



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Úloha iontových kanálů v auxinem indukované inhibici
růstu hypokotylu rajčete *Solanum lycopersicum* L.**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Gabriela Táborská
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2015

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Gabriela Táborská
Název práce	Úloha iontových kanálů v auxinem indukované inhibici růstu hypokotylu rajčete <i>Solanum lycopersicum</i> L.
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2015
Abstrakt	<p>Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda signální dráha kontrolující inhibiční účinky exogenních auxinů na prodlužovací růst intaktních rostlin rajčete zahrnuje funkční aniontové kanály a zda tato dráha interaguje se světelnými signálními drahami. Použili jsme genetického přístupu spočívajícího ve fyziologické analýze mutanta rajčete <i>7B-1</i>, který ukazuje redukovanou citlivost k exogennímu auxinu a sníženou citlivost k modrému světlu. V podmínkách <i>in vitro</i> jsme studovali růstové reakce rostlin rajčete k exogennímu auxinu NAA a k inhibitoru aniontových kanálů DIDS, a to jako funkci kvality světla. Výsledky našich experimentů ukázaly, že prodlužovací růst hypokotylu rajčete u WT cv. Rutgers a mutanta <i>7B-1</i> je vlivem exogenních auxinů inhibován a že světlo tyto inhibiční účinky auxinu snižuje. Experimenty rovněž potvrdily, že etiolovaný hypokotyl mutanta <i>7B-1</i> má sníženou citlivost k exogennímu auxinu. Bylo dále zjištěno, že ve srovnání s WT má hypokotyl <i>7B-1</i> specificky na modrém světle zvýšenou citlivost</p>

k inhibitoru DIDS. Z výsledků lze tedy vyvodit, že funkční produkt 7B-1 je zapojen do signální dráhy regulující reakci etiolovaného hypokotylu k auxinu. Dále lze uvažovat, že specificky na modrém světle genový produkt 7B-1 zvyšuje množství či citlivost aniontových kanálů citlivých k DIDS. Nakonec lze vyvodit závěr, že aniontové kanály citlivé k DIDS nejsou zapojeny v auxinem indukované inhibici délky hypokotylu. Je však možné také říci, že tyto aniontové kanály se na procesu prodlužování hypokotylu rajčete podílejí.

Klíčová slova	Auxin NAA, inhibitor iontových kanálů DIDS, délka hypokotylu, světelné podmínky (tma, modré světlo, červené světlo)
Počet stran	44
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Gabriela Táborská
Title of thesis	Role of ion channels in auxin-induced inhibition of hypocotyl growth in tomato <i>Solanum lycopersicum</i> L.
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2015
Abstract	<p>The aim of this bachelor thesis was to elucidate whether signaling pathway controlling inhibitory effects of exogenous auxins on elongation of intact tomato involves functional anion channels and whether this pathway interacts with light signaling. We used genetic approach consisting in physiological analysis of tomato mutant <i>7B-1</i> showing reduced responsiveness to exogenous auxin and reduced responses to blue light. In conditions <i>in vitro</i> we studied tomato growth responses to exogenous auxin NAA and to an inhibitor anion channels DIDS, as a function of light quality. Results of our experiments showed that hypocotyl elongation in WT cv. Rutgers and mutant <i>7B-1</i> is inhibited by exogenous auxin and that light reduces the hypocotyl responses to auxin. Experiments confirmed that etiolated hypocotyl of <i>7B-1</i> is less responsive than WT to exogenous auxin. It was also observed that in comparison with WT, <i>7B-1</i> hypocotyl is more sensitive to the inhibitor DIDS specifically in</p>

blue light conditions. Based on the results we conclude that functional product 7B-1 is involved in a signaling pathway regulating responses of etiolated hypocotyl to auxin. The results suggest that specifically in blue light conditions gene product 7B-1 enhances number or sensitivity of DIDS-sensitive anion channels. Finally, we conclude that anion channels sensitive to DIDS are not involved in auxin-induced inhibition of hypocotyl elongation. However, our results also suggest that anion channels are involved in the proces of tomato hypocotyl elongation.

Keywords

Auxin NAA, inhibitor of ion channels DIDS, length of hypocotyl, light conditions (dark, blue light, red light)

Number of pages

44

Number of appendices

0

Language

Czech

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D., za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Ráda bych poděkovala Skupině molekulární fyziologie, především doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., za cenné rady a ochotu při vypracování této bakalářské práce.

Obsah

SEZNAM ZKRATEK.....	9
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	10
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	12
2.1 Auxiny.....	12
2.1.1 Historie a obecná charakteristika.....	12
2.1.2 Transport auxinu.....	13
2.1.3 Signální dráhy transdukce auxinu.....	13
2.1.4 Efekt auxinu: buněčné prodloužení.....	14
2.1.5 Efekt auxinu: rostlinný tropismus.....	16
2.1.6 Rozvíjející efekty auxinu.....	16
2.2 Světelné podmínky.....	16
2.3 WT a <i>7B-1</i> mutant rajčete <i>Solanum Lycopersicum L.</i>	17
2.4 Iontové kanály a jejich inhibitory.....	18
3 MATERIÁL A METODY.....	21
3.1 Biologický materiál.....	21
3.2 Roztoky a chemikálie.....	21
3.3 Přístrojová technika a pomůcky.....	21
3.4 Metody.....	22
3.4.1 Příprava média.....	22
3.4.2 Výsev.....	23
3.4.3 Transfer.....	23
3.4.4 Měření.....	24
4 VÝSLEDKY A DISKUSE.....	26
4.1 Růstové reakce mutantu <i>7B-1</i> k auxinu NAA v závislosti na světelných podmínkách.....	26
4.2 Růstové reakce mutantu <i>7B-1</i> k inhibitoru iontových kanálů (DIDS) v závislosti na světelných podmínkách. Studium vlivu iontových kanálů na auxinem indukovanou inhibici růstu hypokotylu a kořene mutantu <i>7B-1</i> v závislosti na světelných podmínkách.....	29
5 ZÁVĚR.....	35
6 LITERATURA.....	36

SEZNAM ZKRATEK

4-Cl-IAA	4-chloroindolyl-3-octová kyselina
CPD	cefpodoxim
CRY	krytochrom
2,4-D	2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina
DIDS	kyselina 4,4-diisothiokyanstilben-2,2-disulfonová
IAA	kyselina indolyl-3-octová
MES	morpholinoethane sulfonic acid
MS	Murashige and Skoog
NAA	α -naftyloctová kyselina
NOA	kyselina naftoxyoctová
NPA	kys. 1-N-naftylftalamová
PAA	kyselina fenylloctová
PHOT	fototropin
PHY	fytochrom
TIBA	kyselina 2,3,5-trijodbenzoová
WT	wild-type

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Růst a rozvoj rostlin je regulován mnoha faktory. Délku hypokotylu rostlin je možné regulovat třemi způsoby: rostlinnými hormony: auxiny (Cleland, 1995), gibberelliny, cytokininy (Chory *et al.*, 1994; Cary *et al.*, 1995), ethylen (Ecker, 1995), kyselina abscisová či brassinosteroidy (Clouse, 1996), přírodními faktory, jako je světlo (Elich *et Chory*, 1994) či mechanickou stimulací (Jones *et Mitchell*, 1989). Prvním rostlinným hormonem studovaným na rostlinách, byl auxin. Účinek auxinu na růst rostlin je často studován pomocí exogenní aplikace auxinu na experimentální rostliny. Exogenní auxin (přírodní i syntetický) je krátce po aplikaci (sekundy, minuty) schopen indukovat prodlužování intaktních rostlin. Zajímavé také je, že exogenní auxin stimuluje rovněž prodlužování segmentů (Cleland, 1995). Avšak u intaktních rostlin v časovém rozmezí hodiny a dny, je prodlužovací růst hypokotyly exogenním auxinem inhibován (Fellner, 1997; Thomine *et al.*, 1997).

Existují důkazy o tom, že elementy signálních drah auxinů mohou být aniontové kanály, které hrají důležitou úlohu v přenosu signálu a regulaci turgoru v buňkách vyšších rostlin (Schroeder *et Hedrich*, 1989; Ward *et al.*, 1995). Například, Keller and Van Volkenburgh, (1996) ukázaly, že depolarizace, která předchází auxinem indukovanou hyperpolarizaci v buňkách ovesné koleoptile, je citlivá k exogennímu Cl^- a může být blokována inhibitorem 9-AC. Thomine *et al.*, (1997) ukázali, že u etiolizovaných rostlin inhibitory aniontových kanálů, jako jsou 9-AC, DIDS, SITS a IAA-94 jsou schopny eliminovat inhibiční účinek exogenního auxinu na prodlužování hypokotyly.

V rámci prohloubení znalostí problematiky byla v teoretické části práce zpracována literární rešerše na téma úloha iontových kanálů v auxinem indukované inhibici růstu hypokotyly rajčete *Solanum lycopersicum* L. Jako experimentální rostlin bylo použito mutanta *7B-1* a odpovídající kontrolní rostliny cv. Rutgers (WT). Tento mutant je typický tím, že kromě své rezistence k abiotickým stresům na modrém světle (Fellner *et Sawhney*, 2002; Piterková *et al.*, 2012), ukazuje u etiolovaných rostlin nižší růstové reakce k exogenním auxinům (Fellner, dosud nepublikované výsledky). Experimentální část bakalářské práce se zabývá studiem růstových reakcí mutanta *7B-1* k auxinu NAA v závislosti na světelných podmínkách. Současně se také zabývá tím, jak mutant *7B-1* reaguje k inhibitoru iontových kanálů (DIDS), a zda zablokování aniontových kanálů inhibitorem DIDS

může vést k eliminaci inhibičního účinku exogenního auxinu na růst hypokotylu. V neposlední řadě se práce zabývá tím, zda možné zapojení aniontových kanálů v auxinem indukované inhibici prodlužování hypokotylu může být ovlivněno kvalitou světla.

Bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav experimentálních botaniky Akademie věd České republiky. Experimenty byly finančně podpořeny Evropským sociálním fondem (projekt č. CZ.1.07/2.3.00/30.0004) a MŠMT (projekt č. LO1204).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Auxiny

2.1.1 Historie a obecná charakteristika

Prvním fytohormonem, který byl studován na rostlinách, byl auxin. Tento hormon je schopen regulovat míru buněčného prodloužení ve stoncích a mnoho dalších aspektů rozvoje rostlin jako jsou například apikální dominance, iniciace růstu adventivních kořenů, rozvoj ovoce, rozvoj meristému. Spolupracuje také s ostatními rostlinnými hormony, jako jsou cytokininy, gibberelliny, ethylen, kyselina abscisová či brassinosteroidy. Auxiny se spolu s cytokininy od ostatních rostlinných hormonů liší tím, že je rostliny vyžadují pro životaschopnost.

Objev auxinu souvisí se studiem fototropismu a gravitropismu. Pojmenování auxin z řečtiny auxein, což znamená vzrůst nebo růst dostal tento fytohormon na základě Wentova pokusu, který provedl v roce 1926 (Went, 1926). F.W.Went ve svém pokusu demonstroval, že aktivní substance uvolněná ze špiček koleoptile ovsu po rozptýlení na želatinovém bloku podporuje buněčné prodloužení a tím růst částí koleoptile.

Kolem roku 1930 bylo zjištěno, že auxin je kyselina indolyl-3-octová (IAA), která se vyskytuje ve všech rostlinách. Později byly objeveny další auxiny. IAA je ovšem ze všech auxinů fyziologicky nejdůležitější a vyskytuje se nejhojněji. Všechna rostlinná pletiva jsou schopna produkovat nízké hladiny IAA, ovšem jako hlavní zdroj IAA slouží apikální meristém a mladé listy rostliny (Ljung *et al.*, 2001). Kyselina indolyl-3-octová může být v rostlině hromaděna, ovšem pokud je její koncentrace v rostlině již optimální nebo je odpověď na ni již dokončena, je degradována. K degradaci může docházet enzymaticky i neenzymaticky (např. světlem).

Později byly ve vyšších rostlinách objeveny další auxiny, mezi které patří, např. 4-chloroindolyl-3-octová kyselina (4-Cl-IAA), kyselina fenyloctová (PAA), kyselina indolyl-3-máselná. Jelikož je struktura kyseliny indolyl-3-octové poměrně jednoduchá, bylo syntetizováno mnoho derivátů s podobnými vlastnostmi, které dostaly pojmenování syntetické auxiny, mezi které můžeme zařadit, např. α -naftyloctovou kyselinu (NAA), 2,4-dichlorofenoxyoctovou kyselinu (2,4-D) či 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoovou kyselinu (dicamba) (Taiz *et Zeiger*, 2010). Aby

mohlo docházet k procesu regulace rozvoje rostliny auxinem, musí být tento fytohormon rostlinou transportován.

2.1.2 Transport auxinu

Bylo zjištěno, že auxin je transportován z apikální části do bazální části rostliny. Tento typ transportu se nazývá polární transport a byl objeven téměř ve všech rostlinách. Není nijak ovlivněn polohou pletiva ani gravitací, vyžaduje však energii potřebnou ke vstupu (influx) a výstupu (efflux) auxinu z buněk.

Bylo objeveno, že polární transport je řízen chemiosmotickým potenciálem (Rubery *et* Sheldrake, 1973; Raven, 1975; Goldsmith *et* Goldsmith, 1977). Chemiosmotický model transportu auxinu nám ukazuje, že vstup (influx) auxinu je řízen protonovou hnací silou ($\Delta E + \Delta pH$) skrz plazmatickou membránu, zatímco výstup (efflux) auxinu je řízen membránovým potenciálem ΔE . Influx auxinu je řízen protonovými symportéry, které patří do rodiny proteinů AUX1/LAX (Bennett *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2006). Efflux auxinu je řízen PIN a ABCB transportními proteiny (Blakeslee *et al.*, 2005). U ABCB transportních proteinů slouží jako zdroj energie ATP. Polární tok auxinu je řízen polárně lokalizovanými proteiny effluxu, které se vyskytují na koncích vedoucích buněk. Tento model byl ověřen v celých rostlinách (Li *et al.*, 2005). Influx a efflux auxinu může být inhibován různými látkami – inhibitory. Efflux může být inhibován NPA, TIBA, CPD či gravacinem, naopak influx může být inhibován, např. NOA.

Transport auxinu je regulován transkripcí genů, posttranskripčními mechanismy a také dalšími faktory jako jsou fosforylace, interakce s regulačními proteiny, proteolytické procesy a složení membrány. Mezi nejvýznamnější faktory, které regulují transport auxinu, patří hormony, pohyb proteinů a flavonoidy (Taiz *et* Zeiger, 2010).

2.1.3 Signální dráhy transdukce auxinu

Transdukce signálu probíhá pomocí signálních drah tak, že nejdříve dochází k navázání malých skupin komplexů, složených z receptorů a enzymů, které regulují degradaci proteinů přes ubikvitin proteasomovou dráhu. Nejprve komplex receptor-enzym po aktivaci auxinem označí specifické transkripční represory pro proteolýzu, výsledkem je aktivace a deprese genů regulovaných auxinem. Tento mechanismus funguje pro většinu odpovědí auxinu. Odlišný typ proteinového receptoru auxinu se

uplatňuje při netranskripční aktivaci a mobilizaci H^+ -ATPázy plazmatické membrány, způsobující rychlé okyselení buněčné stěny a buněčné prodloužení.

Jako hlavní receptory auxinu byly označeny komplexy složené z proteinu, který patří do rodiny TIR1/AFBa proteinů (Dharmasiri *et al.*, 2005a, 2005b; Kepinski *et al.*, 2005). Auxin spojí SCF^{TIR1} komplex s proteinem z rodiny AUX/IAA. Výsledný komplex slouží jako receptor, který umožňuje auxinu regulovat formou signálu nejrůznější procesy.

Na TIR1 signálních dráhách auxinu se podílí dvě rodiny transkripčních regulačních proteinů, mezi které patří ARFs a AUX/IAA. Auxin response factors (ARFs) jsou nukleární proteiny s krátkou dobou života, které se vážou na specifické sekvence DNA, nazývané auxin response elements (AuxREs) za účelem aktivace nebo represe genů transkripce (podle typu navázaného ARFs). Proteiny AUX/IAA patří mezi důležité regulátory genové exprese vyvolané auxiny. Regulují transkripci genu nepřímo po navázání na protein ARF a vazbou na DNA (Kim *et al.*, 1997).

Signální dráha zodpovědná za genovou expresi, vyvolanou auxinem, začíná vazbou auxinu na receptor TIR1/AFB (součást SCF^{TIR1} ubikvitin ligázového komplexu) a následnou interakcí tohoto komplexu s proteinem AUX/IAA prostřednictvím auxinu. Následkem toho dochází k rychlé ubikvitinaci a následné hydrolýze AUX/IAA proteinu v proteazomu. Tím dojde k uvolnění transkripčních faktorů ARF. Proteiny ARF stimulují nebo potlačují genovou expresi (záleží na typu ARF). Auxin-responsive (AR) geny dělíme do dvou skupin primární neboli brzké geny a pozdní geny. Geny, které jsou přímo aktivovány signalizací AUX/IAA-TIR/AFB nazýváme primárně odpovědné geny neboli brzké geny. Čas potřebný pro expresi těchto brzkých genů se pohybuje v rozmezí několika minut až hodin. Všechny geny primární odpovědi jsou vyvolané přes SCF^{TIR1} signální dráhu a zahrnují geny *AUX/IAA*, *SAUR* a geny *GH3*. Obecně mají tyto geny tři hlavní funkce, mezi které patří transkripce, signalizace a konjugace/katabolismus auxinu. Druhá skupina genů se nazývá pozdní geny. Tyto geny jsou aktivovány přibližně 2-4 hodiny po nárůstu auxinu a uplatňují se při adaptaci rostliny na stresové podmínky (Taiz *et Zeiger*, 2010).

2.1.4 Efekt auxinu: buněčné prodloužení

Mezi účinky auxinu můžeme zařadit buněčné prodloužení. Auxin podporuje růst stonků dvouděložných rostlin a jednoděložných koleoptilí, ale inhibuje růst kořene.

Efekt auxinu na růst rostlin je obvykle studován aplikací exogenního auxinu. Exogenní auxin (přírodní a umělý) stimuluje prodloužení určitých částí rostliny (Cleland, 1995). Ovšem po delší časové škále je růst hypokotylu exogenním auxinem inhibován, což odpovídá supraoptimálním účinkům auxinu (Boerjan *et al.*, 1995; King *et al.*, 1995; Fellner, 1997; Thomine *et al.*, 1997). Hladina endogenního auxinu v prodlužovacích částech zdravé rostliny je téměř optimální pro růst. Přidáme-li tedy exogenní auxin, způsobíme stimulaci růstu, ovšem pouze krátkodobou. V případě etiolovaných sazenic je citlivost k supraoptimálním koncentracím auxinu vyšší, než je tomu u rostlin, které vyrostly na světle. Pokud odstraníme zdroj endogenního auxinu z prodlužovacích částí rostliny, tak míra růstu rapidně klesne.

V případě kořene auxin inhibuje prodloužení kořene tím, že stimuluje produkci ethylenu, který také inhibuje prodloužení kořene (Stepanova *et al.*, 2005, 2007). Nedávno bylo zjištěno, že tyto dva hormony působí při ovládní růstu v pletivech kořene rozdílně. Pokud zabráníme biosyntéze ethylenu a přidáme auxin o nízké koncentraci, pak je růst nedotčených kořenů stimulován. Vyšší koncentrace auxinu však růst kořene inhibují. Vysoké koncentrace auxinu, které podporují růst stonků a koleoptilí (Pitts *et al.*, 1998; Rahman *et al.*, 2002), růst kořenů inhibují (Rahman *et al.*, 2007). Kořeny rostlin tedy pro svůj růst potřebují auxin o nízké koncentraci.

Růst, který je stimulován auxinem, vyžaduje energii a je poměrně rychle inhibován metabolickými inhibitory. Dále je tento růst inhibován proteiny, např. cykloheximidem inhibitory RNA syntézy. Aby mohlo dojít k buněčnému prodloužení, musí nejprve dojít k roztažení buněčné stěny. K roztažení buněčné stěny dochází ve třech po sobě následujících krocích: Nejprve buňka přijímá vodu skrz plazmatickou membránu, což je řízeno gradientem vodního potenciálu ($\Delta\Psi_w$). Buněčná stěna je tuhá a neohebná a tak stoupá tlak turgoru. Enzymatickým rozvolněním buněčné stěny a v důsledku tlaku turgoru dochází k rozšíření buňky.

Podle všeobecně uznávané hypotézy kyselého růstu jsou v působení auxinu na buněčnou stěnu zapojeny vodíkové ionty. Jako zdroj vodíkových iontů slouží H^+ -ATPáza přítomná v plazmatické membráně. Aktivita H^+ -ATPázy stoupá (působením ABP1 proteinu) jako odpověď na auxin (Rayle *et al.*, 1970; Hager *et al.*, 1971; Moloney *et al.*, 1981).

2.1.5 Efekt auxinu: rostlinný tropismus

Růst rostlin ovlivňuje mnoho reakcí, které vyvolávají přírodní faktory. Mezi nejvýznamnější patří: fototropismus, gravitropismus a thigmotropismus (Blancaflor *et* Masson, 2003). Fototropismus, který probíhá ve všech výhoncích i v některých kořenech, můžeme definovat jako růst směrem ke zdroji světla. Zajišťuje, aby se do listů dostalo světlo potřebné k fotosyntéze (Darwin, 1880). Gravitropismus můžeme definovat jako změny růstu v důsledku působení gravitace. Kořeny rostou směrem dolů a stonek a listy směrem nahoru (Friml *et* Palme, 2002). Thigmotropismus můžeme definovat jako růst s ohledem na dotek. Tyto přírodní faktory mohou působit i dohromady. Nedávné studie ukázaly, že správný růst kořene vyžaduje gravitropismus i thigmotropismus. (Massa *et* Gilroy, 2003).

Jak už bylo uvedeno, auxin může být rostlinou transportován polárně nebo laterálně. K laterálnímu transportu auxinu dochází v důsledku působení světla, kdy je auxin transportován do stinné části rostliny. Do tohoto procesu jsou zapojeny fototropiny, receptory modrého světla, jejichž aktivita je stimulována modrým světlem (Quail, 2002). Ukázalo se, že fosforylace fototropinů indukuje laterální transport auxinu do stinné části koleoptile, kde vyvolává buněčné prodloužení. Výsledkem je tedy, že ve stinné části rostliny probíhá růst rychleji, než je tomu v osvětlených částech rostliny. Nedávné studie ukázaly, že by špička koleoptile mohla vnímat gravitaci a tím by mohla přemístit auxin do spodní strany (Taiz *et* Zeiger, 2010).

2.1.6 Rozvíjející efekty auxinu

Mezi rozvíjející efekty auxinu patří apikální dominace, růst adventivních kořenů, vývoj meristému, vývoj ovoce. Auxin se používá při procesu zvaném partenokarpie. Při zrání ovoce se kromě auxinu uplatňuje i ethylen, jehož biosyntézu auxin podporuje. Syntetické auxiny se používají jako herbicidy, kdy indukují nadměrné rozšíření buněčné stěny a následnou smrt rostliny.

2.2 Světelné podmínky

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů (přírodních), které regulují chování rostlin (Franklin *et al.*, 2005). Citlivost na světlo je u rostlin zajištěna pomocí vysoce sofistikovaných fotoreceptorů. U rostlin můžeme najít tři hlavní skupiny fotoreceptorů, mezi které patří fytochromy (PHY), kryptochromy (CRY) a

fototropiny (PHOT). Fytochromy jsou schopny zachytit červené světlo o vlnové délce 600-800 nm a modré světlo o vlnové délce 400-500 nm (Quail, 2002). Kryptochromy a fototropiny jsou pak fotoreceptory specifické pro modré světlo. Kryptochromy (CRY1 a CRY2) spolu s fytochromy regulují primární buněčné prodloužení a fotoperiodické kvetení. Fototropiny (PHOT1 a PHOT2) regulují otevírání stomat, pohyb chloroplastů a také zprostředkovávají pohyb rostlin ke zdroji světla při fototropismu (Briggs *et al.*, 2002; Lin, 2002).

V rostlinných pletivech jsou hladiny několika hormonů měněny světelnými podmínkami, což bylo dokázáno na několika fotomorfogenetických mutantech (Kraepiel *et al.*, 1994; Tayomasu *et al.*, 1994; Baraldi *et al.*, 1995; Weatherwax *et al.*, 1996; Kraepiel *et al.*, 1997; Volmaro *et al.*, 1998). Elektrofyzikální studie demonstrovaly, že rychlé inhibici růstu, vyvolané modrým světlem, předchází depolarizace plazmatické membrány buněk hypokotylu v ozářených pletivech (Spalding *et al.*, 1989). Dále bylo ukázáno, že iontové kanály jsou zahrnuty v růstu hypokotylu rostliny ozářené modrým světlem (Cho *et al.*, 1996). Genetickými a molekulárními přístupy se podařilo identifikovat kryptochromy v dalších rostlinných druzích, např. v rajčeti (Weller *et al.*, 2001; Perrota *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že v některých systémech je modré světlo zahrnuto v osmoregulaci buňky. Jako příklad můžeme uvést otevírání stomat prostřednictvím fototropinové signální dráhy, která spouští aktivaci protonových pump, draslíkových kanálů a blokování iontových kanálů ve svěracích buňkách (Kinoshita *et al.*, 2001; Lin, 2002).

2.3 WT a 7B-1 mutant rajčete *Solanum lycopersicum* L.

Rajčata jsou jedním z nejvýznamnějších druhů plodin. Mutant rajčete nazvaný 7B-1 je velmi zajímavý pro testování, protože defekt v 7B-1 genu způsobuje unikátní toleranci vůči osmotickému stresu při klíčení na modrém světle a také tato mutace mění odpověď rostliny k auxinu. Toto nás vede k možnosti identifikovat nový společný prvek, který by byl zahrnut jak v signalizaci modrého světla, tak ve stresových signálních drahách a auxinové signalizaci.

Bylo zjištěno, že růst etiolovaného hypokotylu mutanta 7B-1 je značně méně inhibován auxinem než hypokotyl kontrolní nemutované rostliny cv. Rutgers (WT). V případě WT je inhibiční efekt auxinu značně snížen působením modrého světla. U mutanta 7B-1 bylo zjištěno, že semínka, která vyklíčila pod modrým světlem, jsou

odolná proti osmotickému stresu a zasolení specificky pod modrým světlem. Jeho chování může být ovlivněno percepcí modrého světla nebo transdukci signálu (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et Sawhney*, 2001, 2002; Fellner *et al.*, 2005; Fellner *et al.*, 2008). Dále bylo zjištěno, že modré světlo zesiluje inhibiční efekt osmotického stresu, který působí při klíčení rajčat (Fellner *et Sawhney*, 2001, 2002).

Experimenty, které byly na rajčatech provedeny, nám ukazují, že sazenice rajčat při klíčení vyžadují funkční iontové kanály, jejichž množství a/nebo aktivita může být pravděpodobně redukována modrým světlem. Ukázalo se, že gen *7B-1* může sloužit jako negativní regulátor aktivity a/nebo množství iontových a vodných kanálů při klíčení v daných světelných podmínkách (Fellner, dosud nepublikované výsledky). Toto může být také zahrnuto ve fyziologii auxinu vegetativních částí sazenice rajčete. Nabízí se nám otázka, jestli jsou iontové kanály zahrnuty v inhibici prodloužení hypokotylu vyvolané auxinem v rajčeti a jaká je v tomto procesu role genu *7B-1*.

2.4 Iontové kanály a jejich inhibitory

Ve vyšších rostlinách jsou fyziologické procesy, jako např. minerální výživa, uhlíkový a dusíkový metabolismus, růst a rozvoj závislé na rozpuštěných látkách a proudění vody skrz plazmatickou membránu, tonoplast a jiné vnitřní membrány. Přenašeče iontů skrz plazmatickou membránu jsou spojeny s mnoha procesy, které probíhají v rostlinách, např. zavírání průduchů, hormonální signalizace, depolarizace membrány, osmoregulace, regulace růstu a iontová výživa. Pro jednotlivé buňky jsou tyto přenašeče nezbytné, vyskytují se tedy ve všech buněčných membránách rostlinných buněk včetně plazmatické membrány, tonoplastu, endoplazmatického retikula, mitochondrie a chloroplastů (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Roberts, 2006; de Angeli *et al.*, 2007). Membránové iontové kanály a přenašeče aktivují nebo jsou aktivovány depolarizací, hyperpolarizací, světlem či tahem (Tyerman, 1992; Schroeder, 1995; Barbier-Brygoo *et al.*, 2000; Krol *et Trebacz*, 2000; White *et Broadley*, 2001; Roberts, 2006; Teakle *et Tyerman*, 2010). Pomocí elektrofyziologických technik, aplikovaných na různé typy buněk, můžeme odhalit aktivitu rozmanitých iontových kanálů a přenašečů přítomných v plazmatické membráně.

Je všeobecně známo, že iontové kanály hrají důležitou roli při transdukci signálu a regulaci turgoru v buňkách vyšších rostlin (Schroeder *et Hedrich*, 1989;

Ward *et al.*, 1995). Inhibitory iontových kanálů by tedy měly být schopny zabránit šíření odpovědi na tyto signály v příslušných signálních dráhách. V buňkách hypokotylu může aktivace iontových kanálů vést k omezení růstu snížením tlaku turgoru, což představuje hlavní sílu pro buněčný růst (Cleland, 1995). Podle tohoto tvrzení by blokátory iontových kanálů měly stimulovat růst hypokotylu nebo bránit inhibici prodloužení hypokotylu vyvolané biologickými signály. Důkazy pro toto tvrzení byly získány v případě etiolovaných rostlin *Arabidopsis*, kde blokátory iontových kanálů 9-AC, DIDS, SITS a IAA-94 byly schopny působit proti inhibici prodloužení vyvolané auxiny (Thomine *et al.*, 1997). Podobně také ve svěracích buňkách, mohou být iontové kanály zahrnuty v hladině turgoru (Schroeder *et al.*, 1993). Inhibitory iontových kanálů, které působí proti inhibici prodloužení hypokotylu vyvolané auxiny, slabě stimulují prodloužení hypokotylu v nepřítomnosti auxinu. Tento nárůst délky pravděpodobně odráží interakci inhibitorů iontových kanálů s odpovědí na endogenní auxin, nebo to může být vysvětleno nižší aktivitou iontových kanálů. Toto tvrzení je v souladu s modulací iontových kanálů auxiny. Ve svěracích buňkách (Marten *et al.*, 1991) a v buňkách tabáku (Zimmermann *et al.*, 1994) auxiny striktně neaktivují iontové kanály, ale modulují jejich regulaci v závislosti na napětí tak, že usnadní jejich aktivaci malými depolarizacemi. Inhibitory iontových kanálů mají schopnost působit proti odpovědím auxinu a mohou být tedy užitečným nástrojem pro zkoumání signálních drah auxinů.

Nejúčinnější inhibitory iontových kanálů, mezi něž patří DIDS, SITS a 9-AC, jsou schopny vyvolat nárůst délky hypokotylu až na 40%. Změny ve vývoji hypokotylu (inhibice prodloužení délky hypokotylu), dekortikace a indukce růstu adventivních kořenů, tedy tři hlavní odpovědi hypokotylu na auxin, nejsou blokovány všemi inhibitory iontových kanálů. Inhibitor iontových kanálů 9-AC zabraňuje všem třem odpovědím hypokotylu na auxin (Thomine *et al.*, 1997), DIDS zabraňuje pouze inhibici prodloužení délky hypokotylu a dekortikaci (Thomine *et al.*, 1997). Je nutné zmínit, že inhibitory iontových kanálů zasahují pouze do odpovědi na auxin, nikoliv do odpovědi na další rostlinné hormony jako jsou ethylen, cytokiny či kyselina abscisová, a to pouze na úrovni hypokotylu a ne dalších orgánů. Společným rysem inhibitorů iontových kanálů je indukce rozmanitých odpovědí v odlišných orgánech. Existují dvě možná vysvětlení: první vysvětlení zní tak, že několik typů molekul inhibitorů iontových kanálů mohou odrážet nespecifické interakce s cíli, kterými nejsou iontové kanály. Druhé vysvětlení říká, že existuje

množství iontových kanálů, které představují odlišné farmakologické profily a ovládají různé odpovědi rozvoje rostlin. Výsledky podporují teorii ovlivnění inhibitorů iontových kanálů komponenty, které jsou zahrnuty v signalizaci auxinu, a to proto, že a) inhibitory nejen obnovují normální prodloužení hypokotylu, ale také chrání před dekortikací b) inhibitory iontových kanálů 9-AC a DIDS snižují citlivost hypokotylu k auxinu, než aby působily proti inhibici prodloužení vyvolané auxinem c) ovlivnění inhibitorů iontových kanálů s odpověďmi inhibicí růstu je specifické pro auxin.

Bylo zjištěno, že v plazmatických membránách buněk hypokotylu se vyskytují přinejmenším tři odlišné chloridové kanály. Tyto kanály bychom mohli přirovnat ke kanálům, které se vyskytují v plazmatických membránách svěracích buněk. Rozlišujeme kanály typu R (rapidly activating anion efflux channels) (Thomine *et al.*, 1995, 1997), kanály typu S (slowly activating anion efflux channels) (Barbier-Brygoo *et al.*, 1999; Frachisse *et al.*, 2000) a kanály aktivované modrým světlem (Spalding, 2000). Kanály typu R a kanály typu S jsou aktivovány depolarizací membrány. Stejně jako je tomu u svěracích buněk, tak i v buňkách hypokotylu jsou kanály typu R zahrnuty v elektrické signalizaci. Kanály typu S zprostředkovávají udržení aniontového effluxu. Tyto kanály typu S v plazmatických membránách buněk hypokotylu také zasahují do regulace (inhibice) růstu hypokotylu auxiny (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Biologický materiál

K experimentům byla použita semínka dvou genotypů rajčete *Solanum lycopersicum*: cv. Rutgers (izogenní linie; WT) a mutant *7B-1*. Semena obou genotypů byla laskavě poskytnuta Prof. Vipen K. Sawhney (University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada). Mutant *7B-1* byl vyselektován jako spontánní recesivní mutant vyznačující se pylovou sterilitou v podmínkách dlouhého dne (Sawhney, 1997). Později bylo zjištěno, že *7B-1* produkuje zvýšené množství kyseliny abscisové a vyznačuje se zvýšenou tolerancí k abiotickým stresům, a to specificky na modrém světle (Fellner *et* Sawhney, 2002; Fellner *et* Sawhney, 2001, 2002).

3.2 Roztoky a chemikálie

MS (Murashige-Skoog) médium (kat. č. MSP01-50LT, Caisson LABS)

Sacharóza (kat. č. 40135-APO, Lach-Ner s. r. o.)

1 mM Pufr-MES (kat. č. 29834.04, Serva)

0,7 % Agar (kat. č. P1001.1000, Duchefa Biochemie)

1M KOH

Sterilní destilovaná voda

3% Savo (Bochemie a. s.)

70% a 90% Ethanol

10^{-2} M NAA

10^{-2} M DIDS

3.3 Přístrojová technika a pomůcky

Flowbox

Mikrovltná trouba

Růstová komora (Snijders Scientific, Holandsko)

pH metr

Zásobní lahve autoklávovatelné (500 ml)

Magnetické míchadlo a míchátko

Plastové Petriho misky (kulaté, průměr 90 mm)

10 ml pipeta

Erlenmeyerova baňka (3l)

Erlenmeyerova baňka sterilní (250 ml)

Sterilní pinzeta

Sterilní i nesterilní 50 ml plastové zkumavky

Lihový kahan

Zápalky

Bílá lepicí páska (Softpore BATIST s. r. o.)

Alobal

Nesterilní kádinka

Nesterilní sklenička

Pravítko

Sterilní skalpel

3.4 Metody

3.4.1 Příprava média

Do 3l Erlenmeyerovy baňky byly nality 2 l destilované vody. Erlenmeyerova baňka byla umístěna na magnetické míchadlo a následně do ní bylo přidáno 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (Murashige *et* Skoog, 1962) a 390,4 mg pufru-MES. Po promíchání bylo pH vzniklého roztoku upraveno na hodnotu 6,1 tak, že ke vzniklému roztoku byl po kapkách přidáván 1M KOH. Když bylo médium hotové, tak bylo nachystáno

pět zásobních lahví. Do každé lahve bylo přidáno 2,8 g agaru a 400 ml připraveného média. Nakonec byly lahve zavřeny, bylo na ně napsáno jméno a datum přípravy a víčko bylo obaleno alobalem a přelepeno bílou autoklávovací páskou. Lahve byly umístěny do autoklávu, kde bylo médium vysterilizováno a současně se hodnota jeho pH snížila na 5,7. Po vychladnutí byly sklenice umístěny do lednice.

3.4.2 Výsev semen

Nejprve bylo médium dáno na rozeřtání na 5 minut do mikrovlnné trouby. Do flowboxu byly nachystány Petriho misky. Do každé misky bylo sterilní plastovou 50 ml zkumavkou nalito 20 ml média, následně byly misky téměř přiklopeny víčkem, aby médium ztuhlo. Poté byla odpočítána semínka WT cv. Rutgers a mutanta *7B-1*, které byly dány do předem označené nesterilní plastové 50 ml zkumavky. Tyto zkumavky byly naplněny Savem a semínka byla za občasného protřepání povrchově vysterilizovaná po dobu 30 minut. Poté byla semínka pětkrát promyta sterilní destilovanou vodou za pomoci 10 ml pipety. Semínka od každého genotypu byla sterilní pinzetou sázena na Petriho misky (50 semínek na Petriho misku). Pinzeta byla sterilizována ponořením do 90% ethanolu a následným ožehnutím v plameni. Po výsevu byly okraje misek zalepeny bílou páskou z netkané textilie Softpore. Misky se semínky byly ve vertikální poloze, zabaleny alobalem a následně umístěny do růstové komory, kde za stálé teploty 23°C semínka klíčila během 3 až 4 dnů.

3.4.3 Transfer vyklíčených semen

Nejprve bylo médium vloženo na 5 minut do mikrovlnné trouby na rozeřtání. Do flowboxu byly nachystány Petriho misky. Pro přípravu Petriho misek s auxinem NAA bylo do první Erlenmeyerovy baňky nalito pouze 40 ml média, které bylo následně rozlito sterilní 50 ml zkumavkou po 20 ml do dvou Petriho misek. Do druhé Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán auxin NAA v takovém objemu, aby finální koncentrace NAA v médiu byla $5 \times 10^{-7} \text{M}$. Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou po 20 ml do dvou Petriho misek. Do třetí Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán auxin NAA v takovém objemu, aby finální koncentrace NAA v médiu byla 10^{-6}M . Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou po 20 ml do dvou Petriho misek. Do čtvrté Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán auxin NAA v takovém objemu, aby finální koncentrace NAA

v médiu byla $5 \times 10^{-6} \text{M}$. Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou po 20 ml do dvou Petriho misek.

Pro přípravu Petriho misek s auxinem NAA, DIDS a auxinem NAA a DIDS dohromady bylo do první Erlenmeyerovy baňky nalito pouze 40 ml média, které bylo následně rozlito sterilní 50 ml zkumavkou po 20 ml do dvou Petriho misek. Do druhé Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán auxin NAA v takovém objemu, aby finální koncentrace NAA v médiu byla $7 \times 10^{-7} \text{M}$. Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou do dvou Petriho misek. Do třetí Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán DIDS v takovém objemu, aby finální koncentrace DIDS v médiu byla $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou do dvou Petriho misek. Do čtvrté Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 40 ml média, ke kterému byl přidán auxin NAA spolu s DIDS v takových objemech, aby koncentrace NAA v médiu byla $7 \times 10^{-7} \text{M}$ a koncentrace DIDS byla $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Po rozmíchání bylo toto médium rozlito sterilní 50 ml zkumavkou do dvou Petriho misek. Tento postup byl opakován, dokud byly naplněny všechny Petriho misky. Poté byla na jednotlivé misky sázena naklíčená semínka cv. Rutgers a mutanta *7B-1*, tak, aby na každé misce bylo vždy 10 naklíčených semínek. Misky byly zalepeny bílou páskou a popsány (datum a genotyp). Na misky, které byly umístěny do tmy, byla na horní část napsaná čára (pro orientaci, kde se nachází horní část) a po té byly misky ve vertikální poloze zabaleny do alobalu. Misky, které byly umístěny do červeného či modrého světla, byly umístěny ve vertikální poloze do stojánku. Zdrojem modrého a červeného světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue a TLD-36W/15-Red. Maximální svítivost modrého světla při 440 nm byla $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maximální svítivost červeného světla při 660 nm byla $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Nakonec byly misky umístěny do růstové komory, kde byla stálá teplota 23°C. Misky byly v komoře umístěny po dobu jednoho týdne.

3.4.4 Měření rostlin

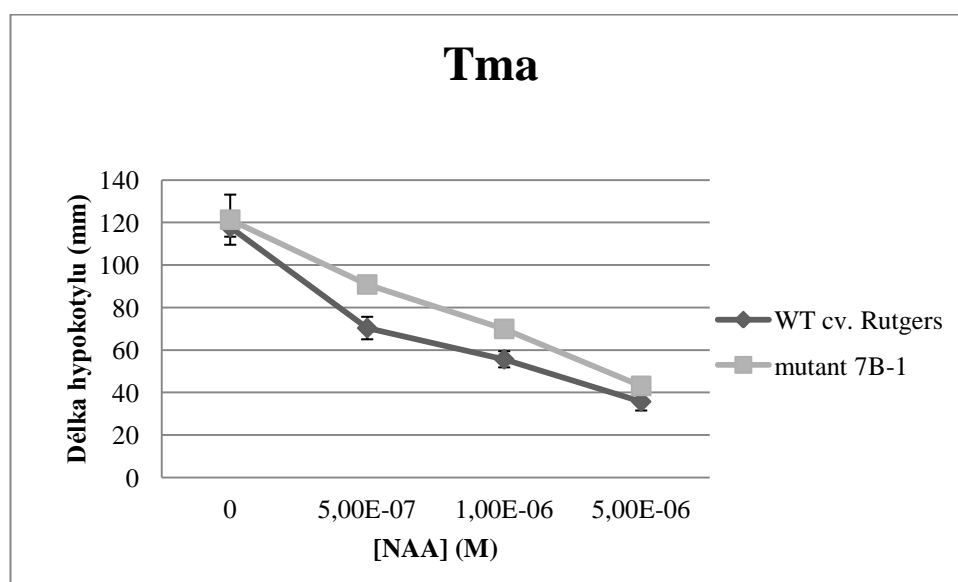
Po uplynutí jednoho týdne od provedení transferu, byly misky z růstové komory vyjmuty. Následně byla změřena délka hypokotylu a kořene jednotlivých rostlin tak, že jednotlivé rostliny byly pomocí pinzety vyjmuty z Petriho misek a po jedné byly nataženy na plastovou kopii milimetrového papíru umístěnou na černém podkladě a následně byla změřena jejich délka podle pravítka na přesnost jednoho milimetru.

Výsledné délky hypokotylu a kořene jednotlivých rostlin byly zapsány do tabulky a následně vyneseny do grafu.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Růstové reakce mutanta *7B-1* k auxinu NAA v závislosti na světelných podmínkách

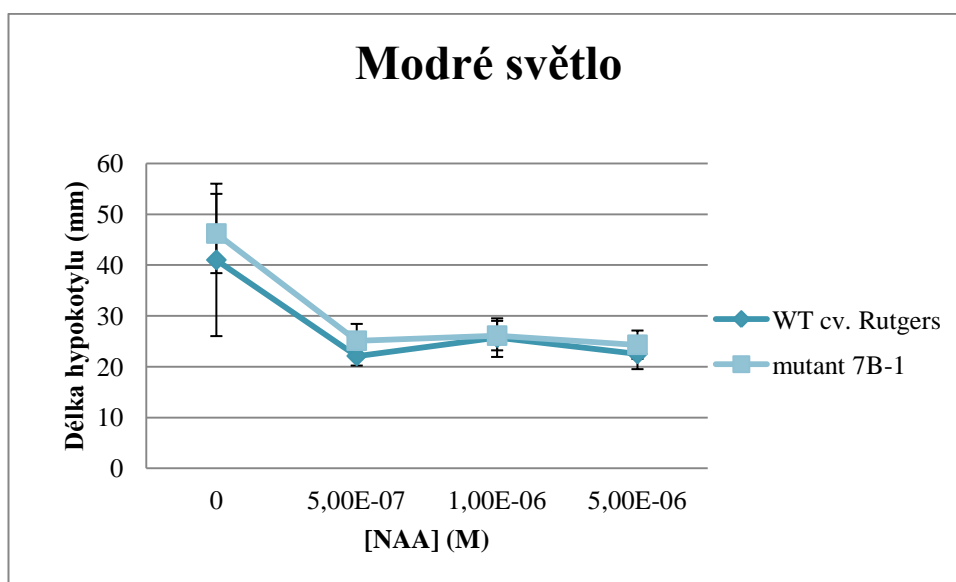
V první části experimentální práce byl sledován vliv auxinů a světelných podmínek (tma, modré světlo, červené světlo) na délku hypokotylu a délku hlavního kořene rajčete. Cílem těchto experimentů bylo: 1) zjistit účinky exogenních auxinů na růst rostlin rajčete a vliv světla na reakci rostlin k auxinům 2) zjistit, zda genový produkt *7B-1* je zapojen v růstových reakcích rostlin k auxinům a ke světlu. V experimentu byly použity čtyři různé koncentrace auxinu NAA 0M, 5×10^{-7} M, 10^{-6} M a 5×10^{-6} M. Pro každou světelnou podmínku byl experiment třikrát zopakován.



Obr. 1 Vliv koncentrace auxinu NAA na délku hypokotylu dvou genotypů rajčete WT cv. Rutgers a mutanta *7B-1* pěstovaných ve tmě po dobu 7 dnů v podmínkách *in vitro*. Uvedená data představují průměrné hodnoty \pm SE, ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu a na každé koncentraci auxinu bylo měřeno 9 rostlin cv. Rutgers a 8 rostlin mutanta *7B-1*.

Obrázek 1 ukazuje, že auxin v testovaných koncentracích redukoval prodlužování etiolizovaných hypokotylů obou genotypů rajčete. U kontrolní rostliny WT došlo k 50% inhibici růstu hypokotylu (z délky 120 mm na délku 60 mm) při koncentraci NAA asi 9×10^{-7} M. U rostlin mutanta *7B-1* docházelo k 50% inhibici klíčení až při koncentraci asi 5×10^{-6} M NAA. Etiolizovaný hypokotyl mutanta *7B-1* tedy ukazuje sníženou citlivost k exogennímu auxinu.

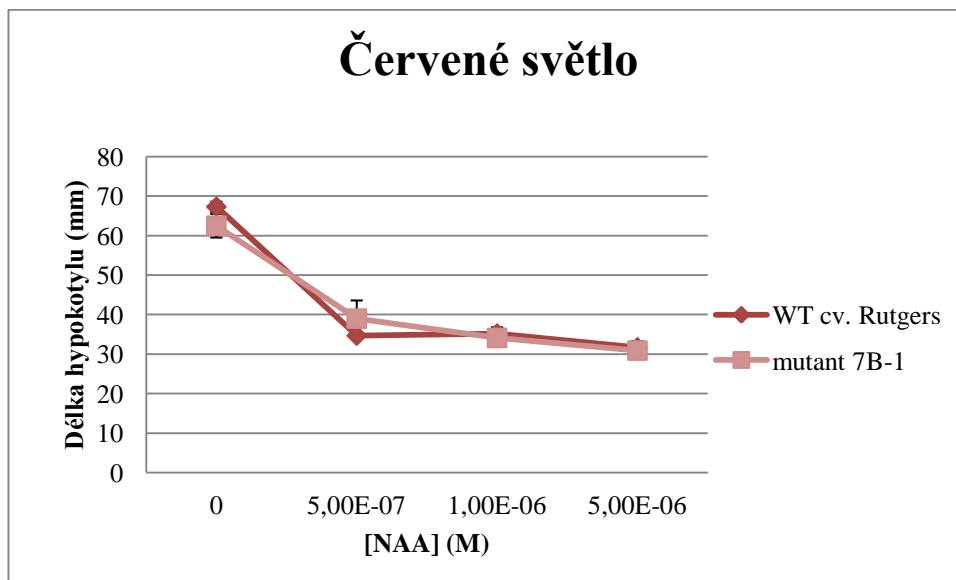
Naše výsledky ukazují, že i když endogenní auxin stimuluje prodlužování a dělení buněk (Cleland, 1995), exogenní auxin v řádu dnů naopak inhibuje prodlužovací růst intaktních hypokotylů rostlin rostoucích ve tmě a v podmínkách *in vitro*. Naše výsledky tak potvrzují dřívější pozorování Boerjan *et al.*, (1995), King *et al.*, (1995), Fellner, (1997) a Thomine *et al.*, (1997). Z výsledků také vyplývá, že genový produkt 7B-1 je zapojen v růstových reakcích rostlin pěstovaných ve tmě k auxinu, a to na základě toho, že u 7B-1 mutanta (gen 7B-1 má špatnou funkci) je inhibiční účinek auxinu oproti cv. Rutgers výrazně nižší (zhruba 5 krát). Protože jde o recesivní mutaci, z výsledků vyplývá, že funkční produkt 7B-1 u rajčete zesiluje reakci etiolizovaného hypokotyly k exogennímu auxinu.



Obr. 2 Vliv koncentrace auxinu NAA na prodlužování hypokotyly testovaných genotypů WT cv. Rutgers a mutanta 7B-1 pěstovaných na modrém světle po dobu 7 dnů v podmínkách *in vitro*. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu a na každé koncentraci auxinu bylo měřeno 10 rostlin cv. Rutgers a 8 rostlin mutanta 7B-1.

Podobně jako ve tmě i na modrém světle exogenní auxin NAA redukoval prodlužování hypokotyly obou testovaných genotypů. Je však zřetelné, že inhibiční účinky auxinu byly u obou genotypů podobné. Dále je patrné, že na modrém světle byly inhibiční účinky vyšších koncentrací auxinů na růst hypokotyly relativně nižší než u rostlin pěstovaných ve tmě. Zatímco nejvyšší testovaná koncentrace NAA $5 \times 10^{-6} \text{M}$ inhibovala prodlužování etiolizovaných hypokotylů asi z 66%, na modrém světle to bylo pouze 45%.

Z výsledků vyplývá, že modré světlo zatím neznámým způsobem snižuje inhibiční účinky exogenního auxinu na prodlužovací růst hypokotylu. Protože na modrém světle je reakce mutantu *7B-1* k NAA podobná jako u nemutovaných rostlin, je zřejmé, že vliv produktu *7B-1* při reakci hypokotylu k auxinu se na modrém světle neuplatňuje.



Obr. 3 Vliv koncentrace auxinu NAA na délku hypokotylu testovaných genotypů WT cv. Rutgers a mutantu *7B-1* pěstovaných na červeném světle po dobu 7 dnů v podmínkách *in vitro*. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu a na každé koncentraci auxinu bylo měřeno 10 rostlin cv. Rutgers a 8 rostlin mutantu *7B-1*.

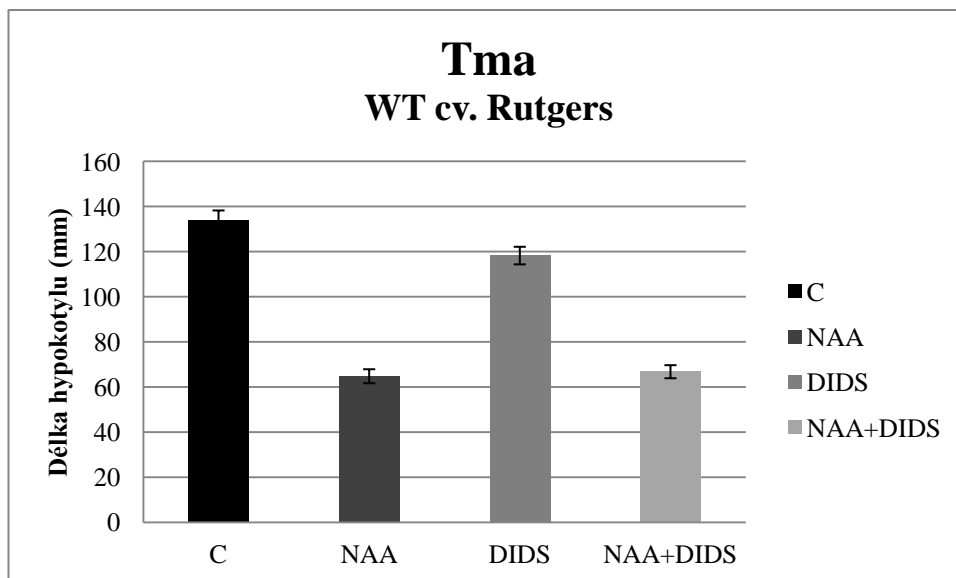
Podobně jako na modrém světle, auxin NAA v testovaných koncentracích inhiboval růst hypokotylu rostlin rostoucích na červeném světle, a to podobně u *7B-1* i WT (Obr. 3). Červené světlo, stejně jako modré, snižovalo inhibiční účinky NAA na růst hypokotylu obou genotypů ve srovnání s inhibicí růstu hypokotylů rostoucích ve tmě. Z výsledků je tedy zřejmé, že funkční produkt *7B-1* je zapojen do signální dráhy regulující reakci hypokotylu k NAA pouze u rostlin rostoucích při absenci světla.

4.2 Růstové reakce mutantu *7B-1* k inhibitoru iontových kanálů (DIDS) v závislosti na světelných podmínkách. Studium vlivu iontových kanálů na auxinem indukovanou inhibici růstu hypokotylu mutantu *7B-1* v závislosti na světelných podmínkách.

Je známo, že iontové kanály hrají důležitou roli při transdukci signálu a regulaci turgoru v buňkách vyšších rostlin (Schroeder *et Hedrich*, 1989; Ward *et al.*, 1995). Inhibitory iontových kanálů by tedy měly být schopny zabránit šíření odpovědí na tyto signály v příslušných signálních dráhách.

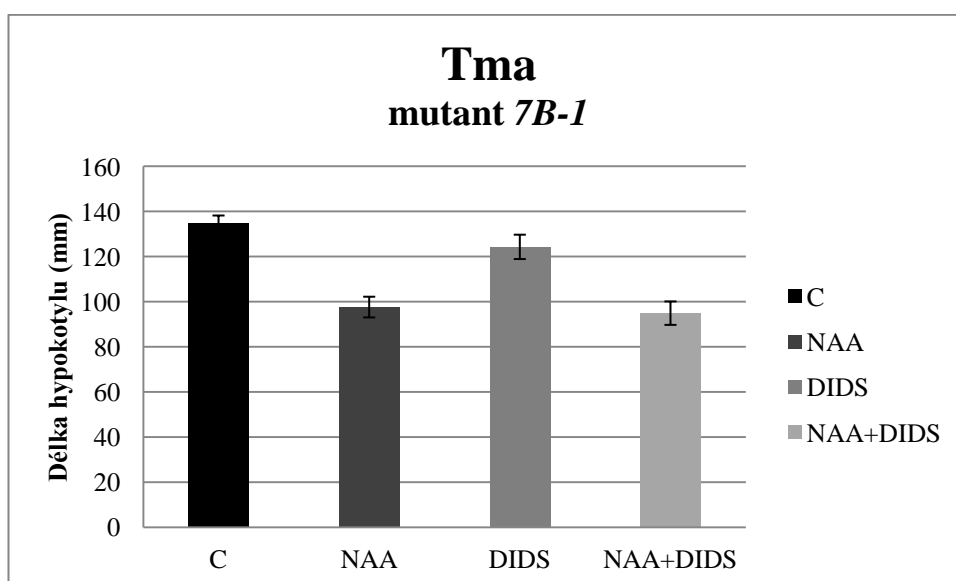
V buňkách hypokotylu může aktivace iontových kanálů vést k omezení růstu snížením tlaku turgoru, což představuje hlavní sílu pro buněčný růst (Cleland, 1995). Podle tohoto tvrzení by blokátory iontových kanálů měly stimulovat růst hypokotylu nebo bránit inhibici prodloužení hypokotylu vyvolané biologickými signály. Toto tvrzení bylo ověřeno v případě etiolovaných sazenic, kde blokátory iontových kanálů 9-AC, DIDS, SITS a IAA-94 byly schopny působit proti inhibici prodloužení vyvolané auxiny (Thomine *et al.*, 1997).

Ve druhé části experimentální práce byly studovány růstové reakce mutantu *7B-1* k inhibitoru iontových kanálů DIDS, a to v závislosti na světelných podmínkách. Dále bylo zjišťováno, zda DIDS je schopen ovlivňovat růstové reakce hypokotylu k exogennímu auxinu NAA, a zda je případná interakce ovlivňována světlem. Cílem těchto experimentů bylo zjistit, jestli mají iontové kanály vliv na auxinem indukovanou inhibici růstu hypokotylu mutantu *7B-1* v závislosti na světelných podmínkách, a dále, zda genový produkt *7B-1* je v tomto procesu zapojen. V experimentech byla použita koncentrace NAA $7 \times 10^{-7} \text{M}$ a koncentrace DIDS $5 \times 10^{-4} \text{M}$. Pro každou světelnou podmínku byl experiment třikrát zopakován.



Obr. 4 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, a směsi NAA + DIDS na délku hypokotylu WT cv. Rutgers, pěstovaného ve tmě. Data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané měřením 8 rostlin v jednom reprezentativním experimentu (u předchozích tří nezávislých experimentů byla testována koncentrace DIDS 10^{-4}M). V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 8 rostlin WT cv. Rutgers.

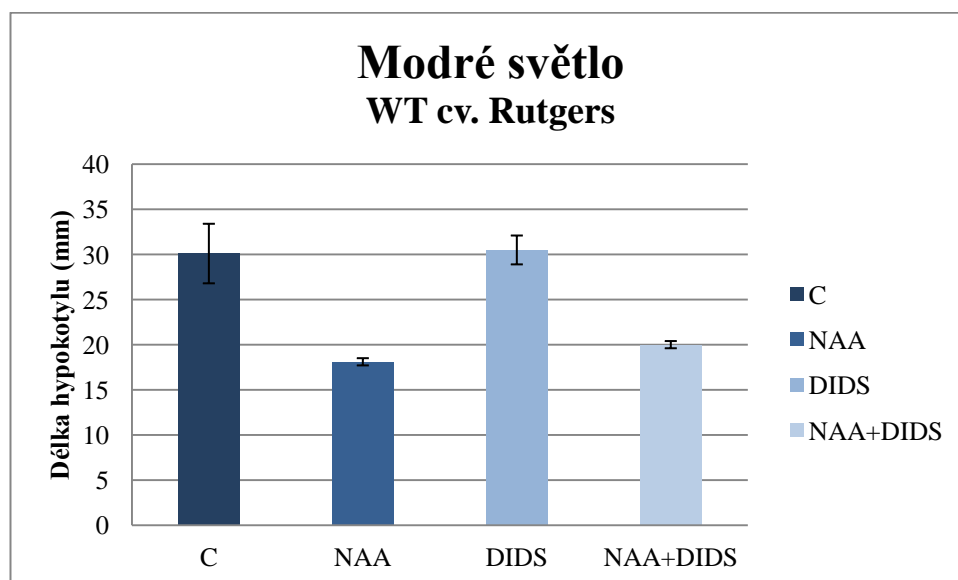
Na Obr. 4 je podle kontrolního vzorku možné pozorovat inhibici délky hypokotylu (asi 50%) vyvolanou auxinem. Po přidání DIDS se délka hypokotylu WT snížila jen velice nepatrně. Dále je možné pozorovat, že rostliny rostoucí na médiu obsahujícím jak NAA tak DIDS byla délka hypokotylu podobná jako délka pozorovaná u rostlin rostoucích pouze za přítomnosti auxinu.



Obr. 5 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, a směsi auxinu NAA + DIDS na délku hypokotylu mutantu *7B-1*, pěstovaného ve tmě. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané měřením 8 rostlin v jednom reprezentativním experimentu (u předchozích tří nezávislých experimentů byla testována koncentrace DIDS 10^{-4}M). V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 8 rostlin mutantu *7B-1*.

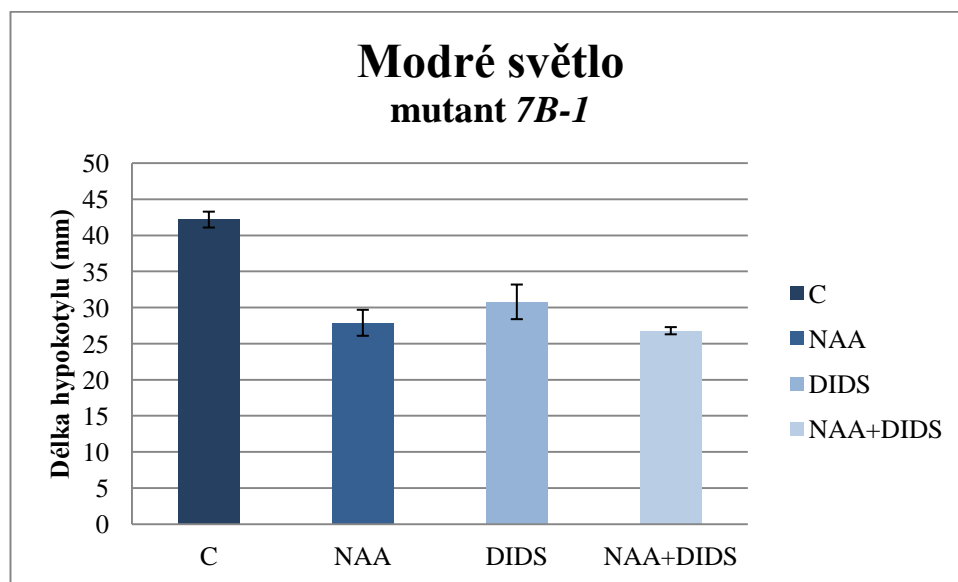
Jak bylo pozorováno v předchozích experimentech s auxinem (Obr.1) auxin inhiboval růst hypokotylu *7B-1* výrazně méně než u WT (Obr. 5). Samotný DIDS pak redukoval délku hypokotylu *7B-1* jen velice nepatrně. Dále je možné pozorovat, že po přidání DIDS do roztoku s auxinem se inhibice vyvolaná auxinem téměř nezměnila.

Naše výsledky naznačují, že blokáce aniontových kanálů vlivem inhibitoru DIDS neměla vliv na inhibici růstu hypokotylu *7B-1* i WT vyvolanou samotným auxinem. Z výsledků lze proto usoudit, že aniontové kanály citlivé k DIDS nezprostředkují inhibiční účinek auxinu na růst etiolovaných hypokotylů. Vzhledem k tomu, že reakce mutantu *7B-1* a WT jsou v tomto smyslu podobné, je možno dedukovat, že u etiolovaných rostlin není produkt *7B-1* zapojen v růstových reakcích hypokotylu k DIDS.



Obr. 6 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, auxinu NAA + DIDS na délku hypokotylu rostlin WT cv. Rutgers pěstovaných na modrém světle. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 10 rostlin WT cv. Rutgers.

Podobně jako u rostlin WT rostoucích ve tmě, u kontrolních rostlin rostoucích na modrém světle je možné pozorovat inhibici délky hypokotylu vyvolanou auxinem, zatímco samotný DIDS neměl na růst hypokotylu WT výrazný vliv (Obr. 6). Dále bylo možné pozorovat, že po přidání DIDS do roztoku s auxinem, se inhibice růstu hypokotylu vyvolaná auxinem téměř nezměnila.

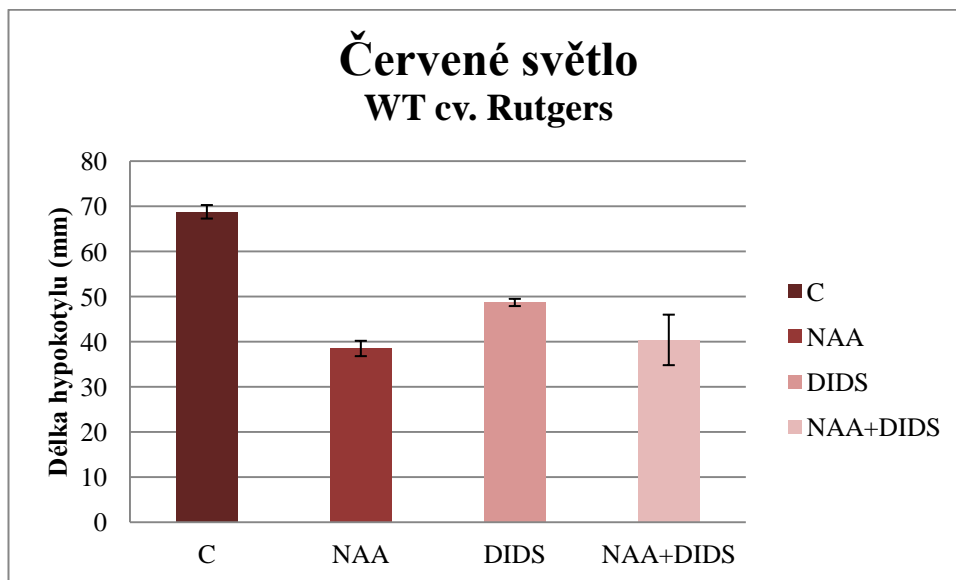


Obr. 7 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, auxinu NAA + DIDS na délku hypokotylu mutovaných rostlin *7B-1* pěstovaných na modrém světle. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 10 rostlin mutantu *7B-1*.

Na modrém světle bylo prodlužování hypokotylů *7B-1* na modrém světle inhibováno auxinem (asi z 35%) (Obr. 7) podobně jako bylo pozorováno u WT (40%) (Obr. 6). Na rozdíl od WT, kde DIDS neměl na růst hypokotylu vliv, však aplikace DIDS vedla k inhibici růstu hypokotylů rostlin *7B-1*, a to asi o 28%. Dále bylo možné pozorovat, že po přidání DIDS do roztoku s auxinem se inhibice vyvolaná auxinem téměř nezměnila.

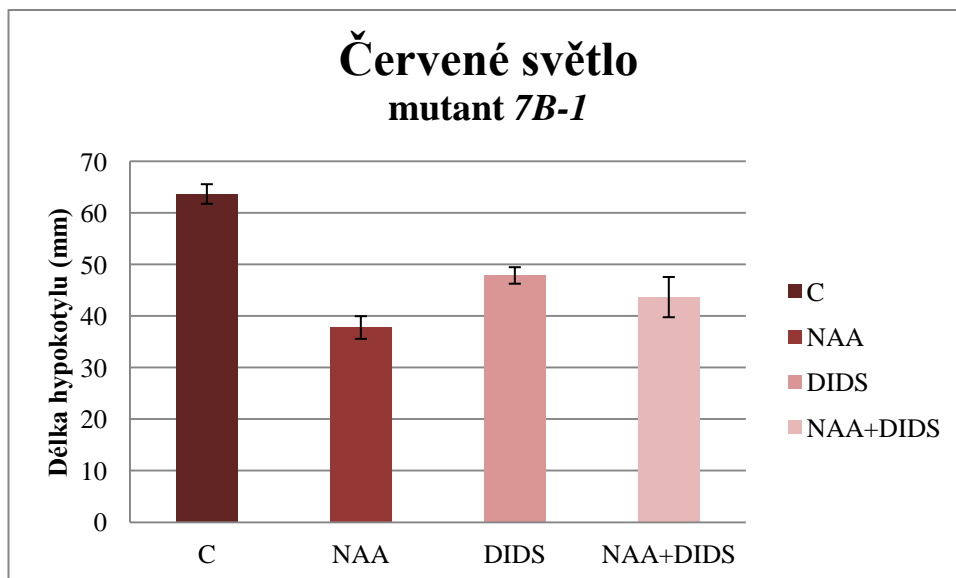
Z výsledků plyne, že podobně jako u etiolovaných rostlin, rovněž na modrém světle neměla blokáce aniontových kanálů prostřednictvím inhibitoru DIDS vliv na inhibici růstu hypokotylu vyvolanou samotným auxinem, a to u obou genotypů. Výsledky tedy naznačují, že ani na modrém světle nejsou aniontové kanály citlivé k DIDS zapojeny v auxinem-indukované inhibici růstu hypokotylu rajčete. Zároveň však bylo zjištěno, že inhibice aniontových kanálů vlivem DIDS vede k redukcii růstu hypokotylu mutovaných rostlin *7B-1* rostoucích na modrém světle. To naznačuje, že

správné fungování těchto iontových kanálů je nutné pro plný růst hypokotylů rajčete na modrém světle. Vyšší citlivost *7B-1* k DIDS může vést k závěru, že mutace *7B-1* redukuje množství DIDS-senzitivních aniontových kanálů nebo zvyšuje jejich citlivost k danému inhibitoru. Je tedy zřejmé, že je funkční produkt *7B-1* zapojen do stimulace růstu hypokotylu rajčete na modrém světle.



Obr. 8 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, auxinu NAA + DIDS na délku hypokotylu rostlin WT cv. Rutgers rostoucích na červeném světle. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 10 rostlin WT cv. Rutgers.

Na Obr. 8 vidíme, že na červeném světle auxin o testované koncentraci inhiboval prodloužování hypokotylu WT asi z 40%. Za přítomnosti DIDS se délka hypokotylu WT cv. Rutgers rovněž snižovala, a to asi o 28%. Dále bylo možné pozorovat, že po přidání DIDS do roztoku s auxinem se inhibice vyvolaná auxinem téměř nezměnila (Obr. 8). Podobné reakce jako u WT byly pozorovány u mutantu *7B-1* (Obr. 9).



Obr. 9 Vliv auxinu NAA o koncentraci $7 \times 10^{-7} \text{M}$, inhibitoru iontových kanálů DIDS o koncentraci $5 \times 10^{-4} \text{M}$, auxinu NAA + DIDS na délku hypocotylu rostlin mutantu *7B-1* rostoucích na červeném světle. Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů. V každém experimentu bylo na každé směsi měřeno 10 rostlin mutantu *7B-1*.

Z našich výsledků vyplývá, že ani na červeném světle nejsou aniontové kanály citlivé k DIDS zapojeny v auxinem-indukované inhibici růstu hypocotylu rajčete. Bylo však zjištěno, že inhibice aniontových kanálů vlivem DIDS vede na červeném světle k redukci růstu hypocotylu WT i mutovaných rostlin *7B-1*. To naznačuje, že správné fungování těchto iontových kanálů je nutné pro plný růst hypocotylů rajčete na červeném světle. Současně je však zřejmé, že v tomto procesu není genový produkt *7B-1* zapojen.

5 ZÁVĚR

Cílem první části této bakalářské práce bylo zjistit účinky exogenních auxinů na růst rostlin rajčete a vliv světla na reakci rostlin k auxinům. Dále bylo za úkol zjistit, zda genový produkt 7B-1 je zapojen v růstových reakcích rostlin k auxinům a ke světlu. Bylo zjištěno, že růst rostlin rajčete u WT cv. Rutgers a mutantu *7B-1* je vlivem exogenních auxinů inhibován. Funkční produkt 7B-1 u rajčete zesiluje reakci etiolizovaného hypokotylu k exogennímu auxinu. Červené a modré světlo snižuje inhibiční účinky exogenního auxinu na prodlužovací růst hypokotylu obou genotypů ve srovnání s inhibicí růstu hypokotylů rostoucích ve tmě. Funkční produkt 7B-1 je zapojen do signální dráhy regulující reakci hypokotylu k auxinu pouze u rostlin rostoucích při absenci světla. Při reakci hypokotylu rostlin pěstovaných na modrém či na červeném světle se vliv produktu 7B-1 k auxinu neuplatňuje.

Cílem druhé části této bakalářské práce bylo zjistit, zda genový produkt 7B-1 je zapojen v růstových reakcích rostlin k DIDS a ke světlu. Dále bylo za úkol zjistit, jestli mají iontové kanály vliv na auxinem indukovanou inhibici růstu hypokotylu rajčete v závislosti na světelných podmínkách. Z výsledků se dá usuzovat, že genový produkt 7B-1 je zapojen v růstových reakcích rostlin k DIDS na modrém světle. Vyšší citlivost mutantu *7B-1* k DIDS může vést k závěru, že mutace *7B-1* redukuje množství DIDS-senzitivních aniontových kanálů nebo zvyšuje jejich citlivost k danému inhibitoru. U rostlin pěstovaných ve tmě či na červeném světle byl učiněn závěr, že genový produkt 7B-1 není zapojen v růstových reakcích rostlin k DIDS. Z výsledků lze rovněž dedukovat, že iontové kanály citlivé k inhibitoru DIDS nejsou zapojeny v regulaci inhibice délky hypokotylu rajčete vyvolané auxinem ve tmě, na modrém i na červeném světle. Správné fungování těchto iontových kanálů je však nutné pro plný růst hypokotylů rajčete pěstovaných ve tmě, na modrém světle i na červeném světle.

6 LITERATURA

Barbier-Brygoo H, Frachisse JM, Colcombet J, Thomine S (1999) Anion channels and hormone signalling in plant cells. *Plant Physiology and Biochemistry* **37**: 381-392.

Barbier-Brygoo H, Vinauger H, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse JM, Maurel C (2000) Anion channels in higher plants: functional characterisation, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**: 199-218.

Bennett MJ, Marchant A, Green HG, May ST, Ward SP, Millner PA, Walker AR, Schulz B, Feldmann KA (1996). *Arabidopsis AUX1* gene: a permease-like regulator of root gravitropism. *Science* **273**: 948-950.

Blakeslee JJ, Peer WA, Murphy AS (2005) Auxin Transport. *Current Opinion in Plant Biology* **8**: 494-500.

Blancaflor EB, Masson PH (2003) Plant gravitropism. Unraveling the ups and downs of a complex process. *Plant Physiology* **133**: 1677-1690.

Boerjan W, Cervera MT, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D (1995) Superroot, a recessive mutation in *Arabidopsis*, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**: 1405-1419.

Briggs WR, Christie JM (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**: 204-210.

Cary AJ, Liu W, Howell SH (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology* **107**: 1075-1082.

Cleland RE (1995) In PJ Davies, ed., Plant Hormones. *Kluwer Academic Publishers*, Dordrecht, The Netherlands, pp. 214-227.

Clouse SD (1996) Molecular genetics studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant Journal* **10**: 1-8.

Darwin C (1880) *The Power of Movement in Plants*. London: *John Murray Publishers*.

De Angeli A, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H (2007) Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Letters* **581**: 2367-2374.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005a) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **436**: 441-451.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Weijers D, Lechner E, Yamada M, Hobbie L, Ehrismann JS, Jurgens G, Estelle M (2005b) Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins. *Developmental Cell* **9**: 109-119.

Ecker JR (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**: 667-675.

Elich TD, Chory J (1994) Initial events in phytochrome signalling: still in the dark. *Plant Molecular Biology* **26**: 1315-1327.

Fellner M (1997) Search for selection screens of auxin-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. Genetic and physiological characterization of the first isolated mutants. Ph.D. thesis, Universite de Paris-Sud XI, Orsay, France

Fellner M, Franklin JA, Reid DM, Sawhney VK (2005) Increased sensitivity to, and reduced production of, ethylene in an ABA-overproducing tomato mutant. *Acta Biologica Cracoviensia* **47**: 205-212.

Fellner M, Pospíšilová K, Plotzová R, Zaoralová J, Dvořáková B, Chmelařová A (2008) Role of ion and water channels in blue-light specific tolerance of seed

germination to osmotic stress – putative function of *7B-1*. International Plant Photobiology Meeting; May 28 – June 1, 2008, Columbia, MO, USA

Fellner M, Sawhney VK (2001) Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* **102**: 215-221.

Fellner M, Sawhney VK (2002) The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* **214**: 675-682.

Fellner M, Zhang R, Pharis RP, Sawhney VK (2001) Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **52**: 725-738.

Frachisse JM, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H (2000) Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **21**: 361-371.

Franklin KA, Lerner VS, Whitelam GC (2005) The signal transducing photoreceptors of plants. *International Journal of Developmental Biology* **49**: 653-664.

Friml J, Palme K (2002) Polar auxin transport – old questions and new concepts? *Plant Molecular Biology* **49**: 273-284.

Goldsmith M, Goldsmith T (1977) Chemiosmotic model for polar transport of auxin. *Plant Physiology* **59**: 90-90.

Hager A, Menzel H, Krauss A (1971) Versuche und Hypothese zur Primärwirkung des Auxins beim Streckungswachstum. *Planta* **100**: 47-75.

Cho MH, Spalding EP (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **93**: 8134-8138.

Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **104**: 339-347.

Jones RS, Mitchell CA (1989) Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings. *Plant Physiology* **76**: 598-602.

Keller CP, Van Volkenburgh E (1996b) The electrical response of *Avena* coleoptile cortex to auxins. Evidence in vivo for activation of a Cl⁻ conductance. *Planta* **198**: 404-412.

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

Kim J, Harter K, Theologis A (1997) Protein-protein interactions among the Aux/IAA proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* **94**: 11786-11791.

King JJ, Stimart DP, Fisher RH, Bleecker AB (1995) A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**: 2023-2037.

Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M, Shimazaki K (2001) Phot 1 and phot 2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature* **414**: 656-660.

Kraepiel Y, Miginiac E (1997) Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant, Cell and Environment* **20**: 807-812.

Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M, Miginiac E (1994) Analysis of phytochrome-deficient and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotina-Plumbaginifolia*. *Plant Journal* **6**: 665-672.

Krol E, Trebacz K (2000) Ways of ion channel gating in plant cells. *Annals of Botany* **86**: 449-469.

Li J, Yang H, Richter G, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Peer WA, Titapiwantakun B, Richards E, Undurraga S, Murphy AS, Gilroy S, Gaxiola R (2005) The H⁺-PPase AVP1 is required for organ development in *Arabidopsis*. *Science* **310**: 121-125.

Lin C (2002) Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* S207-S225.

Ljung K, Bhalearo RP, Sandberg G (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in *Arabidopsis* during vegetative growth. *Plant Journal* **28**: 465-474.

Marten I, Lohse G, Hedrich R (1991) Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature* **353**: 758-762.

Massa GD and Gilroy S (2003). Touch modulates gravity sensing to regulate the growth of primary roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **33**: 435-445.

Moloney MM, Elliott MC, Cleland RE (1981) Acid growth effects in maize roots: evidence for a link between auxin-economy and proton extrusion in the control of root growth. *Planta* **152**: 285-291.

Murashige T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with Tobago cultures. *Physiologia Plantarum* **15**: 473-497.

Perrotta G, Yahoubyan G, Nebuloso E, Renzi L, Giuliano G (2001) Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant, Cell and Environment* **24**: 991-997.

Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M (2012) Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* **110**: 767-776.

Pitts JR, Cernac A, Estelle M (1998) Auxin and ethylene promote root hair elongation in *Arabidopsis*. *Plant Journal* **16**: 553-560.

Quail PH (2002) Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* **14**: 180-188.

Rahman A, Bannigan A, Sulaman W, Pechter P, Blancaflor EB, Baskin TI (2007) Auxin, actin and growth of the *Arabidopsis thaliana* primary root. *Plant Journal* **50**: 514-528.

Rahman A, Hosokawa S, Oono Y, Amakawa T, Goto N, Tsurumi S (2002) Auxin and ethylene response interactions during *Arabidopsis* root hair development dissected by auxin influx modulators. *Plant Physiology* **130**: 1908-1917.

Raven JA (1975) Transport of indole-3-acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* **74**: 163-172.

Rayle DL, Cleland R (1970) Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. *Plant Physiology* **46**: 250-253.

Roberts SK (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist* **169**: 647-666.

Rubery PH, Sheldrake AR (1973) Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature New Biology* **244**: 285-288.

Sawhney VK, Shivanna KR (1997) Genic male sterility, eds. *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press, 183-98.

Schroeder JI (1995) Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Molecular Biology* **28**: 353-361.

Schroeder JI, Hedrich R (1989) Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signalling of higher plant cells. *Trends in Biochemical Science* **14**: 187-192.

Schroeder JI, Schmidt C, Sheaffer J (1993) Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* **5**: 1831-1841.

Spalding EP (2000) Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell and Environment* **23**: 665-674.

Spalding EP, Cosgrove DJ (1989) Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178**: 407-410.

Stepanova AN, Hoyt JM, Hamilton AA, Alonso JM (2005) A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **17**: 2230-2242.

Stepanova AN, Yun J, Likhacheva AV, Alonso JM (2007) Multilevel interactions between ethylene and auxin in *Arabidopsis* roots. *Plant Cell* **19**: 2169-2185.

Taiz L, Zeiger E (2010) Plant physiology, Fifth Edition, Sinauer Associates Inc. Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, pp. 545-573.

Teakle NL, Tyerman SD (2010) Mechanisms of Cl⁻ transport contributing to salt tolerance. *Plant, Cell and Environment* **33**: 566-589.

Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1997) Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: Nucleotide regulation and pharmacological properties. *Journal of Membrane Biology* **159**: 71-82.

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

Thomine S, Zimmermann S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1995) ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Cell* **7**: 2091-2100.

Toyomasu T, Yamane H, Murofushi N, Inoue Y (1994) Effects of exogenously applied gibberellin and red light on the endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. *Plant and Cell Physiology* **35**: 127-129.

Tyerman SD (1992) Anion channels in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **43**: 351-373.

Volmaro C, Pontin M, Luna V, Baraldi R, Bottini R (1998) Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA₃ and abscisic acid. *Plant Growth Regulators* **26**: 165-173.

Ward JM, Pei ZM, Schroeder JI (1995) Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant Cell* **7**: 833-844.

Weatherwax SC, Ong MS, Degenhardt J, Bray EA, Tobin EM (1996) The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology* **111**: 363-370.

Weller JL, Perrotta G, Schreuder ME, Van Tuinen A, Koornneef M, Giuliano G, Kendrick RE (2001) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant Journal* **25**: 427-440.

Went FW (1926) On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* **30**: 10-19.

White PJ, Broadley MR (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant. *Annals of Botany* **88**: 967-988.

Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* **16**: 1123-1127.

Zimmermann S, Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H (1994) An anion current at the plasma membrane of tobacco protoplasts shows ATP-dependent voltage regulation and is modulated by auxin. *Plant Journal* **6**: 707-716.