

MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2015

BC. VERONIKA HIRŠOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
Ústav biologie rostlin



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



Role RMS2 v regulaci apikální dominance
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Mgr. Vilém Reinöhl, Csc.

Vypracovala:
Bc. Veronika Hiršová

Brno 2015

Čestné prohlášení

Prohlašuji, že jsem práci: Studium role RMS2 v regulaci apikální dominance vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů a v souladu s platnou *Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací*.

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

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

V Brně dne:

.....

podpis

PODĚKOVÁNÍ

Na tomto místě bych v první řadě poděkovala Mgr. Vilému Reinöhlovi, Csc. za odborné vedení práce, cenné rady a čas strávený na konzultacích. Dále děkuji Ing. Petru Kalouskovi, Ph.D. a Martině Jůzové za vstřícnost a pomoc při realizaci pokusů. A na závěr bych ráda poděkovala Ing. Michaele Vackové za podporu a pomoc při praktické i teoretické části mé práce.

ABSTRAKT

V této práci byla studována role RMS2 v regulaci apikální dominance s využitím *rms2* mutantních rostlin a divokého typu cv. Torsdag pro stanovení fenotypových projevů a změn v polárním transportu auxinu (imunolokalizací PIN1) způsobených *rms2* mutací a aplikací auxinu. Fenotypové projevy *rms2* mutantů oproti cv. Torsdag jsou, zvýšené větvení především z prvního a druhého nodu, které ale zdaleka nedosahuje stupně větvení pozorovaného u strigolakton-deficientních rostlin. Vlivem aplikace auxinu jak na intaktní, tak na dekapitované *rms2* mutanty dochází k zesílení růstu pupenů nejbližší místu aplikace auxinu na rozdíl od divokého typu, u kterého aplikace růst nejbližších pupenů inhibuje. Aplikace auxinu na řeznou plochu dekapitovaného stonku nebo zboku na stonek vede u primární aplikace vždy ke kanalizaci, U sekundární aplikace 24 hodin později dochází ke kanalizaci pouze u *rms2*. Původně navržené zpětnovazebné přímé působení RMS2 na expresi *RMS1* bylo na základě výsledků změněno na působení RMS2 jako negativního regulátoru polárního transportu auxinu.

Klíčová slova: apikální dominance, auxin, polární transport auxinu, RMS2, strigolakton

ABSTRACT

The role of RMS2 in regulation of apical dominance was studied with the use of *rms2* mutants and wild type cv. Torsdag. Phenotypic changes and changes in polar auxin transport (by immunolocalization of PIN1) in *rms2* mutants and after auxin application were observed. The phenotypic changes of *rms2* mutants against cv. Torsdag are enhanced branching from the first two nodes but much less than branching of strigolactone deficient mutants. Auxin application both on intact and decapitated *rms2* mutants led to enhancement of growth of the buds adjacent to the place of application in contrary to wild type in that the application inhibits the growth of adjacent buds. Auxin application to the cut surface of decapitated stem or from the side of the stem led in the primary application always to canalization. Secondary application 24 hours later led to canalization only in *rms2*. Originally proposed feedback regulation of *RMS1* expression by RMS2 was changed to RMS2 as being a negative regulator of polar auxin transport.

Key words: apical dominance, auxin, polar auxin transport, RMS2, strigolactone

Obsah

1 ÚVOD	9
2 CÍL PRÁCE	10
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	11
3.1 Apikální dominance	11
3.2 Teorie apikální dominance	11
3.3 Hormonální regulace apikální dominance	14
3.3.1 Auxiny	14
3.3.2 Cytokininy	17
3.3.3 Strigolakton	18
3.3.4 Interakce auxinu a strigolaktonu	22
4 MATERIÁL A METODIKA	25
4.1 Rostlinný materiál	25
4.2 Imunolokalizace PIN1 proteinů	25
5 VÝSLEDKY	33
5.1 Růstové křivky	33
5.2 Imunolokalizace PIN1 proteinů	41
6 DISKUSE	50
7 ZÁVĚR	55
8 POUŽITÁ LITERATURA	56
SEZNAM OBRÁZKŮ	63
SEZNAM TABULEK	65
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	66
PŘÍLOHA	69

1 ÚVOD

Každá rostlina má svůj typický tvar, který je dán geneticky podmíněnou architekturou větvení, ale také je ovlivňován vlivy vnějšího prostředí (světelné podmínky, počasí, dostupnost živin atd.). Všechny tyto faktory musí rostlina vyhodnotit a rozhodnout se pro růst nebo inhibici laterálních pupenů.

Apikální dominance je velmi důležitý fyziologický jev, při kterém dochází k nadvládě lodyžního vrcholu a potlačení růstu bočních pupenů, případně kořenového vrcholu a postranních kořenů. Šlechtitele však vždy více zajímala dominance u nadzemní části rostlin. U různých rostlinných druhů jsou rozdílné požadavky na apikální dominanci. Na příklad u ovocných stromů se používají speciální řezy, aby došlo k potlačení apikální dominance a rostlina více větvila, čímž dochází k produkci více plodů a semen. Naopak u obilovin požadují šlechtitelé silnou apikální dominanci. Jako modelové rostliny pro studium apikální dominance se využívají hlavně dvouděložné rostliny – jako příklad můžeme uvést rostliny hrachu, fazolu a v poslední době také huseníček.

Během posledního téměř století bylo vypracováno mnoho hypotéz, které rostlinnou architekturu a apikální dominanci popisují. Dodnes však neexistuje konečná verze toho modelu (LEYSER 2009). Již od počátku je intenzivně zkoumána role fytohormonů v regulaci apikální dominance. Nejdříve byl zájem soustředěn na auxiny a cytokininy, dnes už sem zasahují další nově objevené látky – strigolaktony, ale i doposud neznámý pozitivní regulátor větvení (JANSSEN et al. 2010). Vývoj moderních molekulárně-biologických metod umožňuje také zkoumání apikální dominance na úrovni genetické. Ke studiu funkce a mechanismů účinků rostlinných hormonů významně přispělo také objevení mutantů rostlin, které měly pozměněnou biosyntézu určitého hormonu nebo jeho signální dráhy. U těchto mutantů (např. *max* u huseníčku, *rms* u hrachu, atd.) bylo sledováno zvýšené větvení nadzemní části.

RMS2 zůstává jedním z genů, který je znám pouze na základě fenotypového projevu u hrachu, ale není znám jeho homolog u huseníčku. Stále také není známa jeho sekvence a jeho skutečná funkce.

2 CÍL PRÁCE

Cílem práce bylo přispět k poznatkům o roli RMS2 v regulaci apikální dominance. Vzhledem k jeho předpokládané funkci zpětnovazebného signálu, kterým strigolakton ovlivňuje expresi vlastních biosyntetických genů, bylo původně plánováno studium exprese především genů genové rodiny *RMS*. Na základě prvních experimentů však vyplynulo, že gen *RMS2* se účastní regulace polárního transportu auxinu a bylo tedy jako nástroj pro objasnění role RMS2 zvoleno studium fenotypového projevu *rms2* mutantních rostlin ovlivněných auxinem a imunolokalizace PIN1 proteinů jako klíčového proteinu zprostředkujícího transport auxinu ve stonku.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Apikální dominance

Rostliny jsou složeny z jednotlivých buněk, pletiv a orgánů, což dohromady představuje harmonicky sladěný celek. Celistvost neboli integrita rostlin se projevuje mnohými růstovými korelacemi mezi různými částmi rostlin, které jsou do značné míry ovlivňovány fytohormony (Procházka et al., 2003).

Apikální dominance (AD) je pojem, označující regulaci vývoje větvení díky rostoucímu apexu. Dominantní je hlavní stonek a potlačuje růst úžlabních pupenů. Tento jev určuje celkový vzhled rostliny a u různých druhů rostlin se díky rozdílnému stupni AD odlišuje. Mezi druhy s výraznou apikální dominancí se řadí hrách setý (*Pisum sativum*), u kterého jsou boční pupeny v inhibici díky pupenu vrcholovému. Jako protiklad můžeme uvést například bytel metlatý (*Kochia scoparia*), u kterého se žádná apikální dominance neprojevuje (Šebánek, 1983).

Jedním z prvních, který se začal zajímat o projevy transportu inhibičního signálu z vrcholu, přes stonek a do pupenů byl SNOW (1929). Prováděl mnoho pokusů na rostlinách hrachu a fazolu, kdy odstranil hlavní stonek a sledoval růst bočních větví.

Na počátku byla hlavní role auxinu v rámci regulace AD objasňována pokusy na bobu obecném (*Vicia faba* L.). Byl dekapitován apex rostlinného stonku, což zapříčinilo růst bočních pupenů. V případě, že byl na dekapitovaný stonek aplikován auxin, nastala inhibice bočních pupenů (SKOOG AND THIMANN 1934).

3.2 Teorie apikální dominance

Nutriční teorie apikální dominance

Tuto teorii popisoval už v letech 1900 Goebel. Tvrdil, že růst postranních pupenů je omezen tím, že rostlinný apex sbírá veškeré potřebné živiny, které by jinak sloužily pro vývoj a růst pupenů postranních (ŠEBÁNEK, 2004). Goebelovi další pokusy

ho v této teorii ujistily, protože při odstranění jednoho listu, byly živiny použity pro vývoj zbylých listů, které se výrazně zvětšily. Existují živiny, které dokážou pupen z apikální dominance osvobodit. Patří mezi ně například dusík nebo draslík. Experimenty, při nichž šlo o aplikaci těchto živin přímo na pupeny celistvých rostlin, ovšem tuto schopnost nepotvrdily (MCINTYRE 1977; PRASAD et al. 1989). Tato teorie byla několik let považována za příčinu apikální dominance.

Korelačně inhibiční vlivy na apikální dominanci

DOSTÁL (1908) popřel nutriční teorii svými experimenty s rostlinami hrachu. V případě dekapitace hlavního stonku rostly děložní pupeny, ale po odstranění jedné dělohy se opět ustálila AD růstem pupenu dekapitované dělohy. Na navození AD se podílí regulačně inhibiční vliv zanechané dělohy, protože tato na živiny bohatá děloha, zabraňuje vývoji svého pupenu.

Teorie přímé auxinové inhibice v apikální dominanci

Byly prováděny studie na klíčících rostlinách bobu obecného (*Vicia faba* L.) a díky aplikaci auxinu na dekapitovaný stonek se podařilo nastítnit korelačně inhibiční vliv apikálního pupenu a inhibiční vliv na postranní pupeny (THIMANN, 1937). Po odstranění hlavního stonku rostliny začínaly růst boční větve, ale při aplikaci auxinu na dekapitovanou plochu této rostliny nastala inhibice větvení.

Teorie přímé auxinové inhibice v apikální dominanci byla navržena K.V. THIMANNEM (1937). Podle něj se auxin tvořil v terminálním pupenu, bazipetálně byl transportován a poté přímo zabraňoval růstu úžlabních pupenů. Pokud dekapitujeme auxinový zdroj (terminální pupen), auxin v úžlabních pupenech bude vyčerpán a pupeny obnoví svůj růst.

Tato teorie nebyla příliš úspěšná a byla mnoha studiemi vyvrácena. Pokud byl aplikován auxin k axilárním pupenům, dekapitované rostliny neměly pozastavený růst. Při pokusech s radioaktivně značeným auxinem bylo zjištěno, že při aplikaci na dekapitovanou plochu, není transportován k axilárním pupenům (EVERATBOURBOULOUX AND BONNEMAIN 1980).

Teorie nepřímé auxinové inhibice v apikální dominanci

Existují studie, které se snažily podat důkazy o tom, že AD určují látky jiné než auxinové povahy. Podle této teorie auxin pouze ochraňuje stonk před inhibicemi a díky tomu může apex, ve kterém je velké množství auxinu dále růst. Boční pupeny, jež naopak tolik auxinu neobsahují, nejsou bráněny a nevyvíjí se. Apikální dominance může být také ovlivněna dalšími rostlinnými hormony. Některé studie uvádějí, že auxin může podporovat nebo naopak zabraňovat vzniku některých dalších fytohormonů a ty pak mohou ovlivňovat růst a vývoj pupenů.

Nutriční diverzní teorie apikální dominance

V této teorii je nejdůležitější tok živin z kořenů k apexu, při čemž dochází k oslabení vývoje bočních pupenů (WENT 1939). Při dekapitaci vrcholu stonku se mohou živiny volně rozvést do celé rostliny a boční inhibované pupeny se mohou začít vyvíjet. Několik dalších experimentů podpořilo myšlenku, že by lokální aplikace auxinu mohla stimulovat transport metabolitů a rostlinných hormonů na dlouhé vzdálenosti. Tato nutriční diverzní teorie má základ v tom, že boční pupeny neobsahují dostatečné množství auxinu nebo nejsou schopny soutěžit s dominantním vrcholem (MCINTYRE 1977).

Vaskulární teorie apikální dominance

Stojí na základech teorie nutričně diverzní a teorie přímé inhibice. Hlavní myšlenkou je, že auxin pozastavuje růst bočních pupenů, což je zapříčiněno ovlivněním cévního spojení mezi stonkem a bočními pupeny (OVERBEEK 1938). Dále také SOROKIN AND THIMANN (1964) prováděli experimenty, při nichž prokázali vliv auxinu na diferenciaci cévních svazků xylému.

Neúplný nebo nefungující vaskulární systém není hlavním důvodem pozastavení růstu bočních pupenů (PETERSON AND FLETCHER 1973). SACHS (1981) uvádí, že se inhibice tvorby vaskulárních pletiv dá vyložit jako důsledek inhibice transportu auxinu

z určité zásobárny jeho přítomností do jiné. Použití auxinu po dekapitaci na boční pupeny zapříčinilo, že se v daném místě tvořily cévní svazky, které se poté propojily s cévními svazky rostliny.

3.3 Hormonální regulace apikální dominance

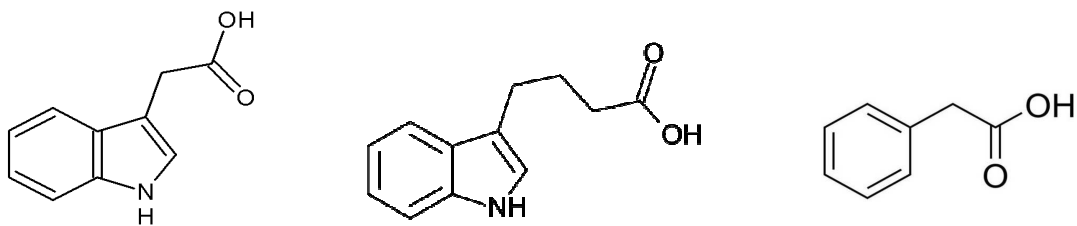
Apikální dominanci ovlivňuje mnoho vnějších faktorů, patří mezi ně například teplota, světlo, voda, živiny a další. Z vnitřních faktorů jsou nejdůležitější fytohormony. Mezi ty nevýznamnější podílející se na AD patří auxiny, cytokininy, etylén, kyselina abscisová a nová skupina - strigolaktony, objevená roku 2008 (GOMEZ-ROLDAN et al. 2008; UMEHARA et al. 2008). V rámci stále se modernizujících analýz a technik jsou objevovány nové skutečnosti, jež obohacují znalosti o vývoji a růstu rostlin.

3.3.1 Auxiny

Tato skupina patří mezi nejdéle známé fytohormony. Název auxin pochází z řeckého slova *auxein* = růst, zvětšovat se, což naznačuje, že hlavním rysem těchto hormonů je prodlužování buněk a to již v nízkých koncentracích. Jejich existence byla objasněna už ve 20. letech 20. století, kdy Charles Darwin prováděl experimenty na koleoptilích ovsa. Tyto rostlinné hormony byly už od počátku spojovány s apikální dominancí a ovlivňováním větvení nadzemní části rostlin tím, že potlačují růst úžlabních pupenů, ale podílejí se také na buněčném dělení, diferencování buněk a vývoji a růstu kořenů (GUILFOYLE et al. 1993).

Auxiny můžeme rozčlenit do dvou skupin – přirozené a syntetické. Na počátku byla dlouho jediným objeveným přirozeným auxinem kyselina indolyl-3-octová (IAA), ale díky vývoji nových metod a analýz jsou již dnes známé mnohé další – fenyloctová kyselina (PAA), indolyl-3-máselná kyselina (IBA) a 4-chlor-indol-3-octová kyselina.

Kyselina indolyl-3-octová (IAA) – nejhojněji se v rostlinách vyskytující, poprvé nalezena v lidské moči (1933), nestálá organická kyselina, je velmi citlivá na UV záření, které ji rozkládá.



Kyselina indolyl-3-octová

Kyselina indolyl-3-máselná

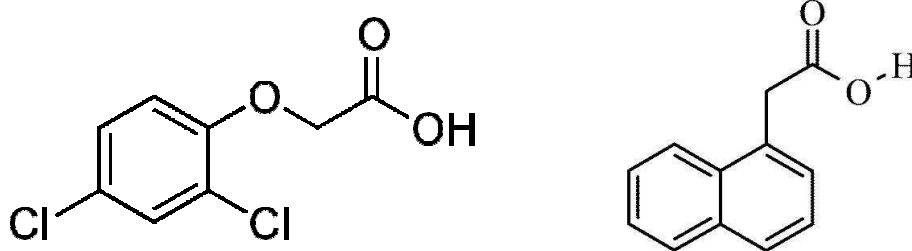
Kyselina fenylactová

Obr. 1: Chemické vzorce přirozených auxinů

Kyselina indolyl-3-máselná (IBA) – prekurzor kyseliny indolyl-3-máselné, ovlivňuje zakořeňování rostlin a mnohé další procesy ovlivňované auxinem (dělení buněk, epinastie, ohyb kmenů (STRADER AND BARTEL 2009).

Kyselina fenylactová (PAA) – vyskytuje se ve vegetačních výhoncích.

Syntetické auxiny jsou svým působením podobné kyselině indolyl-3-octové. Jejich typickým znakem je karboxylová skupina na postranním uhlíkatém řetězci připojeném k aromatickému kruhu. Všechny doposud objevené syntetické auxiny jsou slabé organické kyseliny. Mezi nejznámější patří kyseliny α -naftylactová a 2,4-dichlorfenoxyoctová (EPSTEIN et al. 1989).



Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová

Kyselina α -naftylactová

Obr. 2: Chemické vzorce syntetických auxinů

Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) – běžně se přidává do kultivačních médií jako regulátor růstu, nižší koncentrace tohoto auxinu podporují buněčné dělení,

dediferenciaci *in vitro*, tvorbu somatických embryí, kalusů a zakořeňování (GASPAR ET AL. 1996).

Kyselina α -naftyloctová (NAA) – přidáním NAA lze komplementovat fenotyp rostliny s narušeným gravitropismem díky mutaci vstupního přenašeče auxinu *aux1*, protože tato látka proniká do buněk pouze difuzí, nikoli pomocí membránových přenašečů (YAMAMOTO AND YAMAMOTO 1998).

Přímé použití auxinu na laterální pupeny potlačuje jejich růst, stejně jako při aplikaci na stonk nad pupeny (THIMANN, 1937). Pokud je potlačen růst laterálních pupenů použitím auxinu, žádná jiná část rostliny neroste. Proběhlo mnoho experimentů, které se snažily objasnit, jak funguje regulace růstu pupenů a větvení stonku ovlivněných auxinem (LEYSER 2005) a byly navrženy tři hypotézy založené na tom, jak auxin a cytokinin proudící v hlavním stonku potlačují či stimulují růst úžlabních pupenů a větvení nadzemní části (DUN et al. 2006). Řadíme mezi ně klasickou hypotézu, hypotézu přechodového stavu pupenu a hypotézu transportu auxinu.

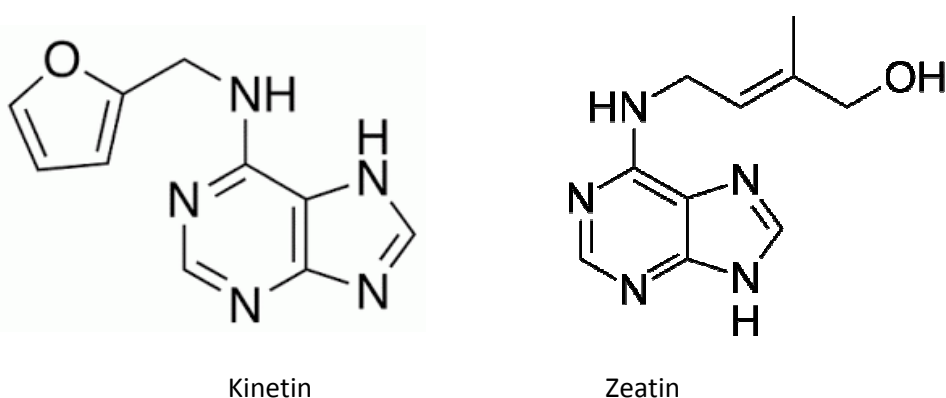
První klasická hypotéza objasňuje, jak auxin ovlivňuje větvení stonku díky změnám hladin ostatních signálů, které podporují potlačení růstu pupenů (DUN et al. 2006). Výše uvedené signály označujeme jako sekundární posly působení auxinu (MCSTEEN AND LEYSER 2005). Mnohé experimenty prokázaly důležitost těchto poslů při propojení mezi růstem pupenů a biosyntetickou drahou cytokininů.

Ve druhé hypotéze je růst pupene rozdělen do tří fází – dormance, přechodový stav a trvalý růst (DUN et al. 2006). Předpokládá se, že postavení pupenů na stonku je důležité pro jejich potenciální růst a reakci na cytokininy nebo dekapitaci. Je tedy potřeba vědět v jakém stádiu se pupen nachází, protože auxin je schopen potlačit růst jen v přechodovém stádiu.

Hlavním aspektem třetí hypotézy je auxinový transport stonkem rostliny. Auxin je transportován stonkem z apikálního meristému, kde je tvořen, resp. kam je transportován z mladých listů, do báze pomocí auxinového polárního transportu (LJUNG ET AL. 2005). Růst úžlabních pupenů je pozastaven díky tomu, že stonk je plně nasycen auxinem a není schopen přijímat další auxin z těchto pupenů (LI AND BANGERTH 1999)

3.3.2 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné látky proudící cévním systémem všech rostlin. Popisujeme je jako sloučeniny, které po ovlivnění auxinem indukují cytokinezi. Jako první byl objeven cytokinin kinetin, nalezený ve spermatu sledě při zkoumání složení živného média (MILLER et al. 1955) a následně první přirozený rostlinný cytokinin zeatin, pojmenovaný podle místa objevení – nezralého endospermu kukuřice (LETHAM AND PALNI 1983).



Obr. 3: Chemické vzorce prvních dvou objevených cytokininů

Cytokininy jsou součástí mnoha důležitých procesů v rostlinách. Patří mezi ně zpomalení senescence, stimulace buněčného dělení, apikální dominance (antagonisté auxinů) (TANAKA et al. 2006; SHIMIZU-SATO et al. 2009) a prodloužení životaschopnosti chloroplastů (MORRIS ET AL. 1993).

Tyto fytohormony rozdělujeme na dvě skupiny – aromatické a isoprenoidní. Zástupci obou těchto podskupin jsou součástí rostlinných těl. Látky isoprenoidní povahy jsou u rostlin častější a jsou zastoupeny ve větších množstvích než látky aromatické.

Isoprenoidní cytokininy: V této skupině jsou nejběžnější 2-isopentenyladenin (2ip) a zeatin.

Aromatické cytokininy: Byly nalezeny u několika rostlinných druhů, ale dodnes není jisté, jestli jsou obsaženy u všech rostlin. Není zcela objasněna jejich biosyntéza ani degradace. Mezi nejznámější patří benzyladenin a topoliny.

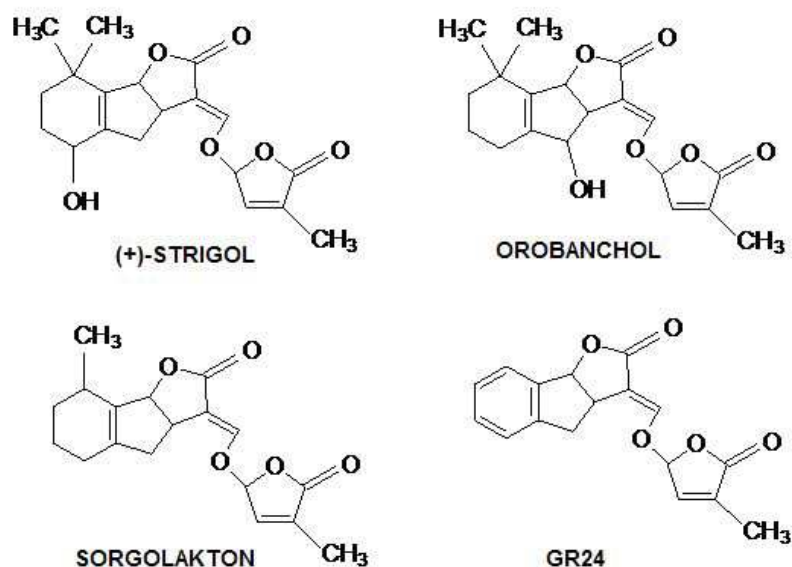
Biosyntéza cytokininů se odehrává především v kořenech, odkud jsou poté tyto látky unášeny transpiračním tokem v xylému do stonku. Při aplikaci cytokininu na boční pupen je jeho růst podpořen jak u rostlin dekapitovaných, tak u intaktních (CHATFIELD et al. 2000). Tato skupina fytohormonů je doposud jedinou známou, která dokáže uvolnit úžlabní pupeny z dormance. Spolu s auxiny působí jako jejich antagonisté. Zatímco auxiny ovlivňují vývoj z intaktního vrcholu stonku potlačením růstu úžlabních pupenů, cytokininy uvolněné po dekapitaci stonkového vrcholu působí jako přímá podpora jejich růstu.

K experimentům byly také použity rostliny s nadprodukcí cytokininů. Výsledky podpořily domněnku, že auxiny potlačují růst bočních pupenů a naopak cytokininy jejich růst podporují. Přenos genu *ipt* z *Agrobacterium tumefaciens* na rostliny *Nicotiana glutinosa* zvýšil hladinu cytokininů a podpořil růst bočních pupenů. Jako protiklad byly použity rostliny se zvýšenou produkcí auxinů (gen *iaaM*) a zde zůstaly boční pupeny v inhibici (KLEE AND ESTELLE 1991). Z této studie vyplývá, že poměr auxinů a cytokininů je velmi důležitý pro vývoj rostlinného těla.

3.3.3 Strigolakton

Rostlinné hormony strigolaktony výrazně ovlivňují vývoj a růst rostlin. Zapojují se do symbiózy s houbami a stimulují klíčivost parazitických semen (MATUSOVA et al. 2005). Jsou schopny regulovat komunikaci mezi kořeny u sousedících organismů a také se podílejí na architektuře nadzemních částí rostlin inhibicí větvení (GOMEZ-ROLDAN et al. 2008; UMEHARA et al. 2008).

Rostliny produkují směs strigolaktonů a ty vypouštějí z kořenů do jejich nejbližšího okolí. Jelikož je tato směs poměrně nestabilní, jsou arbuskulární houby a semena parazitických rostlin schopny strigolaktony vnímat jen do určité vzdálenosti. Koncentrace těchto hormonů ve směsi je u různých rostlinných druhů odlišná.



Obr. 5: Chemické vzorce vybraných strigolaktonů a jejich syntetického analogu G24 (Umehara et al. 2008)

Stimulace klíčení parazitických rostlin

Strigolaktony stimulují klíčivost semen parazitických plevelných rostlin rodu *Striga* a *Orobanche* (záraza). Tyto celosvětově známé rostliny parazitují na kořenovém systému hostitelských rostlin a omezují jejich přísun vody a živin, čímž mohou snižovat výnosnost (LOPEZ-RAEZ et al. 2008; JOEL et al. 2011). Dokud hostitelský kořenový systém nevyloučí do rhizosféry směs strigolaktonů, nemůže dojít k indukci mechanismů podporujících klíčení a semena parazitických rostlin jsou tudíž v dormanci. Strigolaktony jsou už v pikomolárních koncentracích schopny navodit až 50% klíčivost některých dormantních semen (WIGCHERT ET AL., 1999).

Arbuskulární mykorhiza

Jeden z druhů symbiózy rostliny a půdní houby je nazýván arbuskulární mykorhiza. Toto soužití je běžné až u 80 % rostlinných druhů. Důležitá je zde výměna látek mezi rostlinou a houbou, kdy rostlina dodává uhlíkaté látky a houba anorganické živiny.

Houby žijící v arbuskulární mykorhize jsou na ní závislé a nedokáží bez ní uzavřít svůj životní cyklus. Jejich spory klíčí i bez hostitelské rostliny, pokud jsou splněny všechny potřebné podmínky pro život, ale pokud nejsou v okolí hostitelské kořeny, hyfy se nemohou dostatečně rozrůst a odumírají dříve, než spory vyčerpají svoji zásobu živin.

Rostliny, které využívají symbiotickou houbu, vypouští tzv. větvicí faktory – molekuly podporující větvení hyf. Naopak symbiotická houba uvolňuje do půdy v blízkosti hostitelské rostliny tzv. myc faktory – signalizační molekuly, které podporují buněčnou i molekulární odezvu potřebnou pro symbiózu s kořeny. Tento větvicí faktor byl u rostlin štírovníku (*Lotus japonicus*) identifikován jako strigolakton (5 – deoxystrigol) (AKIYAMA et al. 2005).

Ačkoli je arbuskulární mykorhiza pro většinu rostlin nepostradatelná, o jejích mechanismech je známo velmi málo. Hlavním problémem v objasnění je neschopnost kultivace houby bez hostitelské rostliny (AKIYAMA AND HAYASHI 2009). Objev strigolaktonu, podporujícího větvení hyf, však výrazně přispěl k objasnění této problematiky (AKIYAMA et al. 2005).

Ovlivnění větvení nadzemní části rostlin

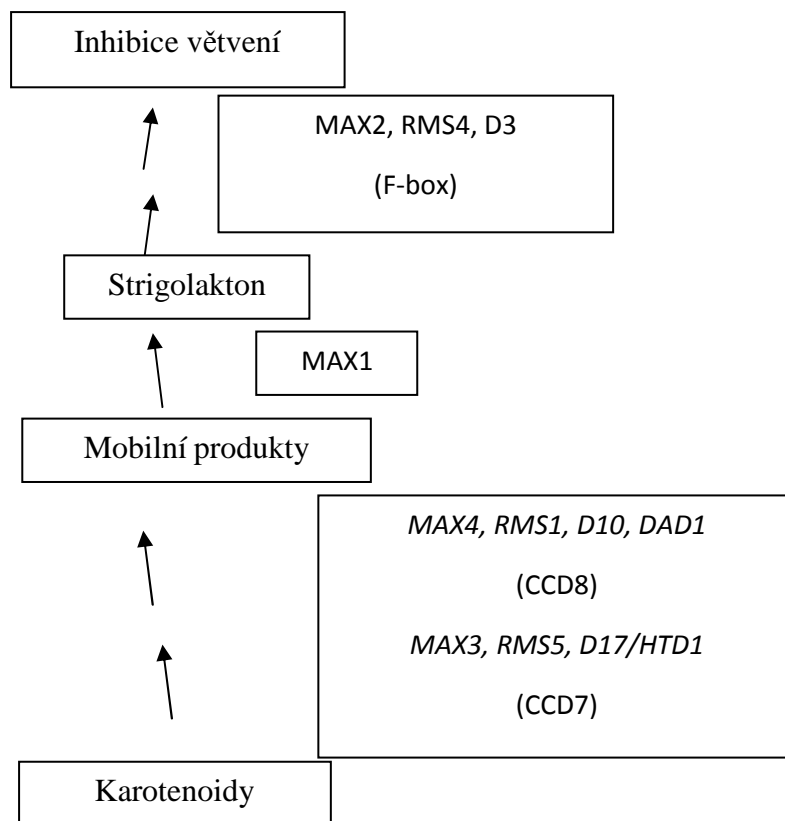
Dnes už je všeobecně známo, že auxiny a cytokininy ovlivňují větvení nadzemní části rostlin. Existují však experimenty s mutantními rostlinami huseníčku (*max*) a hrachu (*rms*), u kterých bylo zjištěno, že je zde další látka ovlivňující vývoj nadzemní části například tím, že působí na pokles kapacity transportu auxinu ve stonku, což navodí inhibici růstu úžlabních pupenů (BENNETT AND LEYSER 2006; MOUCHEL AND LEYSER 2007; ONGARO AND LEYSER 2008). Tato dnes již známá látka, která ovlivňuje inhibici větvení, se řadí mezi strigolaktomy (GOMEZ-ROLDAN et al. 2008; UMEHARA et al. 2008). Bohužel techniky zatím nejsou schopné běžně kvantifikovat strigolakton z rostlinných pletiv. Důležité bude do budoucna provést testy na větvicích fenotypech, zda korelují s úrovní strigolaktonu v nadzemní části s naroubovanými rostlinami.

Biosyntéza strigolaktonu

Před více než deseti lety, identifikací a charakterizací větvících mutantů hrachu (*Pisum sativum*), huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), rýže (*Oryza sativa*) a petunie (*Petunia hybrida*), bylo zřejmé, že signalizace na dlouhé vzdálenosti je významná pro kontrolu větvení nadzemní části rostlin (ONGARO AND LEYSER 2008; BEVERIDGE et al. 2009; MCSTEEN 2009; BEVERIDGE AND KYOZUKA 2010). Roubování u hrachu odhalilo existenci dvou nových signálů působících na dlouhou vzdálenost a kontrolujících větvení nadzemní části, odlišných od známých regulátorů větvení - auxinu a cytokininu (BEVERIDGE et al. 2000; BEVERIDGE 2006; BEVERIDGE et al. 2009). Jednalo se o inhibitor větvení transportovaný z kořene do stonku (BEVERIDGE et al. 1997a; MORRIS et al. 2001); který byl následně identifikován jako strigolakton (SL) nebo jeho derivát (GOMEZ-ROLDAN et al. 2008; UMEHARA et al. 2008) a zpětnovazebný signál z nadzemní části do kořene, který je nezávislý na auxinu a musí být ještě identifikován (BEVERIDGE et al. 1997a; BEVERIDGE et al. 2000). Genetické a fyziologické modely kontroly větvení u hrachu zahrnují pět *RAMOSUS* genů (*RMS1-RMS5*). Větvení u hrachu SL-deficientních mutantů *rms1* a *rms5* je potlačeno, pokud jsou rouby těchto mutantů naroubovány na kořen rostliny divokého typu nebo pokud je na axilární pupeny aplikován syntetický SL GR24. Na rozdíl od toho, mutantní rostliny genů odezvy na SL - *rms3* a *rms4* neztrácejí větvený charakter roubováním na kořeny rostlin divokého typu a nereagují na aplikaci GR24 (BEVERIDGE et al. 1996; BEVERIDGE et al. 2009; DUN et al. 2009a). Všechny *rms* mutanty, s výjimkou *rms2*, mají ve srovnání s divokým typem vysoké hladiny *RMS1* transkriptů v epikotylech (FOO et al. 2005). Navíc mají tyto mutanty, s výjimkou *rms2*, značně snížené množství cytokininu v xylémové míze (X-CK) oproti divokému typu rostlin (Beveridge et al. 1997; FOO et al. 2007; Morris et al. 2001(FOO et al. 2007). Snížená X-CK v několika *rms* mutantech se zdá být zprostředkovaná mobilním signálem z prýtu do kořenů (BEVERIDGE ET AL. 1997; BEVERIDGE ET AL. 2000). Vzhledem k tomu, že *rms2* je jediný *rms* mutant, který nevykazuje sníženou tvorbu X-CK, zdá se, že RMS2 může hrát roli ve vytváření zpětnovazebného signálu. Předpokládá se, že stejný signál může také regulovat hladinu transkriptu *RMS1* (FOO et al. 2005), protože X-CK a hladina transkriptu *RMS1* vykazují opačnou korelaci (DUN ET AL. 2009). Mutant *rms2* nereaguje na SL (DUN ET AL. 2009).

Tento mutant, který má ve srovnání s divokým typem nízkou hladinu transkriptu *RMS1* a mírně zvýšenou X-CK, může větvit, protože má nízkou hladinu SL a/nebo vysoký obsah CK.

Na počátku syntetické dráhy strigolaktonu působí karotenoidy štěpící dioxygenáza (CCD8), která se vyskytuje u různých druhů rostlin a byla postupně objevená a popisována jako MORE AXILLARY GROWTH 4 (MAX4) u huseníčku, RAMOSUS 1 (RMS1) u hrachu, DWARF10 (D10) u rýže a DECREASED APICAL DOMINANCE 1 (DAD1) u petúnie. V této dráze byl později identifikován další gen ovlivňující větvení, kódující CCD7 (MAX3, RMS5, D17/HTD1). Signální dráha nadzemního větvení je tedy obvykle popisována jako MAX/RMS/D dráha.



Obr. 6: Biosyntetická dráha strigolaktonu (UMEHARA ET AL. 2008).

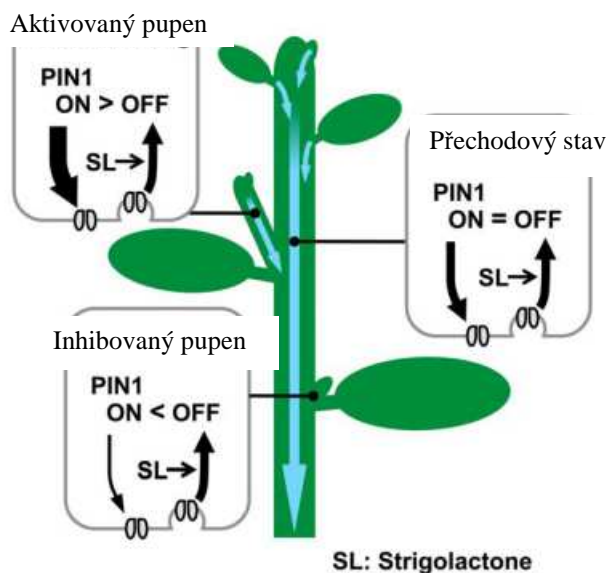
3.3.4 Interakce auxinu a strigolaktonu

Fyziologické práce naznačují, že pokles hladiny auxinu může být zodpovědný za větvení po dekapitaci, ale že vyžaduje sekundární signál, který se může pohybovat

akropetálně. I když větvení na intaktních rostlinách může nebo nemusí být způsobeno stejným mechanismem, jaký následuje po dekapitaci je pravděpodobné, že auxinem regulovaný pokles strigolaktonu je hlavní příčinou větvení po dekapitaci. Vyčerpání auxinu způsobuje značný pokles v expresi genů biosyntézy strigolaktonu u hrachu, rýže a huseníčku. Aplikace analogu strigolaktonu (GR24) na axilární pupeny dekapitovaných rostlin hrachu, zcela zabraňuje jejich růstu. Obdobně větvicí mutanty v auxinovém signalingu u huseníčku, které mají pravděpodobně redukovanou hladinu strigolaktonu a zvýšenou hladinu cytokininu, vykazují značnou odezvu na strigolakton. Konečná funkce strigolaktonu zůstává neznámá, nicméně lokalizované změny v polárním transportu auxinů mohou být důležité.

Stonkový systém je soubor stonkových apikálních meristémů, jež kombinací aktivního růstu nebo dormance vytváří tvar stonku neboli stonkovou architekturu. Z dosavadních výsledků vyplývá, že růst je ve stonkovém systému huseníčku vyvážen kompeticí mezi jednotlivými SAM (stonkový apikální meristém) (SHINOHARA et al. 2013). Tato kompetice je dána potřebou meristému exportovat auxin, aby došlo k aktivaci vyrůstání pupenů. Auxin v hlavním stonku exportovaný rostoucími větvemi může zabránit exportu auxinu z dormantních pupenů a tím zabraňuje jejich aktivaci (BALLA et al. 2011). Dále bylo prokázáno, že strigolakton zvyšuje úroveň kompetice mezi větvemi tím, že znesnadňuje ustavení exportu auxinu. Společně tedy oba hormony určují růst pupenů stonku a nastavují jej v závislosti na podmínkách prostředí, ve kterých rostlina roste (SHINOHARA et al. 2013). Zvláště pozitivní zpětnovazebný mechanismus nazývaný kanalizace auxinu, která je předpokladem exportu auxinu z aktivních stonkových meristémů zprostředkovává kompetici mezi jednotlivými meristémy axilárních pupenů. Působení strigolaktonu způsobuje zvýšený přechod proteinu výstupního přenašeče PIN1 z plazmatické membrány, což koreluje s transportem auxinu a s fenotypy větvení pozorovanými u různých kombinací mutací genů biosyntetické dráhy a signalingu strigolaktonu a ovlivnění aplikací strigolaktonu včetně neočekávané schopnosti strigolaktonu jak stimulovat, tak inhibovat větvení v závislosti na stavu transportu auxinu v rostlině. V souladu s hypotetickým modelem aktivity byl strigolaktonový signaling označen jako spouštěč odstranění PIN1 z plazmatické membrány v buňkách xylémového parenchymu ve stonku. Tento efekt byl pozorován již deset minut po aplikaci strigolaktonu a byl nezávislý na syntéze

proteinů, ale závislý na clathrinem zprostředkovaném membránovém cyklování (SHINOHARA et al. 2013).



Obr. 7: Model regulace vyrůstání pupenů u hrachu (Shinohara et al., 2013)

Geny *RMS1* a *RMS5* se účastní biosyntézy strigolaktonů, který je transportován z kořene do stonku, kde působí jako inhibitor větvení. Odpověď na přítomnosti strigolaktonu vyžaduje proteiny *RMS3* a *RMS4* ve stonku, aby způsobily inhibici růstu pupenů a potlačovaly zpětnovazebný signál. Tento zatím neznámý zpětnovazebný signál, který je částečně závislý na expresi *RMS2* se vytváří ve stonku i v kořenech se pohybuje dolů ze stonku do kořene a podporuje expresi *RMS1* a *RMS5* a zároveň snižuje export cytokininů z kořenů. *RMS3* a *RMS4* v kořenech působí nezávisle na signálech na dlouhou vzdálenost, ale podporují expresi *RMS1* a *RMS5*. Pokud se pupen uvolní z inhibice a roste, signál vznikající ve výhonu se pohybuje dolů a zvyšuje expresi *RMS1* a *RMS5*.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

Při experimentech v této diplomové práci byl jako modelová rostlina používán hrách setý (*Pisum sativum* L.) odrůda Torsdag a mutantní rostliny *rms2* (osivo získáno od C. Beveridge, Austrálie a C. Turnbula, V. Británie). Ve srovnání s rostlinami divokého typu mají mutanti s recesivními alelami genů *rms* rozdílný fenotyp – intaktní rostliny silně větví a jejich úžlabní pupeny výrazně prorůstají (JOHNSON et al. 2006).

4.2 Imunolokalizace PIN1 proteinů

Metody pěstování

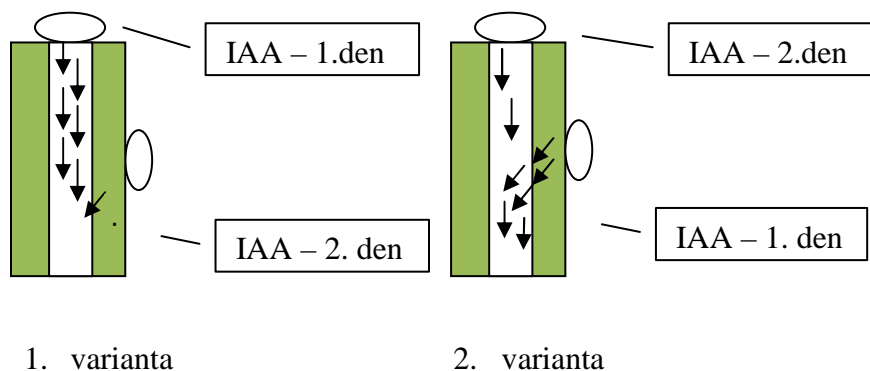
Nejdříve byla semena hrachu dána do kádinky s čistou vodou, kde po dobu 24 hodin bobtnala při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby byla semena vyseta do vlhkého perlitu. Po 6 dnech byla naklíčeným semenům odstraněna testa a byly přesázeny do plastových kultivačních nádob s vlhkým perlitem, bez přidání jakékoli výživy. Poté byly 7 dnů kultivovány v řízených podmínkách klimaboxu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 16/8 hod (den/noc). Intenzita světla byla 150 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a vlhkost 70%.

Tabulka 1: Osvětlení použité v klimaboxu

Vysokotlaká sodíková výbojka Osram Plantastar E40, 250 W	6 ks
Zářivky Biolux, 58 W/965	6 ks
Lumilux 58 W/865	12 ks
Fluora 58 W/77	3 ks

Ošetření rostlin

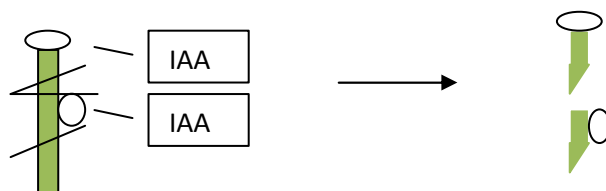
Pro imunolokalizace PIN1 byly používány dekapitované rostliny a to jak u odrůdy Torsdag, tak u *rms2* mutantů. Dekapitace proběhla zhruba centimetr nad druhým axilárním pupenem. Den po přesázení rostlin do kultivačních nádob byl u první varianty na dekapitovaný pahýl nanesen vodní lanolin s přídavkem IAA (0,5%) a u druhé varianty byl na pahýl aplikován čistý vodní lanolin a zhruba půl centimetru pod horní aplikaci byla provedena aplikace vodní lanolinové pasty s přídavkem 0,5% IAA. Druhý den byla vodní lanolinová pasta s 0,5% IAA nanесena z boku pod horní aplikaci (první varianta) a po setření lanolinu na řeznou plochu (druhá varianta) – obr. 7.



Obr. 8: Schéma aplikace IAA na dekapitované rostliny

Odběr rostlinného materiálu

Odběr ošetřeného rostlinného materiálu proběhl pět dní po první aplikaci a následně byla provedena imunolokalizace PIN1 proteinu. Každá varianta byla rozdělena na dva segmenty - viz obr. 9 a byly tedy získány čtyři vzorky.



Obr. 9: Schéma řezů jednotlivých variant

Fixace

Tento pracovní postup byl proveden podle metodiky (PACIOREK et al. 2006)

Jednotlivé varianty řezů byly dány do fixačního roztoku (kyselina octová : metanol – 3 : 1) a při -20°C přes noc inkubovány. Poté byly řezy třikrát promyty v pracovním roztoku 1xPBS (Tab. 2) po dobu 15 minut pro odstranění nadbytečného fixačního činidla. Připravený roztok měl pH upravené na 7,4.

Tabulka 2: Složení zásobního roztoku 10xPBS

chemikálie	g/l
NaCl	9
KH ₂ PO ₄	0,21
Na ₂ HPO ₄ . 12H ₂ O	1

Odvodnění vzorků

Řezy všech variant byly odvodňovány pomocí ethanolové řady. Řada byla složena z 10/30/50/70/90% ethanolu. Do každého byly vzorky na 15 minut vloženy. Následně byly řezy dvakrát promyté v 96% ethanolu a dvakrát ve 100% ethanolu, v obou případech 45 minut. Poté byly vzorky infiltrovány xylénem v roztocích dle Tabulky 3.

Tabulka 3: Roztoky xylénu

chemikálie	zředění	doba působení
ethanol/xylén	3:1	60 min
ethanol/xylén	1:1	60 min

ethanol/xylén	1:3	60 min
xylén	100%	60 min
xylén	100%	přes noc

Zalítí vzorků parafínem

Byl rozpuštěn parafín Paraplast Plus® (Leica microsystem, Surgipath, UK), přidán do xylénu s řezem a následovala inkubace po dobu 12 hodin při pokojové teplotě. Poté byl přidán další parafín, inkubace opět trvala 12 hodin, ale už při 42°C. Následoval poslední přídavek parafínu a inkubace při 58°C 4 hodiny. Potom byla vrstva parafínu a xylénu nahrazena čistým parafínem a inkubace řezů trvala přes noc při 58°C. Čistý parafín posléze ještě třikrát nahradil původní parafín, ve všech případech trvala inkubace 12 hodin při teplotě 58°C.

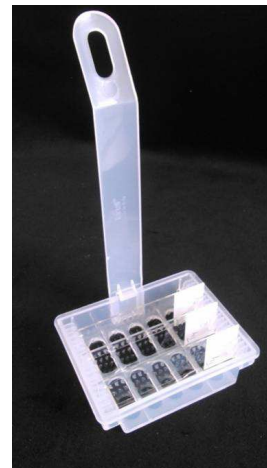
Tímto způsobem připravené řezy byly přemístěny do plastových bločků a zality rozpuštěným parafínem. Pomocí pinzety a preparační jehly byly řezy opatrně naorientovány doprostřed dna bločku a poté ochlazeny. Tím se zajistila správná poloha pro řezání na mikrotomu.

Řezání na mikrotomu

Vytvořené parafínové bločky s jednotlivými segmenty stonku byly řezány na rotačním mikrotomu LEICA RM 2255 na tloušťku 15 µm. Takto nařezané vzorky vytvořily souvislý parafínový pás s jednotlivými řezy stonku uprostřed, který byl poté přenesen do vodní lázně (42°C) a připraven k žehlení. Následně byl tento pruh opatrně přenesen na pozitivně nabitě podložní sklíčko (Super Frost Plus – Menzel-Gläser, Německo) a ponechán na elektrické desce při teplotě 42°C po dobu 2 hodin.

Odparafinování a odvodnění vzorků

Byly použity stojany na sklíčka, do kterých byly vloženy získané vzorky na podložních sklíčkách a byly promyty 100% xylénem po dobu 20 minut. Potom pokračovalo promytí 50% xylénem a 50% ethanolem (10 min), 100% ethanolem (10 min) a na závěr byla sklíčka ponechána zhruba 30 minut schnout. Následovalo odvodnění pomocí etanolové řady. Postupně byla sklíčka přemísťována do 100/90/70/50/30/10% ethanolu, v každém byla ponechána 6 minut a nakonec promyta roztokem 1xPBS (10min).



Obr. 10: Držák na sklíčka

Blokování

Sklíčka byla vyskládána do předem připravené nádoby s vlhkou buničinou na dně pro zajištění vlhkého prostředí. Na každé podložní sklíčko bylo napipetováno 1000 μ l blokovačského roztoku, připraveného z roztoku PBS a albuminu. Inkubace probíhala 1 hodinu při pokojové teplotě.

Tabulka 4: Složení blokovačského roztoku

Látka	Množství
albumin	1,5 g
1xPBS	50 ml



Obr. 11: Nádoba s vlhkou buničinou a vzorky

Navázání první protilátky

Ze sklíček sklepeme blokovací roztok, vrátíme zpět do nádoby s vlhkou buničinou, napipetujeme 100 μ l 1. protilátky (anti-PIN1, ředění 1:1000 v blokovacím roztoku) a přikryjeme je Parafilmem® M (Sigma, USA). Nádobu uzavřeme víkem, překryjeme alobalem a inkubujeme přes noc při pokojové teplotě.

Druhý den sejmeme parafilm a sklíčka naskládáme do stojánku na mikroskopická sklíčka. Vzorky třikrát promyjeme v roztoku 1xPBS s přídavkem 0,2 % Tween®-20 (Sigma-Aldrich, Francie) po dobu 6 minut. Tween-20 slouží k odstranění zbytků nenavázané protilátky.

Blokování a navázání druhé protilátky

Podložní sklíčka se vzorky vyskládáme do připravené nádoby s vlhkou buničinou a napipetujeme na ně 500 μ l blokovacího roztoku (1xPBS + albumin). Nádobu přikryjeme víkem a necháme inkubovat 30 min při pokojové teplotě. Po uplynutí této doby sklepeme blokovací roztok z podložních sklíček a nahradíme ho 100 μ l 2. protilátky (Anti-Rabbit IgG, fragment Cy3, Sigma-Aldrich, USA, ředění 1:500 v blokovacím roztoku). Každé podložní sklíčko přikryjeme parafilmem a necháme

inkubovat v uzavřené nádobě s vlhkou buničinou po dobu 4 hodin v termostatu při 37°C.

Na závěr sundáme parafilm, opět sklepeme protilátku a stojánek s podložními sklíčky třikrát promyjeme roztokem 1xPBS s přídavkem 0,2 % Tween-20 (6 min) poté ještě vložíme sklíčka do roztoku PBS bez přídavku Tween-20 (10 min) a nakonec necháme sklíčka ve svislé poloze vyschnout při pokojové teplotě (cca 10 min).

Zalévací médium a mikroskopování

Suchá podložní sklíčka se vzorky byla zalita zalévacím médiem Citifluor (AgarScientific, UK) a opatrně přikryta krycím sklíčkem. Takto připravené stonkové segmenty byly mikroskopovány a snímkovány pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu LSM 700 Carl Zeiss.



Obr. 12: Mikroskop LSM 700 Carl Zeiss

4.3 Růstové křivky axilárních pupenů

Metody pěstování

Semena hrachu byla po dobu 24 hodin ponechána v kádince s čistou vodou při pokojové teplotě, aby nabobtnala. Poté byla vyseta do vlhkého perlitu. Zhruba po 5-6 dnech byla semena dostatečně naklíčená a mohla být po odstranění testy přesázena do vlhkým perlitem naplněných kultivačních nádob. Následně byla pěstována v řízených podmínkách klimaboxu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 16/8 hod (den/noc). Intenzita světla byla $150 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a vlhkost 70%.

Stanovení růstových křivek axilárních pupenů

K experimentům byly použity rostliny hrachu, které byly buď intaktní, nebo dekapitované nad 2. pupenem. Na rostliny byla aplikována vodní lanolínová pasta (kontrolní varianta) nebo vodní lanolínová pasta s 0,5% IAA (varianta 0,5% IAA) u intaktních rostlin v prstenci nad druhým resp. třetím pupenem a u dekapitovaných rostlin na řeznou plochu. V určité dny byla měřena délka axilárních pupenů milimetrovým měřítkem.

Z naměřených hodnot nárůstu jednotlivých pupenů v čase byly vytvořeny grafy a statistická vyhodnocení – stanovení směrodatné odchylky a Studentova t-testu byla provedena pomocí programu Excel.

5 VÝSLEDKY

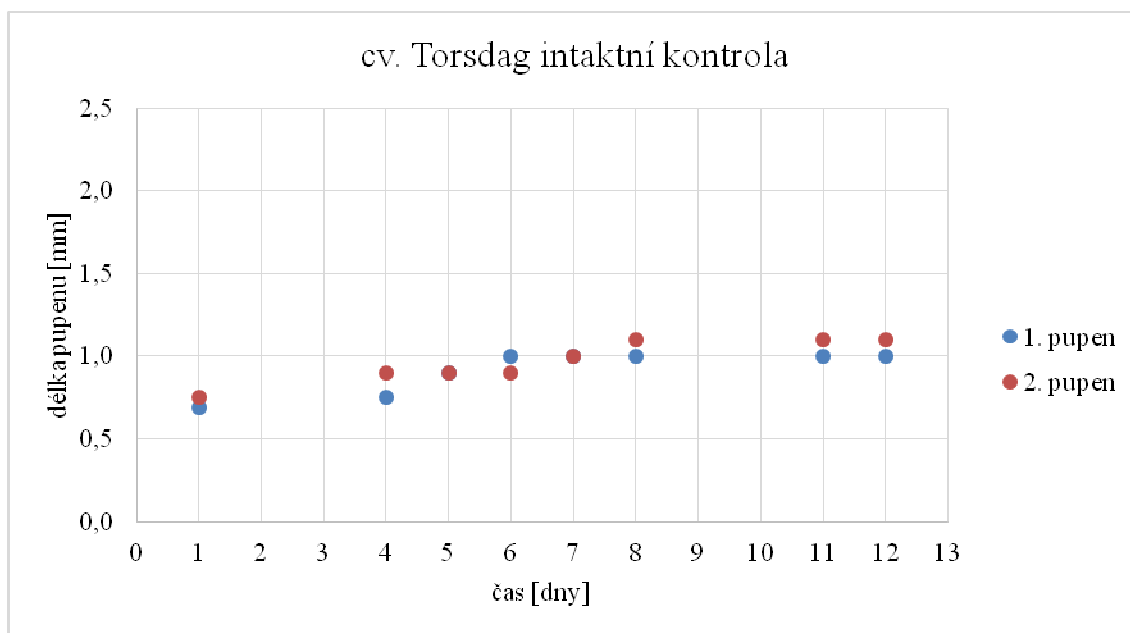
Pro studium role *RMS2* v apikální dominanci je důležitým faktorem interakce signální dráhy strigolaktonu, které se *RMS2* evidentně účastní (DUN et al. 2009b) polárním transportem auxinu (PAT). Pro studium této interakce bylo na základě prvních experimentů zvoleno kromě studia růstových křivek (intaktních a dekapitovaných mutantních rostlin *rms2* a příslušného divokého typu, tedy cv. Torsdag a vliv aplikace auxinu na jednotlivé varianty – viz Kap. 4 Materiál a metodika) také imunolokalizace PIN1 pro sledování změn v polárním transportu auxinů. Byl použit modelový systém podle SACHSE (1981), který byl využit v práci BALLA et al., (2011) pro sledování vzniku PIN1 kanálů umožňujících kanalizaci auxinu po jeho exogenní aplikaci na různé části rostlin mutantů *rms2* a cv Torsdag. Imunolokalizace PIN1 tedy nahradila původně plánované studium exprese genů, neboť je vhodnějším nástrojem pro studium přímého vlivu mutace *rms2* na změny PAT, neboť na základě prvního experimentu byla stanovena nová hypotéza, na základě které byla snaha prokázat, že *RMS2* nezpůsobuje přímý zpětnovazební signál regulující expresi *RMS1*, ale že působí ovlivněním polárního transportu auxinu.

Vzhledem k tomu, že směrodatné odchylky výsledků růstové aktivity byly značné a splývaly, tak jejich zobrazení v jednotlivých grafech nemělo vypovídací schopnost a není proto v grafech použito. Jednotlivé směrodatné odchylky jsou proto uvedeny v Tabulkách v Příloze 1. Velké rozdíly v reakci jednotlivých rostlin a nízký počet opakování jednotlivých variant jsou zdůvodněny a diskutovány v kapitole 6 Diskuse.

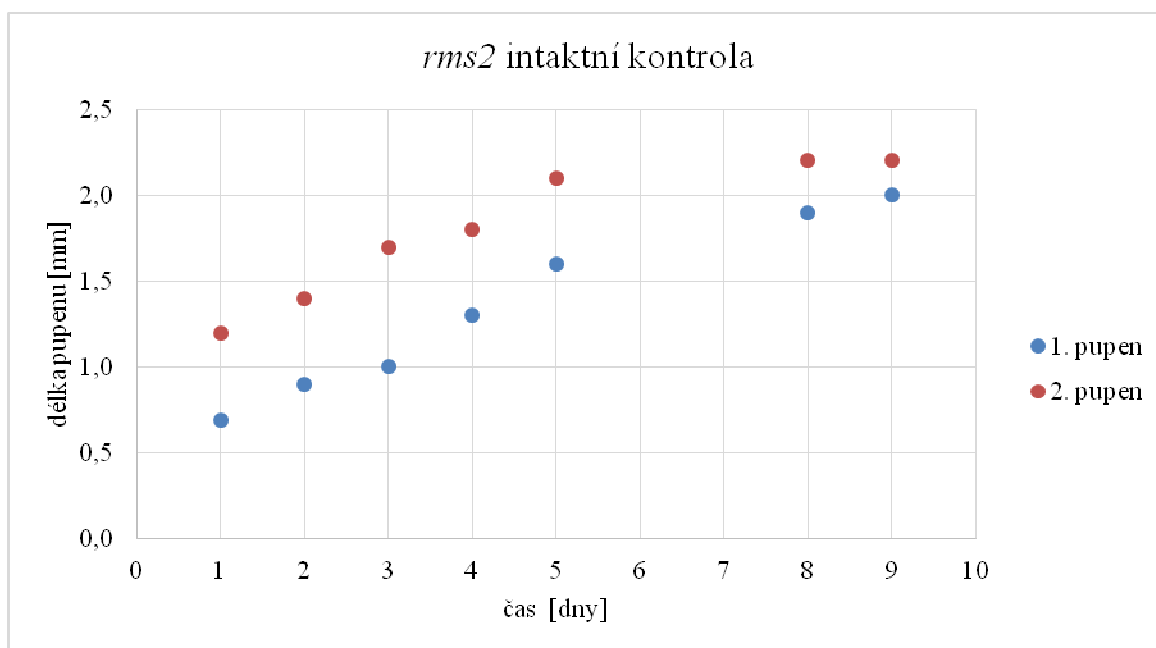
5.1 Růstové křivky

Při studiu role genů pomocí pozorování fenotypových reakcí na rostlinách s nefunkčním genem je základním srovnáním fenotypové chování s původním divokým typem, v našem případě je *rms2* mutant na pozadí kultivaru Torsdag. Byly stanoveny růstové křivky cv. Torsdag, na které byla aplikována jako kontrolní varianta čistá vodní lanolinová pasta anebo varianta 0,5 % IAA (ve vodní lanolinové pastě). Při měření

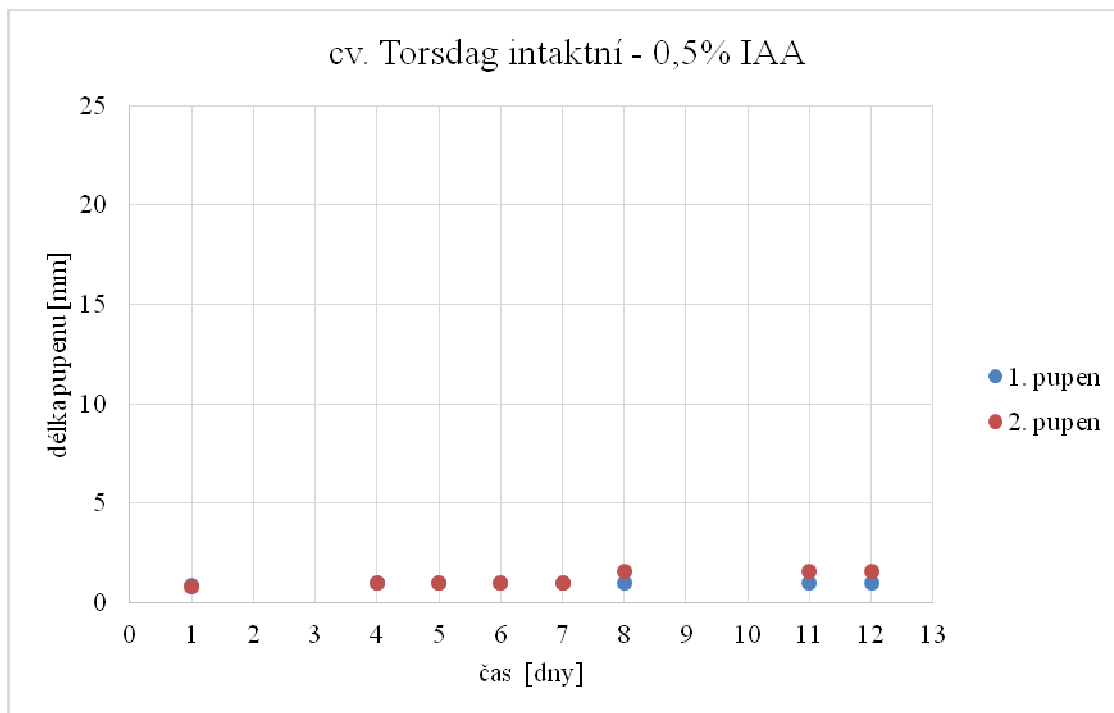
prvního a druhého pupenu u kontrolních intaktních rostlin hrachu cv. Torsdag byly pozorovány pouze minimální až nulové rozdíly v přírůstku. Délka pupenů dosahovala maximálně 1,1 mm (Graf 1). Intaktní kontrolní rostliny mutantů *rms2* vykazovaly na rozdíl od cv. Torsdag stálý, i když malý přírůstek pupenů (Graf 2). Oba pupeny narostly přibližně o 1 mm za týden, pouze jejich výchozí velikost byla rozdílná (0,7 mm - první pupen, 1,2 mm - druhý pupen).



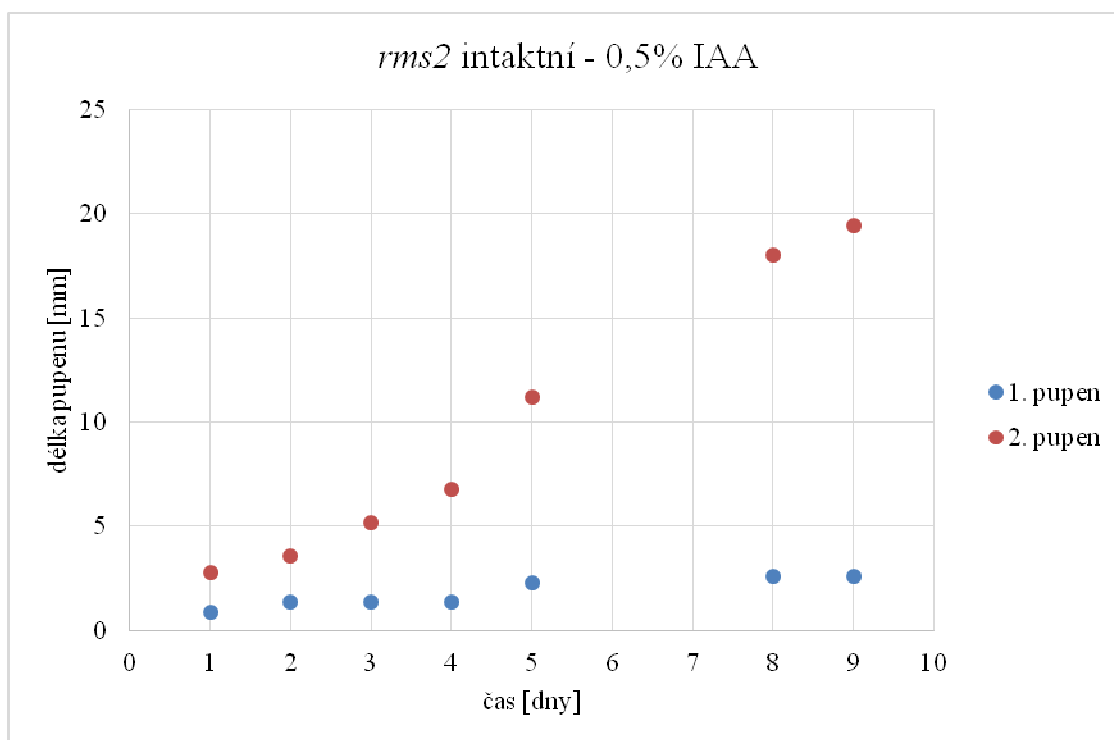
Graf 1: Růstové křivky 1. a 2. pupenu kontrolních intaktních rostlin cv. Torsdag



Graf 2: Růstové křivky 1. a 2. pupene kontrolních intaktních rostlin mutantů *rms2*



Graf 3: Růstové křivky prvního a druhého pupene intaktních rostlin cv. Torsdag s aplikací 0,5% IAA na stonek nad druhým pupenem



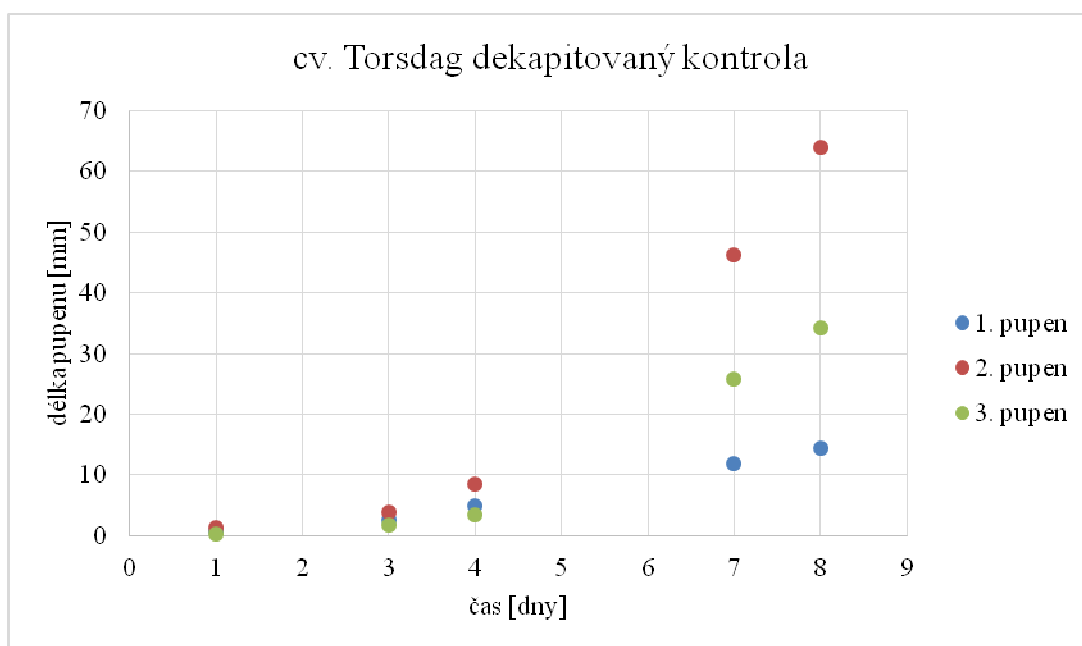
Graf 4: Růstové křivky prvního a druhého pupene intaktních rostlin mutantů *rms2* s aplikací 0,5% IAA na stonek nad druhým pupenem

Srovnání intaktních rostlin odrůdy Torsdag po aplikaci 0,5% IAA s kontrolní variantou neukázalo prakticky žádné rozdíly (Graf 3). Nepatrný nárůst se projevoval u druhého pupenu šestý až osmý den po aplikaci.

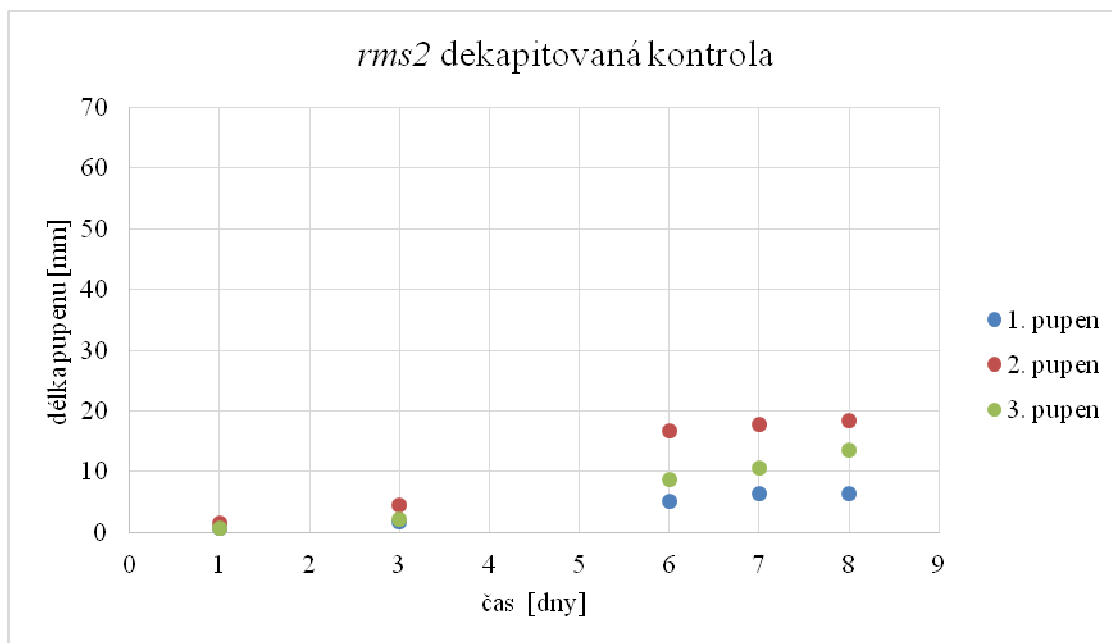
U kontrolních dekapitovaných *rms2* mutantů došlo také k růstu pupenů, s tím že oproti divokému typu je tento nárůst u druhého pupenu pouze ca. třetinový a u prvního a třetího pupenu je ca. poloviční. Po aplikaci 0,5% IAA na stonek nad druhým pupenem intaktních rostlin *rms2* došlo u části rostlin k intenzivnímu růstu výhonů z druhého pupenu. U některých rostlin došlo pouze ke zdvojnásobení délky pupenu oproti kontrolní variantě (na 4 mm) a některé zůstaly zcela inhibované (Příloha 1). První pupen stejně jako u kontrolní varianty nerostl (Graf 4).

U kontrolní varianty dekapitovaného divokého typu cv. Torsdag dle očekávání došlo k intenzivnímu růstu druhého pupenu a přibližně poloviční rychlostí rostl i třetí pupen a také u prvního pupenu byl pozorován nárůst (Graf 5). U kontrolních dekapitovaných *rms2* mutantů došlo také k růstu pupenů, s tím že oproti divokému typu je tento nárůst u druhého pupenu pouze ca. třetinový a u prvního a třetího pupenu je ca. Poloviční (Graf 6).

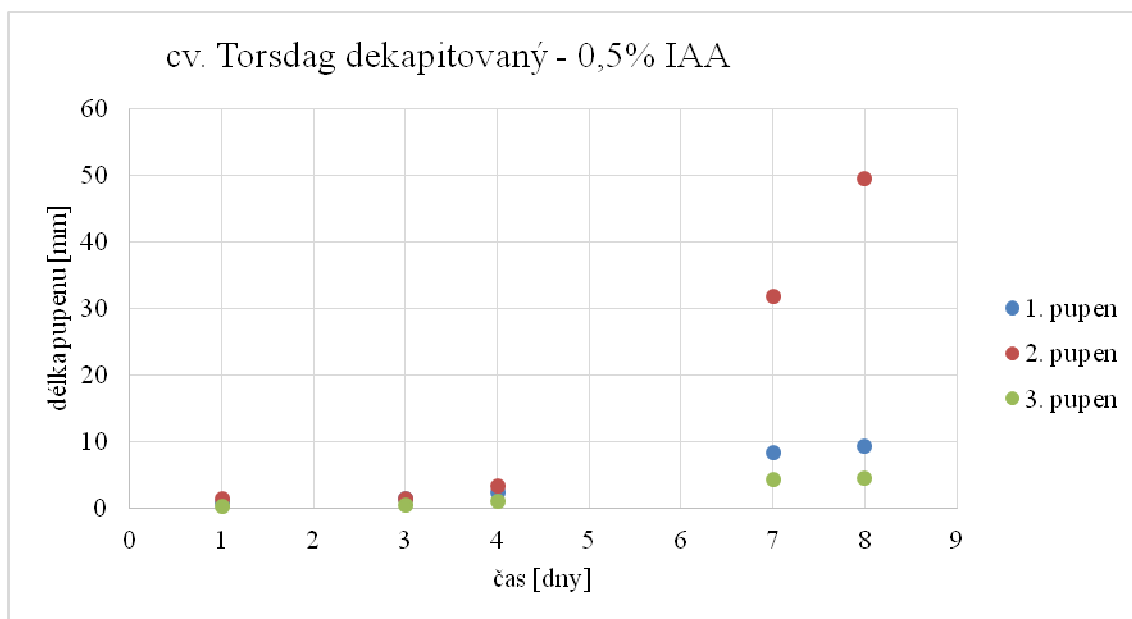
Rostliny hrachu odrůdy Torsdag po dekapitaci a aplikaci 0,5% IAA vykazovaly výrazný nárůst délky u druhého pupenu (až 50 mm), který je stejně jako u prvního pupenu jen nepatrně menší než u kontroly. Aplikace IAA na dekapitovaný stonek ale potlačila růst třetího pupenu, který je nejbližší místu aplikace IAA, na minimum (Graf 7). Na rozdíl od rostlin divokého typu u dekapitovaných rostlin mutantu hrachu *rms2* po aplikaci 0,5% IAA dosahoval největších naměřených hodnot právě třetí pupen, který je nejbližší aplikaci IAA (až 19,4 mm). Naopak druhý a první pupen byl oproti kontrolní variantě silně zainhibován (Graf 8).



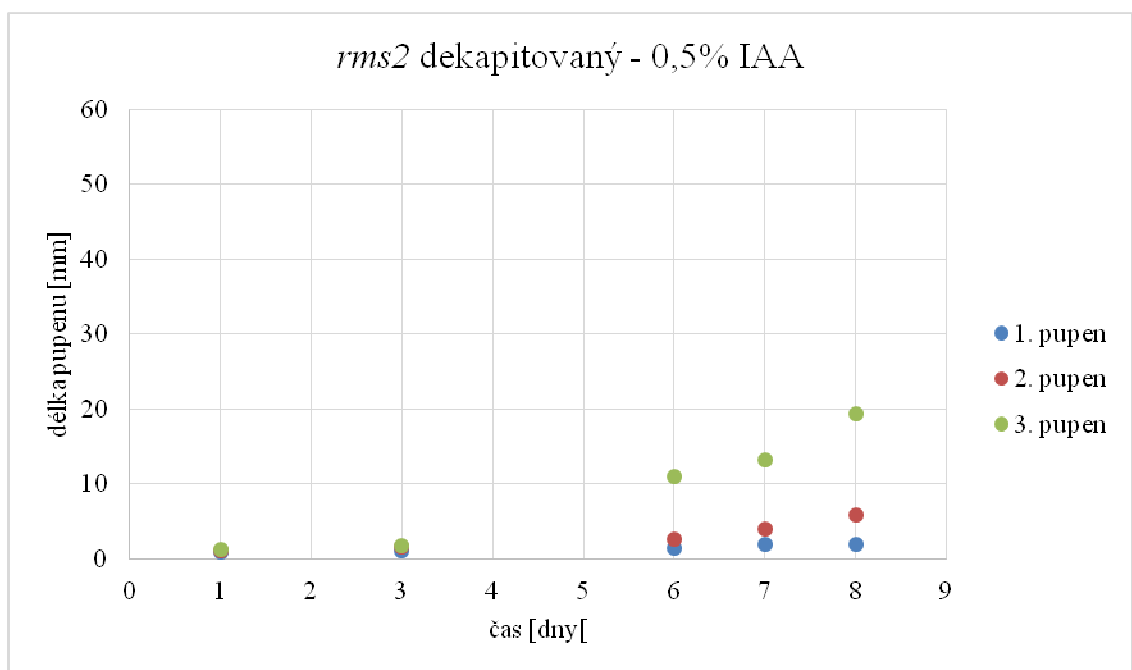
Graf 5: Růstové křivky prvního, druhého a třetího pupenu kontrolních dekapitovaných rostlin cv. Torsdag



Graf 6: Růstové křivky prvního, druhého a třetího pupenu kontrolních dekapitovaných rms2 rostlin



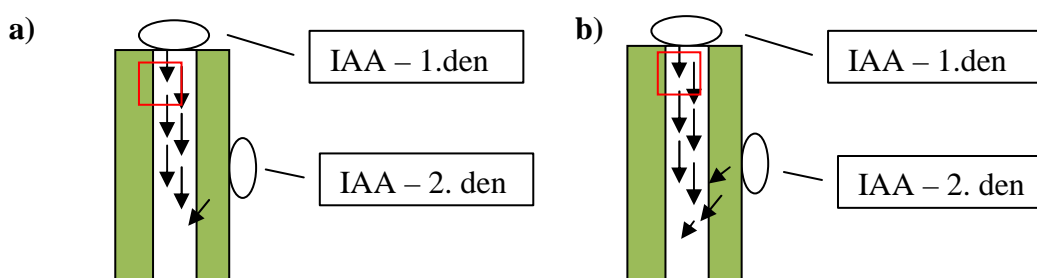
Graf 7: Růstové křivky prvního, druhého a třetího pupenu dekapitovaných rostlin cv. Torsdag s aplikací 0,5% IAA na stonek nad třetí pupenem



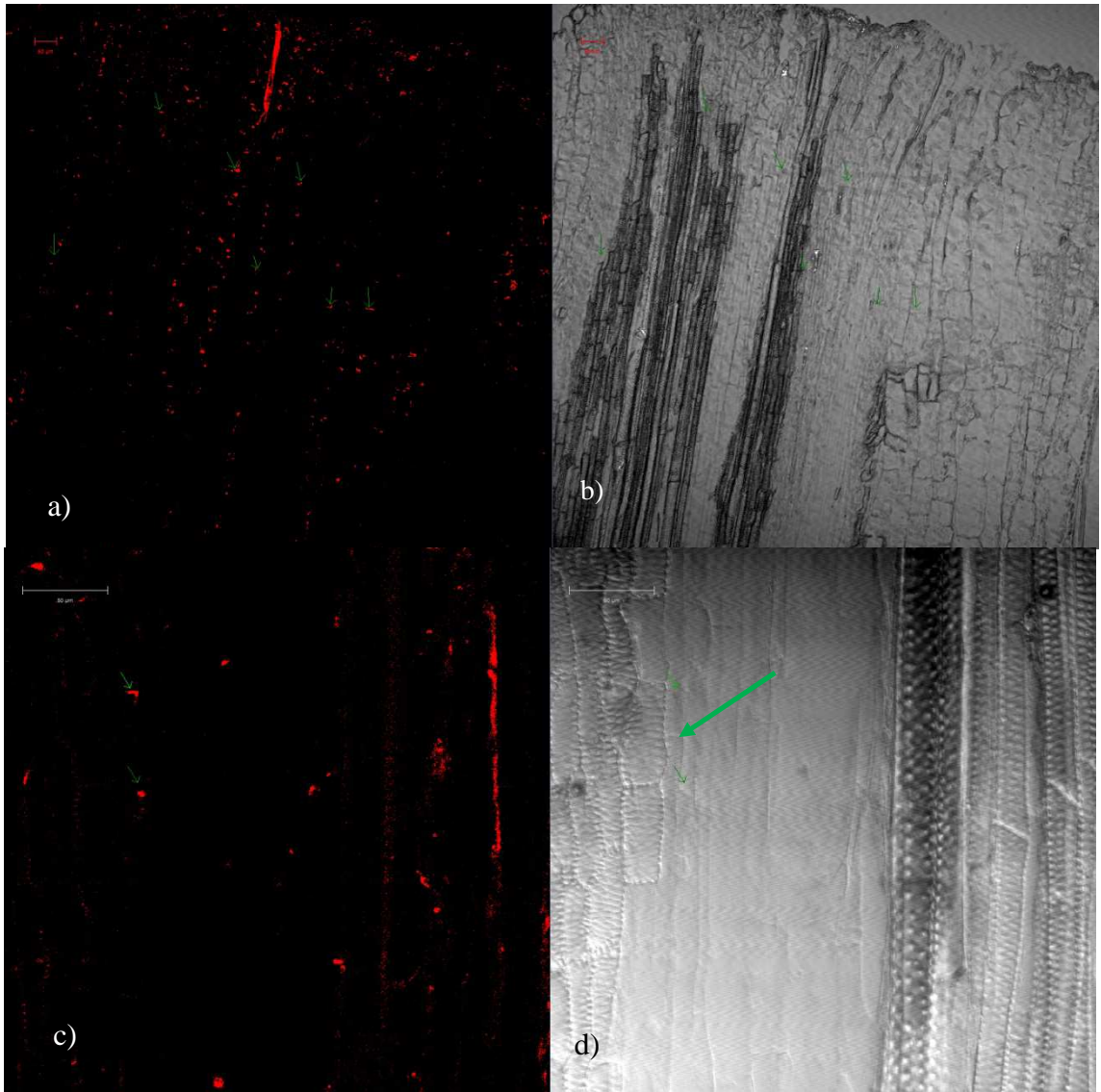
Graf 8: Růstové křivky prvního, druhého a třetího pupenu dekapitovaných rostlin *rms2* s aplikací 0,5% IAA na stonek nad třetím pupenem

5.2 Imunolokalizace PIN1 proteinů

Experimentální systém, který byl využit, byl publikován SACHSEM (1981) a spočíval v pozorování tvorby vaskulárních spojení po exogenní aplikaci IAA, která simuluje například tvorbu nového orgánu. Zatímco SACHS (1981) pozoroval mikroskopicky tvorbu nového xylému, BALLA et al. (2011) pozorovali pomocí imunolokalizace PIN1 tvorbu auxinových kanálů, které předcházejí tvorbě xylému, který vzniká v sousedství těchto kanálů. Pokud je jako modelový systém použit dekapitovaný stonkový pahýl, je možné porovnávat vznik xylému, respektive auxinových kanálů z primárního a sekundárního zdroje tak, že nanášíme ve dvou termínech auxin, nejprve apikálně na řeznou plochu a poté laterálně na stonek, anebo naopak z boku na stonek a poté na řeznou plochu. Pod řeznou plochou, respektive pod místem boční aplikace potom můžeme studovat pomocí imunolokalizace PIN1 a konfokální skenovací laserové mikroskopie vznik auxinových kanálů respektive jejich napojení na stávající transportní systém auxinu ve stonku. Všechna mikroskopická pozorování byla prováděna 5 dní po první aplikaci auxinu, kdy jsou již viditelné ustavené auxinové kanály a podél nich souvislé nebo nesouvislé řetězce xylémových elementů (BALLA et al. 2011).

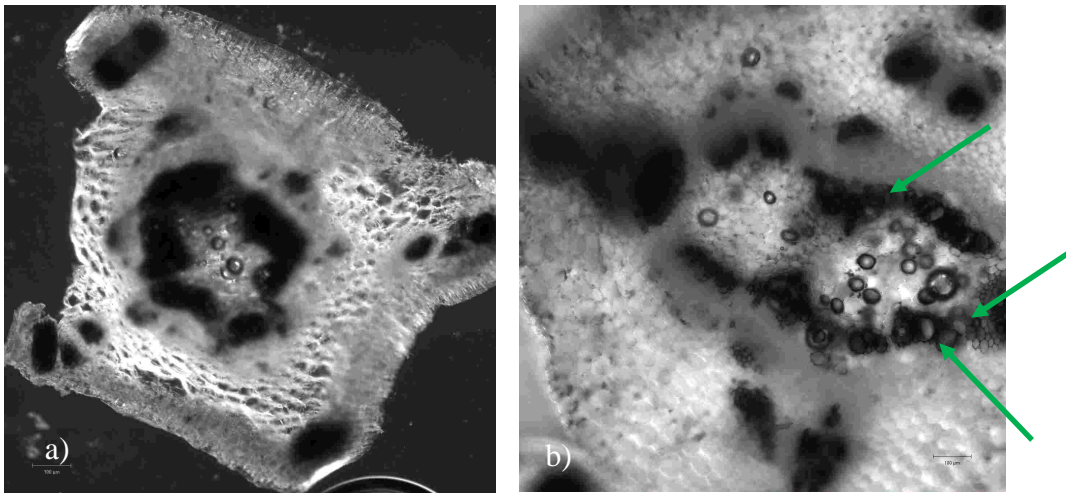


Obr. 13: Schématické znázornění varianty 1 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)

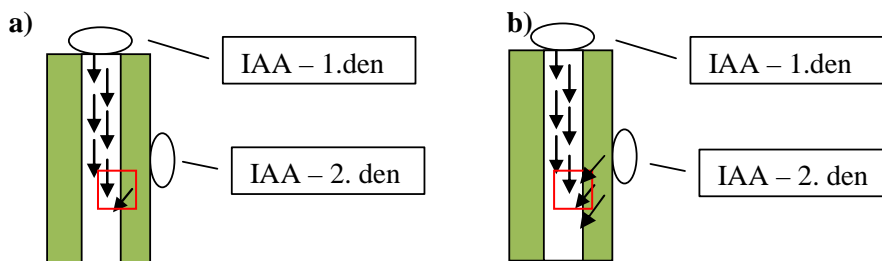


Obr. 14: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 1 a) *rms2* a c) cv. *Torsdag*, světelný snímek b) *RMS2* a d) cv. *Torsdag* (úsečka 50 μm , zelená šipka – nově vzniklé xylémové elementy)

Pokud nanese primárně po dekapitaci auxin na řeznou plochu, dochází jak u divokého typu cv. *Torsdag*, tak u mutantů *rms2* k intenzivní kanalizaci a vytváření xylému. U *rms2* dochází k tvorbě četných, ale ztenčených xylémových svazků (obr. 14b), které jsou na vnější straně obklopeny auxinovým kanálem (obr. 14a). U cv. *Torsdag* jsou xylémové svazky tvořeny menším počtem xylémových buněk, které mají podstatně větší průměr (obr. 15b). Navíc u cv. *Torsdag* nově vytvořené nenavazující xylémové elementy (zelená šipka) se nejeví jako efektivně propojené xylémové svazky (obr. 14d).

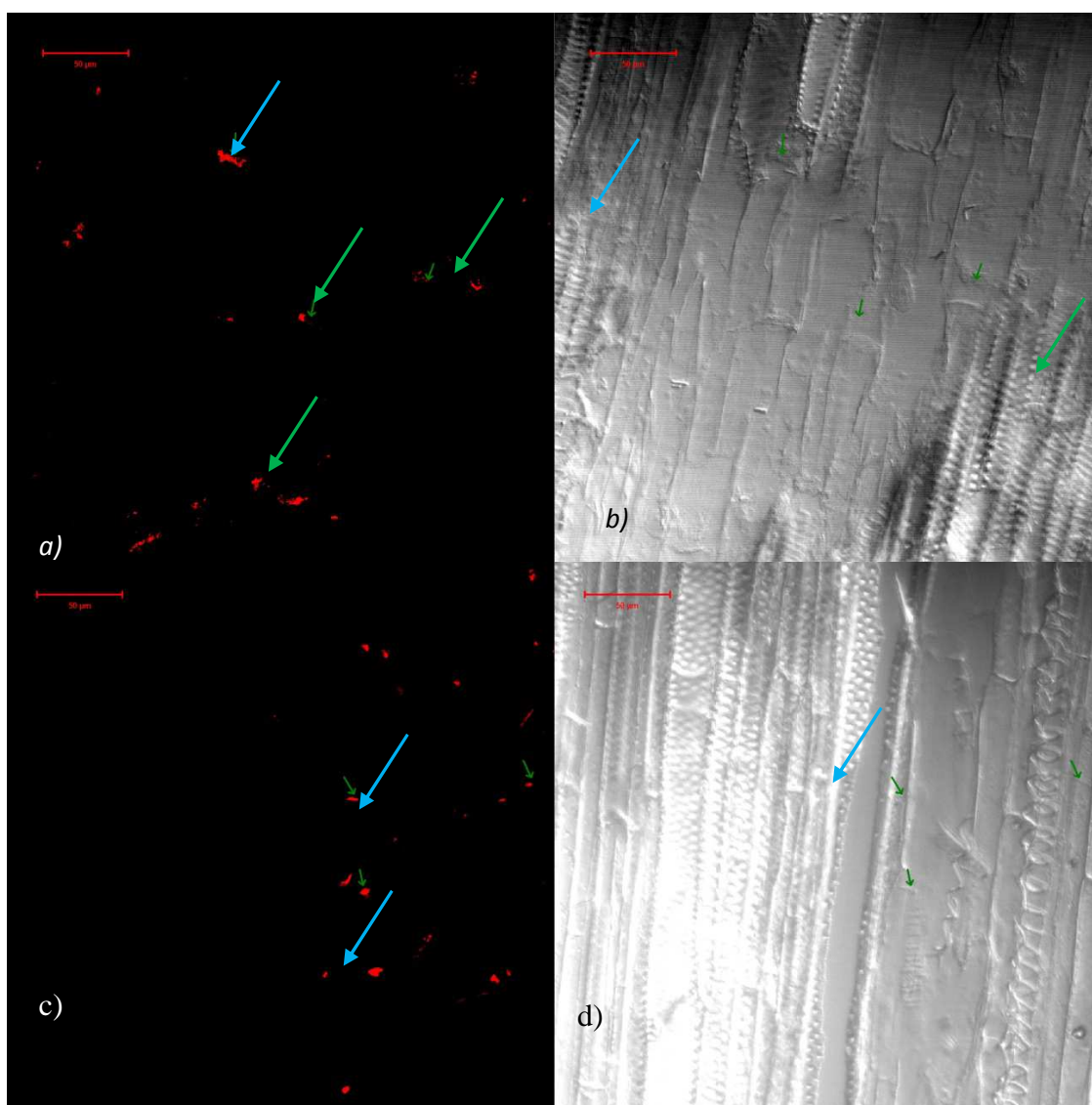


Obr. 15: Příčný řez stonkem hrachu barvený floroglucinem a) *rms2* b) cv. *Torsdag*, zelenou šipkou označené příklady xylémových buněk velkého průměru

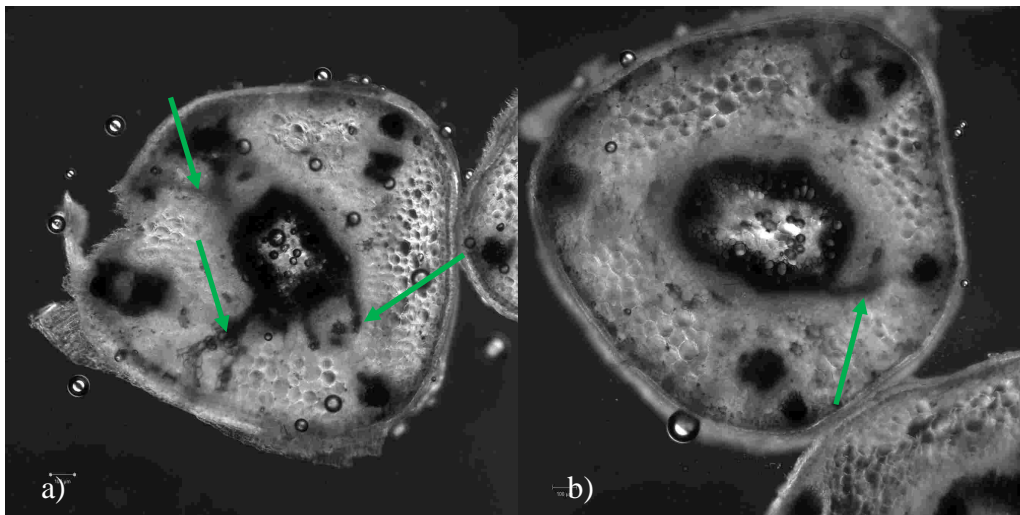


Obr. 16: Schématické znázornění varianty 2 – a) cv. Torsdag, b) *rms2* (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)

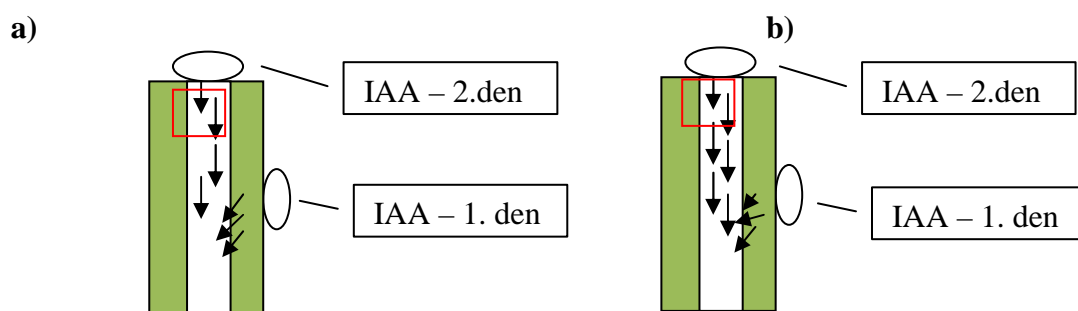
Pokud jde o kontrolní divoký typ cv. Torsdag, tak v případě boční aplikace až 24 hodin po aplikaci apikálního auxinu nedochází ke kanalizaci auxinu ze sekundárního zdroje (Obr. 17c). Naopak u mutantních rostlin *rms2* dochází k intenzitní kanalizaci a opět zřejmě k vzniku zmnožených funkčních xylémových svazků (Obr. 17a,c). Na příčných řezech stonku intaktních rostlin v místě kde byla aplikována pasta s 0,5% IAA vidíme, že u mutantních rostlin *rms2* dochází na více místech k tvorbě úplných kanálů (Obr. 18a), zatímco u divokého typu je pouze náznak ne úplně vytvořeného napojení (Obr. 18b) a šipky označují vytvářející se xylémové svazky.



Obr. 17: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 2 - a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek
 b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μ m, zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a
 xylémové elementy, modré šipky – původní stonkový systém PIN1 a xylémových svazků)



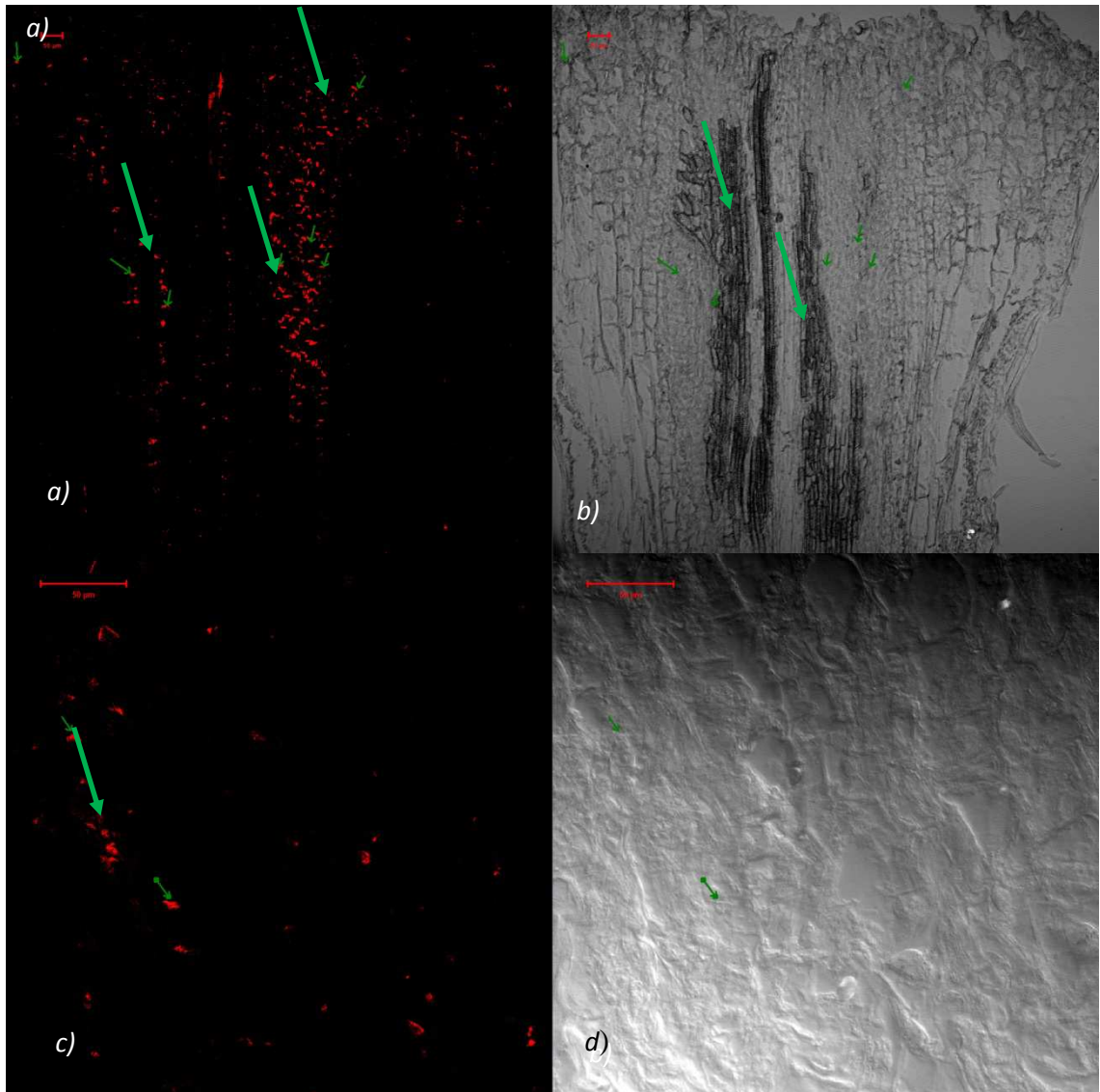
Obr 18: Příčný řez stonkem hrachu po ošetření 0,5 % IAA barvený floroglucinem
 a) rms2 a b) Torsdag, (zelenou šipkou označené tvořící se xylémové kanály)



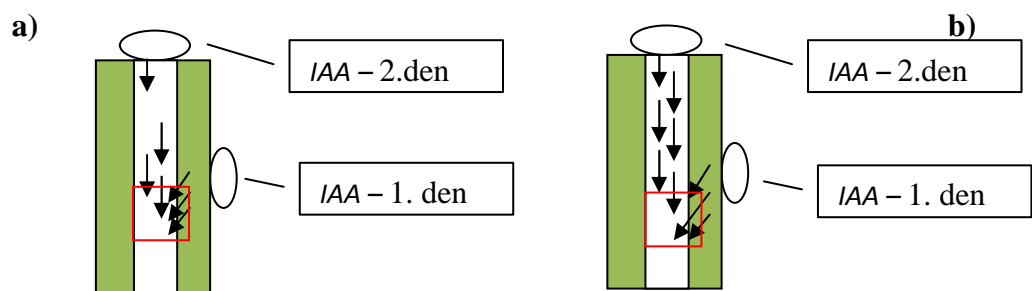
Obr. 19: Schématické znázornění varianty 3 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec
 označuje přibližně místo snímku)

V případě sekundární aplikace auxinu na řeznou plochu u kultivaru Torsdag (Obr. 19a), můžeme pozorovat, že sice dojde k jeho částečné kanalizaci (Obr. 20c), avšak

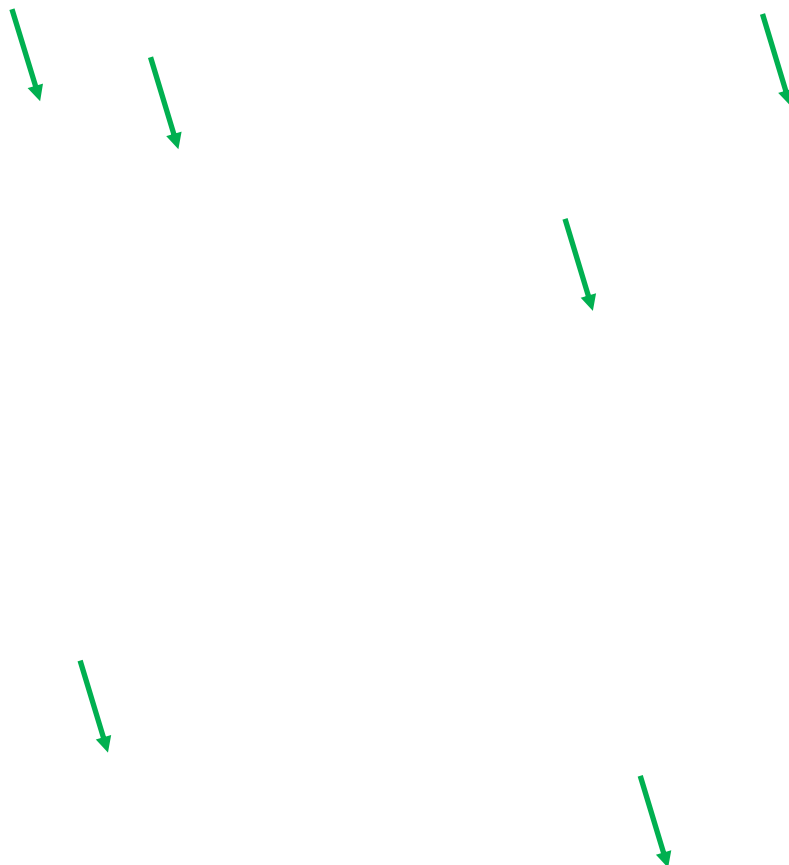
průvodním jevem není vznik xylému (Obr. 20d). S touto situací ostře kontrastuje vznik četných auxinových kanálů (Obr. 20a) a početných xylémových svazků u mutantů *rms2* (Obr. 20b) bez ohledu na to, zda šlo o primární nebo sekundární aplikaci auxinu.



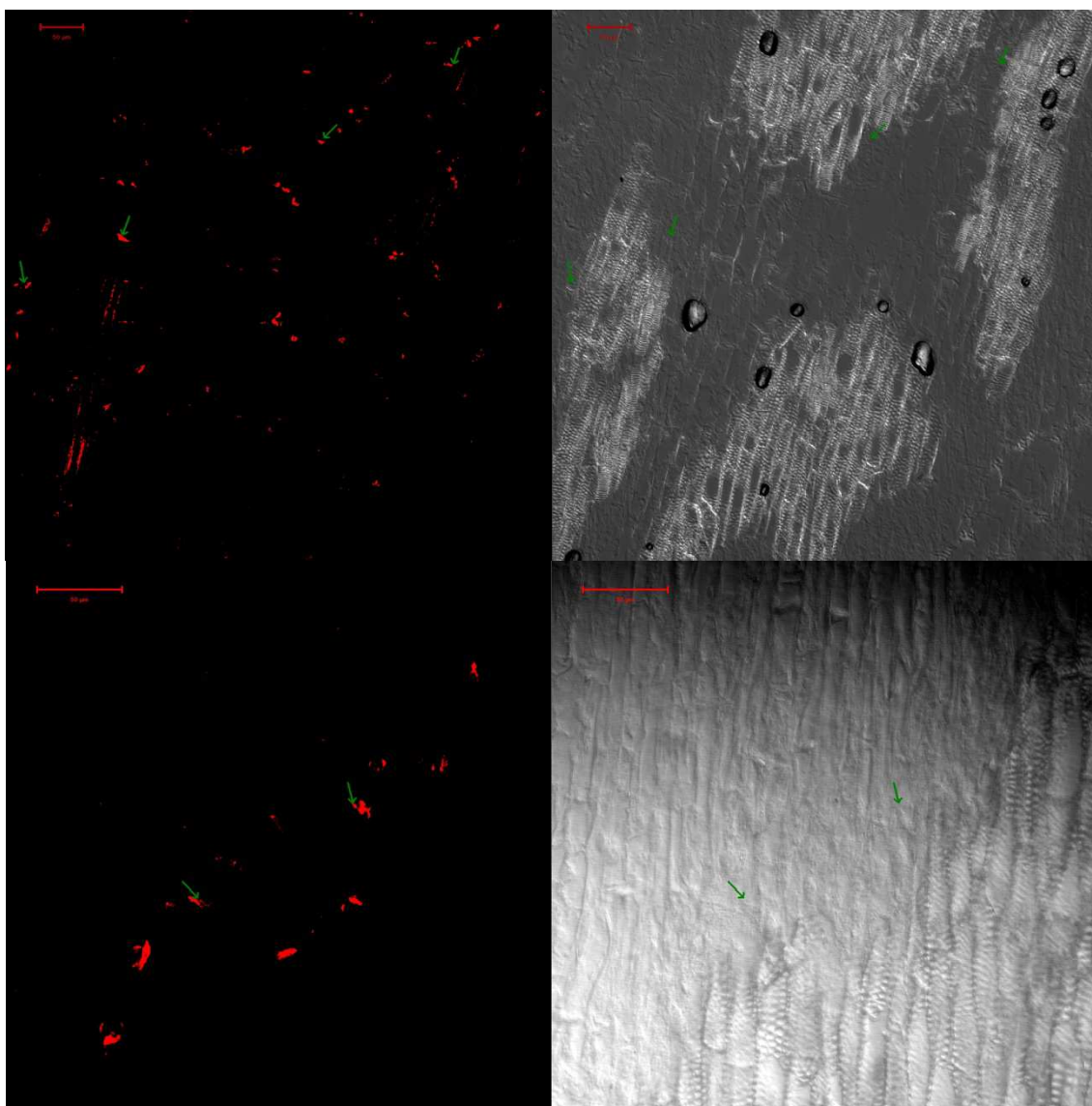
Obr. 20: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 3 - a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μm , zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a xylémové elementy)



Obr. 21: Schématické znázornění Varianty 4 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)



d)



Obr. 22: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 4 - a) *rms2* a c) cv. *Torsdag*, světelný snímek b) *RMS2* a d) cv. *Torsdag* (úsečka 50 μm , zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a xylém)

Pokud je auxin nanesen primárně na stonek z boku (Obr. 21), můžeme u cv. *Torsdag* pozorovat vytvořený auxinový kanál (Obr. 22c), podél nějž bylo vytvořeno mnoho xylémových elementů (Obr. 22d). Situace v případě mutantních rostlin *rms2* je podobná, ale pouze se netvoří jediný hlavní kanál (Obr. 22a), odvádějící IAA z místa aplikace.

6 DISKUSE

Studium role RMS2 je významnou součástí pochopení regulačního mechanismu vyrůstání pupenů vlivem strigolaktonů a s nimi úzce souvisejícího transportu auxinů. Toto studium je ale znesnadněno skutečností, že genom hrachu, jehož sekvenování bude zřejmě v nejbližší době ukončeno, zatím není známý, což neumožňuje použití qPCR pro charakterizaci mutantních rostlin *rms2*. Toto měření transkripční aktivity mutantních rostlin je zejména důležité, protože tento mutant údajně nemá nulovou expresi (Foo *et al.*, 2005). Tato hypotéza však také nevyplývá ze skutečného měření transkripční aktivity, ale je spekulací vycházející z fenotypové analýzy dvojitých mutantů *rms1-1 rms2-2*, jejichž fenotyp je aditivní, což může znamenat buď, že oba geny kontrolují různé signály, nebo pokud by oba působily ve stejné dráze a mutace by nebyly nulové, tak by taktéž vznikl aditivní fenotyp (BEVERIDGE *et al.* 1997b). Není tedy možné zjistit homogenitu mutantní populace. Semena tohoto mutantu navíc byla postupně získána z různých zdrojů (C. Beveridge, Austrálie a C. Turnbull, Velká Británie). Semena pro jednotlivé experimenty byla získána přemnožením původního osiva, které bylo dodáno jen v omezeném množství. Na rozdíl od semen původně dodaných je homogenita vlastností vyrostlých rostlin ze semen méně vyrovnaná, dochází tedy pravděpodobně ke štěpení. Navíc při přemnožení narůstají rostliny s menším počtem nodů a jednotlivé lusky obsahují často jenom jedno nebo dvě životaschopná semena. Z uvedených důvodů bylo při jednotlivých experimentech použito pouze omezené množství rostlin a na nich se projevovala velká nehomogenita růstu, způsobená pravděpodobně různými hladinami exprese RMS2.

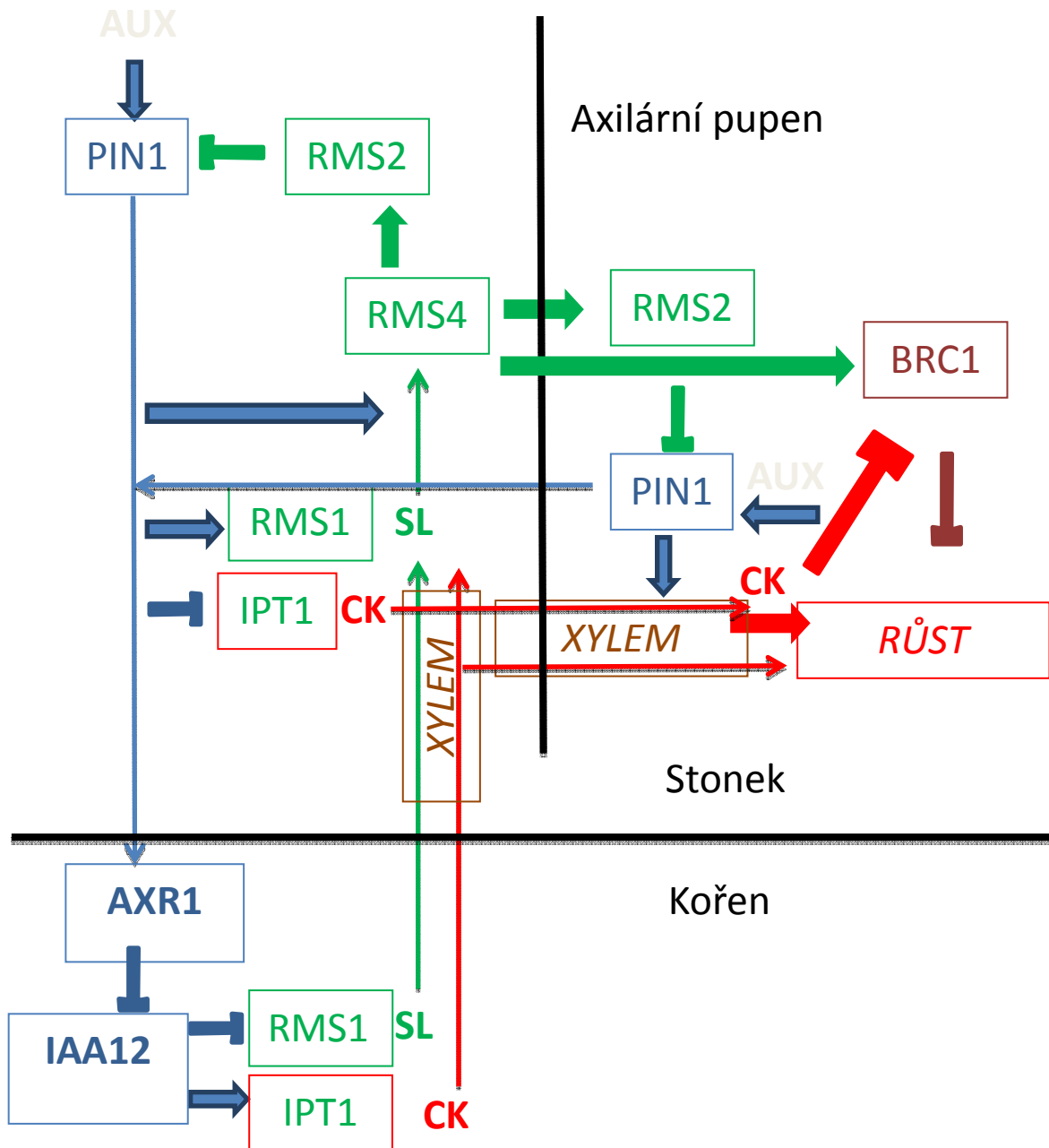
Když jsme při prvním experimentu s aplikací IAA na intaktní rostliny *rms2* zjistili, že místo inhibice větvení tato aplikace větvení podpořila, nevěděli jsme z počátku jak tuto skutečnost interpretovat. Po důkladném rozboru možných interakcí, různých pokusech o modifikaci schéma regulace pupenů (BEVERIDGE *et al.* 2009) a z přehledu doposud známých experimentálně podložených údajů o projevech jednotlivých RMS genů (DUN *et al.* 2009b), jsme postupně došli k závěru, že RMS2 by mohl být negativním regulátorem intenzity polárního transportu auxinů. Vzhledem k již výše uvedeným rozdílům mezi jednotlivými rostlinami bychom pravděpodobně tuto

myšlenku opustili, ale přišlo nečekané potvrzení naší hypotézy. Cathrine Rameau publikovala na workshopu projekt COST příspěvek, ve kterém uvedla, že gen *PsRMS2* je homologní s *AtAFB4* u huseníčku (I. Smýkalová, osobní sdělení). Funkce tohoto genu byla popsána v několika nedávných publikacích a byla definována jako negativní regulátor auxin odpovědi (GREENHAM et al. 2015). BASTER et al. (2013) při studiu gravitropní odezvy kořenů huseníčku popsali jako jeden z mechanismů odstranění přebytků PIN proteinů z buněčné membrány a jejich následné odbourání nasměrováním do lytické vakuoly vazbou do AFB4 F-box proteinového komplexu. Naše výsledky odpovídaly tomuto zjištění a právě v době finalizace diplomové práce došlo k další neočekávané informaci, že autoři GREENHAM et al. (2015) svoji práci stáhli, neboť získali rostliny s jinou mutantní alelou AFB4, které nebyly hypersenzitivní vůči auxinu. Z toho pro naši práci vyplývá, že právě míra potlačení exprese *rms2* (*afb4*) je rozhodující pro reakci vůči auxinu a tedy k projevům, které jsme u některých rostlin pozorovali. Další důležitým zjištěním týkajícím se role AFB4 je, že řízení přítomnosti PIN proteinů na membráně je regulováno na více úrovních, jednak regulací clathrinem zprostředkované internalizace, ale také pomocí směrování PIN proteinů do vakuoly a jejich degradace (BASTER et al. 2013). Tato regulace je podle BASTER et al. (2013) zprostředkovaná auxinem a z našich výsledků vyplývá, že také strigolaktonem. Po zveřejnění sekvence *PsRMS2* respektive po jejím stanovení pomocí degenerovaných primerů (na základě *AtAFB4* a jeho homologů u dalších rostlin) bude možné studovat jejich expresní profily. Tyto experimenty už nebylo možné zvládnout v rámci této diplomové práce, neboť stanovení sekvence *PsRMS2* pro použití v RT-PCR, je časově a finančně náročné.

Ze získaných výsledků, porovnáním růstových křivek divokého typu cv. Torsdag s příslušnými variantami s *rms2* mutantními rostlinami je zřejmé, že aplikace auxinu na tyto mutantní rostliny podporuje růst nejbližší k místu aplikace položeného pupenu. Obdobně v případě sekundární aplikace auxinu 24 hodin po primární aplikaci, kdy divoké rostliny cv. Torsdag ani cv. Vladan (BALLA et al. 2011) nekanalizují auxin ze sekundárního zdroje. Respektive u cv. Torsdag došlo ke kanalizaci, podél auxinového kanálu se ale nevytvořily xylémové elementy. Na rozdíl od experimentu s divokým typem mutantní rostliny *rms2* intenzivně kanalizují auxin z obou zdrojů. Z této fyziologické odpovědi a z dvou předpokladů – a) z hypotézy kompetitivní inhibice

laterálních pupenů (BALLA et al. 2011) a b) ze skutečnosti, že PIN1 je auxinem indukovatelný gen (VIETEN et al. 2005), vyplynulo nakonec jediné možné vysvětlení že *RMS2* je negativním regulátorem právě polárního transportu auxinu zprostředkovaného PIN1 proteinem. Pokud tedy na rostlinu aplikujeme poměrně vysokou koncentraci exogenního auxinu a není-li funkční negativní regulátor, dochází k velkému nárůstu transportní kapacity, která auxinem není saturována, a tedy z hlediska kompetitivní inhibice nebrání růstu laterálních pupenů. Jak bylo již z dřívějších prací známo, *rms2* mutantní rostliny mají silně zmnožené xylémové elementy (DODD et al. 2008) což může být způsobeno právě zmnožením auxinových kanálů, které nejsou negativním regulátorem omezeny na nejnutnější počet. SHINOHARA et al. (2013) tuto skutečnost popisují hypotézou, že transport auxinu je nezbytný pro iniciaci růstu pupenů a že strigolakton znesnadňuje tuto kanalizaci omezením jejich tvorby. Jak je zřejmé z výsledků získaných imunolokalizací PIN1 proteinu vidíme jednak již v literatuře popsané zmnožení xylémových elementů, které ale jsou většinou jenom na vnější hranici tohoto svazku provázeny auxinovým kanálem. Toto postupné omezení auxinových kanálů delší dobu po aplikaci (5 dnů) odpovídá také dříve v literatuře popsané architektuře rostlin *rms2* (DODD et al. 2008). Je totiž známo, že *rms2* rostliny větví z prvního a druhého pupenu a znovu začínají větvit až ze šestého a vyšších pupenů. Tak jak je známo z biosyntézy auxinu, který vzhledem k jeho důležitosti pro vývoj rostliny probíhá až čtyřmi různými biosyntetickými dráhami (BARTEL 1997), je zřejmé regulace intenzity transportu auxinů možných více mechanismů, které se u mutantních rostlin začnou v průběhu vývoje postupně aktivovat, takže počáteční výrazný větvící fenotyp u dalších nodů se již neprojevuje a uplatní se teprve v další fázi vývoje zeslábnutím primárního zdroje auxinu. Obdobně po aplikaci exogenního auxinu zmnožené auxinové kanály jsou sice dokumentovány zmnožením xylémových svazků, které v jejich sousedství vznikají, ale auxin je postupně kanalizován do malého počtu kanálů (Obr. 14a,b). Z výsledků této práce a z literárních údajů o *rms2* mutantech (DODD et al. 2008) včetně doposud oficiálně nepublikovaného výsledku C Rameau jasně ukazují na to, že *RMS2* je ekvivalentem *AFB4* u huseníčku a je tedy odpovědný za směřování PIN proteinů do lytické vakuoly (BASTER et al. 2013) Účastní se tak modulace transportní kapacity polárního transportu auxinů v rostlinách jak předpokládá SHINOHARA et al. (2013). Jednoznačný důkaz pro tuto skutečnost, který by mimo jiné

vyžadoval stanovení míry exprese *RMS2* v mutantních rostlinách a další sledování expresních profilů v souvislosti s fenotypovými projevy je nezbytné po zjištění sekvence tohoto genu provést v další práci.



Obr. 23: Navrhované schéma role *RMS2* v regulaci růstu axilárních pupenů

Schéma vychází z předcházejících návrhů regulace růstu pupenů u hrachu a huseníčku. Z regulačního schéma u huseníčku vychází schéma regulace *RMS1* a *IPT1* auxinem ve stonku, kdy signál je zprostředkován geny *AXR1* a *IAA12*. U rostlin divokého typu tedy vysoká hladina auxinu stimuluje produkci strigolaktonu a inhibuje produkci cytokininu, což zesiluje v důsledku apikální dominanci. Receptor strigolaktonu *RMS4*, který je jednak stimulatorem exprese *BRC1*, který působí inhibičně na růst pupenů, je také stimulatorem exprese studovaného *RMS2*, který zpětnovazebně negativně ovlivňuje množství PIN1 na membráně. Tato zpětnovazebná smyčka tedy moduluje intenzitu transportu auxinu, takže je systém v rovnováze.

7 ZÁVĚR

Z literárních údajů a měření růstových křivek intaktních a dekapitovaných rostlin hrachu s mutantní alelou *rms2* je možné i přes velkou variabilitu výsledků způsobenou pravděpodobně v důsledku neznámé zbytkové transkripční aktivity genu *RMS2* vyvodit následující závěry:

Vlivem aplikace auxinu jak na intaktní tak na dekapitované *rms2* mutantní rostliny dochází k zesílení růstu pupenů nejbližší místu aplikace auxinu na rozdíl do divokého typu, u kterého aplikace růst nejbližších pupenů inhibuje.

Imunolokalizací PIN1 proteinů v dekapitovaném stonku mutantních rostlin *rms2* a divokého typu cv. Torsdag u primárního ošetření je možné pozorovat u *rms2* rostlin obdobně jako již bylo popsáno v literatuře zmnožení a ztenčení jednotlivých xylémových buněk. V případě sekundární aplikace 24 hodin po primární, auxin nanesený na řeznou plochu nebo z boku u divokého typu není kanalizován a u *rms2* mutantních rostlin naopak dochází k intenzivní kanalizaci.

Na základě těchto zjištěných skutečností a známého faktu, že exprese a stabilizace PIN1 na membráně je autoindukována auxinem a zároveň je známo, že auxin indukuje expresi *RMS1*, bylo původně navržené zpětnovazebné přímé působení *RMS2* na expresi *RMS1* změněno v námi navrhované schéma regulace iniciace růstu pupenů na působení *RMS2* jako negativního regulátoru polárního transportu auxinu, jehož důsledkem je právě pozorovaná negativní regulace exprese *RMS1*.

8 POUŽITÁ LITERATURA

- AKIYAMA K., HAYASHI H., 2009: Strigolactones as a host-derived signal in the arbuscular mycorrhizal symbiosis. *J Pestic Sci*, 34(4): 306-309. ISSN 1348-589X
- AKIYAMA K., MATSUZAKI K., HAYASHI H., 2005: Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature*, 435(7043): 824-827. ISSN 0028-0836
- BALLA J., KALOUSEK P., REINOHL V., FRIML J., PROCHAZKA S., 2011: Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth. *Plant J*, 65(4): 571-577. ISSN 0960-7412
- BARTEL B., 1997: Auxin biosynthesis. *Annu Rev Plant Phys*, 48: 49-64. ISSN 1040-2519
- BASTER P., ROBERT S., KLEINE-VEHN J., VANNESTE S., KANIA U., GRUNEWALD W., DE RYBEL B., BEECKMAN T., FRIML J., 2013: SCF(TIR1/AFB)-auxin signalling regulates PIN vacuolar trafficking and auxin fluxes during root gravitropism. *The EMBO journal*, 32(2): 260-274. ISSN 1460-2075
- BENNETT T., LEYSER O., 2006: Something on the side: Axillary meristems and plant development. *Plant Mol Biol*, 60(6): 843-854. ISSN 0167-4412
- BEVERIDGE C.A., 2006: Axillary bud outgrowth: sending a message. *Curr Opin Plant Biol*, 9(1): 35-40. ISSN 1369-5266
- BEVERIDGE C.A., DUN E.A., RAMEAU C., 2009: Pea Has Its Tendrils in Branching Discoveries Spanning a Century from Auxin to Strigolactones. *Plant Physiol*, 151(3): 985-990. ISSN 0032-0889
- BEVERIDGE C.A., KYOZUKA J., 2010: New genes in the strigolactone-related shoot branching pathway. *Curr Opin Plant Biol*, 13(1): 34-39. ISSN 1369-5266

- 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. *Plant J*, 11(2): 339-345. ISSN 0960-7412
- BEVERIDGE C.A., ROSS J.J., MURFET I.C., 1996: Branching in pea - Action of genes rms3 and rms4. *Plant Physiol*, 110(3): 859-865. ISSN 0032-0889
- 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 Physiol*, 115(3): 1251-1258. ISSN 0032-0889
- 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 Physiol*, 123(2): 689-697. ISSN 0032-0889
- DODD I.C., FERGUSON B.J., BEVERIDGE C.A., 2008: Apical wilting and petiole xylem vessel diameter of the rms2 branching mutant of pea are shoot controlled and independent of a long-distance signal regulating branching. *Plant Cell Physiol*, 49(5): 791-800. ISSN 0032-0781
- DOSTÁL R., 1908: Korelační vztahy u klíčních rostlin Papilionaceí. *Rozprava České Akademie II*, 17(25): 1-44
- DUN E.A., BREWER P.B., BEVERIDGE C.A., 2009a: Strigolactones: discovery of the elusive shoot branching hormone. *Trends Plant Sci*, 14(7): 364-372. ISSN 1360-1385
- DUN E.A., FERGUSON B.J., BEVERIDGE C.A., 2006: Apical dominance and shoot branching. Divergent opinions or divergent mechanisms? *Plant Physiol*, 142(3): 812-819. ISSN 0032-0889
- DUN E.A., HANAN J., BEVERIDGE C.A., 2009b: Computational Modeling and Molecular Physiology Experiments Reveal New Insights into Shoot Branching in Pea. *Plant Cell*, 21(11): 3459-3472. ISSN 1040-4651
- EPSTEIN E., CHEN K.H., COHEN J.D., 1989: Identification of Indole-3-Butyric Acid as an Endogenous Constituent of Maize Kernels and Leaves. *Plant Growth Regul*, 8(3): 215-223. ISSN 0167-6903

- EVERATBOURBOULOUX A., BONNEMAIN J.L., 1980: Distribution of Labeled Auxin and Derivatives in Stem Tissues of Intact and Decapitated Broad-Bean Plants in Relation to Apical Dominance. *Physiol Plantarum*, 50(2): 145-152. ISSN 0031-9317
- FOO E., BULLIER E., GOUSSOT M., FOUCHER F., RAMEAU C., BEVERIDGE C.A., 2005: The branching gene RAMOSUS1 mediates interactions among two novel signals 464 and auxin in pea. *Plant Cell*, 17(2): 464-474. ISSN 1040-4651
- FOO E., MORRIS S.E., PARMENTER K., YOUNG N., WANG H.T., JONES A., RAMEAU C., TURNBULL C.G.N., BEVERIDGE C.A., 2007: Feedback regulation of xylem cytokinin content is conserved in pea and arabidopsis. *Plant Physiol*, 143(3): 1418-1428. ISSN 0032-0889
- GASPAR T., KEVERS C., PENEL C., GREPPIN H., REID D.M., THORPE T.A., 1996: Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell Dev-Pt*, 32(4): 272-289. ISSN 1054-5476
- GOMEZ-ROLDAN V., FERMAS S., BREWER P.B., PUECH-PAGES V., DUN E.A., PILLOT J.P., LETISSE F., MATUSOVA R., DANOUN S., PORTAIS J.C., BOUWMEESTER H., BECARD G., BEVERIDGE C.A., RAMEAU C., ROCHANGE S.F., 2008: Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature*, 455(7210): 189-U122. ISSN 0028-0836
- GREENHAM K., SANTNER A., CASTILLEJO C., MOONEY S., SAIRANEN I., LJUNG K., ESTELLE M., 2015: The AFB4 Auxin Receptor Is a Negative Regulator of Auxin Signaling in Seedlings (Retraction of vol 21, pg 520, 2011). *Curr Biol*, 25(6): 819-819. ISSN 0960-9822
- GUILFOYLE T.J., HAGEN G., LI Y., ULMASOV T., LIU Z.B., STRABALA T., GEE M., 1993: Auxin-Regulated Transcription. *Aust J Plant Physiol*, 20(4-5): 489-502. ISSN 0310-7841
- CHATFIELD S.P., STIRNBERG P., FORDE B.G., LEYSER O., 2000: The hormonal regulation of axillary bud growth in Arabidopsis. *Plant J*, 24(2): 159-169. ISSN 0960-7412
- JANSSEN B.J., DRUMMOND R.S., LEDGER S.E., SNOWDEN K.C., 2010: A positive approach to branching. *Plant signaling & behavior*, 5(4): 422-424. ISSN 1559-2324

- JOEL D.M., CHAUDHURI S.K., PLAKHINE D., ZIADNA H., STEFFENS J.C., 2011: Dehydrocostus lactone is exuded from sunflower roots and stimulates germination of the root parasite *Orobanche cumana*. *Phytochemistry*, 72(7): 624-634. ISSN 0031-9422
- JOHNSON X., BRCICH T., DUN E.A., GOUSSOT M., HAUROGNE K., BEVERIDGE C.A., RAMEAU C., 2006: Branching genes are conserved across species. Genes controlling a novel signal in pea are coregulated by other long-distance signals. *Plant Physiol*, 142(3): 1014-1026. ISSN 0032-0889
- KLEE H., ESTELLE M., 1991: *Molecular Genetic Approaches to Plant Hormone Biology*. *Annu Rev Plant Phys*, 42: 529-551. ISSN 0066-4294
- LETHAM D.S., PALNI L.M.S., 1983: The Biosynthesis and Metabolism of Cytokinins. *Annu Rev Plant Phys*, 34: 163-197. ISSN 0066-4294
- LEYSER O., 2005: The fall and rise of apical dominance - Commentary. *Curr Opin Genet Dev*, 15(4): 468-471. ISSN 0959-437X
- LEYSER O., 2009: The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant Cell Environ*, 32(6): 694-703. ISSN 0140-7791
- 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. *Physiol Plantarum*, 106(4): 415-420. ISSN 0031-9317
- LJUNG K., HULL A.K., CELENZA J., YAMADA M., ESTELLE M., NONMANLY J., SANDBERG G., 2005: Sites and regulation of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell*, 17(4): 1090-1104. ISSN 1040-4651
- LOPEZ-RAEZ J.A., CHARNIKHOVA T., GOMEZ-ROLDAN V., MATUSOVA R., KOHLEN W., DE VOS R., VERSTAPPEN F., PUECH-PAGES V., BECARD G., MULDER P., BOUWMEESTER H., 2008: Tomato strigolactones are derived from carotenoids and their biosynthesis is promoted by phosphate starvation. *New Phytol*, 178(4): 863-874. ISSN 0028-646X
- MATUSOVA R., RANI K., VERSTAPPEN F.W.A., FRANSSSEN M.C.R., BEALE M.H., BOUWMEESTER H.J., 2005: The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol*, 139(2): 920-934. ISSN 0032-0889

- MCINTYRE G.I., 1977: The role of nutrition in apical dominance. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 31: 251-273. ISSN 0081-1386
- MCSTEEN P., 2009: Hormonal Regulation of Branching in Grasses. *Plant Physiol*, 149(1): 46-55. ISSN 0032-0889
- MCSTEEN P., LEYSER O., 2005: Shoot branching. *Annual Review of Plant Biology*, 56: 353-374. ISSN 1543-5008
- MILLER C.O., SKOOG F., VONSALTZA M.H., STRONG F.M., 1955: Kinetin, a Cell Division Factor from Deoxyribonucleic Acid. *J Am Chem Soc*, 77(5): 1392-1392. ISSN 0002-7863
- MORRIS R.O., BLEVINS D.G., DIETRICH J.T., DURLEY R.C., GELVIN S.B., GRAY J., HOMMES N.G., KAMINEK M., MATHEWS L.J., MEILAN R., REINBOTT T.M., SAYAVEDRASOTO L., 1993: Cytokinins in Plant-Pathogenic Bacteria and Developing Cereal-Grains. *Aust J Plant Physiol*, 20(4-5): 621-637. ISSN 0310-7841
- 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 Physiol*, 126(3): 1205-1213. ISSN 0032-0889
- MOUCHEL C.F., LEYSER O., 2007: Novel phytohormones involved in long-range signaling. *Curr Opin Plant Biol*, 10(5): 473-476. ISSN 1369-5266
- ONGARO V., LEYSER O., 2008: Hormonal control of shoot branching. *J Exp Bot*, 59(1): 67-74. ISSN 0022-0957
- OVERBEEK J.V., 1938: Auxin Production in Seedlings of Dwarf Maize. *Plant physiology*, 13(3): 587-598. ISSN 0032-0889
- PACIOREK T., SAUER M., BALLA J., WISNIEWSKA J., FRIML J., 2006: Immunocytochemical technique for protein localization in sections of plant tissues. *Nature protocols*, 1(1): 104-107. ISSN 1750-2799
- PETERSON C.A., FLETCHER R.A., 1973: Apical Dominance Is Not Due to a Lack of Functional Xylem and Phloem in Inhibited Buds. *J Exp Bot*, 24(78): 97-101, ISSN 0022-0957

- PRASAD T.K., HOSOKAWA Z., CLINE M.G., 1989: Effects of Auxin, Auxin-Transport Inhibitors and Mineral Nutrients on Apical Dominance in *Pharbitis-Nil*. *J Plant Physiol*, 135(4): 472-477. ISSN 0176-1617
- PROCHÁZKA S., MACHÁČKOVÁ I., KREKULE J., ŠEBÁNEK J., 2003: *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia, 484 s.
- SACHS T., 1981: The Control of the Patterned Differentiation of Vascular Tissues. *Adv Bot Res*, 9: 151-262
- SHIMIZU-SATO S., TANAKA M., MORI H., 2009: Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Mol Biol*, 69(4): 429-435. ISSN 0167-4412
- SHINOHARA N., TAYLOR C., LEYSER O., 2013: Strigolactone Can Promote or Inhibit Shoot Branching by Triggering Rapid Depletion of the Auxin Efflux Protein PIN1 from the Plasma Membrane. *Plos Biol*, 11(1). ISSN 1545-7885
- SKOOG F., THIMANN K.V., 1934: Further Experiments on the Inhibition of the Development of Lateral Buds by Growth Hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 20(8): 480-485. ISSN 0027-8424
- SNOW R., 1929: The transmission of inhibition though dead stretches of stem. *Annals of Botany*, 43: 261-267
- SOROKIN H.P., THIMANN K.V., 1964: Histological Basis for Inhibition of Axillary Buds in *Pisum Sativum* and Effects of Auxins and Kinetin on Xylem Development. *Protoplasma*, 59(2): 326-&. ISSN 0033-183X
- STRADER L.C., BARTEL B., 2009: The Arabidopsis PLEIOTROPIC DRUG RESISTANCE8/ABCG36 ATP Binding Cassette Transporter Modulates Sensitivity to the Auxin Precursor Indole-3-Butyric Acid. *Plant Cell*, 21(7): 1992-2007. ISSN 1040-4651
- ŠEBÁNEK J., SLADKÝ Z., PROCHÁZKA S., 1983: *Experimentální morfologie rostlin*. Praha: Academia, 320 s.
- TANAKA M., TAKEI K., KOJIMA M., SAKAKIBARA H., MORI H., 2006: Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance. *Plant J*, 45(6): 1028-1036. ISSN 0960-7412

- THIMANN K.V., 1937: On the Nature of Inhibitions Caused by Auxin. *Amer. J. Bot.*, 24: 407-412
- UMEHARA M., HANADA A., YOSHIDA S., AKIYAMA K., ARITE T., TAKEDA-KAMIYA N., MAGOME H., KAMIYA Y., SHIRASU K., YONEYAMA K., KYOZUKA J., YAMAGUCHI S., 2008: Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210): 195-U129. ISSN 0028-0836
- VIETEN A., VANNESTE S., WISNIEWSKA J., BENKOVA E., BENJAMINS R., BEECKMAN T., LUSCHNIG C., FRIML J., 2005: Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-independent cross-regulation of PIN expression. *Development*, 132(20): 4521-4531. ISSN 0950-1991
- WENT F.W., 1939: Transport of Inorganic Ions in Polar Plant Tissues. *Plant physiology*, 14(2): 365-369. ISSN 0032-0889
- YAMAMOTO M., YAMAMOTO K.T., 1998: Differential effects of 1-naphthaleneacetic acid, indole-3-acetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on the gravitropic response of roots in an auxin-resistant mutant of *Arabidopsis*, *aux1*. *Plant Cell Physiol*, 39(6): 660-664. ISSN 0032-0781

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1: Chemické vzorce přirozených auxinů	15
Obr. 2: Chemické vzorce syntetických auxinů	15
Obr. 3: Chemické vzorce prvních dvou objevených cytokininů	17
Obr. 5: Chemické vzorce vybraných strigolaktonů a jejich syntetického analogu G24 (Umehara et al. 2008)	19
Obr. 6: Biosyntetická dráha strigolaktonu (UMEHARA ET AL. 2008)	22
Obr. 7: Model regulace vyrůstání pupenů u hrachu (Shinohara et al., 2013)	24
Obr. 8: Schéma aplikace IAA na dekapitované rostliny	26
Obr. 9: Schéma řezů jednotlivých variant	27
Obr. 10: Držák na sklíčka	29
Obr. 11: Nádoba s vlhkou buničinou a vzorky	30
Obr. 12: Mikroskop LSM 700 Carl Zeiss	31
Obr. 13: Schématické znázornění varianty 1 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)	41
Obr. 14: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 1 a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μm , zelená šipka – nově vzniklé xylémové elementy)	1
Obr. 15: Příčný řez stonkem hrachu barvený floroglucinem a) rms2 b) cv. Torsdag, zelenou šipkou označené příklady xylémových buněk velkého průměru	43
Obr. 16: Schématické znázornění varianty 2 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)	44

Obr. 17: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 2 - a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μm , zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a xylémové elementy, modré šipky – původní stonkový systém PIN1 a xylémových svazků) **45**

Obr 18: Příčný řez stonkem hrachu po ošetření 0,5 % IAA barvený floroglucinem a) rms2 a b) Torsdag, (zelenou šipkou označené tvořící se xylémové kanály) **45**

Obr. 19: Schématické znázornění varianty 3 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku) **45**

Obr. 20: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 3 - a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μm , zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a xylémové elementy) **1**

Obr. 21: Schématické znázornění Varianty 4 – a) cv. Torsdag, b) rms2 (červený čtverec označuje přibližně místo snímku)

48

Obr. 22: Imunolokalizace PIN1 u Varianty 4 - a) rms2 a c) cv. Torsdag, světelný snímek b) RMS2 a d) cv. Torsdag (úsečka 50 μm , zelené šipky – nově vytvořené PIN1 a xylém) **49**

Obr. 23: Navrhované schéma role RMS2 v regulaci růstu axilárních pupenů **53**

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Osvětlení použité v klimaboxu	str. 26
Tab. 2	Složení zásobního roztoku 10xPBS	str. 28
Tab. 3	Roztoky xylénu	str. 28
Tab. 4	Složení blokovacího roztoku	str. 30

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AD	apikální dominance
IAA	indolyl-3-octová kyselina
PAA	fenyloctová kyselina
IBA	indolyl-3-máselná kyselina
2,4-D	2,4-dichlorfenoxycetová kyselina
NAA	α -naftyloctová kyselina
SL	strigolakton
RMS	RAMOSUS (<i>Pisum sativum</i>)
GR24	syntetický analog strigolaktonu
X-CK	cytokininy v xylémové míze
CK	cytokininy
CCD	karotenoidy štěpící dioxygenáza
MAX	MORE AXILLARY GROWTH (<i>Arabidopsis thaliana</i>)
D	DWARF (<i>Oryza sativa</i>)
DAD	DECREASED APICAL DOMINANCE (<i>Petunia hybrida</i>)
WT	divoký typ (wild-type)
SAM	stonkový apikální meristém
PAT	Polární transport auxinu

PŘÍLOHA

Tabulka P1: Délky pupenů cv. Torsdag dekapitovaný - vodní lanolin

pupen rostlina	1.den			3. den			4. den			7. den			8. den		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1	1	2	0,3	3	5	2	6	11	4	7	62	6	8	90	6
2	0,5	1	0,3	3	3	2	5	6	3	27	16	28	27	19	50
3	1	1,5	0,3	4	4	1	7	10	3	9	50	18	20	75	9
4	0,5	1	0,3	1	3	1	3	6	3	5	42	29	6	51	50
5	0,5	1	0,3	4	5	2	7	11	4	20	68	23	23	100	25
6	0,5	1	0,3	1	3	2	2	7	4	3	40	51	3	49	66
Průměr	0,67	1,25	0,30	2,67	3,83	1,67	5,00	8,50	3,50	11,83	46,33	25,83	14,50	64,00	34,33
Smodch	0,26	0,42	0,00	1,37	0,98	0,52	2,10	2,43	0,55	9,52	18,48	14,91	10,05	30,04	24,60

Tabulka P2: Délky pupenů rms2 dekapitovaný - vodní lanolin

pupen rostlina	1. den			3. den			6. den			7. den			8. den		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1	0,5	0,5	0,5	1,0	1,5	1,0	2,5	5,0	9,0	2,5	5,0	11,0	2,5	5,0	19,0
2	1,0	4,0	2,0	4,0	10,0	5,0	6,0	37,0	10,0	7,0	37,0	12,0	7,0	39,0	12,0
3	0,5	1,0	0,5	1,0	5,0	1,0	1,5	20,0	3,0	1,5	24,0	4,0	1,5	25,0	4,0
4	0,5	0,5	0,5	2,0	2,0	2,5	5,0	5,0	14,0	5,0	5,0	16,0	5,0	5,0	23,0
5	1,0	0,0	0,5	1,0	0,0	1,0	11,0	0,0	8,0	16,0	0,0	10,0	16,0	0,0	10,0
Průměr	0,7	1,2	0,8	1,8	3,7	2,1	5,2	13,4	8,8	6,4	14,2	10,6	6,4	14,8	13,6
Smodch	0,27	1,60	0,67	1,30	3,96	1,75	3,72	15,18	3,96	5,78	15,71	4,34	5,78	16,59	7,50

T-Test	0,841	0,949	0,171	0,311	0,945	0,617				0,276	0,012	0,054	0,133	0,009	0,097
											*			**	

Tabulka P3: Délky pupenů cv. Torsdag dekapitovaný - vodní lanolin s 0,5 % IAA

pupen rostlina	1. den			3. den			4. den			7. den			8. den		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1	1	2	0,4	3	4	1	7	9	2	15	78	4	21	100	4
2	1	1	0,3	1	1	0,5	2	2	1	2	21	9	2	30	9
3	0,8	1,5	0,3	1,5	2	0,5	2	3	1	5	24	4,5	5	45	5
4	0,3	2	0,3	1	2	0,3	1	3	0,5	7	25	1,5	7	41	1,5
5	1	1	0,3	1	1	0,3	1,5	1	0,5	6	8	5	6	20	7
6	1	1	0,3	1	1,5	0,5	2	2	1	20	25	3	20	48	3
7	2	2	0,5	2	2,5	1	2	4	2	4	42	3	4	62	3
Průměr	1,01	1,50	0,34	1,50	2,00	0,59	2,50	3,43	1,14	8,43	31,86	4,29	9,29	49,43	4,64
Smodch	0,50	0,50	0,08	0,76	1,04	0,30	2,02	2,64	0,63	6,55	22,64	2,38	7,83	25,99	2,59

Tabulka P4: Délky pupenů rms2 dekapitovaný - vodní lanolin s 0,5 % IAA

pupen rostlina	1. den			3. den			6. den			7. den			8. den		
	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.	1.	2.	3.
1	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	2,0	1,5	1,0	4,0	3,0	1,0	6,0	5,0
2	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	1,0	2,0	2,0	2,0	4,0	5,0	2,0	8,0	10,0
3	1,0	1,0	4,0	1,5	1,5	6,0	2,0	2,0	37,0	2,0	2,0	43,0	2,0	2,0	53,0
4	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0	1,0	0,5	2,0	2,0	0,5	5,0	4,0
5	2,0	1,5	1,0	2,5	3,0	1,0	2,5	6,0	13,0	4,0	8,0	13,0	4,0	8,0	25,0
Průměr	0,9	1,1	1,3	1,1	1,5	1,7	1,4	2,6	10,9	1,9	4,0	13,2	1,9	5,8	19,4
Smodch	0,65	0,22	1,52	0,89	0,87	2,41	0,82	1,95	15,42	1,34	2,45	17,21	1,34	2,49	20,57

T-Test	0,752	0,095	0,233	0,441	1,000	0,804				0,039	0,017	0,313	0,047	0,004	0,184
										*	*		*	**	

Tabulka P5: Délky pupenů cv. Torsdag intaktní - vodní lanolin

pupen rostlina	1. den		4. den		5. den		6. den		7. den		8. den		11. den		12. den	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,8	0,5	1	0,8	1	1	1	1	1	1
2	0,5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	0,5	0,5	0,5	0,8	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1	2	1	2
7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
8	0,5	0,5	1	0,7	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Průměr	0,69	0,75	0,75	0,88	0,88	0,94	0,95	0,94	1,00	0,98	1,00	1,06	1,00	1,13	1,00	1,13
Smodch	0,26	0,27	0,27	0,19	0,23	0,18	0,09	0,18	0,00	0,07	0,00	0,18	0,00	0,35	0,00	0,35

Tabulka P6: Délky pupenů rms2 intaktní - vodní lanolin

pupen rostlina	1.den		2. den		3. den		4. den		5. den		8. den		9. den	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	1	1	1	1	1	1,5	1	1,5	1	1,5	1	1,5	1	1,5
2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	2	1	2	2	2,5	2	2,5	3	3	4	3	4
4	0	1	0	1,5	0	2	0	2	0	2	0,5	2	0,5	2
5	0,5	1	0,5	1,5	0,5	1,5	1	2	1	2	1	2	1	2
6	1	1	1	1,5	1	1,5	1	1,5	1	1,5	3	2	3	2
7	1	3	1,5	3	2	3	2,5	3	3	3,5	3	3,5	4	3,5
8	1	1,5	1	2	1	2	1,5	2	1,5	2	1,5	2	1,5	2
9	0,5	1	1	1	1	1	1	1	3	2	3	2	3	2
Průměr	0,72	1,22	0,94	1,44	1,00	1,72	1,28	1,78	1,56	2,06	1,89	2,22	2,00	2,22
Smodch	0,36	0,71	0,58	0,73	0,66	0,62	0,79	0,62	1,04	0,77	1,08	0,94	1,25	0,94

T-Test	0,822	0,093					0,090	0,002	0,090	0,002	0,039	0,006		
								**		**	*	**		

Tabulka P7: Délky pupenů cv. Torsdag intaktní - vodní lanolin s 0,5 % IAA

pupen rostlina	1.den		4. den		5. den		6. den		7. den		8. den		11. den		12. den	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
2	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
4	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1,5	1	1	1	1
7	0,5		1	1	1	1	1	1	1	1	1	5	1	6	1	6
8	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Průměr	0,88	0,71	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,56	1,00	1,63	1,00	1,63
Smodch	0,23	0,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	1,40	0,00	1,77	0,00	1,77

Tabulka P8: Délky pupenů rms2 intaktní - vodní lanolin s 0,5 % IAA

pupen rostlina	1.den		2. den		3. den		4. den		5. den		8. den		9. den	
	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.	1.	2.
1	0,5	1	1	1,5	1	1,5	1	2	1	2	1	2	1	2,5
2	1	6	1	7	1	7,5	1	8	1	8	1,5	9	1,5	10
3	0,5	0,5	1	2	1	3	1	3,5	1	3,5	1	4	1	4
4	1	5	2	7	2	15	2	23	7	49	7	88	7	95
5	2	3	3	3	3	3	3	3,5	3	3,5	4	4	4	4
6	0,5	1	0,5	1	0,5	1	0,5	1	1	1	1	1	1	1
Průměr	0,92	2,75	1,42	3,58	1,42	5,17	1,42	6,83	2,33	11,17	2,58	18,00	2,58	19,42
Smodch	0,58	2,32	0,92	2,73	0,92	5,34	0,92	8,27	2,42	18,69	2,46	34,40	2,46	37,15

T-Test	0,874	0,084					0,317	0,145	0,235	0,240	0,175	0,295		

