prstencom lanolínovej pasty s 1 % kyseliny indolyl-3-octovej (IAA, Sigma-Aldrich) pod apexom stonky (obr. 12a). Rovnakým spôsobom ako mutantné rastliny boli prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA pod apexom stonky ošetrené aj intaktné rastliny štandardného typu. Ako kontrolný variant boli použité intaktné rastliny štandardného typu a mutantné rastliny *rms1* a *rms2*, u ktorých bol pod apex stonky aplikovaný prstenec lanolínovej pasty bez pridania IAA (obr. 12b).

Axilárne pupene boli odoberané v časových intervaloch 0 a 6 hodín po ošetrení rastlín IAA-lanolínovou pastou. Pre každú vzorku jedného biologického opakovania jednotlivých experimentálnych variantov boli odoberané axilárne pupene z 30 rastlín, pričom analyzované boli dve biologické opakovania v technických duplikátoch. Odobrané pupene v mikroskúmavkách zo všetkých experimentálnych variantov boli ihneď po odobraní zmrazené v tekutom dusíku a následne uložené do hlbokomraziaceho boxu pri teplote $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.



Obr. 12: Schéma experimentu: intaktná rastlina štandardného typu a mutantných rastlín *rms1* a *rms2* ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.

4.1.2 Izolácia RNA, reverzná transkripcia, real-time PCR

Izolácia RNA z axilárnych pupenov hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odrody Vladan bola vykonaná podľa návodu k produktu RNAeasy Plant Mini Kit (Qiagen) za použitia originálnych roztokov. Princíp izolácie RNA pomocou centrifugačných RNA väzbových kolóniek je založený na kombinácii väzbových vlastností silikónovej membrány, centrifugácii s premývacím roztokom a vyviazaním RNA elučným roztokom alebo vodou. Následné použitie endonukleázy DNázy I zabezpečuje odstránenie DNA z RNA vzorky, čím sa zvýši jej čistota.

RNA z axilárnych pupenov mutantných rastlín *rms1* a *rms2* na pozadí štandardného typu hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Parvus bola izolovaná v rámci účasti na zahraničnej stáži na Imperial College London v Spojenom kráľovstve za použitia TRIzolovej reagentie (TRI Reagent[®], Sigma-Aldrich) podľa protokolu, ktorý napísal Rio *et al.* (2010). TRIzol je jednofázový roztok fenolu a guanidín

izotiokyanátu, ktorý súčasne rozpúšťa biologický materiál a denaturuje proteíny. Následné pridanie chloroformu vedie k separácii jednotlivých fáz, počas ktorej sú proteíny extrahované v organickej fáze, DNA v interfáze a RNA zostáva vo vodnej fáze.

Výtťažnosť izolovanej RNA bola vďaka schopnosti špecifickej absorpcie UV žiarenia nukleovými kyselinami stanovená meraním absorpcie jednotlivých vzoriek pomocou spektrofotometru picodrop (PICO100, East Port) pri vlnovej dĺžke 260 nm.

Integrita RNA bola overená prostredníctvom agarózovej elektroforetickej separácie. Na základe použitia interkalačného farbiva etídium bromidu (Sigma-Aldrich) boli rozdelené fragmenty vizualizované v prostredí UV žiarenia ako dva celistvé pruhy tvorené 28S RNA a 18S RNA. Následne bola izolovaná celková RNA prepísaná na cDNA (komplementárna DNA) v procese reverznej transkripcie, katalyzovanom enzýmom RNA-dependentnou-DNA-polymerázou z M-MLV (Moloney Murine Leukemia Virus) vírusu za použitia kitu SuperScript® III Reverse Transcriptase (RT) (Invitrogen). Reakčná zmes pre reverznú transkripciu bola pripravená pipetovaním objemov jednotlivých komponentov (tab. 2) do mikroskúmaviek.

Tab. 2: Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.

chemická látka	objem [μ l]
1. krok reverznej transkripcie	
H ₂ O	-
0,5 μ g templátová RNA	-
10 mM mix deoxyribonukletidov (dNTP mix)	2
50 μ M oligo (dT) ₂₀ primer	2
2. krok reverznej transkripcie	
5x pufer	8
0,1M DTT (dithiothreitol)	4
reverzná transkriptáza SuperScript® III RT	0,5
celkový objem	40 μl

Pre reverznú transkripciu bolo použitých vždy 0,5 µg RNA z každej vzorky, pričom výsledný objem templátovej RNA bol vypočítaný na základe koncentrácie RNA stanovenej v elučnom roztoku. Objem vody bol rovnako vypočítaný pre každú vzorku zvlášť, tak aby výsledný objem reakčnej zmesi tvoril 40 µl. Počas 1. kroku reverznej transkripcie bola pripravená reakčná zmes z reagensí (SuperScript® III Reverse Transcriptase, Invitrogen) uvedených v tab. 2 inkubovaná pri teplote 72 °C v termocykléri (Techne Progene FPROG02D) 10 minút, v priebehu ktorých dochádzalo k denaturácii sekundárnej štruktúry RNA. Týmto bola umožnená efektívnejšia reverzná transkripcia. Po ukončení inkubácie boli vzorky vychladené v drvenom ľade, k reakčnej zmesi boli pridané ďalšie komponenty (SuperScript® III Reverse Transcriptase, Invitrogen) uvedené v tab. 2 (2. krok reverznej transkripcie) a následne prebiehala v prostredí termocykléru vlastná reverzná transkripcia pri teplote 42 °C počas 50 minút. Po ukončení procesu bola získaná cDNA uložená do mrazničky pri -20 °C.

Pre vlastnú real-time PCR reakciu bola ako templát použitá cDNA z predchádzajúceho kroku reverznej transkripcie v objeme 0,5 µl z každej vzorky. K cDNA bola pipetovaním pridaná reakčná zmes pripravená za použitia kitu LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche) podľa tab. 3.

Tab. 3: Zloženie reakčnej zmesi pre real-time PCR.

chemická látka	objem [µl]
H ₂ O	1,4
Forward (F) primer	0,8
Reverse (R) primer	0,8
SYBR Green I Master	5,0
cDNA	2,0
celkový objem	10 µl

Amplifikácia cieľových sekvencií cDNA pomocou špecifických primerov (tab. 4) prebiehala v prostredí termocykléru (C1000 Touch™/CFX96™, Bio-rad) v daných teplotných režimoch (tab. 5).

Tab. 4: Sekvencie použitých špecifických primerov pre vybrané gény.

<i>Psβ-Tubulin-F</i>	5'-GCTCCCAGCAGTACAGGACTCT-3'
<i>Psβ-Tubulin-R</i>	5'-TGGCATCCCACATTTGTTGA-3'
<i>PsActin-F</i>	5'-TGTCAGCCACACTGTCCCTATC-3'
<i>PsActin-R</i>	5'-CAAGACGAAGGATGGCATGT-3'
<i>PsEF1α-F</i>	5'-CTGTCATGGATGCACCT -3'
<i>PsEF1α-R</i>	5'-TCCTTAGAGATAACCGGCT T -3'
<i>PsDRM1-F</i>	5'-AACTCACCACCACCCTCAAAGATG -3'
<i>PsDRM1-R</i>	5'-GATGTAGACACGTGGCAGAAGATG-3'
<i>PsBRC1-F</i>	5'-AGGCAAGAGAAAGAGCAAGG-3'
<i>PsBRC1-R</i>	5'-TTGCATTGCTTTGAGTTTGA-3'
<i>PsAUX1-F</i>	5'-GGGTTTGGGTTTGGAGGATGGGC-3'
<i>PsAUX1-R</i>	5'-TGGTGGTGGAGGCTTGCATTGG-3'
<i>PsPIN1-F</i>	5'-CTGCGTCCGACAATATAGAT-3'
<i>PsPIN1-R</i>	5'-AGTTATGCCACCAGCTAG-3'
<i>PsCDC2-F</i>	5'-ATCTAGTATGCTTCGCTTG -3'
<i>PsCDC2-R</i>	5'-TTTGAAGAAAATAGCACGGAT-3'
<i>PsYUC1-F</i>	5'-ATGGTGCAAAATTTATGGAT -3'
<i>PsYUC1-R</i>	5'-TCACTTCCCTTAAGCCAAC-3'

Real-time PCR bola vyhodnotená prostredníctvom softwaru pre C1000 Touch™/CFX96™ (Bio-rad), pričom relatívna expresia sledovaných génov bola normalizovaná pomocou normalizačného faktoru vypočítaného z expresie konštitutívnych génov *Psβ-Tubulin*, *PsActin* a *PsEF1α* za použitia programu geNorm (Microsoft Excel, 2002). Analyzované boli vzorky z dvoch biologických opakovaní v technických duplikátoch. Smerodajná odchýlka bola determinovaná z jednotlivých opakovaní každého variantu. Štatisticky významné rozdiely medzi jednotlivými

variantmi boli identifikované prostredníctvom Študentovho t-testu ($\alpha=0,05^*$ a $\alpha=0,01^{**}$) (Microsoft Excel, 2010).

Tab. 5: Reakčné podmienky real-time PCR reakcie.

krok real-time PCR reakcie	počet cyklov	teplota [°C]	čas [s]
počiatočná denaturácia	1	95 °C	600
denaturácia	35	95 °C	15
nasadenie primerov <i>Psβ-Tubulin, PsActin,</i> <i>PsEF1α, PsDRM1, PsAUX1,</i> <i>PsYUC1</i> <i>PsPIN1, PsCDC2</i> <i>PsBRC1</i>	35	58 °C 58 °C 58 °C 55 °C 62 °C	15
elongácia	40	72 °C	15
záverečná elongácia	1	72 °C	30
meltingová analýza	-	70 - 93 °C	1 s na každých 0,2 °C

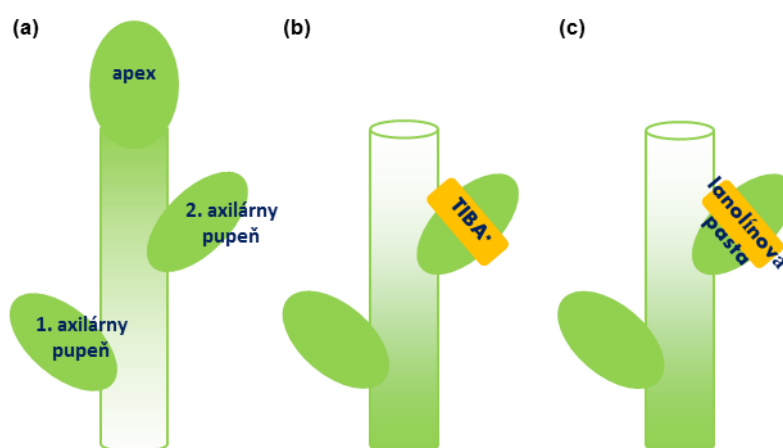
4.1.3 Imunolokalizácia PIN1 proteínov

Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrovanie inhibítormi a hormónmi

Pre imunohistochemickú analýzu PIN1 proteínov boli použité rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan (Semo a.s., Smržice). Semená hrachu najprv namočené počas 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli následne vysiate do perlitu, v ktorom 3 až 4 dni klíčili. Po klíčení boli rastliny presadené do kultivačných nádob s perlitom a Richterovým živným roztokom, v ktorých boli pestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

V rámci pozorovania kompetície medzi dvomi axilárnymi pupeňmi, bola analyzovaná lokalizácia PIN1 proteínov v prvom a druhom axilárnom pupeni 7-dňových (počítané od výsevu) dekapitovaných rastlín a v druhom axilárnom pupeni

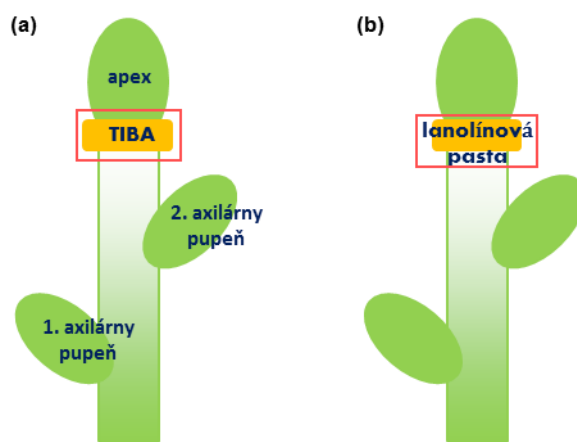
ošetrenom v závislosti od experimentálneho variantu lanolínovou pastou buď s 1 % NPA (Sigma-Aldrich), 1 % TIBA (Sigma-Aldrich), 1 % BFA (Sigma-Aldrich) alebo 1 % CHX (Sigma-Aldrich) (obr. 13b). Pre kontrolný variant bola na druhý pupeň aplikovaná čistá lanolínová pasta (obr. 13c). Aplikácia inhibítorov na druhý pupeň bola vykonaná 4 hodiny pred dekapitáciou rastliny, pričom prvý axilárny pupeň ošetrený nebol. Axilárne pupene boli odoberané v časových intervaloch 6, 12 a 24 hodín po dekapitácii rastliny.



Obr. 13: Schéma experimentu: intaktná neošetrená rastlina s prvým a druhým axilárnym pupeňom (a), dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným pupeňom a s druhým pupeňom ošetreným lanolínovou pastou s 1 % TIBA. Hviezdička indikuje aplikáciu lanolínovej pasty s 1 % NPA, 1 % BFA alebo 1 % CHX na druhý pupeň pre ďalšie experimentálne varianty (b). Dekapitovaná rastlina s neošetreným prvým pupeňom a druhým pupeňom ošetreným čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (c).

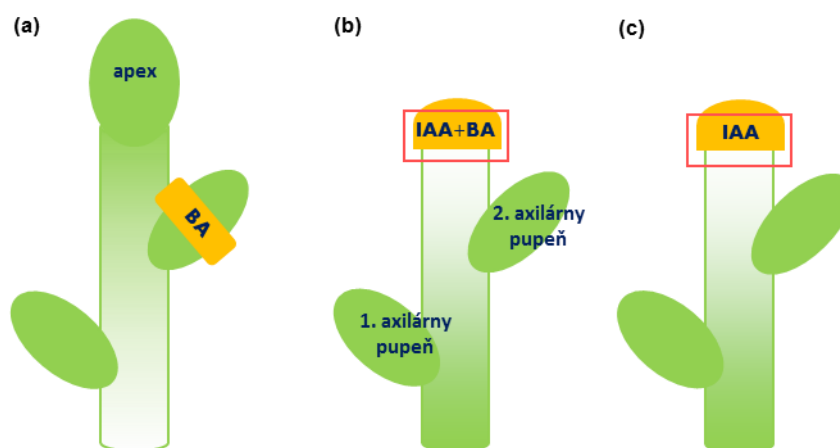
Pre sledovanie vplyvu prerušenia polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke na lokalizáciu PIN1 proteínov boli dopestované intaktné 7-dňové (počítané od výsevu) rastliny ošetrené prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (Sigma-Aldrich) na hlavnú stonku medzi apexom a druhým axilárnym pupeňom (obr. 14a). Lokalizácia PIN1 proteínov bola pozorovaná v prvom a druhom axilárnom pupeni takto ošetrených rastlín a v odobraných 5 mm dlhých segmentoch stonky z miesta, kde bola aplikovaná TIBA (obr. 14a). Axilárne pupene a segmenty stonky boli z ošetrených rastlín odoberané v časovom intervale 24 hodín po aplikácii TIBA-lanolínovej pasty. Pre kontrolný variant bola lokalizácia PIN1 proteínov pozorovaná v zodpovedajúcich stonkových

segmentoch alebo axilárnych pupeňoch odobraných z rastlín ošetrených prstencom čistej lanolínovej pasty pod apexom stonky (obr. 14b).



Obr. 14: Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky. Červene ohraničená oblasť označuje miesto odberu stonkového segmentu.

Vplyv cytokinínu na rýchlosť zmien v lokalizácii PIN1 proteínov bol sledovaný v druhom axilárnom pupeni 7-dňových (počítané od výsevu) intaktných rastlín, ošetrenom lanolínovou pastou s 1 % cytokinínu benzyladenínu (BA, Sigma-Aldrich) (obr. 15a). Pre kontrolný variant bola na druhý pupeň aplikovaná čistá lanolínová pasta. Pupene pre analýzu boli odoberané v časových intervaloch 1, 2, 3, 4, 5 a 6 hodín po aplikácii BA. Efekt exogénne pridaného cytokinínu (BA) k auxínu (IAA) na formovanie PIN1 auxínových kanálov bol sledovaný v stonkových segmentoch dekapitovaných rastlín, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky namiesto odstráneného apexu aplikovaná lanolínová pasta s 0,5 % IAA (Sigma-Aldrich) a 0,5 % BA (Sigma-Aldrich). Z ošetrených rastlín boli odoberané 5 mm dlhé segmenty dekapitovanej stonky z miesta aplikácie hormónov (obr. 15b). Ako kontrolný variant boli v tomto experimentálnom usporiadaní použité 5 mm segmenty stonky z rastlín ošetrených 0,5 % IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanej stonke (obr. 15c). Stonkové segmenty boli odoberané v časových intervaloch 96 a 120 hodín po dekapitácii a aplikácii hormónov.



Obr. 15: Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená BA-lanolínovou pastou na druhom axilárnom pupeni (a). Dekapitovaná rastlina ošetrená IAA+BA-lanolínovou pastou (b) alebo IAA-lanolínovou pastou (c) na reznú plochu dekapitovanej stonky namiesto apexu. Červene ohraničená oblasť označuje miesto odberu stonkového segmentu.

Fixácia vzoriek

Všetky odobrané vzorky axilárnych pupenov a stonkových segmentov určených pre imunohistochemickú analýzu boli ihneď po odobraní zafixované pomocou fixačnej zmesi metanol : kyselina octová v pomere 3 : 1 a skladované počas 12-24 hodín pri teplote $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. Následne boli vzorky s cieľom odstránenia fixačnej zmesi 3-krát premyté vždy počas 15 minút v PBS pufré (tab. 6) s hodnotou pH 7,4.

Tab. 6: Zloženie PBS pufru.

chemická látka	hmotnosť [g]
KH_2PO_4	0,21
NaCl	9,0
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$	1,0
doplnenie ultračistou H_2O na celkový objem 1 000 ml úprava pH na hodnotu 7,4	

Odvodnenie a zalievanie vzoriek do parafínu

Následne boli vzorky po vymytí fixačnej zmesi postupne dehydrované v etanolovom rade 10/30/50/70/90 % vždy počas 15 minút, 2-krát počas 45 minút v 96 % etanole a 2-

krát počas 45 minút v 100 % etanole. Po dehydratácii boli vzorky infiltrované xylénom v roztokoch etanolu a xylénu v nasledujúcich pomeroch:

- etanol : xylén 3 : 1 počas 60 minút
- etanol : xylén 1 : 1 počas 60 minút
- etanol : xylén 1 : 3 počas 60 minút
- 100 % xylén počas 60 minút
- 100 % xylén počas 12 hodín

K vzorkám axilárnych pupeňov a stonkových segmentov v xyléne bol ďalej postupne pridávaný parafín Paraplast Plus (Leica Biosystems) s teplotou topenia 56 °C. Vzorky v roztoku parafínu a xylénu boli najprv ponechané 12 hodín pri laboratórnej teplote. Po tejto dobe bol znovu pridaný parafín a roztok bol inkubovaný 12 hodín pri 42 °C a 4 hodiny pri 58 °C. Následne bol roztok xylénu s parafínom postupne odstraňovaný a nahradzovaný čistým parafínom pri teplote 58 °C, až boli vzorky úplne prevedené do čistého parafínu. Nakoniec boli jednotlivé vzorky pupeňov a stonkových segmentov zaliate čistým parafínom do bločkov, ktoré boli rýchlo schladené na ľade a skladované pri -20 °C.

Príprava mikroskopických preparátov

Pripravené parafínové bločky s jednotlivými axilárnymi pupeňmi a stonkovými segmentami boli narezané na rotačnom mikrotóme (RM2125 RTS, Leica Biosystems) na rezy tenké 12 µm. Rezy axilárnych pupeňov a stonkových segmentov boli následne žehlené vo vodnom kúpeli pri teplote 42 °C a prenesené na podložné sklá s pozitívnym nábojom (Super Frost Plus, Menzel-Gläser). Narezané vzorky na podložných sklách boli následne temperované 2 až 3 hodiny pri 42 °C.

Deparafinácia a rehydratácia vzoriek

Narezané vzorky na podložných sklách boli inkubované 20 minút v prostredí 100 % xylénu, ďalej 10 minút v roztoku xylén : etanol 1 : 1 a nakoniec 10 minút v prostredí 100 % etanolu. Vysušené podložné sklá so vzorkami boli potom umiestnené počas 30 minút pri teplote -20 °C. Vzorky boli následne rehydrované v etanolovom rade 10/30/50/70/90 % vždy počas 10 minút a nakoniec premývané 10 minút v 1x PBS pufre.

Blokovanie a inkubácia s primárnou protilátkou

Na každé podložné sklo s narezanými vzorkami bolo pridaných 500 µl blokovacieho roztoku zloženého z 1xPSB pufru a 3 % bovínneho sérového albumínu (BSA; Sigma-Aldrich). Blokovanie prebiehalo 1 hodinu pri laboratórnej teplote. Po odstránení blokovacieho roztoku bolo na každé podložné sklo pridaných 100 µl primárnej protilátky (anti-PIN1, riedenie 1 : 200 v blokovacom roztoku). Následne boli podložné sklá prikryté parafilmom M (Sigma-Aldrich) z dôvodu zabránenia vysušenia vzoriek a inkubované v zatemnenom prostredí s vysokou vzdušnou vlhkosťou (90-100 %) počas 12 hodín pri laboratórnej teplote. Po odstránení protilátky boli podložné sklá 3-krát premyté v 1xPBS puFRE s 0,2 % Tween-20 (Sigma-Aldrich) vždy počas 10 minút.

Blokovanie a inkubácia so sekundárnou protilátkou

Na každé podložné sklo bolo opäť pridaných 500 µl blokovacieho roztoku (1xPBS pufer + 3 % BSA) a následne boli vzorky inkubované pri laboratórnej teplote počas 30 minút. Po odstránení blokovacieho roztoku bolo na každé podložné sklo pridaných 100 µl sekundárnej protilátky konjugovanej s fluorescenčným farbivom (polyklonálny Cy3-antirabbit, Sigma-Aldrich, riedenie 1 : 200 v blokovacom roztoku). Podložné sklá boli zakryté parafilmom M a inkubované v zatemnenom prostredí s vysokou vzdušnou vlhkosťou (90-100 %) 4 hodiny pri teplote 37 °C. Následne boli sklá so vzorkami 3-krát premyté v roztoku 1xPBS s 0,2 % Tween-20 (Sigma-Aldrich) vždy počas 10 minút. Nakoniec boli podložné sklá inkubované ešte 10 minút v 1xPBS.

Finálna úprava preparátov a mikroskopické pozorovanie objektov

Vzorky na podložných sklách boli nakoniec zaliate zalievacím médiom (Citifluor, AgarScientific) a prikryté kryciami sklami. Pripravené preparáty boli pozorované prostredníctvom konfokálneho laserového mikroskopu BX 60 LSM Fluoview 200 (Olympus). Použitý bol argónový laser vlnovej dĺžky 568 nm, bariérový filter BA 585 IF a objektív UPlanFI 20x/0,5, pričom sledované objekty boli nasnímané za použitia Fluoview 5.0 softwaru.

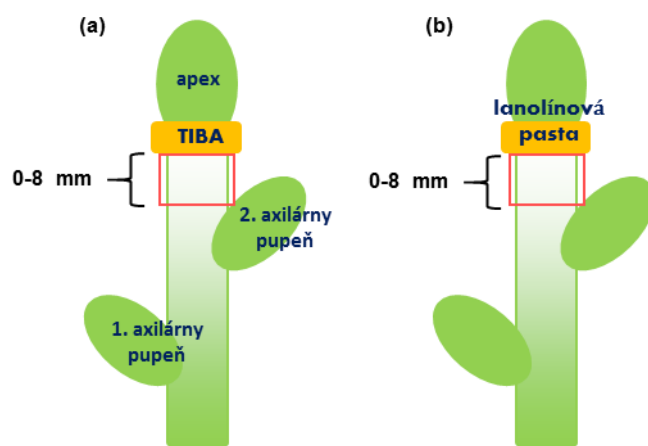
4.1.4 Analýza transportu auxínu [³H] značenou IAA

Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrovanie hormónmi a analýza exportu IAA

Pre analýzu transportu auxínu boli použité rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan (Semo a.s., Smržice). Semená najprv namočené počas 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli následne vysiate do perlitu, v ktorom 3 až 4 dni klíčili. Po klíčení boli rastliny presadené do kultivačných nádob s perlitom a Richterovým živným roztokom, v ktorých boli pestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 μmol.m⁻².s⁻¹.

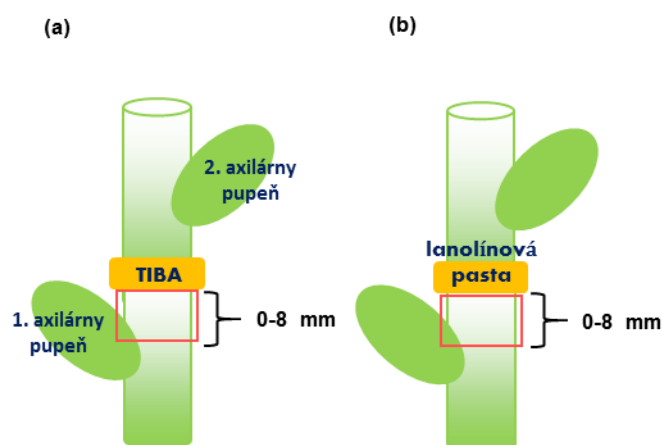
Pre hodnotenie auxínového exportu bol v závislosti od experimentálneho variantu použitý roztok buď 0,5 μl alebo 1 μl [5-³H]-indolyl-3-octovej kyseliny (American Radiolabeled Chemicals, 925 Gbq.mmol⁻¹, 6666 Bq. μl⁻¹) v 50 % etanole. Pre každý experimentálny variant boli z 10 rastlín odobrané stonkové segmenty, ktoré boli následne inkubované počas 12 hodín v kvapalnom dioxínovom scintilačnom roztoku. Aktivita [³H] v stonkových segmentoch bola meraná za použitia scintilačného spektrofotometru Packard TRI/Carb 2000 (Packard).

Pre analýzu exportu auxínu z apexu stonky boli 7-dňové (počítané od výsevu) intaktné rastliny subapikálne ošetrované prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (Sigma-Aldrich) (obr. 16a) alebo čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (obr. 16b). 24 hodín po aplikácii TIBA-lanolínovej pasty alebo čistej lanolínovej pasty bol na špičku apexu aplikovaný 1 μl [³H]-IAA a po ďalších 2 hodinách boli odoberané 4 mm dlhé stonkové segmenty so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm od miesta ošetrovaného TIBA-lanolínovou pastou alebo čistou lanolínovou pastou (obr. 16).



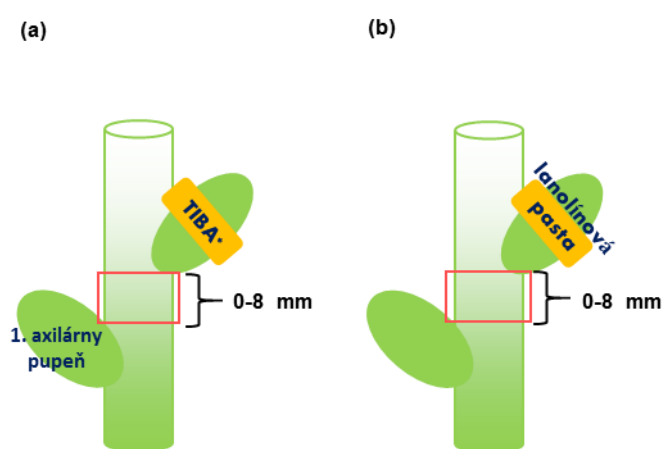
Obr. 16: Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky. Červene ohraničená oblasť označuje miesto odberu stonkových segmentov.

Analýza exportu auxínu z vyrastajúceho pupeňa a jeho následného transportu v hlavnej stonke bola vykonaná na 7-dní (počítané od výsevu) starých dekapitovaných rastlinách ošetrených prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (Sigma-Aldrich) (obr. 17a) medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom, pričom aplikácia TIBA-lanolínovej pasty bola vykonaná 4 hodiny pred dekapitáciou rastliny. Pre kontrolný variant bol na rastliny medzi prvý a druhý axilárny pupeň aplikovaný prstenec čistej lanolínovej pasty (obr. 17b). Po 3 dňoch od ošetrenia bol na vyrastajúci druhý axilárny pupeň resp. na formujúci sa laterálny výhon aplikovaný 1 μl [^3H]-IAA a po ďalších 2 hodinách boli odoberané 4 mm dlhé stonkové segmenty zo vzdialenosti 0-4 a 4-8 mm od miesta aplikácie TIBA-lanolínovej pasty (obr. 17).



Obr. 17: Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom. Červene ohraničená oblasť označuje miesto odberu stonkových segmentov.

Export auxínu z druhého axilárneho pupeňa bol stanovený na 7-dňových (počítané od výsevu) dekapitovaných rastlinách, ktoré mali druhý pupeň ošetrený lanolínovou pastou buď s 1 % NPA (Sigma-Aldrich), 1 % TIBA (Sigma-Aldrich), 1 % BFA (Sigma-Aldrich) alebo 1 % CHX (Sigma-Aldrich) (obr. 18a), pričom aplikácia lanolínovej pasty s inhibítormi bola vykonaná 4 hodiny pred dekapitáciou rastliny. Pre kontrolný variant bol druhý axilárny pupeň ošetrený čistou lanolínou pastou (obr. 18b). 6 hodín po dekapitácii bolo na druhý ošetrený pupeň aplikovaných 0,5 μl [^3H]-IAA a po ďalších 2 hodinách boli z internódia odobrané 4 mm dlhé stonkové segmenty zo vzdialenosti 0-4 mm a 4-8 mm od druhého pupeňa (obr. 18).



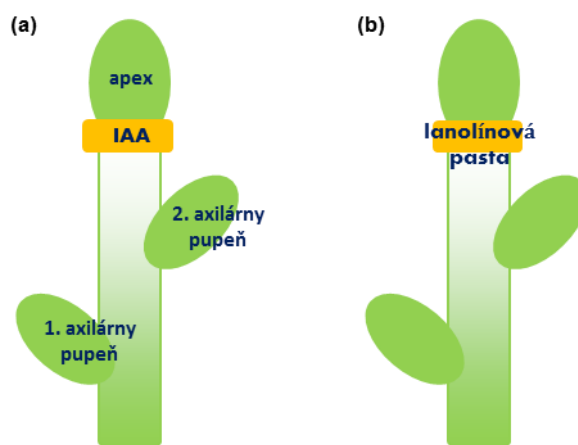
Obr. 18: Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným axilárnym pupeňom a s druhým axilárnym pupeňom ošetreným lanolínovou pastou s 1 % TIBA. Hviezdička indikuje aplikáciu lanolínovej pasty s 1 % NPA, 1 % BFA alebo 1 % CHX na druhý pupeň pre ďalšie experimentálne varianty (a). Kontrolný variant s druhým pupeňom ošetreným čistou lanolínovou pastou (b). Červene ohraničená oblasť označuje miesto odberu stonkových segmentov.

4.1.5 Analýza hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte

Rastlinný materiál, kultivačné podmienky, ošetrovanie hormónmi

Pre stanovenie hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte (X-CK) boli dopestované rastliny zo semien hrachu (*Pisum sativum* L.) namočených najprv počas 12 hodín vo vode pri laboratórnej teplote, následne vysiatych a pestovaných v kultivačných nádobách v zmesi rašelina : vermikulit (3 : 1). Kultivácia rastlín prebiehala v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Pre analýzu použité intaktné mutantné rastliny hrachu *rms1* a *rms2* na pozadí štandardného typu hrachu siateho (*Pisum sativum* L.)

odroda Parvus (Imperial College London) boli ošetrené prstencom 1 % IAA-lanolínovej pasty pod apexom stonky (obr. 19a). Rovnakým spôsobom ako mutantné rastliny boli prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA pod apexom stonky ošetrené aj intaktné rastliny štandardného typu. Ako kontrolný variant boli použité intaktné rastliny štandardného typu a mutantné rastliny *rms1* a *rms2*, u ktorých bol aplikovaný prstenec lanolínovej pasty bez pridania IAA (obr. 19b).



Obr. 19: Schéma experimentu: intaktná rastlina štandardného typu a mutantných rastlín *rms1* a *rms2* ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.

Odber xylémového exsudátu

Pre analýzu X-CK bol xylémový exsudát zbieraný z rastlín hrachu dekapitovaných pod prvým axilárnym pupeňom za mierneho podtlaku podľa postupu popísaného Lejeune *et al.* (1988). Pružná silikónová hadička dĺžky približne 15 mm, s vnútorným priemerom 2-3 mm, pripojená k špičke 2 ml striekačky bola napojená na dekapitovanú stonku rastliny hrachu a pevne stiahnutá v mieste napojenia. Podtlak v striekačke bol vytvorený povytiahnutím piesta, pričom xylémový exsudát bol za týchto podmienok odoberaný počas 2 hodín. Z jednotlivej rastliny bolo po 2 hodinách získaných 50-200 μ l xylémového exsudátu. Pre každý experimentálny variant bolo použitých 10 rastlín, pričom po odbere bol xylémový exsudát ihneď zmrazený v tekutom dusíku a následne skladovaný pri -80 °C.

Analýza cytokinínov

Pred analýzou bol ku každej vzorke na základe zmeraného objemu pridaný deutériom značený cytokinínový interný štandard (10 ng/ml exsudátu; [$^2\text{H}_5$]Z, [$^2\text{H}_5$]ZR, [$^2\text{H}_5$]ZRP, [$^2\text{H}_3$]DHZ, [$^2\text{H}_3$]DHZR, [$^2\text{H}_6$]iP, [$^2\text{H}_6$]iPR, [$^2\text{H}_6$]iPRP, [$^2\text{H}_5$]tZ9G, [$^2\text{H}_3$]DHZ9G a [$^2\text{H}_6$]IP9G; Olchemim). Extrakt bol centrifugovaný pri 10 000 g a 4 °C 10 minút. Supernatant bol následne prenesený do LC-MS vialky.

LC-MS (Liquid chromatography-mass spectrometry) analýza bola vykonaná v spolupráci s Imperial College London, pričom LC-MS bola upravená podľa Foo *et al.* (2007). Vzorky boli vstrekané na Phenomenex 3 μm C₁₈ Luna 100 x 2-mm kolónu za použitia Agilent 1100 Binary LC systému spojeného s Applied Biosystems Q-Trap hybridným hmotnostným spektrometrom vybaveným TurboIonspray elektrosprejovým zdrojom operujúcim v pozitívnom iónovom MRM (Multi Reaction Monitoring) móde. Použitá bola gradientová elúcia acetonitrilom v 10 mM octane amónnom (pH 3,4), najprv 5 % počas 4 minút, potom zvýšenie koncentrácie na 14 % počas 20 minút a nakoniec 32 % počas 25 minút s prietokom 200 $\mu\text{l min}^{-1}$. Cytokiníny boli detegované pomocou MRM s integračným časom 30 milisekúnd pre každú hmotnostnú analýzu.

4.1.6 Hodnotenie dĺžky axilárnych pupeňov a laterálnych výhonov

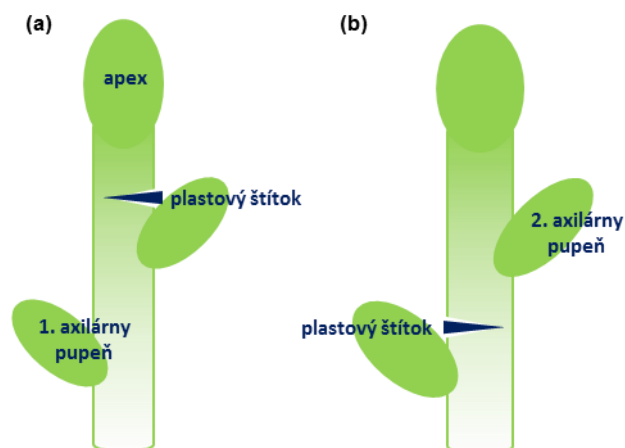
Rastlinný materiál a kultivačné podmienky

Pre stanovenie dĺžky axilárnych pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov boli použité rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan (Semo a.s., Smržice). Semená najprv namočené počas 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli následne vysiate do perlitu, v ktorom 3 až 4 dni klíčili. Po klíčení boli rastliny presadené do kultivačných nádob s perlitom, v ktorých boli pestované v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Pre ďalšie experimentálne varianty boli použité mutantné rastliny *rms1* a *rms2* na pozadí štandardného typu hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Parvus (Imperial College London). Semená najprv namočené počas 24 hodín vo vode pri laboratórnej teplote boli následne vysiate a pestované v kultivačných nádobách v zmesi rašelina : vermikulit (3 : 1). Kultivácia rastlín prebiehala v podmienkach klimaboxu pri teplote 20/10 °C, fotoperióde 16/8 hod (deň/noc) a intenzite svetla 125 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Pre hodnotenie dĺžky axilárnych pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov v závislosti od experimentálnych variantov v súlade s variantmi uvedenými vyššie v časti 4. MATERIÁL A METÓDY boli vždy intaktné alebo dekapitované 7-dňové (počítané od výsevu) rastliny hrachu ošetrené buď hormónmi (IAA, BA) alebo inhibítormi (NPA, TIBA, BFA, CHX). Pre kontrolný variant bola na príslušné časti rastliny (axilárne pupene, stonka) aplikovaná čistá lanolínová pasta. Dĺžka pupeňov a výhonov bola meraná každých 24 hodín v priebehu nasledujúcich 5 alebo 6 dní od ošetrenia rastliny.

Vplyv toku auxínu v hlavnej stonke na vyrastanie axilárnych pupeňov bol sledovaný na 7-dňových (počítané do výsevu) intaktných rastlinách, pričom u týchto rastlín bol za účelom mechanického prerušenia polárneho transportu auxínu formovaný v hlavnej stonke laterálny zárez buď medzi apexom stonky a druhým axilárnym pupeňom (obr. 20a) alebo medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom (obr. 20b). Z dôvodu zamedzenia tvorby nových vaskulárnych spojení umožňujúcich rýchlu obnovu toku auxínu v stonke bol do každého zárezu vložený plastový štítok (obr. 20).

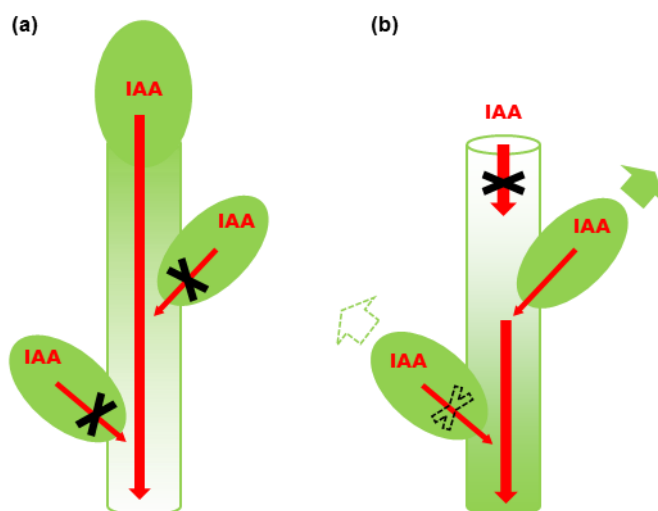


Obr. 20: Schéma experimentu: intaktná rastlina s formovaným laterálnym zárezom v hlavnej stonke medzi apexom a druhým axilárnym pupeňom (a) alebo medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom (b).

5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Apex reguluje vetvenie stonky u hrachu

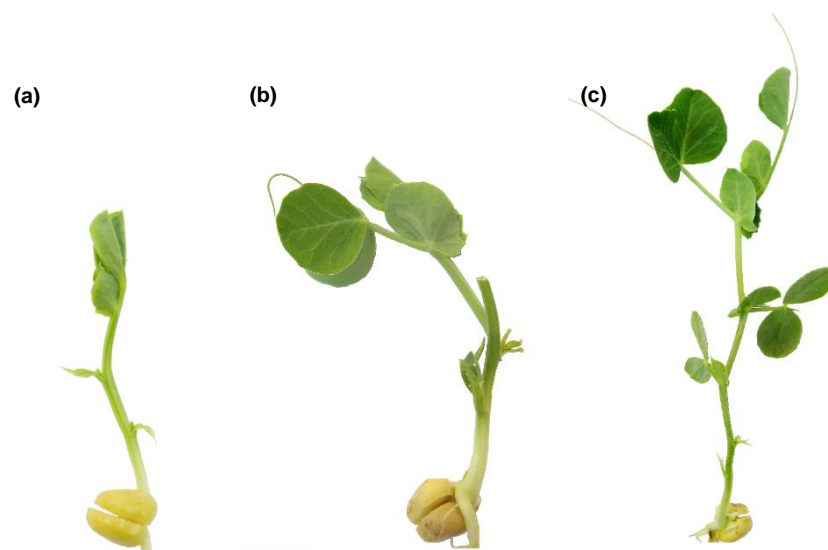
Rastliny sú charakteristické vysokým stupňom schopnosti prispôbovať svoj vývojový program a dynamicky tak reagovať na zmeny v okolitom prostredí. Nevyhnutnou súčasťou vývojovej plasticity rastlín je formovanie stonkovej architektúry, ktorá je determinovaná reguláciou aktivity axilárnych pupeňov v rámci procesu apikálnej dominancie. Tento fyziologický jav sa vyznačuje inhibičným vplyvom apexu stonky na vyrastanie axilárnych pupeňov (obr. 21a, obr. 22a, 22c). V hlavnej stonke intaktných rastlín sú PIN1 transportné proteíny auxínu lokalizované v parenchymatických bunkách xylému polárne, čo znamená silný polárny auxínový transport (obr. 23c). Naopak PIN1 proteíny v prokambiónych bunkách axilárnych pupeňov inhibovaných vo vyrastaní nevykazujú polárnu lokalizáciu (obr. 23a). Oslabenie apexu či jeho odstránenie dekapitáciou uvoľňuje axilárne pupene z vplyvu apikálnej dominancie a umožňuje ich vyrastanie (obr. 21b, obr. 22b), pričom v takto vyrastajúcich pupeňoch sú PIN1 proteíny v prokambiónych bunkách lokalizované polárne (obr. 23b), podobne ako v hlavnej stonke. Táto inhibícia vyrastania pupeňov môže byť spôsobená kompetíciou apikálneho a laterálnych zdrojov auxínu o primárnu kanalizáciu auxínového transportu do auxínového toku v hlavnej stonke (Balla *et al.*, 2011).



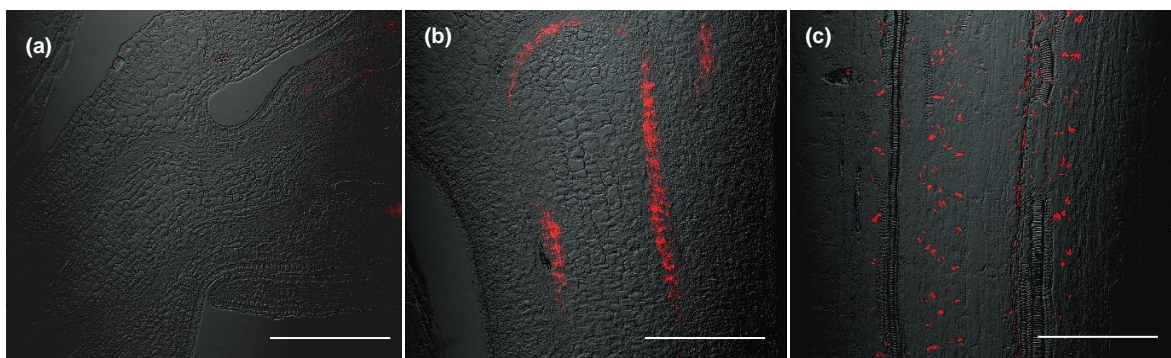
Obr. 21: Schéma experimentu (zelená šípka indikuje vyrastanie pupeňa): intaktná rastlina. Auxín transportovaný z apexu (ako primárneho zdroja auxínu) do stonky zabraňuje kanalizácii auxínu

a jeho exportu z axilárneho pupeňa (sekundárneho zdroja auxínu) **(a)**. Dekapitovaná rastlina. Apex ako primárny zdroj auxínu je odstránený, čím môže byť auxín syntetizovaný v axilárnom pupeni z neho exportovaný, čo vedie k aktivácii a počiatočnému vyrastaniu prvého i druhého axilárneho pupeňa. Počiatočné vyrastanie sa zmení na kompetíciu, ktorá nakoniec vyústí v dominanciu druhého pupeňa nad prvým **(b)**.

Pre bližšie sledovanie kompetície primárneho zdroja auxínu (apex) a jeho potenciálnych sekundárnych zdrojov (axilárne pupene) bol použitý dvojnódový modelový systém (obr. 21a, 21b) na rastlinách hrachu sateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan, ktorý má geneticky podmienenú silnú apikálnu dominanciu.



Obr. 22: Rastliny hrachu sateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan. 7-dňová (počítané od výsevu) intaktná rastlina **(a)**, rastlina 5 dní po dekapitácii s inhibovaným prvým axilárnym pupeňom a dominantným vyrastajúcim druhým axilárnym pupeňom **(b)**. Intaktná rastlina v rovnakom čase s axilárnymi pupeňmi zadržanými v dormancii **(c)**.

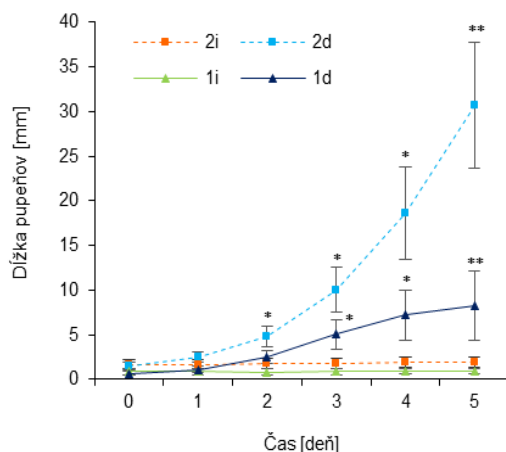


Obr. 23: Imunolokalizácia PIN1 proteínov pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca nepolárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách inhibovaného axilárneho pupeňa intaktnej rastliny **(a)**, polárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách vo vyrastajúcom pupeni **(b)** a polárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách vo vyrastajúcom pupeni **(c)**.

dekapitovaných rastlín 24 hodín po dekapitácii **(b)** a polárnu lokalizáciu PIN1 v parenchymatických bunkách xylému hlavnej stonky intaktnej rastliny **(c)**. Objektív 20x, mierka predstavuje veľkosť 100 μm .

U intaktných rastlín hrachu s prítomným apexom ako primárnym zdrojom auxínu nebolo pozorované žiadne vyrastanie axilárnych pupeňov (obr. 24). Súčasne bolo zistené, že prvý axilárny pupeň je morfológicky menší v porovnaní s druhým pupeňom. Veľkosť prvého axilárneho pupeňa je u intaktných rastlín resp. rastlín pred dekapitáciou približne polovičná než veľkosť druhého pupeňa. Po odstránení apikálneho vrcholu stonky dekapitáciou začal vyrastať prvý i druhý axilárny pupeň rovnakou mierou (obr. 24). Tri dni po dekapitácii výhon, ktorý sa začínal formovať z prvého pupeňa významne spomalil svoj rast, zatiaľ čo výhon formovaný z druhého pupeňa ďalej pokračoval vo svojom raste, až sa postupne stal jednoznačne dominantným (obr. 24).

Blažková *et al.* (1999) zistili, že dekapitácia vedie k rapídному a významnému zníženiu hladiny IAA v axilárnych pupeňoch už po 6 hodinách od dekapitácie, pričom po 24 hodinách od odstránenia apexu dochádza k opätovnému nárastu IAA hladiny v axilárnych pupeňoch. Toto môže indikovať, že po dekapitácii dochádza k rýchlemu exportu akumulovaného auxínu z pupeňa, čo koreluje s pozorovaním, že k polarizácii PIN1 proteínov dochádza v priebehu 6 hodín po dekapitácii (Balla *et al.*, 2011). Týmto je umožnené formovanie PIN1 značených auxínových kanálov a následný export auxínu z pupeňa. Proces kompetície o vytvorenie nového zdroja auxínu preto môže byť aplikovaný aj počas vyrastania axilárnych pupeňov po dekapitácii, čo znamená, že druhý axilárny pupeň inhibuje prvý pupeň v raste, avšak jednoznačná dominancia nie je stanovená ihneď po dekapitácii.



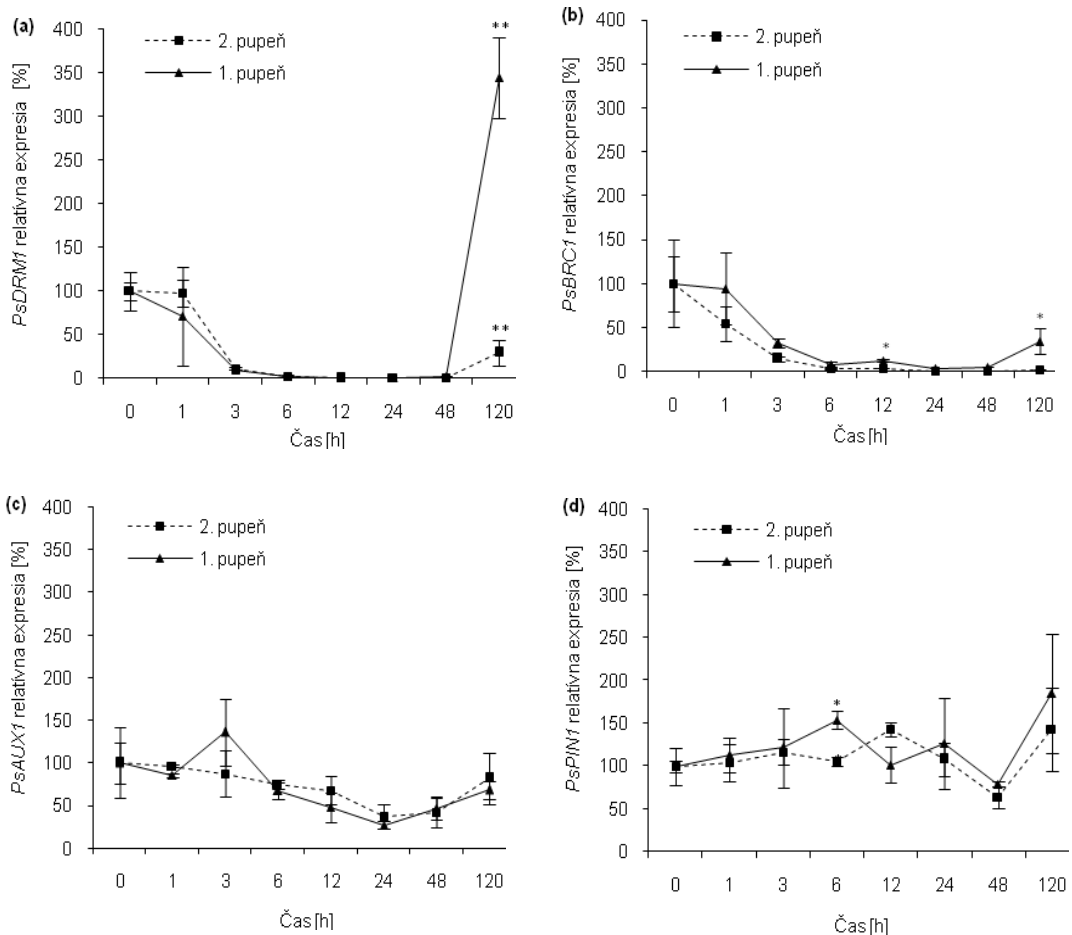
Obr. 24: Rastová krivka predstavujúca dĺžku axilárnych pupeňov a z nich formovaných výhonov, kde **1i** = prvý pupeň intaktnej rastliny, **2i** = druhý pupeň intaktnej rastliny, **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$).

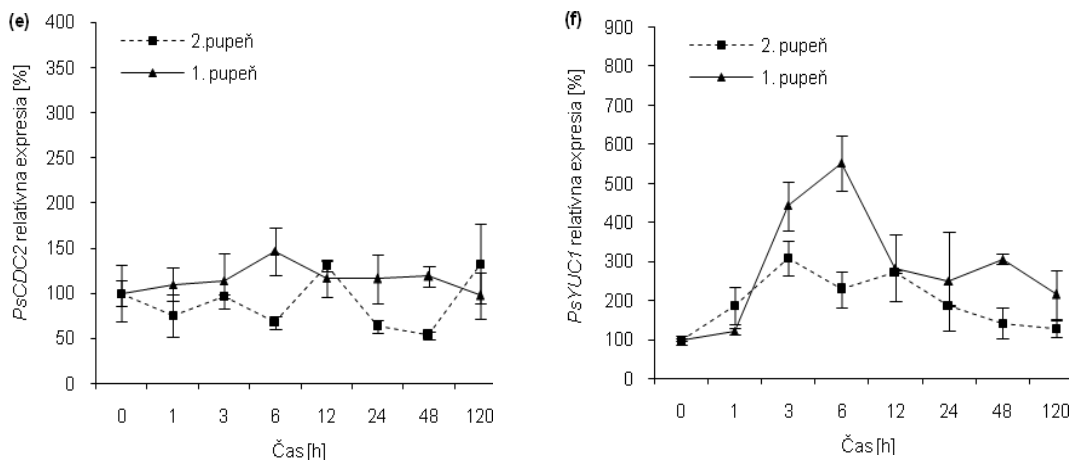
Tieto sledované morfológické zmeny axilárnych pupeňov boli sprevádzané s očakávanými zmenami v expresii génu *PsDRM1* (*DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN 1*), ktorý ako marker dormancie ukazuje inhibovaný alebo rastúci stav pupeňa resp. pletív. V oboch pupeňoch po dekapitácii jeho expresia klesla v priebehu 6 hodín k nulovým hodnotám, čo indikuje, že obidva pupene boli po dekapitácii aktivované a dochádzalo medzi nimi ku kompetícii, avšak po 120 hodinách od dekapitácie sa v prvom pupeni jeho expresia mnohonásobne zvýšila v porovnaní s druhým pupeňom, v ktorom zostávala expresia génu *PsDRM1* stále na nízkej úrovni (obr. 25a).

Podobný expresný profil bol zistený aj u génu *PsBRC1*, ktorého expresia je nevyhnutná pre udržanie dormantného stavu axilárneho pupeňa. *AtBRC1* pravdepodobne predstavuje kľúčový prvok v integrácii rôznych signálnych dráh kontrolujúcich vetvenie u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), pričom jeho expresia sa mení po dekapitácii veľmi rýchlo (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). V druhom pupeni nebola expresia *PsBRC1* po kontinuálnom znižovaní v priebehu 6 hodín od dekapitácie detekovateľná, zatiaľ čo v prvom pupeni sa po prvotnom znížení expresia po 120 hodinách od dekapitácie významne zvýšila (obr. 25b).

Okrem génov súvisiacich s dormantným stavom pupeňov bola sledovaná aj expresia génov kódujúcich transportné proteíny auxínu *PsAUX1* (obr. 25c), *PsPIN1* (obr. 25d) a génu *PsCDC2* (*CELL DIVISION CONTROL 2*) (obr. 25e) zapojeného

do procesu bunkového delenia. Zmeny v expresii týchto génov, ktoré boli zistené v prvom pupeni korelovali so zmenami v druhom pupeni (obr. 25c, 25d, 25e). Podobný expresný profil bol zaznamenaný aj u génu biosyntetickej dráhy auxínu *PsYUC1*, aj keď zmeny v expresii v prvom pupeni boli výraznejšie než v druhom pupeni (obr. 25f). Toto môže byť vysvetlené tým, že v rámci kompetície dochádza v morfológicky menšom prvom pupeni k intenzívnejšej aktivite na transkripčnej úrovni s cieľom získať dominanciu nad druhým pupeňom. Súhrnne, výsledky zo stanovenia expresie vybraných génov opäť naznačujú, že prvý pupeň bol dekapitáciou uvoľnený z inhibície rovnako ako pupeň druhý. Prostredníctvom morfológických a molekulárnych markerov tak bola odhalená kompetícia o dosiahnutie dominancie medzi axilárnymi pupeňmi uvoľnenými z dormancie.





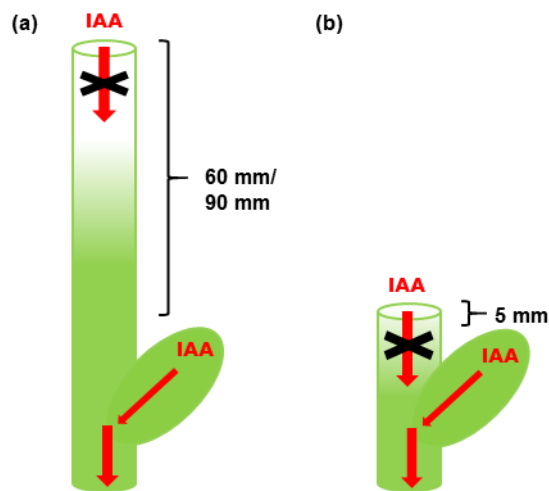
Obr. 25: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d), *PsCDC2* (e) a *PsYUC1* (f) v prvom a druhom axilárnom pupeňi dekapitovaných rastlín. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Podľa teórie kanalizácie auxínového transportu je apikálna dominancia determinovaná tokom auxínu v hlavnej stonke rastliny. Stonkový meristém, či už je apikálny alebo axilárny môže rásť jedine v prípade, že aktívne exportuje auxín polárnym transportným systémom (Morris, 1977; Bangerth, 1989; Bennett *et al.*, 2006; Mouchel a Leyser, 2007; Ongaro a Leyser, 2008). Polárny auxínový transportný systém zahŕňa množstvo transportných PIN1 proteínov, ktoré vytvárajú auxínové spojenie medzi jednotlivými bunkami a generujú jednosmerný bazipetálny tok hormónu z apexu cez hlavnú stonku (Friml *et al.*, 2003). Rastlina s úplným fenotypom apikálnej dominancie má činnosť polárneho auxínového transportu v hlavnej stonke na maximálnej kapacitnej úrovni, čím už PIN1 proteíny nemajú dostatočnú dispozíciu transportu pre ďalší auxín prichádzajúci z pupeňov (Bennett *et al.*, 2006; Mouchel a Leyser, 2007; Ongaro a Leyser, 2008). V tomto prípade predstavuje auxín transportovaný z apexu stonky zásadný faktor pre reguláciu vyrastania pupeňov, ktorý zabraňuje exportu auxínu z pupeňa, čím inhibuje jeho vyrastanie. Export auxínu z pupeňa môže prebiehať jedine vtedy, keď dôjde k zmene v tejto regulácii, buď znížením hladiny auxínu alebo zvýšením počtu auxínových transportérov. Redukovanie endogénnej hladiny IAA dekapitáciou (Thimann a Skoog, 1933; Thimann a Skoog, 1934; van Overbeek, 1938; White *et al.*, 1975; Morris *et al.*, 2005) preto môže viesť k vytvoreniu dostatočne silného sinku pre kanalizáciu auxínu z druhého axilárneho pupeňa, ktorého vyrastanie bolo po dekapitácii pozorované (obr. 24). Aj keď po odstránení apexu dekapitáciou dochádza v dôsledku zníženej hladiny auxínu

k počiatočnému vyrastaniu tiež prvého pupeňa (obr. 24) a jeho kompetícii s pupeňom druhým, jeho trvalý rast je inhibovaný tokom auxínu práve z vyrastajúceho druhého pupeňa. Konečné formovanie jedného dominantného výhonu je pritom pravdepodobne determinované kapacitou PIN1 proteínov a mierou auxínového transportu z každého jedného pupeňa (Bangerth, 1989; Bangerth *et al.*, 2000; Bennett *et al.*, 2006; Ongaro a Leyser, 2008).

5.2 Dĺžka ponechanej dekapitovanej stonky ovplyvňuje rýchlosť uvoľnenia axilárnych pupeňov z dormancie

Pre lepšie pochopenie dôležitosti bazipetálneho auxínového toku v stonke v regulácii vyrastania pupeňov boli použité deetioloované rastliny s predĺženými internódiami, ktoré boli dekapitované 60 mm alebo 90 mm nad druhým axilárnym pupeňom (obr. 26a), na rozdiel od kontrolného variantu, v ktorom boli rastliny dekapitované 5 mm nad druhým pupeňom (obr. 26b).



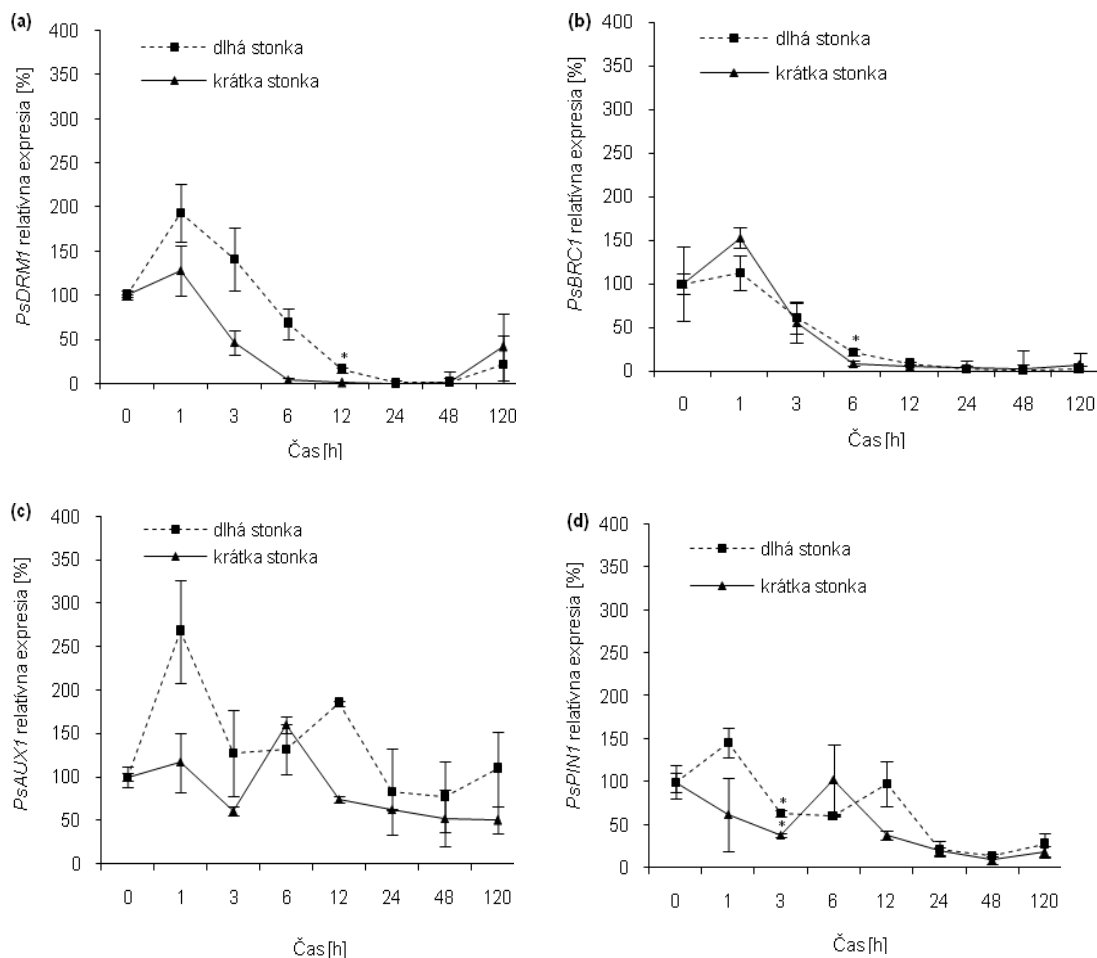
Obr. 26: Schéma experimentu: Rastlina s dlhým internódiom dekapitovaná 60 mm alebo 90 mm nad druhým pupeňom (a). Rastlina dekapitovaná 5 mm nad druhým pupeňom (b).

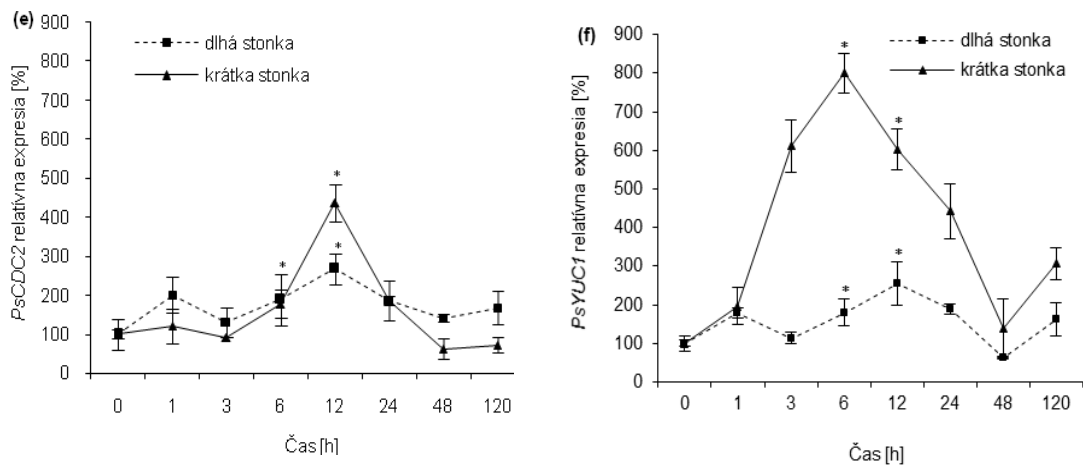
Pre determinovanie času uvoľnenia pupeňov z dormancie a ich vyrastaní bol použitý marker dormancie gén *PsDRM1* a represor stonkového vetvenia gén *PsBRC1*, ktorých expresná dynamika bola sledovaná v druhom axilárnom pupeni rastlín dekapitovaných spôsobom uvedeným vyššie (obr. 26). Všeobecne bol zistený približne 6-hodinový posun u variantu s 60 mm dlhou dekapitovanou stonkou (obr. 27a, 27b) a 12-hodinový posun u variantu s 90 mm dlhou dekapitovanou stonkou (obr. 28a, 28b)

v expresnom profile obidvoch génov *PsDRM1* a *PsBRC1* v porovnaní s kontrolným variantom, kde boli rastliny dekapitované 5 mm nad druhým axilárnym pupeňom (obr. 27a, 27b, 28a, 28b). Vplyv dĺžky dekapitovanej stonky bol ďalej sledovaný aj v prípade expresie génov *PsAUX1*, *PsPIN1*, *PsCDC2* a *PsYUC1* v druhom axilárnom pupeňi, kde bol tiež zaznamenaný podobný časový posun v rýchlosti zmien v expresii týchto sledovaných génov po dekapitácii u variantu s 60 mm alebo 90 mm dlhou dekapitovanou stonkou v porovnaní s kontrolným variantom, kde dekapitovaná stonka mala 5 mm (obr. 27c, 27d, 27e, 27f, 28c, 28d, 28e, 28f.).

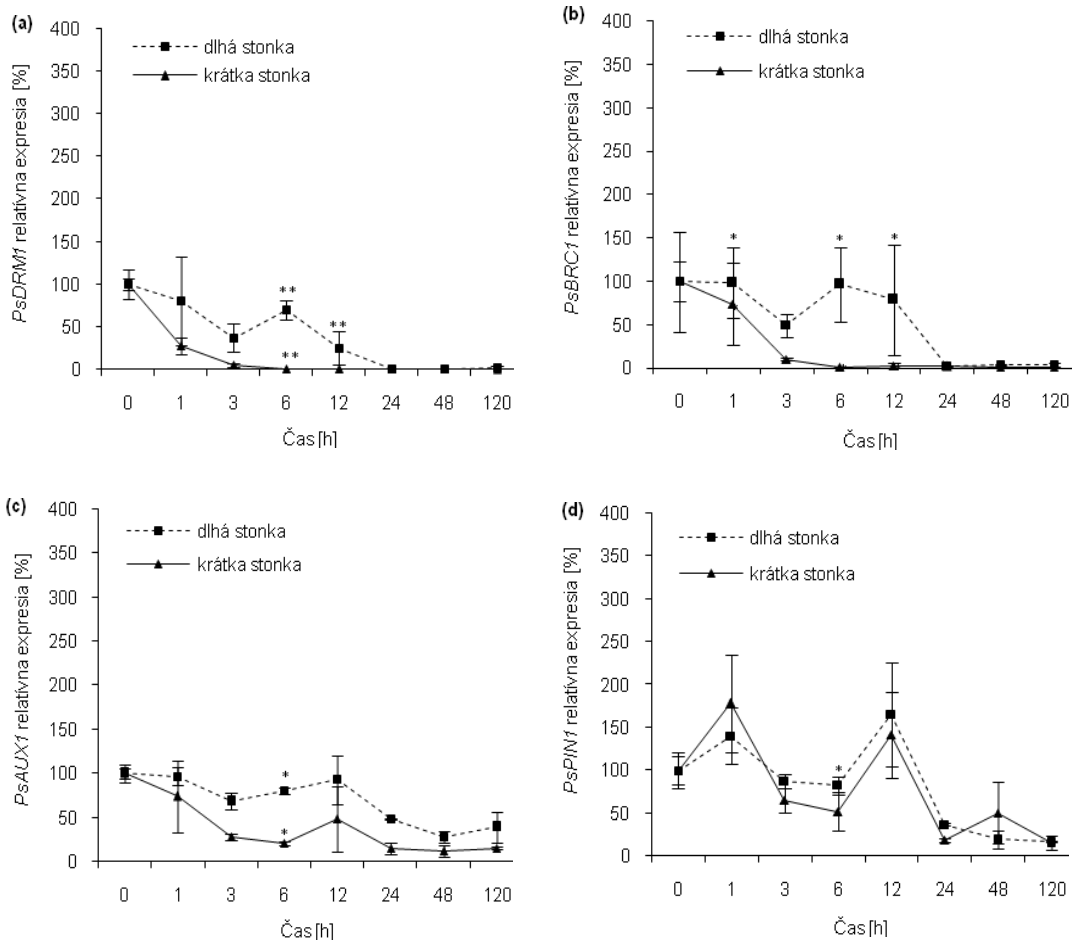
Vzhľadom na to, že priemerná rýchlosť polárneho transportu auxínu je približne $10 \text{ mm}\cdot\text{h}^{-1}$ (Goldsmith, 1977), tieto výsledky ukazujú, že vyčerpanie auxínu v stonke alebo prinajmenšom zníženie jeho hladiny po odstránení apexu ako jeho primárneho zdroja môže mať vplyv na rýchlosť vyrastania axilárneho pupeňa.

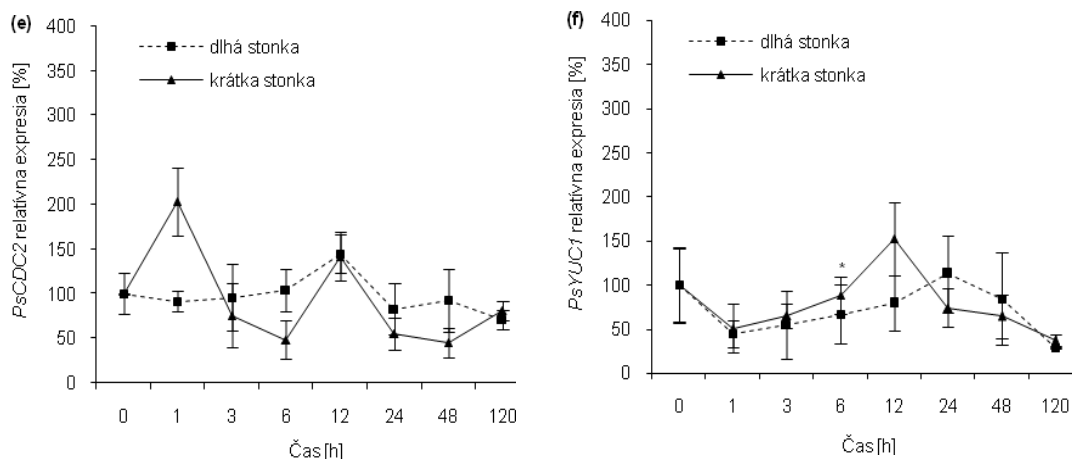
Podobne i Blažková *et al.* (1999) pozorovali po dekapitácii zvýšenú rýchlosť vyrastania axilárneho pupeňa bližšie k apexu (5. nódu) už po 24 hodinách, zatiaľ čo axilárny pupeň na bazálnejšej pozícii (2. nódu) v rámci hlavnej stonky začal vyrastať z určitým oneskorením.





Obr. 27: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d), *PsCDC2* (e) a *PsYUC1* (f) v druhom axilárnom pupeni rastlín dekapitovaných 60 mm nad druhým pupeňom (dlhá stonka) alebo 5 mm nad druhým pupeňom (krátka stonka). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).





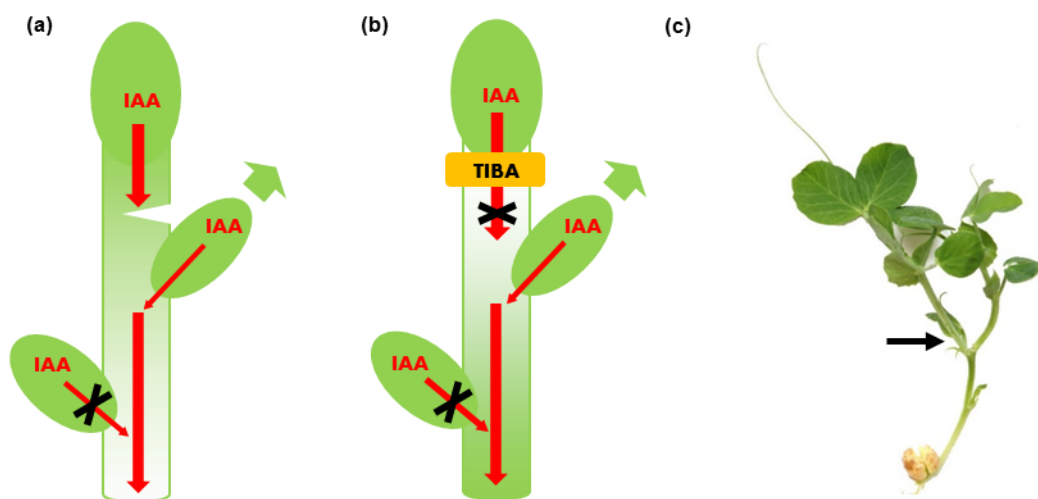
Obr. 28: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d), *PsCDC2* (e) a *PsYUC1* (f) v druhom axilárnom pupeni rastlín dekapitovaných 90 mm nad druhým pupeňom (dlhá stonka) alebo 5 mm nad druhým pupeňom (krátka stonka). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Podľa teórie kanalizácie auxínového transportu je vyrastanie pupeňov regulované tokom auxínu v stonke (Bangerth, 1989; Bennett *et al.*, 2006; Mouchel a Leyser, 2007; Ongaro a Leyser, 2008). Po odstránení primárneho zdroja auxínu - apexu, dochádza k redukcii jeho hladiny v hlavnej stonke (Thimann a Skoog, 1933; Thimann a Skoog, 1934; van Overbeek, 1938; White *et al.*, 1975; Morris *et al.*, 2005) pravdepodobne do tej doby, než je vytvorený nový aktívny zdroj auxínu, ktorým môže byť axilárny pupeň. Na základe toho je možné usudzovať, že časový interval medzi odstránením pôvodného primárneho zdroja auxínu a založením jeho nového zdroja môže byť determinovaný mierou auxínu dostupného pre polárny transport PIN1 proteínmi lokalizovanými na úseku stonky medzi apexom a axilárnym pupeňom. Aj keď niektoré štúdie ukázali, že iniciácia vyrastania pupeňa po dekapitácii nie vždy koreluje s lokálnym vyčerpaním auxínu v stonke (Morris *et al.*, 2005; Ferguson *et al.*, 2009; Renton *et al.*, 2012; Mason *et al.*, 2014), tieto rozdiely môžu byť spôsobené odlišným experimentálnym usporiadaním, vzhľadom na to, že v týchto štúdiách boli pre experimenty použité 20-dní staré rastliny. Experimentálne usporiadanie použité v tejto práci však zreteľne ukázalo, že dynamika vyrastania axilárnych pupeňov môže byť ovplyvňovaná dĺžkou dekapitovanej stonky, v ktorej po odstránení apexu dochádza k zmenám v hladine auxínu.

5.3 Prerušenie polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke uvoľňuje axilárne pupene z dormancie

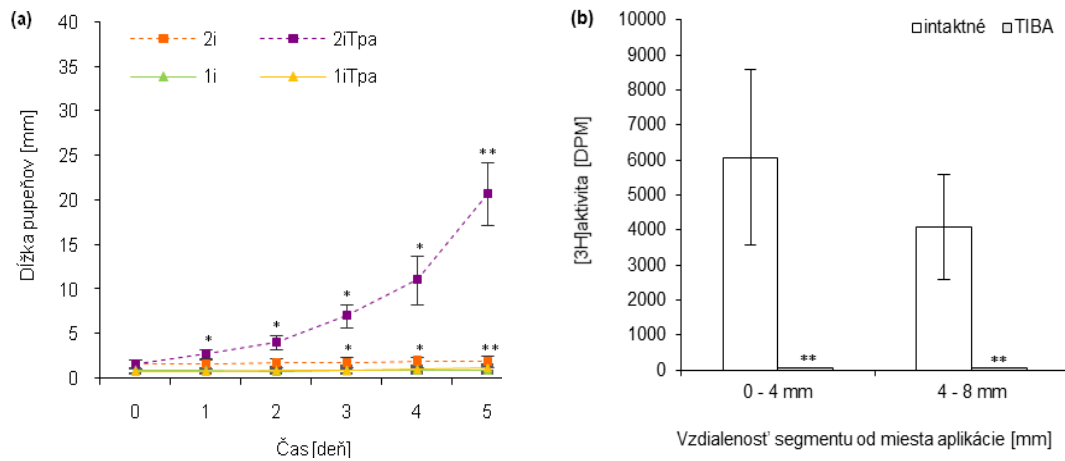
Pre potvrdenie predchádzajúcich výsledkov a pre ďalšie testovanie kľúčovej úlohy auxínového toku v hlavnej stonke v inhibícii vyrastania pupenov, boli vykonané experimenty, v ktorých bol redukovaný auxínový tok v intaktnej rastline hlbokým zárezom do hlavnej stonky. Pokiaľ bol zárez vytvorený nad druhým axilárnym pupeňom (obr. 29a), bol tento pupeň uvoľnený z dormancie a začal sa z neho formovať laterálny výhon (obr. 29c). Prvý pupeň zostal aj naďalej zadržaný v dormancii tokom auxínu exportovaného do stonky z vyrastajúceho druhého pupeňa, pričom hlavná stonka s apikálnym vrcholom ďalej pokračovala v raste (obr. 29c).

Ako ďalší prístup prerušenia auxínového toku bol bazipetálny transport auxínu v hlavnej stonke inhibovaný aplikáciou inhibítora transportu auxínu, kyseliny 2,3,5-trijódbenzoovej (TIBA) v lanolínovej paste medzi intaktný stonkový apex a druhý axilárny pupeň (obr. 29b). Tento prstenec TIBA-lanolínovej pasty efektívne blokoval stonkový auxínový transport, ako bolo zistené na základe merania auxínového transportu za použitia [³H] značeného auxínu (obr. 30b). Tiež v tomto prípade prerušenie toku auxínu z apexu do hlavnej stonky viedlo k vyrastaniu druhého axilárneho pupeňa, zatiaľ čo prvý pupeň zostal zadržaný v dormancii (obr. 30a).



Obr. 29: Schéma experimentu (zelené šípky vedľa pupenov indikujú vyrastanie pupeňa): intaktná rastlina s laterálnym zárezom do hlavnej stonky nad druhým pupeňom. Oslabenie stonkového auxínového toku umožňuje export auxínu z druhého pupeňa a jeho vyrastanie. Prvý pupeň zostáva zadržaný v dormancii v dôsledku toku auxínu do stonky z druhého pupeňa (a). Intaktná rastlina ošetrená TIBA-lanolínovou pastou pod apex. Inhibítora transportu auxínu blokuje auxínový tok

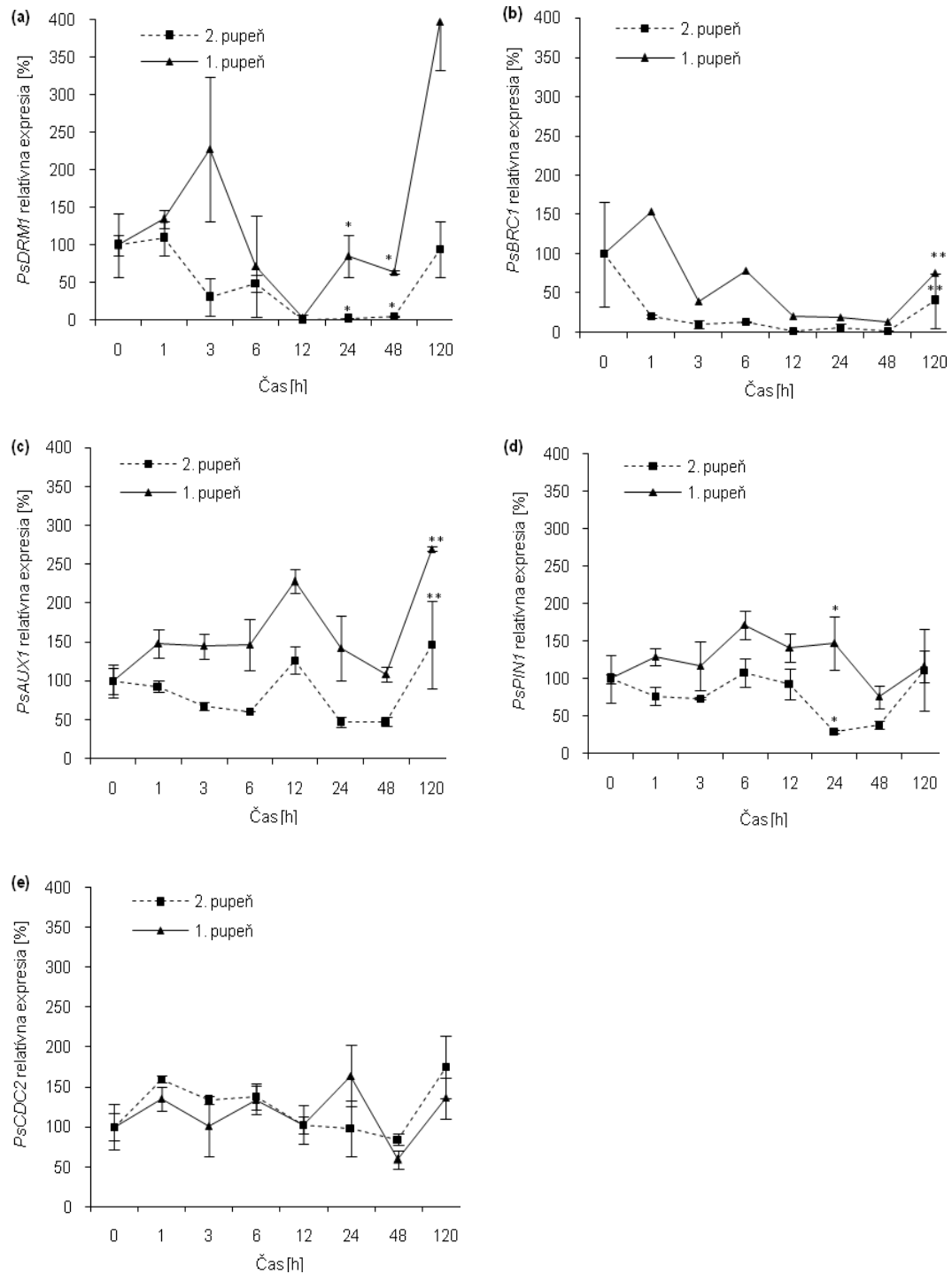
z apexu a umožňuje druhému pupeňu stať sa novým primárnym zdrojom auxínu, ktorý ďalej pokračuje v zabraňovaní exportu auxínu z prvého pupeňa **(b)**. Intaktná rastlina hrachu s laterálnym zárezom nad druhým axilárnym pupeňom. Čierna šípka ukazuje laterálny výhon formovaný z druhého axilárneho pupeňa **(c)**.



Obf. 30: Dĺžka axilárných pupeňov a z nich formovaných výhonov, kde **1i** = prvý pupeň intaktnej rastliny, **2i** = druhý pupeň intaktnej rastliny, **1iTpa** = prvý pupeň intaktnej rastliny ošetrenej TIBA pod apexom, **2iTpa** = druhý pupeň intaktnej rastliny ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou pod apexom **(a)**. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$). $[^3\text{H}]$ IAA transport v hlavnej stonke meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm pod miestom aplikácie TIBA-lanolínovej pasty pod apexom stonky intaktnej rastliny. $[^3\text{H}]$ IAA bola zbieraná z bázy stonkového segmentu **(b)**. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

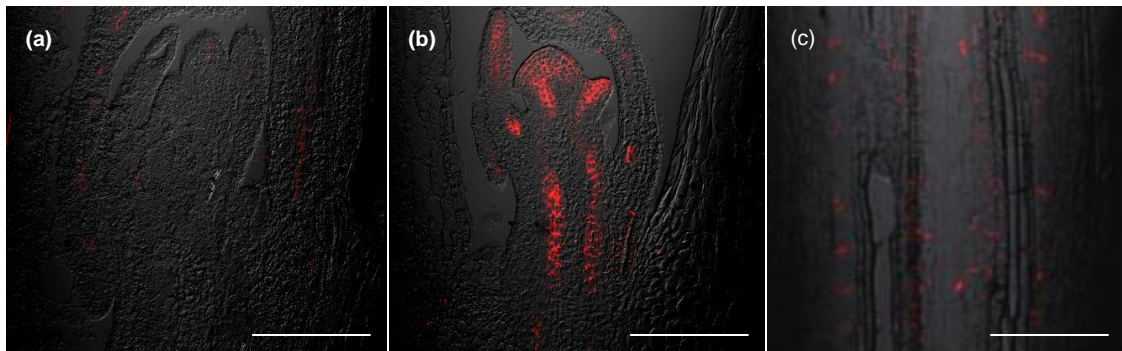
Morfologicky pozorovaný stav vyrastania pupeňov alebo ich zadržania v dormancii bol potvrdený expresiou *PsDRM1* dormantného markeru a *PsBRC1* represoru stonkového vetvenia, ktorých expresia sa vo vyrastajúcom druhom pupeni znížila k nulovým hodnotám, zatiaľ čo v prvom pupeni bola expresia obidvoch génov udržiavaná na vyššej úrovni (obr. 31a, 31b). Sledovaná bola tiež expresia génov *PsAUX1* (obr. 31c), *PsPIN1* (obr. 31d) a *PsCDC2* (obr. 31e), kde boli rovnako zistené rozdiely medzi druhým a prvým pupeňom korelujúce s morfológickými zmenami (obr. 30a) spôsobenými prerušením toku auxínu z apexu do hlavnej stonky. Navyše imunohistochemická analýza PIN1 proteínu tiež preukázala, že v intaktných rastlinách ošetrovaných TIBA-lanolínovou pastou medzi apexom a druhým pupeňom (obr. 29b), v druhom vyrastajúcom pupeni dochádzalo k polarizácii PIN1 proteínov za účelom založenia exportu auxínu z pupeňa (obr. 32b), zatiaľ čo v prvom pupeni zadržanom

v dormantnom stave neboli detegované žiadne známky polarizácie (obr. 32a). V stonke samotnej neboli po 24 hodinách zistené žiadne zmeny v PIN1 polarizácii v mieste aplikácie TIBA-lanolínovej pasty alebo okolo miesta aplikácie (obr. 32c).



Obr. 31: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d) a *PsCDC2* (e) v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných rastlín ošetrených TIBA-lanolínovou pastou medzi

apexom a druhým pupeňom. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

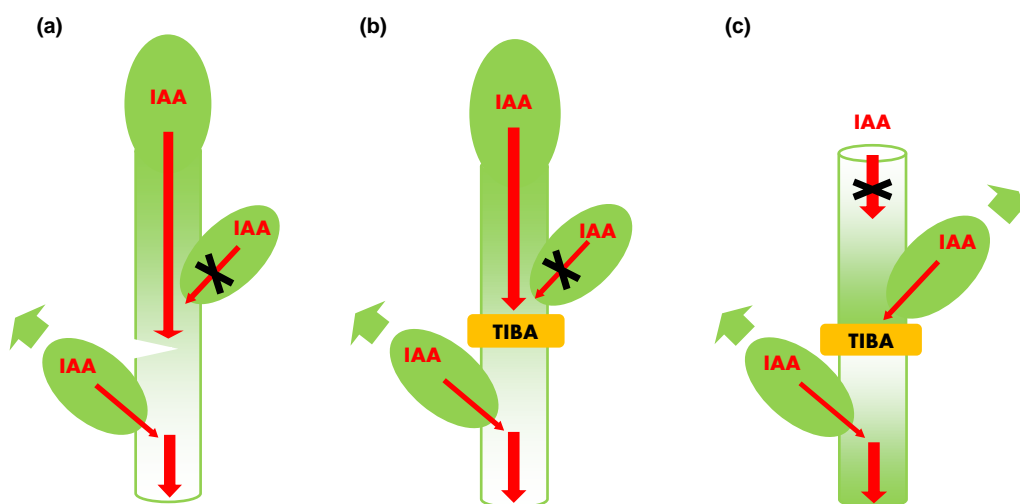


Obr. 32: Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca nepolárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách prvého axilárneho pupeňa inhibovaného vo vyrastaní (a), polárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách druhého vyrastajúceho pupeňa (b) a polárnu lokalizáciu v parenchymatických bunkách xylému hlavnej stonky v mieste aplikácie TIBA-lanolínovej pasty 24 hodín po aplikácii (c). Objektív 20x, mierka predstavuje veľkosť 100 μm .

Rovnako ako navrhuje teória kanalizácie auxínu (Bangerth, 1989; Bennett *et al.*, 2006; Mouchel a Leyser, 2007; Ongaro a Leyser, 2008), tak aj uvedené výsledky indikujú, že sústavný tok auxínu z apexu do hlavnej stonky je nevyhnutný pre udržanie dormancie axilárnych pupeňov a jeho prerušenie alebo inhibícia uvoľňujú druhý pupeň z dormancie. Narušenie auxínového toku v hlavnej stonke sa prejavilo zmenami v expresii markeru dormancie, ako aj ďalších sledovaných génov, a tiež polarizáciou PIN1 transportných proteínov auxínu.

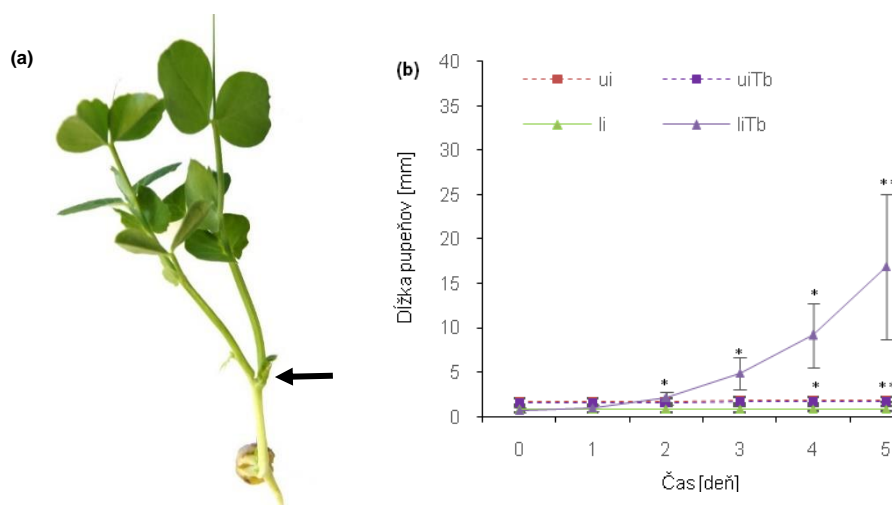
5.4 Prerušenie polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke medzi pupeňmi uvoľňuje prvý pupeň z dormancie

V nasledujúcich experimentoch bol prerušený auxínový tok v hlavnej stonke intaktnej rastliny medzi axilárnymi pupeňmi. Pokiaľ bol hlboký zárez vytvorený pod druhým axilárnym pupeňom (alebo kdekoľvek medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom) (obr. 33a), tak bol prvý pupeň uvoľnený z inhibície a následne bol z neho formovaný laterálny výhon (obr. 34a). Druhý pupeň zostal aj naďalej zadržaný v dormancii v dôsledku toku auxínu z apexu. Okrem toho, že prvý pupeň formoval výhon, hlavný stonkový výhon ďalej pokračoval vo svojom raste (obr. 34a).



Obr. 33: Schéma experimentu (zelená šípka vedľa pupeňov indikuje ich vyrastanie): intaktná rastlina s laterálnym zárezom pod druhým pupeňom. Oslabenie stonkového toku auxínu umožňuje export auxínu zo spodného pupeňa a tým jeho vyrastanie. Druhý pupeň zostáva ďalej zadržaný v dormancii v dôsledku toku auxínu z apexu (a). Intaktná rastlina ošetrená TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom. Inhibítor transportu auxínu blokuje tok auxínu v hlavnej stonke a umožňuje export auxínu z prvého pupeňa, čo vedie k jeho vyrastaniu (b). Dekapitovaná rastlina ošetrená TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom. Kompetícia medzi vyrastajúcimi pupeňmi je eliminovaná aplikáciou inhibítora transportu auxínu, ktorý izoluje prvý pupeň od auxínu exportovaného z druhého pupeňa, výsledkom čoho je rovnocenné formovanie výhonov z oboch vyrastajúcich pupeňov (c).

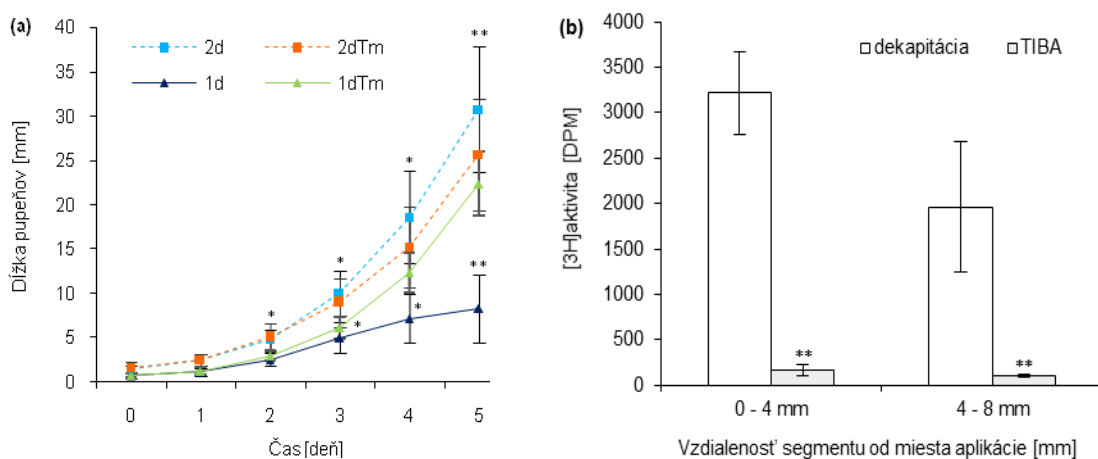
V prípade, že namiesto zárezu bol na hlavnú stonku intaktnej rastliny medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom aplikovaný prstenec TIBA-lanolínovej pasty (obr. 33b), bolo opäť pozorované vyrastanie prvého axilárneho pupeňa, zatiaľ čo druhý pupeň zostal v dormantnom stave (obr. 34b).



Obr. 34: Intaktná rastlina hrachu s laterálnym zárezom pod druhým axilárnym pupeňom. Čierna šípka ukazuje laterálny výhon formovaný z prvého axilárneho pupeňa (a). Rastové krivky

predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1i** = prvý axilárny pupeň na intaktnej rastline, **2i** = druhý axilárny pupeň na intaktnej rastline, **1iTm** = prvý pupeň na rastline ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým pupeňom, **2iTm** = druhý pupeň, rovnaké ošetrovanie (**b**). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$).

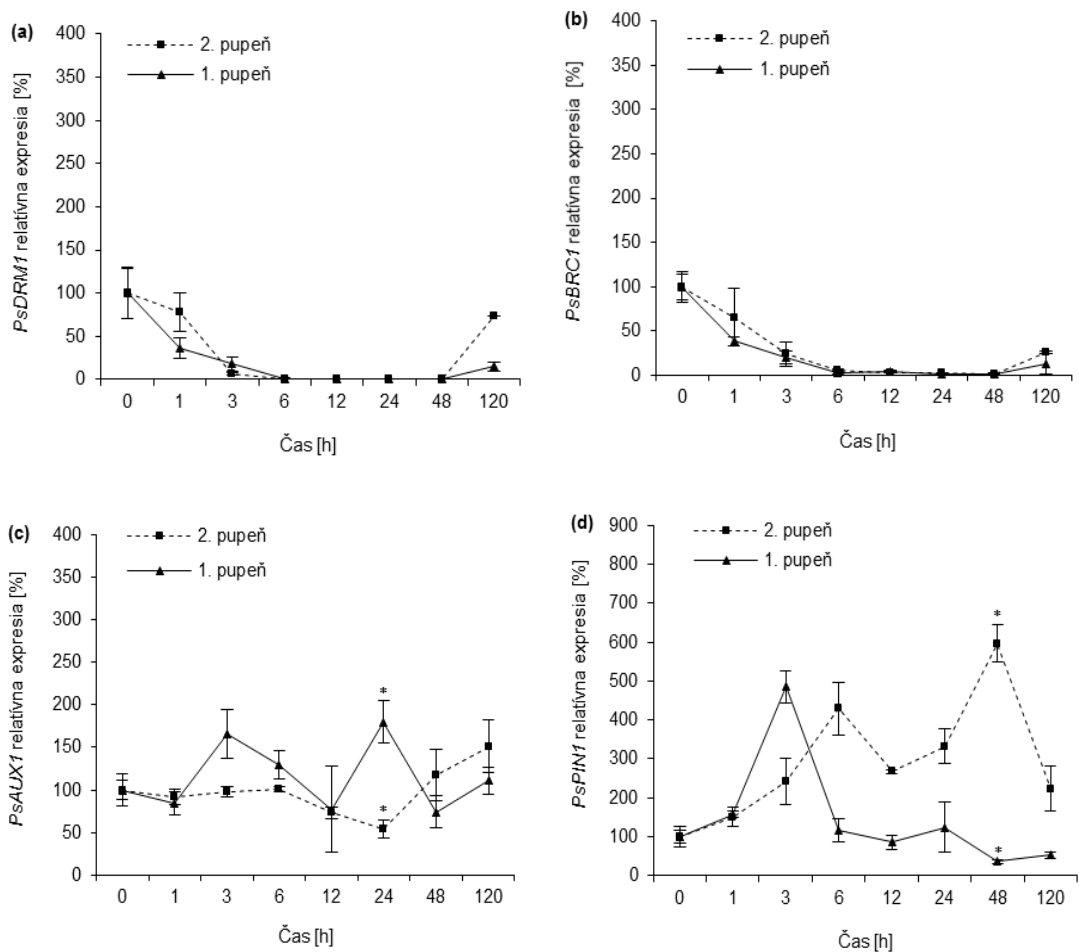
V ďalšom experimentálnom variante bol auxínový transport v hlavnej stonke znovu inhibovaný aplikáciou prstenca TIBA-lanolínovej pasty medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom, avšak na stonku dekapitovanej rastliny (obr. 33c). TIBA ako inhibítor transportu auxínu izolovala dva pupene od seba v zmysle auxínového transportu, ako bolo potvrdené [³H] značeným auxínom (obr. 35b). Aplikáciou TIBA-lanolínovej pasty bolo medzi takto izolovanými dvomi pupeňmi zamedzené ich kompetíciu, čo viedlo k rovnocennému formovaniu laterálnych výhonov z oboch vyrastajúcich axilárnych pupeňov (obr. 35a).

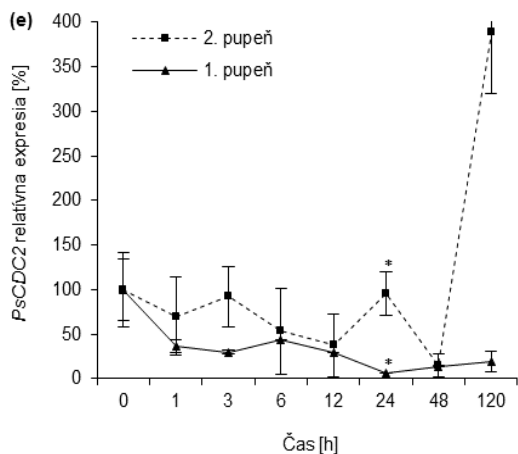


Obr. 35: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1d** = prvý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1dTm** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým pupeňom, **2dTm** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**a**). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$). [³H]IAA transport v hlavnej stonke meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm pod miestom aplikácie TIBA-lanolínovej pasty medzi dvomi axilárnymi pupeňmi dekapitovaných rastlín. [³H]IAA bola zbieraná z bázy stonkového segmentu (**b**). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Analýzou expresie markeru dormancie génu *PsDRM1* a represoru stonkového vetvenia génu *PsBRC1* bolo zistené, že v prvom a druhom pupeni klesala expresia po dekapitácii a TIBA aplikácii v oboch pupeňoch rovnakou mierou (obr. 36a, 36b).

Navyše ani v expresii génov *PsAUX1*, *PsPIN1* a *PsCDC2* neboli pozorované v skorých časových intervaloch po dekapitácii a TIBA aplikácii významné rozdiely medzi prvým a druhým pupeňom (obr. 36c, 36d, 36e). Vzhľadom na to, že aplikáciou prstenca TIBA-lanolínovej pasty bol v hlavnej stonke prerušený polárny transport auxínu, čo tiež potvrdzujú zmeny v expresii sledovaných génov, dohromady uvedené výsledky indikujú, že obidva pupene boli aktivované a začali vyrastať súčasne. Zvýšenie expresie génov *PsPIN1* a *PsCDC2* v druhom pupeni v neskorých časových intervaloch po ošetrení rastliny môže byť spôsobené akumuláciou auxínu v pletivách nad prstencom TIBA-lanolínovej pasty ako následok zamedzenia toku auxínu až do koreňa.





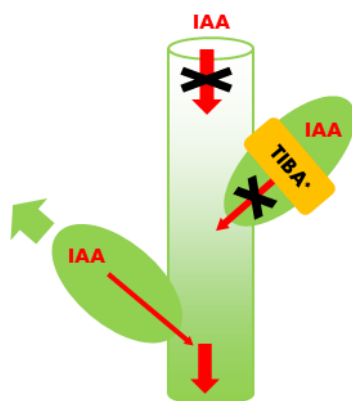
Obr. 36: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d) a *PsCDC2* (e) v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovaných rastlín ošetrovaných TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha=0,05^*$ a $\alpha=0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Pokiaľ je tok auxínu transportovaného z apexu akokoľvek prerušený, či už hlbokým zárezom, aplikáciou inhibítora alebo úplným odstránením apexu dekapitáciou, toto prerušenie auxínového toku je vždy spojené s vyrastaním pupeňov. K vyrastaniu daného pupeňa pritom dochádza v závislosti od jeho schopnosti a možnosti exportovať dostatočné množstvo auxínu pre obnovenie nepretržitého toku auxínu v hlavnej stonke. Podobne aj Panigrahi a Audus (1966) a Tamas *et al.* (1989) zistili, že prerušenie transportu auxínu v hlavnej stonke vedie k vyrastaniu pupeňov.

Rovnako ako za použitia predchádzajúceho experimentálneho usporiadania, tak aj v tomto prípade experimentálneho variantu bola potvrdená dôležitosť sústavného auxínového toku v hlavnej stonke pre udržanie apikálnej dominancie a axilárnych pupeňov v dormantnom stave.

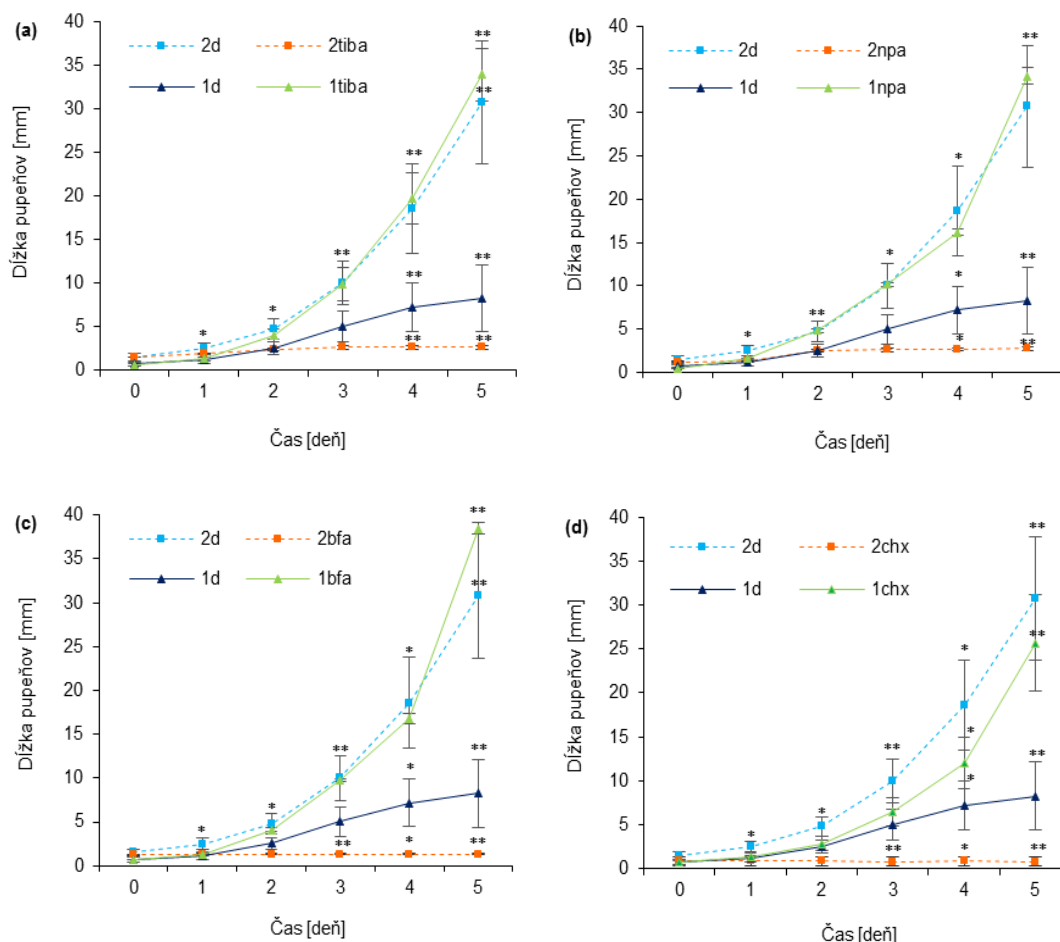
5.5 Inhibícia polárneho transportu auxínu z druhého axilárneho pupeňa uvoľňuje prvý axilárny pupeň z dormancie

Nasledujúcim experimentálnym prístupom bolo zasahované do kompetície axilárnych pupeňov o vytvorenie nového primárneho zdroja auxínu inhibíciou auxínového exportu priamo z druhého pupeňa. Ako je uvedené vyššie, po odstránení apexu ako primárneho zdroja sa po počiatočnej kompetícii medzi pupeňmi jednoznačne dominantným stane druhý axilárny pupeň. V tomto experimentálnom usporiadaní bol inhibovaný export auxínu priamo z tohto pupeňa.



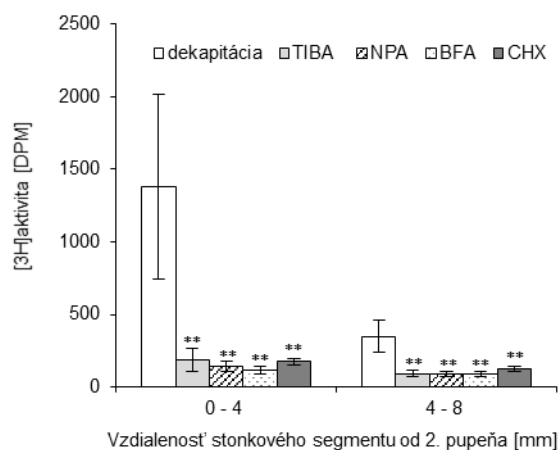
Obr. 37: Schéma experimentu (zelená šípka vedľa pupeňa indikuje jeho vyrastanie): druhý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny ošetrený TIBA-lanolínovou pastou. Hviezdička indikuje, že v ďalších experimentálnych variantoch bol druhý pupeň dekapitovanej rastliny ošetrení buď NPA-lanolínovou pastou, BFA-lanolínovou pastou alebo CHX-lanolínovou pastou.

Najprv bol sledovaný efekt inhibítora transportu auxínu TIBA aplikovaného v podobe lanolínovej pasty na druhý pupeň dekapitovaných rastlín (obr. 37). Ako bolo očakávané, kontinuálne rastúci výhon bol formovaný z prvého axilárneho pupeňa, zatiaľ čo druhý ošetrený pupeň sa v dôsledku aplikácie inhibítora navrátil do stavu dormancie po krátkej perióde počiatočného rastu (obr. 38a). Pre ďalšie testovanie kompetície medzi pupeňmi bola na druhý pupeň aplikovaná kyselina 1-N-naftylftalámová (NPA)-ďalší inhibítor transportu auxínu s odlišným mechanizmom inhibície (Sussman a Goldsmith, 1981). Po dekapitácii a NPA aplikácii boli zistené rovnaké morfológické zmeny ako v prípade použitia TIBA-lanolínovej pasty. Z prvého pupeňa bol formovaný laterálny výhon, zatiaľ čo druhý pupeň bol v raste inhibovaný (obr. 38b). Následne bolo vyrastanie druhého pupeňa ovplyvnené použitím brefeldínu A (BFA), ktorý inhibuje subcelulárnu endocyklózu PIN1 proteínu, a tým blokuje export auxínu z bunky (Morris a Robinson, 1998; Geldner *et al.*, 2001). Zistený výsledok po aplikácii BFA bol podobný ako po ošetrení druhého pupeňa NPA alebo TIBA (obr. 38c), čo opäť umožnilo formovanie laterálneho výhonu z pupeňa prvého (obr. 38d). Nakoniec bola kompetícia medzi dvomi pupeňmi narušená aplikáciou inhibítora proteínovej syntézy cykloheximidu (CHX) (Baliga *et al.*, 1969; Schneider-Poetsch *et al.*, 2010), ktorá viedla k rovnakému výsledku ako u predchádzajúcich variantov.



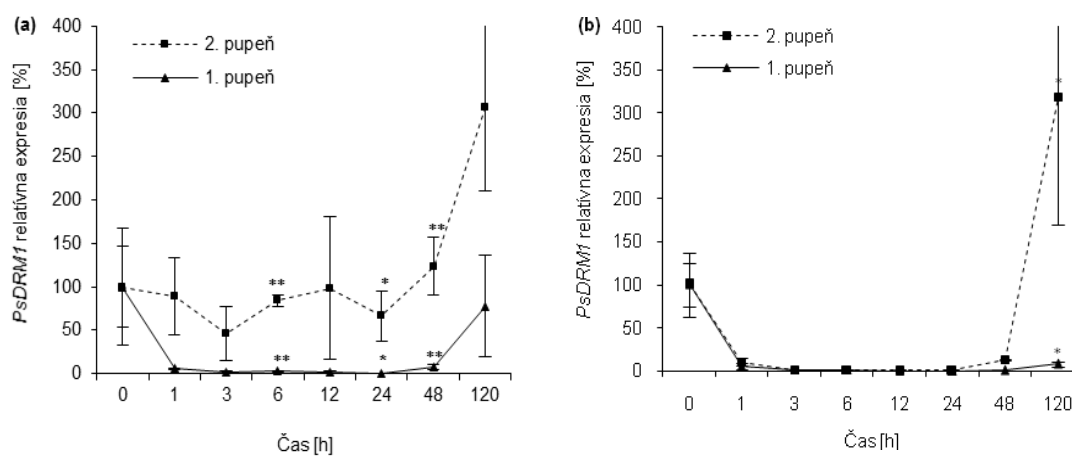
Obr. 38: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1d** = prvý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **1tiba** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným TIBA-lanolínovou pastou, **2tiba** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (a), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1npa** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným NPA-lanolínovou pastou, **2npa** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (b), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1bfa** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným BFA-lanolínovou pastou, **2bfa** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (c), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1chx** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným CHX-lanolínovou pastou, **2chx** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chýbové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$).

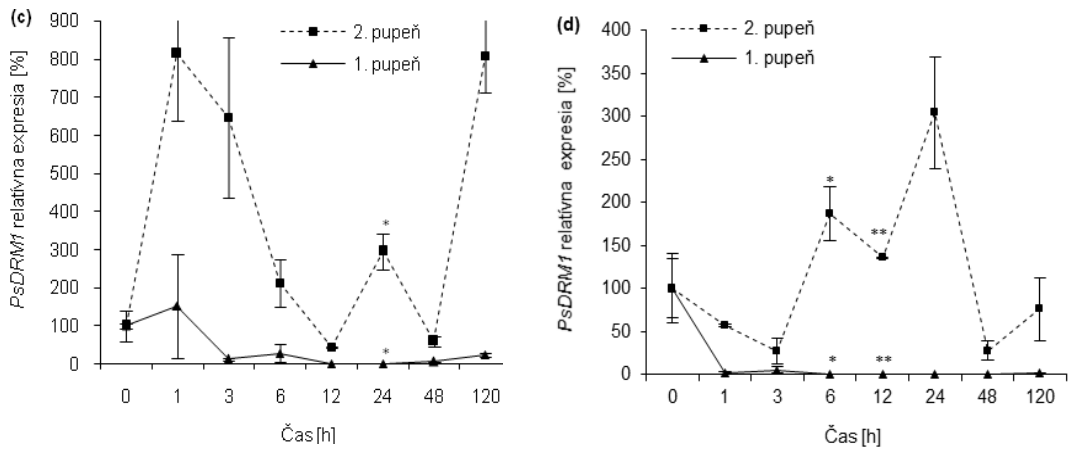
Inhibícia transportu auxínu z druhého axilárneho pupeňa ošetreného rôznymi inhibítormi bola overená testovaním exportu auxínu z tohto pupeňa dekapitovaných rastlín za použitia [^3H] značenej IAA. Analýza ukázala, že NPA, TIBA, BFA i CHX sú silnými inhibítormi exportu auxínu (obr. 39).



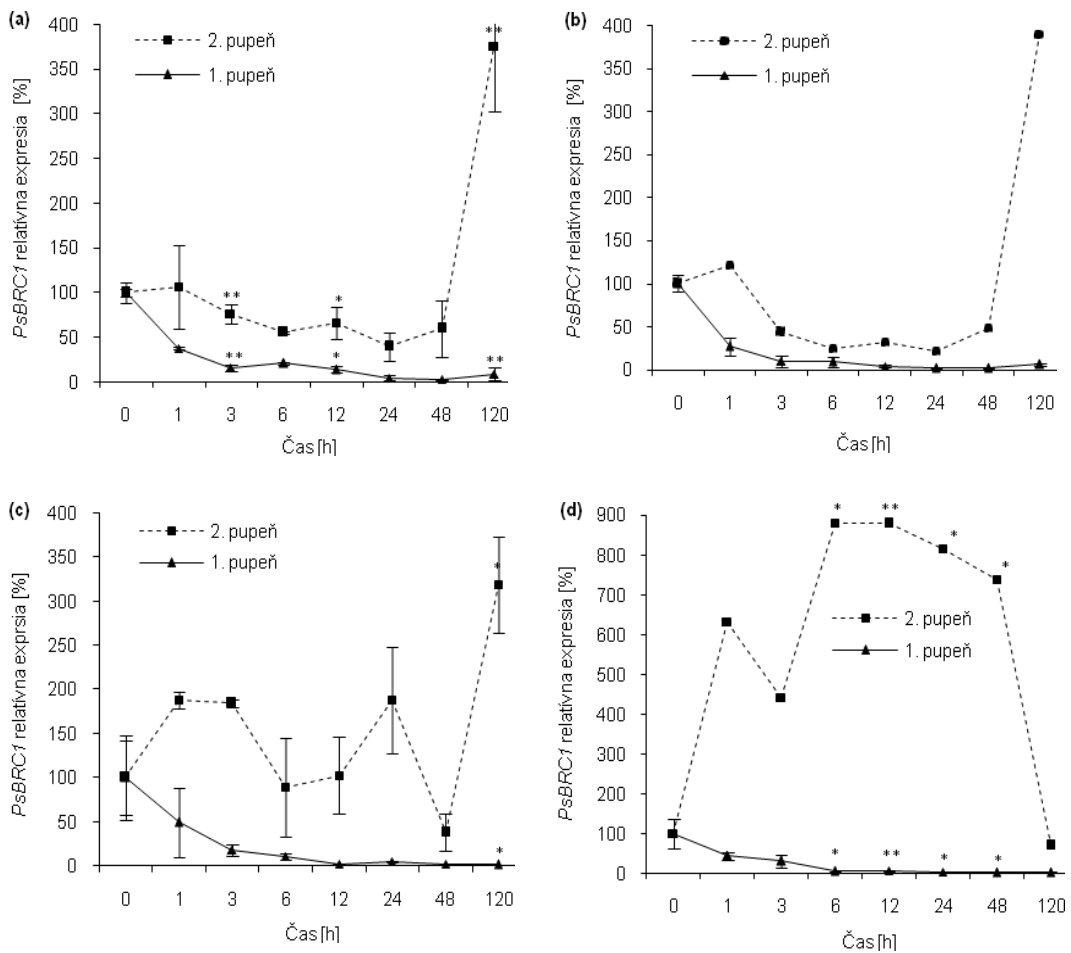
Obr. 39: [³H]IAA export z druhého axilárneho pupeňa dekapitovanej rastliny ošetreného buď TIBA-, NPA-, BFA- alebo CHX-lanolínovou pastou meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm od druhého pupeňa. [³H]IAA bola zbieraná z bázy stonkového segmentu. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Zistené morfológické zmeny boli v súlade s výsledkami získanými z analýzy expresie génov *PsDRM1* a *PsBRC1*, ktoré opäť reflektovali rastúci stav prvého pupeňa, zatiaľ čo niekoľkonásobné zvýšenie ich expresie v ošetrenom druhom pupeni bolo v korelácii s jeho návratom do dormancie (obr. 40a, 40b, 40c, 40d, 41a, 41b, 41c, 41d). Sledované dočasné zníženie expresie génov *PsDRM1* a *PsBRC1* v druhom pupeni ošetrenom inhibítormi, naznačuje, že po dekapitácii dochádza aj u tohto pupeňa k uvoľneniu z dormancie a iniciácii vyrastania. Avšak v dôsledku inhibície transportu auxínu nie je tento pupeň schopný konkurovať pupeňu prvému, ktorý exportuje auxín do hlavnej stonky, preto sa druhý pupeň po krátkej dobe navracia späť do stavu dormancie.





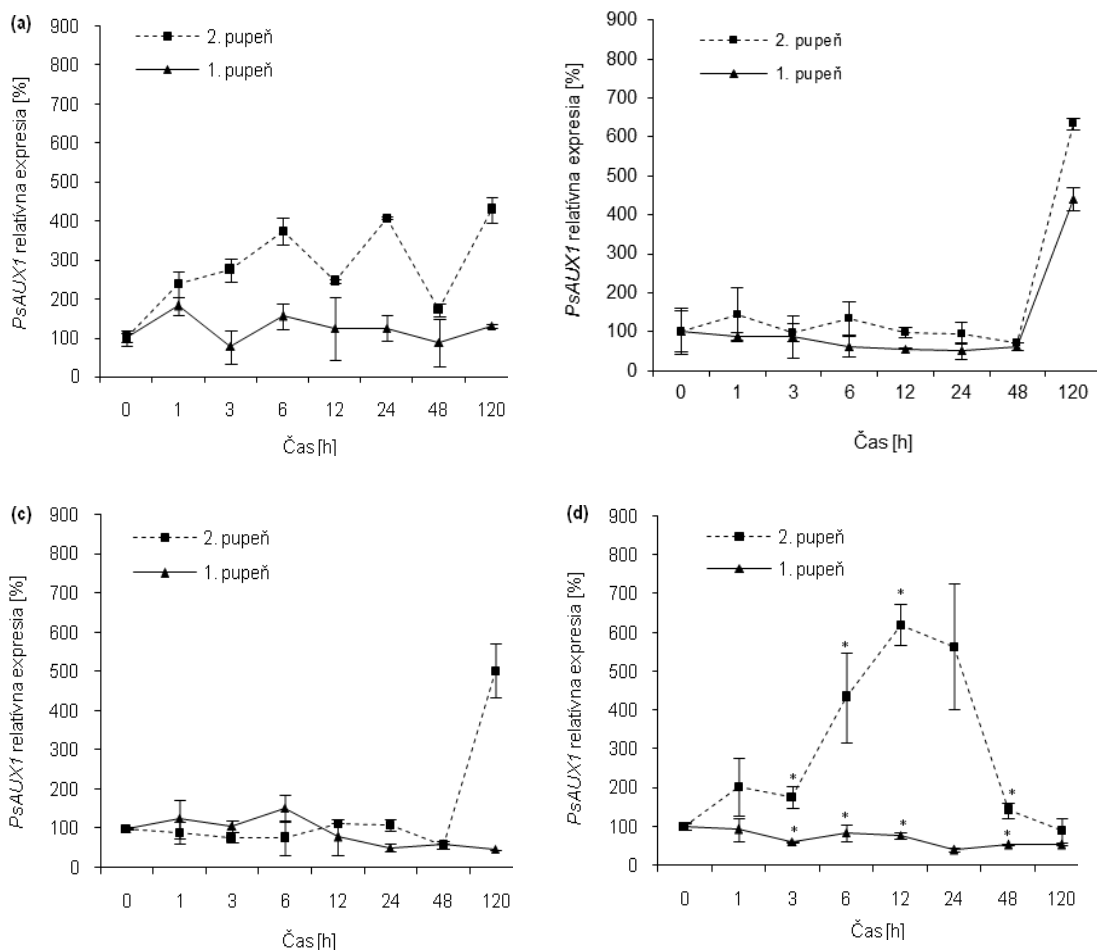
Obr. 40: Relatívna expresia génu *PsDRM1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).



Obr. 41: Relatívna expresia génu *PsBRC1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely

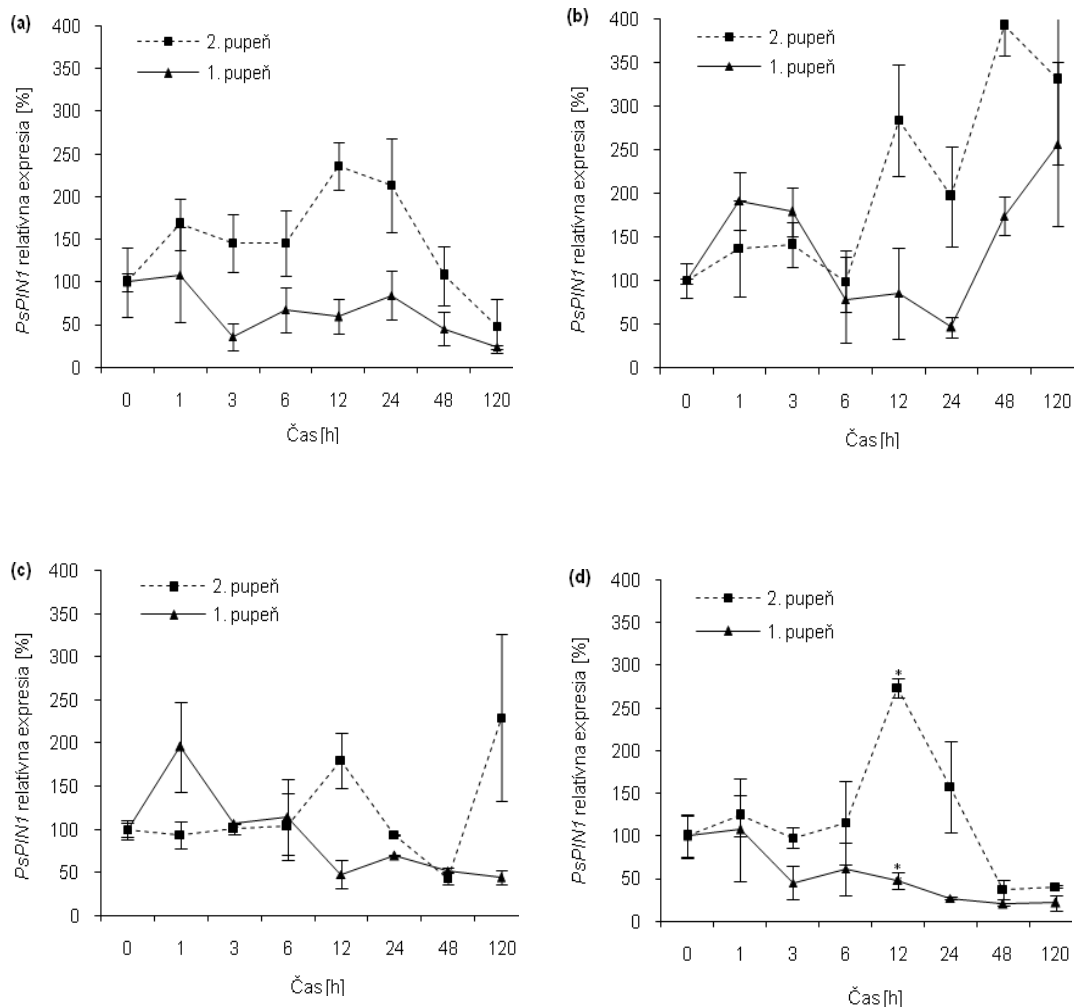
(identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

V prípade génov *PsAUX1* a *PsPIN1* bola zistená vyššia úroveň expresie v druhom ošetrenom axilárnom pupeni v porovnaní s prvým neošetreným pupeňom (obr. 42a, 42b, 42c, 42d, 43a, 43b, 43c, 43d). Vzhľadom na to, že tieto gény kódujú transportné proteíny auxínu a auxín v rámci vlastnej spätne-väzbovej odpovede stimuluje svoj vlastný transport (Benková *et al.*, 2003; Vieten *et al.*, 2005; Scarpella *et al.*, 2010; Bennett *et al.*, 2016), je možné predpokladať, že k zvýšeniu expresie týchto génov dochádzalo v dôsledku akumulácie auxínu v druhom pupeni neschopnom exportovať auxín do hlavnej stonky. Značné zvýšenie génovej expresie v druhom pupeni ošetrenom CHX môže byť spôsobené stimuláciou expresie skorých auxín-responzívnych génov týmto inhibítorom proteínovej syntézy (Soeno *et al.*, 2010).



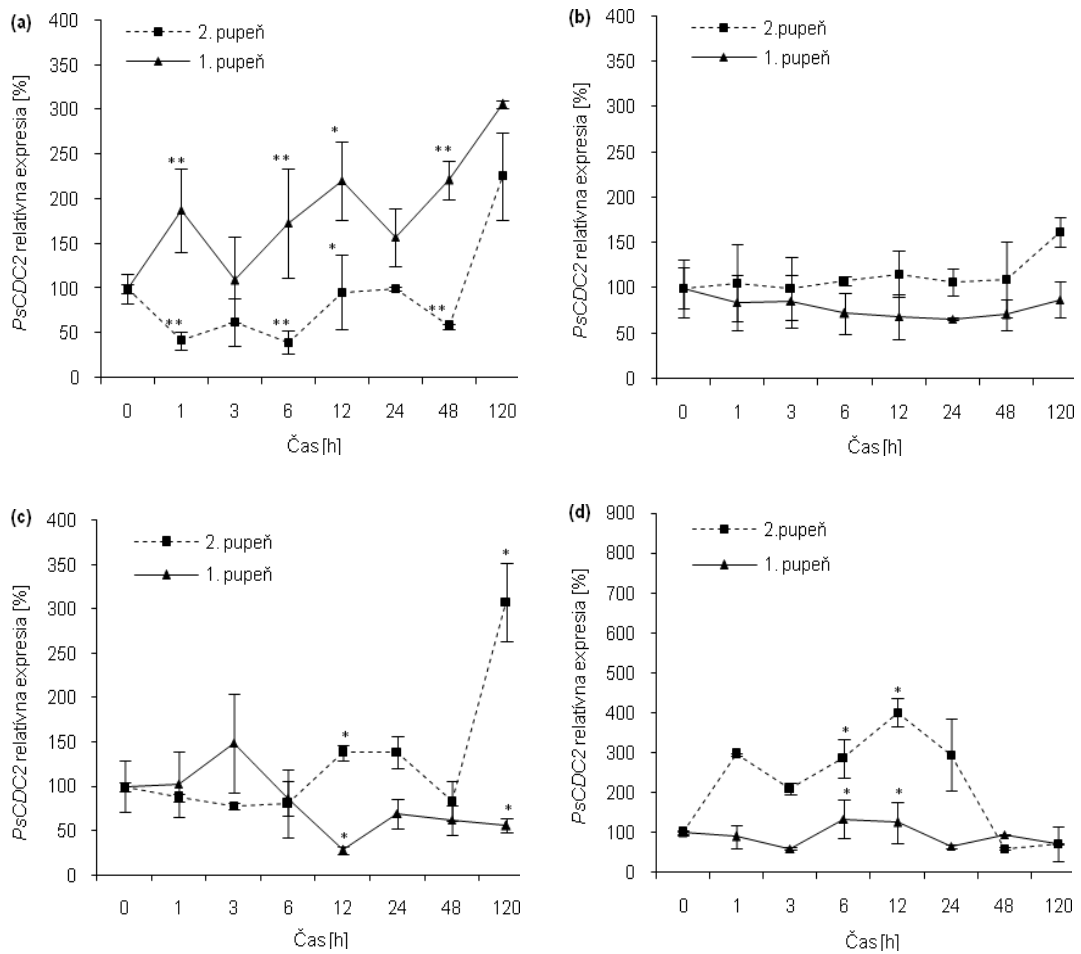
Obr. 42: Relatívna expresia *PsAUX1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou

(c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

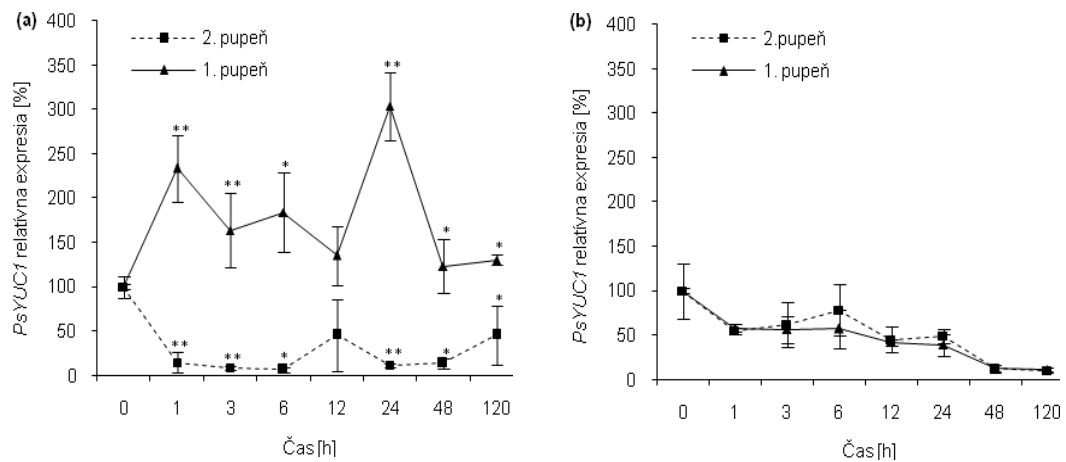


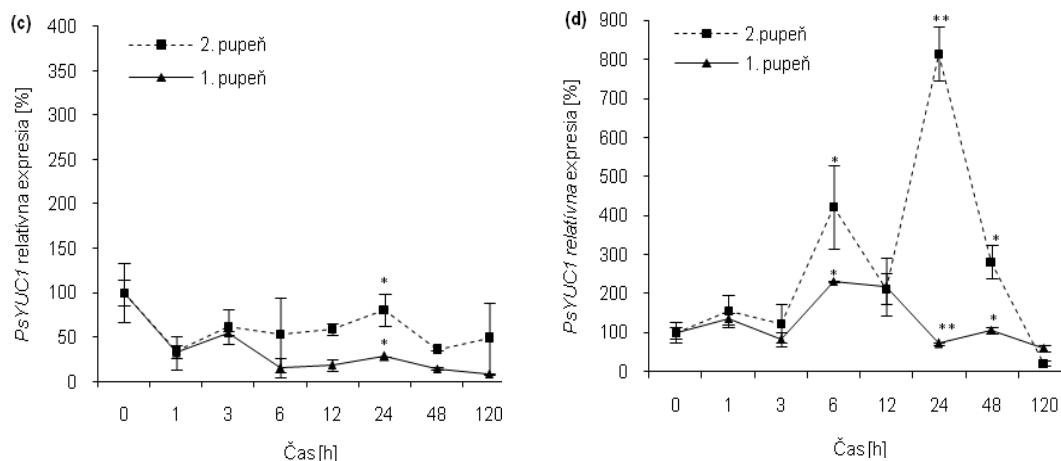
Obr. 43: Relatívna expresia *PsPIN1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrovom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Ďalej bola sledovaná expresia *PsCDC2* a *PsYUC1* génov, ktorých expresia sa významne zvyšovala v prvom pupeni rastlín s ošetrovaným druhým pupeňom TIBA-lanolínovou pastou (obr. 44a, obr. 45a). Zatiaľ čo po aplikácii NPA neboli zistené významné rozdiely v expresii *PsCDC2* a *PsYUC1* medzi prvým a druhým pupeňom (obr. 44b, obr. 45b), inhibícia vyrastania pupeňa BFA-lanolínovou pastou spôsobila mierny nárast expresie obidvoch génov v druhom pupeni v porovnaní s prvým (obr. 44c, obr. 45c). U rastlín, kde bol na druhý pupeň aplikovaný CHX došlo k nárastu expresie v tomto ošetrovanom pupeni a v prvom pupeni bola expresia udržiavaná na približne podobnej úrovni (obr. 44d, obr. 45d).



Obr. 44: Relatívna expresia génu *PsCDC2* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).



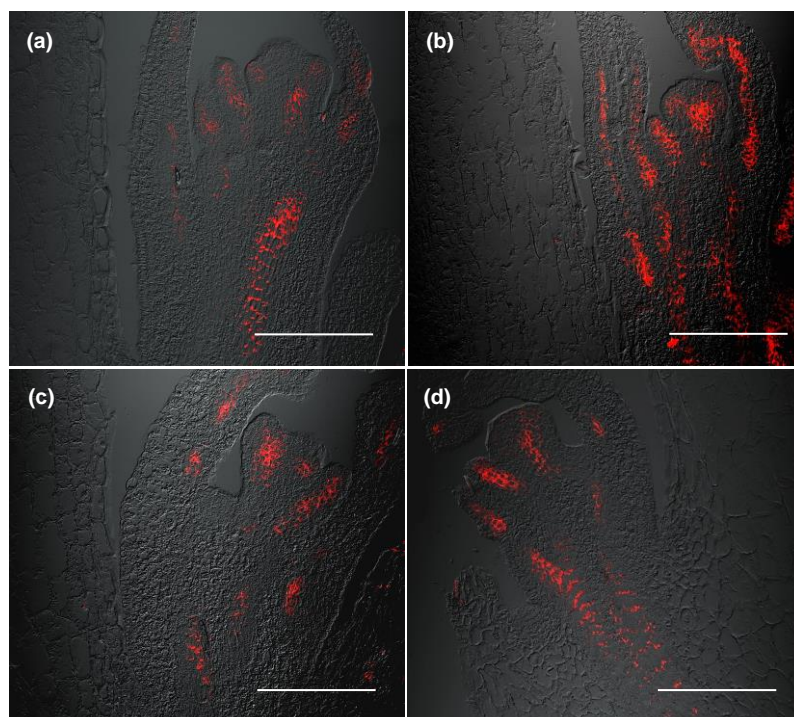


Obr. 45: Relatívna expresia génu *PsYUC1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b), BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Rozdiely v počiatočnom vyrastaní druhého pupeňa, a tiež v expresii vybraných génov medzi jednotlivými variantmi s rôznymi aplikovanými inhibítormi môžu byť vysvetlené ich odlišným pôsobením na PIN transportné proteíny. TIBA blokuje celý pohyb vezikúl a organel medzi cytoplazmatickou membránou a endozomálnymi kompartmentami stabilizáciou aktínových filamentov (Dhonukshe *et al.*, 2008), čo vedie k PIN1 akumulácii na cytoplazmatickej membráne. Podobne aj NPA inhibuje internalizáciu PIN1 proteínov lokalizovaných na cytoplazmatickej membráne, aj keď primárne neovplyvňuje aktínový cytoskelet bunky (Nick *et al.*, 2009). Naopak BFA vedie k internalizácii a PIN1 vyčerpaniu z cytoplazmatickej membrány (Geldner *et al.*, 2001).

V nasledujúcom kroku bolo zisťované pôsobenie aplikovaných inhibítorov na lokalizáciu PIN1 proteínov. Ako bolo pozorované v predchádzajúcich experimentoch, PIN1 proteíny môžu byť vizualizované v prokambiálnych zväzkoch axilárnych pupeňov intaktných rastlín, avšak nie polárnym spôsobom a ich polarizácia sa objavuje až počas uvoľňovania pupeňa z dormancie (Balla *et al.*, 2011). Napriek popísanému efektu na subcelulárnu endocyklózu PIN1 proteínov TIBA-, NPA- alebo BFA-lanolínová pasta aplikovaná na druhý pupeň nezabránila iniciálnej PIN1 polarizácii alebo viditeľne neovplyvnila PIN1 polárnu lokalizáciu ani 24 hodín po aplikácii (obr. 46a, 46b, 46c). Aj keď sú tieto výsledky neočakávané, predovšetkým pri variante s BFA, je pravdepodobné, že efektívna koncentrácia použitých inhibítorov

na pletivá je dostatočná k inhibícii auxínového exportu, ako bolo potvrdené [³H] značenou IAA (obr. 39), ale pritom nezasahuje do PIN1 lokalizácie. Okrem toho je známe, že PIN proteíny sú transportované buď BFA-senzitívnou alebo odlišnou BFA-insenzitívnou dráhou, ktoré boli charakterizované predovšetkým v koreňoch arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) (Geldner *et al.*, 2001, Kleine-Vehn *et al.*, 2011). Na základe tohto je možné usudzovať, že počiatočná PIN1 polarizácia v nadzemnej časti hrachu v porovnaní s koreňom arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) vyžaduje odlišný typ regulátorov transportu PIN1 proteínov, pravdepodobne ten, ktorý je zapojený do BFA-insenzitívnej dráhy. Navyše, imunohistochemická analýza pupeňov ošetrených CHX, ktoré boli tiež efektívne zadržané v dormancii, rovnako ukázala po 24 hodinách štandardnú PIN1 polarizáciu (obr. 46d), podobne ako bolo popísané v koreňoch arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), kde aplikácia CHX nemala žiadny detekovateľný efekt na lokalizáciu PIN1 proteínov na cytoplazmatickej membráne (Geldner *et al.*, 2001).



Obr. 46: Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca polárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách druhého axilárneho pupeňa 24 hodín po jeho ošetrení TIBA-lanolínovou pastou (a), NPA-lanolínovou pastou (b) BFA-lanolínovou pastou (c) alebo CHX-lanolínovou pastou (d) a dekapitácii rastliny. Objektív 20x, mierka predstavuje veľkosť 100 μ m.

Z uvedených výsledkov vyplýva, že po dekapitácii je z dormancie uvoľnený druhý pupeň ošetrovaný inhibítormi rovnako, ako aj neošetrovaný prvý pupeň. Aj napriek aplikácii inhibítorov je do pupeňa pravdepodobne prenesený signál o odstránení apexu ako primárneho zdroja auxínu, čo je v súlade s nepriamou reguláciou apikálnej dominancie a vyrastania pupeňov auxínom. Tým, že na krátku dobu prebieha iniciácia rastu rovnako ako v prvom pupeni tak aj v druhom pupeni, dochádza medzi pupeňmi ku kompetícii. Napriek počiatočnej kompetícii medzi pupeňmi je v dôsledku aplikácie inhibítora zamedzený sústavný export auxínu z druhého pupeňa. Experimenty ukazujú, že inhibícia auxínového exportu z pupeňa spôsobená aplikáciou rôznych inhibítorov zabraňuje jeho trvalému uvoľneniu z dormancie, aj keď bez viditeľného ovplyvňovania PIN1 polarizácie. Inhibíciou druhého pupeňa je umožnené vytvorenie nového zdroja auxínu v prvom pupeni, ktorý následne vyrastá a formuje dominantný laterálny výhon. Toto umožňuje sústavný export auxínu z prvého pupeňa, ktorý tak formuje nový dominantný výhon. Súhrne tieto uvedené výsledky potvrdzujú predchádzajúce zistenia, že po odstránení primárneho zdroja auxínu dochádza medzi potenciálnymi sekundárnymi zdrojmi ku kompetícii o vytvorenie nového zdroja auxínu a obnovu apikálnej dominancie. Zároveň tieto výsledky ukazujú, že pre sústavný rast axilárneho pupeňa a formovanie laterálneho výhonu z neho je potrebná nielen polárna lokalizácia PIN proteínov, ale predovšetkým dostatočná kapacita auxínového exportu z tohto pupeňa.

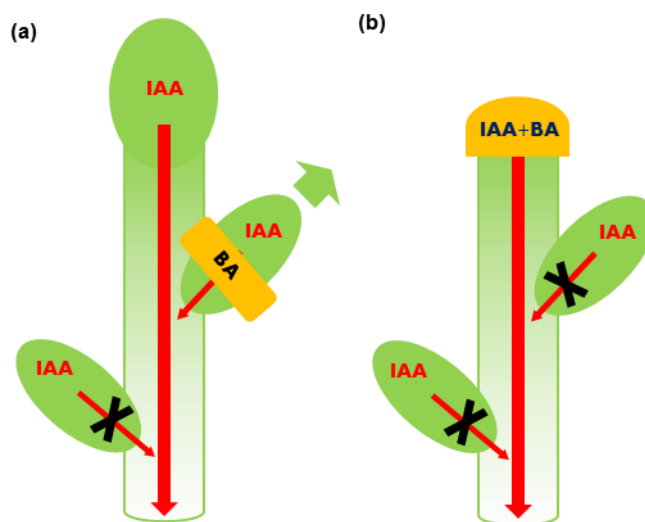
5.6 Cytokiníny stimulujú polárny transport auxínu, čím uvoľňujú axilárne pupene z dormancie

Úloha cytokinínov v interakcii s auxínom v regulácii vyrastania axilárnych pupeňov je známa ako antagonistická (Coenen a Lomax, 1997), vzhľadom na to, že aplikácia cytokinínov priamo na pupeň vedie k uvoľneniu tohto pupeňa z inhibície dokonca aj na intaktných rastlinách (Sachs a Thimann, 1967; Kalousek *et al.*, 2010). Podobne transgénne rastliny arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) exprimujúce bakteriálny *isopentenyl transferase (ipt)* gén, ktorý katalyzuje biosyntézu cytokinínov vykazujú zvýšenú hladinu cytokinínov často spojenú so slabou apikálnou dominanciou a zvýšeným vetviacim fenotypom (Faiss *et al.*, 1997; Eklöf *et al.*, 2000; Böhner a Gatz, 2001). Zároveň môže byť vyrastanie axilárneho pupeňa u intaktných rastlín hrachu (*Pisum sativum* L.), následne po jeho ošetrovaní cytokinínom benzyladenínom (BA),

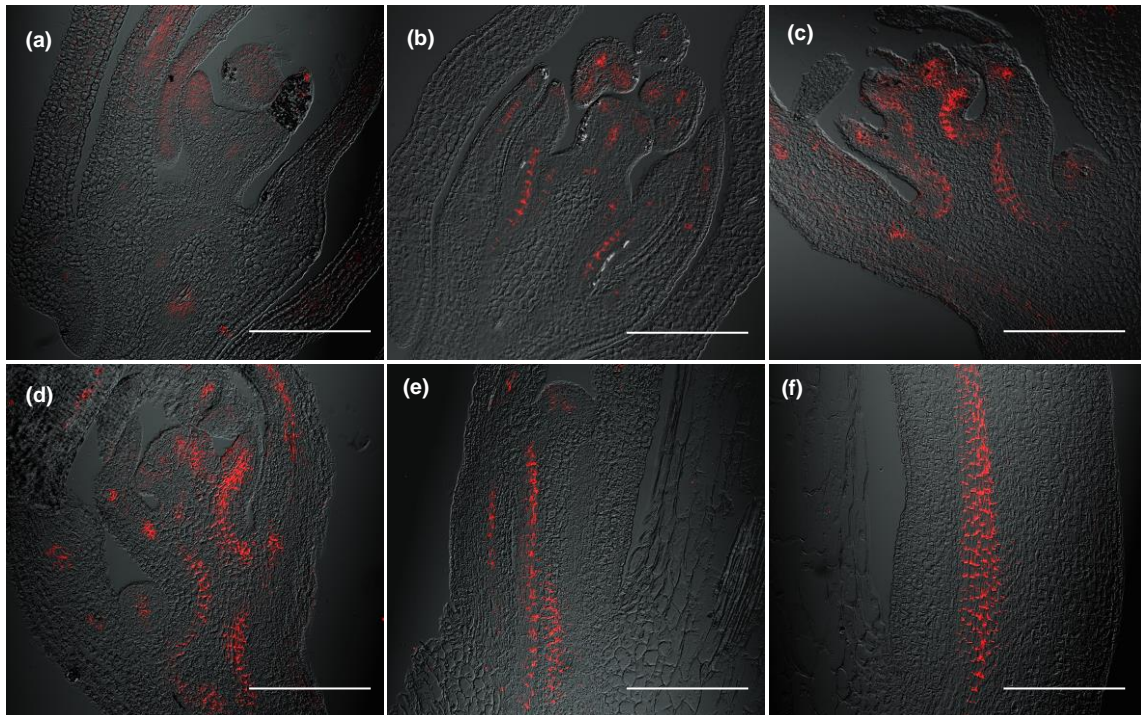
sprevádzané znížením expície markeru dormancie, *PsDRM1* génu (Kalousek *et al.*, 2010).

Proces uvoľnenia pupeňa z vplyvu apikálnej dominancie je spojený s polarizáciou PIN1 proteínov, ktorá v prípade dekapitovaných rastlín začína 4-6 hodín po odstránení apexu a pokračuje následným exportom auxínu z pupeňa (Procházka a Jacobs, 1984; Balla *et al.*, 2011; Bennett *et al.*, 2016). Funkcia cytokinínov vo vyrastaní pupeňov nie je presne známa, preto bolo testované, do akej miery aplikácia cytokinínu vo forme BA-lanolínovej pasty (obr. 47a) ovplyvňuje polarizáciu PIN1 proteínov v axilárnych pupeňoch intaktných rastlín.

Na základe imunolokalizácie bola už po 2 hodinách od aplikácie BA na druhý pupeň sledovaná polárna lokalizácia PIN1 proteínov (obr. 48b). Vzhľadom na to, že po dekapitácii rastliny nastáva polarizácia PIN1 proteínov v axilárnych pupeňoch po 6 hodinách od odstránenia apexu (Balla *et al.*, 2011), výsledky naznačujú, že cytokiníny lokálne stimulujú PIN1 polarizáciu. V priebehu nasledujúcich 4-24 hodín od BA aplikácie bolo pozorované postupné formovanie auxínového kanálu a provaskulárneho spojenia (obr. 48c, 48d, 48e, 48f), ktoré pravdepodobne umožňuje export auxínu a následné vyrastanie pupeňa.



Obr. 47: Schéma experimentu (zelená šípka vedľa pupeňa indikuje jeho vyrastanie): intaktná rastlina ošetrená BA-lanolínovou pastou na druhom axilárnom pupeni. Aplikácia cytokinínu na pupeň môže viesť k jeho uvoľneniu z dormancie. Zelená šípka vedľa pupeňa indikuje jeho vyrastanie (a). Dekapitovaná rastlina ošetrená IAA-lanolínovou pastou na reznú plochu dekapitovanej stonky inhibuje vyrastanie axilárnych pupeňov. Pokiaľ je k IAA-lanolínovej paste pridaný cytokinín benzyladenín (BA), toto ošetrenie prehlbuje inhibíciu vyrastania pupeňov (b).



Obr. 48: Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca polárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách druhého axilárneho pupeňa intaktnej rastliny v čase 0 hodín (a), 2 hodiny (b), 4 hodiny (c), 6 hodín (d), 12 hodín (e) a 24 hodín (f) po jeho ošetrení BA-lanolínovou pastou. Objektív 20x, mierka predstavuje veľkosť 100 μm .

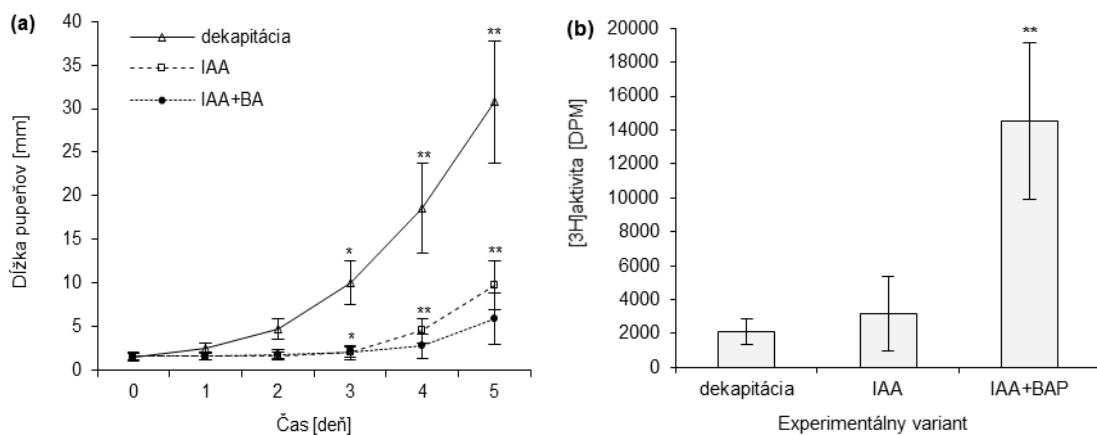
Mechanizmus tejto cytokinínmi riadenej polarizácie môže byť spojený s nedávno popísanou PIN polarizáciou v koreňových bunkách arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), ku ktorej dochádza prostredníctvom vyčerpania PIN proteínov na špecifických polárnych doménach degradáciou vedúcou k pre-usporiadaniu bunkovej PIN polarity (Marhavý *et al.*, 2014).

Okrem tohto stimulačného efektu cytokinínov na vyrastanie pupeňov, je známy tiež ich odlišný efekt pokiaľ sú aplikované spoločne s auxínom. Davies *et al.* (1966) zistili, že súčasná aplikácia kinetínu a IAA na dekapitovanú stonku rastlín fazule (*Phaseolus vulgaris* L.) vedie k omnoho väčšiemu predĺženiu inhibície, ako spôsobuje aplikácia IAA samotnej. Toto môže byť založené na pozitívnej regulácii auxínového toku ako demonštrovali Li a Bangerth (2003), ktorí zaznamenali zvýšený IAA export do stonky z apexu po ošetrení cytokinínmi.

Z tohto dôvodu bolo sledované, ako môžu cytokiníny ovplyvňovať dĺžku periódy, počas ktorej sú pupene zadržané v inhibícii po aplikácii IAA-lanolínovej pasty na reznú plochu dekapitovanej stonky namiesto apexu (obr. 47b). Na základe experimentov bolo zistené, že zatiaľ čo dekapitácia rastlín hrachu vedie k vyrastaniu

druhého axilárneho pupeňa, aplikácia IAA-lanolínovej pasty na reznú plochu dekapitovanej stonky dokáže tomuto vyrastaniu zabrániť až do 3 dňa od dekapitácie a IAA aplikácie (obr. 49a). Pridanie cytokinínu benzyladenínu (BA) k IAA-lanolínovej paste tento časový interval inhibície dokáže významne predĺžiť na 4 dni (obr. 49a).

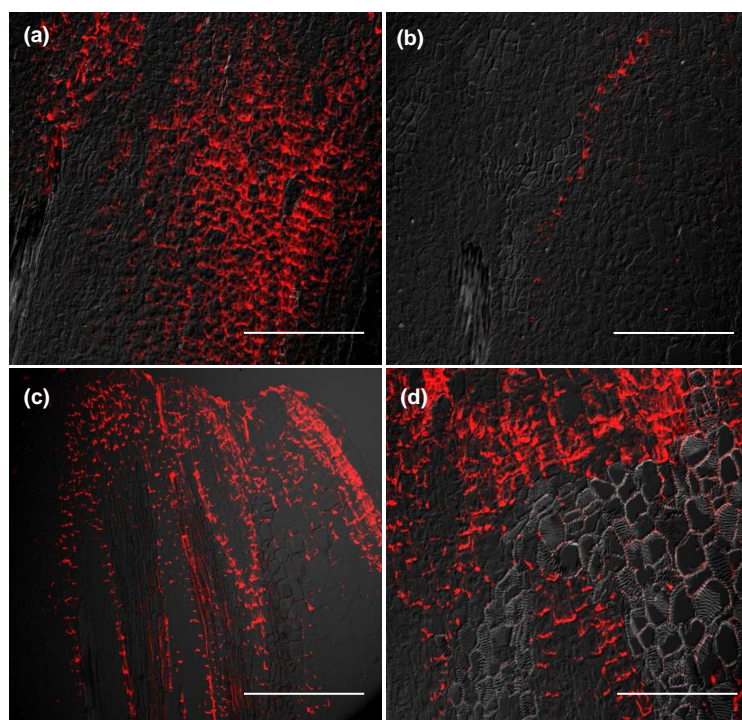
S cieľom sledovať efekt cytokinínov pridaného k IAA-lanolínovej paste na tok auxínu v dekapitovanej stonke bol analyzovaný transport [^3H] značenej IAA. Výsledky ukázali, že po 3 dňoch od ošetrenia pridanie BA významne zvýšilo množstvo transportovaného auxínu v hlavnej stonke v porovnaní s variantom, v ktorom bola na dekapitovanú stonku aplikovaná iba IAA-lanolínová pasta (obr. 49b).



Obr. 49: Rastové krivky predstavujúce veľkosť druhých axilárnych pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **dekapitácia** = kontrolné dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná lanolínová pasta, **IAA** = dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná IAA-lanolínová pasta, **IAA+BA** = dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná IAA-lanolínová pasta s pridaním cytokinínu benzyladenínu (BA). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 60$) (a). [^3H]IAA transport v stonke dekapitovanej rastliny. [^3H]IAA bola aplikovaná na dekapitovanú stonku ošetrovanú buď lanolínovou pastou, IAA-lanolínovou pastou alebo IAA-lanolínovou pastou s pridaním BA. [^3H]IAA bola zbieraná z bázy stonkového segmentu. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$) (b).

Imunolokalizácia PIN1 proteínov v ošetrovej dekapitovanej stonke ukázala, že pridanie BA k IAA-lanolínovej paste viedlo už po 3 dňoch od dekapitácie a aplikácie k vzniku mnohonásobných auxínových kanálov s polárne lokalizovanými PIN1 proteínmi (obr. 50c), čo v prípade aplikácie IAA-lanolínovej pasty bez BA nebolo pozorované (obr. 50a). Okrem toho BA pridanie umožnilo skoršie formovanie

xylémových zväzkov. 5 dní po ošetrení bol auxínový tok kanalizovaný do úzkych kanálov sprevádzaných novými xylémovými zväzkami v oboch experimentálnych variantoch. Či už vo variante so samotnou IAA-lanolínovou pastou aplikovanou na reznú plochu dekapitovanej stonky alebo vo variante, v ktorom bol k IAA-lanolínovej paste pridaný BA, aj keď u rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou doplnenou o BA bol počet formovaných auxínových kanálov výrazne väčší (obr. 50b, 50d). Z týchto pozorovaní vyplýva, že cytokiníny môžu mať vplyv na expresiu a polarizáciu PIN1 proteínov.



Obr. 50: Imunolokalizácia PIN1 proteínov v stonke pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu. Aplikácia IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú plochu stonky vedie po 3 dňoch od aplikácie k masívnej PIN1 polarizácii **(a)** a po 5 dňoch k formovaniu PIN1 značených auxínových kanálov-nových xylémových vlákien **(b)**. Pridanie BA k IAA-lanolínovej paste vedie po 3 dňoch od aplikácie k PIN1 polarizácii sústredenej v mnohonásobných auxínových kanáloch **(c)** a už 3 dní po ošetrení sú formované xylémové zväzky **(d)**. Objektív 20x, mierka predstavuje veľkosť 100 μm .

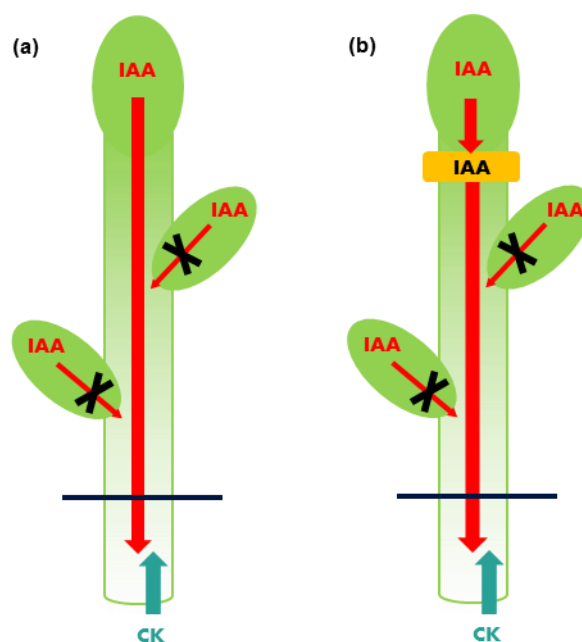
Z uvedených výsledkov vyplýva, že cytokiníny môžu podporovať a urýchľovať polarizáciu PIN1 proteínov, rovnako ako aj auxínový transport, pokiaľ sú aplikované buď na hlavnú stonku rastliny hrachu alebo na axilárne pupene. Týmto mechanizmom môžu cytokiníny regulovať inhibíciu vyrastania axilárnych pupenov závislú od auxínu. Teória kanalizácie auxínu (Prusinkiewicz *et al.*, 2009; Balla *et al.*, 2011) spolu s týmito pozorovaniami, že cytokiníny urýchľujú polarizáciu PIN1 proteínov a následne

podporujú auxínový tok, poskytuje súladné vysvetlenie, ako tie isté cytokiníny, ktoré iniciujú vyrastanie axilárnych pupeňov, keď sa lokálne zvýši ich hladina v pupeni, zároveň zosilňujú inhibíciu vyrastania pupeňov, keď sú aplikované apikálne na hlavnú stonku.

5.7 Polárny transport auxínu v stonke reguluje hladinu cytokinínov v xyléme

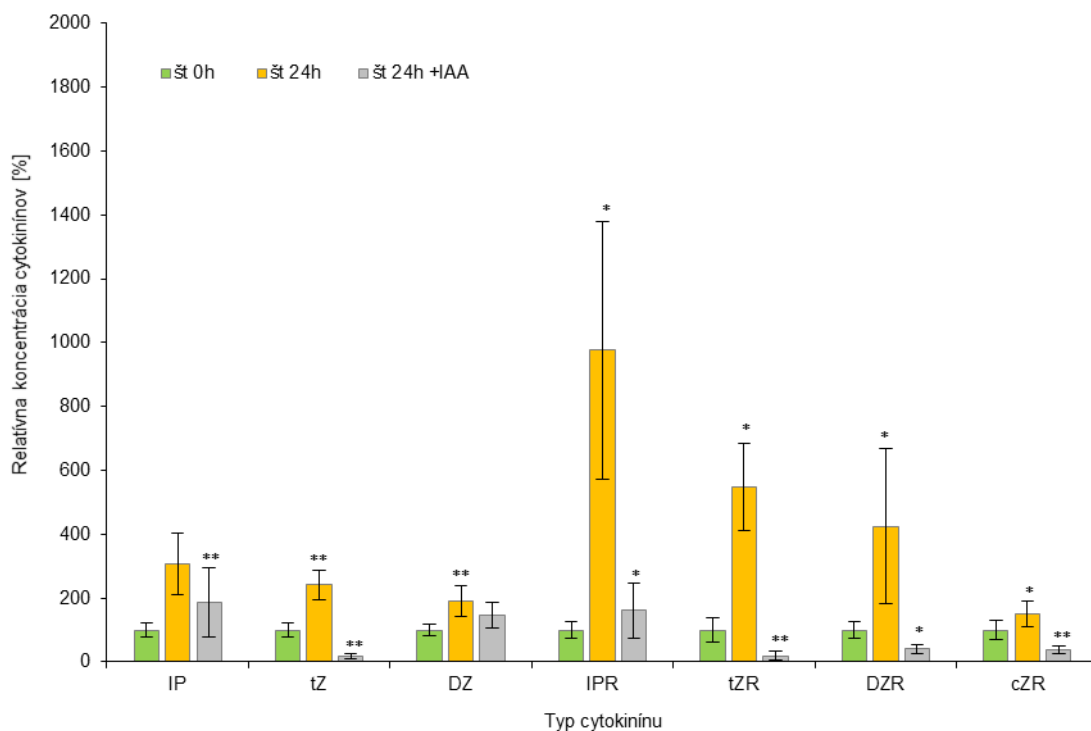
Auxín sa v polárnom transportnom systéme pohybuje smerom zo stonky do koreňa (Morris *et al.*, 2004; Blakeslee *et al.*, 2005), ktorý predstavuje hlavné miesto biosyntézy cytokinínov (Bangerth, 1994), odkiaľ sú cytokiníny prenášané do nadzemnej časti v xyléme (Kiba *et al.*, 2013). Predchádzajúce experimenty ukázali, že cytokiníny môžu prostredníctvom ovplyvňovania lokalizácie PIN1 proteínov transportujúcich auxín regulovať vyrastanie pupeňov na lokálnej úrovni. V nasledujúcich experimentoch bolo sledované zapojenie cytokinínov v auxínom regulovanom stonkovom vetvení na systémovej úrovni, pričom boli analyzované zmeny v hladine cytokinínov v xylémovom exsudáte (X-CK) v odpovedi na zmeny v hladinách auxínu v nadzemnej časti.

Predpokladá sa, že X-CK hrajú významnú úlohu v regulácii stonkového vetvenia, a tiež, že ich hladina je regulovaná auxínovým tokom v hlavnej stonke (Bangerth, 1994). Hladina endogénnych cytokinínov v xylémovom exsudáte bola preto najprv zisťovaná u intaktných rastlín (obr. 51a), u ktorých je sústavný auxínový tok v hlavnej stonke zabezpečovaný jeho polárnym transportom z apexu stonky. Súčasne bola analyzovaná hladina X-CK u intaktných rastlín, u ktorých bola exogénne aplikovaná IAA-lanolínová pasta pod apex stonky (obr. 51b) s cieľom zvýšiť endogénnu hladinu auxínu transportovaného v hlavnej stonke.



Obr. 51: Schéma experimentu: auxín transportovaný z apexu do stonky intaktnej rastliny zabraňuje kanalizácii auxínu a jeho exportu z axilárneho pupeňa, pričom reguluje hladinu cytokinínov transportovaných z koreňa v xylémovom exsudáte (a). Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty na stonku pod apex intaktnej rastliny vedie k zosilneniu antagonistického účinku auxínu na hladinu cytokinínov transportovaných z koreňa do stonky (b).

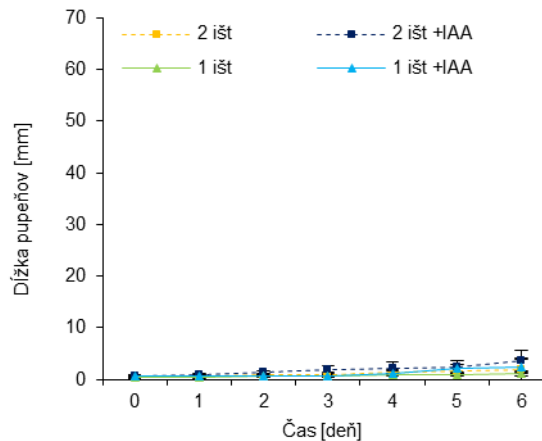
Analýza hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte ukázala, že v priebehu 24 hodín sa u intaktných rastlín významne zvýšila hladina všetkých sledovaných typov cytokinínov, predovšetkým ich prekursorov IPR (izopentenyladenín ribozid), *t*ZR (*trans*-zeatín ribozid) a DZR (dihydrozeatín ribozid) (obr. 52). Na základe tohto je možné predpokladať, že s postupným rastom rastliny sa z koreňa translokované prekuzory, resp. zásobné formy cytokinínov, následne premieňané na aktívne formy, uplatňujú v regulácii rastových a vývojových procesov v nadzemnej časti. Takým procesom významne regulovaným prítomnými cytokinínmi môže byť aj zakladanie a vývoj axilárnych pupeňov, vzhľadom na to, že násobne mutantné rastliny arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) *ipt1ipt3ipt5ipt7* a *ipt3ipt5ipt7* majú významne redukovaný počet založených axilárnych pupeňov v úžľabí listov (Müller *et al.*, 2015). Okrem toho, ako bolo uvedené vyššie, prítomnosť cytokinínov v hlavnej stonke môže v dôsledku modulácie lokalizácie PIN1 proteínov ovplyvňovať silu auxínového toku v stonke, a tým regulovať proces apikálnej dominancie.



Obr. 52: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte u intaktných rastlín hrachu štandardného typu a z intaktných rastlín ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom. Prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS) boli analyzované izoprenoidné cytokiníny IP-typu, tZ-typu a DZ-typu. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

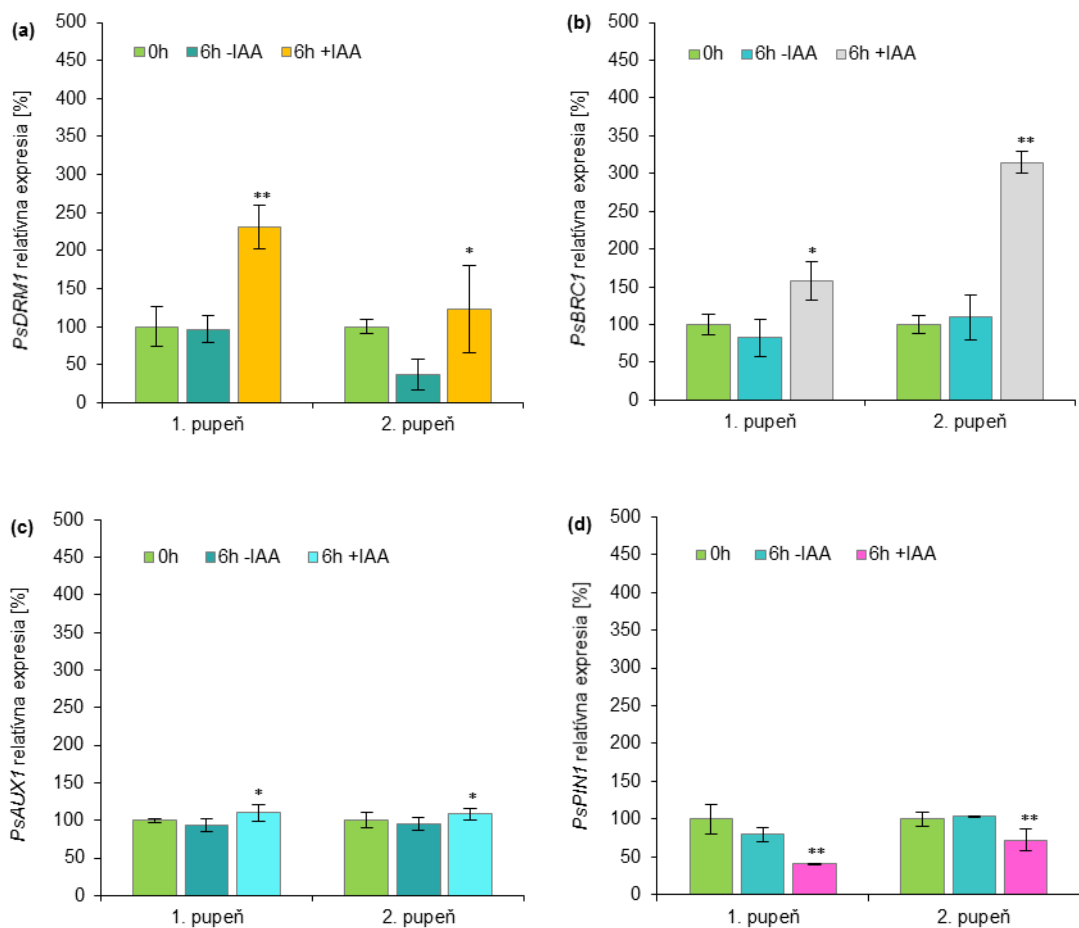
Zosilnenie auxínového toku v hlavnej stonke exogénnou aplikáciou auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty pod apex stonky (obr. 51b) viedlo v priebehu 24 hodín od aplikácie k významnému zníženiu hladiny všetkých stanovovaných X-CK v porovnaní s neošetrenými intaktnými rastlinami (obr. 52). Na základe týchto výsledkov je možné usudzovať, že množstvo auxínu transportované polárnym transportným systémom z nadzemnej časti do koreňa reguluje množstvo cytokinínov transportovaných z koreňa do stonky xylémom, čo je v súlade so zistenou reguláciou cytokinínov auxínom (Bangerth, 1994; Li *et al.*, 1995). Koordinovaná modulácia hladín obidvoch hormónov pritom zabezpečuje, aby nedochádzalo v nadzemnej časti rastliny k obmedzovaniu kontinuálnych rastových a vývojových procesov vyžadujúcich cytokiníny a zároveň k narušovaniu apikálnej dominancie. Toto bolo zistené i na úrovni fenotypu, kde nebolo pozorované žiadne vyrastanie axilárnych pupeňov u intaktných rastlín (obr. 53). Rovnako aj u intaktných rastlín ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou

zostávali axilárne pupene naďalej v inhibovanom stave (obr. 53) v dôsledku dominancie vrcholu stonky, ktorého nadvláda nad pupeňmi sa aplikáciou auxínu ešte zosilnila.



Obr. 53: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1išt** = prvý axilárny pupeň na intaktnej rastline hrachu štandardného typu, **2išt** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1išt+IAA** = prvý pupeň na intaktnej rastline ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2išt+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

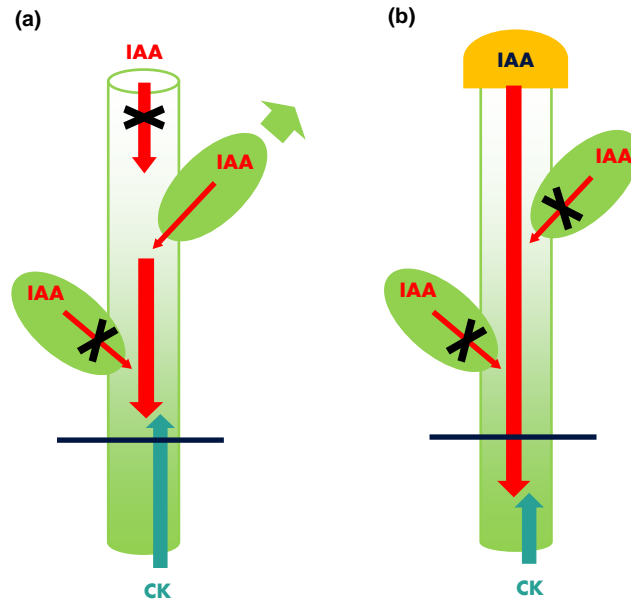
Pre sledovanie efektu systémového signálu X-CK na lokálnu reguláciu dormantného stavu pupeňov bola stanovená expresia génov *PsDRM1*, *PsBRC1*, *PsAUX1* a *PsPIN1* v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných rastlín a intaktných rastlín ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. V oboch axilárnych pupeňoch intaktných rastlín bola v priebehu 6 hodín udržiavaná expresia všetkých štyroch sledovaných génov bez významných zmien na približne rovnakej úrovni (obr. 54a, 54b, 54c, 54d). Exogénna aplikácia auxínu však spôsobila u intaktných rastlín významné zvýšenie úrovne transkriptu génov *PsDRM1* (obr. 54a) a *PSBRC1* (obr. 54b) súvisiacich s dormantným stavom pletív, resp. pupeňov. Naopak, expresia génu kódujúceho transportné proteíny auxínu *PsPIN1* sa výrazne znížila (obr. 54d) a u expresie *PsAUX1* bol zistený mierny nárast po 6 hodinách od aplikácie exogénneho auxínu v porovnaní s expresiou vybraných génov v axilárnych pupeňoch neošetrovaných kontrolných rastlín v rovnakom čase (obr. 54a, 54b, 54c, 54d).



Obr. 54: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c) a *PsPIN1* (d) v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných rastlín a intaktných rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

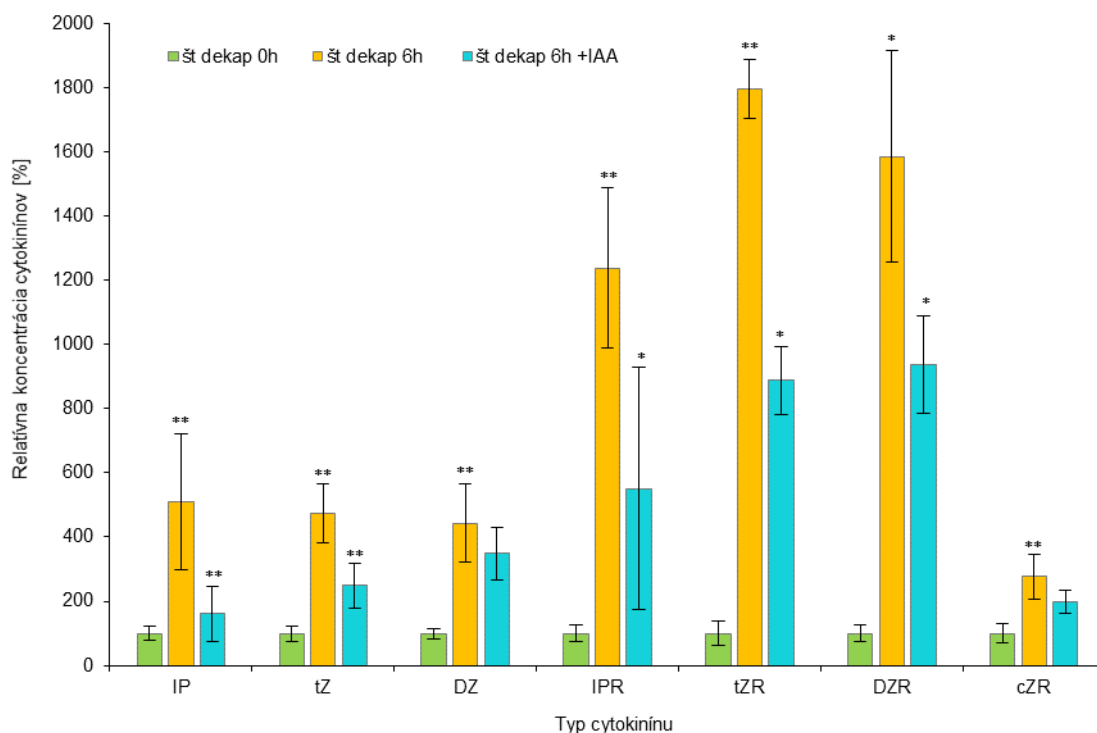
Expresné profily sledovaných génov v axilárnych pupeňoch indikujú, že po exogénnej aplikácii auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty pod apexom stonky intaktnej rastliny nastalo zosilnenie inhibičného vplyvu auxínu syntetizovaného v primárnom zdroji auxínu - apexe stonky na vyrastanie axilárnych pupeňov, čo odráža predovšetkým nárast expresie génov spojených s dormantným stavom pletív.

Ďalej bola nevyhnutnosť toku auxínu transportovaného z apexu v hlavnej stonke v udržiavaní nízkej hladiny X-CK, a tým aj inhibícii vyrastania axilárnych pupeňov sledovaná za použitia dekapitovaných rastlín (obr. 55a) a rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanú plochu stonky (obr. 55b).



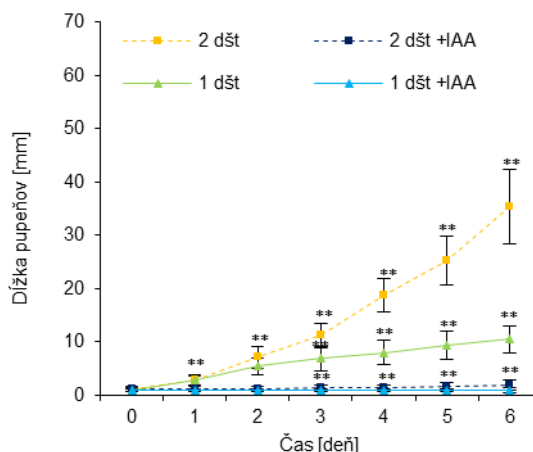
Obr. 55: Schéma experimentu: odstránenie apexu ako primárneho zdroja auxínu dekapitáciou vedie k postupnému vytvoreniu nového zdroja auxínu v druhom axilárnom pupeňom, ktorý sa stáva dominantným nad prvým axilárnym pupeňom, v priebehu čoho dochádza k zvýšeniu hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte (a). Exogénna aplikácia IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú plochu stonky namiesto apexu dokáže vplyv tohto odstráneného apexu v zmysle primárneho zdroja auxínu nahradiť a udržať hladiny cytokinínov na úrovni podobnej v rastlinách intaktných (b).

V prípade odstránenia primárneho zdroja auxínu - apexu stonky dekapitáciou bolo zistené niekoľkonásobné zvýšenie hladiny všetkých typov analyzovaných X-CK v priebehu 6 hodín od dekapitácie, pričom najvýraznejšie zmeny boli zistené opäť u prekursorov cytokinínov IPR, *t*ZR a DZR (obr. 56). Exogénnou aplikáciou auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty namiesto odstráneného vrcholu stonky bol obnovený inhibičný vplyv auxínu transportovaného z apexu na zvyšovanie hladiny X-CK. U takto ošetrovaných rastlín bola hladina X-CK významne znížená v priebehu 6 hodín od dekapitácie a IAA aplikácie v porovnaní s dekapitovanými rastlinami (obr. 56). Podobne aj Blažková *et al.* (1999) pozorovali, že dekapitácia spôsobuje už po 6 hodinách zvyšovanie hladiny cytokinínov v axilárnych pupeňoch, pričom aplikácia IAA na dekapitovanú stonku tomuto nárastu hladiny cytokinínov zabránila. Významnejšie zvýšenie cytokinínov pritom pozorovali u transportných foriem cytokinínov. Podobné zmeny v hladinách cytokinínov po dekapitácii v axilárnych pupeňoch sledovali aj Turnbull *et al.* (1997) u cíceru (*Cicer arietinum* L.)



Obr. 56: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných rastlín a z dekapitovaných rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanej ploche stonky. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, tZ-typu a DZ-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Všetky zaznamenané zmeny v hladinách X-CK boli v korelácii so zmenami na úrovni fenotypu rastlín. Odstránenie zdroja auxínu - apexu stonky dekapitáciou a následné zvýšenie hladiny X-CK viedlo k vyrastaniu prvého i druhého axilárneho pupeňa (obr. 57). Naopak aplikáciou exogénneho auxínu na dekapitovanú plochu stonky bol nahradený auxín produkovaný apexom stonky a v súlade so zníženou hladinou X-CK zostali aj axilárne pupene zadržané v dormancii a nedochádzalo k ich vyrastaniu (obr. 57). Rovnako ako aj Foo *et al.* (2007) zistili najmenej dvojnásobné zvýšenie hladiny X-CK u hrachu (*Pisum sativum* L.) po dekapitácii, tak aj Bangerth (1994) pozoroval na dekapitovanej rastline fazule (*Phaseolus vulgaris* L.) vyrastanie pupeňov sprevádzané zvýšením hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte, pričom obidva efekty boli potlačené exogénnou aplikáciou IAA namiesto dekapitovaného apexu.



Obr. 57: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1dšt**=prvý axilárny pupeň na dekapitovanej rastline hrachu štandardného typu, **2dšt**=druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1dšt+IAA**=prvý pupeň na dekapitovanej rastline ošetrenej IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanú plochu stonky, **2dšt+IAA**=druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

U rastlín nadzemná časť a korene spolu komunikujú s cieľom synchronizovať a zlepšovať rastové odpovede k environmentálnym zmenám. Vzájomná rastová koordinácia vyžaduje komunikáciu sprostredkovanú signálnymi molekulami, ktoré sa pohybujú medzi nadzemnými a podzemnými časťami rastliny. Hlavnými signálmi prenášanými medzi koreňom a stonkou sú cytokiníny, ktoré sú translokované oboma smermi - z koreňa do stonky i zo stonky do koreňa (Hirose *et al.*, 2008; Kudo *et al.* 2010) a auxín, ktorý sa pohybuje zo stonky do koreňa (Blakeslee *et al.*, 2005; Morris *et al.*, 2004). Interakcia týchto signálov umožňuje rastline kontinuálne sa adaptovať na neustále sa meniace podmienky okolitého prostredia. Translokácia cytokinínov z koreňa je kľúčová pre správny rast a vývoj nadzemnej časti rastliny, čo zistili Ko *et al.* (2014) na vrúbľovaných *atabcg14* mutantných rastlinách arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.), u ktorých koreň mutantný v géne *AtABCG14*, kódujúcom proteín zodpovedný za translokáciu cytokinínov do stonky, viedol k narušeniu rastu nadzemnej časti štandardného typu. Podobne aj Müller *et al.* (2015) na základe experimentov s mutantnými rastlinami arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) *ipt1*, *ipt3*, *ipt5* a *ipt7* a násobnými mutantnými rastlinami *ipt1ipt3ipt5ipt7* a *ipt3ipt5ipt7* ukázali, že prítomnosť cytokinínov je pre vetvenie rastliny nevyhnutná. Odstránením apexu dekapitáciou dochádza k zvyšovaniu hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte, podobne ako aj k zvyšovaniu expresie *IPT* biosyntetických génov v stonke hrachu

(Tanaka *et al.*, 2006), čo môže byť zodpovedné za rýchle zvýšenie hladiny cytokinínov v mieste stonky pri v axilárnom pupeni (Li *et al.*, 1995; Turnbull *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 2006). Avšak, aj keď sa hladina cytokinínov môže zvyšovať priamo v stonke, cytokiníny produkované v koreni sú schopné kompenzovať redukciiu cytokinínov v nadzemnej časti (Müller *et al.*, 2015). Zatiaľ čo cytokiníny, či už aplikované priamo na pupeň alebo dodané xylémovým tokom, vetveniu podporujú (Dun *et al.*, 2009), exogénna aplikácia auxínu na reznú plochu dekapitovanej stonky vetveniu redukuje (Sachs a Thimann, 1967; Turnbull *et al.*, 1997; Dun *et al.*, 2012; obr. 57).

Vzájomná interakcia auxínu a cytokinínu je známa ako antagonistická (Coenen a Lomax, 1997), čo sa prejavuje znižovaním hladiny X-CK (Bangerth, 1994; obr. 52, 56) alebo cytokinínov v stonke auxínom (Nordström *et al.*, 2004). Avšak korelácia medzi hladinou X-CK alebo expresiou cytokinínových biosyntetických génov, hladinou auxínu a aktivitou pupeňov (Cline *et al.*, 1994; Turnbull *et al.*, 1997; Bangerth *et al.*, 2000; Nordström *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2006) je nevyhnutná pre optimálne formovanie stonkovej architektúry v odpovedi na podmienky okolitého prostredia.

Uvedené výsledky predstavujú ďalšie doklady o regulácii hladiny cytokinínov v xyléme polárne transportovaným auxínom v hlavnej stonke a súčasne ukazujú na zapojenie cytokinínov do regulácie stonkového vetvenia koordinovaného auxínom na systémovej úrovni.

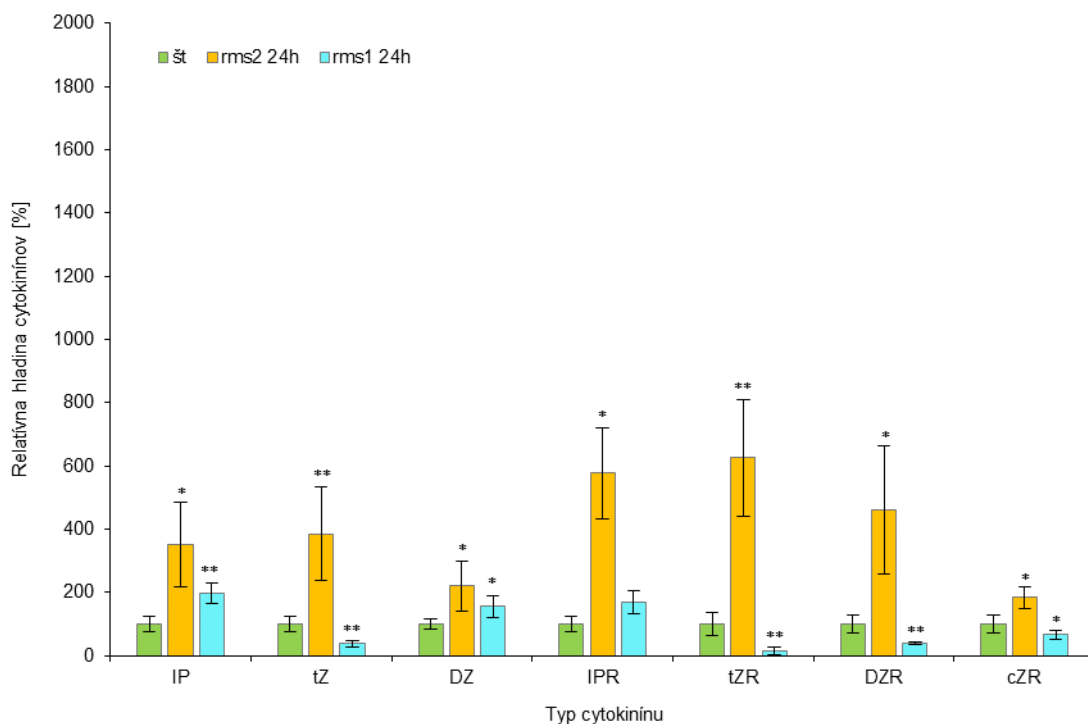
5.8 Auxín reguluje vetvenie u mutantných rastlín hrachu *rms2*

Pre ďalšie sledovanie systémovej regulácie stonkového vetvenia cytokinínmi a ovplyvňovania ich hladiny auxínom boli použité mutantné rastliny hrachu (*Pisum sativum* L.) *ramosus2* (*rms2*) na pozadí štandardného typu odrody Parvus.

Mutantné rastliny *rms2* majú na rozdiel od ostatných strigolaktónových mutantných rastlín (napr. *rms1*) zvýšenú hladinu cytokinínov v xylémovom exsudáte v porovnaní so štandardným typom (Beveridge *et al.*, 1997b; Foo *et al.*, 2007; obr. 58). Zároveň majú rastliny tejto mutantnej línie zníženú expresiu biosyntetického génu strigolaktónu *RMS1* v stonkových pletivách (Foo *et al.*, 2005). Predpokladá sa, že *RMS2* gén, má funkciu v spätnej väzbe, ktorá reguluje oboje – export cytokinínov z koreňa a biosyntézu strigolaktónov (Beveridge *et al.*, 1994, Beveridge *et al.*, 1997b; Dun *et al.*, 2009). Z týchto dôvodov predstavujú *rms2* mutantné rastliny hrachu so zvýšeným stonkovým vetvením vhodný systém pre súčasné sledovanie úlohy viacerých

endogénnych faktorov zúčastňujúcich sa na utváraní stonkovej architektúry. Tými sú predovšetkým auxín, cytokiníny a ich vzájomná interakcia, rovnako ako aj spätnoväzbový regulačný signál strigolaktónovej dráhy, za ktorý je považovaný práve *RMS2* (Foo *et al.*, 2007).

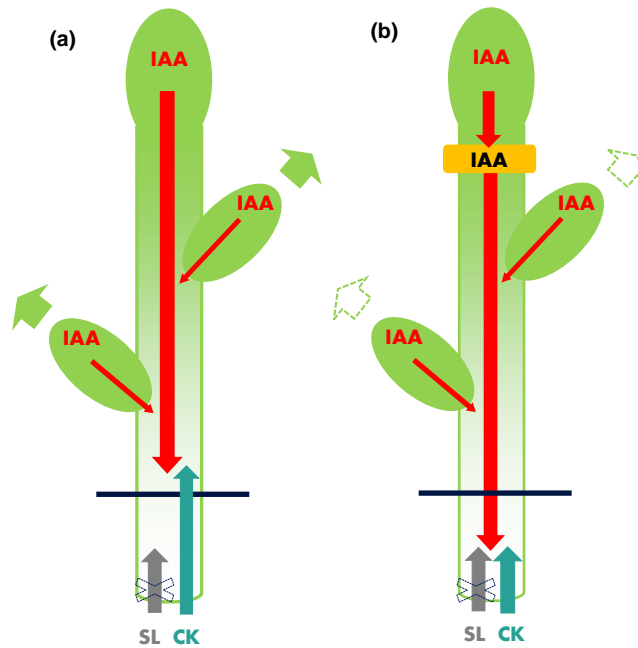
Za zvýšené stonkové vetvenie u intaktných rastlín *rms2*, ku ktorému dochádza u tejto mutantnej línie aj napriek prítomnosti apexu stonky, pritom môže byť zodpovedná kombinácia zvýšenej transportnej kapacity auxínu (Beveridge *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 2001), zvýšenej hladiny X-CK a zníženej hladiny strigolaktónu ako následku nízkej expresie *RMS1* génu (Dun *et al.*, 2009).



Obr. 58: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte intaktných mutantných rastlín *rms2* a *rms1* porovnaná s hladinou v intaktných rastlinách štandardného typu. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, *tZ*-typu a *DZ*-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

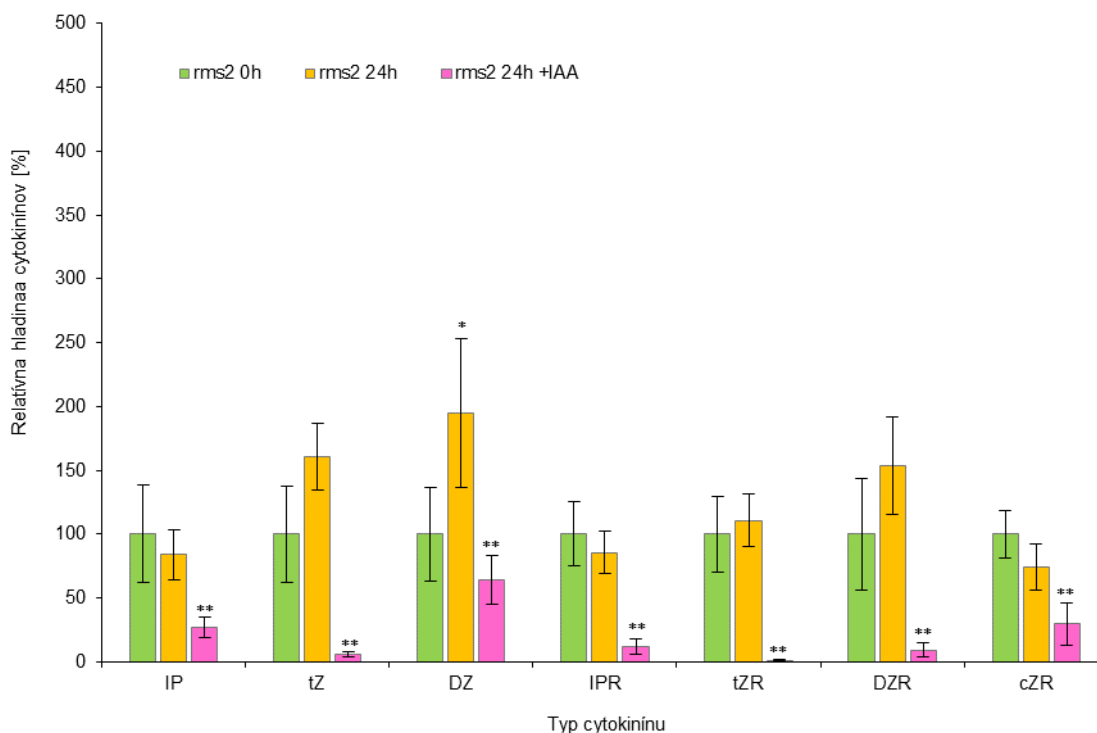
V predchádzajúcich experimentoch s rastlinami štandardného typu bolo zistené, že exogénnou aplikáciou auxínu môže byť hladina X-CK významne znížená (obr. 52) a vyrastanie axilárnych pupeňov u dekapitovaných rastlín tým zamedzené (obr. 56). Auxín navyše indukuje expresiu strigolaktónových biosyntetických génov (*RMS1*

a *RMS5*) (Sorefan *et al.*, 2003; Bainbridge *et al.*, 2005; Foo *et al.*, 2005; Ishikawa *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006; Arite *et al.*, 2007; Hayward *et al.*, 2009; Wen *et al.*, 2016) a zároveň potlačuje biosyntézu cytokinínov v stonke (Tanaka *et al.*, 2006; Dun *et al.*, 2012). Na základe týchto poznatkov boli v nasledujúcich experimentoch intaktné mutantné rastliny *rms2* ošetrené auxínom v podobe IAA-lanolínovej pasty pod apexom stonky (obr. 59b) s cieľom zosilniť vplyv auxínu syntetizovaného v apexe, naplniť tak kapacitu auxínového transportného systému a následne sledovať odpoveď rastliny.



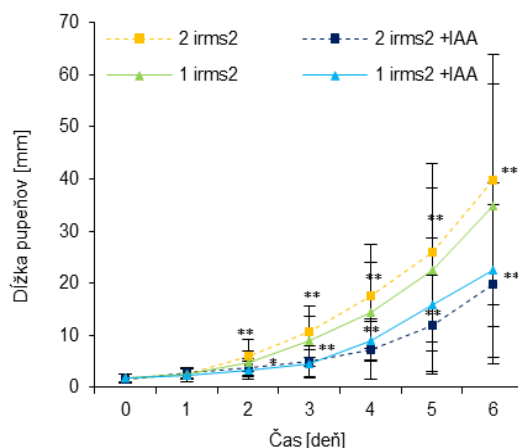
Obr. 59: Schéma experimentu: intaktné rastliny mutantných línií *rms2* so zvýšenou hladinou cytokinínov v xyléme a zníženou expresiou strigolaktónového biosyntetického génu *RMS1* i za prítomnosti apexu vytvárajú laterálne výhony z axilárnych pupeňov (a). Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty pod apex stonky vedie k zníženiu hladiny X-CK a k významnej redukcii *rms2* vetviaceho fenotypu (b).

Na základe analýzy cytokinínov v xylémovom exsudáte z intaktných *rms2* mutantných rastlín bolo zistené, že aplikácia IAA-lanolínovej pasty pod apex stonky viedla v priebehu 24 hodín k významnému poklesu hladiny všetkých typov sledovaných cytokinínov v porovnaní s neošetrenými rastlinami v rovnakom čase (obr. 60). Najvýraznejšie zníženie, takmer až k nulovým hodnotám, bolo pozorované u *tZ* a jeho prekursoru *tZR* (obr. 60), pričom práve *tZ*-typ cytokinínov tvorí hlavný podiel cytokinínov translokovaných z koreňa do stonky cez xylém (Kiba *et al.*, 2013).



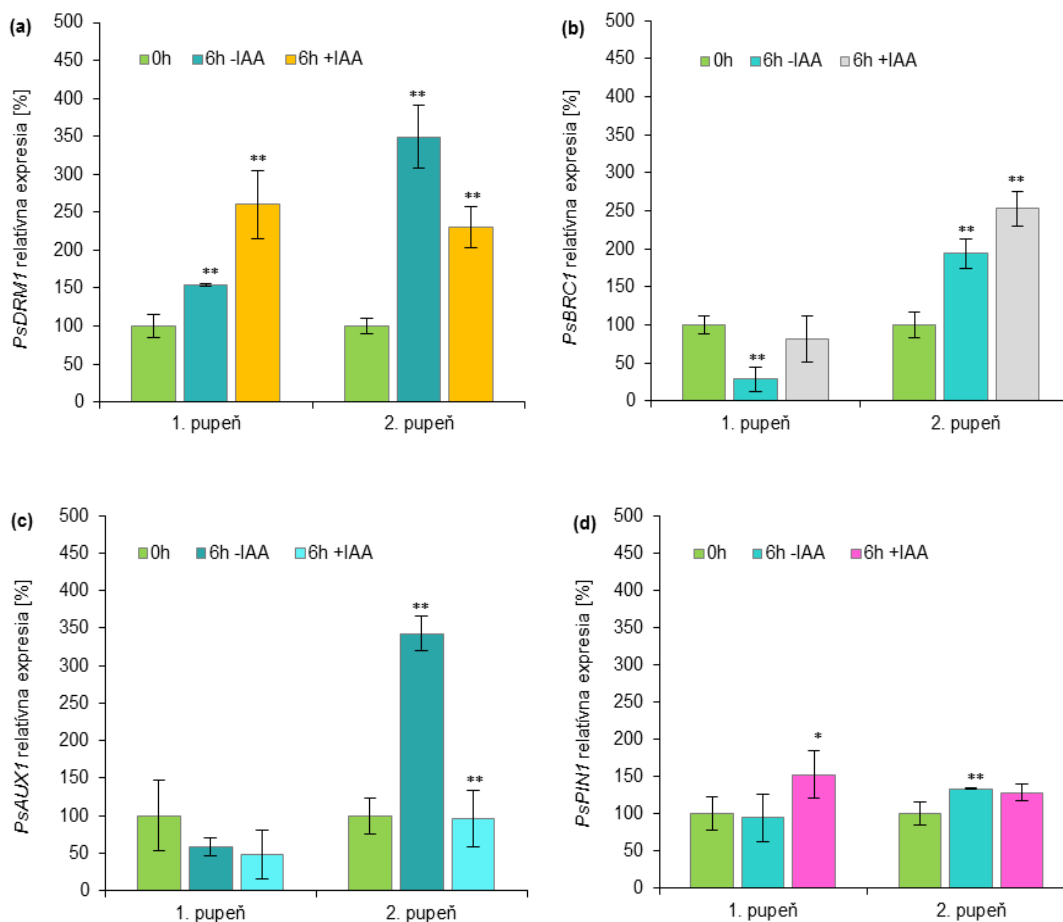
Obr. 60: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms2* a z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms2* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, tZ-typu a DZ-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Intaktné mutantné rastliny *rms2* sú charakteristické vetviacim fenotypom, pritom práve vysoká hladina X-CK môže podporovať sústavný rast výhonov po tom, ako sú pupene uvoľnené z dormancie a začnú vyrastať (Dun *et al.*, 2009). V korelácii so zníženou hladinou X-CK na intaktných rastlinách *rms2* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky bola pozorovaná významná redukcia v dĺžke formovaných výhonov v porovnaní s neošetrovanými intaktnými rastlinami *rms2* (obr. 61), aj keď úplné zamedzenie vyrastania axilárnych pupenôv nebolo pozorované.



Obr. 61: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1irms2** = prvý axilárny pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms2*, **2irms2** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1irms2+IAA** = prvý pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms2* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2irms2+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

Z analýzy expresie génov *PsDRM1*, *PsBRC1* vyplýva, že redukované vetvenie *rms2* mutantných rastlín po exogénnej aplikácii IAA bolo sprevádzané zvýšenou expresiou génu *PsDRM1* (obr. 62a), rovnako ako aj génu *PsBRC1* (obr. 62b) v prvom axilárnom pupeni, zatiaľ čo v druhom pupeni bol sledovaný skôr pokles génu *PsDRM1* v porovnaní s neošetreným variantom (obr. 62a). Toto môže byť spojené s limitovanou schopnosťou *rms2* mutantných rastlín odpovedať na exogénnu aplikáciu auxínu v zmysle inhibície vetvenia, čo pozorovali aj Bennett *et al.*, (2006) u *max* mutantných rastlín arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.). V prípade génov *PsAUX1* a *PsPIN1* neboli pozorované významné zmeny v expresii týchto génov (obr. 62c, 62d), s výnimkou zníženia expresie *PsAUX1* v druhom pupeni (obr. 62c).

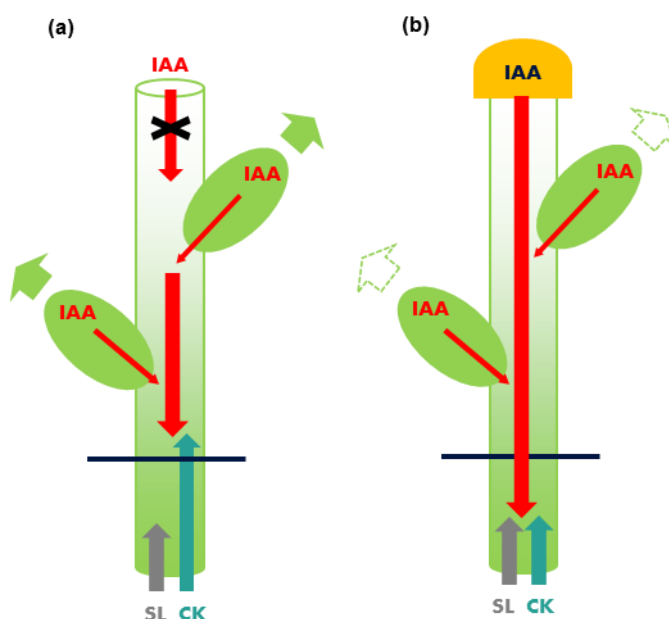


Obr. 62: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c) a *PsPIN1* (d) génov v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných mutantných rastlín *rms2* a intaktných mutantných rastlín *rms2* rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Braun *et al.* (2012) a tiež Dun *et al.* (2012) na základe exogénnej aplikácie hormónov u *rms* mutantných línií hrachu (*Pisum sativum* L.) zistili silnú koreláciu medzi vyrastaním pupeňa a pomerom hladín CK:SL v pupeni, čo je pravdepodobne sprostredkované opačným efektom strigolaktónov a cytokinínov na expresiu génu *PsBRC1*. Pritom práve prítomnosť strigolaktónov reguluje hladinu X-CK v xylémovej exsudáte (Beveridge *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2001; Foo *et al.*, 2005) a nízka hladina X-CK je spojená s vysokou úrovňou expresie *RMS1* (Foo *et al.*, 2005). Ako alternatívny mechanizmus pôsobenia strigolaktónov na vyrastanie pupeňov, ktorý podporuje teóriu kanalizácie auxínového transportu, je navrhované, že ako primárnou odpoveďou k strigolaktónu je rapidné vyčerpanie PIN1 proteínov z cytoplazmatickej membrány,

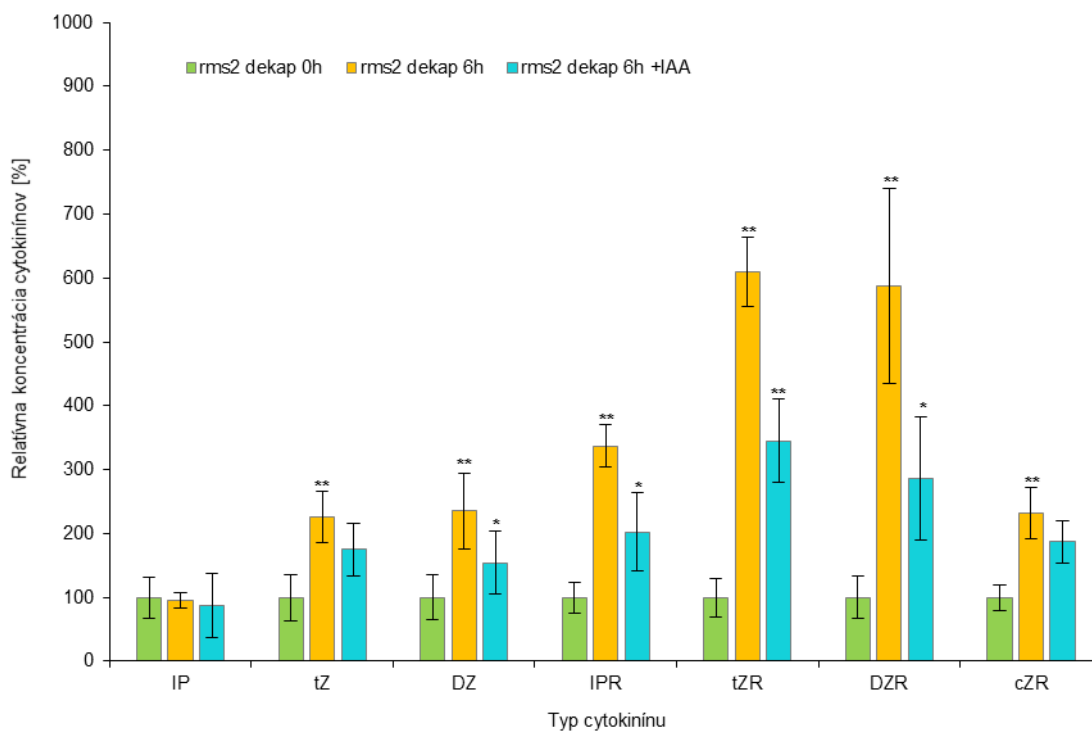
čím nie je umožnená kanalizácia auxínu z pupeňa do hlavnej stonky (Bennett *et al.*, 2006; Crawford *et al.*, 2010; Shinohara *et al.*, 2013).

U dekapitovaných rastlín štandardného typu exogénna aplikácia auxínu namiesto odstráneného apexu stonky dokáže nahradiť jeho vplyv v zmysle primárneho zdroja auxínu a inhibovať vetvenie (Bangerth, 1994; obr. 65). S cieľom overiť tento regulačný vplyv auxínu transportovaného zo stonkového apexu na hladinu X-CK a vyrastanie axilárnych pupeňov u mutantných rastlín *rms2* s vetviacim fenotypom aj za prítomnosti apexu, boli tieto rastliny dekapitované a ošetrené IAA-lanolínovou pastou na reznú plochu dekapitovanej stonky (obr. 63b)



Obr. 63: Schéma experimentu: dekapitované rastliny mutantných línií *rms2* vytvárajú laterálne výhony z axilárnych pupeňov (a). Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú stonku namiesto apexu však vedie k významnej redukcii hladiny X-CK a súčasne vetviaceho fenotypu (b).

Podobne ako u dekapitovaných rastlín štandardného typu (obr. 56), tak aj u mutantných rastlín *rms2* bol zistený podobný nárast hladiny X-CK po dekapitácii (obr. 64), čo tiež pozorovali Foo *et al.* (2007). Exogénna aplikácia IAA na dekapitovanú plochu stonky mutantných rastlín *rms2* významne redukovala hladinu sledovaných typov cytokinínov v xylémovom exsudáte (obr. 64). Týmto bol opäť potvrdený regulačný vplyv auxínu na hladinu X-CK (Bangerth, 1994; obr. 56, obr. 60, obr. 64).

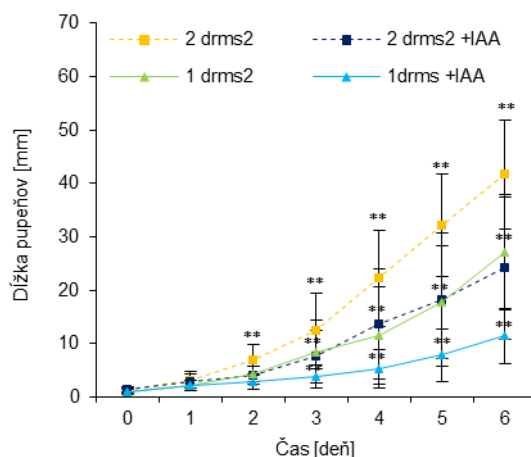


Obr. 64: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms2* a z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms2* ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanú plochu stonky. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, *tZ*-typu a DZ-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Znížená hladina X-CK po aplikácii IAA-lanolínovej pasty bola sprevádzaná redukovaným vetvením resp. dĺžka laterálnych výhonov formovaných z axilárnych pupeňov bola približne o polovicu menšia ako u dekapitovaných *rms2* mutantných rastlín (obr. 65). Aj keď, rovnako ako u intaktných rastlín *rms2*, tak ani u dekapitovaných nebolo aplikáciou IAA-lanolínovej pasty vyrastanie pupeňov úplne inhibované. Podobne aj Beveridge *et al.* (2000) pozorovali limitovanú inhibíciu vyrastania pupeňov po exogénnej aplikácii auxínu na dekapitovaných rastlinách, zatiaľ čo Young *et al.* (2014) zistili inhibíciu rastu axilárnych pupeňov na izolovaných segmentoch stonky po aplikácii IAA.

Dekapitácia rastliny vedie k rapídному a významnému vyčerpaniu množstva transkriptu *RMS1* v stonke hrachu, čomu môže byť zabránené exogénnou aplikáciou auxínu (Foo *et al.*, 2005). Toto naznačuje, že inhibičný efekt auxínu, aplikovaného na dekapitovanú stonku alebo aj na stonku intaktnej rastliny *rms2*, na stonkové vetvenie, môže byť podporený jeho stimulačným vplyvom na *RMS1* expresiu

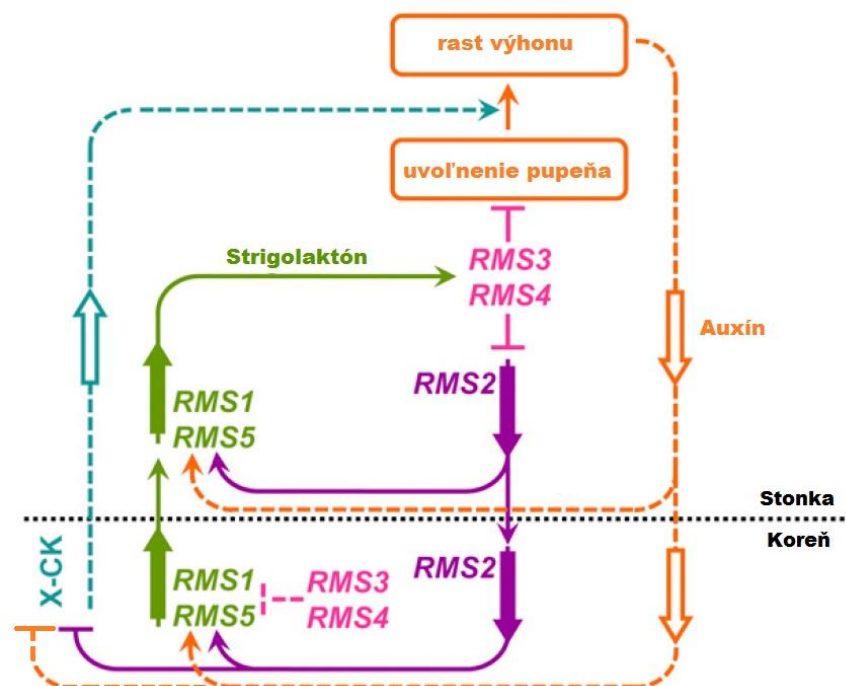
nevyhnutnú pre biosyntézu strigolaktónu, ktorý tiež vetvenie inhibuje (Gomez-Roldan *et al.*, 2008).



Obr. 65: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1drms2** = prvý axilárny pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms2*, **2drms2** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1drms2+IAA** = prvý pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms2* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2drms2+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

Aplikácia IAA-lanolínovej pasty, či už pod apex stonky intaktnej alebo na reznú plochu stonky dekapitovanej *rms2* mutantnej rastliny, viedla k významnej redukcii hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte, zvýšeniu expresie génov spojených s dormantným stavom pupeňov a následne aj k významnému obmedzeniu rastu laterálnych výhonov formovaných z axilárnych pupeňov. Vzhľadom na to, že rastliny mutantnej línie *rms2* s vetviacim fenotypom majú zvýšenú endogénnu hladinu X-CK (Beveridge *et al.*, 1997b; Foo *et al.*, 2007; obr. 58) podporujúcich vyrastanie pupeňov, zníženú hladinu strigolaktónu inhibujúceho vetvenie v dôsledku redukovanej expresie *RMS1* génu (Foo *et al.*, 2005; Dun *et al.*, 2009), spolu uvedené výsledky podporujú centrálnu úlohu auxínu v regulácii stonkového vetvenia. Avšak aj napriek svojmu ústrednému postaveniu v procese apikálnej dominancie nemá auxín schopnosť úplne zamedziť vyrastaniu axilárnych pupeňov v podmienkach s narušenou funkciou spätno-väzbového signálu podmieneného expresiou *RMS2* génu (Foo *et al.*, 2007), ktorý je v *rms2* rastlinách mutantný. Uvedené výsledky naznačujú, že pôsobenie auxínu je v kontrole stonkového vetvenia modulované ďalšími endogénnymi faktormi – cytokinínmi a strigolaktónom, pričom pre úplnú inhibíciu vyrastania axilárnych

pupeňov je nevyhnutná súčinnosť spätno-väzbového signálu podmieneného expresiou génu *RMS2*. Toto je v súlade s navrhovaným zapojením génu *RMS2* do kontroly spätno-väzbovej regulácie expresie *RMS1* génu (obr. 66), a tiež hladiny cytokinínov v xyléme u hrachu (Beveridge *et al.*, 1997; Beveridge *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2001; Foo *et al.*, 2005, Foo *et al.*, 2007). Jednoduchým vysvetlením fenotypu týchto mutantných rastlín je, že *RMS1* a *RMS5* kontrolujú biosyntézu, a tým aj hladinu strigolaktónu, ktorý sa pohybuje smerom od koreňa ku stonke, zatiaľ čo *RMS2* kontroluje spätno-väzbový signál, ktorý sa pohybuje smerom od stonky ku koreňu a spolu s auxínom reguluje expresiu *RMS1* génu a hladinu cytokinínov v xyléme (obr. 66; Beveridge *et al.*, 2000; Morris *et al.*, 2001; Foo *et al.*, 2005; Dun *et al.*, 2009; Hayward *et al.*, 2009). Medzi auxínom a spätno-väzbovým signálom je pritom viacero podobných funkcií: obidva podporujú expresiu génu *RMS1* zapojeného do biosyntézy strigolaktónu (Sorefan *et al.*, 2003; Foo *et al.*, 2005) a negatívne regulujú X-CK export z koreňa. Pričom je pravdepodobné, že auxín je oveľa viac dominantnejší indukčný a regulačný signál expresie génov zapojených do strigolaktónovej biosyntézy než spätno-väzbový signál u arábovky (*Arabidopsis thaliana* L.) (Hayward *et al.*, 2009).

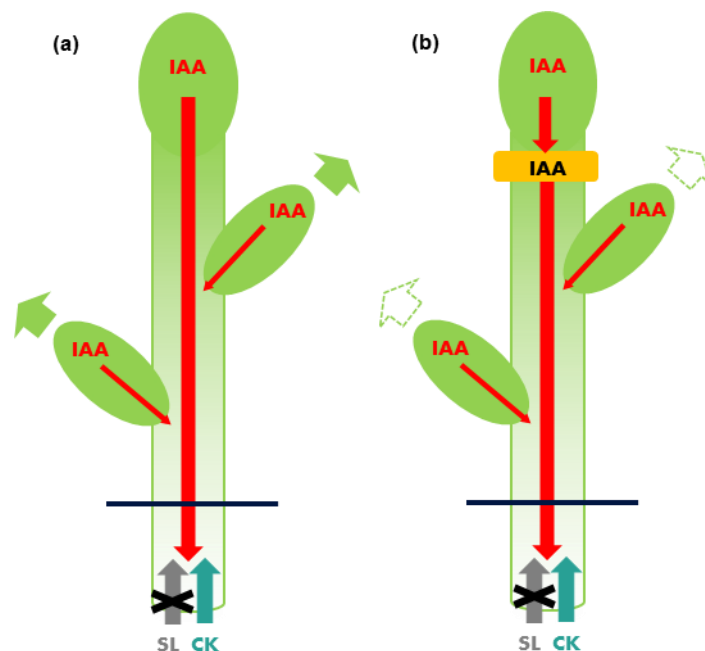


Obr. 66: Model regulácie vyrastania pupeňa u hrachu (*Pisum sativum* L.) (upravené podľa Foo *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006).

5.9 Auxín reguluje vetvenie u mutantných rastlín *rms1* s deficitnou biosyntetickou dráhou strigolaktónu

V štúdiách zameraných na kontrolu utvárania stonkovej architektúry bolo na základe experimentov s vrúbľovanými mutantnými rastlinami hrachu *ramosus1* (*rms1*) zistené, že okrem auxínu a cytokinínov sa na regulácii stonkového vetvenia zúčastňuje i ďalší signál (Beveridge *et al.*, 1997). Tento signál, ktorého úlohou je vetvenie inhibovať bol neskôr identifikovaný ako strigolaktón (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Umehara *et al.*, 2008), ktorý pre svoju syntézu vyžaduje aktivitu génov *RMS1* a *RMS5* (Morris *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006). Napriek tomu, že *rms1* mutantné rastliny majú na rozdiel od *rms2* veľmi nízku hladinu cytokinínov v xylémovom exsudáte (Beveridge *et al.*, 1996, 1997b; Morris *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2014; obr. 58) je pre *rms1* rastliny tiež charakteristický vetviaci fenotyp stonky (Morris *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2005; Johnson *et al.*, 2006).

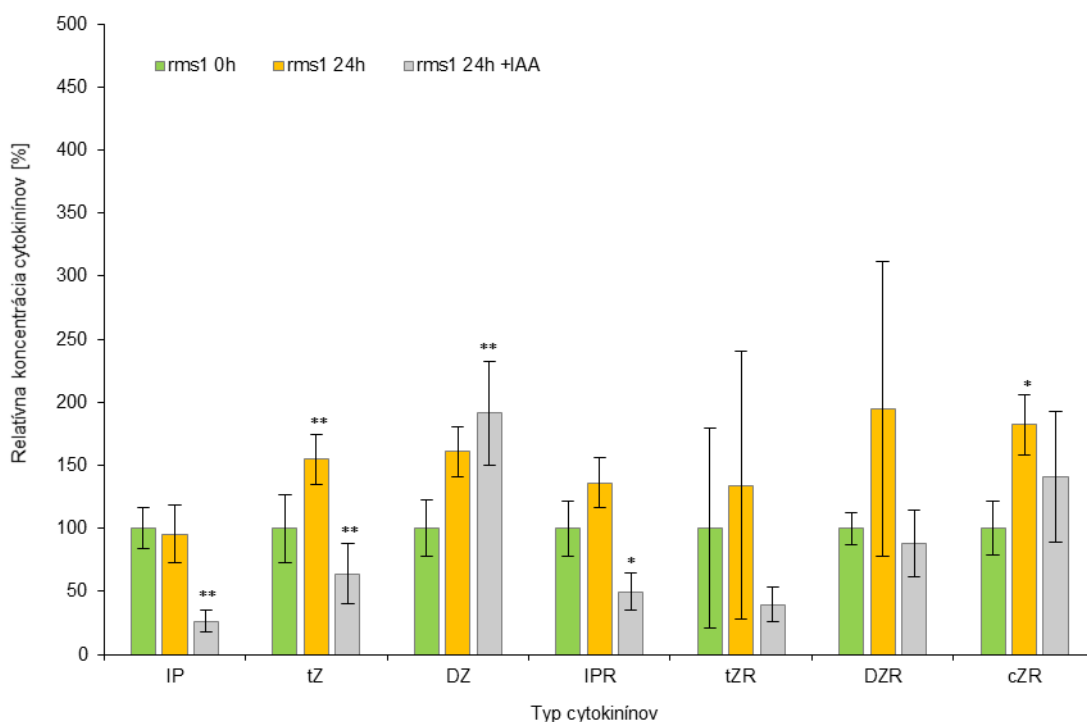
Z tohto dôvodu boli pre ďalšie sledovanie kontroly X-CK vo vzťahu k vyrastaniu axilárnych pupeňov za podmienok, kedy vetvenie rastlín nie je ovplyvňované strigolaktónom, použité intaktné mutantné rastliny *rms1* a rastliny *rms1* ošetrované IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky (obr. 67)



Obr. 67: Schéma experimentu: intaktné mutantné rastliny *rms1* majú v dôsledku mutácie génu *RMS1* narušenú dráhu biosyntézy strigolaktónu, čím dochádza k zníženej inhibícii vyrastania pupeňov a rastliny *rms1* vykazujú vetviaci fenotyp (a). Exogénnou aplikáciou IAA-lanolínovej pasty

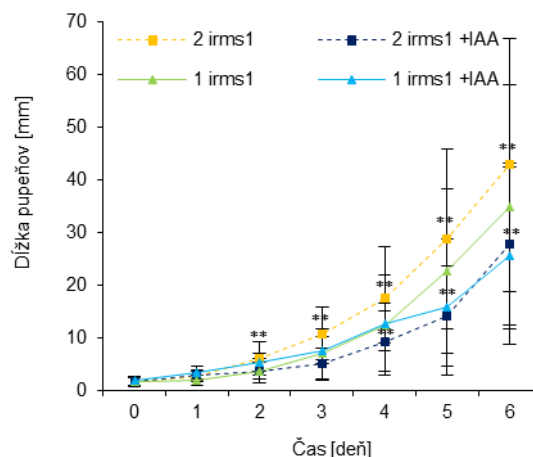
pod apex stonky je zosilnený inhibičný vplyv auxínu transportovaného z apexu na vyrastanie pupeňov (b).

Z analýzy izoprenoidných X-CK vyplýva, že v priebehu 24 hodín dochádzalo k miernemu nárastu hladiny sledovaných cytokinínov v xylémovom exsudáte intaktných rastlín *rms1*, zatiaľ čo exogénna aplikácia auxínu viedla k významnému poklesu tejto hladiny v rovnakom sledovanom čase (obr. 68).



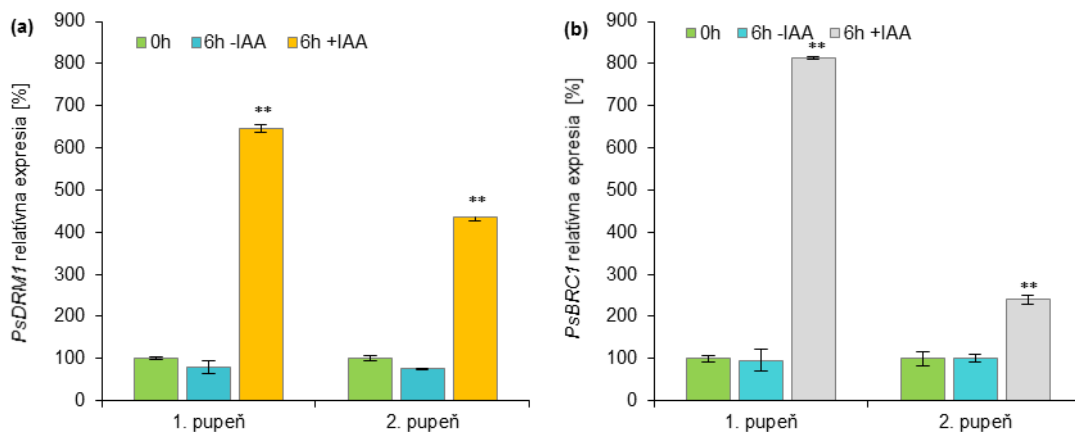
Obr. 68: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms1* a z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms1* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, tZ-typu a DZ-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

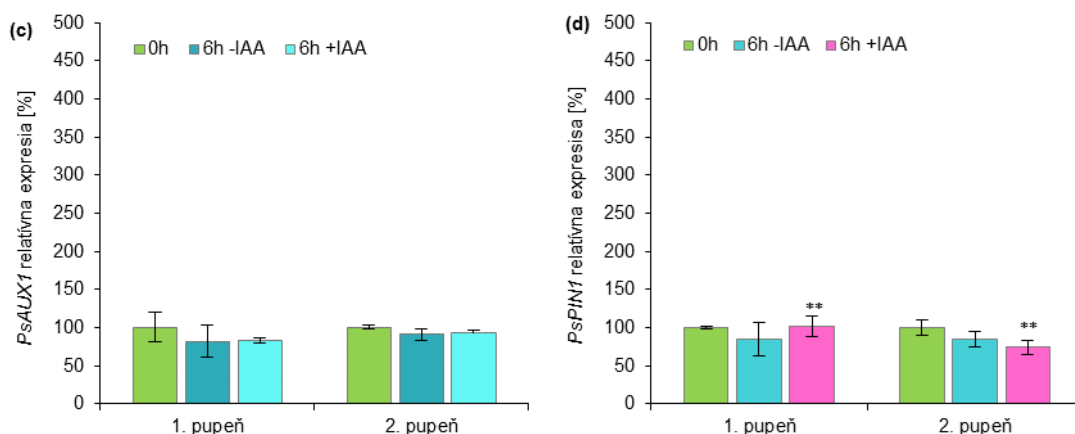
Týmto ošetrovaním IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky bola už pôvodne redukovaná hladina X-CK v *rms1* rastlinách ešte viac znížená, čo sa prejavilo obmedzením dĺžky formovaných laterálnych výhonov (obr. 69), čo je v súlade so zistením Dun *et al.* (2009), že dostupnosť X-CK k vyrastajúcim axilárnym pupeňom je nevyhnutná pre ich sústavný rast.



Obr. 69: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1irms1** = prvý axilárny pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms1*, **2irms1** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1irms1+IAA** = prvý pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms1* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2irms1+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chýbové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

Napriek tomu, že po 6 hodinách od aplikácie auxínu bol zistený rapidný nárast v expresii génov *PsDRM1* (obr. 70a) a *PsBRC1* (obr. 70b) v oboch axilárnych pupeňoch, podobne ako u mutantných rastlín *rms2*, ani u rastlín *rms1* nebola pozorovaná úplná inhibícia vyrastania pupeňov pridaním exogénneho auxínu pod apex stonky. V prípade génu *PsAUX1* bola expresia udržiavaná na približne rovnakej úrovni aj po aplikácii auxínu (obr. 70c) a ani v expresii génu *PsPIN1* nedochádzalo výrazným zmenám v priebehu 6 hodín od ošetrovania (obr. 70d).





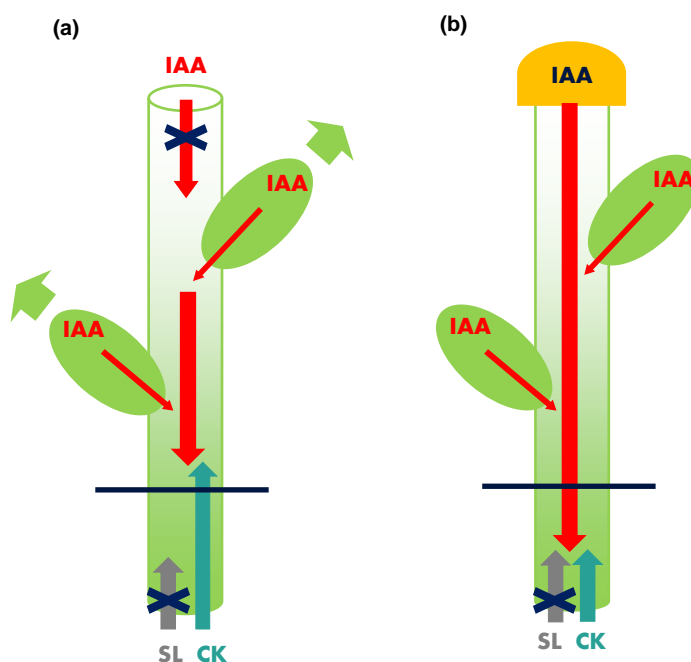
Obr. 70: Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c) a *PsPIN1* (d) v prvom a druhom axilárnom pupeňu intaktných mutantných rastlín *rms1* a intaktných mutantných rastlín *rms1* rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 4$).

Interakcia cytokinínov so strigolaktónom je podobne, ako s auxínom, v regulácii vyrastania pupeňov považovaná za antagonistickú (Dun *et al.*, 2012). Regulácia vetvenia cytokinínmi a strigolaktónmi je pravdepodobne integrovaná cez opačný vplyv na expresiu TCP transkripčného faktoru TEOSINTE BRANCHED 1 (TB1)/BRANCHED1 (BRC1) v pupeňoch (Minakuchi *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2012; Dun *et al.*, 2012). Expresia *PsBRC1* je pritom v negatívnej korelácii s vyrastajúcim pupeňom (Aguilar-Martínez *et al.*, 2007). U hrachu sú cytokiníny negatívnym regulátorom *PsBRC1* (Braun *et al.*, 2012). Naopak, po aplikácii strigolaktónu nedochádza k zmenám v expresii *TB1/BRC1* ortológu u kukurice (*Zea mays* L.) alebo u ryže (*Oryza sativa* L.) (Minakuchi *et al.*, 2010). Zvýšené vetvenie u *brc1* mutantných rastlín u hrachu, arábovky alebo ryže nie je pridaním strigolaktónu redukované (Brewer *et al.*, 2009; Minakuchi *et al.*, 2010; Braun *et al.*, 2012), čo naznačuje, že strigolaktónová signálna dráha je závislá od funkcie *BRC1*.

Vzhľadom na to, že po 6 hodinách od aplikácie IAA-lanolínovej pasty bol zistený v oboch axilárnych pupeňoch výrazný nárast expresie *PsBRC1* je možné usudzovať, že naopak expresia *PsBRC1* je významne ovplyvňovaná hladinou X-CK, ktorá je zase regulovaná auxínom.

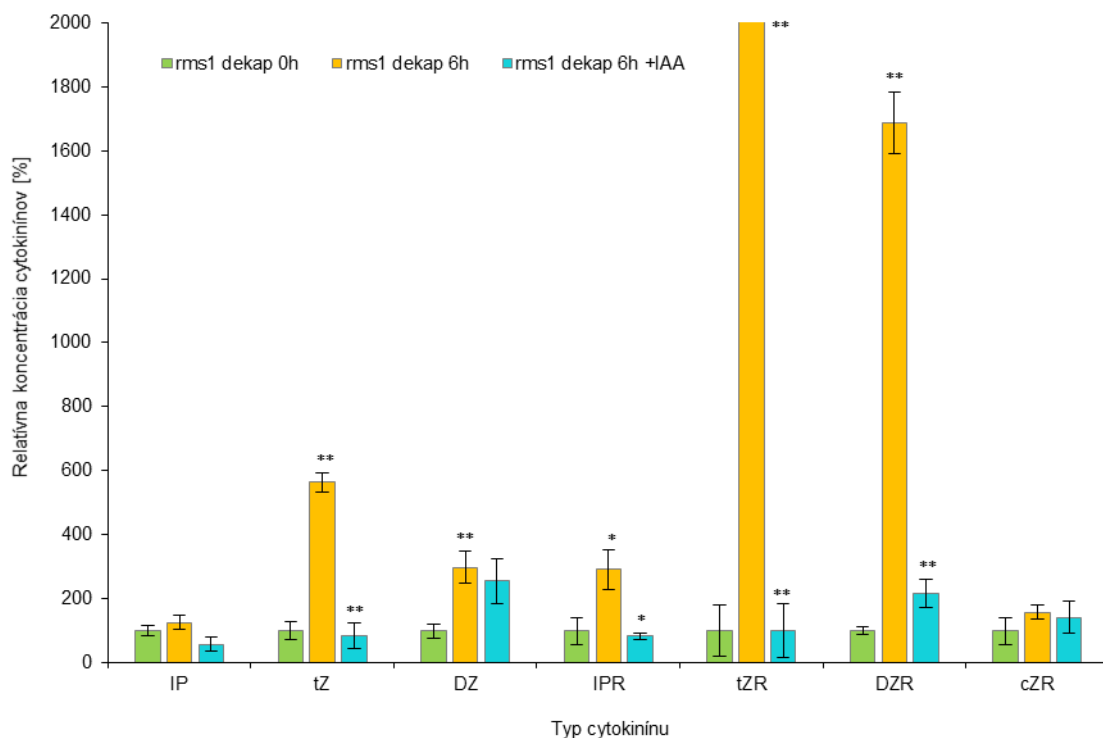
Vplyv odstránenia apexu dekapitáciou na hladinu X-CK a následné vyrastanie pupeňov bol opäť sledovaný aj u mutantných rastlín *rms1* (obr. 71a). Súčasne boli

použité dekapitované rastliny *rms1*, u ktorých bola namiesto apexu na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná IAA-lanolínová pasta (obr. 71b).



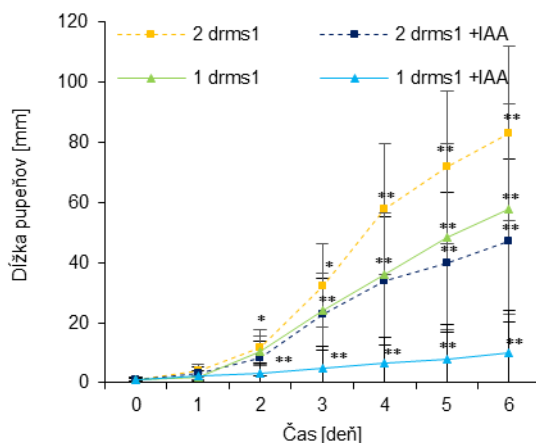
Obr. 71: Schéma experimentu : dekapitované rastliny hrachu mutantnej línie *rms1* s narušenou biosyntetickou dráhou strigolaktónu vykazujú zvýšenú hladinu X-CK v dôsledku odstránenia apexu (a). Pokiaľ je odstránený apex nahradený exogénnou aplikáciou IAA-lanolínovej pasty, vplyv auxínu transportovaného z apexu na hladinu X-CK môže byť týmto obnovený (b).

V priebehu 24 hodín po dekapitácii bol zistený významný nárast v hladine väčšiny sledovaných cytokinínov v xylémovom exsudáte, predovšetkým však prekursorov *tZR* a *DZR* (obr. 72). Rovnako ako pri všetkých predchádzajúcich experimentoch, v ktorých boli či už rastliny štandardného typu alebo mutantné rastliny *rms2* dekapitované, tak aj u *rms1* aplikácia IAA-lanolínovej pasty na reznú plochu dekapitovanej stonky viedla k významnému zníženiu hladiny X-CK v porovnaní s kontrolnými dekapitovanými rastlinami v rovnakom sledovanom čase (obr. 72).



Obr. 72: Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms1* a z dekapitovaných mutantných rastlín *rms1* ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanej ploche stonky. Izoprenoidné cytokiníny IP-typu, *tZ*-typu a DZ-typu boli analyzované prostredníctvom kvapalinovej chromatografie (LC) spojenej s hmotnostnou spektrometriou (MS). Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 10$).

Pozorovaná redukcia hladiny X-CK po aplikácii IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú stonku bola v korelácii s významným obmedzením rastu laterálnych výhonov (obr. 73), zatiaľ čo u kontrolných dekapitovaných rastlín viedlo odstránenie apexu k značne silnejšiemu stonkovému vetveniu (obr. 73). Podobne aj Brewer *et al.* (2009) navrhujú, že podstatné vyčerpanie auxínu v hlavnej stonke, spôsobené napríklad odstránením zdroja auxínu, vedie k zvýšenému vetveniu, ktoré je ešte podporené redukciou strigolaktónovej biosyntézy u *rms1* mutantných línií.



Obr. 73: Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1drms1** = prvý axilárny pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms1*, **2drms1** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1drms1+IAA** = prvý pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms1* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou dekapitovanú plochu stonky, **2drms1+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. Štatisticky významné rozdiely (identifikované Študentovým t-testom) $\alpha = 0,05^*$ a $\alpha = 0,01^{**}$. Chybové úsečky predstavujú smerodajnú odchýlku ($n = 40$).

Mutantné rastliny *rms1* majú v dôsledku mutácie génu *RMS1* narušenú strigolaktónovú biosyntetickú dráhu, a aj napriek tomu, že majú nízku hladinu cytokinínov v xylémovom exsudáte v porovnaní so štandardným typom rastlín (Beveridge *et al.*, 1996; Morris *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2014; obr. 58), sa na základe uvedených výsledkov zdá byť táto hladina X-CK za neprítomnosti inhibičného vplyvu strigolaktónu dostatočná pre stonkové vetvenie u intaktných rastlín *rms1* (Beveridge *et al.*, 2000; obr. 69). Toto môže byť podmienené tým, že *rms1* mutantné rastliny sú oveľa viac senzitívne k nízkym hladinám cytokinínov dodaných vaskulatúrou alebo aplikovaných priamo na pupeň, ako štandardný typ rastliny. Navyše rastliny tejto mutantnej línie majú zvýšenú úroveň transkriptu génu *PsIPT1* v nódoch a internódiách (Dun *et al.*, 2012). Podobne ako u *rms2* mutantných rastlín, tak aj u *rms1* viedlo odstránenie apexu, ako primárneho zdroja auxínu, dekapitáciou k intenzívnejšiemu rastu laterálnych výhonov (obr. 73), čo pozorovali aj Ferguson a Beveridge (2009), že dekapitácia zvyšuje stonkové vetvenie u *rms* mutantných rastlín.

Spoločne, výsledky z tejto experimentálnej časti dokazujú dôležitosť úlohy auxínu v regulácii apikálnej dominancie. Zvýšenou hladinou auxínu sa významne redukuje vetviaci fenotyp u mutantných rastlín *rms1*, ktoré majú v dôsledku mutácie génu *RMS1* narušenú biosyntézu strigolaktónu, a tým tiež zníženú inhibíciu vyrastania

pupeňov. Exogénne aplikovaný auxín však nedokáže vetveniu zamedziť úplne, čo ukazuje na dôležitosť koordinovaného spolupôsobenia jednotlivých rastlinných hormónov vo vývojovom procese apikálnej dominancie. Navyše exogénna aplikácia auxínu spôsobila zníženie hladiny X-CK, čím výsledky potvrdzujú predchádzajúce zistenia o antagonistickej vplyve auxínov a cytokinínov

5.10 Súhrnná diskusia

Dôležitosť auxínu bola rozpoznaná už klasickým experimentom, ktorý vykonali Thimann a Skoog (1934), a ktorým dokázali inhibičný efekt auxínu na vyrastanie axilárnych pupeňov. V procese apikálnej dominancie je vyrastanie axilárnych pupeňov inhibované stonkovým apexom alebo iným dominujúcim rastúcim výhonom, ktorý predstavuje primárny a hlavný zdroj auxínu. Odstránením tohto rastúceho výhonu dekapitáciou je spôsobené zníženie endogénnej hladiny kyseliny indolyl-3-octovej (IAA), bioaktívnej formy fytohormónu auxínu (Thimann a Skoog, 1933, Thimann a Skoog, 1934; van Overbeek, 1938; White *et al.*, 1975; Morris *et al.*, 2005), ktoré umožňuje vyrastanie axilárnych pupeňov. Predpokladá sa, že inhibícia vyrastania pupeňov nastáva v dôsledku kompetície jednotlivých zdrojov auxínu o primárnu kanalizáciu auxínu do polárneho auxínového transportného toku v hlavnej stonke (Balla *et al.* 2011).

Experimenty vykonané v rámci tejto práce ukázali, že odstránenie dominujúceho rastúceho rastového vrcholu vedie k iniciácii vyrastania obidvoch axilárnych pupeňov lokalizovaných pod týmto rastovým vrcholom, ktoré je spojené so zmenami v génovej expresii. Odstránením apexu, a tým aj primárneho zdroja auxínu dekapitáciou, dochádzalo medzi dvomi axilárnymi pupeňmi ako potenciálnymi novými zdrojmi auxínu ku kompetícii o vytvorenie nového auxínového zdroja. Aj keď sú po dekapitácii aktivované obidva pupene, nový dominantný výhon je konečne formovaný z druhého axilárneho pupeňa, lokalizovaného bližšie k odstránenému apexu stonky, zatiaľ čo formovanie výhonu z prvého pupeňa je inhibované tokom auxínu z nového dominujúceho výhonu. Avšak v prípade, že je export auxínu z tohoto druhého axilárneho pupeňa inhibovaný, dochádza k formovaniu dominujúceho laterálneho výhonu z prvého axilárneho pupeňa. Celý proces utvárania nového zdroja auxínu, vyrastania axilárnych pupeňov a formovania laterálneho výhonu je pritom s najväčšou pravdepodobnosťou determinovaný kapacitou PIN proteínov a silou auxínového toku (Bangerth, 1989; Bangerth *et al.*, 2000; Ongaro a Leyser, 2008).

Vzhľadom na to, že priemerná rýchlosť auxínového toku môže byť približne 10 mm.h^{-1} (Goldsmith, 1977), bolo ďalšími experimentami zistené, že dĺžka dekapitovanej stonky môže mať vplyv na rýchlosť zmien, ku ktorým dochádza v axilárnom pupeni po odstránení primárneho zdroja auxínu dekapitáciou. Týmto bolo zároveň zistené, že tok auxínu v hlavnej stonke má zásadný vplyv na vyrastanie axilárnych pupeňov, čo navrhuje aj teória kanalizácie auxínového transportu (Bangerth, 1989; Bennett *et al.*, 2006; Mouchel a Leyser, 2007; Ongaro a Leyser, 2008), podľa ktorej je vyrastanie pupeňov regulované tokom auxínu v stonke. Dôležitosť polárneho transportu auxínu v hlavnej stonke rastliny pre udržanie apikálnej dominancie bola testovaná rôznymi experimentálnymi prístupmi, ktoré spoločne potvrdili, že pre udržanie apikálnej dominancie a inhibíciu vyrastania axilárnych pupeňov je nevyhnutný sústavný tok auxínu v stonke. V prípade, že došlo k zoslabeniu toku auxínu v hlavnej stonke rastliny, či už mechanicky vytvoreným zárezom alebo pomocou inhibítora transportu auxínu kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA), dochádzalo následne k vyrastaniu axilárneho pupeňa, príslušného k danej časti hlavnej stonky, v ktorej bola hladina auxínu redukovaná.

Okrem auxínu je účasť v procese apikálnej dominancie podľa teórie sekundárnych poslov prisudzovaná aj ďalšej triede rastlinných hormónov cytokinínov (Snow, 1929; Sachs a Thimann, 1967; Bangerth, 1994), pričom na rozdiel od nepriameho vplyvu auxínu bol na základe aplikácie cytokinínu na pupeň zistený priamy efekt cytokinínov na uvoľnenie pupeňov z apikálnej dominancie (Sachs a Thimann, 1964; Kalousek *et al.*, 2010). Následne bola interakcia a pomer týchto dvoch tried fytohormónov, auxínov a cytokinínov, považovaná za kľúčovú v regulácii apikálnej dominancie. Bangerth (1994) a Li *et al.* (1995) priniesli dôkazy o interakcii transportných systémov auxínu a cytokinínov - zníženie bazipetálneho transportu auxínu v dôsledku dekapitácie poskytuje signál pre zvýšenie akropetálneho transportu navrhovaného sekundárneho posla - cytokinínov. Vzhľadom na predpoklad, že proces vytvárania nového auxínového zdroja pre rastlinu, sprevádzaného vyrastaním axilárnych pupeňov, je determinovaný polarizáciou a kapacitou PIN1 proteínov (Bangerth, 1989; Bangerth *et al.*, 2000; Ongaro a Leyser, 2008), boli v tejto práci vykonané experimenty, ktoré ukázali, že cytokiníny môžu lokálnym pôsobením pozitívne regulovať auxínový tok urýchlením polárnej lokalizácie PIN1 proteínov. Súčasne bolo zistené, že v prípade, že sú cytokiníny aplikované na hlavnú stonku

rastliny hrachu, významne stimulujú auxínový transport v stonke, čím môžu cytokiníny regulovať inhibíciu vyrastania pupeňov, ktorá je závislá od auxínu.

Auxíny a cytokiníny predstavujú signálne molekuly, ktoré ovplyvňujú proces stonkového vetvenia nielen lokálne, ale pôsobia tiež na systémovej úrovni celej rastliny (Wolters a Jürgens, 2009). Pre sledovanie účasti cytokinínov v auxínom regulovanom utváraní stonkovej architektúry na systémovej úrovni boli sledované zmeny v hladine cytokinínov v xylémovom exsudáte (X-CK), ku ktorým dochádzalo v dôsledku zmien v hladinách auxínu, vyvolaných buď exogénnou aplikáciou auxínu alebo dekapitáciou. Výsledky z vykonaných experimentov ukázali, že zvýšená hladina auxínu v rastline po aplikácii IAA-lanolínovej pasty vedie k významnému zníženiu cytokinínov v xylémovom exsudáte, zatiaľ čo zníženie hladiny auxínu v hlavnej stonke dekapitáciou spôsobí nárast sledovaných X-CK. Pozorované zmeny v hladinách cytokinínov v xylémovom exsudáte korelovali s lokálnymi zmenami v axilárnych pupeňoch, ktoré sa prejavovali či už na morfolologickej úrovni alebo na úrovni expresie vybraných génov. Rovnaké experimentálne prístupy s exogénne aplikovaným auxínom a dekapitovaným stonkovým vrcholom boli pre sledovanie vplyvu cytokinínov na systémovej úrovni vykonané aj za použitia mutantných línií hrachu (*Pisum sativum* L.) *ramosus2* (*rms2*) so zvýšeným stonkovým vetvením a zvýšenou hladinou X-CK (Beveridge *et al.*, 1997b; Foo *et al.*, 2007). Gén *RMS2* je považovaný za hlavný faktor regulujúci v rámci spätnoväzbovej odpovede export cytokinínov z koreňa, a tiež biosyntézu strigolaktónov (Foo *et al.*, 2007), ktoré sa ako ďalší navrhovaný typ sekundárnych poslov zúčastňujú v regulácii apikálnej dominancie. Strigolaktóny majú pritom schopnosť inhibovať vyrastanie axilárnych pupeňov (Gomez-Roldan *et al.*, 2008; Brewer *et al.*, 2009). Zmeny v hladinách auxínu v hlavnej stonke, vyvolané buď exogénnou aplikáciou IAA alebo dekapitáciou, viedli k podobným výsledkom, aké boli pozorované u rastlín hrachu štandardného typu - ošetrovanie rastlín IAA-lanolínovou pastou významne znížilo hladinu sledovaných X-CK a obmedzilo formovanie laterálnych výhonov z axilárnych pupeňov, zatiaľ čo odstránenie zdroja auxínu - stonkového vrcholu dekapitáciou viedlo k zvýšeniu hladiny X-CK. Aj keď auxín nemal schopnosť úplne zamedziť vyrastaniu axilárnych pupeňov v podmienkach s narušenou funkciou spätnoväzbového signálu podmieneného expresiou *RMS2* génu (Foo *et al.*, 2007), ktorý je práve v *rms2* rastlinách mutantný, experimentami bol potvrdený regulačný vplyv auxínu na cytokiníny transportované z koreňa do nadzemnej časti rastliny, ktorý navrhoval Bangerth (1994). Za použitia ďalších mutantných línií *ramosus1* (*rms1*), pre ktoré je tiež charakteristický

fenotyp so stonkovým vetvením (Morris *et al.*, 2001; Morris *et al.*, 2005), a ktoré majú naopak zníženú hladinu X-CK (Beveridge *et al.*, 1996, 1997b; Morris *et al.*, 2001; Young *et al.*, 2014) bolo zistené, že aplikácia IAA-lanolínovej pasty vedie k redukcii už nízkej hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte, čo bolo sprevádzané významným obmedzením rastu laterálnych výhonov a zmenami v expresii génov v axilárnych pupeňoch. Odstránenie zdroja auxínu - stonkového apexu dekapitáciou spôsobilo, podobne ako u štandardného typu a aj mutantných línií *rms2*, zvýšenie hladiny sledovaných X-CK a výraznejšie stonkové vetvenie.

Súhrnne uvedené výsledky podporujú centrálnu úlohu auxínu v regulácii stonkového vetvenia a ukazujú, že apikálna dominancia je kontrolovaná predovšetkým polárne transportovaným auxínom, čo je v súlade s teóriou kanalizácie auxínového transportu. Výsledky súčasne ukazujú, že pôsobenie auxínu je v kontrole stonkového vetvenia významne modulované ďalšími endogénnymi faktormi – cytokinínmi a strigolaktónmi, ktoré predstavujú hlavných zástupcov v teórii sekundárnych poslov. Týmto sa vytvára prepojenie medzi dvomi, v súčasnej dobe aktuálnymi, teóriami o mechanizme fungovania apikálnej dominancie. Spoločne výsledky tejto práce poukazujú na to, že vývojový proces apikálnej dominancie a stonkového vetvenia je proces regulovaný veľmi dômyselne a komplexne na mnohých úrovniach a mnohými faktormi, pričom hlavné postavenie auxínu vyvážené dopĺňajú cytokiníny a strigolaktóny, tak aby zabezpečili harmonické utváranie morfológických štruktúr a najpriaznivejší rast počas celého životného cyklu rastliny.

6 ZÁVER

Apikálna dominancia priťahuje pozornosť rastlinných fyziológov aj agromónov po desaťročia. Na jednu stranu reprezentuje najdôležitejší a univerzálny spôsob orgánovej korelácie, na stranu druhú prináša možnosti zvyšovania produkcie hospodársky dôležitých plodín a estetického pôsobenia okrasných rastlín. Regulácia stonkovej architektúry je dôležitá pre adaptáciu rastlín, pre konkurenciuschopnosť v ich životnom prostredí, a tiež pre dosiahnutie celého životného cyklu rastliny. Poskytuje rastline možnosť optimalizovať fyziologické procesy s cieľom vytvoriť čo najvhodnejšiu stavbu nadzemnej časti, a flexibilne tak odpovedať na rôzne environmentálne faktory.

Niekoľko dekád trvajúce úsilie prinieslo mnoho poznatkov o tom, ako systém apikálnej dominancie funguje, aj keď stále zostáva objasniť niekoľko otázok, aby bol kompletný mechanizmus tohto vývojového procesu úplne pochopený. V priebehu mnohoročného výskumu a štúdiá apikálnej dominancie boli postupne s rozvojom nových metód navrhované viaceré teórie predkladajúce rôzne názory o určujúcich prvkoch v apikálnej dominancii, pričom za primárny a kľúčový faktor regulujúci stonkové vetvenie je považovaný rastlinný hormón auxín.

Jednotlivé kúsky veľkej mozaiky – mechanizmus, ktorým auxín celý proces apikálnej dominancie reguluje a koordinuje – sa postupne daria úspešne skladať dohromady. Predkladaná práca do tejto mozaiky prináša niekoľko podstatných častí. Základnú časť tvoria výsledky získané na základe experimentov s dvoj-nódovým modelovým systémom hrachu (*Pisum sativum* L.), ktoré ukazujú, že axilárne pupene medzi sebou súťažia o nahradenie odstráneného primárneho zdroja auxínu – apexu, s cieľom vytvoriť nový zdroj auxínu pre rastlinu. Tým tieto zistenia podporujú jednu z aktuálne navrhovaných teórií – teóriu kompetitívnej kanalizácie auxínového transportu.

Ďalšiu prínosnú časť tvorí zistenie, že rýchlosť aktivácie nového zdroja auxínu po dekapitácii môže byť spojená s dĺžkou ponechanej dekapitovanej stonky, čo ukazuje na dôležitosť hladiny auxínu v hlavnej stonke v inhibícii vyrastania axilárnych pupeňov, resp. inhibícii vytvorenia nového zdroja auxínu. S týmto tiež súvisí dôležitosť naplnenia kapacity auxínového transportného systému – sinku pre auxín exportovaný z jeho zdroja, ktorý predstavuje hnaciu silu v auxínovom transportnom systéme. Táto nevyhnutnosť udržania sústavného toku auxínu v hlavnej stonke v inhibícii aktivácie

potenciálneho auxínového zdroja bola v tejto práci následne potvrdená viacerými experimentálnymi prístupmi, ktorých výsledky predstavujú ďalšie doklady podporujúce teóriu kanalizácie auxínového transportu. Aktivácia sekundárneho zdroja auxínu, resp. iniciácia rastu axilárneho pupeňa a formovanie laterálneho výhonu z neho, je možná jedine v prípade, že je polárny transport auxínu v hlavnej stonke od primárneho zdroja auxínu narušený či už mechanicky alebo prostredníctvom inhibítora transportu auxínu. Súčasne bolo v tejto práci zistené, že pokiaľ je auxínový export inhibovaný z pupeňa iniciovaného k vyrastaniu, k formovaniu laterálneho výhonu z tohto pupeňa nedochádza. Z týchto výsledkov jasne vyplýva, že sústavný transport auxínu je nevyhnutný súčasne pre inhibíciu zakladania ďalších zdrojov auxínu (vyrastania axilárnych pupeňov) v prípade, že rastlina už auxínový zdroj má založený, a tiež v prípade, že u rastliny dochádza k zakladaniu nového zdroja auxínu, kedy je auxínový export z tohto novo-zakladaného zdroja potrebný pre formovanie nových vaskulárnych zväzkov.

Ďalšiu časť, ktorú táto práca prináša do mozaiky pochopenia mechanizmu hormonálnej regulácie apikálnej dominancie sú výsledky získané z experimentov zameraných na účasť ďalšieho rastlinného hormónu - cytokinínu v procese utvárania stonkovej architektúry. Druhou, aktuálne navrhovanou teóriou je teória sekundárnych poslov, podľa ktorej je nepriamy inhibičný efekt auxínu na vyrastanie axilárnych pupeňov sprostredkovaný cez pôsobenie ďalších faktorov, za ktoré sa považujú predovšetkým cytokiníny, a tiež hormóny strigolaktóny. Interakcia auxínov a cytokinínov je pokladaná za rozhodujúcu, vzhľadom na to, že cytokiníny majú na rozdiel od auxínov schopnosť priamo uvoľňovať axilárne pupene z inhibičného vplyvu apikálnej dominancie. Predkladaná práca potvrdzuje, že cytokiníny skutočne umožňujú na lokálnej úrovni vyrastanie pupeňov - a to na základe urýchlenia polárnej lokalizácie PIN1 proteínov, čím je silne stimulovaný transport auxínu z jeho zdroja do sinku. V neposlednej rade táto práca prináša doklady aj o systémovom pôsobení cytokinínov v rámci procesu apikálnej dominancie, v rámci ktorého môže zvýšenie hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte (X-CK) viesť k stimulácii vyrastania axilárnych pupeňov. Naopak, hladina X-CK však môže byť podstatne znížená zvýšenou hladinou auxínu, napríklad na základe exogénnej aplikácie, čo spôsobuje opäť inhibíciu alebo obmedzenie stonkového vetvenia. Toto znovu poukazuje na kľúčovú úlohu auxínu v regulácii vyrastania axilárnych pupeňov, a tiež na významnosť interakcie auxínu s ďalším rastlinným hormónom. Navyše, experimenty s mutantnými líniami hrachu

ramosus (*rms1* a *rms2*) odhalili, že okrem primárnej regulácie apikálnej dominancie auxínom, je pre zabezpečenie harmonického utvárania morfológických štruktúr nadzemnej časti rastliny v prostredí s meniacimi sa podmienkami, potrebné koordinované spolupôsobenie auxínu tiež s rastlinným hormónom strigolaktónom, čo ukazuje na existenciu komplexného fytohormonálneho systému regulácie apikálnej dominancie.

7 POUŽITÁ LITERATÚRA

AGUILAR-MARTÍNEZ, J. A., POZA-CARRIÓN, C., CUBAS, P., 2007: *Arabidopsis* BRANCHED1 acts as an integrator of branching signals within axillary buds. *The Plant Cell*, 19: 458-472.

AGUSTI, J., HEROLD, S., SCHWARZ, M., SANCHEZ, P., LJUNG, K., DUN, E. A. *et al.*, 2011: Strigolactone signaling is required for auxin-dependent stimulation of secondary growth in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 108: 20242-20247.

AL-BABILI, S., BOUWMEESTER, H. J., 2015: Strigolactones, a novel carotenoid-derived plant hormone. *Annual Review of Plant Biology*, 66: 161-186.

ALDER, A., JAMIL, M., MARZORATI, M., BRUNO, M., VERMATHEN, M., BIGLER, P. *et al.*, 2012: The path from β -carotene to carlactone, a strigolactone-like plant hormone. *Science*, 335: 1348-1351.

ALLEN, M., QIN, W., MOREAU, F., MOFFATT, B., 2002: Adenine phosphoribosyltransferase isoforms of *Arabidopsis* and their potential contributions to adenine and cytokinin metabolism. *Physiologia Plantarum*, 115: 56-68.

ALONI, R., 2001: Foliar and axial aspects of vascular differentiation: Hypotheses and evidence. *Journal of Plant Growth Regulation*, 20: 22-34.

AMIJIMA, M., IWATA, Y., KOIZUMI, N., MISHIBA, K., 2014: The polar auxin inhibitor TIBA inhibits endoreduplication in dark grown spinach hypocotyls. *Plant Science*, 225: 45-51.

ARITE, T., IWATA, H., OHSHIMA, K., MAEKAWA, M., NAKAJIMA, M., KOJIMA, M. *et al.*, 2007: *DWARF10*, an *RMS1/MAX4/DAD1* ortholog, controls lateral bud outgrowth in rice. *The Plant Journal*, 51: 1019-1029.

BAINBRIDGE, K., SOREFAN, K., WARD, S., LEYSER, O., 2005: Hormonally controlled expression of the *Arabidopsis* MAX4 shoot branching regulatory gene. *The Plant Journal*, 44: 569-580.

BALIGA, B. S., PRONCZUK, A. W., MUNRO, H. N., 1969: Mechanism of cycloheximide inhibition of protein synthesis in a cell-free system prepared from rat liver. *The Journal of Biological Chemistry*, 244: 4480-4489.

- BALLA, J., KALOUSEK, P., REINOHL, V., FRIML, J., PROCHÁZKA, S., 2011: Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *The Plant Journal*, 65: 571-577.
- BANGERTH, F., 1989: Dominance among fruits/sinks and the search for a correlative signal. *Physiologia Plantarum*, 76: 608-614.
- BANGERTH, F., 1994: Response of cytokinin concentration in the xylem exudates of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) plants to decapitation and auxin treatment, and relationship to apical dominance. *Planta*, 194: 439-442.
- BANGERTH, F., LI, C. J., GRUBER, J., 2000: Mutual interaction of auxin and cytokinins in regulating correlative dominance. *Plant Growth Regulation*, 32: 205-217.
- BARBEZ, E., KUBEŠ, M., ROLCÍK, J., BÉZIAT, C., PENCÍK, A., WANG, B., *et al.*, 2012: A novel putative auxin carrier family regulates intracellular auxin homeostasis in plants. *Nature*, 485: 119-122.
- BAYER, E., SMITH, R., MANDEL, T., NAKAYAMA, N., SAUER, M., PRUSINKIEWICZ, P. *et al.*, 2009: Integration of transport-based models for phyllotaxis and midvein formation. *Genes and Development*, 23: 373-384.
- BECK, E., WAGNER, B. M., 1994: Quantification of the daily cytokinin transport from the root to the shoot of *Urtica dioica* L. *Botanica Acta*, 107: 342-348.
- BENJAMINS, R., QUINT, A., WEIJERS, D., HOOYKAAS, P., OFFRINGA, R., 2001: The PINOID protein kinase regulates organ development in *Arabidopsis* by enhancing polar auxin transport. *Development*, 128: 4057-4067.
- BENKOVÁ, E., MICHNIEWICZ, M., SAUER, M., TEICHMENN, T., SEIFERTOVÁ, D., JÜRGENS, G. *et al.*, 2003: Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation. *Cell*, 15: 591-602.
- BENNETT, S. R. M., ALVAREZ, J., BOSSINGER, G., SMYTH, D. R., 1995: Morphogenesis in pinoid mutants of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 8: 505-520.
- 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.
- BENNETT, T., LEYSER, O., 2006: Something on the side: Axillary meristems and plant development. *Plant Molecular Biology*, 60: 843-854.

- BENNETT, T., SIEBERER, T., WILLET, B., BOOKER, J., LUSCHNIG, C., LEYSER, O., 2006: The *Arabidopsis* MAX pathway controls shoot branching by regulating auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 16: 553-563.
- BENNETT, T., HINES, G., van RONGEN, M., WALDIE, T., SAWCHUK, G., SCARPELLA, E. *et al.*, 2016: Connective auxin transport in the shoot facilitates communication between shoot apices. *PLOS Biology*, 14(4):e1002446.
- BERNASCONI, P., PATEL, B. C., REAGAN, J. D., SUBRAMANIAN, M. V., 1996: The N-1-naphthylphthalamic acid-binding protein is an integral membrane protein. *Plant Physiology*, 1115: 427-432.
- BEVERIDGE, C. A., ROSS, J. J., MURFET, I. C., 1994: Branching mutant *rms-2* in *Pisum sativum*: grafting studies and endogenous indole-3-acetic acid levels. *Plant Physiology*, 104: 953-959.
- BEVERIDGE, C. A., ROSS, J. J., MURFET, I. C., 1996: Branching in pea: action of genes *Rms3* and *Rms4*. *Plant Physiology*, 110: 859-865.
- BEVERIDGE, C. A., MURFET, I. C., KERHOAS, L., SOTTA, B., MIGINIAC, E., RAMEAU, C., 1997a: The shoot controls zeatin riboside export from pea roots. Evidence from the branching mutant *rms4*. *The Plant Journal*, 11: 339-345.
- BEVERIDGE, C. A., SYMONS, G. M., MURFET, I. C., ROSS, J. J., RAMEAU, C., 1997b: The *rms1* mutant of pea has elevated indole-3-acetic acid levels and reduced root-sap zeatin riboside content but increased branching controlled by graft-transmissible signal(s). *Plant Physiology*, 115: 1251-1258.
- BEVERIDGE, C. A., SYMONS, G. M., TURNBULL, C. G. N., 2000: Auxin inhibition of decapitation-induced branching is dependent on graft-transmissible signals regulated by genes *Rms1* and *Rms2*. *Plant Physiology*, 123: 689-697.
- BHALERAO, R. P., EKLÖF, J., LJUNG, K., MARCHANT, A., BENNETT, M., SANDBERG, G., 2002: Shoot derived auxin is essential for early lateral root emergence in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 29: 325-332.
- BIALEK, K., COHEN, J. D., 1986: Isolation and partial characterization of the major amide-linked conjugate of indole-3-acetic acid from *Phaseolus vulgaris* L., *Plant Physiology*, 80: 99-104.
- BLAKESLEE, J. J., BANDYOPADHYAY, A., PEER, W. A., MAKAM, S. N., MURPHY, A. S., 2004: Relocalization of the PIN1 auxin efflux facilitator plays a role in phototropic response. *Plant Physiology*, 134: 28-31.

- BLAKESLEE, J. J., PEER, W. A., MURPHY, A. S., 2005: Auxin transport. *Current Opinion in Plant Biology*, 8: 494-500.
- BLAKESLEE, J. J., BANDYOPADHYAY, A., LEE, O. R., MRAVEC, J., TITAPIWATANAKUN, B., SAUER, M. *et al.*, 2007: Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 19: 131-147.
- BLAŽKOVÁ, J., KREKULE, J., MACHÁČKOVÁ, I., PROCHÁZKA, S., 1999: Auxin and cytokinins in the control of apical dominance in pea: a differential response due to bud position. *Plant Physiology*, 154: 691-696.
- BOOKER, J., CHATFIELD, S., LEYSER, O., 2003: Auxin acts in xylem-associated or medullary cells to mediate apical dominance. *The Plant Cell*, 15: 495-507.
- BOOKER, J., AULDRIDGE, M., WILLS, S., MCCARTY, D., KLEE, H., LEYSER, O., 2004: MAX3/CCD7 is a carotenoid cleavage dioxygenase required for the synthesis of a novel plant signaling molecule. *Current Biology*, 14: 1232-1238.
- BOOKER, J., SIEBERER, T., WRIGHT, W., WILLIAMSON, L., WILLETT, B., STIRNBERG, P. *et al.*, 2005: MAX1 encodes a cytochrome P450 family member that acts downstream of MAX3/4 to produce a carotenoid-derived branch-inhibiting hormone. *Developmental Cell*, 8: 443-449.
- BÖHNER, S., GATZ, C., 2001: Characterisation of novel target promoters for the dexamethasone-inducible/tetracycline-repressible regulator TGV using luciferase and isopentenyl transferase as sensitive reporter genes. *Molecular and General Genetics*, 264: 860-870.
- BRAUN, N., de SAINT GERMAIN, A., PILLOT, J. P., BOUTET-MERCEY, S., DALMAIS, M., ANTONIADI, I. *et al.*, 2012: The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiology*, 158: 225-238.
- BREWER, P., DUN, E., FERGUSON, B., RAMEAU, C., BEVERIDGE, C., 2009: Strigolactone acts downstream of auxin to regulate bud outgrowth in pea and Arabidopsis. *Plant Physiology*, 150: 482-493.
- BREWER, P. B., KOLTAI, H., BEVERIDGE, C. A., 2013: Diverse roles of strigolactones in plant development. *Molecular Plant*, 6: 18-28.

- BRZOBOHATÝ, B., MOORE, I., KRISTOFFERSEN, P., BAKO, L., CAMPOS, N., SCHELL, J. *et al.*, 1993: Release of active cytokinin by a β -glucosidase localized to the maize root meristem. *Science*, 262: 1051-1054.
- BURTON, J. D., PEDERESSEN, M. K., COBLE, H. D., 2008: Effect of cyclanilide on auxin activity. *Journal of Plant Growth Regulation*, 27: 342-352.
- BÜRKLE, L., CEDZICH, A., DÖPKE, C., STRANSKY, H., OKUMOTO, S., GILLISSEN, B. *et al.*, 2003: Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 34: 13-26.
- CAMBRIDGE, A., MORRIS, D., 1996: Transfer of exogenous auxin from the phloem to the polar auxin transport pathway in pea (*Pisum sativum* L.). *Planta*, 1995: 583-588.
- CARLAND, F., FUJIOKA, S., NELSON, T., 2010: The sterol methyltransferases SMT1, SMT2, and SMT3 influence *Arabidopsis* development through nonbrassinosteroid products. *Plant Physiology*, 153: 741-756.
- CASIMIRO, I., BEECKMAN, T., GRAHAM, N., BHALERAO, R., ZHANG, H., CASERO, P. *et al.*, 2003: Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. *Trends in Plant Science*, 4: 165-171.
- CLINE, M. G., 1991: Apical dominance. *Botanical Review*, 57: 318-358.
- CLINE, M. G., 1994: The role of hormones in apical dominance: New approaches to an old problem in plant development. *Physiologia Plantarum*, 90: 230-237.
- CLINE, M. G., 1997: Concepts and terminology of apical dominance. *American Journal of Botany*, 84: 1064-1069.
- COENEN, C., LOMAX, T. L., 1997: Auxin-cytokinin interaction in higher plants: Old problems and new tools. *Trends in Plant Science*, 2: 351-356.
- COOK, C. E., WHICHARD, L. P., TURNER, B., WALL, M. E., EGGLEY, G. H., 1966: Germination of witchweed (*Striga lutea* Lour.): isolation and properties of a potent stimulant. *Science*, 154: 1189-1190.
- CORBESIER, L., PRINSEN, E., JACQMARD, A., LEJEUNE, P., VAN ONCKELEN, H., PÉRILLEUX, C. *et al.*, 2003: Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany*, 54: 2511-2517.

- COX, D. N., MUDAY, G. K., 1994: NPA binding-activity is peripheral to the plasma membrane and is associated with the cytoskeleton. *The Plant Cell*, 65: 1941-1953.
- CRAWFORD, S., SHINOHARA, N., SIEBERER, T., WILLIAMSON, L., GEORGE, G., HEPWORTH, J. *et al.*, 2010: Strigolactones enhance competition between shoot branches by dampening auxin transport. *Development*, 137: 2905-2913.
- DAI, X., MASHIGUCHI, K., CHEN, Q., KASAHARA, H., KAMIYA, Y., OJHA, S. *et al.*, 2013: The biochemical mechanism of auxin biosynthesis by an *Arabidopsis* YUCCA flavin-containing monooxygenase. *The Journal of Biological Chemistry*, 288: 1448-1457.
- DAVIES, C. R., SETH, A. K., WAREING, P. F., 1966: Auxin and kinetin interaction in apical dominance. *Science*, 151: 468-469.
- DELAUX, P. M., XIE, X. N., TIMME, R. E., PUECH-PAGES, V., DUNAND, C., LECOMPTE, E. *et al.*, 2012: Origin of strigolactones in the green lineage. *New Phytologist*, 195: 857-871.
- DELBARRE, A., MULLER, P., GUERN, J., 1998: Short-lived and phosphorylated proteins contribute to carrier-mediated efflux, but not to influx, of auxin in suspension-cultured tobacco cells. *Plant Physiology*, 1165: 833-844.
- DE SMET, I., JÜRGENS, G., 2007: Patterning the axis in plants--auxin in control. *Current Opinion in Genetics and Development*, 17: 337-343.
- DHARMASIRI, S., SWARUP, R., MOCKAITIS, K., DHARMASIRI, N., SINGH, S. K., KOWALCHYK, M. *et al.*, 2006: AXR4 is required for localization of the auxin influx facilitator AUX1. *Science*, 3125: 1218-1220.
- DHONUJSHE, P., GRIGORIEV, I., FISCHER, R., TOMINAGA, M., ROBINSON D. G., HAŠEK J. *et al.*, 2008: Auxin transport inhibitors impair vesicle motility and actin cytoskeleton dynamics in diverse eukaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 105: 4489-4494.
- DHONUJSHE, P., HUANG, F., GALVAN-AMPUDIA, C. S., MAHONEN, A. P., KLEINE-VEHN, J., XU, J. *et al.*, 2010: Plasma membrane-bound AGC3 kinases phosphorylate PIN auxin carriers at TPRXS(N/S) motifs to direct apical PIN recycling. *Development*, 137: 3245-3255.
- DING, Z., WANG, B., MORENO, I., DUPLÁKOVÁ, N., SIMON, S., CARRARO, N., *et al.*, 2012: ER-localized auxin transporter PIN8 regulates auxin homeostasis and male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Nature Communications*, 3: 941.

- DOEBLEY, J., STEC, A., HUBBARD, L., 1997: The evolution of apical dominance in maize. *Nature*, 386: 485-488.
- DOMAGALSKA, M. A., LEYSER, O., 2011: Signal integration in the control of shoot branching. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 12: 211-221.
- DOSTÁL, R., 1908: Correlation relationships in germinating plants of *Papilionaceae*. *Rozpravy České Akademie II*, 17: 1-44.
- DUBROVSKY, J. G., SAUER, M., NAPSUCIALY-MENDIVIL, S., IVANCHENKO, M. G., FRIML, J., SHISHKOVA, S. *et al.*, 2008: Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 105: 8790-8794.
- DUN, E. A., BREWER, P. B., BEVERIDGE, C. A., 2009: Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends in Plant Science*, 14: 364-372.
- DUN, E. A., de SAINT GERMAIN, A., RAMEAU, C., BEVERIDGE, C. A., 2012: Antagonistic action of strigolactone and cytokinin in bud outgrowth control. *Plant Physiology*, 158: 487-498.
- DUN, E. A., de SAINT GERMAIN A., RAMEAU, C., BEVERIDGE, C. A., 2013: Dynamics of strigolactone function and shoot branching responses in *Pisum sativum*. *Molecular Plant*, 6: 128-140.
- EKLÖF, S., ÅSTOT, C., SITBON, F., MORITZ, T., OLSSON, O., SANDBERG, G., 2000: Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overexpressing phenotypes. *The Plant Journal*, 23: 279-284.
- ELHITI, M., STASOLLA, C., 2011: Ectopic expression of the *Brassica SHOOTMERISTEMLESS* attenuates the deleterious effects of the auxin transport inhibitor TIBA on somatic embryo number and morphology. *Plant Science*, 180: 383-390.
- EMERY, R. J. N., LONGNECKER, N. E., ATKINS, C. A., 1998: Branch development in *Lupinus angustifolius* L. II Relationship with endogenous ABA, IAA and CKs in axillary and main stem buds. *Journal of Experimental Botany*, 49: 555-562.
- EPSTEIN, E., LUDWIG-MÜLLER, J., 1993: Indole-3-butyric acid in plants: occurrence, synthesis, metabolism and transport. *Physiologia Plantarum*, 88: 382-389.

- FAISS, M., ZALUBÍLOVÁ, J., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T., 1997: Conditional transgenic expression of the *ipt* gene indicates a function for cytokinins in paracrine signaling in whole tobacco plants. *The Plant Journal*, 12: 401-15.
- FERGUSON, B. J., BEVERIDGE, C. A., 2009: Roles for auxin, cytokinin, and strigolactone in regulating shoot branching. *Plant Physiology*, 149: 1929-1944.
- FISCHER, U., IKEDA, Y., LJUNG, K., SERRALBO, O., SINGH, M., HEIDSTRA, R. *et al.*, 2006: Vectorial information for *Arabidopsis* planar polarity is mediated by combined AUX1, EIN2, and GNOM activity. *Current Biology*, 16: 2143-2149.
- FOO, E., BULLIER, E., GOUSSOT, M., FOUCHER, F., RAMEAU, C., BEVERIDGE, C. A., 2005: The branching gene *RAMOSUS1* mediates interactions among two novel signals and auxin in pea. *The Plant Cell*, 17: 464-474.
- FOO, E., MORRIS, S. E., PARMENTER, K., YOUNG, N., WANG, H., JONES, A. *et al.*, 2007: Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 143: 1418-1428.
- FOO, E., DAVIES, N. W., 2011: Strigolactones promote nodulation in pea. *Planta*, 234: 1073-1081.
- FRIML, J., BENKOVÁ, E., BLILOU, I., WISNIEWSKA, J., HAMANN, T., LJUNG, K. *et al.*, 2002a: AtPIN4 mediates sink-driven auxin gradients and root patterning in *Arabidopsis*. *Cell*, 108: 661-673.
- FRIML, J., WIŚNIEWSKA, J., BENKOVÁ, E., MENDGEN, K., PALME, K., 2002b: Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature*, 415: 806-809.
- FRIML J., 2003: Auxin transport - shaping the plant. *Current Opinion in Plant Biology*, 6: 7-12.
- FRIML, J., VIETEN, A., SAUER, M., WEIJERS, D., SCHWARZ, H., HAMANN, T. *et al.*, 2003: Efflux-dependent auxin gradients establish the apical-basal axis of *Arabidopsis*. *Nature*, 426: 147-153.
- FRIML, J., YANG, X., MICHNIEWICZ, M., WEIJERS, D., QUINT, A., TIETZ, O. *et al.*, 2004: A PINOID-dependent binary switch in apical-basal PIN polar targeting directs auxin efflux. *Science*, 306: 862-865.
- FUJITA, H., SYONO, K., 1996: Genetic analysis of the effects of polar transport inhibitors on root growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 37: 1094-1101.

- FURUTANI, M., VERNOUX, T., TRAAS, J., KATO, T., TASAKA, M., AIDA, M., 2004: *PIN-FORMED1* and *PINOID* regulate boundary formation and cotyledon development in *Arabidopsis* embryogenesis. *Development*, 131: 5021-5030.
- GALUSZKA, P., FRÉBORTOVÁ, J., WERNER, T., YAMADA, M., STRNAD, M., SCHMÜLLING, T. *et al.*, 2004: Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat: cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry*, 271: 3990-4002.
- GAN, S., AMASINO, R.M., 1995: Inhibition of leaf senescence by autorregulated production of cytokinin. *Science*, 270: 1986-1988.
- GANGULY, A., LEE, S. H., CHO, M., LEE, O. R., YOO, H., CHO, H. T., 2010: Differential auxin-transporting activities of PIN-FORMED proteins in *Arabidopsis* root hair cells. *Plant Physiology*, 153: 1046-1061.
- GANGULY, A., LEE, S. H., CHO, H. T., 2012a: Functional identification of the phosphorylation sites of *Arabidopsis* PIN-FORMED3 for its subcellular localization and biological role. *The Plant Journal*, 71: 810-823.
- GANGULY, A., SASAYAMA, D., CHO, H. T., 2012b: Regulation of the polarity of protein trafficking by phosphorylation. *Molecules and Cells*, 33: 423-430.
- GÄLWEILER, L., GUAN, C., MÜLLER, A., WISMAN, E., MENDGEN, K., YEPHREMOV A. *et al.*, 1998: Regulation of polar auxin transport by *AtPIN1* in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science*, 282: 2226-2230.
- GEISLER, M., BLAKESLEE, J. J., BOUCHARD, R., LEE, O. R., VINCENZETTI, V., BANDYOPADHYAY, A. *et al.*, 2005: Cellular efflux of auxin catalyzed by the *Arabidopsis* MDR/PGP transporter *AtPGP1*. *The Plant Journal*, 44: 179-94.
- 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.
- GELDNER, N., ANDERS, N., WOLTERS, H., KEICHER, J., KORNBERGER, W., MULLER, P. *et al.*, 2003: The *Arabidopsis* GNOM ARF-GEF mediates endosomal recycling, auxin transport, and auxin-dependent plant growth. *Cell*, 112: 219-230.
- GILLISSEN, B., BÜRKLE, L., ANDRE, B., KÜHN, C., RENTSCH, D., BRANDL, B. *et al.*, 2000: A new family of high-affinity transporters for adenine, cytosine, and purine derivatives in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 12: 291-300.

- GOEBEL K., 1900: Beiträge zur Morphologie und Physiologie des Blattes. *Botanische Zeitung*, 38: 809.
- GOLDSMITH, M. H. M., 1977: Polar transport of auxin. *Annual Review of Plant Physiology*, 28: 439-478.
- GOLOVKO, A., SITBON, F., TILLBERG, E., NICANDER, B., 2002: Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 49: 161-169.
- GOMEZ-ROLDAN, V., FERMAS, S., BREWER, P. B., PUECH-PAGÈS, V., DUN, E. A., PILLOT, J. P. *et al.*, 2008: Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455: 189-194.
- GONZÁLEZ-GRANDÍO, E., POZA-CARRIÓN, C., SORZANO, C., CUBAS, P., 2013: *BRANCHED1* promotes axillary bud dormancy in response to shade in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 25: 834-850.
- GREBE, M., FRIML, J., SWARUP, R., LJUNG, K., SANDBERG, G., TERLOU, M., 2002: Cell polarity signaling in *Arabidopsis* involves a BFA-sensitive auxin influx pathway. *Current Biology*, 125: 329-334.
- GRUNEWALD, W., FRIML, J., 2010: The march of the PINs: developmental plasticity by dynamic polar targeting in plant cells. *EMBO Journal*, 29: 2700-2714.
- HAYWARD, A., STIRNBERG, P., BEVERIDGE, C. A., LEYSER, O., 2009: Interactions between auxin and strigolactone in shoot branching control. *Plant Physiology*, 151: 400-412.
- HEISLER, M. G., OHNO, C., DAS, P., SIEBER, P., REDDY, G. V., LONG, J. A. *et al.*, 2005: Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Current Biology*, 15: 1899-1911.
- HEISLER, M. G., HAMANT, O., KRUPINSKI, P., UYTTEWAAL, M., OHNO, C., JÖNSSON, H. *et al.*, 2010: Alignment between PIN1 polarity and microtubule orientation in the shoot apical meristem reveals a tight coupling between morphogenesis and auxin transport. *PLOS Biology*, 8: e1000516.
- HILLMAN, J. R., 1984: Apical Dominance. In M. B. Wilkins (Ed.), *Advanced Plant Physiology*, London: Pitman, 127-148.

- HIROSE, N., TAKEI, K., KUROHA, T., KAMADA-NOBUSADA, T., HAYASHI, H., SAKAKIBARA, H., 2008: Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany*, 59: 75-83.
- HORTON, R. F., 1993: Peroxidase, ethylene, and submergence-promoted growth of petioles of *Ranunculus sceleratus* L. *Journal of Plant Physiology*, 141: 690-693.
- HOU, B., LIM, E. K., HIGGINS, G., BOWLES, D. J., 2004: N-Glucosylation of cytokinins by glycosyltransferases of *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 47822-47832.
- HUANG, F., ZAGO, M. K., ABAS, L., VAN MARION, A., GALVÁN-AMPUDIA, C. S., OFFRINGA, R., 2010: Phosphorylation of conserved PIN motifs directs *Arabidopsis* PIN1 polarity and auxin transport. *The Plant Cell*, 22: 1129-1142.
- HUBBARD, L., MCSTEEN, P., DOEBLEY, J., HAKE, S., 2002: Expression patterns and mutant phenotype of teosinte branched1 correlate with growth suppression in maize and teosinte. *Genetics*, 162: 1927-1935.
- CHEN, C. M., ERTL, J. R., LEISNER, S. M., CHANG, C. C., 1985: Localization of cytokinin biosynthetic sites in pea plants and carrot roots. *Plant Physiology*, 78: 510-513.
- CHENG, Y., DAI, X., ZHAO, Y., 2006: Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20: 1790-1799.
- CHENG, Y., DAI, X., ZHAO, Y., 2007: Auxin synthesized by the YUCCA flavin monooxygenases is essential for embryogenesis and leaf formation in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 19: 2430-2439.
- CHO, M., LEE, S. H., CHO, H. T., 2007a: P-Glycoprotein4 displays auxin efflux transporter like action in *Arabidopsis* root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell*, 19: 3930-3943.
- CHO, M., LEE, O. R., GANGULY, A., CHO, H. T., 2007b: Auxin-signaling: short and long. *Journal of Plant Biology*, 50: 79-89.
- CHO, M., LEE, Z. W., CHO, H. T., 2012: ATP-binding cassette B4, an auxin-efflux transporter, stably associates with the plasma membrane and shows distinctive intracellular trafficking from that of PIN-FORMED proteins. *Plant Physiology*, 159: 642-654.

- CHRISTENSEN, S. K., DAGENAIS, N., CHORY, J., WEIGEL, D., 2000: Regulation of auxin response by the protein kinase PINOID. *Cell*, 100: 469-478.
- ISHIKAWA, S., MAEKAWA, M., ARITE, T., ONISHI, K., TAKAMURE, I., KYOZUKA, J., 2005: Suppression of tiller bud activity in tillering dwarf mutants of rice. *Plant and Cell Physiology*, 46: 79-86.
- JOHNSON, X., BRCICH, T., DUN, E. A., GOUSSOT, M., HAUROGNE, K., BEVERIDGE, C. A. *et al.*, 2006: Branching genes are conserved across species: genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiology*, 142: 1014-1026.
- JONES, A. R., KRAMER, E. M., KNOX, K., SWARUP, R., BENNETT, M. J., LAZARUS, C. M., *et al.*, 2009: Auxin transport through non-hair cells sustains root-hair development. *Nature Cell Biology*, 11: 78-84.
- KAKIMOTO, T. 2001: Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology*, 42: 677-685.
- KALOUSEK, P., BUCHTOVÁ, D., BALLA, J., REINOHL, V., PROCHÁZKA S., 2010: Cytokinins and polar transport of auxin in axillary pea buds. *Acta universitatis agriculturae et silviculturae mendelianae brunensis*, 4: 79-87.
- KASAHARA, H., TAKEI, K., UEDA, N., HISHIYAMA, S., YAMAYA, T., KAMIYA, Y. *et al.*, 2004: Distinct isoprenoid origins of cis- and trans-zeatin biosyntheses in *Arabidopsis*. *The Journal of Biological Chemistry*, 279: 14049-14054.
- KATEKAR, G. F., GEISLER, A. E., 1980: Auxin transport inhibitors. IV. Evidence of a common mode of action for a proposed class of auxin transport inhibitors, the phytotropins. *Plant Physiology*, 66: 1190-1195.
- KEBROM, T. H., BURSON, B. L., FINLAYSON, S. A., 2006: *Phytochrome B* represses *teosinte branched1* expression and induces sorghum axillary bud outgrowth in response to light signals. *Plant Physiology*, 140: 1109-1117.
- KERR, I. D., BENNETT, M. J., 2007: New insight into the biochemical mechanisms regulating auxin transport in plants. *Biochemical Journal*, 401:613-622.
- KIBA, T., TAKEI, K., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H., 2013: Side-chain modification of cytokinins controls shoot growth in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*, 27: 452-461.

- KIM, J. Y., HENRICHS, S., BAILLY, A., VINCENZETTI, V., SOVERO, V., MANCUSO, S. *et al.*, 2010: Identification of an ABCB/P-glycoprotein-specific inhibitor of auxin transport by chemical genomics. *The Journal of Biological Chemistry*, 285: 23309-23317.
- KLEINE-VEHN, J., DHONUKSHE, P., SWARUP, R., BENNETT, M., FRIML, J., 2006: Subcellular trafficking of the *Arabidopsis* auxin influx carrier AUX1 uses a novel pathway distinct from PIN1. *The Plant Cell*, 18: 3171-3181.
- KLEINE-VEHN, J., DHONUKSHE, P., SAUER, M., BREWER, P., WIŚNIEWSKA, J., PACIOREK, T. *et al.*, 2008: ARF GEF-dependent transcytosis and polar delivery of PIN auxin carriers in *Arabidopsis*. *Current Biology*, 18: 526-531.
- KLEINE-VEHN, J., WABNIK, K., MARTINIÈRE, A., ŁANGOWSKI, Ł., WILLIG, K., NARAMOTO, S. *et al.*, 2011: Recycling, clustering, and endocytosis jointly maintain PIN auxin carrier polarity at the plasma membrane. *Molecular Systems Biology*, 7: 540.
- KO, D., KANG, J., KIBA, T., PARK, J., KOJIMA, M., DO, J. *et al.*, 2014: *Arabidopsis* ABCG14 is essential for the root-to-shoot translocation of cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA* 111: 7150-7155.
- KOHLLEN, W., CHARNIKHOVA, T., LIU, Q., BOURS, R., DOMAGALSKA, M. A., BEQUERIE, S. *et al.*, 2011: Strigolactones are transported through the xylem and play a key role in shoot architectural response to phosphate deficiency in nonarbuscular mycorrhizal host *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 155: 974-987.
- KOHLLEN, W., CHARNIKHOVA, T., LAMMERS, M., POLLINA, T., TÓTH, P., HAIDER, I. *et al.*, 2012: The tomato CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 (SICCD8) regulates rhizosphere signaling, plant architecture and affects reproductive development through strigolactone biosynthesis. *New Phytologist*, 196: 535-47.
- KOWALCZYK, M., SANDBERG, G., 2001: Quantitative analysis of indole-3-acetic acid metabolites in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 127: 1845-1853.
- KRETZSCHMAR, T., KOHLLEN, W., SASSE, J., BORGHI, L., SCHLEGEL, M., BACHELIER, J. B. *et al.*, 2012: A petunia ABC protein controls strigolactone-dependent symbiotic signalling and branching. *Nature*, 483: 341-344.
- KŘEČEK, P., SKŮPA, P., LIBUS, J., NARAMOTO, S., TEJOS, R., FRIML, J. *et al.*, 2009: The PIN-FORMED (PIN) protein family of auxin transporters. *Genome Biology*, 10: 249.

- KUBEŠ, M., YANG, H., RICHTER, G. L., CHENG, Y., MŁODZIŃSKA, E., WANG, X. *et al.*, 2012: The Arabidopsis concentration-dependent influx/efflux transporter ABCB4 regulates cellular auxin levels in the root epidermis. *The Plant Journal*, 69: 640-654.
- KUDO, T., KIBA, T., SAKAKIBARA, H., 2010: Metabolism and long-distance translocation of cytokinins. *Journal of Integrative Plant Biology*, 52: 53-60.
- LANG, G. A., EARLY, J. D., DARNELL, R. D., MARTIN, G. C., 1987: Endo-, para- and ecodormancy: physiological terminology and classification for dormancy research. *Horticultural Science*, 22: 371-377.
- LAUX, T., JÜRGENS, G., 1997: Embryogenesis: A new start in life. *The Plant Cell*, 9: 989-1000.
- LAZAR, G., GOODMAN, H. M., 2006: MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 103: 472-476.
- LEE, S. H., CHO, H. T., 2006: PINOID positively regulates auxin efflux in Arabidopsis root hair cells and tobacco cells. *The Plant Cell*, 18: 1604-1616.
- LEJEUNE, P., KLINET, J. A., BERNIER, G., 1988: Cytokinin fluxes during floral induction in the long day plant *Sinapis alba* L. *Plant Physiology*, 86: 1095-1098.
- LEJEUNE, P., BERNIER, G., REQUIER, M. C., KINET, J. M., 1994: Cytokinins in phloem and xylem saps of *Sinapis alba* during floral induction. *Physiologia Plantarum*, 90: 522-528.
- LETHAM, D. S., 1963: Zeatin, a factor inducing cell division from *Zea mays*. *Life Sciences*, 8: 569-573.
- LETHAM, D. S., PALNI, L. M. S., TAO, G. Q., GOLLNOW, B. I., BATES, C. M., 1983: Regulators of cell division in plant tissues XXIX. The activities of cytokinin glucosides and alanine conjugates in cytokinin bioassay. *Journal of Plant Growth Regulation*, 2: 103-115.
- LI, C. J., GUEVARA, E., HERRERA, J., BANGERTH, F., 1995: Effect of apex excision and replacement by 1-naphthylacetic acid on CK concentration and apical dominance in pea plants. *Physiologia Plantarum*, 94: 465-469.
- LI, C. J., BANGERTH, F., 1999: Autoinhibition of indoleacetic acid transport in the shoots of two-branched pea (*Pisum sativum*) plants and its relationship to correlative dominance. *Physiologia Plantarum*, 106: 415-420.

- LI, C. J., BANGERTH, F., 2003: Stimulatory effect of cytokinins and interaction with IAA on the release of lateral buds of pea plants from apical dominance. *Journal of Plant Physiology*, 160: 1059-1063.
- LIANG, J., ZHAO, L., CHALLIS, R., LEYSER, O., 2010: Strigolactone regulation of shoot branching in chrysanthemum (*Dendranthema grandiflorum*). *Journal of Experimental Botany*, 61: 3069-3078.
- LIU, C. M., XU, Z., CHUA, N. H., 1993: Auxin polar transport is essential for the establishment of bilateral symmetry during early plant embryogenesis. *The Plant Cell*, 5: 621-630.
- LJUNG, K., BHALERAO, R. P., SANDBERG, G., 2001: Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *The Plant Journal*, 28: 465-474.
- LUDWIG-MÜLLER, J., 2000: Indole-3-butyric acid in plant growth and development. *Plant Growth Regulators*, 32: 219-230.
- LUDWIG-MÜLLER, J., SASS, S., SUTTER, E. G., WODNER, M., EPSTEIN, E., 1993: Indole-3-butyric acid in *Arabidopsis thaliana* I. Identification and quantification. *Plant Growth Regulators*, 13: 179-187.
- LUDWIG-MÜLLER, J., EPSTEIN, E., 1991: Occurrence and in vivo biosynthesis of indole-3-butyric acid in corn. *Plant Physiology*, 97: 765-770.
- LUSCHNIG, C., GAXIOLA, R. A., GRISAFI, P., FINK, G. R., 1998: EIR1, a root-specific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Genes and Development*, 12: 2175-2187.
- MACHÁČKOVÁ, I., Růst a vývoj: Růstové regulátory. In: PROCHÁZKA, S. *et al.*, 2003: Fyziologie rostlin. *Academia Praha*, 226-284, ISBN: 80-200-0586-2.
- MARHAVÝ, P., DUCLERCQ, J., WELLER, B., FERARU, E., BIELACH, A., OFFRINGA, R. *et al.*, 2014: Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis. *Current Biology*, 24: 1031-1037.
- MARTÍN-TRILLO, M., GRANDÍO, E. G., SERRA, F., MARCEL, F., RODRÍGUEZ-BUEY, M. L., SCHMITZ, G. *et al.*, 2011: Role of tomato *BRANCHED1*-like genes in the control of shoot branching. *The Plant Journal*, 67: 701-714.
- MASON, M. G., ROSS, J. J., BABST, B. A., WIENCLAW, B. N., BEVERIDGE, C. A., 2014: Sugar demand, not auxin, is the initial regulator of apical dominance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 111: 6092-6097.

- MATTSSON, J., CKURSHUMOVA, W., BERLETH, T., 2003: Auxin signaling in *Arabidopsis* leaf vascular development. *Plant Physiology*, 131: 1327-1339.
- MATUSOVA, R., RANI, K., VERSTAPPEN, F. W. A., FRANSSEN, M. C. R., BEALE, M. H., BOUWMEESTER, H. J., 2005: The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobancha* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiology*, 139: 920-934.
- MASHIGUCHI, K., TANAKA, K., SAKAI, T., SUGAWARA, S., KAWAIDE, H., NATSUME, M. *et al.*, 2011: The main auxin biosynthesis pathway in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 108: 18512-18517.
- MEN, S., BOUTTÉ, Y., IKEDA, Y., LI, X., PALME, K., STIERHO, F. Y. D. *et al.*, 2008: Sterol-dependent endocytosis mediates post-cytokinetic acquisition of PIN2 auxin efflux carrier polarity. *Nature Cell Biology*, 10: 237-244.
- MIYAWAKI, K., MATSUMOTO-KITANO, M., KAKIMOTO, T., 2004: Expression of cytokinin biosynthetic isopentenyltransferase genes in *Arabidopsis*: tissue specificity and regulation by auxin, cytokinin, and nitrate. *The Plant Journal*, 37: 128-138.
- MIYAWAKI, K., TARKOWSKI, P., MATSUMOTO-KITANO, M., KATO, T., SATO, S., TARKOWSKA, D. *et al.*, 2006: Roles of *Arabidopsis* ATP/ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 103: 16598-16603.
- MICHALKE, W., KATEKAR, G. F., GEISLER, A. E., 1992: Phytotropin-binding sites and auxin transport in *Cucurbita pepo*: evidence for two recognition sites. *Planta*, 187: 254-260.
- MICHNIEWICZ, M., ZAGO, M. K., ABAS, L., WEIJERS, D., SCHWEIGHOFER, A., MESKIENE, I. *et al.*, 2007: Antagonistic regulation of PIN phosphorylation by PP2A and PINOID directs auxin flux. *Cell*, 130: 1044-1056.
- MILLER, C. O., SKOOG, F., VON SALTZA, M. H., STRONG, F., 1955: Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal fo the American Chemical Society*, 77: 1392.
- MINAKUCHI, K., KAMEOKA, H., YASUNO, N., *et al.*, 2010: FINE CULM1 (FC1) works downstream of strigolactones to inhibit the outgrowth of axillary buds in rice. *Plant and Cell Physiology*, 51: 1127-1135.
- MOK, D. W., MOK, M. C., 2001: Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 89: 89-118.

- MORGAN, D. G., 1964: Influence of α -naphthylphthalamic acid on the movement of indolyl-3-acetic acid in plants. *Nature*, 201: 476-477.
- MORRIS, D. A., KADIR, G. O., BARRY, A. J., 1973: Auxin transport in intact pea seedlings (*Pisum sativum* L.): the inhibition of transport by 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Planta*, 110: 173-182.
- MORRIS, D. A., 1977: Transport of exogenous auxin in two-branched dwarf pea seedlings. *Planta*, 36: 91-96.
- MORRIS, D. A., THOMAS, A. G., 1978: A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings. *Journal of Experimental Botany*, 295: 147-157.
- MORRIS, D. A., ROBINSON, J. S., 1998: Targeting of auxin carriers to the plasma membrane: differential effects of brefeldin A on the traffic of auxin uptake and efflux carriers. *Planta*, 2055: 606-612.
- MORRIS, S. E., TURNBULL, C. G. N., MURFET, I. C., BEVERIDGE, C. A., 2001: Mutational analysis of branching in pea. Evidence that *Rms1* and *Rms5* regulate the same novel signal. *Plant Physiology*, 126: 1205-1213.
- MORRIS, S. E., COX, M. C. H., ROSS, J. J., KRISTANTINI, S., BEVERIDGE, C. A., 2005: Auxin dynamics after decapitation are not correlated with the initial growth of axillary buds. *Plant Physiology*, 138: 1665-1672.
- MORRIS, D. A., FRIML, J., ZAŽÍMALOVÁ, E., The Transport of Auxins. In DAVIES, P. J., 2010: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, Springer Netherlands, 451-484, ISBN 978-1-4020-2685-0.
- MOUCHEL, C. F., LEYSER, O., 2007: Novel phytohormones involved in long-range signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 10: 473-476.
- MRAVEC, J., KUBEŠ, M., BIELACH, A., GAYKOVA, V., PETRÁŠEK, J., SKŮPA, P. *et al.*, 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. *et al.*, 2009: Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter. *Nature*, 459: 1136-1140.
- MUDAY, G. K., DELONG, A., 2001: Polar auxin transport: controlling where and how much. *Trends in Plant Science*, 65: 535-542.

- MUDAY, G. K., MURPHY, A. S., 2002: An emerging model of auxin transport regulation. *The Plant Cell*, 145: 293-299.
- MULTANI, D. S., BRIGGS, S. P., CHAMBERLIN, M. A., BLAKESLEE, J. J., MURPHY, A. S., JOHAL, G. S., 2003: Loss of an MDR transporter in compact stalks of maize *br2* and sorghum *dw3* mutants. *Science*, 302: 81-84.
- MÜLLER, A., HILLEBRAND, H., WEILER, E. W., 1998: Indole-3-acetic acid is synthesized from L-tryptophan in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 206: 362-369.
- MÜLLER, D., WALDIE, T., MIYAWAKI, K., TO, J. P. C., MELNYK, CH. W., KIEBER, J. J. *et al.*, 2015: Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance. *The Plant Journal*, 82: 874-886.
- NAGASHIMA, A., SUZUKI, G, UEHARA, Y., SAJI, K., FURUKAWA, T., KOSHIBA, T. *et al.*, 2008: Phytochromes and cryptochromes regulate the differential growth of *Arabidopsis* hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *The Plant Journal*, 53: 516-529.
- NAPOLI, C., 1996: Highly branched phenotype of the petunia *dad1-1* mutant is reversed by grafting. *Plant Physiology*, 111: 27-37.
- NELSON, T., DENGLER, N., 1997: Leaf vascular pattern formation. *The Plant Cell*, 9: 1121-1135.
- NICK, P., HAN, M. J., AN, G., 2009: Auxin stimulates its own transport by shaping actin filaments. *Plant Physiology*, 151: 155-167.
- NOH, B., MURPHY, A. S., SPALDING, E. P., 2001: *Multidrug resistance*-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *The Plant Cell*, 13: 2441-2454.
- NORDSTRÖM, A., TARKOWSKI, P., TARKOWSKA, D., NORBAEK, R., ÅSTOT, C., DOLEŽAL, K. *et al.*, 2004: Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: A factor of potential importance for auxin-cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 101: 8039-8044.
- NORMANLY, J., 2010: Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a001594.

- OKADA, K., UEDA, J., KOMAKI, M. J., BELL, C. J., SHIMURA, Y., 1991: Requirement of the auxin polar transport system in early stages of *Arabidopsis* floral bud formation. *The Plant Cell*, 3: 677-684.
- ONGARO, V., LEYSER, O., 2008: Hormonal control of shoot branching. *Journal of Experimental Botany*, 59: 67-74.
- OSTIN, A., KOWALCZYK, M., BHALERAO, R. P., SANDBERG, G., 1998: Metabolism of indole-3-acetic acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 118: 285-296.
- OUYANG, J., CHEN, M., LI, J., 1999: Measurement of soluble tryptophan and total indole-3-acetic acid in *Arabidopsis* by capillary electrophoresis. *Analytical Biochemistry*, 271: 100-102.
- PACIOREK, T., ZAŽÍMALOVA, E., RUTHARDT, N., PETRÁŠEK, J., STIERHOF, Y. D., KLEINE-VEHN, J. *et al.*, 2005: Auxin inhibits endocytosis and promotes its own efflux from cells. *Nature*, 435: 1251-1256.
- PANIGRAHI, B. M., AUDUS, L. J., 1966: Apical dominance in *Vicia faba*. *Annals of Botany*, 30: 457-473.
- PARRY, G., DELBARRE, A., MARCHANT, A., SWARUP, R., NAPIER, R., PERROT-RECHENMANN, C. *et al.*, 2001: Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation *aux1*. *The Plant Journal*, 25: 399-406.
- PÉRET, B., LI, G., ZHAO, J., BAND, L. R., VOß, U., POSTAIRE, O. *et al.*, 2012: Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 14: 991-998.
- PETRÁŠEK, J., ELČKNER, M., MORRIS, D. A., ZAŽÍMALOVÁ, E., 2002: Auxin efflux carrier activity and auxin accumulation regulate cell division and polarity in tobacco cells. *Planta*, 216: 302-308.
- PETRÁŠEK, J., ČERNÁ, A., SCHWARZEROVÁ, K., ELČKNER, M., MORRIS, D. A., ZAŽÍMALOVÁ, E., 2003: Do phytohormones inhibit auxin efflux by impairing vesicle traffic? *Plant Physiology*, 131: 254-263.
- PETRÁŠEK, J., MRAVEC, J., BOUCHARD, R., BLAKESLEE, J. J., ABAS, M., SEIFERTO VÁ, D. *et al.*, 2006: PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science*, 312: 914-918.
- PETRÁŠEK, J., FRIML, J., 2009: Auxin transport routes in plant development. *Development*, 136: 2675-2688.

- PORTER, W. L., THIMANN, K. V., 1965: Molecular requirements for auxin action. I. Halogenated indoles and indoleacetic acid. *Phytochemistry*, 4: 229-243.
- PRANDI, C., OCCHIATO, E. G., TABASSO, S., BONFANTE, P., NOVERO, M., SCARPI, D. *et al.*, 2011: New Potent Fluorescent Analogues of Strigolactones: Synthesis and Biological Activity in Parasitic Weed Germination and Fungal Branching. *European Journal of Organic Chemistry*, 2011: 3781-3793.
- PROCHÁZKA, S., ČERNOCH, V., BLAŽKOVÁ, J., DUNDELOVÁ, M., 1983: Morphoregulative effects of phenylacetic acid in pea seedlings (*Pisum sativum* L.). *Biochemistry Physiology Pflanzen*, 178: 493-501.
- PROCHÁZKA, S., JACOBS, W. P., 1984: Transport of benzyladenine and gibberellin A1 from roots in relation to the dominance between the axillary buds of pea (*Pisum sativum* L.) cotyledons. *Plant Physiology*, 76: 224-227.
- PROCHÁZKA, S., TRUSKA, M., 1999: Phytohormones and shoot apical dominance. *Advances in Regulation of Plant Growth and Development*, 1999: 221-232.
- PRUSINKIEWICZ, P., CRAWFORD, C., SMITH, R., LJUNG, K., BENNETT, T., ONGARO, V. *et al.*, 2009: Control of bud activation by an auxin transport switch. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 106: 17431-17436.
- RAMEAU, C., MURFET, I. C., LAUCOU, V., FLOYD, R. S., MORRIS, S. E., BEVERIDGE, C. A., 2002: Pea *rms6* mutants exhibit increased basal branching. *Physiologia Plantarum*, 115: 458-467.
- RASHOTTE, A. M., DeLONG, A., MUDAY, G. K., 2011: Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *The Plant Cell*, 13: 1683-1697.
- RASMUSSEN, A., MASON, M. G., De CUYPER, C., BREWER, P. B., HEROLD, S., AGUSTI, J. *et al.*, 2012: Strigolactones suppress adventitious rooting in *Arabidopsis* and pea. *Plant Physiology*, 158: 1976-1987.
- RAVEN, J. A., 1975: Transport of indoleacetic acid in plant-cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist*, 74: 163-172.
- REINECKE, D. M., 1999: 4-Chloroindole-3-acetic acid and plant growth. *Plant Growth Regulators*, 27: 3-13.
- REINHARDT, D., MANDEL, T., KUHLEMEIER, C., 2000: Auxin regulates the initiation and radial position of plant lateral organs. *Plant Cell*, 12: 507-518.

- REINHARDT, D., PESCE, E. R., STIEGER, P., MANDEL, T., BALTENSBERGER, K., BENNETT, M. *et al.*, 2003: Regulation of phyllotaxis by polar auxin transport. *Nature*, 426: 255-260.
- RENTON, M., HANAN, J., FERGUSON, B. J., BEVERIDGE, C. A., 2012: Models of long-distance transport: how is carrier-dependent auxin transport regulated in the stem? *New Phytologist*, 194: 704-715.
- ROBERT, S., KLEINE-VEHN, J., BARBEZ, E., SAUER, M., PACIOREK, T., BASTER, P. *et al.*, 2010: ABP1 mediates auxin inhibition of clathrin-dependent endocytosis in *Arabidopsis*. *Cell*, 143: 111-121.
- ROBERT, H. S., FRIML, J., 2009: Auxin and other signals on the move in plants. *Nature Chemical Biology*, 5: 325-332.
- ROBINSON, J. S., ALBERT, A. C., MORRIS, D. A., 1999: Differential effects of brefeldin A and cycloheximide on the activity of auxin efflux carriers in *Cucurbita pepo* L. *Journal of Plant Physiology*, 155: 678-684.
- ROJAS-PIERCE, M., TITAPIWATANAKUN, B., SOHN, E. J., FANG, F., LARIVE, C. K., BLAKESLEE, J. *et al.*, 2007: *Arabidopsis* P-glycoprotein19 participates in the inhibition of gravitropism by gravacin. *Chemistry and Biology*, 14: 1366-1376.
- ROMANOV, G. A., LOMIN, S. N., SCHMÜLLING, T., 2006: Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany*, 57: 4051-4058.
- RUBERY, P. H., SHELDRAKE, A. R., 1974: Carrier-mediated auxin transport. *Planta*, 118: 101-121.
- RUYTER-SPIRA, C., KOHLEN, W., CHARNIKHOVA, T., VAN ZEIJL, A., VAN BEZOUWEN, L., DE RUIJTER, N. *et al.*, 2011: Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in *Arabidopsis*: another belowground role for strigolactones? *Plant Physiology*, 155: 721-34.
- RUYTER-SPIRA, C., AL-BABILI, S., VAN DER KROL, S., BOUWMEESTER, H., 2013: The biology of strigolactones. *Trends in Plant Science*, 18: 72-83.
- SACHS, T., THIMANN, K. V., 1964: Release of lateral buds from apical dominance. *Nature*, 201: 939-940.

- SACHS, T., THIMANN, K. V., 1967: The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. *American Journal of Botany*, 54: 136-144.
- SACHS, T., 1968: On the determination of the pattern of vascular tissue in peas. *Annals of Botany*, 32: 781-790.
- SACHS, T., 1981: The control of patterned differentiation of vascular tissues. *Advances in Botanical Research*, 9: 151-262.
- SACHS, T., 2000: Integrating cellular and organismic aspects of vascular differentiation. *Plant and Cell Physiology*, 41: 649-656.
- SAKAKIBARA, H., 2006: Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Review of Plant Biology*, 57: 431-449.
- SAUER, M., BALLA, J., LUSCHNIG, CH., WISNIEWSKA, J., REINOHL, V., FRIML, J. *et al.*, 2006: Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feedback regulation of PIN polarity. *Genes and Development*, 20: 2902-2911.
- SCANLON, M. J., 2003. The polar auxin transport inhibitor N-1-naphthylphthalamic acid disrupts leaf initiation, KNOX protein regulation, and formation of leaf margins in maize. *Plant Physiology*, 133: 597-605.
- SCARPELLA, E., MARCOS, D., FRIML, J., BERLETH, T., 2006: Control of leaf vascular patterning by polar auxin transport. *Genes and Development*, 20: 1015-1027.
- SCARPELA, E., BARKOULAS, M., TSIANTIS, M., 2010: Control of leaf and vein development by auxin. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2:a001511.
- SETO, Y., SADO, A., ASAMI, K., HANADA, A., UMEHARA, M., AKIYAMA, K. *et al.*, 2014: Carlactone is an endogenous biosynthetic precursor for strigolactones. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 111: 1640-1645.
- SHIMIZU-SATO, S., MORI, H., 2001: Control of outgrowth and dormancy in axillary buds. *Plant Physiology*, 127: 1405-13.
- SHIMIZU-SATO, S., TANAKA, M., MORI, H., 2009: Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology*, 69: 429-435.
- 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 Biology*, 11: e1001474.

- SCHMÜLLING, T., 2002: New insights into the functions of CKs in plant development. *Journal of Plant Growth Regulation*, 21: 40-49.
- SCHMÜLLING, T., WERNER, T., RIEFLER, M., KRUPLOVÁ, E., BARTINA, Y., MANN, I., 2003: Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *Journal of Plant Research*, 116: 241-252.
- SCHNEIDER-POETSCH, T., JU, J. H., EYLER, D. E., DANG, Y. J., BHAT, S., MERRICK, W. C. *et al.*, 2010: Inhibition of eukaryotic translation elongation by cycloheximide and lactimidomycin. *Nature Chemical Biology*, 6: 209-217.
- SIEBERER, T., LEYSER, O., 2006: Auxin transport, but in which direction? *Science*, 312: 858-860.
- SIMONS, J. L., NAPOLI, C. A., JANSSEN, B. J., PLUMMER, K. M., SNOWDEN, K. C., 2007: Analysis of the DECREASED APICAL DOMINANCE genes of petunia in the control of axillary branching. *Plant Physiology*, 143: 697-706.
- SMALL, D. K., MORRIS, D. A., 1990: Promotion of elongation and acid invertase activity in *Phaseolus vulgaris* L. internode segments by phenylacetic acid. *Journal of Plant Growth Regulation*, 9: 329-340.
- SNOW, R., 1929: The young leaf as the inhibiting organ. *New Phytologist*, 28: 345-358.
- SNOW, R., 1937: On the nature of correlative inhibition. *New Phytologist*, 36: 283-300.
- SNOWDEN, K., SIMKIN, A., JANSSEN, B., TEMPLETON, K., LOUCAS, H., SIMONS, J. *et al.*, 2005: The decreased apical dominance1/*Petunia hybrida* CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE8 gene affects branch production and plays a role in leaf senescence, root growth, and flower development. *The Plant Cell*, 17: 746-759.
- SNYDER, W. E., 1949: Some responses of plants to 2,3,5-triiodobenzoic acid. *Plant Physiology*, 24: 195-206.
- SOENO, K., GODA, H., ISHII, T., OGURA, T., TACHIKAWA, T., SASAKI, E. *et al.*, 2010: Auxin biosynthesis inhibitors, identified by a genomics-based approach, provide insights into auxin biosynthesis. *Plant and Cell Physiology*, 51: 524-536.
- SOROKIN, H. P., THIMANN, K. V., 1964: The histological basis for inhibition of axillary buds in *Pisum sativum* and effects of auxin and kinetin on xylem development. *Protoplasma*, 59: 326-350.

- SOREFAN, K., BOOKER, J., HAUROGNÉ, K., GOUSSOT, M., BAINBRIDGE, K., FOO, E. *et al.*, 2003: MAX4 and RMS1 are orthologous dioxygenase-like genes that regulate shoot branching in *Arabidopsis* and pea. *Genes and Development*, 17: 1469-1474.
- SOREFAN, K., GIRIN, T., LILJEGREN, S. J., LJUNG, K., ROBLES, P., GALVÁN-AMPUDIA, C. S. *et al.*, 2009: A regulated auxin minimum is required for seed dispersal in *Arabidopsis*. *Nature*, 459: 583-586.
- SOTO, M. J., FERNÁNDEZ-APARICIO, M., CASTELLANOS-MORALES, V., GARCÍA-GARRIDO, J. M., OCAMPO, J. A., DELGADO, M. J. *et al.*, 2010: First indications for the involvement of strigolactones on nodule formation in alfalfa (*Medicago sativa*). *Soil Biology and Biochemistry*, 42: 383-385.
- SPÍCHAL, L., RAKOVA, N.Y., RIEFLER, M., MIZUNO, T., ROMANOV, G.A., STRNAD, M. *et al.*, 2004: Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology*, 45: 1299-1305.
- STAFSTROM, J. P., SUSSEX, I. M., 1988: Patterns of protein synthesis in dormant and growing vegetative buds of pea. *Planta*, 176: 497-505.
- STAFSTROM, J. P., SARUP, V. B., 2000: Development of supernumerary buds from the axillary meristem of pea, *Pisum sativum* (Fabaceae). *Australian Journal of Botany*, 48: 271-278.
- STEINMANN, T., GELDNER, N., GREBE, M., MANGOLD, S., JACKSON, C. L., PARIS, S., 1999: Coordinated polar localization of auxin efflux carrier PIN1 by GNOM ARF GEF. *Science* 286: 316-318.
- STEPANOVA, A. N., ROBERTSON-HOYT, J., YUN, J., BENAVENTE, L. M., XIE, D. Y., DOLEZAL, K. *et al.*, 2008: TAA1-mediated auxin biosynthesis is essential for hormone crosstalk and plant development. *Cell*, 133: 177-191.
- STEPANOVA, A. N., YUN, J., ROBLES, L. M., NOVAK, O., HE, W., GUO, H. *et al.*, 2011: The *Arabidopsis* YUCCA1 flavin monooxygenase functions in the indole-3-pyruvic acid branch of auxin biosynthesis. *The Plant Cell*, 23: 3961-3973.
- STIRNBERG, P., van de SANDE, K., LEYSER, O., 2002: MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 129: 1131-1141.
- STRADER, L. C., CULLER, A. H., COHEN, J. D., BARTEL, B., 2010: Conversion of endogenous indole-3-butyric acid to indole-3-acetic acid drives cell expansion in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 153: 1577-1586.

STRNAD, M., 1997: The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum*, 101: 674-688.

SUGAWARA, S., HISHIYAMA, S., JIKUMARU, Y., HANADA, A., NISHIMURA, T., KOSHIBA, T. *et al.*, 2009: Biochemical analyses of indole-3-acetaldoxime-dependent auxin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 106: 5430-5435.

SUN, J., NIU, Q.W., TARKOWSKI, P., ZHENG, B., TARKOWSKÁ, D., SANDBERG, G. *et al.*, 2003: The Arabidopsis AtIPT8/PGA22 gene encodes an isopentenyl transferase that is involved in de novo cytokinin biosynthesis. *Plant Physiology*, 131: 167-176.

SUSSEX, I. M., KERK, N. M., 2001: The evolution of plant architecture. *Current Opinion in Plant Biology*, 4: 33-37.

SUSSMAN, M. R., GOLDSMITH, M. H., 1981: Auxin uptake and action of N-1-naphthylphthalamic acid in corn coleoptiles. *Planta*, 151: 15-25.

SWARUP, R., FRIML, J., MARCHANT, A., LJUNG, K., SANDBERG, G., PALME, K. *et al.*, 2001: Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. *Genes and Development*, 15: 2648-2653.

SWARUP, R., PARRY, G., GRAHAM, N., ALLEN, T., BENNETT, M., 2002: Auxin cross-talk: integration of signalling pathways to control plant development. *Plant Molecular Biology*, 49: 411-426.

SWARUP, R., KARGUL, J., MARCHANT, A., ZADIK, D., RAHMAN, A., MILLS, R. *et al.*, 2004: Structure-function analysis of the presumptive Arabidopsis auxin permease AUX1. *The Plant Cell*, 16: 3069-3083.

SWARUP, K. BENKOVÁ, E., SWARUP, R., CASIMIRO, I., PERET, B., YANG, Y. *et al.*, 2008: The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Nature Cell Biology*, 10: 946-954.

ŠEBÁNEK, J., 1971: Interpretation of apical dominance in the plant on the base studies on correlation between cotyledons and cotylary buds in pea (*Pisum sativum* L.). *Acta Universitatis Agriculture*, 4: 393-418.

TAKEDA, T., SUWA, Y., SUZUKI, M. *et al.*, 2003: The *OsTBI* gene negatively regulates lateral branching in rice. *The Plant Journal*, 33: 513-520.

- TAKEI, K., SAKAKIBARA, H., SUGIYAMA, T., 2001: Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry*, 276: 26405-26410.
- TAKEI, K., UEDA, N., AOKI, K., KUROMORI, T., HIRAYAMA, T., SHINOZAKI, K. *et al.*, 2004: *AtIPT3* is a key determinant of nitrate-dependent cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant and Cell Physiology*, 45: 1053-1062.
- TAM, Y. Y., EPSTEIN, E., NORMANLY, J., 2000: Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*, low steady-state levels of indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiology*, 123: 589-596.
- TAMAS, I. A., Hormonal regulation of apical dominance. In DAVIES, P. J., 1987: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*. *Mertinus Nijhoff Publishers, USA*, 393-410, ISBN 978-90-247-3498-6.
- TAMAS, I. A., SCHLOSSBERG-JACOBS, J. L., LIM, R., FRIEDMAN, L. B., BARONE, C. C., 1989: Effect of plant growth substances on the growth of axillary buds in cultured stem segments of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Growth Regulation*, 8: 165-183.
- TANAKA, M., TAKEI, K., KOJIMA, M., SAKAKIBARA, H., MORI, H., 2006: Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *The Plant Journal*, 45: 1028-1036.
- TAO, Y., FERRER, J. L., LJUNG, K., POJER, F., HONG, F., LONG, J. A. *et al.*, 2008: Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell*, 133: 164-176.
- TEICHMANN, T., MUHR, M., 2015: Shaping plant architecture. *Frontiers in Plant Science*, 6: 233.
- 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., SKOOG, F., 1933: Studies on the growth hormone of plants III. The inhibitory action of the growth substance on bud development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of 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.

- THOMSON, K. S., HERTEL, R., MÜLLER, S., TAVARES, J. E., 1973: 1-N-Naphthylphthalamic acid and 2,3,5-triiodobenzoic acid: in-vitro binding to particulate cell fractions and action on auxin transport in corn coleoptiles. *Planta*, 109: 337-352.
- TITAPIWATANAKUN, B., MURPHY, A. S., 2009: Post-transcriptional regulation of auxin transport proteins: Cellular trafficking, protein phosphorylation, protein maturation, ubiquitination, and membrane composition. *Journal of Experimental Botany*, 60: 1093-1107.
- TITAPIWATANAKUN, B., BLAKESLEE, J. J., BANDYOPADHYAY, A., YANG, H., MRAVEC, J., SAUER, M. *et al.*, 2009: ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 57: 27-44.
- TURNBULL, C. G. N., RAYMOND, M. A., DODD, I. C., MORRIS, S. E., 1997: Rapid increases in cytokinin concentration in lateral buds of chickpea (*Cicer arietinum* L.) during release of apical dominance. *Planta*, 202: 271-276.
- TURNBULL, C. G., BOOKER, J. P., LEYSER, O., 2002: Micrografting techniques for testing long-distance signalling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 32: 255-262.
- UENO, K., NOMURA, S., MURANAKA, S., MIZUTANI, M., TAKIKAWA, H., SUGIMOTO, Y., 2011: *Ent-2'-epi-orobanchol* and its acetate, as germination stimulants for *Striga gesnerioides* seeds isolated from cowpea and red clover. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59: 10485-10490.
- UMEHARA, M., HANADA, A., YOSHIDA, S., AKIYAMA, K., ARITE, T., TAKEDA-KAMIYA, N. *et al.*, 2008: Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455: 195-200.
- VANNESTE, S., FRIML, J., 2009: Auxin: a trigger for change in plant development. *Cell*, 136: 1005-1016.
- VAN OVERBEEK, J., 1938: Auxin distribution in seedlings and its bearing on the problem of bud inhibition. *Botanic Gardens*, 100: 133-166.
- VERNOUX, T., BESNARD, F., TRAAS, J., 2010: Auxin at the shoot apical meristem. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2: a001487.
- VIETEN, A., VANNESTE, S., WISNIEWSKA, J., BENKOVÁ, E., BENJAMINS, R., BEECKMAN, T. *et al.*, 2005: Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-independent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132: 4521-4531.
- VIETEN, A., SAUER, M., BREWER, P., FRIML, J., 2007: Molecular and cellular aspects of auxin-transport-mediated development. *Trends in Plant Science*, 12: 160-168.

- WATERS, M. T., BREWER, P. B., BUSSELL, J. D., SMITH, S. M., BEVERIDGE, C. A., 2012: The *Arabidopsis* ortholog of rice DWARF27 acts upstream of MAX1 in the control of plant development by strigolactones. *Plant Physiology*, 159: 1073-1085.
- WEIJERS, D., SCHLERETH, A., EHRISMANN, J. S., SCHWANK, G., KIENZ, M., JÜRGENS, G., 2006: Auxin triggers transient local signaling for cell specification in *Arabidopsis* embryogenesis. *Developmental Cell*, 10: 265-270.
- WEN, CH., ZHAO, Q., NIE, J., LIU, G., SHEN, L., CHENG, CH. *et al.*, 2016: Physiological controls of chrysanthemum *Dgd27* gene expression in regulation of shoot branching. *Plant Cell Reports*, 35: 1053-1070.
- WENT, F. W., 1926: On growth-accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, 30: 10-19.
- WENT, F. W., 1936: Allgemeine Betrachtungen über das Auxinproblem. *Biologische Zeitblätter*. 56: 449-463.
- WERNER, T., MOTYKA, V., STRNAD, M., AND SCHMÜLLING, T., 2001: Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 98: 10487-10492.
- WERNER, T., MOTYKA, V., LAUCOU, V., SMETS, R., VAN ONCKELEN, H., SCHMÜLLING, T., 2003: Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell*, 15: 2532-2550.
- WICKSON, M., THIMANN, K. V., 1958: The antagonism of auxin and kinetin in apical dominance. *Physiologia Plantarum*, 11: 62-74.
- WIGHTMAN, F., LIGHTLY, D. L., 1982: Identification of phenylacetic acid as a natural auxin in the shoots of higher plants. *Physiologia Plantarum*, 55: 17-24.
- WILLEMSEN, V., FRIML, J., GREBE, M., 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., SEIFERTOVIĆ, D., BREWER, P. B., RŮŽIČKA, K., BLILOU, I. *et al.*, 2006: Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science*, 312: 883.

- WHITE, J. C., MEDLOW, G. C., HILLMAN, J. R., WILKINS, M. B., 1975: Correlative inhibition of lateral bud growth in *Phaseolus vulgaris* L: isolation of indoleacetic acid from the inhibitory region. *Journal of Experimental Botany*, 26: 419-424.
- WOLTERS, H., JÜRGENS, G., 2009: Survival of the flexible: hormonal growth control and adaptation in plant development. *Nature Reviews Genetics*, 10: 305-317.
- WOODWARD, A. W., BARTEL, B., 2005: Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany*, 95: 707-735.
- WON, C., SHEN, X., MASHIGUCHI, K., ZHENG, Z., DAI, X., CHENG, Y. *et al.*, 2011: Conversion of tryptophan to indole-3-acetic acid by TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASES OF ARABIDOPSIS and YUCCAs in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of USA*, 108: 18518-18523.
- XIE, X. N., YONEYAMA, K., YONEYAMA, K., 2010: The strigolactone story. *Annual Review of Phytopathology*, 48: 93-117.
- XIE, X., YONEYAMA, K., KISUGI, T., UCHIDA, K., ITO, S., AKIYAMA, K. *et al.*, 2013: Confirming stereochemical structures of strigolactones produced by rice and tobacco. *Molecular Plant*, 6: 153-163.
- YAMADA, H., SUZUKI, T., TERADA, K., TAKEI, K., ISHIKAWA, K., MIWA, K. *et al.*, 2001: The Arabidopsis AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology*, 41: 1017-1023.
- YAMADA, M., GREENHAM, K., PRIGGE, M. J., JENSEN, P. J., ESTELLE, M., 2009: The TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE2 gene is required for auxin synthesis and diverse aspects of plant development. *Plant Physiology*, 151: 168-179.
- YANG, Y., HAMMES, U. Z., TAYLOR, C. G., SCHACHTMAN, D. P., NIELSEN, E., 2006: High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology*, 16: 1123-1127.
- YANG, H., MURPHY, A. S., 2009: Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in *Schizosaccharomyces pombe*. *The Plant Journal*, 59: 179-191.
- YONEYAMA, K., XIE, X., KISUGI, T., NOMURA, T., YONEYAMA, K., 2013: Nitrogen and phosphorus fertilization negatively affects strigolactone production and exudation in sorghum. *Planta*, 238: 885-94.

- YOSHIDA, S., IWAMOTO, K., DEMURA, T., FUKUDA, H., 2009: Comprehensive analysis of the regulatory roles of auxin in early transdifferentiation into xylem cells. *Plant Molecular Biology*, 70: 457-469.
- YOUNG, N. F., FERGUSON, B. J., ANTONIADI, I., BENNETT, M. H., BEVERIDGE, C. A., TURNBULL, C. G., 2014: Conditional auxin response and differential cytokinin profiles in shoot branching mutants. *Plant Physiology*, 165: 1723-1736.
- ZHANG, J., NODZYŃSKI, T., PENCÍK, A., ROLCÍK, J., FRIML, J., 2010: PIN phosphorylation is sufficient to mediate PIN polarity and direct auxin transport. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 107: 918-922.
- ZHAO, Y., 2010: Auxin biosynthesis and role in plant development. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 49-64.
- ZHAO, Y., 2012: Auxin biosynthesis: a simple two-step pathway converts tryptophan to indole-3-acetic acid in plants. *Molecular Plant*, 5: 334-338.
- ZHAO, Y., CHRISTENSEN, S. K., FRANKHAUSER, C., CASHMAN, J. R., COHEN, J. D., WEIGEL, D. *et al.*, 2001: A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, 291: 306-309.
- ZOLMAN, B. K., MARTINEZ, N., MILLIUS, A., ADHAM, A. R., BARTEL, B., 2008: Identification and characterization of *Arabidopsis* indole-3-butyric acid response mutants defective in novel peroxisomal enzymes. *Genetics*, 180: 237-251.
- ZOU, J., CHEN, Z., ZHANG, S., ZHANG, W., JIANG, G., ZHAO, X. *et al.*, 2005): Characterizations and fine mapping of a mutant gene for high tillering and dwarf in rice (*Oryza sativa* L.). *Planta*, 222: 604-612.
- ZOU, J. H., ZHANG, S. Y., ZHANG, W. P., LI, G., CHEN, Z. X., ZHAI, W. X. *et al.*, 2006: The rice *HIGH-TILLERING DWARF1* encoding an ortholog of *Arabidopsis* *MAX3* is required for negative regulation of the outgrowth of axillary buds. *The Plant Journal*, 48: 687-696.
- ZWANENBURG, B., POSPISIL, T., 2013: Structure and Activity of Strigolactones: New Plant Hormones with a Rich Future. *Molecular Plant*, 6: 38-62.

8 ZOZNAM OBRÁZKOV

Obr. 1	Klasické fyziologické experimenty demonštrujúce existenciu apikálnej dominancie.	12
Obr. 2	Chemická štruktúra endogénnych auxínov.	14
Obr. 3	Chemická štruktúra vybraných aromatických cytokinínov.	31
Obr. 4	Chemická štruktúra vybraných izoprenoidných cytokinínov.	32
Obr. 5	Štruktúra strigolaktónov strigolového, orobanchového a karlaktónového typu.	35
Obr. 6	Architektúra dvojkľúčnolistovej rastliny.	39
Obr. 7	Model kanalizácie auxínového transportu.	44
Obr. 8	Obr. 8: Schéma experimentu: intaktná neošetrená rastlina s prvým a druhým axilárnym pupeňom (a), dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným axilárnym pupeňom a s druhým axilárnym pupeňom ošetreným lanolínovou pastou s 1 % TIBA (b), dekapitovaná rastlina s neošetreným prvým pupeňom a druhým pupeňom ošetreným čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (c).	53
Obr. 9	Schéma experimentu: deetiolované rastliny dekapitované 60 mm/90 mm nad druhým axilárnym pupeňom (a) a deetiolované rastliny hrachu dekapitované 5 mm nad druhým axilárnym pupeňom (b).	54
Obr. 10	Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.	54
Obr. 11	Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom.	55
Obr. 12	Schéma experimentu: intaktná rastlina štandardného typu a mutantných rastlín <i>rms1</i> a <i>rms2</i> ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.	56
Obr. 13	Schéma experimentu: intaktná neošetrená rastlina s prvým a druhým axilárnym pupeňom (a), dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným pupeňom a s druhým pupeňom ošetreným lanolínovou pastou s 1 % TIBA (b), dekapitovaná rastlina s neošetreným prvým pupeňom a druhým pupeňom ošetreným čistou lanolínovou pastou pre kontrolný variant (c).	61
Obr. 14	Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (a) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (b) pod apexom stonky.	62
Obr. 15	Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená BA-lanolínovou pastou na druhom axilárnom pupeni (a), dekapitovaná rastlina ošetrená IAA+BA-lanolínovou pastou (b) alebo IAA-lanolínovou pastou (b) na reznú plochu	

- dekapitovanej stonky namiesto apexu. 63
- Obr. 16** Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrovaná prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (**a**) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (**b**) pod apexom stonky. 67
- Obr. 17** Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina ošetrovaná prstencom lanolínovej pasty s 1 % TIBA (**a**) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (**b**) medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom. 67
- Obr. 18** Schéma experimentu: dekapitovaná rastlina s prvým neošetreným axilárnym pupeňom a s druhým axilárnym pupeňom ošetrovaným lanolínovou pastou s 1 % TIBA (**a**). Kontrolný variant s druhým pupeňom ošetrovaným čistou lanolínou pastou (**b**). 68
- Obr. 19** Schéma experimentu: intaktná rastlina štandardného typu a mutantných rastlín *rms1* a *rms2* ošetrovaná prstencom lanolínovej pasty s 1 % IAA (**a**) alebo prstencom čistej lanolínovej pasty pre kontrolný variant (**b**) pod apexom stonky. 69
- Obr. 20** Schéma experimentu: intaktná rastlina s formovaným laterálnym zárezom v hlavnej stonke medzi apexom a druhým axilárnym pupeňom (**a**) alebo medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom (**b**). 71
- Obr. 21** Schéma experimentu (zelená šípka indikuje vyrastanie pupeňa): intaktná rastlina (**a**), dekapitovaná rastlina (**b**). 72
- Obr. 22** Rastliny hrachu siateho (*Pisum sativum* L.) odroda Vladan. 73
- Obr. 23** Imunolokalizácia PIN1 proteínov pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca nepolárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách inhibovaného axilárneho pupeňa intaktnej rastliny (**a**), polárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách vo vyrastajúcom pupeni dekapitovaných rastlín 24 hodín po dekapitácii (**b**) a polárnu lokalizáciu PIN1 v parenchymatických bunkách xylému hlavnej stonky intaktnej rastliny (**c**). 73
- Obr. 24** Rastová krivka predstavujúca dĺžku axilárných pupeňov a z nich formovaných výhonov, kde **1i** = prvý pupeň intaktnej rastliny, **2i** = druhý pupeň intaktnej rastliny, **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny. 75
- Obr. 25** Relatívna expresia génu *PsDRM1* (**a**), *PsBRC1* (**b**), *PsAUX1* (**c**), *PsPIN1* (**d**), *PsCDC2* (**e**) a *PsYUC1* (**f**) v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovaných rastlín. 76-77
- Obr. 26** Schéma experimentu: rastlina s dlhým internódiom dekapitovaná 60 mm alebo 90 mm nad druhým pupeňom (**a**). Rastlina dekapitovaná 5 mm nad druhým pupeňom (**b**). 78
- Obr. 27** Relatívna expresia génu *PsDRM1* (**a**), *PsBRC1* (**b**), *PsAUX1* (**c**), *PsPIN1* (**d**), *PsCDC2* (**e**) a *PsYUC1* (**f**) v druhom axilárnom pupeni rastlín dekapitovaných

- 60 mm nad druhým pupeňom (dlhá stonka) alebo 5 mm nad druhým pupeňom (krátka stonka). 80
- Obr. 28** Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d), *PsCDC2* (e) a *PsYUC1* (f) v druhom axilárnom pupeni rastlín dekapitovaných 90 mm nad druhým pupeňom (dlhá stonka) alebo 5 mm nad druhým pupeňom (krátka stonka). 80-81
- Obr. 29** Schéma experimentu: intaktná rastlina s laterálnym zárezom do hlavnej stonky nad druhým pupeňom (a). Intaktná rastlina ošetrovaná TIBA-lanolínovou pastou pod apex (b). Intaktná rastlina hrachu s laterálnym zárezom nad druhým axilárnym pupeňom (c). 82
- Obr. 30** Dĺžka axilárnych pupeňov a z nich formovaných výhonov, kde **1i** = prvý pupeň intaktnej rastliny, **2i** = druhý pupeň intaktnej rastliny, **1iTpa** = prvý pupeň intaktnej rastliny ošetrenej TIBA pod apexom, **2iTpa** = druhý pupeň intaktnej rastliny ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou pod apexom (a). [³H]IAA transport v hlavnej stonke meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm pod miestom aplikácie TIBA-lanolínovej pasty pod apexom stonky intaktnej rastliny (b). 83
- Obr. 31** Relatívna expresia génu *PsDRM1* (a), *PsBRC1* (b), *PsAUX1* (c), *PsPIN1* (d) a *PsCDC2* (e) v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných rastlín ošetrovaných TIBA-lanolínovou pastou medzi apexom a druhým pupeňom. 84
- Obr. 32** Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca nepolárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách prvého axilárneho pupeňa inhibovaného vo vyrastaní (a), polárnu lokalizáciu v prokambiálnych bunkách druhého vyrastajúceho pupeňa (b) a polárnu lokalizáciu v parenchymatických bunkách xylému hlavnej stonky v mieste aplikácie TIBA-lanolínovej pasty 24 hodín po aplikácii (c). 85
- Obr. 33** Schéma experimentu: intaktná rastlina s laterálnym zárezom pod druhým pupeňom (a). Intaktná rastlina ošetrovaná TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom (b). Dekapitovaná rastlina ošetrovaná TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom (c). 86
- Obr. 34** Intaktná rastlina hrachu s laterálnym zárezom pod druhým axilárnym pupeňom (a). Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1i** = prvý axilárny pupeň na intaktnej rastline, **2i** = druhý axilárny pupeň na intaktnej rastline, **1iTm** = prvý pupeň na rastline ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým pupeňom, **2iTm** = druhý pupeň, rovnaké ošetrenie (b). 86
- Obr. 35** Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1d** = prvý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň

dekapitovanej rastliny, **1dTm** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny ošetrenej TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým pupeňom, **2dTm** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**a**). [³H]IAA transport v hlavnej stonke meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm pod miestom aplikácie TIBA-lanolínovej pasty medzi dvomi axilárnymi pupeňmi dekapitovaných rastlín (**b**).

87

Obr. 36 Relatívna expresia génu *PsDRM1* (**a**), *PsBRC1* (**b**), *PsAUX1* (**c**), *PsPIN1* (**d**) a *PsCDC2* (**e**) v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovaných rastlín ošetrených TIBA-lanolínovou pastou medzi prvým a druhým axilárnym pupeňom.

88-

89

Obr. 37 Schéma experimentu: druhý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny ošetrený TIBA-lanolínovou pastou.

90

Obr. 38 Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1d** = prvý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý axilárny pupeň dekapitovanej rastliny, **1tiba** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným TIBA-lanolínovou pastou, **2tiba** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**a**), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1npa** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným NPA-lanolínovou pastou, **2npa** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**b**), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1bfa** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným BFA-lanolínovou pastou, **2bfa** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**c**), **1d** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny, **2d** = druhý pupeň dekapitovanej rastliny, **1chx** = prvý pupeň dekapitovanej rastliny s druhým pupeňom ošetreným CHX-lanolínovou pastou, **2chx** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant (**d**).

91

Obr. 39 [³H]IAA export z druhého axilárneho pupeňa dekapitovanej rastliny ošetreného buď TIBA-, NPA-, BFA- alebo CHX-lanolínovou pastou meraný v dvoch stonkových segmentoch so vzdialenosťou 0-4 mm a 4-8 mm od druhého pupeňa.

92

Obr. 40 Relatívna expresia génu *PsDRM1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (**a**), NPA-lanolínovou pastou (**b**), BFA-lanolínovou pastou (**c**) alebo CHX-lanolínovou pastou (**d**).

92-

93

Obr. 41 Relatívna expresia génu *PsBRC1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou (**a**), NPA-lanolínovou pastou (**b**), BFA-lanolínovou pastou (**c**) alebo CHX-lanolínovou pastou (**d**).

93

Obr. 42 Relatívna expresia *PsAUX1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej

- rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou **(a)**, NPA-lanolínovou pastou **(b)**, BFA-lanolínovou pastou **(c)** alebo CHX-lanolínovou pastou **(d)**. 94
- Obr. 43** Relatívna expresia *PsPIN1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou **(a)**, NPA-lanolínovou pastou **(b)**, BFA-lanolínovou pastou **(c)** alebo CHX-lanolínovou pastou **(d)**. 95
- Obr. 44** Relatívna expresia génu *PsCDC2* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou **(a)**, NPA-lanolínovou pastou **(b)**, BFA-lanolínovou pastou **(c)** alebo CHX-lanolínovou pastou **(d)**. 96
- Obr. 45** Relatívna expresia génu *PsYUC1* v prvom a druhom axilárnom pupeni dekapitovanej rastliny ošetrenom buď TIBA-lanolínovou pastou **(a)**, NPA-lanolínovou pastou **(b)**, BFA-lanolínovou pastou **(c)** alebo CHX-lanolínovou pastou **(d)**. 96-97
- Obr. 46** Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca polárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách druhého axilárneho pupeňa 24 hodín po jeho ošetrení TIBA-lanolínovou pastou **(a)**, NPA-lanolínovou pastou **(b)** BFA-lanolínovou pastou **(c)** alebo CHX-lanolínovou pastou **(d)** a dekapitácii rastliny. 98
- Obr. 47** Schéma experimentu: intaktná rastlina ošetrená BA-lanolínovou pastou na druhom axilárnom pupeni **(a)**. Dekapitovaná rastlina ošetrená IAA-lanolínovou pastou na reznú plochu dekapitovanej stonky inhibuje vyrastanie axilárnych pupeňov **(b)**. 100
- Obr. 48** Imunolokalizácia PIN1 proteínu pozorovaná prostredníctvom konfokálneho mikroskopu zobrazujúca polárnu lokalizáciu PIN1 v prokambiálnych bunkách druhého axilárneho pupeňa intaktnej rastliny v čase 0 hodín **(a)**, 2 hodiny **(b)**, 4 hodiny **(c)**, 6 hodín **(d)**, 12 hodín **(e)** a 24 hodín **(f)** po jeho ošetrení BA-lanolínovou pastou. 101
- Obr. 49** Rastové krivky predstavujúce veľkosť druhých axilárnych pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **dekapitácia** = kontrolné dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná lanolínová pasta, **IAA** = dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná IAA-lanolínová pasta, **IAA+BA** = dekapitované rastliny, u ktorých bola na reznú plochu dekapitovanej stonky aplikovaná IAA-lanolínová pasta s pridaním cytokinínu benzyladenínu (BA) **(a)**. [³H]IAA transport v stonke dekapitovanej rastliny. [³H]IAA bola aplikovaná na dekapitovanú stonku ošetrenú buď lanolínovou pastou, IAA-lanolínovou pastou alebo IAA-lanolínovou pastou s pridaním BA **(b)**. 102
- Obr. 50** Imunolokalizácia PIN1 proteínov v stonke pozorovaná prostredníctvom

konfokálneho mikroskopu. Aplikácia IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú plochu stonky vedie po 3 dňoch od aplikácie k masívnej PIN1 polarizácii **(a)** a po 5 dňoch k formovaniu PIN1 značených auxínových kanálov-nových xylémových vlákien **(b)**. Pridanie BA k IAA-lanolínovej paste vedie po 3 dňoch od aplikácie k PIN1 polarizácii sústredenej v mnohonásobných auxínových kanáloch **(c)** a už 3 dni po ošetrení sú formované xylémové zväzky **(d)**.

103

Obr. 51 Schéma experimentu: auxín transportovaný z apexu do stonky intaktnej rastliny zabraňuje kanalizácii auxínu a jeho exportu z axilárneho pupeňa, pričom reguluje hladinu cytokinínov transportovaných z koreňa v xylémovom exsudáte **(a)**. Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty na stonku pod apex intaktnej rastliny vedie k zosilneniu antagonistického účinku auxínu na hladinu cytokinínov transportovaných z koreňa do stonky **(b)**.

105

Obr. 52 Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte u intaktných rastlín hrachu štandardného typu a z intaktných rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom.

106

Obr. 53 Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1idt** = prvý axilárny pupeň na intaktnej rastline hrachu štandardného typu, **2idt** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1idt+IAA** = prvý pupeň na intaktnej rastline ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2idt+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant.

107

Obr. 54 Relatívna expresia génu *PsDRM1* **(a)**, *PsBRC1* **(b)**, *PsAUX1* **(c)** a *PsPIN1* **(d)** v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných rastlín a intaktných rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky.

108

Obr. 55 Schéma experimentu: odstránenie apexu ako primárneho zdroja auxínu dekapitáciou vedie k postupnému vytvoreniu nového zdroja auxínu v druhom axilárnom pupeni, ktorý sa stáva dominantným nad prvým axilárnym pupeňom, v priebehu čoho dochádza k zvýšeniu hladiny cytokinínov v xylémovom exsudáte **(a)**. Exogénna aplikácia IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú plochu stonky namiesto apexu dokáže vplyv tohto odstráneného apexu v zmysle primárneho zdroja auxínu nahradiť a udržať hladiny cytokinínov na úrovni podobnej v rastlinách intaktných **(b)**.

109

Obr. 56 Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných rastlín a z dekapitovaných rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanej ploche stonky.

110

Obr. 57 Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1dšt**=prvý axilárny pupeň na dekapitovanej rastline hrachu štandardného typu, **2dšt**=druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1dšt+IAA**=prvý pupeň na dekapitovanej rastline ošetrenej IAA-lanolínovou

- pastou na dekapitovanú plochu stonky, **2dšt+IAA**=druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. 111
- Obr. 58** Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte intaktných mutantných rastlín *rms2* a *rms1*. 113
- Obr. 59** Schéma experimentu: intaktné rastliny mutantných línií *rms2* so zvýšenou hladinou cytokinínov v xyléme a zníženou expresiou strigolaktónového biosyntetického génu *RMS1* (**a**). Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty pod apex stonky vedie k zníženiu hladiny X-CK a k významnej redukcii *rms2* vetviaceho fenotypu (**b**). 114
- Obr. 60** Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms2* a z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms2* ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. 115
- Obr. 61** Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1irms2** = prvý axilárny pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms2*, **2irms2** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1irms2+IAA** = prvý pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms2* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2irms2+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. 116
- Obr. 62** Relatívna expresia génu *PsDRM1* (**a**), *PsBRC1* (**b**), *PsAUX1* (**c**) a *PsPIN1* (**d**) génov v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných mutantných rastlín *rms2* a intaktných mutantných rastlín *rms2* rastlín ošetrených IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. 117
- Obr. 63** Schéma experimentu: dekapitované rastliny mutantných línií *rms2* vytvárajú laterálne výhony z axilárnych pupeňov (**a**). Exogénna aplikácia auxínu v podobe IAA-lanolínovej pasty na dekapitovanú stonku namiesto apexu však vedie k významnej redukcii hladiny X-CK a súčasne vetviaceho fenotypu (**b**). 118
- Obr. 64** Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms2* a z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms2* ošetrených IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanú plochu stonky. 119
- Obr. 65** Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1drms2** = prvý axilárny pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms2*, **2drms2** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1drms2+IAA** = prvý pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms2* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2drms2+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. 120
- Obr. 66** Model regulácie vyrastania pupeňa u hrachu (*Pisum sativum* L.). 121
- Obr. 67** Schéma experimentu: intaktné mutantné rastliny *rms1* (**a**). Exogénnou aplikáciou IAA-lanolínovej pasty pod apex stonky je zosilnený inhibičný vplyv auxínu

- transportovaného z apexu na vyrastanie pupeňov **(b)**. 122
- Obr. 68** Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms1* a z intaktných mutantných rastlín hrachu *rms1* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. 123
- Obr. 69** Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1irms1** = prvý axilárny pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms1*, **2irms1** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1irms1+IAA** = prvý pupeň na intaktnej mutantnej rastline *rms1* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky, **2irms1+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. 124
- Obr. 70** Relatívna expresia génu *PsDRM1* **(a)**, *PsBRC1* **(b)**, *PsAUX1* **(c)** a *PsPIN1* **(d)** v prvom a druhom axilárnom pupeni intaktných mutantných rastlín *rms1* a intaktných mutantných rastlín *rms1* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou pod apexom stonky. 124-125
- Obr. 71** Schéma experimentu: dekapitované rastliny hrachu mutantnej línie *rms1* **(a)**. Pokiaľ je odstránený apex nahradený exogénnou aplikáciou IAA-lanolínovej pasty, vplyv auxínu transportovaného z apexu na hladinu X-CK môže byť týmto obnovený **(b)**. 126
- Obr. 72** Relatívna hladina cytokinínov v xylémovom exsudáte z dekapitovaných mutantných rastlín hrachu *rms1* a z dekapitovaných mutantných rastlín *rms1* ošetrovaných IAA-lanolínovou pastou na dekapitovanej ploche stonky. 127
- Obr. 73** Rastové krivky predstavujúce veľkosť pupeňov a z nich formovaných laterálnych výhonov, kde **1drms1** = prvý axilárny pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms1*, **2drms1** = druhý axilárny pupeň, rovnaký experimentálny variant, **1drms1+IAA** = prvý pupeň na dekapitovanej mutantnej rastline *rms1* ošetrenej IAA-lanolínovou pastou dekapitovanú plochu stonky, **2drms1+IAA** = druhý pupeň, rovnaký experimentálny variant. 128

9 ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1	Prehľad génov kódujúcich enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónu.	36
Tab. 2	Zloženie reakčnej zmesi pre reverznú transkripciu.	57
Tab. 3	Zloženie reakčnej zmesi pre real-time PCR.	58
Tab. 4	Sekvencie použitých špecifických primerov pre vybrané gény.	59
Tab. 5	Reakčné podmienky real-time PCR reakcie.	60
Tab. 6	Zloženie PBS pufru.	63

10 ZOZNAM SKRATIEK

ABC	ATP-binding cassette transportných proteínov
ABCB	gén kódujúci transportné proteíny ABC rodiny, ABC-B/multidrug resistance/P-glycoprotein
AUX1	<i>AUXIN-RESISTANT1</i> ; gén kódujúci transportné proteíny auxínu
ARF-GEF	guanín-nuklotidové výmenné faktory pre GTPázy ARF triedy
BA	benzyladenín
BFA	brefeldin A
BRC	<i>BRANCHED 1</i> ; gén kódujúci transkripčné faktory s TCP (TB1 CYCLOIDEA PCF) doménou
CDC2	<i>CELL DIVISION CONTROL 2</i> ; gén kódujúci proteín zapojený do procesu bunkového delenia
cDNA	komplementárna deoxyribonukleová kyselina
CKX	<i>CYTOKININ OXIDASE/DEHYDROGENASE</i> ; gén kódujúci cytokinínovú oxidázu/dehydrogenázu
cZ	<i>cis</i> -zeatín
DAD	<i>DECREASED APICAL DOMINANCE</i> ; gén kódujúci enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónov u peptúnie (<i>Petunia hybrida</i> L.)
DRM	<i>DORMANCY-ASSOCIATED PROTEIN</i> ; gén kódujúci proteín asociovaný s dormanciou
DTT	dithiothreitol
DZ	dihydrozeatín
DZR	dihydrozeatín ribozid
EF1 α	<i>ELONGATION FACTOR1α</i> ; gén kódujúci elongačný faktor
GNOM	gén kódujúci brefeldin A senzitivne guanín-nuklotidové výmenné faktory pre GTPázy
GR24	syntetický analóg strigolaktónu
CHX	cykloheximid
IAA	kyselina indolyl-3-octová
IBA	kyselina indolyl-3-maslová
iP	izopentenyladenín
IPR	izopentenyladenín ribozid
IPT	<i>ISOPENTENYL TRANSFERASE</i> ; gén kódujúci izopentenytransferázu
LC-MS	kvapalinová chromatografia spojená s hmotnostnou spektrometriou
MAX	<i>MORE AXILLARY GROWT</i> ; gén kódujúci enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónov u arábovky Thalovej (<i>Arabidopsis thaliana</i> L.)
mRNA	mediátorová ribonukleová kyselina
M-MLV	vírus Moloney Murine Leukemia Virus
NAA	kyselina naftyloctová
NOA	kyselina naftoxyoctová
NPA	kyselina 1-N-naftyftalámová

<i>RMS</i>	<i>RAMOSUS</i> ; gén kódujúci enzýmy zapojené do biosyntézy strigolaktónov u hrachu (<i>Pisum sativum</i> L.)
RNA	ribonukleová kyselina
RT	reverzná transkripcia
PAA	kyselina fenyloctová
PAT	polárny auxínový transport
PCR	polymerázová reťazová reakcia
<i>PID</i>	<i>PINOID</i> ; gén kódujúci serín/treonínovú proteínovú kinázu
<i>PIN</i>	<i>PIN-FORMED</i> ; gén kódujúci transportné proteíny auxínu
PP2A	proteínová fosfatáza 2A
<i>TAA</i>	<i>TRYPTOFAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS</i> ; gén kódujúci aminotransferázu
TIBA	kyselina 2,3,5-trijódbenzoová
tRNA	transférová ribonukleová kyselina
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatín
<i>tZR</i>	<i>trans</i> -zeatín ribozid
X-CK	cytokiníny v xylémovom exsudáte
<i>YUC</i>	<i>YUCCA</i> ; gén kódujúci enzým flavínová monooxygenáza