



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Úloha kanálu kyseliny borité, NIP5;1, v růstových reakcích
Arabidopsis thaliana k auxinu 2,4-D

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Kateřina Slowiková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2013

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Slowiková
Název práce	Úloha kanálu kyseliny borité, <i>NIP5;1</i> , v růstových reakcích <i>Arabidopsis thaliana</i> k auxinu 2,4-D
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2013
Abstrakt	<p>Předložená bakalářská práce se zabývá úlohou kanálu pro transport kyseliny borité, <i>NIP5;1</i>, v růstových reakcích <i>Arabidopsis thaliana</i> k boru a exogenně aplikovanému auxinu 2,4-D. Bor je základní mikrobiogenní prvek, potřebný pro správný růst a vývoj rostlin. Je známo, že v nižších koncentracích (1-3 mM) růst hypokotylu stimuluje, kdežto ve vyšších (nad 5 mM) růst naopak inhibuje. Exogenně aplikovaný auxin stimuluje rostlinný růst, ale při dlouhodobém působení má inhibiční účinky. U boru i auxinu je kapacita stimulace i inhibice ovlivněna světelnými podmínkami.</p> <p>Poznatky, vyplývající z této práce naznačují, že kanál <i>NIP5;1</i> se do růstových reakcí k boru i auxinu zapojuje specificky na modrém světle.</p>
Klíčová slova	<i>NIP5;1</i> , bor, auxin 2,4-D
Počet stran	41
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Slowiková
Title of thesis	Role of boric acid channel NIP5;1 in Arabidopsis growth responses to auxin 2,4-D
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2013
Abstract	The presented bachelor thesis deals with the role of the channel for transport of boric acid, NIP5;1, the growth responses of <i>Arabidopsis thaliana</i> to boron and exogenously applied auxin 2,4-D. Boron is an essential micronutrient required for proper growth and development of plants. It is known that at lower concentrations (1-3 mM), boron stimulates growth of hypocotyls, whereas at higher concentrations (above 5 mM), it inhibits the growth. Auxin stimulates plant growth, but it is known that in long-term, exogenous auxin inhibits growth of intact seedlings. Capacity of boron and auxin to stimulate and/or inhibits growth is affected by light conditions. The findings resulting from this thesis indicate that specifically in blue light, the channel NIP5;1 is involved in boron- and auxin-induced growth responses of <i>Arabidopsis</i> plant.
Keywords	NIP5;1, bor, auxin 2,4-D
Number of pages	41
Language	Czech (English)

Poděkování

Ráda bych poděkovala doc. RNDr. Martinu Fellnerovi Ph.D., za jeho rady, připomínky a také čas, který mi věnoval při řešení mé bakalářské práce.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a že jsem použila pouze literární zdroje uvedené v kapitole Literatura.

V Olomouci dne

.....

(podpis)

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Bor v biologii rostlin.....	9
2. 1. Transport boru a transportéry boru BOR1 a NIP5;1.....	10
2. 1. 1. BOR1	10
2. 1. 2. NIP5;1	11
2. 2. Vliv boru na prodlužování hypokotylu <i>Arabidopsis</i>	12
3. Rostlinné hormony-fytohormony.....	12
3. 1. Auxiny.....	12
3. 1. 1. Teorie kyselého růstu.....	15
3. 1. 2. Auxin 2,4-D	15
4. Světlo a fotoreceptory	17
4. 1. Fytochromy	18
4. 2. Kryptochromy	19
4. 3. Fototropiny.....	20
5. Studie mutanta <i>bor1 - 1</i>	20
6. Cíl práce	22
7. Materiál a metody	23
7. 1. Rostlinný materiál.....	23
7. 2. Růstové reakce	23
7. 2. 1. Příprava média	23
7. 2. 2. Příprava semen.....	24
7. 2. 3. Výsev semen	24
7. 2. 4. Kultivace semen na médiu s borem a/nebo auxinem.....	24
7. 2. 5. Měření růstu	25
8. Výsledky - studium růstových reakcí	26
8. 1. Studium vlivu boru	26
8. 1. 1. Růstové reakce hypokotylu.....	26
8. 1. 2. Růstové reakce kořene	27
8. 2. Studium vlivu boru na citlivost k auxinu.....	29
8. 2. 1. Růstové reakce hypokotylu.....	29
8. 2. 2. Růstové reakce kořene	32

9. Diskuze	34
10. Závěr	38
11. Literatura.....	39
12. Seznam zkratek.....	43

1. Úvod

Bor je prvek potřebný pro správný růst a vývoj rostlin. V praxi ovlivňuje nejenom úrodu, ale také kvalitu a výnosnost plodin. V některých oblastech je problém s nedostatkem či nadbytkem boru v půdě. Jelikož jde o prvek, u něhož je úzké rozmezí mezi nedostatkem a toxicitou, je těžké najít optimální řešení jeho regulace v zemědělských půdách. Dodnes se přesně neví, jak vlastně bor v rostlinách působí. Pochopením správného mechanismu působení boru v rostlinách by mohlo napomoci zvýšit výnosnost plodin v problémových oblastech.

Předkládaná bakalářská práce s názvem „Úloha kanálu kyseliny borité, NIP5;1, v růstových reakcích *Arabidopsis thaliana* k auxinu 2,4-D“ je součástí základního výzkumu, který se zabývá základními procesy růstu a vývoje v rostlinách. Cílem práce je poodhalit zapojení kanálu *NIP5;1* v mechanismech působení boru a auxinu 2,4-D na růst kořene a hypokotylu *Arabidopsis thaliana*. K tomuto účelu byl zvolen genetický přístup, kdy byly srovnávány růstové reakce recesivního mutanta s defektem v genu *NIP5;1* a kontrolní rostliny Col-0. Kromě toho byl zjišťován i vliv světelných podmínek na tyto reakce.

2. Bor v biologii rostlin

Již před více než 85 lety se přišlo na skutečnost, že bor je jedním ze základních mikrobiogenních prvků, potřebných pro správný růst a vývoj rostlin (Tariq and Mott, 2007). V dnešním zemědělství se problém nedostatku boru v půdě objevuje častěji než nedostatek jakéhokoliv jiného mikroprvku. Můžeme se s ním potkat v oblastech s hojnými dešťovými srážkami, jako je např. jihovýchodní Asie a jihovýchodní Čína. Nedostatek boru postihuje především rostoucí rostlinné orgány, a proto u takových rostlin můžeme pozorovat ztrátu apikální dominance, zkrácené kořeny, špatný vývoj listů a květů a dokonce ztrátu plodnosti. Naopak nadbytek boru má na rostliny toxické účinky. Mezi symptomy toxicity patří inhibice růstu, inhibice klíčení a chloróza listů. Tento problém nastává v polosuchých oblastech, jako je jižní Austrálie, Chile, Kalifornie nebo Turecko. Rozmezí mezi nedostatkem a nadbytkem boru je velmi úzké. Špatné zásobení rostliny borem má vliv na celkový výnos a kvalitu plodin.

Úloha boru v rostlině se značně liší od role jiných mikroprvků, které obvykle fungují jako součásti enzymů nebo enzymové aktivátory či inhibitory. Hlavní funkcí boru je udržení struktury buněčné stěny, kde zprostředkovává vazbu mezi dvěma monomery homogalacturonanu za vzniku rhamnogalacturonanu II (dRG-II-B) (Iwai *et al.*, 2006). Tento pektinový polysacharid zajišťuje mechanické vlastnosti primární buněčné stěny. Změny ve zmíněné vazbě mají za následek symptomy, spojované s nedostatkem boru. Dále je bor součástí metabolismu karbohydrátů, RNA, proteinů i fenolů. Při nedostatku boru v rostlině se fenolické látky hromadí v listech a způsobují jejich nekrózu. Předpokládá se, že při normální hladině boru vytváří tento prvek s fenolem komplexy a snižuje tak jeho toxicitu. Vytváření komplexů s borem je využito i při transportu cukrů, kdy komplex bor-cukr napomáhá doručení látky do cílového místa, aniž by po cestě reagoval s jinými látkami. Bor napomáhá i regulaci vstupu vody do buňky. Nedostatek se projevuje menší šťavnatostí listů a menší metabolickou aktivitou. Mezi dalšími funkcemi boru v rostlině bychom mohli vyjmenovat i vliv na reprodukci, vytváření pylu, semen a plodů a na odolnost proti nemocem, např. za nedostatku je vyšší pravděpodobnost napadení rostliny houbou, např. u ječmene (Lambert *et al.*, 1980).

Z chemického hlediska je bor polokov. Ačkoliv jej v periodické tabulce nalezneme ve III. A (13) skupině, s ostatními prvky této skupiny, jako je Ga nebo Al, moc společného nemá (Tanaka and Fujiwara, 2007). Některé jeho neobvyklé vlastnosti,

např. schopnost vytvářet neobvyklé chemické vazby (zvláště s vodíkem), jej činí důležitým prvkem nejenom v organické chemii.

V půdě je bor přítomen převážně ve formě elektroneutrální molekuly H_3BO_3 , částečně jako anion $\text{B}(\text{OH})_4^-$. V případě H_3BO_3 jde o jediný element přijímaný rostlinami ne jako ion, ale jako nenabitá molekula. Příjem boru rostlinou byl dlouho považován za pasivní proces. Na základě molekulární hmotnosti, počtu vodíkových vazeb a dalších byl stanoven teoretický koeficient propustnosti membrány pro H_3BO_3 $8 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Raven, 1980). Relativně vysoká hodnota se stala základem pro hypotézu, že pasivní transport je pro rostlinu dostačující a představuje hlavní a pravděpodobně jediný způsob membránového transportu H_3BO_3 . Tato hypotéza byla vyvrácena díky pokusům se syntetickými lipozomy, kdy byl stanoven koeficient $4 \cdot 10^{-6} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ a pomocí membrán kořenů, kde byla stanovena hodnota propustnosti $2,4 \cdot 10^{-8} \text{ cm} \cdot \text{s}^{-1}$ (Dorden and Brown, 2000). Nižší propustnost znamenala nižší možnost příjmu boru rostlinou a tím pádem potřebu membránových proteinů, aby byl obstarán dostatečný přísun boru.

2. 1. Transport boru a transportéry boru BOR1 a NIP5;1

Jak bylo výše zmíněno, bor je důležitý pro udržení biosyntézy buněčné stěny a optimálního rostlinného vývoje. Je nepřetržitě dodáván do rostoucích pletiv z půdy skrze kořeny a cévní systém rostliny v podobě nenabitých molekul kyseliny borité. Za dostatečné koncentrace této kyseliny v půdním roztoku je bor do rostliny dodáván pomocí pasivního transportu prostou difuzí. Za jeho nedostatku v půdě se do transportu zapojují aktivní transportní systémy. Zprostředkovávají přenos proti koncentračnímu gradientu za spotřeby energie v podobě ATP. U *Arabidopsis* byly objeveny hlavní dva typy přenašečů, NIP5;1 a BOR1 (Miwa and Fujiwara, 2010), jsou však známy i jiné proteiny, které se podílejí na přenosu boru přes membránu (např. NIP6;1 nebo BOR4).

2. 1. 1. BOR1

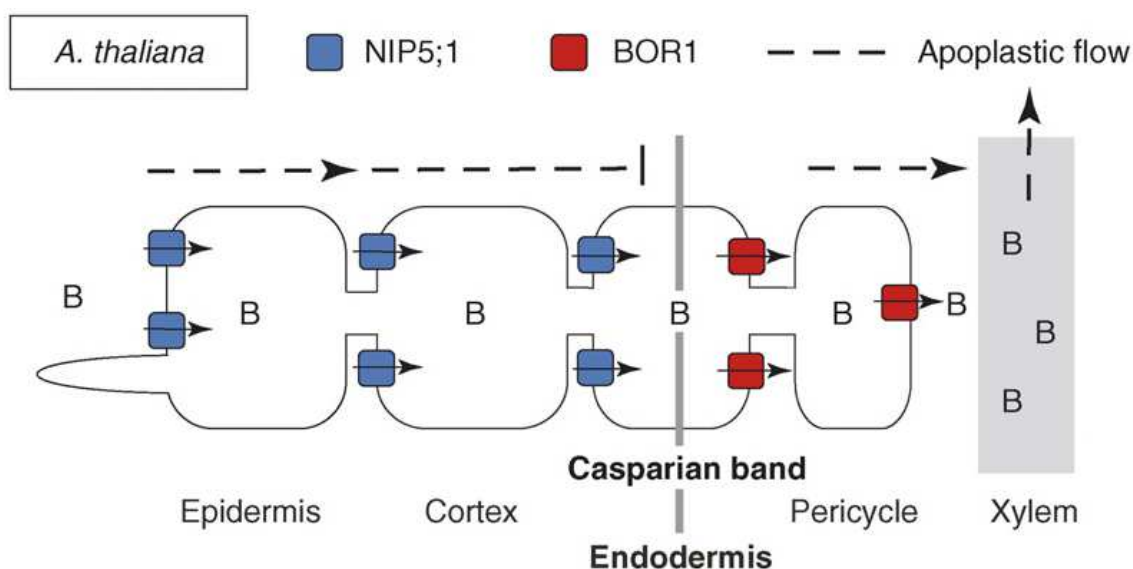
Tento přenašeč byl identifikován jako první transportér boru v živém systému (Tanaka and Fujiwara, 2007). Jde o efluxní typ transportéru, je umístěn v plazmatické membráně buněk kořene a zprostředkovává účinný transport boru do xylému. Jeho exprese je regulována posttranskripčně. Za nedostatku boru se BOR1 hromadí v plazmatické membráně, aby usnadnil přenos boru do xylému a dále do rostoucích částí

rostliny (Obr. 1). Při nadbytku boru je BOR1 zabudováván do endosomů a transportován do vakuoly, kde je degradován (Takano *et al.*, 2005). Tento systém slouží jako opatření proti toxické hladině boru v rostlině.

2. 1. 2. NIP5;1

NIP5;1 je kanál pro transport kyseliny borité, mající na starosti účinný příjem boru do buněk kořene. NIP5;1 patří do skupiny proteinů typu MIP (major intrinsic proteins), zahrnující i aquaporiny. MIP jsou známy jako proteiny, které usnadňují přenos vody a malých nenabitých molekul přes membránu. Hlavní funkcí NIP5;1 je transport kyseliny borité, ale částečně je propustný i pro vodu. Předpokládá se, že i jiné proteiny z rodiny MIP se mohou zúčastňovat transportu boru (např. kanál NIP6;1, který usnadňuje transport kyseliny borité, ale pro vodu je nepropustný (Tanaka *et al.*, 2008).

Exprese NIP5;1 je regulována množstvím boru v rostlině. Při nedostatku dochází ke zvýšené expresi v buňkách kořene, zvláště u epidermálních, kortikálních a endodermálních buněk (Obr. 1). U rostlin rostoucích za nedostatku boru byla zjištěna až 12x vyšší úroveň mRNA transkriptu akumulovaného v kořenech, než u rostliny rostoucí za normálních podmínek.



Obr. 1 – Transport boru směrem z povrchu kořene do xylému (převzato z review: Takano, Miwa, Fujiwara, 2008)

2. 2. Vliv boru na prodlužování hypokotylu *Arabidopsis*

U *Arabidopsis* je hypokotyl jednoduchým orgánem, který má délku přibližně 20 buněk (od kořene po dělohy). Většina z těchto buněk vzniká již během embryonálního vývoje. Samotné prodlužování hypokotylu během růstu je způsobeno zvětšováním těchto buněk, k jejich dělení dochází pouze výjimečně.

Bor má v buněčné stěně funkci stabilizátoru pektinové sítě. Bylo zjištěno, že při nižších koncentracích (1–3 mM) kyselina boritá v podmínkách *in vitro* stimuluje zvětšování buněk a tím i prodlužování hypokotylu *Arabidopsis*, zatímco při vyšších (nad 5 mM) naopak jeho růst inhibuje (Kocábek *et al.*, 2009). Bylo rovněž zjištěno, že bor, transportovaný proteinem BOR1, snižuje citlivost hypokotylu *Arabidopsis* k růstovým účinkům auxinů (Stočes *e al.*, 2012).

3. Rostlinné hormony-fytohormony

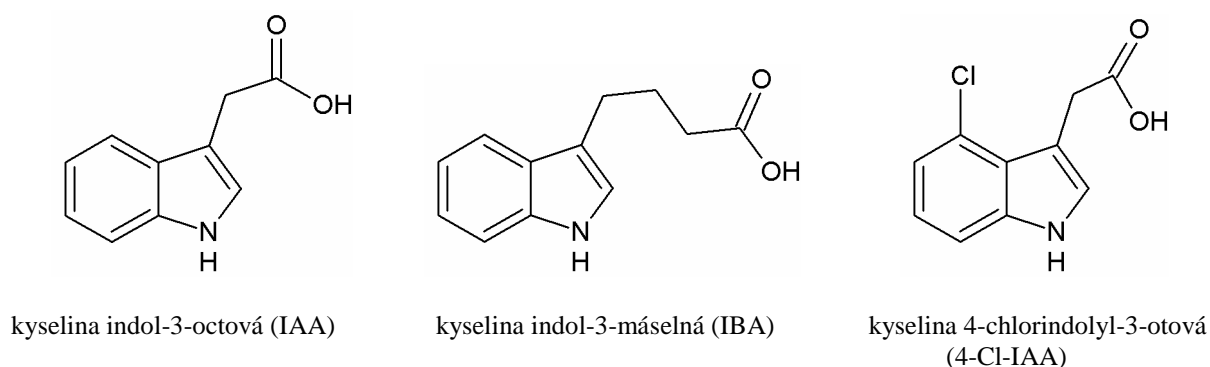
Tvar a funkce mnohobuněčného organismu nemůžou být možné bez účinné komunikace mezi jednotlivými buňkami, pletivy a orgány. U vyšších rostlin je regulace a řízení metabolismu, růst a morfogeneze často závislá na chemických signálech přecházejících z jedné části rostliny do jiné. (Julius von Sachs, 1832-1897). Takto již v 19. století naznačil německý botanik von Sachs existenci chemických posílů v rostlinách, které později Starling (1866-1927) nazval hormony.

Jinak řečeno, hormony jsou chemickými posly, vytvořenými buňkou/buňkami, které interakcí se specifickými receptory upravují buněčné procesy. V živočišném nebo rostlinném organismu se nacházejí v nepatrných koncentracích. U rostlin rozeznáváme tyto skupiny fytohormonů: auxiny, gibereliny, cytokininy, etylen, kyselina abscisová, brassinosteroidy, kyselina jasmonová, kyselina salicylová a strigolaktony (Taiz and Zeiger, 2010).

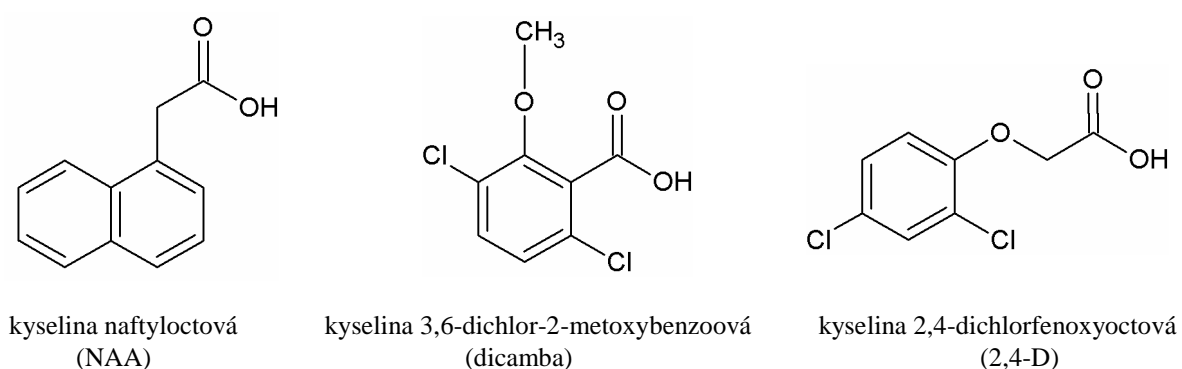
3. 1. Auxiny

Auxiny zasahují prakticky do všech aspektů rostlinného růstu a vývoje a hlavní účinky auxinů se týkají růstu buněk, tropismu a vlivu na vývoj rostliny. Byly prvními fytohormony, objevenými v rostlinách. První zmínky o rostlinných stimulantech pocházejí již z 80. let 19. století (Charles Darwin, *The Power of Movement in Plants*,

1881). V polovině 30. let 20. století byl v koleoptyle ovsa (*Avena sativa*) objeven první a dodnes hlavní přírodní auxin -kyselina indol-3-octová (IAA) (Kögl a Haagen-Smit, 1936) (Obr 2). Nedlouho poté byly objeveny i další auxiny, 4-chlorindolyl-3-octová kyselina (4-Cl-IAA) v hrachu a indol-3-másečná kyselina (IBA) v kukuřici a luštěninách (Epstein *et al.* 1989) (Obr. 2). Struktura IAA je relativně jednoduchá, proto byly výzkumné laboratoře docela rychle schopny syntetizovat širokou škálu látek s aktivitou auxinů (2,4-D, NAA, dicamba, atd.) (Obr. 3). V rostlině jsou auxiny přítomny ve velmi malých koncentracích, ve vyšších koncentracích naopak růst inhibují. Ačkoliv jsou jednotlivé auxiny chemicky různorodé, společným znakem je vzdálenost 0,5 nm mezi pozitivně nabitým aromatickým řetězcem a karboxylovou skupinou s negativním nábojem.



Obr. 2 – Strukturní vzorce nativních auxinů



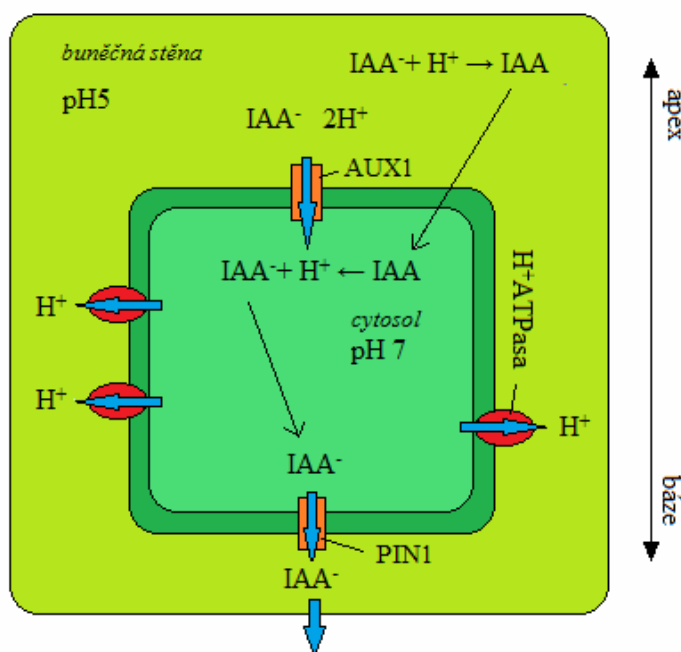
Obr. 3 – Strukturní vzorce syntetických auxinů

Auxiny vznikají především v apexu a mladých vyvíjejících se pletivech, avšak v nízkých koncentracích jsou syntetizovány prakticky ve všech rostlinných

pletivech. V rostlinách existuje několik drah syntézy, přičemž téměř všechny vychází z tryptofanu, popř. indolyl-3-glycerfosfátu.

Z místa syntézy jsou auxiny transportovány bazipetálně skrze stonek a akropetálně v kořenech mechanismem polárního transportu (Ebert and Bangerth, 1981). Ten vyžaduje energii a není závislý na gravitaci. Auxiny jsou přepravovány parenchymem vodivých pletiv. V rostlině se tak vytváří podélný gradient, důležitý pro některé vývojové procesy rostlin, např. apikální dominance. Polární tok auxinů je řízen chemiosmotickým potenciálem. Protonovaný auxin IAA (IAAH) se do buňky dostává prostou difuzí nebo pomocí influxních přenašečů AUX1 (Obr. 4) a LAX1-3 (Parry *et al.*, 2001). Poté díky specifické distribuci efluxních přenašečů je auxin nasměrován ven z buňky požadovaným směrem. Efluxní transportér PIN1 je umístěn na spodní straně buněk (Galweiler *et al.*, 1998) (Obr. 4). Zprostředkovává vertikální přenos auxinu z apexu směrem ke kořenům. Jde o nestabilní protein, což umožňuje rychlé reakce rostliny na vnější i vnitřní signály. Dalšími efluxními transportéry jsou např. P-glykoproteiny.

V rostlinách probíhá i laterální transport auxinů z vodivých pletiv do vnějších vrstev, až do epidermis. Tento typ transportu je zprostředkován PIN proteiny (u buněk cévních svazků) a ABCB transportéry (Noh *et al.*, 2001).



Obr. 4 – Bazipetální polární transport auxinů. Auxin IAA se v buněčné stěně při nízkém pH částečně disociuje a do cytosolu může vstoupit pasivně jako IAA nebo aktivním transportem společně s dvěma vodíkovými protony jako anion IAA^- . Tento transport je zajištěn přenašečem AUX1. V cytosolu je disociace IAA vyšší než v buněčné stěně, IAA je transportována ven z buňky jako anion IAA^- pomocí přenašeče PIN1. Vodíkové protony jsou aktivně pumpovány ven z buňky pomocí H^+ ATPasy. (Zpracováno podle Pavlové a Fischera, 2011)

3. 1. 1. Teorie kyselého růstu

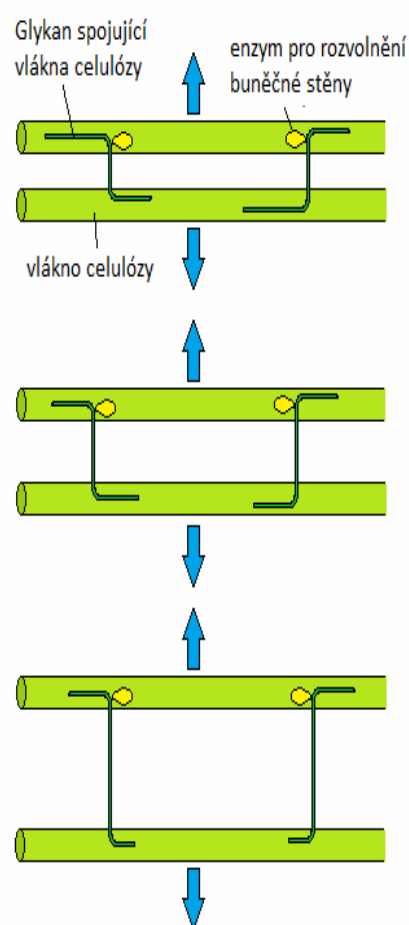
Popisuje jev, kdy je růst buněk stimulován auxinem. Po vstupu do buňky auxin ovlivňuje přesun vodíkových protonů z buňky do apoplastu. Děje se tak prostřednictvím H^+ -ATPasy (Obr. 4). Jsou popsány dva způsoby působení auxinu, aktivací a/nebo vyvoláním exprese. V hypotéze o aktivaci H^+ -ATPasy se uvažuje, že auxin se váže na auxin-binding protein ABP1 nacházející se v apoplastu blízko plazmatické membrány v cytosolu a v endoplazmatickém retikulu (Pavlová a Fischer, 2011). Vzniklý komplex stimuluje aktivitu H^+ -ATPasy, která pumpuje vodíkové protony do apoplastu (Taiz and Zeiger, 2010). V hypotéze o syntéze H^+ -ATPasy auxin vyvolává přes druhého posla expresi genů pro H^+ -ATPasu. Zvýšený počet protonových pump v membráně má za následek zvýšený přesun protonů vodíku přes membránu do apoplastu (Taiz and Zeiger, 2010).

Po odčerpání vodíkových protonů dochází k okyselení apoplastu. Za sníženého pH se v buněčné stěně aktivují enzymy expansiny, které rozrušují vazby mezi vlákny celulózy a způsobují tak rozvolnění buněčné stěny (Obr. 5). Zároveň uvnitř buňky nastane převaha záporného náboje a dochází k hyperpolarizaci.

Pro vyrovnání této změny se spustí transport K^+ iontu do buňky, čímž se sice kompenzuje záporný náboj, ale prohloubí se osmotický gradient. Do buňky proudí voda, rozvolněná buněčná stěna se roztahuje, což umožňuje vkládání nového materiálu a ve výsledku zvětšování buňky.

3. 1. 2. Auxin 2,4-D

Některé ze syntetických auxinů, např. kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) jsou dodnes využívány v zemědělství jako herbicidy. 2,4-D je syntetický auxin bílé,



Obr. 5 – Za kyselého pH jsou v buněčné stěně aktivovány expansiny, které rozrušují vazby mezi vlákny celulózy a způsobí rozvolňování buněčné stěny

krystalické nebo vločkovité struktury, bez zápachu nebo slabým fenolickým aroma. Rostlinou je 2,4-D přijímán skrze kořeny a listy, poté je veden transpiračním proudem a akumuluje v meristematických pletivech prýtu a kořenů. Vyvolává nadměrný růst buněk, který následně vede ke smrti rostliny. Syntetické auxiny tohoto typu jsou vysoce účinné, protože nejsou tak rychle metabolizovány a jejich transport je pomalejší než IAA (Taiz and Zeiger, 2010). Využívá se hlavně herbicid na obilných a třtinových polích, proti plevelům na trávnících a pastvinách. 2,4-D byl zneužit ve Vietnamské válce, kde byl součástí směsi s 2,4,6 a 2,4,5,-trichlorfenoxyoctovou kyselinou v poměru 1:1, jako silný herbicid Agent Orange.

Účinek auxinu na růst rostlin je často studován aplikací exogenního auxinu na experimentální rostliny, kdy změnou koncentrace exogenního auxinu lze regulovat růst rostliny. Krátkodobá aplikace vede ke zrychlenému růstu, bylo však zjištěno, že u intaktních rostlin v dlouhodobém horizontu (řádově dnů) dochází aplikací exogenního auxinu k inhibici prodlužovacího růstu různých orgánů (hypokotylů, kořenů, mezokotylů či koleoptylů) (Thomine *et al.*, 1997; Fellner *et al.*, 2003, 2006). Inhibiční účinek auxinů potvrzují i studie na mutantech se zvýšenou hladinou endogenních auxinů. Bylo ukázáno, že mutanti *sur1* nebo *vucca* se zvýšenou hladinou auxinů, nebo za přítomnosti exogenních auxinů, mají silně redukováno prodlužování hypokotylu (Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995). Může to být způsobeno tím, že po určité době dochází ke snížení citlivosti buněk k auxinu (pH optimum pro rozvolňování buněčné stěny se zvyšuje) a snížení polárního transportu (Haga and Lino, 1998). Auxin se po svém příchodu do buňky se může navázat na auxinový receptor, ABP1 nebo TIR1. Protein ABP1 je znám jako prostředník auxinové odpovědi ve formě dlouhivého růstu buněk. Vazbou je zprostředkován příjem a přenos signálu a následně brzká reakce, např. změnou toků iontů přes plazmatickou membránu. Přítomnost inhibitorů iontových kanálů, např. 9-AC nebo DIDS, je schopna potlačit inhibiční účinek exogenního auxinu na růst hypokotylu (Thomine *et al.*, 1997).

Dříve se předpokládalo, že exogenní auxin může inhibovat růst hypokotylu i prostřednictvím etylénu. V této hypotéze by auxin podporoval syntézu etylénu, který následně růst hypokotylu inhiboval. Tento předpoklad byl však vyvrácen s tím, že etylén a auxin působí v kontrole růstu hypokotylu nezávisle.

2,4-D stimuluje buněčné dělení, ale inhibuje buněčné prodlužování. (Campanoni and Nick, 2005). O 2,4-D je také známo, že do buněk vstupuje skrze přenašeče, k volné

difuzi přes membránu u něj nedochází a tak má tendenci se v buňce hromadit (Delbarre *et al.*, 1996).

4. Světlo a fotoreceptory

Světlo, jeho kvalita a kvantita ovlivňuje mnoho aspektů rostlinného růstu a vývoje. V zájmu rostliny je zajištění optimálního nastavení svých orgánů, zejména listů tak, aby dosáhly maximální úrovně asimilace uhlíku při fotosyntéze, a proto jsou rostliny na osvětlení velmi citlivé. Světlo jako signál je rostlinou vnímáno skrze fotoreceptory, které přeměňují světelný signál na signál chemický. Chemický signál je nesen signální kaskádou do jádra, kde ovlivní expresi genů. Tímto způsobem je vyvolána reakce, která rostlině pomůže vyrovnat se změnami v ozáření, vlnové délce a směru světla.

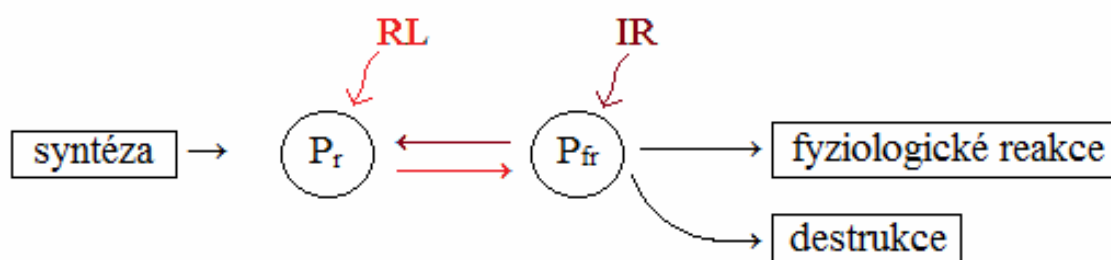
Vyvíjí-li se rostlina ve tmě, nazývá se tento proces skotomorfogeneze (z řec. „skotos“ – tma) (Daněk, Pavlová, 2002). Tento proces je typický pro klíčící rostliny, ale můžeme jej pozorovat i u rostlin bez jakéhokoliv osvětlení, jde o tzv. etiolizovaný růst. Etiolizované rostliny se vyznačují dlouhým, křehkým a bledým stonkem (pro vývoj chloroplastů a biosyntézu chlorofylu je vyžadováno světlo). Apikální háček zůstává nezměněn a slouží jako ochrana apexu při prorůstání půdou. Vývoj děloh a aktivita apikálního meristému jsou potlačeny.

Vystavením rostliny světlu, např. při proniknutí semenáčku půdou, je aktivována exprese specifických genů. Změny v expresi vyvolají nástup fotomorfogeneze (Taiz and Zeiger, 2010). Etiolizovaná rostlina je velmi citlivá na světlo, fotomorfogeneze nastává již po minimální expozici světla (stačí pár minut). Jako první nastane de-etiolizace. Rostlina začne zelenat, růst hypokotylu je inhibován, je nastartována aktivita apikálního meristému a začnou se vyvíjet zelené lístky. Fotomorfogeneze kromě de-etiolizace zahrnuje i další procesy, „shade avoidance“ a regulace denních rytmu (cirkadiánní rytmy).

Rostlinné fotoreceptory jsou molekuly citlivé na světlo, které po absorpci světelné energie podstoupí strukturální, energetické nebo konformační změny. Po zachycení signálu dojde k jeho přenosu skrze signální kaskádu a zahájení odpovídající odpovědi. Molekulární struktura fotoreceptorů je citlivá ke světlu určité vlnové délky. Podle toho je rozlišujeme na fytochromy, které odpovídají na červenou a infračervenou část spektra, kryptochromy, citlivé k modré a ultrafialové oblasti a fototropiny, reagující na modré světlo (Takemiya *et al.*, 2005).

4. 1. Fytochromy

Z chemického hlediska jde o homodimerické proteiny, složené ze dvou identických polypeptidových řetězců (tzv. apoproteiny). Ke každému proteinu je kovalentně navázán chromofor, tetrapyrrol, který zachycuje světelný signál a poté podstoupí izomerizaci. Následkem toho se změní konformace celého proteinu a spustí se signální kaskáda. Fytochromy existují ve dvou základních konformacích, navzájem v sebe přecházejících po absorpci světla dané vlnové délky. Konformace P_r , absorbující světlo červené světlo (650-680 nm) a P_{fr} , absorbující infračervené světlo (710-740 nm). Fytochromy jsou syntetizovány ve formě P_r , po absorpci červeného světla jsou konvertovány do P_{fr} , které je konvertováno nazpátek do P_r absorpcí infračerveného světla (Obr. 6).



Obr. 6 – Fytochromy jsou syntetizovány ve formě P_r . Po ozáření červeným světlem změny svou konformaci do stavu P_{fr} (aktivní forma). Po ozáření infračerveným světlem se konvertují zpět do P_r . (zpracováno podle Šetlíka *et al.*, 2004)

U *Arabidopsis* bylo objeveno pět různých fytochromových apoproteinů: phyA, phyB, phyC, phyD a phyE, kódovaných stejnojmennými geny. Nejlépe prozkoumané jsou phyA a phyB (Taiz and Zeiger, 2010).

Fytochrom phyA je citlivý k infračervenému světlu a jako jediný z fytochromů je fotolabilní. Má důležitou funkci při přechodu rostliny z programu skotomorfogeneze do fotomorfogeneze. V etiolizovaných rostlinách dochází k jeho akumulaci. Jeho fotolabilita způsobí, že jakmile dojde k osvětlení rostliny, nastane rychlý pokles phyA a tím je vyslán signál pro spuštění fotomorfogeneze. Pokles nastává třemi odlišnými mechanismy, které probíhají zároveň. Je potlačena transkripce *PHYA*, mRNA phyA je degradována a fytochrom A ve formě P_{fr} je ubiquitinován a následně degradován proteazomem (Debieux and Fankhauser, 2010). Citlivost phyA k infračervenému světlu je důležitá i v mechanismu „shade avoidance“, např. při růstu ve stínu jiných rostlin. Listy

výše rostoucích rostlin odfiltrují z dopadajícího světla velké množství červené oblasti spektra a na níže rostoucí rostlinu propouští infračervené světlo. To je detekováno phyA, který vyvolá dlouhivý růst stonku a řapíků a umožní tak rostlině prorůst na světlo, ke zdroji světelné energie pro fotosyntézu. PhyB je zodpovědný za detekci a citlivost k červenému světlu. Ostatní fytochromy jsou fotostabilní, jsou přítomny v nízké, ale stabilní úrovni ve tmě i na světle. Genová exprese phyB a ostatních fytohormonů není světlem ovlivněna. Fytochromy nejsou přítomny jen u vyšších rostlin. Proteiny jim podobné byly objeveny i u řas, cyanobakterií a dokonce i u nefotosyntetizujících bakterií (např. *Pseudomonas aeruginosa*).

4. 2. Kryptochromy

Kryptochromy byly první fotoreceptory modrého světla, které byly identifikovány a charakterizovány u *Arabidopsis* a následně byly objeveny i u jiných organismů, od cyanobakterií, kapradin, myší až po člověka. Všechny doposud identifikované kryptochromy mají své homology u fotolyáz - enzymů, které fungují u bakterií jako fotoreceptory a zprostředkovávají opravy DNA v závislosti na energii viditelného světla (VIS).

Kryptochromy jsou detektory modrého světla a ultrafialového záření v oblasti 320-500 nm. Podobně jako fytochromy mají apoproteiny s připojenými chromofory. Na rozdíl od fytochromů jsou však připojeny nekovalentní vazbou. Chromofory jsou dvou typů: flavin adenin dinukleotid (FAD) a pterin methyltetrahydrofolát (MTHF). Dopadající světlo je absorbováno MTHF a excitační energie je poté přenesena na FAD, následně dojde k přenosu elektronu z FAD v rámci molekuly. Kryptochrom změní svou konformaci a dojde k aktivaci signální kaskády (Lin and Shalitin, 2003). U *Arabidopsis* byly popsány tři geny, kódující kryptochromy, *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*. Hlavní funkcí *CRY1* a *CRY2* je světlem vyvolaná regulace genové exprese. Změnou konformace, po ozáření modrým světlem, inhibují aktivitu ubiquitin ligázy COP1. *CRY1* podporuje akumulaci anthocyaninu, inhibuje růst hypokotylu a synchronizuje denní cyklus rostliny. *CRY2* má také vliv na inhibici růstu hypokotylu, ale menší než *CRY1*. Je však důležitý během osvětlení modrým světlem o nízké intenzitě a má svou roli při navození generativního růstu (kvetení) (Smith *et al.*, 2009).

4. 3. Fototropiny

Dalšími fotoreceptory modrého světla jsou fototropiny, které jsou zapojeny v procesu fototropismu, což je růst rostliny přímo ke zdroji světla (Taiz and Zeiger, 2010). Díky tomuto mechanismu může rostlina svými listy zachytit více světelné energie, potřebné pro fotosyntézu. Ohýbání hypokotylu, které během fototropismu nastává, je způsobeno zvýšenou akumulací auxinů na zastíněné straně hypokotylu. Vlivem auxinu dojde na této straně k dlouhivému růstu a hypokotyl se ohne. Další funkcí fototropinů je vliv na otevírání stomat a migraci chloroplastů v rostlinných buňkách (Smith *et al.*, 2009).

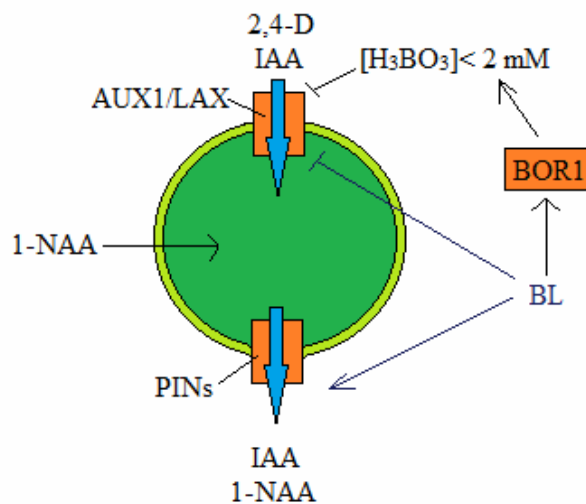
Bylo zjištěno, že hypokotyle jsou velmi citlivé k vnějším signálům, obzvláště ke světelným podmínkám, při kterých rostlina roste. Bylo publikováno, že kapacita stimulace a inhibice růstu vyvolaná působením kyseliny borité v médiu je ovlivněna kvalitou použitého osvětlení (Kocábek *et al.*, 2009).

5. Studie mutanta *bor1 - 1*

Rostlina *Arabidopsis thaliana* s mutací v genu *BOR1* vyžaduje pro normální růst větší množství boru než kontrolní rostliny (Takano *et al.*, 2002). Bylo zjištěno, že bor ovlivňuje metabolismus a transport auxinu. Ve WT za nepřítomnosti boru byl růst hypokotylu inhibován auxinem 2,4-D ve tmě a na červeném světle, zatímco na modrém světle a po přidání boru do média byla inhibice potlačena. U mutanta *bor1-1* za všech koncentrací boru a ve tmě a na červeném světle byla citlivost k auxinu podobná jako ve WT. Pouze na modrém světle si mutant zachoval k inhibičnímu účinku auxinu 2,4-D plnou citlivost (Stočes *et al.*, 2011).

Studie na mutantu vedla k vytvoření modelu, který předpokládá, že bor ve vyšších koncentracích (nad 2 mM) snižuje aktivitu auxinového influxního přenašeče AUX1/LAX. Předpokládaný přísun boru probíhá skrze přenašeč BOR1. Tento model také předpokládá, že aktivita transportéru *BOR1* je specificky regulována působením modrého světla (Obr. 7).

Rovněž bylo zjištěno, že exprese *BOR1* ne vždy koreluje s růstem hypokotylu jako odpovědí na bor a není možno prozatím vysvětlit borem vyvolanou stimulaci a inhibici (Stočes *et al.*, 2011).



Obr. 7 – Model vlivu boru a modrého světla na transport auxinu do/z buňky. Bor ve vyšších koncentracích inhibuje činnost transportního systému AUX1/LAX. Modré světlo podporuje syntézu *BOR1*, inhibuje činnost transportního systému AUX1/LAX a podporuje syntézu přenašečů PINs (zpracováno podle Stočes *et al.*, 2011)

6. Cíl práce

Předložená bakalářská práce byla zaměřena na studium růstových reakcí rostlin *Arabidopsis thaliana* L. ke kyselině borité (H_3BO_3) a auxinu 2,4-D. Práce byla rozdělena na dvě etapy. Cílem první etapy bylo zjistit, jak recesivní mutace v genu *NIP5;1* ovlivňuje růst rostlin vystavených různým koncentracím H_3BO_3 . Ve druhé etapě bylo cílem zjistit, zda bor, prostřednictvím kanálu NIP5;1, mění citlivost růstových reakcí těchto rostlin k auxinu 2,4-D. V obou etapách bylo rovněž cílem zjistit, zda jsou tyto reakce ovlivněny kvalitou světla.

7. Materiál a metody

7. 1. Rostlinný materiál

Experimenty byly provedeny na experimentální rostlině huseníčku rolním, *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. Byl použit T-DNA mutant *nip5;1* s defektem v genu *NIP5;1* kódujícím kanál pro transport kyseliny borité (H_3BO_3) (Takano et al. 2006) a odpovídající ekotyp Columbia (Col-0). Semena mutanta *nip5;1* byla laskavě poskytnuta prof. Toru Fujiwara (University of Tokyo, Japan).

7. 2. Růstové reakce

Experimenty probíhaly ve dvou etapách. Semenáčky mutanta *nip5;1* a kontrolní rostliny Col-0 byly nejdříve kultivovány na základním MS médiu (Murashige and Skoog 1962) doplněném o vybrané koncentrace kyseliny borité (H_3BO_3) (0,1; 1; 2; 3; 5 a 10 mM) ve tmě, na modrém nebo červeném světle. Ve druhé etapě byl studován vliv H_3BO_3 (v koncentracích 0; 0,1 a 2 mM) na citlivost růstových reakcí mutanta a kontrolního genotypu k auxinu 2,4-D (koncentrace 0; 10^{-6} ; $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} M) a to v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo, červené světlo).

7. 2. 1. Příprava média

Pro přípravu 2 litrů základního MS média bylo rozpuštěno 20 g sacharózy, 390,4 mg pufru MES a 8,604 g MS media (Caisson USA) asi v 500 ml destilované vody. Poté byl roztok doplněn destilovanou vodou na objem 2 l a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 6,1 postupným přikapáváním 1M KOH. Do půllitrových autoklávovatelných lahví bylo naváženo 2,8 g fytoagaru (Duchefa Biochemie, Česká republika) pro ztužení média. Láhve byly doplněny připraveným roztokem média do objemu 400 ml a následně byla provedena sterilizace média v autoklávu. Pro vlastní experimenty bylo sterilní médium rozlito v laminárním boxu do plastových Petriho misek o průměru 90 mm (20 ml média do jedné misky). Pro první etapu experimentu byla upravena koncentrace boru v médiu tak, že do 120 ml média bylo napipetováno dané množství 1M kyseliny borité (240 μ l H_3BO_3 pro finální koncentraci 1 mM, 480 μ l pro 2 mM, 720 μ l pro 3 mM, 1200 μ l pro 5mM a 2400 μ l pro 10 mM). Pro druhou etapu experimentu byla vytvořena

média s koncentrací boru 0, 0,1 a 2 mM. Do média s přidaným borem byl přidán auxin 2,4-D ze zásobního roztoku o koncentraci 10^{-2} M tak, aby konečná koncentrace auxinu v médiích byla 0; 10^{-6} ; $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} M.

7. 2. 2. Příprava semen

Navážená semena byla nejprve stratifikována, aby se zvýšila homogenita klíčení. S tímto účelem byla semena vložena do mikrozkuvek s destilovanou vodou a umístěna v lednici při teplotě 4°C po dobu 3-4 dnů. Po této stratifikaci byla semena povrchově vysterilizována pomocí 1,5% roztoku Savo (Bochemia). Pipetou byla odebrána sterilní voda a byl přidán roztok Sava, který za občasného protřepání mikrozkuvky působil na semena 30 min. Po uplynutí doby byla semena pomocí pipety šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Takto upravená semena byla připravena pro výsev na agarové médium.

7. 2. 3. Výsev semen

Výsev byl prováděn v laminárním boxu za sterilních podmínek. Byla použita automatická pipeta, jejíž špička byla seříznuta skalpelem kvůli snadnější průchodnosti semen špičkou pipety. Ostří skalpelu bylo namočeno v 96% etanolu a ožehnuto v plameni lihového kahanu, aby se zabránilo kontaminaci. Semínka byla vyseta na povrch základního MS média, v počtu asi 140 semen v každé misce. Po výsevu byly Petriho misky zalepeny páskou z netkané textilie (Softpore, Batist s. r. o), zabaleny do alobalu a označeny. Misky se semeny byly umístěny do kultivační komory (Snijders Scientific B. V., Holandsko) ve vertikální poloze při teplotě 23°C, na 2-3 dny, dokud semena nevyklíčila.

7. 2. 4. Kultivace semen na médiu s borem a/nebo auxinem

V laminárním boxu byla naklíčená semena přenesena na povrch obohaceného MS média. V první etapě bylo použito médium s upravenou koncentrací boru (0,1; 1; 2; 3; 5 a 10 mM) a ve druhé etapě bylo použito médium s upravenou koncentrací boru (0; 0,1 a 2 mM) společně s různými koncentracemi auxinu 2,4-D (0; 10^{-6} ; $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} M). Pomocí sterilní jehly bylo přeneseno průměrně 13 semenáček do jedné řady na každou

misku. Misky byly označeny a zalepeny páskou. Část misek byla umístěna do kultivační komory s modrým osvětlením, část do komory s červeným osvětlením a část určená pro růst ve tmě byla zabalena do alobalu a umístěna do komory s libovolným osvětlením. Pro experimenty s modrým světlem byly použity zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Philips, USA; ozáření $10 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), jako zdroj červeného světla byly použity zářivky Philips TLD36W/15-Red (Philips USA; ozáření $10 \text{ mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$). Ozáření světla byla měřena pomocí přenosného spektrometru (model LI-1800; Li-Cor, Lincoln, NE). Rostliny v miskách byly kultivovány při teplotě 23°C po dobu devíti dní.

7. 2. 5. Měření růstu

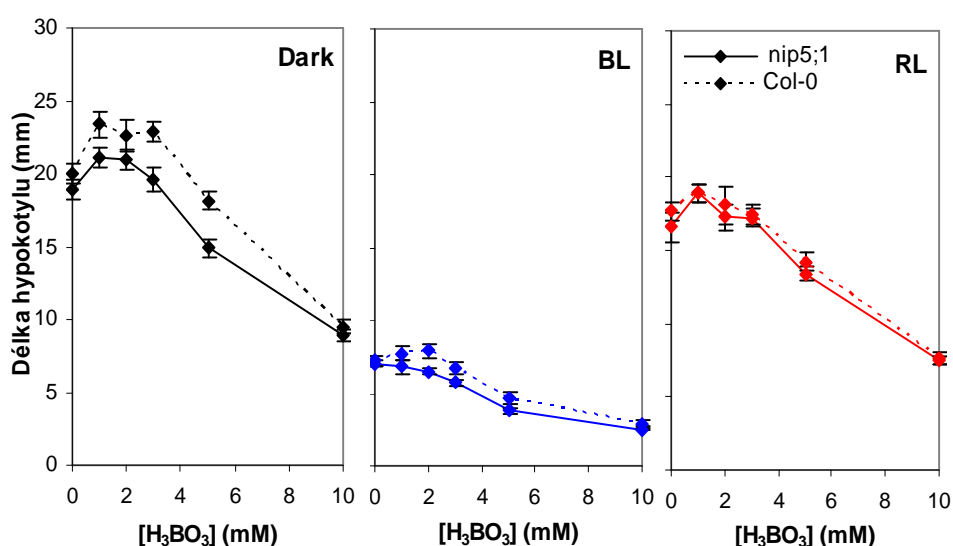
Po uplynutí doby inkubace byly měřeny délky hypokotylu a kořene jednotlivých rostlinek. Pomocí pinzety byly vytaženy z Petriho misky a přiloženy na milimetrovou folii, která byla podložena černým papírem. Naměřené hodnoty byly zaznamenány do tabulky a poté dále zpracovány v programu Microsoft Office Excel 2003. Výsledky byly vyneseny do grafů.

8. Výsledky - studium růstových reakcí

8. 1. Studium vlivu boru

Pro studium vlivu kyseliny borité (H_3BO_3) na růst hypokotylu a kořene mutanta *Arabidopsis nip5;1* a odpovídající kontrolní rostliny Col-0 byly semenáčky po dobu devíti dní kultivovány na médiích s vybranými koncentracemi boru a za různých světelných podmínek: tma, modré světlo, červené světlo.

8. 1. 1. Růstové reakce hypokotylu



Obr. 8 - Růst hypokotylu ekotypu Col-0 a mutanta *nip5;1* v závislosti na koncentraci kyseliny borité (H_3BO_3) a kvalitě osvětlení (tma, modré světlo, červené světlo). Hodnoty grafu reprezentují výsledky čtyř nezávislých experimentů \pm SE. V každém experimentu bylo měřeno průměrně 13 rostlin.

Semenáčky kontrolní rostliny Col-0 rostoucí za tmy měly dlouhé, křehké a bledě žluté hypokotylu. V médiu bez boru dosahovaly průměrné délky 20 mm. Po přidání kyseliny borité na koncentraci 1 mM došlo ke stimulaci asi 17 %. Při koncentraci 3 mM již byla stimulace nižší, 14 %. Při dalším zvyšování koncentrace boru v médiu došlo naopak k inhibici, při 5 mM o 10 % a při 10 mM již o 53%. Etiolizované hypokotylu mutantní rostliny *nip5;1* reagovaly podobně, ale kapacita stimulace byla nižší a inhibice nastala dříve než u kontrolní rostliny. Na médiu bez boru měly hypokotylu *nip5;1*

průměrnou délku 18,9 mm. Po přidání kyseliny borité na koncentraci 1 mM a 2 mM nastala stimulace o 11 %, při koncentraci 3 mM byl růst stimulován o 4 % a při vyšší koncentraci nastala inhibice růstu, o 21 % při 5 mM a o 53 % při 10 mM (stejně jako u kontrolní rostliny Col-0) (Obr. 8, Dark).

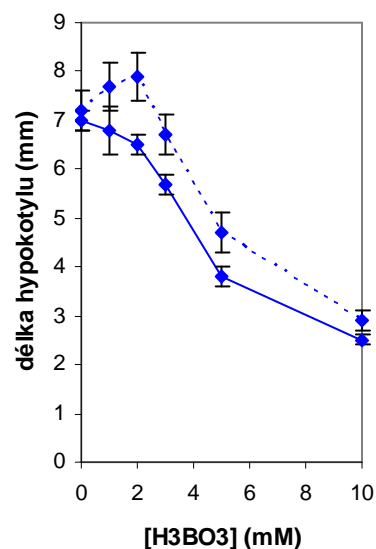
Na modrém světle byly hypokotyly kontrolní rostliny Col-0 krátké, silné a sytě zelené a na mediu bez boru dosahovaly délku 7,2 mm (Obr. 8, BL, Obr. 9). Po přidání kyseliny borité na koncentraci 1 mM byl růst hypokotylu stimulován o 7 %. Nejvyšší stimulace bylo dosaženo při koncentraci 2 mM, a to 10%. Při dalším zvyšování množství boru v mediu došlo k inhibici. Při 3 mM o 7 %, při 5 mM o 35 % a při 10 mM o 60 %. U mutantní rostliny *nip5;1* byla průměrná délka hypokotylu na mediu bez boru 7,0 mm. Na rozdíl od kontrolní rostliny Col-0 po přidání kyseliny borité do média nebyla stimulace růstu hypokotylu pozorována, naopak, došlo k inhibici růstu. Při 1 mM boru v mediu byla inhibice 3 %, při 10 mM 64 % (Obr. 8, BL, Obr. 9).

Na červeném světle byly hypokotyly pouze o něco kratší, než hypokotyly rostoucí ve tmě, zelené a silné. Na mediu bez boru měly semenáčky kontrolní

rostliny Col-0 průměrnou délku 17,7 mm. Růst hypokotylu byl stimulován po přidavku boru na 1 mM o 7 %. V koncentraci 2 mM byla stimulaci již jen 2 % a při dalším zvyšování množství boru v mediu docházelo k inhibici růstu. Při 3 mM nastala slabá inhibice o 1 %, při 5 mM o 20 % a při 10 mM o 57 %. Hypokotyly mutantu *nip5;1* měly průměrnou délku na mediu bez boru 16,6 mm. Po přidavku boru na 1 mM nastala stimulace růstu o 14 %. Při 2 a 3 mM byla stimulace 4%, při dalším zvyšování boru docházelo k inhibici. O 19 % při 5 mM a o 55 % při 10 mM (Obr. 8, RL).

8. 1. 2. Růstové reakce kořene

Kořeny reagovaly na zvyšování koncentrace kyseliny borité citlivěji než hypokotyly. U kořenů nebyla pozorována žádná stimulace růstu indukovaná borem. Naopak, po přidání kyseliny borité do média okamžitě docházelo k inhibici. Mutantní



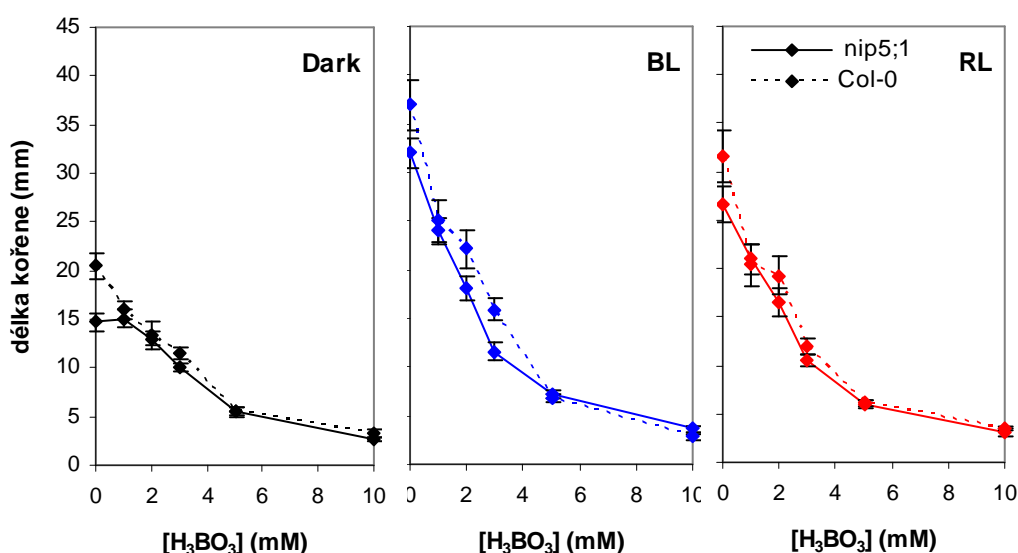
Obr. 9 – Detail růstu hypokotylu *A. thaliana* (kontrolní rostliny Col-0 a mutantní rostliny *nip5;1*) v modrém světle.

rostlina *nip5;1* reagovala za všech světelných podmínek na zvyšování boru s menší citlivostí než kontrolní rostlina.

Ve tmě dosahovaly kořeny nejmenší délky. U kontrolní rostliny Col-0 byla průměrná délka na médiu bez boru 20,5 mm. Po přidání kyseliny borité do média došlo k okamžité inhibici, při koncentraci 1 mM o 22 % a při 10 mM o 82 %. U mutanta *nip5;1* byla průměrná délka na počátečním médiu 14,7 mm. Při koncentraci 1 mM nebyly pozorovány žádné změny v růstu kořene. Při dalším zvyšování koncentrace byl již růst inhibován, a to o 12 % při 1 mM a o 82 % při 10 mM (Obr. 10).

Podle očekávání byl růst kořenů stimulován modrým světlem. Průměrně kořeny dosahovaly největší délky a na zvyšování boru reagovaly nejcitlivěji. Průměrná délka kořenů u kontrolní rostliny Col-0 na médiu bez boru byla 36,9 mm. Po přidavku boru na koncentraci 1 mM došlo k inhibici o 32 % a při 10 mM šlo již o 92 %. Kořeny mutanta *nip5;1* měly na médiu bez boru průměrnou délku 32 mm, při 1 mM 25 % a při 10 mM 89 % (Obr. 10).

Na červeném světle byla průměrná délka kořenů na médiu bez boru u Col-0 31,6 mm. Po přidání kyseliny borité na koncentraci 1 mM nastala inhibice o 35 %. Při 10 mM byla inhibice 89 %. Mutantní rostlina *nip5;1* měla na médiu bez boru délku kořenů 26,7 mm. Po přidavku boru na 1 mM nastala inhibice o 21 %, po přidání boru na 10 mM o 88 % (Obr. 10).

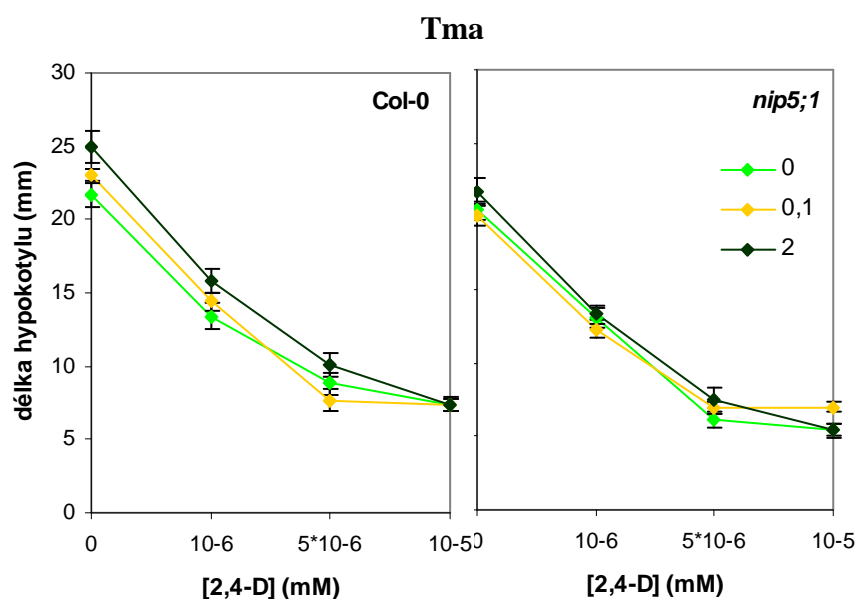


Obr. 10 - Růst kořene ekotypu Col-0 a mutanta *nip5;1* v závislosti na koncentraci kyseliny borité (H₃BO₃) a kvalitě osvětlení (tma, modré světlo, červené světlo). Hodnoty grafu reprezentují výsledky ze čtyř nezávislých experimentů ± SE. V každém experimentu bylo měřeno průměrně 13 rostlin.

8. 2. Studium vlivu boru na citlivost k auxinu

Ve druhé etapě byl zjišťován vliv boru na citlivost růstových reakcí rostlin k auxinu 2,4-D. Rostliny byly kultivovány na médiích s koncentrací kyseliny borité 0, 0,1 a 2 mM a současně s přidavkem auxinu o koncentracích 0; 10^{-6} ; $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} mM. Zároveň byl sledován vliv světelných podmínek na tyto reakce (tma, modré světlo a červené světlo).

8. 2. 1. Růstové reakce hypokotylu

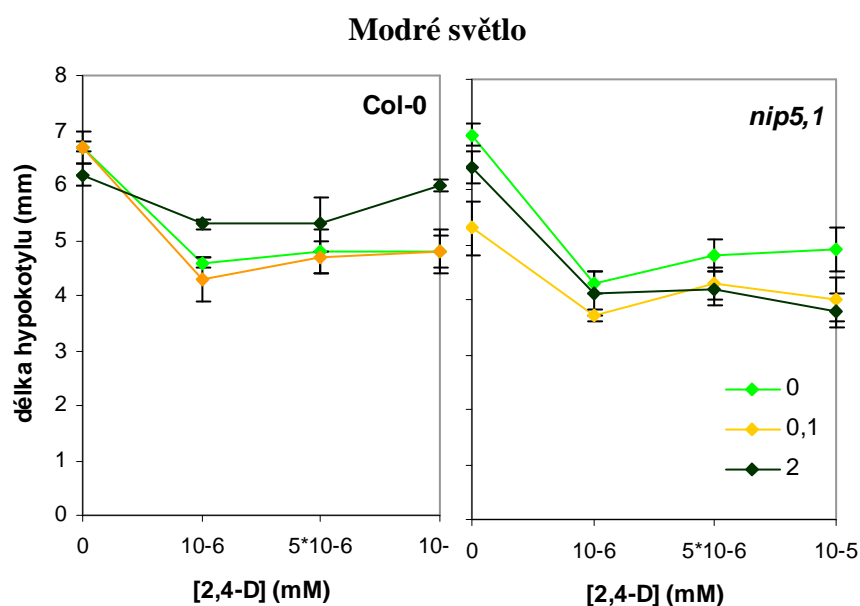


Obr. 11 – Rostliny kultivované ve tmě, kontrolní rostlina Col-0 a mutant *nip5;1*. Vliv různých koncentrací boru (0; 0,1; 2 mM) v závislosti na koncentraci auxinu 2,4-D na délku jejich hypokotylu. Hodnoty grafu reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů \pm SE. V každém experimentu bylo měřeno průměrně 13 rostlin.

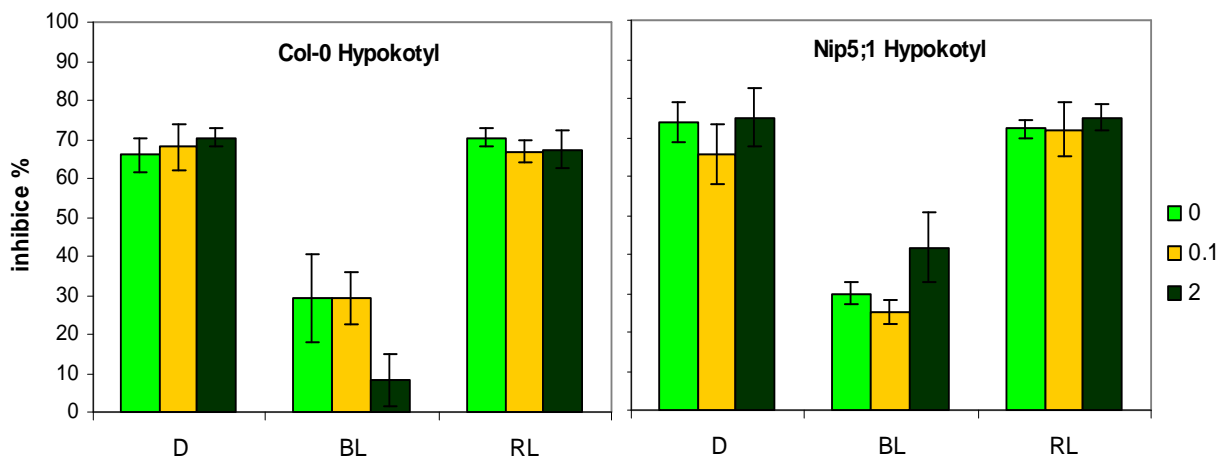
Rostliny na médiu bez auxinu a bez boru měly délku hypokotylu 21,7 mm. Přídavek auxinu do média měl za následek inhibici růstu hypokotylu, nepřímo úměrnou zvyšující se koncentraci auxinu. Při růstu na médiu s 10^{-6} mM auxinu nastala inhibice o 40 %, při $5 \cdot 10^{-6}$ mM inhibice o 65 % a při 10^{-5} mM byla inhibice 70% (Obr. 11). Kyselina boritá přidaná do média v koncentracích 0,1 nebo 2 mM neovlivňovala inhibiční účinek auxinu na růst hypokotylů Col-0 (Obr. 11).

U mutantní rostliny *nip5;1* na médiu bez auxinu i bez boru byla průměrná délka hypokotylu 20,4 mm. K přidanému auxinu reagoval *nip5;1* o trochu citlivěji než WT. Při koncentraci 10^{-6} mM nastala inhibice 50 % a při 10^{-5} mM byla inhibice 75 %. Stejně

jako u kontrolní rostliny zde nebyl pozorován výrazný vliv rostoucí koncentrace boru na inhibici vyvolanou auxinem.



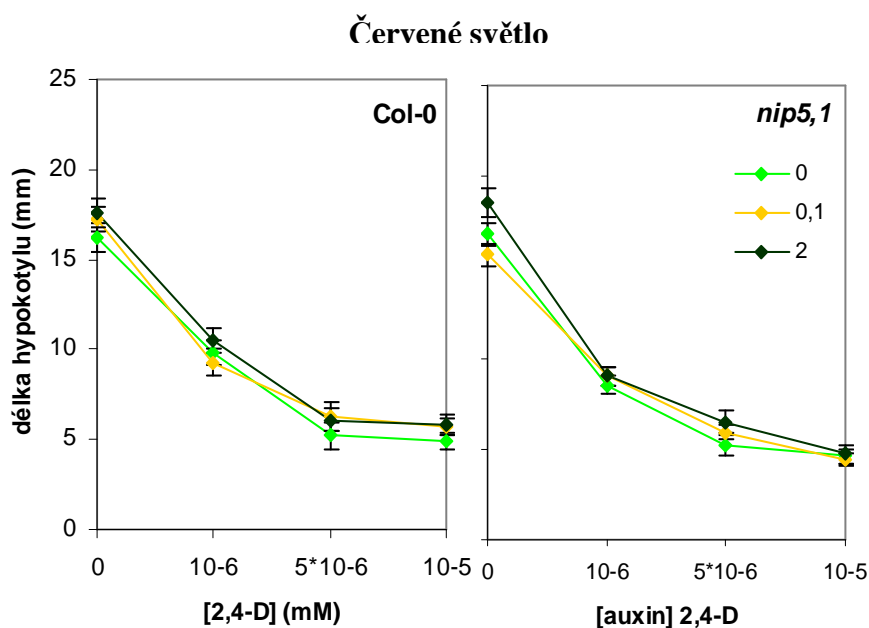
Obr. 12 – Rostliny kultivované na modrém světle, kontrolní rostlina Col-0 a mutant *nip5;1*. Vliv různých koncentrací boru (0; 0,1; 2 mM) v závislosti na koncentraci auxinu 2,4-D na délku jejich hypokotylu. Hodnoty grafu reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů ± SE. V každém experimentu bylo měreno průměrně 13 rostlin.



Obr. 13 – Graf znázorňující kapacitu inhibice u rostlin Col-0 a *nip5;1* kultivovaných na médiu s koncentrací auxinu 10⁻⁵ mM a na modrém světle. Hodnoty reprezentují výsledky tří nezávislých experimentů ± SE. V každém experimentu bylo měreno průměrně 13 rostlin.

Kontrolní rostliny Col-0 kultivované na modrém světle měly na médiu bez boru a bez auxinu průměrnou délku hypokotylů 6,7 mm. K přidanému auxinu reagovaly

s nejmenší citlivostí, kapacita inhibice byla při všech koncentracích 30%. Bylo pozorováno, že bor v médiu snižuje kapacitu inhibice vyvolanou auxinem. Při koncentraci 2 mM boru byla inhibice snížena na 10 % (Obr. 12). Mutant *nip5;1* na čistém médiu reagoval shodně s kontrolní rostlinou. Jeho počáteční délka byla 7 mm a kapacita inhibice byla, stejně jako u Col-0, přibližně 30 % při všech koncentracích auxinu. Oproti kontrolní rostlině u mutanta neměl bor na kapacitu inhibice výraznější vliv. Ta byla na všech koncentracích boru okolo 30-40 % (Obr. 12).



Obr. 14 – Rostliny kultivované na červeném světle, kontrolní rostlina Col-0 a mutant *nip5;1*. Vliv různých koncentrací boru (0; 0,1; 2 mM) v závislosti na koncentraci auxinu 2,4-D na délku jejich hypokotylu. Hodnoty grafu reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů \pm SE. V každém experimentu bylo měřeno průměrně 13 rostlin.

Rostliny kultivované na červeném světle reagovaly podobně jako rostliny ve tmě, mezi oběma genotypy nebyl velký rozdíl. Kontrolní rostlina Col-0 měla na médiu bez auxinu a bez boru průměrnou délku hypokotylu 16,2 mm. Po přidavku auxinu na 10⁻⁶ mM nastala inhibice o 40 % a při 10⁻⁵ mM a o 70 % při 10⁻⁵ mM. Bor neměl na kapacitu inhibice způsobené auxinem velký účinek, rozdíl mezi jednotlivými koncentracemi boru nebyl velký. (Obr. 14).

Mutant *nip5;1* reagoval téměř stejně jako kontrolní rostlina, kapacita inhibice byla taktéž obdobná. Zvyšující se koncentrace boru neměla na kapacitu inhibice vliv (Obr. 14).

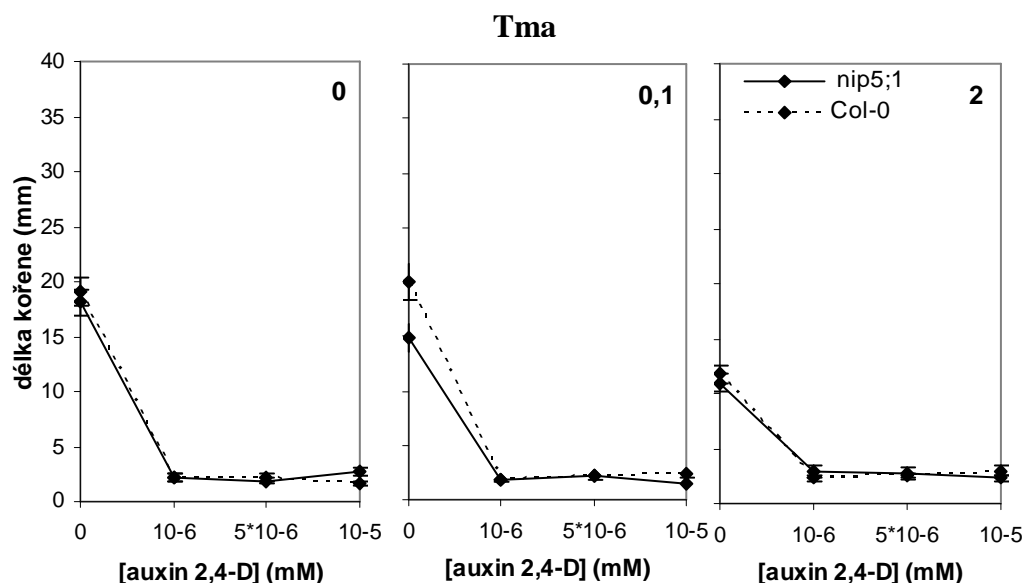
8. 2. 2. Růstové reakce kořene

Na médiu bez auxinu tvořily rostliny jeden hlavní kořen. K auxinu přidanému do média reagovaly rostliny velmi citlivě, a to okamžitým a výrazným zkrácením hlavního kořene a vytvořením většího množství kořenů vedlejších.

Ve tmě na médiu bez auxinu a bez boru byly kořeny kontrolní rostliny Col-0 dlouhé průměrně 19,1 mm. Po přidání auxinu došlo k inhibici růstu kořene o 90 % při všech testovaných koncentracích. Bor částečně snižoval inhibiční efekt auxinu. V koncentraci 2 mM byla inhibice růstu 75 % (Obr. 15).

Mutantní rostlina reagovala na auxin i bor v médiu téměř stejně jako kontrolní rostlina

I zde zvýšená koncentrace boru snížila kapacitu inhibice přibližně o 15 % (Obr. 15).



Obr 15 - Rostliny kultivované ve tmě, kontrolní rostlina Col-0 a mutant *nip5;1*. Vliv různých koncentrací boru (0; 0,1; 2 mM) v závislosti na koncentraci auxinu 2,4-D na délku jejich kořene. Hodnoty grafu reprezentují výsledky ze tří nezávislých experimentů \pm SE. V každém experimentu bylo měřeno průměrně 13 rostlin.

Kořeny rostlin Col-0 kultivovaných na modrém světle dosahovaly na médiu bez auxinu a bez boru průměrné délky 34,3 mm. Po přidání auxinu nastala inhibice růstu kořene o 90 %. Zvýšená koncentrace boru snížila kapacitu inhibice o 10 %. Mutantní rostlina reagovala na auxin citlivěji, na médiu bez auxinu a bez boru měla průměrnou délku 34,2 mm. Po přidání auxinu došlo k inhibici o 95 %. Při zvýšené koncentraci boru byla kapacita inhibice snížena přibližně o 10 %, stejně jako Col-0.

Na červeném světle dosahovaly kořeny Col-0 na čistém médiu průměrné délky 22,8 mm. Auxin inhiboval růst o 85 %. Bor částečně snižoval inhibiční účinek auxinu, přibližně o 10 %. U mutantní rostliny byl průměrný vzrůst kořenů na médiu bez auxinu a bez boru 25,6 mm. Po přidání auxinu do média nastala inhibice o 95 %. Zvýšená koncentrace boru snížila inhibici způsobenou auxinem asi o 15 %.

9. Diskuze

U *Arabidopsis* odpovídá kapacita růstu hypokotylu kapacitě prodlužování buněk. Z jednotlivých měření byly získány údaje, které naznačovaly, zdali dané podmínky vedou ke zmenšení či zvětšení rostlinné buňky.

Bakalářská práce byla rozdělena na dvě části. V první bylo zkoumáno, jak recesivní mutace v genu *NIP5;1* ovlivňuje růst rostlin vystavených různým koncentracím H_3BO_3 . Ve srovnání s kontrolní rostlinou Col-0, mutantní rostlina *nip5;1* reagovala ke změnám koncentrace boru s větší citlivostí, inhibice nastávala při nižší koncentraci boru než u kontrolní rostliny. Rovněž byl zkoumán vliv světelných podmínek na kapacitu stimulace a inhibice vyvolané borem. Nejvyšší stimulace dosahovaly oba genotypy ve tmě, naopak na modrém světle byla největší kapacita inhibice. Mutant *nip5;1* reagoval ve tmě i na červeném světle podobně jako Col-0 (Obr. 8). Největší rozdíl mezi genotypy byl zaznamenán na modrém světle (Obr. 9). Zatímco u Col-0 je růst v rozmezí 1-2 mM boru stimulován, u mutantu žádná stimulace nenastává, naopak, růst je po prvním přídavku boru již v koncentraci 0,1 mM inhibován. Otázkou tedy je, zda by u mutantu *nip5;1* stimulace nastala při nižší koncentraci boru, než jaký je rozsah testovaných koncentrací. Bylo by vhodné provést další pokusy, kdy by rostliny byly kultivovány na médiu s obsahem boru např. 0,01, 0,25, 0,5 mM.

Na základě růstových výsledků reakcí mutantu *nip5;1* k boru je tedy zřejmé, že kanál NIP5;1 je zapojen ve zprostředkování stimulace růstu hypokotylu vyvolané borem, ale pouze na modrém světle.

Podle očekávání kořeny *Arabidopsis* reagovaly na změny koncentrace boru mnohem citlivěji než hypokotyl. Pro studium zapojení NIP5;1 v borem-indukovaném růstu kořene bude tedy v budoucnu nutné použít nižší koncentrace boru, než byly použity v případě studia růstu hypokotylů.

Je známo, že rostlinný růst a vývoj není ovlivňován jen vnějšími signály, jako je zvolené osvětlení nebo množství boru v médiu, ale také vnitřní faktory, jako jsou fytohormony. Ve druhé části práce bylo proto cílem zjistit, zda bor, prostřednictvím kanálu NIP5;1, mění citlivost růstových reakcí *Arabidopsis* k auxinu 2,4-D. Je známo, že při dlouhodobé aplikaci exogenního auxinu nastává u intaktních rostlin inhibice růstu hypokotylu. U Col-0 i *nip5;1* se přítomnost auxinu 2,4-D v médiu projevovala inhibicí růstu hypokotylu přímo úměrně se stoupající koncentrací auxinu. Ve tmě a na červeném světle zvyšující se koncentrace boru neměla na kapacitu inhibice

vyvolané auxinem výrazný vliv (Obr. 11, Obr. 14). Naopak, modré světlo samo o sobě snižovalo citlivost k inhibičnímu efektu auxinu. Zajímavým poznatkem bylo, že po přidání boru do media (na 2mM) u Col-0 se kapacita inhibice růstu hypokotylu auxinem znatelně snížila (asi na 10 %; Obr. 13), kdežto u mutantu *nip5;1* se toto snížení citlivosti neprojevilo, tzn., že růst hypokotylu byl inhibován i při vyšší koncentraci boru stejně jako na médiu bez boru (Obr. 13). Z toho vyplývá, že citlivost k inhibičnímu účinku 2,4-D je snižována borem prostřednictvím kanálu NIP5;1, a to specificky na modrém světle.

Kořeny byly opět citlivým indikátorem přítomnosti auxinu v médiu. Ta se projevila výrazným zkrácením hlavního kořene a vytvořením většího množství kořenů vedlejších. Množství auxinu ani světelné podmínky výrazně neovlivňovaly kapacitu inhibice. Zvýšení koncentrace boru snížilo kapacitu inhibice přibližně o 15 %, ale to bylo nejspíš způsobeno faktem, že již samotný bor v médiu bez auxinu inhiboval růst kořenů (Obr. 15).

Tématem, jak bor ovlivňuje růst hypokotylu, se zabývali i Kocábek a kol. (2009). Studovali efekt zvyšující se koncentrace boru u *Arabidopsis thaliana*, s cílem vysvětlit mechanismus účinku boru na růst hypokotylu na molekulární úrovni. Ke svému výzkumu využili mutantu s defektem v genu *BOR1* a mutanty v genech kódujících receptory pro světelné signály. Základní vzorec růstových odpovědí na zvyšování koncentrace boru se u jednotlivých genotypů příliš nelišil. Bor stimuloval růst hypokotylu v koncentračním rozmezí 1-3 mM, při vyšší koncentraci naopak růst inhiboval. Mnou provedené experimenty s kontrolní rostlinou Col-0 a mutantní rostlinou *nip5;1* tuto skutečnost potvrdily. Čím se však jednotlivé genotypy lišily, byla kapacita stimulace a inhibice hypokotylu v závislosti na kvalitě osvětlení.

Analýzy genu *BOR1* ukázaly, že červené a modré světlo zvyšuje jeho expresi. Tím Kocábek a kol (2009) vysvětlovali vyšší citlivost rostlin k inhibičnímu a stimulačnímu účinku boru na červeném a modrém světle. Ve fenotypu se to projevilo inhibicí růstu na červeném a modrém světle již při nejnižších koncentracích boru (nebyla žádná stimulace). Z analýz mutantu *bor1-1* vyplynul závěr, že BOR1 zprostředkovává stimulaci růstu hypokotylu vyvolanou borem na červeném i modrém světle (Kocábek *et al.*, 2009).

Z pokusů, které jsem provedla na *nip5;1*, vyplývá, že kanál NIP5;1 je zapojen ve zprostředkování stimulace borem specificky na modrém světle. Avšak zatímco u mutantu *bor1-1* je optimum pro bor posunuto na modrém světle do vyšších hodnot,

což potvrzuje, že mutant potřebuje větší množství boru, aby dosáhl ekvivalentní stimulační odpovědi jako WT, u mutantu *nip5;1* byl růst hypokotylu na modrém světle borem inhibován (Obr. 9). Tato skutečnost naznačuje rozdílné mechanismy přenosu boru u obou proteinů.

Na výzkum zkoumající vliv boru na růst hypokotylu navázala studie zjišťující společný vliv boru, světelných podmínek a auxinů, který provedl Stočes a kol (2012). Ve své práci uvedl zajímavý poznatek, že modré světlo u mutantu *bor1-1* nesnižovalo inhibiční účinky auxinu 2,4-D na růst hypokotylu. Jinak řečeno, na modrém světle si hypokotyly tohoto mutantu zachovaly svou citlivost. Naproti tomu u mnou zkoumané mutantní rostliny *nip5;1* modré světlo citlivost k auxinu snižovalo, mutantní rostlina vykazovala přibližně stejné procento inhibice (30 %) jako kontrolní rostlina Col-0. Tato skutečnost naznačuje rozdílné zapojení kanálů BOR1 a NIP5;1 v signálních dráhách světla a auxinu.

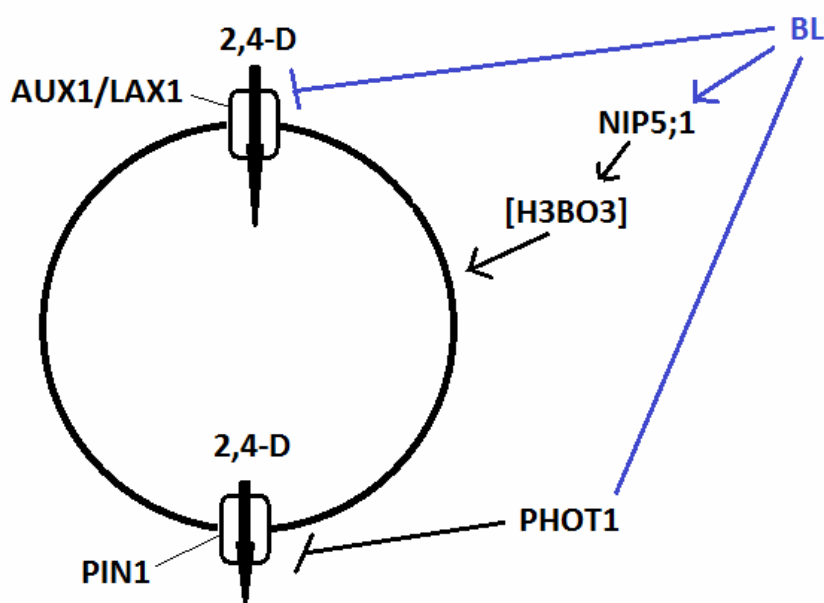
Stočes et al. (2012) dále zjistili, že u Col-0 zvýšená koncentrace boru v médiu (0,1 mM) výrazně snižovala citlivost k inhibičnímu účinku auxinu. U mutantu *bor1-1* bylo potřeba větší množství boru (2 mM), aby se projevil stejný účinek. Z toho byl vyvozen závěr, že borem indukované snížení citlivosti hypokotylu k inhibičnímu účinku auxinu je zprostředkováno kanálem BOR1.

Experimenty, provedené v rámci mé práce s mutantem *nip5;1*, vedly k poněkud odlišným výsledkům. Byl použit stejný kontrolní genotyp Col-0, jako v práci Stočes a kol (2012), ale na modrém světle došlo ke snížení citlivosti hypokotylu k inhibičnímu účinku auxinu až při 2mM koncentraci boru (Obr. 12, Obr. 13). Tato skutečnost může být důsledkem více faktorů. Bylo provedeno příliš málo experimentů, aby výsledky byly věrohodné, nastala chyba při pipetování nebo byla semena sklížena v jiném ročním období (což může mít vliv na obsah a poměry hormonů v semeni). Avšak na rozdíl od Col-0 či mutantu *bor1*, mutantní rostlina *nip5;1* žádné snížení citlivosti hypokotylu k auxinu vlivem boru nevykazovala a růst hypokotylu byl inhibován auxinem při všech koncentracích boru podobně. Výsledky tedy vedou k závěru, že na modrém světle zvýšená koncentrace boru snižuje citlivost k auxinu, a to opět zapojením kanálu NIP5;1. Z toho jsem vyvodila, že modré světlo by mohlo podporovat expresi nebo aktivaci tohoto kanálu.

Bylo zjištěno, že modré světlo snižuje citlivost růstových odpovědí k auxinu, ale dodnes se přesně neví, jaké mechanismy jsou v tomto ději zapojeny. U 2,4-D je známo, že se hromadí v buňkách a nedochází u něj k volné difuzi přes membránu.

Proto předpokládané změny v dráze auxinu probíhají skrze přenašeče z/do buňky. Stočes a kol (2012) se ve své práci zabýval myšlenkou, že modré světlo inhibuje funkci *AUX1*, který zprostředkovává příjem auxinu buňkou, a/nebo stimuluje funkci přenašeče *PIN1*, ten se naopak stará o efflux auxinu ven z buňky. Stejně jako Stočes ve své práci i já se domnívám, že modré světlo může blokovat příjem auxinu buňkou právě inaktivací přenašeče *AUX1*. Při studii proteinu *PIN1* bylo zjištěno, že po ozáření modrým světlem je delokalizován z plazmatické membrány, čímž je snížena intenzita polárního transportu auxinu. U mutantu *phot1* k tomuto jevu nedochází (Blakeslee *et al.*, 2004). To naznačuje, že *PIN1* je inhibován modrým světlem skrze *PHOT1* (Obr. 16). Zablokováním obou přenašečů na modrém světle by se tak podstatně snížila intenzita transportu auxinu.

Vliv boru na citlivost k auxinu by mohl být vysvětlen tak, že bor v buňce zpevní buněčnou stěnu tak, že je odolnější proti účinkům auxinu, ať už stimulačním, nebo inhibičním. Jestli modré světlo podporuje syntézu *NIP5;1*, zjednodušil by se tak příjem boru rostlinou a kontrola nad tímto příjmem (Obr. 16). Je možné, že u mutantu *nip5;1* dochází k vytvoření alternativní cesty příjmu boru skrze jiné kanály a přenašeče, který však neumožňuje takovou kontrolu, jako mechanismus přirozený.



Obr. S – Schéma působení modrého světla na růstové reakce buňky hypocotylu k auxinu

10. Závěr

Předložená bakalářská práce si stanovila dva cíle: zjistit, jestli mutace v genu *NIP5;1* nějak ovlivňuje růstové reakce k boru, a pokud ano, tak jestli bor, prostřednictvím tohoto kanálu má vliv na citlivost k auxinu 2,4-D. Zároveň se zkoumal vliv světelných podmínek na tyto růstové reakce.

Byly provedeny experimenty s *Arabidopsis thaliana*, ekotypem Col-0 a mutantem *nip5;1* s defektem v genu kódujícím kanál pro přenos kyseliny borité. Srovnání růstových reakcí u těchto dvou genotypů přineslo několik nových poznatků. Bylo zjištěno, že kanál NIP5;1 nemá výrazný vliv na růstové reakce rostliny k boru ve tmě a na červeném světle. Pro tento protein je klíčovým modré světlo, na kterém je NIP5;1 nějak zapojen do mechanismu v borem vyvolané stimulaci růstu hypokotylu. Na modrém světle také bor, skrze NIP5;1, snižuje citlivost k inhibičnímu účinku auxinu 2,4-D. Výsledkem této práce je tedy zjištění, že modré světlo je schopno regulovat funkci kanálu NIP5;1. V současné době neexistuje mnoho prací, které by popisovaly funkci boru, transportérů boru, či konkrétně kanálu NIP5;1 v růstových odpovědích hypokotylu k auxinům. Proto, ke správnému pochopení mechanismů zapojených v regulaci růstu rostlin vlivem boru bude potřeba provést mnoho dalších experimentů.

11. Literatura

- 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 responses. *Plant Physiol.* 134: 28-31
- Boerjan W., Cervera M. T., Delaure M., Beeckman T., Dewitte W., Bellini C., Caboche M., Van Onckelen H., Van Montagu M., Inze D. (1995) *superroot*, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* 7: 1405-1419
- Campanoni P., Nick P. (2005) Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2,4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology* 137(3): 939-948
- Pavlová L., Daněk L. (2002) Fotomorfogenese I. Kryptochromy a fototropin. *Biologické listy* 67: 195-205
- Debrieux D., Fankhauser C. (2010) Light-induced degradation of phyA is promoted by transfer of the photoreceptor into the nucleus. *Plant Mol Biol* 73(6): 687-95
- Delbarre A., Muller P., Imhoff V., Guern J. (1996) Comparison of mechanism controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-butanoic acid, and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198: 532-541
- 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: 215-223
- Fellner M. (2009) Role of boron and light signaling pathways in the activity of boron cell transporters during plant growth. Znen. projektu GACR 2009-2012
- Fellner M., Ford E. D., Van Volkenburgh E. (2006) Development of erect leaves hybrid is associated with reduced responsiveness to auxin and light of young seedlings *in vitro*. *Plant Signaling and Behavior* 1: 201-2011

Fellner M., Horton L. A., Cocke A. E., Stephens N. R., Ford E. D., Van Volkenburgh (2003) Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. *Planta* 216: 366-376

Galweiler L., Guan C., Muller A., Wisman E., Mendgen K., Yephremov A., Palme K. (1998) Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in *Arabidopsis* vascular tissue. *Science* 282: 2226-2230

Haga K., Lino M. (1998) Auxin-Growth relationships in maize coleoptiles and pea internodes and control by auxin of the tissue sensitivity to auxin. *Plant physiol.* 117: 1473-1486

Iwai H., Hokura A., Oishi M., Chida H., Ishii T., Sakai S., Satoh S. (2006) The gene responsible for borate cross-linking of pectin Rhamnogalacturonan-II is required for plant reproductive tissue development and fertilization. *Plant Biology* 103 (44): 16592-16597

King J. J., Stimart D. P., Fisher R. H., Bleecker A. B. (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 7: 2023-2037

Kocábek T., Svoboda Z., Al-Zwi A. M., Rolfe S. A., Fellner M. (2009) Boron-regulated hypocotyl elongation in *Arabidopsis* mutants with defects in light signaling pathways. *Environmental and Experimental Botany* 67: 101-111

Kögl F., Haagen-Smit A. J. (1936) *Zeit Physiol Chem* 243,209

Lambert D. H., Cole H., Baker D. E. (1980) The role of boron in plant response to mycorrhizal infection. *Plant and Soil*, Volume 57, Issue 2-3, pp 431-438

Lin C. T., Shalitin D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54: 469-496

Miwa K., Fujiwara T. (2010) Boron transport in plants: co-ordinated regulativ of transporters. *Annals of Botany* 105 (7): 1103-1108

Noh B., Murphy A. S., Spalding E. P. (2001) Multidrug Resistance-like genes of *Arabidopsis* required for auxin transport and auxin-mediated development. *Plant Cell* 13: 2441-2454

Pavlová L., Fischer L. (2011) *Růst a vývoj rostlin*, Karolinum, Praha

Parry G., Delbarre A., Marchant A., Swarup R., Napier R., Perrot-Rechenmann C., Bennett M. J. (2001) Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier station aux1. *Plant J.* 25: 399-406

Raven, J.A. (1980). Short-and long-distance transport of boric acid in plants. *New Phyt.*, 84: 231-249

Smith A. M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R., Amey A. (2010) *Plant Biology*. New York: Garland Science

Stoces Š., Karlick M., Fellner M. (2012) Boron and blue light reduce responsiveness of *Arabidopsis* hypocotyls to exogenous auxins. *Plant Growth Regulation* 66:293-301

Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant physiology*, 5th Ed., Sinauer Associates, Inc., USA

Takano J., Miwa K., Fujiwara T. (2008) Boron transport mechanism: collaboration of channels and transporters. *Trends in plant science* 13(8): 451-457

Takano J., Miwa K., Yuan L., von Wirén N., Fujiwara T. (2005) Endocytosis and degradation of BOR1, a boron transporter of *Arabidopsis thaliana*, regulated by boron availability. *Plant Biology* 102(34): 12276–12281

Takano J., Noguchi K., Yasumori M., Kobavashi M., Gajdos Z., Miwa K., Hayashi H., Yoneyama T., Fujiwara T. (2002) *Arabidopsis* boron transporter for xylem loading. *Nature* 420: 337-340

Takano J., Wada M., Ludewig U., Schaaf G., Wirén von N., Fujiwara T. (2006) The *Arabidopsis* Major intrinsic Protein NIP5;1 Is Essential for Efficient Boron Uptake and Plant Development under Boron Limitation. *The Plant Cell* 18: 1498-1509

Takemiya A., Inoue S., Doi M., Kinoshita T., Shimazakki K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17: 1120-1127

Tanaka M, Fujiwara T (2007) Physiological roles and transport mechanisms of boron: perspectives from plants. *Pflug. Arch.* 456, 671–677

Tariq M., Mott C. J. B. (2007) The significance of Boron in Plant Nutrition and Environment-A Review. *Journal of Agronomy* 6 (1): 1-10

Thomine S., Lelievre F., Boufflet M., Guern J., Barbier-Brygoo H. (1997) Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiol* 115:533-542

12. Seznam zkratek

2,4-D	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
4-Cl-IAA	4-chlorindolyl-3-octová kyselina
BL	modré světlo
Col-0	ekotyp Columbia
D	tma
IBA	indol-3-máselná kyselina
MES	2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
MS medium	Murashige-Skoog médium
NAA	naftyloctová kyselina
RL	červené světlo
IAA	3-indolactová kyselina
WT	wild type, kontrolní rostlina