



Agronomická
fakulta

Mendelova
univerzita
v Brně



**Vplyv fotoperiódny na apikálnu dominanciu u
hrachu**

Bakalárska práca

Vedúci práce:
Ing. Petr Kalousek, Ph.D.

Vypracoval:
Martin Füleky

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Zpracovatel : **Martin Füleky**
Studijní program: Agrobiologie
Obor: Molekulární biologie a biotechnologie
Název tématu: **Vplyv fotoperiody na apikálnu dominanciu u hrachu.**
Rozsah práce: 30 stran včetně obrazových příloh

Zásady pro vypracování:

1. Vypracování literární rešerže na téma fytohormonální regulace apikální dominance, vliv světla na apikální dominanci a polární transport auxinu.
2. Realizace experimentů zaměřených na srovnání charakteru větvení stonku intaktních a dekapitovaných rostlin vybraných kultivarů hrachu pod vlivem krátké fotoperiody, dlouhé fotoperiody a nepřetržitého osvětlení. Za stejných experimentálních podmínek rovněž porovnání dalších vybraných růstových korelací.
3. Porovnání exprese vybraných genů, souvisejících s regulací větvení stonku a s polárním transportem auxinu, v hlavním stonku.
4. Vyhodnocení experimentů, statistické zpracování získaných dat, vypracování závěrečné práce.

Seznam odborné literatury:

1. Arumingtyas, E.L., Floyd, R.S., Gregory, M.J., Murfet, I.C., (1992): Branching in Pisum: inheritance and allelism tests with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetics*, vol. 24: 17-31
2. Braun, N., de Saint Germain, A., Pillot, J.P., Boutet-Mercey, S., Dalmais, M., Antonialdi, I., Li, X., Maia-Grondard, A., Le Signor, C., Bouteiller, N., Luo, D., Bendahmane, A., Turnbull, C., Rameau, C. (2012): The pea TCP transcription factor PsBRC1 acts downstream of Strigolactones to control shoot branching. *Plant Physiol.*, 158 (1): 225-238
3. Ongaro, V., Leyser, O. (2008): Hormonal control of shoot branching. *Journal of experimental botany*. Vol. 59, No. 1: 67 – 74

Datum zadání bakalářské práce: říjen 2015

Termín odevzdání bakalářské práce: duben 2017


Martin Fulek
Autor práce




Ing. Petr Kalousek, Ph.D.
Vedoucí práce


prof. RNDr. Ladislav Havel, CSc.
Vedoucí ústavu


doc. Ing. Pavel Ryant, Ph.D.
Děkan AF MENDELU

Čestné prehlásenie

Prehlasujem, že som prácu: Vplyv fotoperiódny na apikálnu dominanciu u hrachu vypracoval/a samostatne a všetky použité pramene a informácie uvádzam v zozname použitej literatúry. Súhlasím, aby moja práca bola zverejnená v súlade so § 47b zákonom č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o zmene a doplnení ďalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, a v súlade s platnou Směrnici o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brne dňa:.....

.....
podpis

POĎAKOVANIE

Rád by som poďakoval vedúcemu svojej bakalárskej práce Ing. Petrovi Kalouskovi, Ph.D. za pomoc pri spracovávaní mojej práce, za ochotu a odborné vedenie počas všetkých mojich experimentov a v ich následnom spracovávaní.

ABSTRAKT

Súčasťou mojej práce bolo vypracovanie literárnej rešerše, v ktorej som sa venoval vplyvu fotoperiód, intenzity svetla, fytohormónov (hlavne auxínov, cytokinínov a strigolaktónov) a ďalších faktorov na vetvenie stoniek rastlín hrachu. Vlastný experiment bol zameraný na zistenie vplyvu rôznych dĺžok dňa (8 hodín, 16 hodín, 24 hodín) na vetvenie stonky hrachu. Analyzovali sa intaktné rastliny, rastliny dekapitované nad 3. nodom a rastliny dekapitované nad kľúčnymi listami. Počítali sa čisté prírastky dĺžky vetví po dobu 5 dní a následne boli zostrojené grafy a bola vykonaná štatistická analýza. Z rastlín boli odobrané vzorky, ktoré boli využité v následných analýzach génovej expresie. K tomuto účelu bola použitá metóda semikvantitatívnej RT-PCR s následným vyhodnotením intenzity expresie s agarózového gélu.

Kľúčové slová: apikálna dominancia, axilárny púčik, fotoperiód, vetvenie stonky, *Pisum sativum L.*

ABSTRACT

The part of my thesis was to make literary research about influence of photoperiod, light intensity, phytohormones (mainly auxins, cytokinins and strigolactones) and other factors on shoot branching in pea. The experiment was focused on finding the influence of different day lengths (8 hours, 16 hours, 24 hours) on shoot branching in pea. In experiment intact plants, plants decapitated above 3rd node and plants decapitated above cotyledons were analyzed. Increases in length of the branches were observed for 5 days. Graphs and statistical analysis were generated from the data. After that, samples from plants were taken. These samples were used in semiquantitative RT-PCR with analysis of intensity of gene expression from agarose gel.

Key words: apical dominance, axillary bud, photoperiod, shoot branching, *Pisum sativum L.*

OBSAH

1	Úvod	9
2	Cieľ	10
3	Literárny prehľad.....	11
3.1	Vplyv fytohormónov na rast púčikov.....	11
3.1.1	Vplyv auxínu	11
3.1.2	Vplyv cytokinínov.....	12
3.1.3	Vplyv strigolaktónov.....	13
3.2	Mutanti s potlačenou apikálnou dominanciou	14
3.2.1	Ramosus	14
3.2.2	More axillary branching	15
3.3	Vplyv živín na rast púčikov	16
3.4	Vplyv svetla na rast púčikov.....	16
3.5	Fotoreceptory zapojené do kontroly vetvenia.....	19
3.5.1	Fytochrómy	19
3.5.2	Krytochrómy	20
3.6	Génová expresia u inhibovných axilárnych púčikov	21
3.6.1	PsBRC1	21
3.6.2	PsDRM1	22
4	Materiál a Metodika.....	23
4.1	Experimentálny materiál	23
4.2	Metodika.....	23
4.2.1	Výsev rastlín	23
4.2.1.1	Kultivačné podmienky	23
4.2.2	Meranie čistého prírastku	24
4.2.3	Odber vzoriek	24
4.2.4	Izolácia RNA	25

4.2.4.1	Izolácia celkovej RNA z axilárnych púčikov	25
4.2.5	Stanovenie výťažnosti RNA	25
4.2.6	Elektroforéza RNA.....	25
4.2.6.1	Príprava agarózového gélu	25
4.2.6.2	Príprava vzoriek.....	26
4.2.6.3	Vlastná denaturačná elektroforéza RNA.....	26
4.2.7	RT-PCR.....	27
4.2.7.1	Reverzná transkripcia.....	27
4.2.7.2	Vlastná PCR	28
4.2.7.3	Elektroforetická separácia PCR produktov	29
4.2.8	Štatistické vyhodnotenie rastových experimentov.....	30
5	Výsledky a diskusia	31
5.1	Vyhodnotenie rastu púčikov	31
5.1.1	Pokusy so žiarivkovým osvetlením.....	31
5.1.2	Pokusy s LED diódovým osvetlením	38
5.1.2.1	Pokusy pod modrým svetlom	39
5.1.2.2	Pokusy pod bielim svetlom	44
5.1.2.3	Pokusy pod červeným svetlom	49
5.1.2.4	Porovnanie rastu intaktných rastlín pri rôznej vlnovej dĺžke svetla ..	54
5.1.3	Diskusia výsledkov rastových experimentov	55
5.2	Vyhodnotenie RT-PCR	56
5.2.1	Diskusia výsledkov RT-PCR.....	59
6	Záver	61
7	Zoznam použitej literatúry	63
8	Zoznam obrázkov	66
9	Zoznam tabuliek	68

1 ÚVOD

Hlavný aspekt postembryonálneho vývoja rastlín je formovanie sekundárnych osí rastu: vegetatívnych vetví, vetví súkvetia, alebo kvetov.

Množstvo rastlinných foriem pozorovaných v prírode je dôsledkom aktivít rozličných meristémov počas postembryonálneho vývoja. Pri semenných rastlinách primárna os rastu, spolu s primárnym výhonkom a koreňom apikálnych meristémov, je založená v embryonálnom vývoji. Počas post embryonálneho vývoja, sekundárne osi rastu vznikajú z laterálnych (axilárnych) meristémov, ktoré sú v úžľabiach listových zárodokov. Vo vegetatívnom vývoji, axilárne meristémy zahajujú formáciu niekoľkých listových zárodokov, z ktorých vzniká axilárny púčik. Tieto púčiky sa stanú dormantnými po určitú dobu, alebo budú pokračovať v raste (Schmitz, Theres, 2006). Vetvenie je vysoko regulovaný proces, ktorý zahŕňa množstvo vývojových dráh zapojených v regulácii rastu axilárnych meristémov (Janssen *et al.*, 2014). Regulácia vetvenia je dôležitá pre rastlinnú adaptáciu, prežitie a konkurencieschopnosť. Poskytuje rastline flexibilitu pri reakcii na enviromentálne faktory ako napríklad svetlo alebo bylinožravce, zatiaľ čo optimalizuje jej zdroje (Ferguson, Beveridge, 2009). Potlačenie rastu púčikov inhibičnými účinkami primárneho rastového vrcholu sa nazýva apikálna dominancia (Schmitz, Theres, 2006).

Apikálna dominancia je definovaná ako kontrola vykonávaná zakončením výhonku axilárnych púčikov, zatiaľ čo korelatívna inhibícia zahŕňa potlačenie rastu ostatnými rastúcimi púčikmi alebo výhonkami. Úroveň, signalizácia a tok rastlinného hormónu auxínu v stonkách a púčikoch je zapojená v týchto procesoch (Ferguson, Beveridge, 2009).

Apikálna dominancia je typická pre mnoho odrôd hrachu (*Pisum sativum*), kde úplné potlačenie rastu púčikov je pozorovateľne počas vegetatívneho vývoja. Odstránením rastového vrcholu zmierňuje inhibíciu, umožňuje tak rast postranných púčikov. Dekapitácia tiež redukuje úroveň endogennej indol-3-octovej kyseliny (IAA), bioaktívnej formy fytohormónu auxínu. Aj keď IAA dokáže potlačiť vetvenie po dekapitácii, často nie je schopná úplne zastaviť rast postranných púčikov.

2 CIEĽ

Cieľom práce bolo zhodnotenie vplyvu fotoperiódy na charakter vetvenia stonky rastlín hrachu siateho (*Pisum sativum* L.). K experimentom bola využitá odroda Paloma, ktorá sa vyznačuje zvýšeným vetvením intaktných rastlín z bazálnych nodov. Boli využité 3 modelové systémy: intaktné rastliny, rastliny dekapitované nad 3. nodom, u ktorých bol sledovaný rast axilárnych púčikov 1., 2. a 3. nodu a rastliny dekapitované nad kľúčnymi listami, u ktorých bol sledovaný rast kotyledonárnych púčikov.

Experimenty boli vykonávané v riadených kultivačných podmienkach v 3 svetelných režimoch, líšiacich sa intenzitou a spektrálnym zložením svetla: štandardné žiarivkové osvetlenie, LED diódové osvetlenie biele, červené/modré s prevažujúcou červenou zložkou a červené/modré s prevažujúcou modrou zložkou spektra. Pod vyššie uvedenými typmi osvetlenia boli rastliny pestované v režime krátkeho dňa (8 hod. svetlo/16 hod. tma), dlhého dňa (16 hod. svetlo/8 hod. tma) a nepretržitého osvetlenia.

U vybraných experimentálnych variantoch bola taktiež študovaná expresia vybraných génov v axilárnych púčikoch, konkrétne génu *PsPIN1*, ktorý súvisí s polárnym transportom auxínu, génu *PsBRC1*, ktorý funguje ako svetlom regulovaný represor rastu axilárnych púčikova génu *PsDRM1*, ktorý je markerom inhibovaného stavu axilárnych púčikov.

3 LITERÁRNY PREHLAD

3.1 Vplyv fytohormónov na rast púčikov

3.1.1 Vplyv auxínu

Auxín bol prvý fytohormón spojený s reguláciou vetvenia a jeho účinky boli pozorované už pred viac ako 100 rokmi. (Ongaro, Leyser, 2008) Prirodzené auxíny predstavuje malá skupina štruktúrne podobných látok – kyselina indol-3-octová (IAA), kyselina indol-3-maslová (IBA), kyselina 4-chlórindol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylactová (PAA).

IAA je syntetizovaná v mladých rýchlo sa deliacich bunkách – v apikálnom meristém stonky, v mladých listoch aj v meristémoch koreňa. Vysoká hladina auxínu je tiež v embryách a vyvíjajúcich sa semenách a plodoch (Pavlová, Fisher, 2011).

Hypotéza transportu IAA hovorí, že apikálna dominancia je určená priamo tokom IAA v rastline. Apikálny alebo axilárny meristém môže rásť, keď je IAA aktívne exportovaná bazipetálne, čo sa nazýva polárny auxínový transport. Polárny auxínový transport zahŕňa niekoľko proteínov, ktoré prenášajú IAA z bunky do bunky. Tok IAA je diktovaný pomocou IAA efluxných nosičov, obzvlášť PIN-FORMED1 (PIN1), ktoré generujú jednosmerný tok hormónu bazipetálne z apexu cez stonku. Púčik musí exportovať IAA do polárneho auxínového toku hlavnej vetvy, aby mohol púčik zahájiť rast. IAA prenesený z hlavného rastového vrcholu koná ako kritický regulátor rastu púčiku, bráni prietoku IAA z púčiku, a tým zabraňuje rastu púčiku. Keď je táto prekážka zmierená (ak je úroveň IAA znížená alebo počet IAA prenášačov zvýšený), bude export IAA zahájený a tým dosiahnutý rast púčiku. Blokovanie transportu auxínu z jedného výhonku zastaví jeho rast a podporí rast druhého. Aj vo výhonkoch s dobre zavedenými cievnyimi spojeniami to môže súvisieť so schopnosťou auxínového toku z výhonku priťahovať živiny alebo signály, a preto ostať konkurencieschopný s ostatnými výhonkami (Ferguson, Beveridge, 2009).

Na stimulovanie rastu púčikov sa často používa dekapitácia rastliny a aplikácia inhibítorov transportu auxínu. Dekapitácia je však extrémna, zahŕňa odstránenie rastlinného pletiva, čo postihuje rôzne signály iné ako IAA, a narušuje rastlinný turgor a vzťahy medzi zdrojom a sinkom (Ferguson, Beveridge, 2009).

Bol zistený vplyv svetla na auxínovú signalizáciu pri kontrole rastu púčikov. U púčikov *Arabidopsis*, fytochróm B pozitívne reguluje expresiu *TAA1* (*Tryptophan Aminotransferase of Arabidopsis1*) génu, ktorý kóduje enzým dôležitý v biosyntéze auxínu, ktorého expresia koreluje s rastom púčikov. U meristémov rajčiaku (*Solanum lycopersicum*) svetlo reguluje lokalizáciu PIN1 proteínu na plazmatickej membráne a iniciáciu rastu primordií. Svetlo ďalej nadreguluje organogénu počas rastu púčikov u kríkov ruže. Hromadenie auxínu v predlžujúcich sa orgánoch semenáčkov počas SAS (shade-avoidance syndrome) je spôsobené nízkym pomerom R:FR, a mutácia *TAA1* spôsobuje stratu tejto odpovede (Leduc *et al.*, 2014).

3.1.2 Vplyv cytokinínov

Cytokiníny sú obecné definované ako látky, ktoré majú podobné biologické účinky ako zeatín (chemicky trans-6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino) purín). Boli objavené v 50. rokoch minulého storočia a sú nevyhnutné pre delenie buniek. Cytokiníny sa tvoria hlavne v koreňovom apikálnom meristéme. Ďalej sú syntetizované v embryách, v mladých listoch, v plodoch a všade tam kde sa bunky delia. Z koreňového apikálneho meristému sú cytokiníny (hlavne trans-zeatín) transportované xylémom spolu s vodou a minerálnymi látkami do nadzemných častí (Pavlová, Fisher, 2011).

Cytokiníny ovplyvňujú radu fyziologických procesov v rastlinách. Zásadný význam majú hlavne pri delení buniek. Stimulujú funkciu vegetatívnych stonkových meristémov, ovplyvňujú veľkosť koreňových meristémov a diferenciáciu vodivých pletív v predlžovacej zóne koreňa. Urýchľujú diferenciáciu chloroplastov pri deetiólácii, stimulujú syntézu fotosyntetických pigmentov a proteínov fotosystému I a II. Cytokiníny tiež pôsobia na transportné procesy v rastline, atrahujú asimiláty aj aminokyseliny. Odďaľujú senescenciu listov, spomaľujú odbúravanie chlorofylu, inhibujú tvorbu superoxidu a hydroxylových radikálov, čím znižujú oxidáciu membránových lipidov a stabilizujú tylakoidy (Pavlová, Fisher, 2011).

Cytokiníny sú jediné známe hormóny, ktoré stimulujú rast púčikov. Znižujú expresiu *BRC1* a pôsobia protikladne ku auxínom a strigolaktómom pri apikálnej dominancii. Ak je apikálna dominancia porušená, hladina cytokinínov v stonke sa zvýši a rovnako aj v púčikoch lebo novosyntetizované cytokiníny sú transportované zo stonky do púčikov. Cytokiníny tiež podporujú syntézu auxínov a ich export do púčikov, a tým

indukujú ich rast. V púčikoch cytokiníny kontrolujú organogenézu apikálneho meristému a elongáciu vytváraných orgánov (Leduc *et al.*, 2014). Málo je poznatkov o interakcii medzi cytokinínmi a fotokontrolou rastu púčikov. Pri hrachu, ak sú etiologované epikotyli, ktoré nesú axilárne púčiky ponorené do roztoku sacharózy a vystavené červenému svetlu, aplikácia cytokinínov zvýši rast púčikov a zvýši inkorporáciu sacharózy do púčikov. U *Arabidopsis* bola organogenéza apikálneho meristému inhibovaná v tme, ale absencia svetla bola vyvážená cytokinínmi. Tieto dve zistenia popisujú možné intrakcie medzi cytokinínmi a svetelnou signálnou dráhou pri kontrole aktivity apikálneho meristému a raste púčikov (Leduc *et al.*, 2014).

Niektoré patogénne baktérie alebo hmyz vylučujú voľné cytokiníny alebo silne aktivujú ich biosyntézu v rastline, a tým indukujú delenie buniek a vznik charakteristických štruktúr napríklad tumorov (Pavlová, Fisher, 2011).

3.1.3 Vplyv strigolaktónov

Strigolaktóny sú rastlinné metabolity odvodené od karotenoidov, ktoré slúžia ako signálne molekuly endogénne ako fytohormóny. Boli objavené ako stimulanty klíčenia u *Striga lutea*. Sú zapojené v rôznych rastových procesoch ako rast koreňov, formovanie postranných koreňov, predlžovanie koreňov, predlžovanie stonky, expanzia listov a vetvenie (Waldie *et al.*, 2013). Ďalej bolo zistené, že pôsobia ako signály pre symbiotické interakcie s albuskulárnymi mykorrhízovými hubami (Umehara *et al.*, 2008).

Strigolaktóny inhibujú rast púčikov. Predpokladá sa, že strigolaktóny pôsobia ako druhý posol pri pôsobení auxínu, a tak sa podieľajú na inhibícii rastu púčikov (Brewer *et al.*, 2009). Experimenty u *Pisum*, *Arabidopsis* a *Petunia* naznačujú, že strigolaktóny sú transportované z koreňa do výhonku, ale nie naopak (Waldie *et al.*, 2013). Signálna dráha zahŕňa *D14/D88/HTD2* gény u ryže a *Petunia hybrida* *DAD2* gén kódujúce α/β hydrolázu, ktorá môže slúžiť ako receptor pre molekuly strigolaktónov. Táto α/β hydroláza interaguje s F-box proteínom MAX2 a patriacemu do SCF komplexu, ktorý spôsobuje proteolýzu pozitívnych vetviacich integrátorov. MAX2 tiež pravdepodobne podporuje expresiu negatívnych vetviacich integrátorov, ako napríklad *BRC1*. Pomerne málo je momentálne poznatkov o vplyve svetla na strigolaktónovú dráhu a následný dopad na rast púčikov (Leduc *et al.*, 2014). Detailná charakterizácia strigolaktónových mutantov po dobu viacerých rokov vyústila do zistenia dvoch mechanizmov pre účinok strigolaktónov. Strigolaktónové signály pôsobia cez transkripčnú nadreguláciu určitých

génov. Strigolaktóny systematicky spúšťajú odstraňovanie PIN1 auxínových efluxných proteínov z plazmatickej membrány (Waldie *et al.*, 2013). U hrachu krátka fotoperiódou u *rms1/rms2* mutantov spôsobuje vetvenie bazálnych nodov zatiaľ čo dlhá fotoperiódou spôsobuje vetvenie nodov bližších k rastovému vrcholu. Tieto zistenia predpokladajú vzťah medzi fotoperiódou a strigolaktónmi (Leduc *et al.*, 2014).

3.2 Mutanti s potlačenou apikálnou dominanciou

3.2.1 Ramosus

Ramosus (rms) gény u hrachu (*Pisum sativum L.*) kontrolujú syntézu a vnímanie signálu inhibujúceho vetvenie, produkovaného v stonke a koreňoch. Aplikácia auxínu ovplyvňuje expresiu *rms* génov. Rast púčikov a dĺžka vetví sú zosilnené pri dekapitovaných *rms*-mutantov v porovnaní s intaktnými rastlinami. (Ferguson, Beveridge, 2009) Niekoľko *rms* mutantov má strigolaktónové vady, narušené hladiny cytokinínov v xyléme a zníženú odpoveď na auxín pri dekapitovanom vrchole. Ale púčiky na izolovaných nodoch (explantátoch) *rms* rastlín reagujú na auxín normálne. Prítomnosť alebo absencia priložených koreňov ma za následok transkripčné a hormonálne rozdiely v púčikoch a pletivách stonky a môže spôsobovať rozdielnú odpoveď na auxín. Dekapitované rastliny aj explantáty vykazujú rovnakú reguláciu génov pre biosyntézu cytokinínov, zvýšenú úroveň cytokinínov a zníženú reguláciu auxínových transportných génov (Young *et al.*, 2014).

Rms1 mutant je hypersenzitívny na exogénne cytokiníny a táto hypersenzitivita je marená prídavkom strigolaktónov. Cytokinínová a strigolaktónová regulácia vetvenia sa zdá byť integrovaná cez opačné akcie expresie TCP transkripčného faktora Teosinte Branched1(TB1) / BRANCHED1 (BRC1) v púčikoch. Cytokiníny sú negatívny regulátor a strigolaktóny pozitívny regulátor pre PsBRC1. Strigolaktóny tiež vplyvajú na úroveň cytokinínov, výrazne redukujú obsah cytokinínov v xyléme strigolaktón-defektných mutantov. *Rms2* mutant je výnimkou, vykazujúc zvýšený obsah cytokinínov v xyléme spojený s nízkou génovou expresiou v biosyntéze strigolaktónov.

Strigolaktónový mutanti vykazujú výrazne zníženú odpoveď na auxín v inhibovaní vetvenia u dekapitovaných rastlín (Young *et al.*, 2014). *Rms* rastliny vykazujú rast púčikov napriek prítomnosti rastúcich rastových vrcholov. Pri absencii funkčnej RMS dráhy, samotná apikálna dominancia nie je schopná inhibovať rast bazálnych

púčikov. Ale RMS/strigolaktónová cesta potrebuje na svoju funkciu apikálnu dominanciu, lebo dekapitácia rastlín základného fenotypu redukuje expresiu *RMS1* a *RMS5* génov a redukuje hladiny IAA a tým vedie k rastu púčikov (Ferguson, Beveridge, 2009).

3.2.2 More axillary branching

Rastliny dosahujú pozoruhodnú plasticitu v architektúre vetvenia pomocou regulácie aktivity sekundárnych meristémov ležiacich v úžľabí každého listu. Aktivita axilárnych meristémov a vetvenie rastliny sú regulované sieťou hormonálnych signálov pohybujúcich sa skrz rastlinu. Každý axilárny meristém má rovnaký vývojový potenciál ako primárny apikálny meristém a preto sekundárne výhonky môžu vzniknúť z aktivity axilárnych meristémov. Rast sekundárnych výhonkov je však regulovaný v ranných štádiách ako malý púčik (Bennet *et al.*, 2006).

MAX mutanti u *Arabidopsis thaliana* majú fenotyp so zvýšeným vetvením spôsobený reguláciou apikálnej dominancie. Tieto recesívne mutácie spôsobujú predčasný a zvýšený rast postranných výhonkov v kombinácii s jednoduchými pleiotropickými efektami. Nie sú žiadne značné rozdiely v množstve regulátorov vetvenia auxínov a cytokinínov. Experimenty s reciprokým krížením naznačujú, že niekoľko génových produktov, ktoré zodpovedajú za tieto mutácie (napríklad *MAX1*, *MAX3*, *MAX4*), sú zapojené v syntéze nového mobilného signálu, ktorý sa môže pohybovať akropetálne z koreňov alebo stonky do štepov na potlačenie vetvenia (Schmitz, Theres, 2006). *MAX1* pôsobí dolu prúdom *MAX3* a *MAX4* v biosyntéze signálu. *MAX4* a *MAX3* kódujú rozdielnu karotenoidy štiepiacu dioxygenázu, čo naznačuje, že signál je odvodený od karotenoidov, a *MAX1* kóduje cytochróm P450 rodiny. *MAX2* kóduje F boxproteín bohatý na leucín, ktorý pôsobí lokálne vo výhonku, a preto pôsobí ako transdukcia signálu v púčiku. *MAX* cesta interaguje s auxínom lebo *max4* mutantné púčiky sú odolné voči inhibičným účinkom apikálneho auxínu. *MAX* cesta môže teda pôsobiť ako druhý posol pre auxín v regulácii rastu púčikov. Napriek tomu, že auxín podstatne stimuluje expresiu *RMS1* v stonkách hrachu, nemá žiadny efekt na expresiu *MAX4*.

Podľa jednej z hypotéz *max* cesta pôsobí nezávisle na auxínovej signalizácii a miesto toho pracuje na regulácii auxínovej transportnej kapacity v hlavnej stonke, a tým mení silu sinku v stonke pre auxín odvodený z púčikov.

Mutácie v *MAX* génoch vyúsťujú v zvýšené vetvenie rastliny a *max4* púčiky sú rezistentné voči apikálnemu auxínu. V rozvetvených *max* mutantoch je zvýšená kapaci-

ta transportu auxínu, a tým je zvýšená akumulácia PIN1 v stonke. Ak je auxínový transport obnovený do základných úrovní, buď farmakologicky s NPA alebo geneticky s *pin1* mutantom, základné vetviace úrovne sú obnovené a auxínová odpoveď v púčikoch je tiež obnovená. Zvýšená transportná kapacita auxínu v stonke spôsobuje zvýšené vetvenie pomocou mechanizmu, ktorý nevyžaduje priamo AXR1-sprostredkovanú auxínovú signálnu dráhu (Bennet *et al.*, 2006).

3.3 Vplyv živín na rast púčikov

Cukry regulujú rast púčikov u mnohých druhov. U ružovitých púčiky reagujú na svetlo zvýšením expresie dvoch génov zapojených do metabolizmu cukrov: *RhVII* (*Rosa hybrida* vacuolar invertase 1), ktorý riadi elongačnú aktivitu a silu sinku rastúcich orgánov; a *RhSUC2* (*Rosa hybrida* sucrose transporter 2), ktorý katalyzuje aktívne dodávanie sacharózy do púčikov. Cukry interagujú so svetlom na podporu expresie *RhVII* a rastu púčikov. Tieto zistenia a fakt, že palatinóza (nemetabolizovateľný analóg sacharózy) dokáže napodobniť účinok sacharózy, naznačujú kooperatívny účinok svetla a disacharidovej signálnej dráhy v sprostredkovaní rastu púčikov a expresii génov. Predpokladá sa aj rola ďalších signálnych dráh v účinku svetla na rast púčikov. Veľmi známe cukorné signálne proteíny ako SnrK1, Hexokináza a TOR kináza. Vývoj nových vetví vyžaduje okrem cukrov aj dusík (Leduc *et al.*, 2014). Dusík môže zvýšiť syntézu cytokinínov v koreňoch. Cytokiníny môžu následne putovať pomocou transpiračného prúdu do celej rastliny a podporovať rast vetví (Leyser, 2009). Dusík môže pochádzať z N rezervnej mobilizácie alebo z aktuálneho príjmu dusíka a asimilácie. Proporcie medzi zdrojmi dusíka sa líšia počas rastu púčikov a závisia na druhu rastliny a ročnom období (Leduc *et al.*, 2014). Nedostatok dusíka pravdepodobne redukuje vetvenie tým, že redukuje zásobovanie rastliny cytokinínmi z koreňa a zároveň zvyšuje množstvo auxínu transportovaného z rastového vrcholu (Leyser, 2009).

3.4 Vplyv svetla na rast púčikov

Fotoperiódou je množstvo svetla a tmy v dennom cykle, ktorý trvá 24 hodín. V okolí rovníka je fotoperiódou konštantná 12 hodín svetla a 12 hodín tmy, ale kvôli sklonu zemských osí proti slnku, pri pohybe od rovníku smerom k pólom sa dĺžky svet-

la a tmy periodicky menia a stávajú sa nerovnými časťami 24-hodinového cyklu. Rozdiely v dĺžke dňa a noci sa stávajú tým viac extrémne, čím bližšie ku pólom sa dostaneme, kde fotoperiódou 24 hodín svetla alebo 24 hodín tmy nastáva niekoľkokrát do roka. Rotácia Zeme okolo Slnka spôsobuje zmenu dĺžky dňa a noci počas roka (okrem oblastí rovníka) s dlhšími dňami v letnom období a kratšími v zimnom. Cyklus zmien vo fotoperiódach je rovnaký z roka na rok (Jackson, D. S., 2008).

Fotoperiódou kontroluje mnoho vývojových odoziev u živočíchov, rastlín aj húb. Odozva na fotoperiódou sa vyvinula, lebo dĺžka dňa je spoľahlivý indikátor ročných období, umožňuje teda, aby boli vývojové udalosti naplánované tak, aby sa odohrali v konkrétnych prírodných podmienkach. Veľký posun bol zaznamenaný v pochopení molekulárnych mechanizmov zapojených do odpovede na fotoperiódou u rastlín. Tieto mechanizmy zahŕňujú detekciu svetelného signálu v listoch, zahájenie cirkadiánnych rytmov a produkciu mobilného signálu, ktorý je prenesený skrz rastlinu. Napríklad načasovanie rozmnožovania na jar, aby malo zraniteľné potomstvo maximálny možný čas na vývoj, kým prídu kruté podmienky zimy, vyústi vo vyššiu mieru prežitia potomstva.

Poznáme tri hlavné typy odpovede na fotoperiódou:

- 1) krátkodenné rastliny (SDP - short-day plants), ktorých odpoveď je zahájená, ak je fotoperiódou kratšia ako kritická dĺžka dňa
- 2) dlhodenné rastliny (LDP - long-day plants), ktorých odpoveď je zahájená, ak fotoperiódou prekročí kritickú dĺžku dňa
- 3) neutrálne rastliny (DNP- day-neutral plants), ktoré nereagujú na fotoperiódou.

Kritická dĺžka dňa je bod, pri ktorom sa fotoperiódou mení z neinduktívnej na induktívnu, a hodnoty kritickej dĺžky dňa sú rozdielne medzi druhmi aj medzi rastlinami rovnakého druhu. Nie je pravda, že SDP rastliny kvitnú len pri krátkych fotoperiódach a LDP len pri dlhých fotoperiódach. Niektoré SDP rastliny ako napríklad *Xanthium strumarium* má dlhú kritickú dĺžku dňa (asi 15,5 hod) a preto môže kvitnúť a pri dlhých dňoch a niektoré LDP rastliny ako napríklad *Lolium perenne* majú krátku kritickú dĺžku dňa a dokážu kvitnúť aj pri krátkych dňoch (9 hod) (Jackson, D. S., 2008).

U hrachu línie s odpoveďou na fotoperiódou majú oveľa väčšiu tendenciu k produkcii postranných vetiev ako línie, ktoré sú neutrálne. Je to spôsobené vyšším

tokom živín v bazipetálnom smere u línií s odpoveďou na fotoperiódou. Schopnosť reagovať na fotoperiódou u hrachu je spôsobená prítomnosťou dominantných génov *Sn* a *Dne* a aktivita *Sn Dne* systému je znížená pri dlhých dňoch. Podmienky dlhých dní znižujú výskyt postranných vetiev u fotoperiodických genotypov a rast týchto sekundárnych stoniek môže byť úplne potlačený v niektorých prípadoch. Pri hrachu nody ktoré nesú kvetenstvo bežne neprodukujú postranné výhonky (Arumingtyas *et al.*, 1992).

Fotoperiodická kontrola je enviromentálny faktor, ktorý indukuje formovanie a dormanciu púčikov u mnohých vytrvalých druhov. U okrasnej rastliny *Rhododendron catawbiense* je vetvenie modifikované fotoperiódou. Distálne vetvy jednovetvových rastlín sú tvorené pri dlhých dňoch (16 hodinové dni), zatiaľ čo bazálne vetvy nerastú. U krátkych dní (8 hodinové dni) sa rastový potenciál distálnych púčikov rapídne znižuje. Znižuje sa apikálna dominancia, čím rastúci apex udržuje púčiky lokalizované na rovnakej osi dormantné. Pri nezáhradníckych druhoch ako *Arabidopsis thaliana*, zvyšovanie frekvencie striedania tmy a svetla (7hod/7hod) výrazne inhibuje vytváranie axilárnych púčikov. U hrachu (*Pisum sativum L.*) krátke fotoperiódou (8 hodín) zvyšujú tvorenie bazálnych vetví.

U mnohých druhov je rast púčikov ovplyvnený intenzitou svetla. U bylenných druhov, ako napríklad *Lolium perenne* alebo *Triticum aestivum*, nízka intenzita svetla spôsobuje znížené odnožovanie, zatiaľ čo vysoká intenzita svetla stimuluje vetvenie u kríkov a stromov, ako napríklad *Abies balsamea*, *Picea abies* či *Pinus sylvestris*. Absolútna nutnosť svetla pre rast púčikov bola zistená pri ruži a hrachu. Pri ruži temnota úplne inhibuje organogénnu aktivitu apikálneho meristému a rozšírenie listov potrebných pre rast. Intenzita svetla neovplyvňuje len potenciál jednotlivých púčikov vyrásť, ale ovplyvňuje aj rastový gradient v mladých vetvách (Leduc *et al.*, 2014).

Spektrálne zloženie svetla je pre rastlinu dôležitý zdroj informácií o prostredí, v ktorom rastie. Vnímanie zloženia svetla umožňuje rastlinám vycítiť prítomnosť iných rastlín v ich okolí, rovnako ako tieň, striedanie dňa a noci a ročné obdobia. Tieto informácie im pomáhajú vo vývoji, pomáhajú im detekovať zmeny v dĺžke dní a pripraviť sa tak na drastické zmeny podnebia ako napríklad nízke teploty v zime. Všetky tieto signály môžu meniť schopnosť púčikov rásť. Veľmi známy prípad je vývojová odpoveď rastlín na podmienky tieňa. Rastliny bojujú o svetlo a vyvinuli si stratégiu nazývanú „syndróm vyhýbania sa tieňu“ - SAS (shade-avoidance syndrome). SAS je charakterizovaný

redukovanou schopnosťou axilárnych púčikov vyrásť. Rastlina tak dokáže presunúť všetky zdroje do hlavnej stonky a zaistiť tak jej rast a orientáciu listov proti svetlu a zabezpečiť skoré kvitnutie. Skoré kvitnutie môže podporovať vetvenie u niektorých druhov. SAS je spustený, ak rastliny zachytia nízky pomer červeného R (Red) svetla ku FR (Far-red) a redukovanú intenzitu modrého svetla v okolí. Ak sú červené a modré vlnové dĺžky absorbované okolitými rastlinami pre asimiláciu prostredníctvom fotosyntézy a fotomorfogenézu a odrážanie FR žiarenia ich zelenými tkanivami znižuje pomer R:FR a intenzitu modrého svetla v spektre tak rastliny dokážu vycítiť konkurenciu medzi susednými rastlinami skôr ako vlastnú prítomnosť tieňa. Nízky pomer R:FR spôsobuje znížené vetvenie u mnohých kultúrnych plodín ako napríklad *Hordeum vulgare*, *Lolium multiflorum* či *Brassica juncea*. Vplyv modrého svetla na rast púčikov závisí od druhu rastliny. Modré svetlo stimuluje rast púčikov napríklad u pšenice (*T. aestivum*) alebo u rastlín rodu *Rosa*, zatiaľ čo pri zemiaku (*Solanum tuberosum*) rast púčikov inhibuje. Vplyv modrého svetla sa môže líšiť aj medzi rôznymi formami v rámci druhu, ako napríklad pri rajčiaku (Leduc *et al.*, 2014).

3.5 Fotoreceptory zapojené do kontroly vetvenia

3.5.1 Fytochrómy

Fytochrómy sú fotosenzory červenej oblasti spektra. Boli preukázané u semenných, výtrusných rastlín aj zelených rias. Sú prítomné vo všetkých organelách rastliny vrátane koreňov.

Proteínové zložky fytochrómov sa nazývajú apoproteíny. Jeden apoproteín viaže jeden chromofor - fytochromobilín. Jeden proteín s chromoforom tvorí monomér a fytochromy sú funkčné ako diméry. Apoproteíny sú kódované v jadre a syntetizované v cytoplazme. Konvenčne sa fytochrómy delia na dva základné typy – typ I a typ II . Fytochrómy typu I majú apoproteíny A a fytochrómy typu II majú apoproteíny B,C,D,E a môžu tvoriť heterodiméry (Pavlová, Fisher, 2011).

Fytochróm B (PHYB) je zapojený v odpovedi na svetlo pri raste púčikov napríklad u *Arabidopsis* alebo pri čiroku. U týchto druhov mutanti so stratou funkcie PHYB vykazujú znížené vetvenie v porovnaní so základným fenotypom, preto sa predpokladá podporný efekt fytochrómu B na rast púčikov. Pri *Arabidopsis*, nízky pomer R:FR spô-

sobuje rovnaké zníženie vetvenia ako mutácia v PHYB. To naznačuje, že PHYB pôsobí na snímaní R:FR a že vysoký pomer R:FR podporuje vetvenie. Pri široku doplnkové FR svetlo v pozadí bieleho svetla redukuje rast púčikov rovnako ako *phyB-1* mutanti (Leduc *et al.*, 2014).

Vplyv fytochrómu A (PHYA) závisí na druhu rastliny. Pri ryži mutácia vo PHYA nespôsobujú žiadne rozpoznateľné zmeny fenotypu v porovnaní so základným fenotypom. U hrachu *phyA* mutácia spôsobuje zvýšenie vetvenia. Pri kultivare „Torsdag“, ak rastliny rastú pri normálnej fotoperióde alebo pri dlhej fotoperióde, žiadne postranné vetvy sa netvoria. Mutácia vo fytochróme A však spôsobí vyrastane mnohých vetiev pozdĺž celej hlavnej vetvy. Tento fenotyp bol pozorovaný aj u rastlín so základným fenotypom, ktoré rástli pri krátkej fotoperióde. Pri dlhej fotoperióde s FR bohatým spektrom, PHYA sa stáva primárnym fytochrómom zodpovedným za detekciu FR bohatých vlnových dĺžok pri detekcii dĺžky dňa.

Podľa doterajších výsledkov fytochrómy kontrolujú rast púčikov pomocou vnímania dĺžky dňa a pomeru R:FR, takže rastliny majú informácie o budúcich tieňových podmienkach (Leduc *et al.*, 2014).

3.5.2 Kryptochrómy

Kryptochrómy sú ďalšie dôležité fotoreceptory, ktoré sa podieľajú na kontrole svetla pri vývoji rastliny prostredníctvom vnímania modrého svetla (Leduc *et al.*, 2014). Kryptochrómy sú receptory modrého svetla. Bežné sú u rastlín, ale preukázané boli aj u rias. *Arabidopsis* má podľa súčasných poznatkov dva kryptochrómy – kryptochrom 1 (CRY1) kryptochrom 2 (CRY2). Kryptochrómy sú funkčné ako homodiméry. Proteíny viažu v značne konzervovanej oblasti N-domény nekovalentne dva chromofory – FAD a pterín. C-domény sú variabilnejšie a nesú signál pre lokalizáciu v jadre a zaisťujú schopnosť interakcie s ďalšími proteínmi (Pavlová, Fisher, 2011).

Mutanti so stratou funkcie kryptochrómov boli získaní u niekoľkých druhov napríklad u *Pisum sativum* či *Arabidopsis thaliana*. Napriek tomu nebol zdokumentovaný žiaden dopad *cry* mutácie na rast púčikov. Napriek tomu zvýšená expresia CRY2 u rajčiaku spôsobuje potlačenie apikálnej dominancie, a tým pádom rast axilárnych meristémov a vzniká rozsiahly vetviaci fenotyp (Leduc *et al.*, 2014).

Zdá sa, že vetvenie je pod kontrolou kryptochrómov u paradajky. CRY2 pravdepodobne podporuje rast púčikov a CRY1 stimuluje rast vyvíjajúcich sa axilárnych ve-

tiev. Takéto výsledky však neboli pozorované u *Arabidopsis* CRY1 alebo CRY2 expresorov. Takže sa musí jednať o rozdielnu kontrolu vývoja pomocou CRY u týchto dvoch druhov (Leduc *et al.*, 2014).

3.6 Génová expresia u inhibovných axilárnych púčikov

3.6.1 PsBRC1

Súčasnú štúdiu preukázali, že gény *tb1* a *BRC1* sú zapojené v tieňom indukovanej odpovedi na reguláciu vetvenia. U *Arabidopsis* je *BRC1* nadregulovaný v axilárnych púčikoch rastlín, ktoré rastú vo vysokej hustote a je pre nich dôležité v týchto podmienkach potlačiť vetvenie. Navyše *BRC1* a *BRC2* môžu odlišne prispievať na odpoveď potlačenia vetvenia a pôsobiť cez rôzne dráhy rastlín *Arabidopsis* rastúcich v podmienkach stáleho tieňa. Tieň indukuje fotosyntetickú aklimatizáciu, ktorá zahŕňa zmeny v expresii génov a metabolizme.

U väčšiny rastlín je hlavnou odpoveďou na SAS potlačenie vetvenia. Bolo preukázané, že vystavenie rastliny svetlu z nízkym pomerom R:FR svetla po kvitnutí spôsobuje potlačenie vetvenia a *BRC1* je potrebný na potlačenie rastu púčikov v týchto podmienkach. Jedna z teórií tvrdí, že v axilárnych púčikoch je mRNA génu pre *BRC1* (nie však pre *BRC2*) akumulovaná hneď po vystavení rastliny podmienkam tieňa (González-Grandío *et al.*, 2013).

Predpokladá sa, že *BRC1* je zapojený v strigolaktónovej signálnej dráhe pri potlačení rastu púčikov. Pri ošetrení rastliny strigolaktónmi rapídne zvýši expresia *PsBRC1* v axilárnych púčikoch. Transkripcia *PsBRC1* sa naopak zníži pri aplikácii cytokinínov na axilárne púčiky. Tieto výsledky poukazujú na to, že cytokiníny kontrolujú expresiu *PsBRC1* nezávisle na strigolaktónovej dráhe. *PsBRC1* môže teda interagovať so strigolaktónovou a cytokinínovou dráhou na transkripčnej úrovni (Braun *et al.*, 2012).

3.6.2 PsDRM1

Gény *DRM1* a *DRM2* sú spojené s dormanciou u axilárnych púčikov u rastlín hrachu. *PsDRM1* gén je oveľa lepší marker dormancie ako *PsDRM2*. Sekvencia *PsDRM1* má otvorený čítací rámec a kóduje 111 aminokyselín. Dĺžka cDNA je 554 párov báz. Množstvo mRNA *PsDRM1* sa zníži asi 20x 6 hodín po dekapitácii a po 12 hodinách je už signál nedetekovateľný.

Expresia *PsDRM1* je tiež spojená s nerastúcimi alebo „zrelými“ štádiami u koreňov a stoniek. Na príklad signál *PsDRM1* nie je detekovaný v koreňových vrcholoch ktoré obsahujú populáciu deliacich sa buniek, ale bol detekovaný v zreľých koreňových pletivách kde je delenie buniek vzácné. Z toho vyplýva, že *PsDRM1* je primárne exprimovaný v nerastúcich púčikoch, koreňoch a stonkách (Stafstrom *et al.*, 1998).

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Experimentálny materiál

Pre experiment bol využitý hrach odrody Paloma. Osivo pre experimenty láskavo poskytla prof. Christine Beveridge z univerzity v Queenslande. Toto osivo bolo pre experimentálne účely niekoľkokrát premnožené. Odroda Paloma je výhodná (na rozdiel od odrôd hrachu tradične využívaných na Ústave biologie rastlin k štúdiu apikálnej dominancie) tým, že vetví pri bežných kultivačných podmienkach z bazálnych internódií a zároveň je v dostupnej literatúre uvádzaná ako odroda citlivá k fotoperióde vo vzťahu k vetveniu stonky (Arumingtyas *et al.*, 1992).

V predbežných testoch bola využívaná odroda hrachu Torsdag, ktorá mala podľa niektorých autorov vetviť pri podmienkach krátkeho dňa v niektorých nodoch. To však v experimentoch nebolo pozorované.

4.2 Metodika

4.2.1 Výsev rastlín

Semená boli najprv ponechané 24 hodín vo vode aby došlo k ich nabobtnaniu. Potom nasledoval výsev do perlitu. Rastliny boli v perlite ponechané po dobu 7 dní, aby došlo k ich vyklíčeniu. Následne boli rastliny premiestnené do živného roztoku a prenesené na príslušný svetelný režim (fotoperióda, spektrálne zloženie svetla), kde boli kultivované po dobu 7 dní pred začiatkom merania axilárov. Ako zdroj minerálnej výživy bol využitý Richterov živný roztok (Richter, 1926).

4.2.1.1 Kultivačné podmienky

Rastliny boli kultivované pri teplote 22 ° C cez deň a 18 ° C v noci pri relatívnej vzdušnej vlhkosti 60%.

Skúmané boli 3 varianty: Krátky deň - 8 hodín svetlo, 16 hodín tma

Dlhý deň – 16 hodín svetlo, 8 hodín tma

Nepretržité osvetlenie – 24 hodín svetlo

Rastliny boli kultivované v dvoch rôznych klimatizovaných komorách (Climacell).

1. Climacell 707 – v tomto prípade boli rastliny kultivované pri žiarivkovom osvetlení (Sylvania Lux Line Plus Cool White F15W/840, GE) s PPFD $186 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Testovali sa tri experimentálne varianty: Intaktné rastliny

Rastliny dekapitované nad 3. nodom

Rastliny dekapitované nad kľúčnymi listami

2. Climacell 707 evo – v tomto prípade boli rastliny kultivované pri LED diódovom osvetlení v troch rôznych variantách s rozdielnym spektrálnym zložením svetla

a) Červená zložka (100 %), Modrá zložka (50 %), FR (10 %), PPFD $34 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (červené svetlo)

b) Červená zložka (50 %), Modrá zložka (100 %), FR (10 %), PPFD $54 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (modré svetlo)

c) Biele svetlo (100 %), PPFD $328 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$

Testovali sa dve experimentálne varianty: Intaktné rastliny

Rastliny dekapitované nad 3. nodom

4.2.2 Meranie čistého prírastku

Po tom, čo boli rastliny kultivované (7 dní v príslušnom svetelnom režime), sa prešlo k meraniu postranných vetví. Boli merané vetvi prvého, druhého a tretieho nodu. Bolo vykonané nulté meranie, pri ktorom sa určila počiatočná dĺžka vetví. Po tom boli vetvy každý deň po dobu 5 dní premerané a vypočítal sa čistý prírastok dĺžky ako podiel príslušnej dĺžky axiláru v daný deň a počiatočnej dĺžky axiláru (nulté meranie). V rámci každej varianty bolo meraných 10-12 rastlín.

4.2.3 Odber vzoriek

Tri dni po presadení a prenesení kľúčnych rastlín do príslušných svetelných podmienok boli z intaktných rastlín, pestovaných v kimacelli s LED diódovým osvetlením, odobrané vzorky axilárnych púčikov druhého nodu na analýzy gémovej expresie. Pre každú experimentálnu variantu boli odobrané púčiky z 10-11 rastlín. Vzorky boli

následne zmrazené v tekutom dusíku. Experimenty boli vykonané v jednom biologickom opakovaní a v jednom technickom opakovaní.

4.2.4 Izolácia RNA

4.2.4.1 Izolácia celkovej RNA z axilárnych púčikov

Prvým krokom bola homogenizácia vzoriek v kvapalnom dusíku (navážka do max. 100mg axilárnych púčikov). Samotná izolácia RNA a jej purifikácia bola vykonaná pomocou kitu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, GE). Na odstránenie zvyškov genómovej DNA bol použitý RNaseFree DNase Set (Qiagen, GE). Po prečistení boli vzorky eluované z kolóniek pomocou 40µl deionizovanej vody bez RNáz a boli uskladnené pri -70°C v hlbokomraziacom boxe MDF-U3286S (Sanyo, JPN). Pri manipuláciách s RNA boli používané autoklávané špičky a mikroskúmavky.

Pracovalo sa v latexových rukaviciach, ktoré boli ošetrené prípravkom RNase Zap (Sigma, USA), aby bolo riziko kontaminácie vzoriek ribonukleázami minimálne.

4.2.5 Stanovenie výťažnosti RNA

Koncentrácia RNA bola stanovená spektrofotometricky s využitím prístroja PicoDrop (Picodrop Ltd., UK) pri vlnovej dĺžke 260 nm.

4.2.6 Elektroforéza RNA

Denaturujúca gélová elektroforéza s farbením pomocou fluorescenčného farbiva etidumbromidu bola použitá na overenie integrity izolovanej RNA.

4.2.6.1 Príprava agarózového gélu

Agarózový gél bol pripravený podľa manuálu RNeasy Mini Handbook (Qiagen, GE). Bolo použitých 1,2 g agarózy (Sigma, USA) a 10 ml pufru 10x FA gel buffer (tab. 1.) a objem bol doplnený na 100 ml. Za stálého miešania bola zmes zahriata k varu. Po rozpustení agarózy bol roztok mierne ochladený a bolo pridaných 1,8 ml 37 % formaldehydu a 1,2 µl 10% roztoku etidumbromidu. Pripravený gél bol následne inkubovaný v 1x FA gel runnig bufferu pripraveného podľa manuálu RNeasy Mini Handbok (Qiagen, GE) (100 ml 10x FA gel buffer + 20 ml 37 % formaldehydu + 880 ml vody / 1 l roztoku) po dobu 30 minút.

Tab. 1 Zloženie pufru 10x FA gel buffer

Komponent	Potrebné množstvo
3-[N-morfolino]propánsulfónová kyselina (MOPS)	200 mM
Octan sodný	50 mM
EDTA	10 mM
Doplniť destilovanou vodou na objem 1000 ml, pH=7	

4.2.6.2 Príprava vzoriek

Podľa koncentrácie RNA bol do mikroskúmavky napipetovaný taký objem vzorky, ktorý obsahuje 1 µg RNA. Následne bol pridaný nanášací pufr 5x RNA loading buffer pripravený podľa manuálu RNeasy Mini Handbook (tab. 2.) v pomere 1:4. Táto zmes bola následne inkubovaná 3-5 minút pri teplote 65°C. Vzorky boli potom napipetované do nanášacích jamiek na gély.

Tab. 2 Zloženie nanášacieho pufru 5x RNA loading buffer

Komponent	Zásobná koncentrácia	Potrebné množstvo
Bromfenolová modrá	nasýtený vodný roztok	16 µl
EDTA (pH=8)	500 mM.	80 µl
Formaldehyd	37 %	720 µl
Glycerol	100 %	2 ml
10x FA gel buffer	10x	4 ml
Doplniť destilovanou vodou na celkový objem 10 ml		

4.2.6.3 Vlastná denaturačná elektroforéza RNA

Elektroforetická separácia molekúl RNA bola vykonaná pomocou súpravy pre elektroforézu fy. OMNI-BIO (CZ) . V súprave bola zahrnutá forma na odlievanie gélu, nádobu na elektroforézu, hrebienok na odlievanie nanášacích jamiek (10 zubov, šírka zubu 6 mm) a zdroj napätia typu P1. Rozmery gélu: 85x100 mm. Separácia prebiehala v 1x FA gel runnig pufru pri napätí 50-70 V. Gél bol následne nasnímaný pod UV žiarením. Na elektroforeograme sú ostro oddelené prúžky jednotlivých frakcií

ribozomálnych RNA, z ktorých najzreteľnejšie sú 25S rRNA a 18S rRNA, ktoré tvoria rozhodujúci podiel celkovej RNA.

4.2.7 RT-PCR

Amplifikácia cieľových mRNA bola vykonaná metódou dvoj krokovej semikvantitatívnej RT-PCR pomocou kitu Enhanced Avian HS RT-PCR Kit (Sigma, USA).

4.2.7.1 Reverzná transkripcia

V prvej fáze bola vykonaná reverzná transkripcia všetkých mRNA. Pri tejto reakcii boli všetky molekuly mRNA prepísané do molekúl príslušných cDNA s využitím enzýmu reverznej transkriptázy z víru vtácej myeloblastózy (AMV-RT). Pri reverznej transkripcii bol využitý oligo (dT)₂₃ primer, ktorý sa viaže na polyadenylový koniec mRNA. Do mikroskúmavky bol pridaný objem vzorky obsahujúci 1 µg celkovej RNA. Zloženie reakčnej zmesi pre prvú fázu je obsiahnuté v tab. 3. Po napipetovaní všetkých komponent boli mikroskúmavky zvortexované (MS2 Minishaker, IKA, USA), krátko scentrifugované a následne temperované v termocyclery Biometra T3 thermocycler, GE na 70 °C po dobu 10 minút. Pri tejto teplote dochádza k denaturácii sekundárnej štruktúry RNA.

Tab. 3 Zloženie reakčnej zmesi pre prvú fázu RT-PCR

Komponent	Zásobná koncentrácia	Finálna koncentrácia	Objem (µl)
Voda (PCR reagent, Sigma, USA)			
Templátová RNA		0,1 µg/ µl	
Mix deoxyribonukleotidov (Sigma, USA)	10 mM každého dNTP	500 µM každého dNTP	1
oligo (dT) ₂₃ primer (Sigma, USA)	0,5 µg/ µl	3,5 µM	1
Celkový objem reakčnej zmesi: 10 µl			

Následne boli vzorky schladené na ľade a do mikroskúmavky boli pridané komponenty uvedené v tab. 4. Syntéza prvého reťazca cDNA prebiehala v termocyclery pri teplote 45 °C po dobu 50 minút.

Tab. 4 Zloženie reakčnej zmesi pre druhú fázu RT-PCR

Komponent	Zásobná koncentrácia	Finálna koncentrácia	Objem (μl)
Voda (PCR reagent, Sigma, USA)			6
10x buffer for AMV-RT (Sigma, USA)	10x	1x	2
Inhibitor RNázy (Sigma, USA)	20 U/ μl	1 U/ μl	1
AMV-RT (Sigma, USA)	20 U/ μl	1 U/ μl	1
Celkový objem reakčnej zmesi: 20 μl			

4.2.7.2 Vlastná PCR

0,5 μl roztoku cDNA získanej pri reverznej transkripcii spolu s komponentami uvedenými v tab. 5. Boli napipetované do tenkostenných mikroskúmaviek pre PCR o objeme 200 μl (Axygen, USA). Mikroskúmavky boli následne zvortexované a scentrifugované. Amplifikácia cieľových sekvencií bola vykonaná v termocyklere pri teplotnom režime uvedenom v tab. 6. Vzorky boli následne krátkodobo skladované pri teplote 6-8 °C.

Tab. 5 Zloženie reakčnej zmesi pre vlastnú PCR reakciu

Komponent	Zásobná koncentrácia	Finálna koncentrácia	Objem (μl)
Voda (PCR reagent, Sigma, USA)			34,5
5x Green GoTaq buffer (Promega, USA)	5x	1x	10
Dimetylsulfoxid (Sigma, USA)		2 % obj.	1
Mix deoxyribonukleotidov (Sigma, USA)	10 mM dATP, 10 mM dCTP, 10 mM dDTT, 10 mM dGTP	200 μM každého dNTP	1
PCR primery	50 pM/ μl každý	1 pM/ μl každý	2
cDNA z RT reakce			1
GoTaq DNA polymeráza (Promega, USA)	5 U/ μl	0,05 U/ μl	0,5
Celkový objem reakčnej zmesi: 50 μl			

Sekvence použitéch špecifických primerov:

PsActin-F 5'-TGTCAGCCACACTGTCCCTATC-3'

PsActin-R 5'-CAAGACGAAGGATGGCATGT-3'

Veľkosť PCR produktu: 62 bp

Zdroj: (Die *et al.*, 2010)

PsBRC1-F 5'-AGGCAAGAGAAAGAGCAAGG-3'

PsBRC1-R 5'-TTGCATTGCTTTGAGTTTGA-3'

Veľkosť PCR produktu: 94 bp

Zdroj: (Braun *et al.*, 2012)

PsDRM1-F 5'-AACTCACCACCACCTCAAAGATG -3'

PsDRM1-R 5'-GATGTAGACACGTGGCAGAAGATG-3'

Veľkosť PCR produktu: 352 bp

PsPIN1-F 5'-CTGCGTCCGACAATATAGAT-3'

PsPIN1-R 5'-AGTTATGCCACCAGCTAG-3'

Veľkosť PCR produktu: 182 bp

Tieto primery boli navrhnuté na Ústavu biologie rostlin.

Tab. 6 Reakčné podmienky PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklov
Počiatočná denaturácia	94	3 min.	1
Denaturácia	94	45 s	28
Annealing	55	30 s	
Elongácia	72	1 min. 30 s	
Záverečná elongácia	72	5 min.	1

4.2.7.3 Elektroforetická separácia PCR produktov

Amplifikované fragmenty ofarbené etídiumbromidom boli rozdelené pomocou elektroforézy na 1,2 % agarózovom gély o veľkosti 85x100 mm (tab. 7.). Do nanášacích jamiek gélu bolo napipetovaných 18 µl PCR produktu spoločne s 2 µl nanášacieho puru

Blue/Orange 6x Loading Dye (Promega, USA). Elektroforéza prebiehala v prostredí trisacetátového pufru (tab. 8.) pri napätí 70 V po dobu cca 1 hod. Na určenie veľkosti amplifikovaných fragmentov bol použitý veľkostný marker 50 bp DNA ladder (Thermo, USA). Po ukončení separácie boli fragmenty vizualizované pomocou UV žiarenia a nasnímané dokumentačným systémom GDS 7500 (UVP, USA) s využitím programu Grab-IT 2,0 (UVP, USA). Intenzita fluorescencie amplifikovaných produktov bola následne vyhodnotená s využitím programu GelWorks 1D Intermediate (UVP, USA). Získané hodnoty odpovedajúce hladinám mRNA jednotlivých génov v príslušnej vzorke boli vyjadrené ako pomerná hodnota voči expresii konštitutívne exprimovaného génu.

Tab. 7 Zloženie 1,2 % agarózového gélu pre elektroforetické rozdelenie PCR produktov

Komponent	Potrebné množstvo
Agaróza (Sigma, USA)	0,6 g
1xTAE pufr	50 ml
Etídiumbromid (10% vodný roztok)*	0,6 μ l

*Etídiumbromid bol pridaný až po ochladení gélu na cca 65 °C

Tab. 8 Zloženie trisacetátového pufru

Komponent	Potrebné množstvo
Tris báza (Serva, USA)	242 g
Ľadová kyselina octová (Lachema, CZ)	57,1 ml
Na ₂ EDTA (500 mM.l ⁻¹ , pH 8, Lachema, CZ)	100 ml
Doplniť destilovanou vodou na celkový objem: 1000 ml	

4.2.8 Štatistické vyhodnotenie rastových experimentov

Na vyhodnotenie rastových experimentov bol využitý program MS Excel. Z čistých prírastkov dĺžky vetví bol vypočítaný aritmetický priemer, smerodajná odchýlka a stredná chyba aritmetického priemeru. Z týchto hodnôt boli zostrojené grafy a vynesené chybové úsečky. Na analýzu štatistických rozdielov medzi jednotlivými variantmi bol použitý študentov t-test.

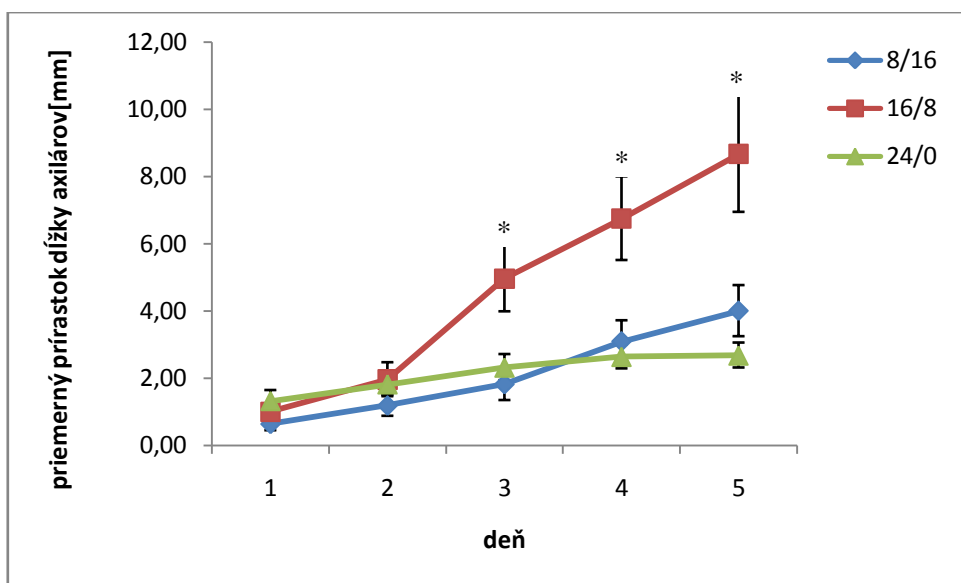
5 VÝSLEDKY A DISKUSIA

5.1 Vyhodnotenie rastu púčikov

5.1.1 Pokusy so žiarivkovým osvetlením

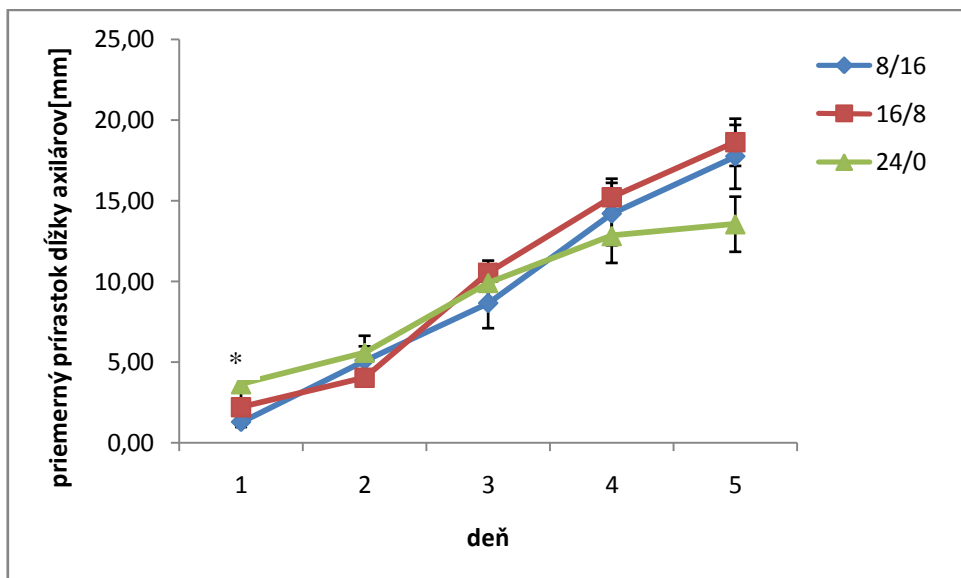
V prvých pokusoch sa skúmal rast rastlín pod bielim svetlom. Testovali sa tri varianty: Intaktné rastliny, rastliny dekapitované nad tretím nodom a rastliny dekapitované nad kľúčnymi listami.

Vplyv fotoperiód na rast axilárnych púčikov intaktných rastlín



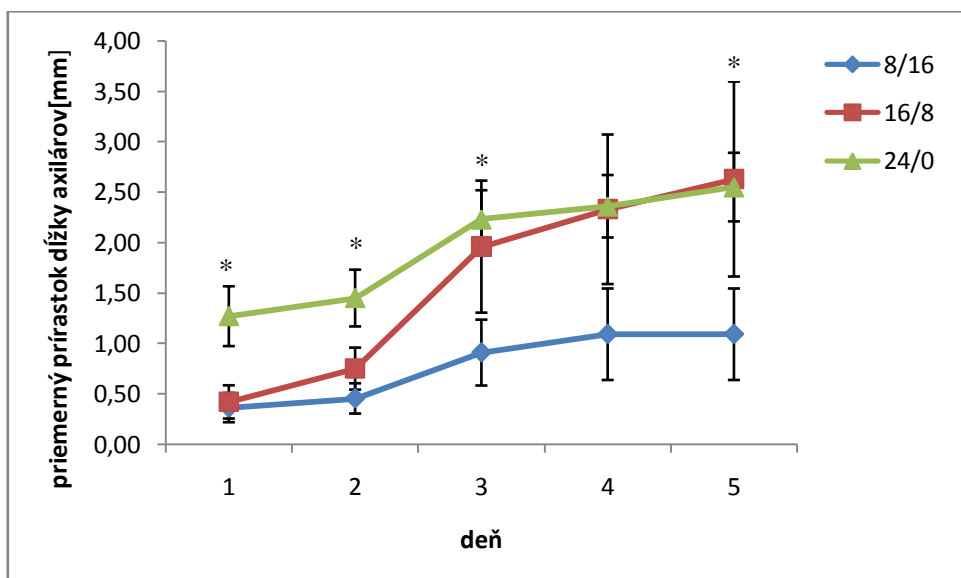
Obr. 1 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 1 v prvé dva dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetví prvého nodu. V treťom a štvrtom a piatom dni je rast pri šesnásťhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě.



Obr. 2 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

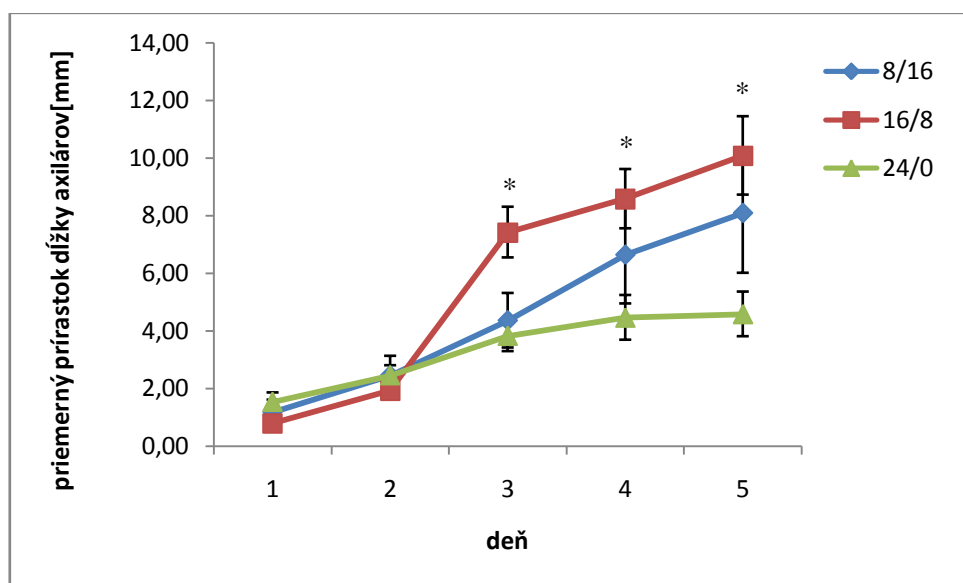
Ako vyplýva z Obr. 2 v prvý deň je rast vetví druhého nodu pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri osemhodinovej fotoperióde. V ďalších dňoch nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste, ale mierne dominuje rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde.



Obr. 3 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 3 v prvý deň je rast vetiev tretieho nodu pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri šestnásť a osemhodinovej fotoperiódě. V druhom a treťom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Vo štvrtom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste. V piatom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě.

Vplyv fotoperiódě na rast axilárnych púčikov rastlín dekapitovaných nad 3. nodom

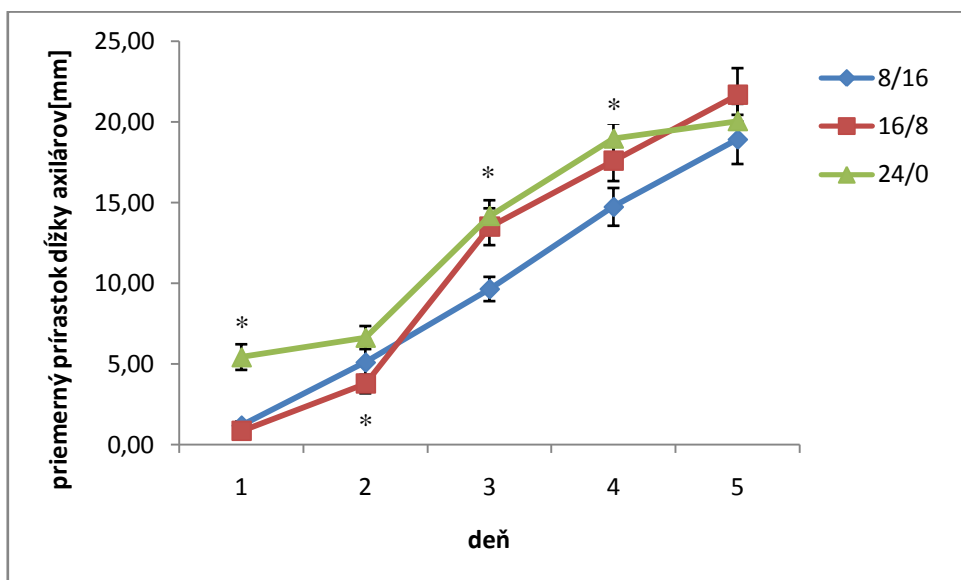


Obr. 4 Vplyv fotoperiódě na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 4 v prvých dvoch dňoch nie žiadny štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. V tretí deň je rast pri šestnásťhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Vo štvrtom a piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri šestnásťhodinovej fotoperiódě.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri šestnásťhodinovej fotoperiódě a najnižší rast bol pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Pri intaktných rastlinách bol však rast výrazne nižší ako pri dekapitovaných. V poslednom dni vetvy rastlín pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě u intaktných rastlín dorástli len do polovice dĺžky

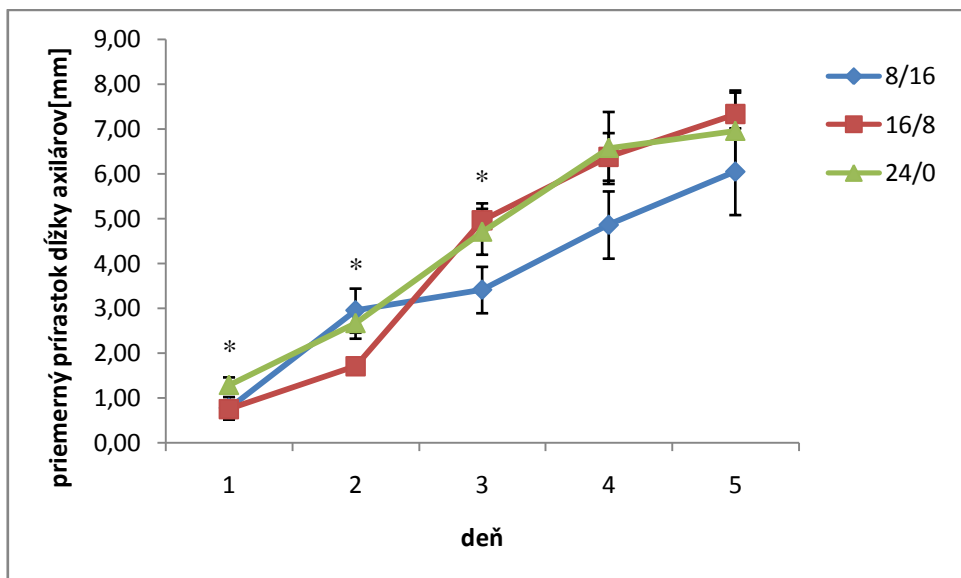
vetiev rastlín dekapitovaných. Pri šestnásťhodinovej fotoperióde bol tiež rast mierne nižší.



Obr. 5 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 5 v prvý deň je rast vetiev druhého nodu štatisticky významne vyšší pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V druhý je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri šestnásťhodinovej. V treťom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri šestnásť a dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. Vo štvrtom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri dvadsaťštyrihodinovej. V piatom dni už nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste, ale mierne dominuje rast pri šestnásťhodinovej fotoperióde.

Pri intaktných rastlinách rovnako dominoval rast pri šestnásťhodinovej fotoperióde, rast pri zvyšných dvoch fotoperiódach bol však opačný. Pri intaktných rastlinách bol rast rovnako ako pri prvom node výrazne nižší ako pri dekapitovaných rastlinách.

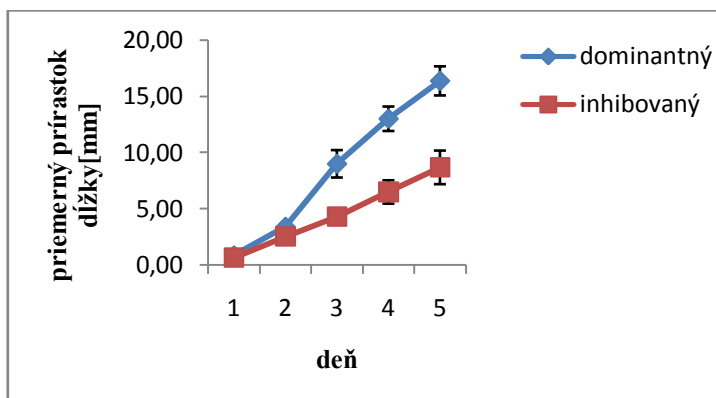


Obr. 6 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

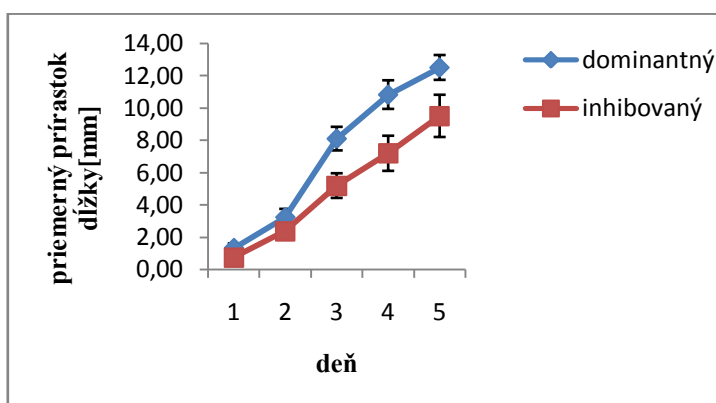
Ako vyplýva z Obr. 6 v prvý deň je rast vetiev tretieho nodu pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri šesťnásťhodinovej. V druhý deň je rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V tretí deň je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri šesťnásťhodinovej fotoperióde. Vo štvrtom a piatom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde a najnižší rast bol pri osemhodinovej fotoperióde. Pri intaktných rastlinách bol však rast výrazne nižší ako pri dekapitovaných. Najvýraznejší rozdiel bol pri osemhodinovej fotoperióde kde vetvy 3. nodu u dekapitovaných rastlín rástli niekoľkonásobne rýchlejšie ako pri intaktných rastlinách.

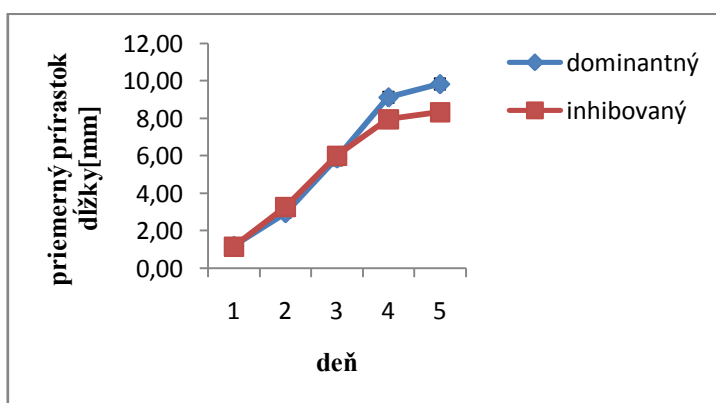
Vplyv fotoperiody na rast kotylárnych púčikov u rastlín dekapitovaných nad kľúčnymi listami



Obr. 7 Rast kotylárnych púčikov pri osemhodinovej fotoperióde.



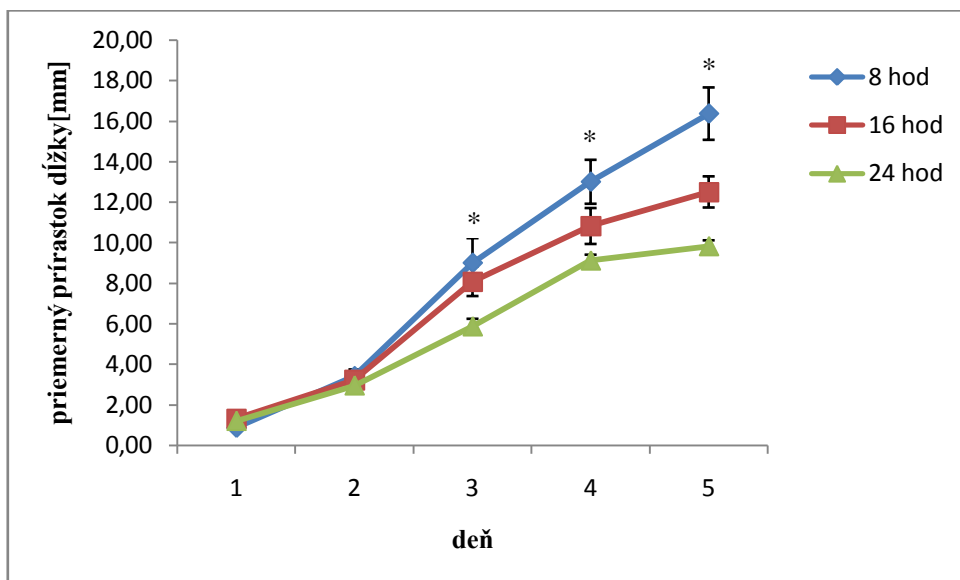
Obr. 8 Rast kotylárnych púčikov pri šesťnásťhodinovej fotoperióde.



Obr. 9 Rast kotylárnych púčikov pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde.

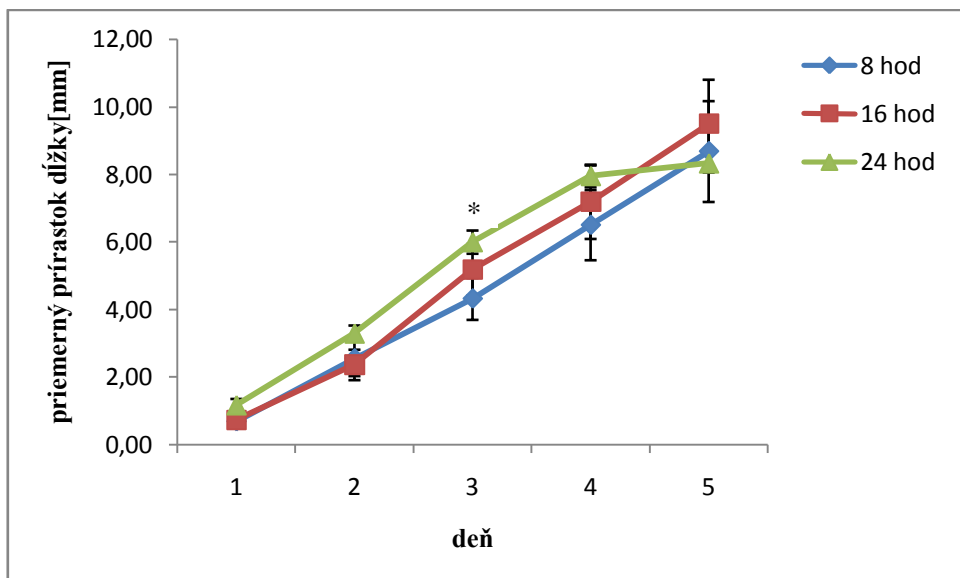
Ako vyplýva z Obr. 7 – Obr. 9 pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperióde bol výrazný rast dominujúcich kotylárov zatiaľ čo rast druhých kotylárov bol potlačený. Pri

dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde naopak nebol výrazný rozdiel v raste medzi kotýlar-
mi a obe sa viac menej vyvíjali rovnako.



Obr. 10 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky dominujúcich kotylárnych púčikov u rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 10 v prvých dvoch dňoch nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste dominujúcich kotýlarov. V tretí deň je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťhodinovej fotoperióde. Vo štvrtom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťhodinovej fotoperióde.



Obr. 11 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky inhibovaných kotylárnych púčikov u rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 11 v prvých dvoch dňoch nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste inhibovaných kotylárov. V treťom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Vo štvrtom a piatom dni nie je žiadne štatisticky významný rozdiel v raste.

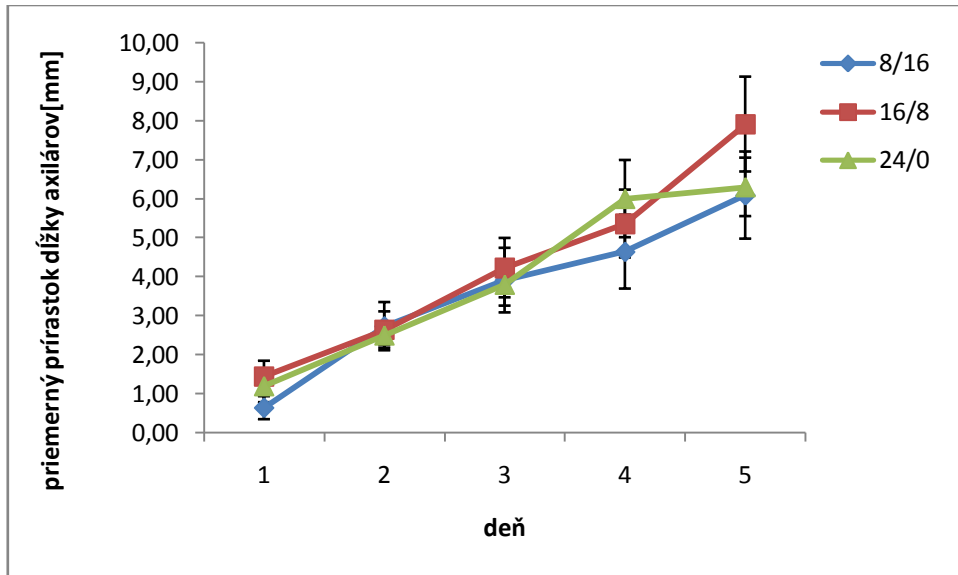
Vo väčšine meraní nebol medzi jednotlivými variantmi zaznamenaný preukázateľný rozdiel v raste inhibovaných kotylárov, aj keď je z výsledkov zrejماً opačná tendencia oproti rastu dominujúcich kotylárov. Rozdiely medzi dominujúcimi a inhibovanými kotylármi pri jednotlivých fotoperiódach sú teda spôsobené hlavne zvýšenou rastovou aktivitou dominujúcich kotylárov pri kratších fotoperiódach.

5.1.2 Pokusy s LED diódovým osvetlením

V týchto pokusoch sa skúmal rast pod bielim, modrým a červeným osvetlením. Testovali sa dve varianty: intaktné rastliny a rastliny dekapitované nad 3. nodom. Následne bolo ešte vykonané porovnanie rastu vetiev druhého nodu u intaktných rastlín pri bielom, modrom a červenom svetle.

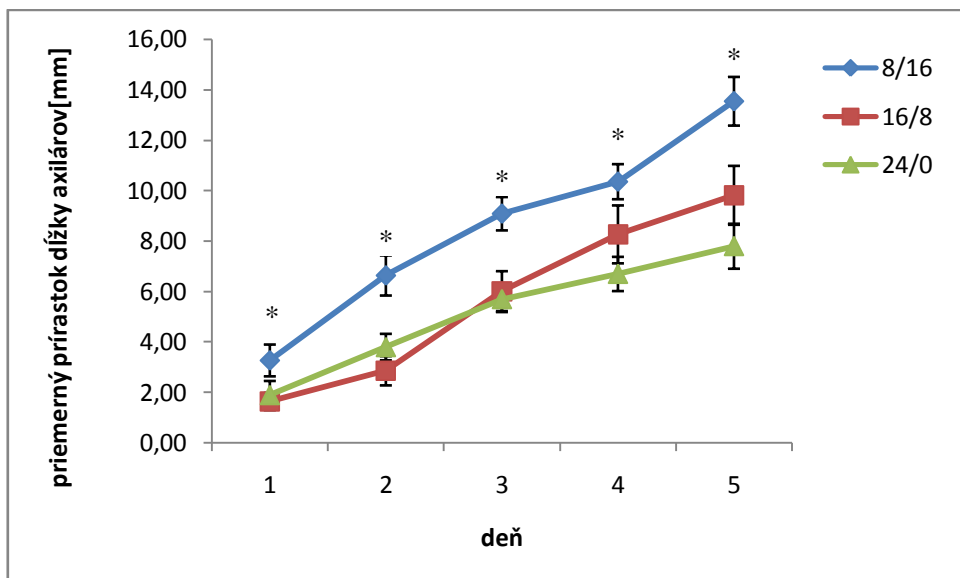
5.1.2.1 Pokusy pod modrým svetlom

Vplyv fotoperiody na rast axilárnych púčikov intaktných rastlín



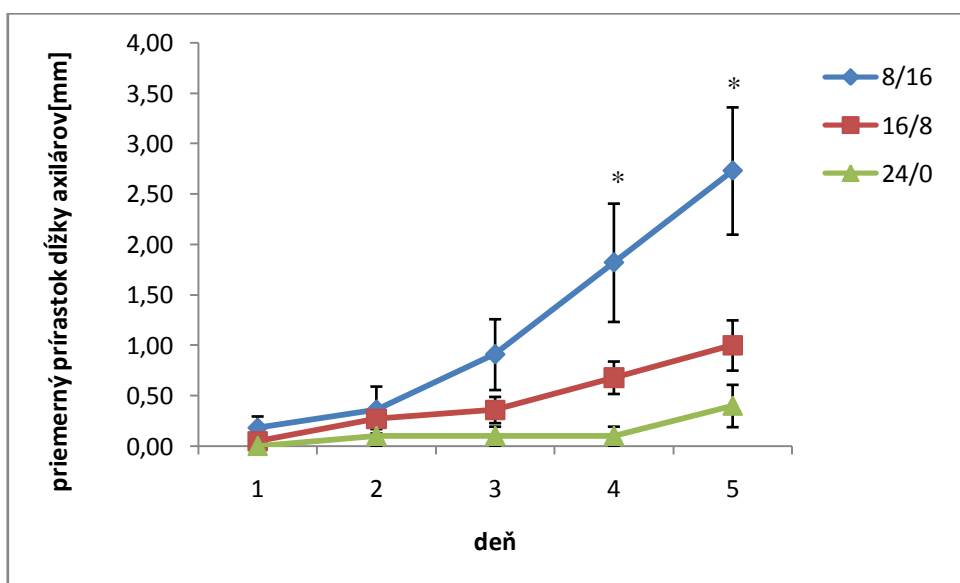
Obr. 12 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 12 ani v jednom z piatich dní nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. Zo začiatku mierne dominoval rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde, ale v piaty deň už dominoval rast pri šesťnásťhodinovej.



Obr. 13 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

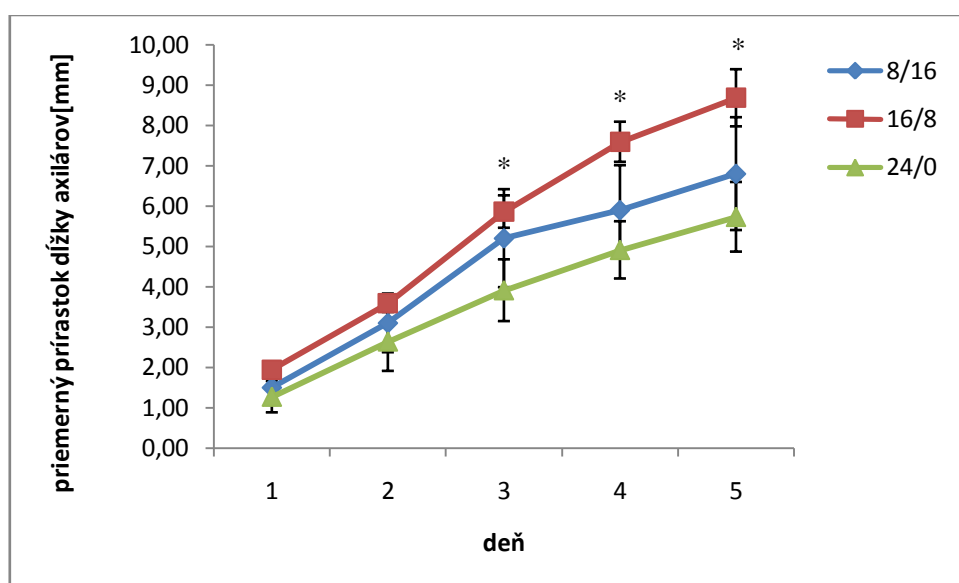
Ako vyplýva z Obr. 13 v prvom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri šestnást' hodinovej fotoperiódě. V druhom, treťom a piatom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri šestnást' a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Vo štvrtom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej.



Obr. 14 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 14 v prvých troch dňoch nie žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetiev tretieho nodu. Vo štvrtom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperióde. V piatom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri šesťnásť a dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde.

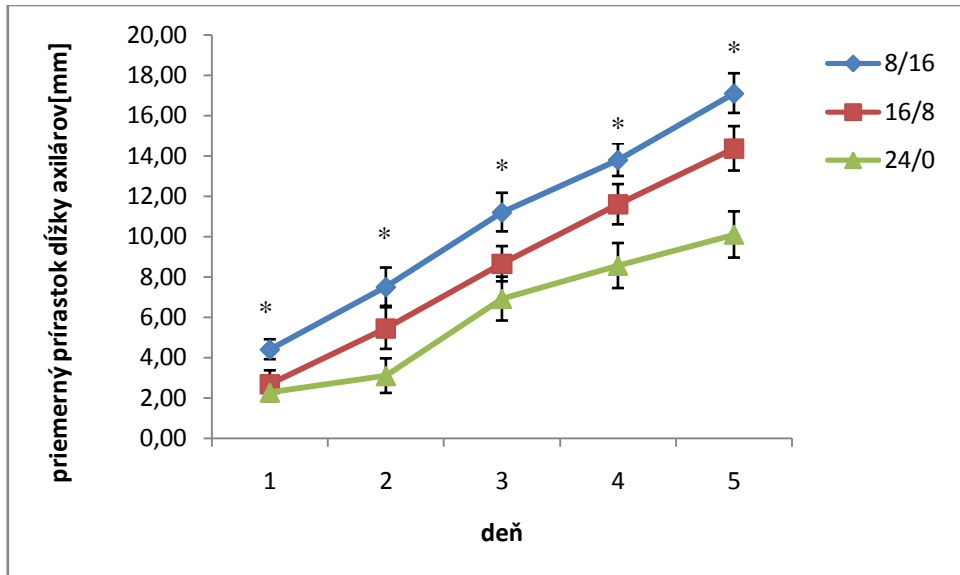
Vplyv fotoperiódy na rast axilárnych púčikov rastlín dekapitovaných nad 3. nodom



Obr. 15 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 15 v prvých dvoch dňoch nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. V treťom, štvrtom a piatom dni je rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej.

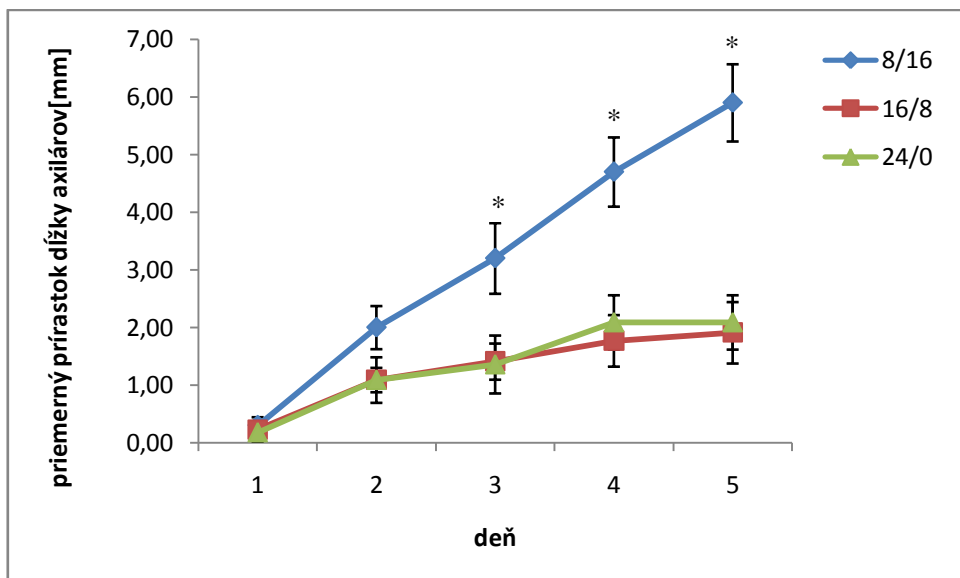
Pri intaktných rastlín rovnako mierne dominoval rast pri šesnásťhodinovej fotoperiódě, medzi rastom pri osem a šesnásťhodinovej fotoperiódě u intaktných nebol takmer žiaden rozdiel. Nebol pozorovaný ani žiaden výrazný rozdiel v raste akurát rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě u intaktných rastlín bol mierne vyšší ako pri dekapitovaných.



Obr. 16 Vplyv fotoperiódě na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 16 v prvom až štvrtom dni je štatisticky výrazne vyšší rast vetiev druhého nodu pri osemhodinovej fotoperiódě ako dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri osem a šesnásťhodinovej fotoperiódě.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri osemhodinovej fotoperiódě a najnižší rast bol pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Pri intaktných rastlinách bol však rast výrazne nižší ako pri dekapitovaných.



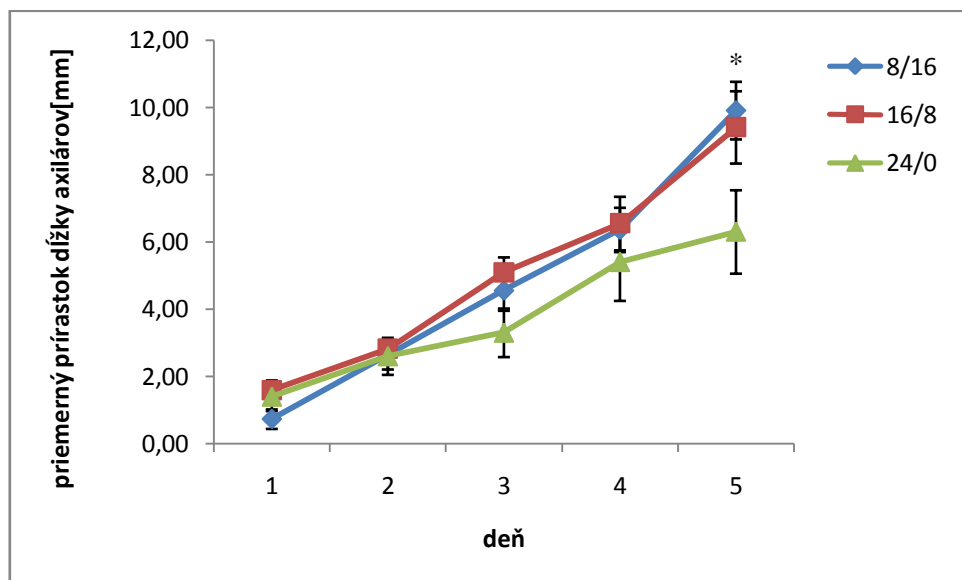
Obr. 17 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 17 v prvých dvoch dňoch nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetiev tretieho nodu. Vo zvyšných dňoch je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri šestnásť a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri osemhodinovej fotoperiódě. Pri intaktných rastlinách bol však rast výrazne nižší ako pri dekapitovaných.

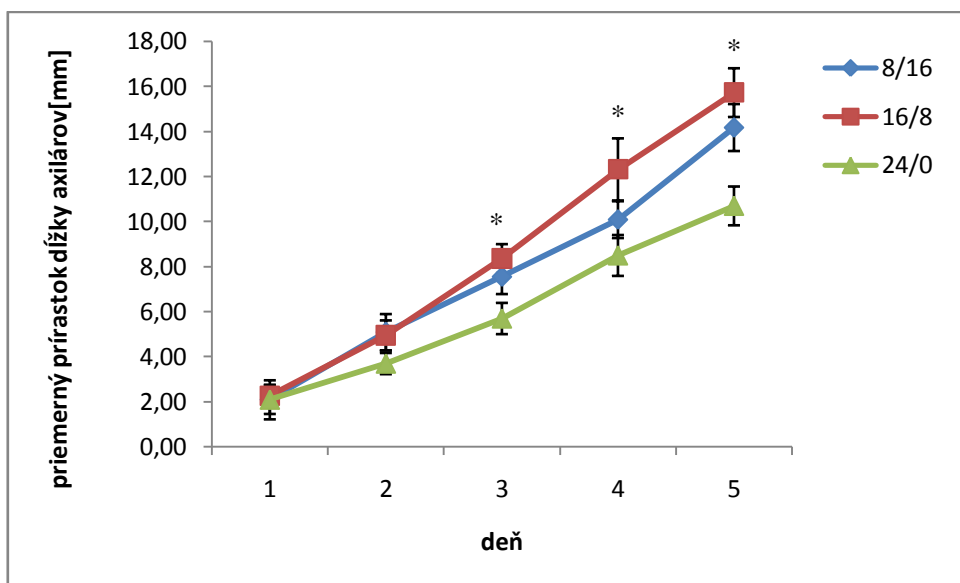
5.1.2.2 Pokusy pod bielim svetlom

Vplyv fotoperiody na rast axilárnych púčikov intaktných rastlín



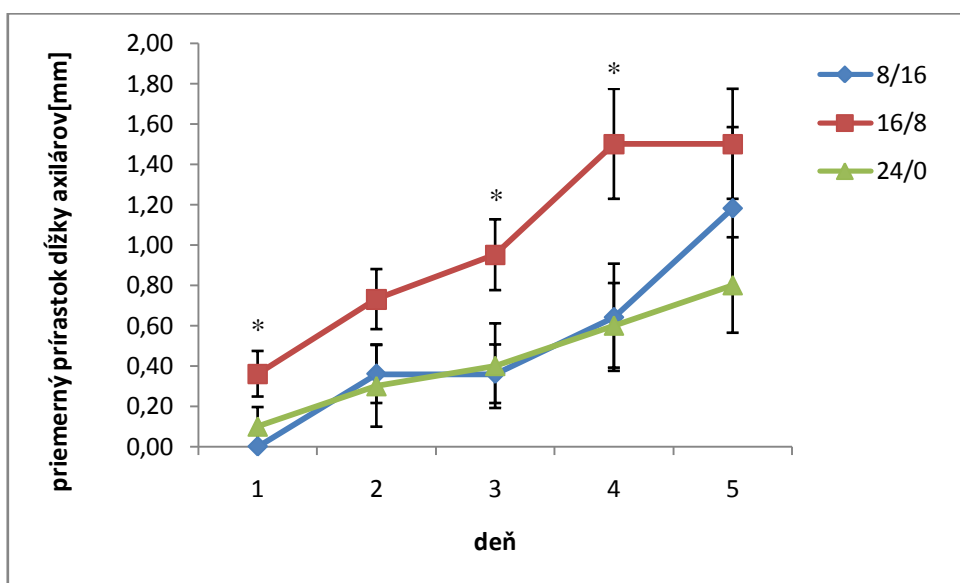
Obr. 18 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 18 v prvých štyroch dňoch nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri osemhodinovej fotoperiódě.



Obr. 19 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

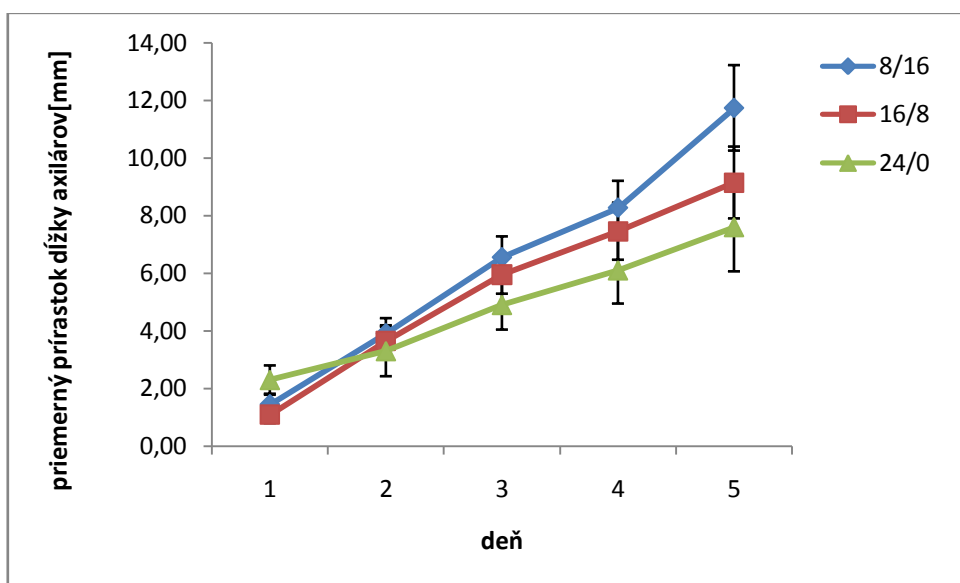
Ako vyplýva z Obr. 19 v prvých dvoch dňoch nie je žiadne štatisticky významný rozdiel v raste vetiev druhého nodu. V treťom a štvrtom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě. V piaty deň je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej.



Obr. 20 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 20 v prvom dni je rast vetiev tretieho nodu štatisticky významne vyšší pri šesťnásť hodinovej fotoperióde ako pri osemhodinovej fotoperióde. V druhom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste. V treťom dni je rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri osemhodinovej. Vo štvrtom dni je rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V piatom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste, ale mierne dominuje rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde.

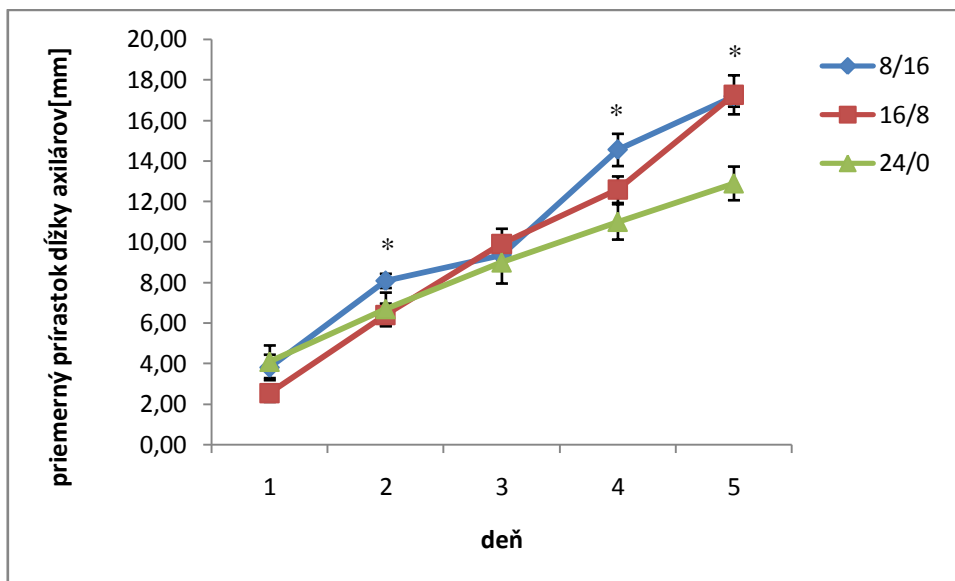
Vplyv fotoperiódy na rast axilárnych púčikov rastlín dekapitovaných nad 3. nodom



Obr. 21 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 21 ani v jednom z piatich dní nie štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. Od druhého dňa však mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.

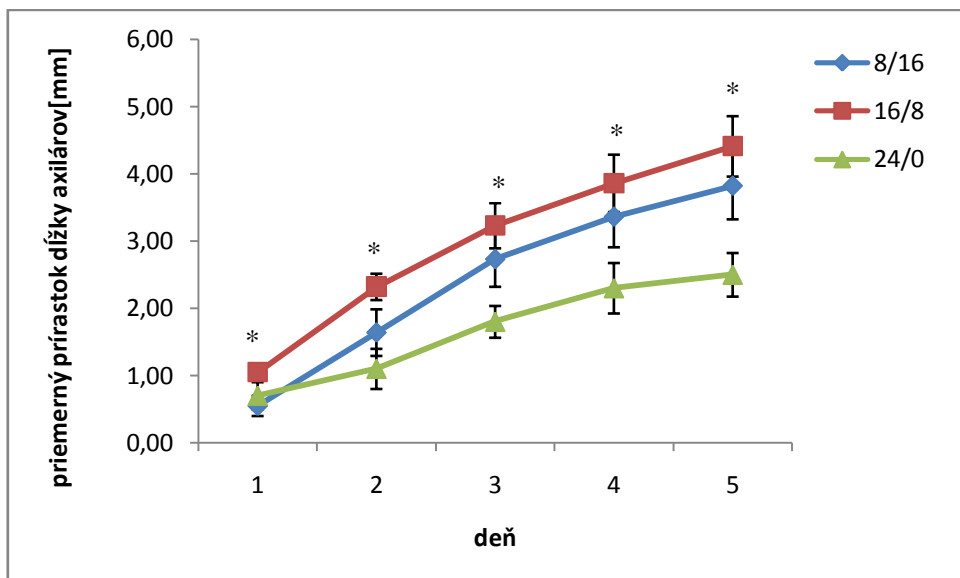
Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri osemhodinovej fotoperióde a najnižší rast bol pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. Rast intaktných rastlín bol mierne nižší ako pri dekapitovaných.



Obr. 22 Vplyv fotoperiód na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 22 v prvom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetiev druhého nodu. V druhom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě. V treťom dni nie je žiaden štatistický rozdiel v raste. Vo štvrtom dni je rast pri osemhodinovej fotoperiódě štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyri-hodinovej fotoperiódě štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperiódě.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě a najnižší rast bol pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě. Medzi intaktnými a dekapitovanými rastlinami nebol výrazný rozdiel v raste.



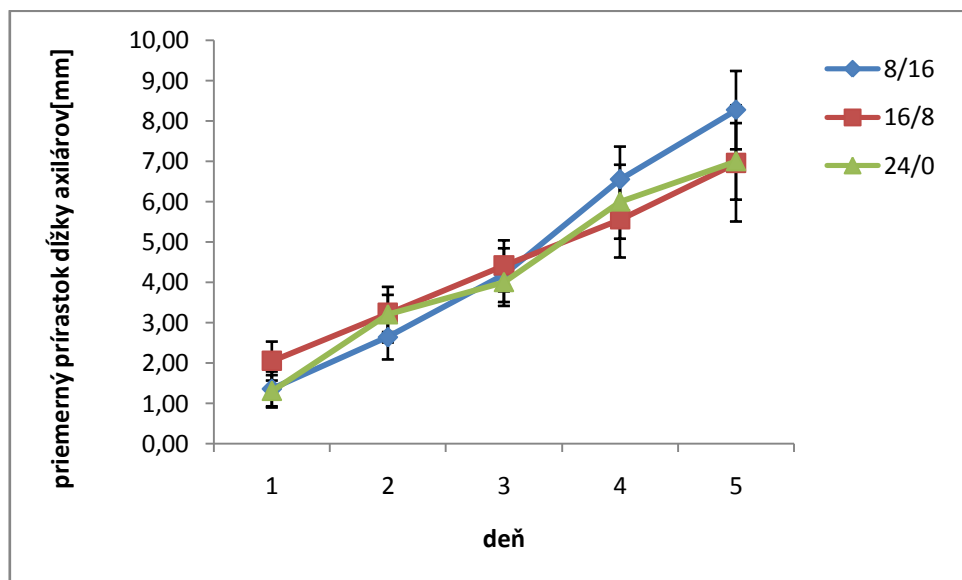
Obr. 23 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 23 v prvom dni je rast vetiev tretieho nodu pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri osemhodinovej. V druhom, treťom a štvrtom dni je rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperióde.

Pri intaktných rastlín dominoval rovnako rast pri šesťnásťhodinovej fotoperióde a najnižší rast bol pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. Rast intaktných rastlín bol však výrazne nižší ako pri dekapitovaných rastlinách.

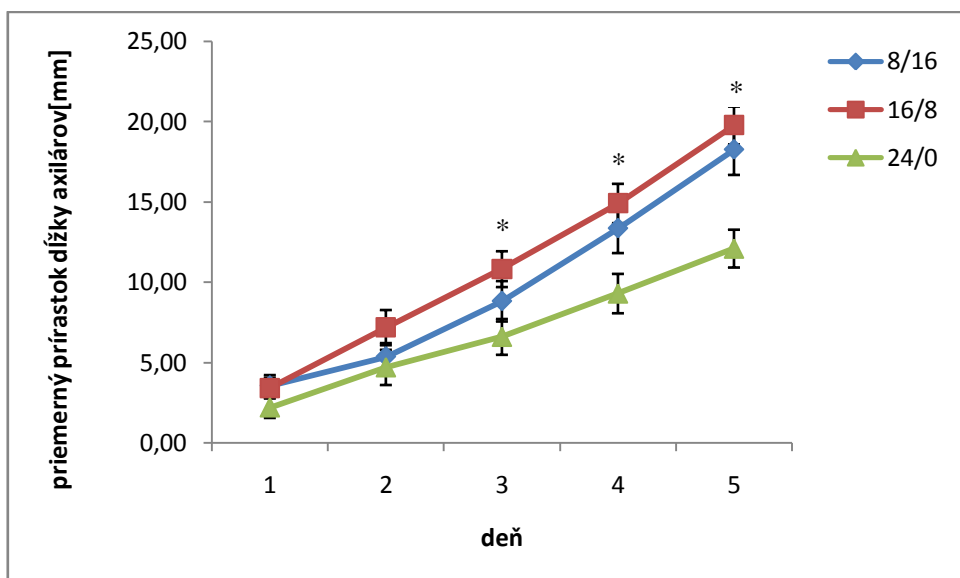
5.1.2.3 Pokusy pod červeným svetlom

Vplyv fotoperiody na rast axilárnych púčikov intaktných rastlín



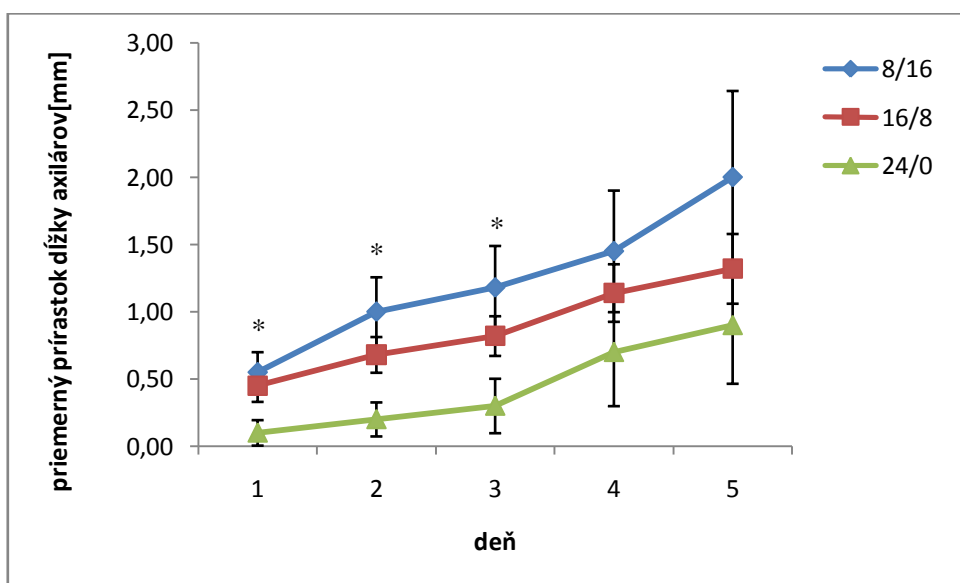
Obr. 24 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 24 ani v jednom z piatich dní nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. Od štvrtého dňa však mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.



Obr. 25 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

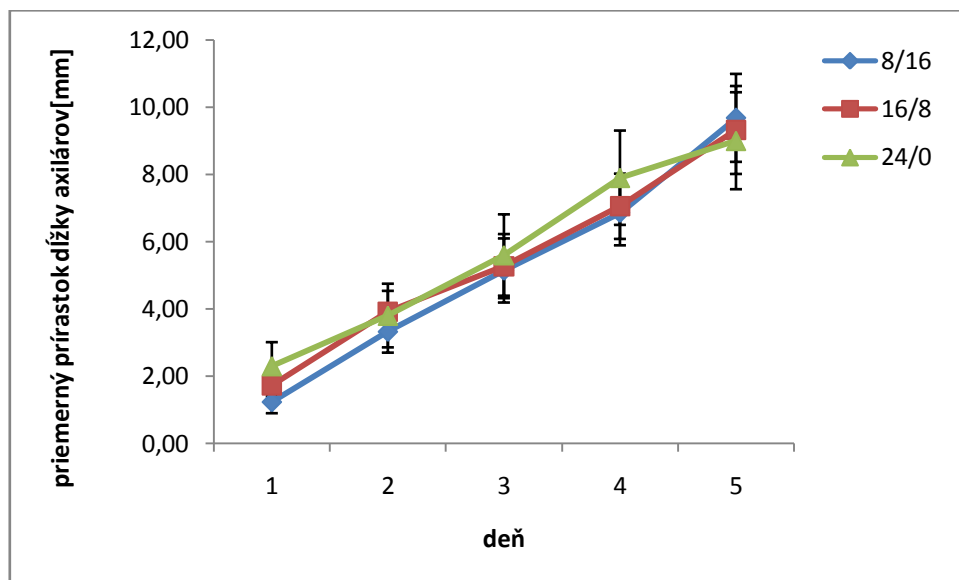
Ako vyplýva z Obr. 25 v prvých dvoch dňoch nie je vidieť žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetiev druhého nodu. Vo treťom a štvrtom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri šesťnásťhodinovej fotoperióde. V piatom dni je rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperióde.



Obr. 26 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 26 v prvých dvoch dňoch je rast vetiev tretieho nodu pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde štatisticky významne nižší ako pri osem a šesťnásťhodinovej fotoperióde. V treťom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. Vo štvrtom a piatom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste, ale mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.

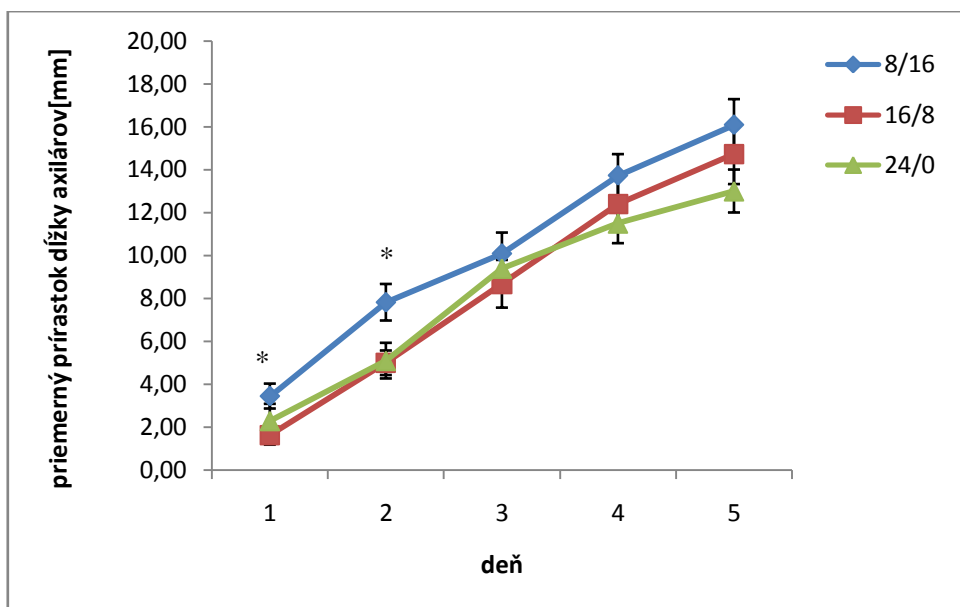
Vplyv fotoperiódy na rast axilárnych púčikov rastlín dekapitovaných nad 3. nodom



Obr. 27 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 27 ani v jednom z piatich dní nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev prvého nodu. V treťom a vo štvrtom dni mierne dominuje rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V piatom dni už mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.

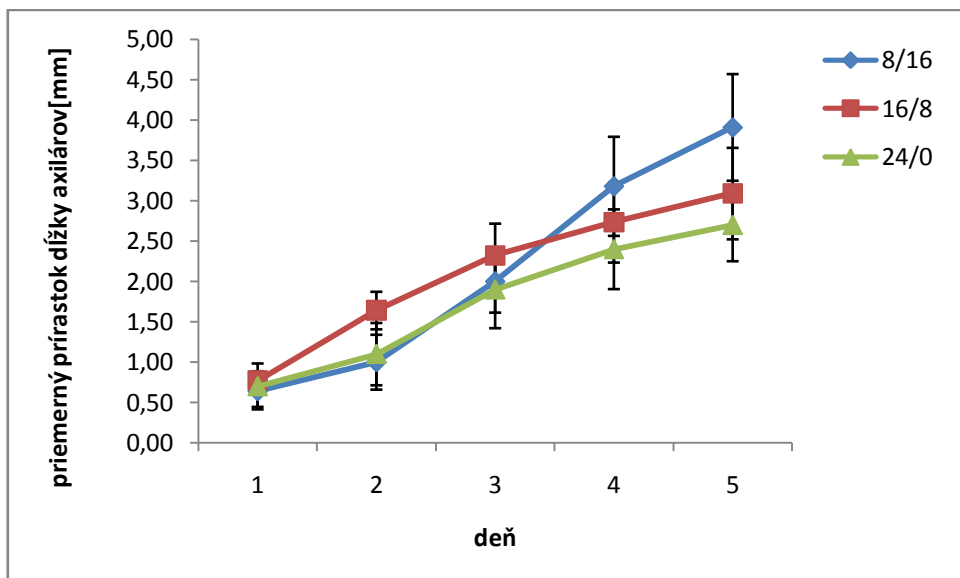
Pri intaktných rastlinách tiež nie sú významné rozdiely v raste medzi jednotlivými fotoperiódami. Žiaden výrazný rozdiel nebol ani v dynamike rastu.



Obr. 28 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 28 v prvom dni je rast vetiev druhého nodu pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri šestnásthodinovej fotoperióde. V druhom dni je rast pri osemhodinovej fotoperióde štatisticky významne vyšší ako pri šestnást' a dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde. V treťom, štvrtom a piatom dni nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste, ale mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.

Pri intaktných rastlinách bol rovnako rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde najnižší. U zvyšných dvoch fotoperiód je to naopak. Nie je žiaden výrazný rozdiel v raste pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde medzi intaktnými a dekapitovanými rastlinami. Pri osem a šestnást' hodinovej fotoperióde však výraznejšie rástli vetvy pri intaktných rastlinách.

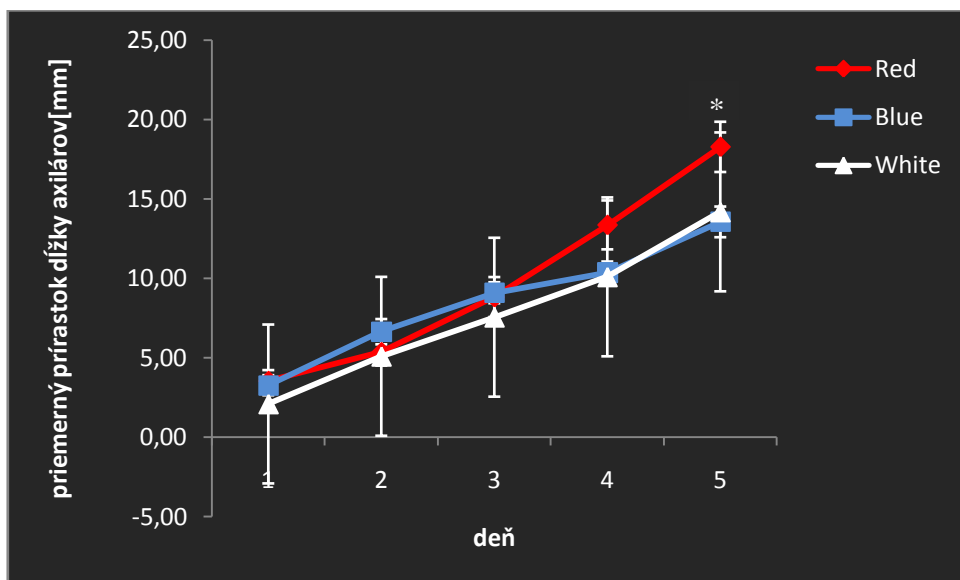


Obr. 29 Vplyv fotoperiódy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.

Ako vyplýva z Obr. 29 ani v jednom z piatich dní nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev tretieho nodu. V prvých troch dňoch mierne dominuje rast pri šestnásťhodinovej fotoperióde. Vo štvrtom a piatom dni už mierne dominuje rast pri osemhodinovej fotoperióde.

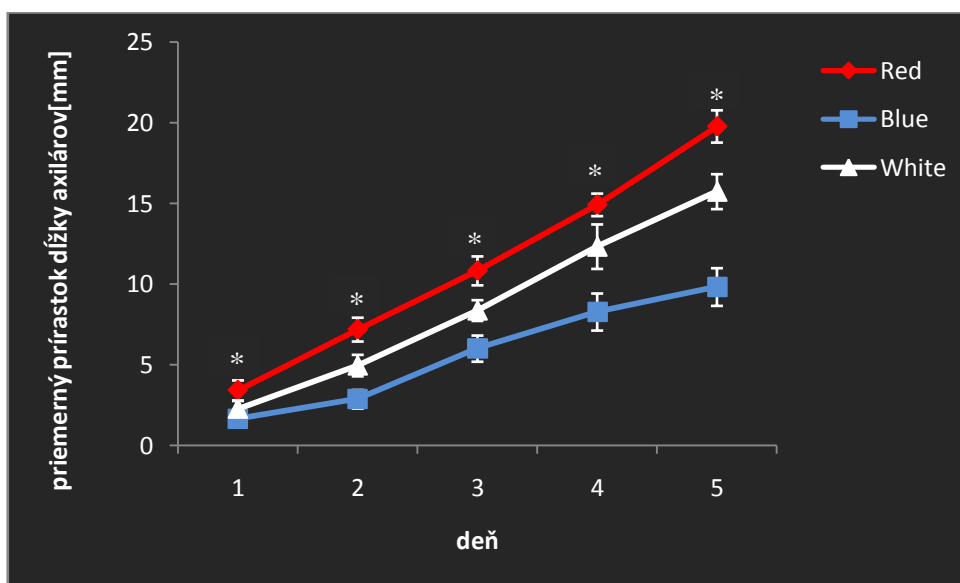
Pri intaktných rastlinách bol rovnako rast pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde najnižší a najvyšší bol pri osemhodinovej fotoperióde. Rast u dekapitovaných rastlín bo však výrazne vyšší.

5.1.2.4 Porovnanie rastu intaktných rastlín pri rôznej vlnovej dĺžke svetla



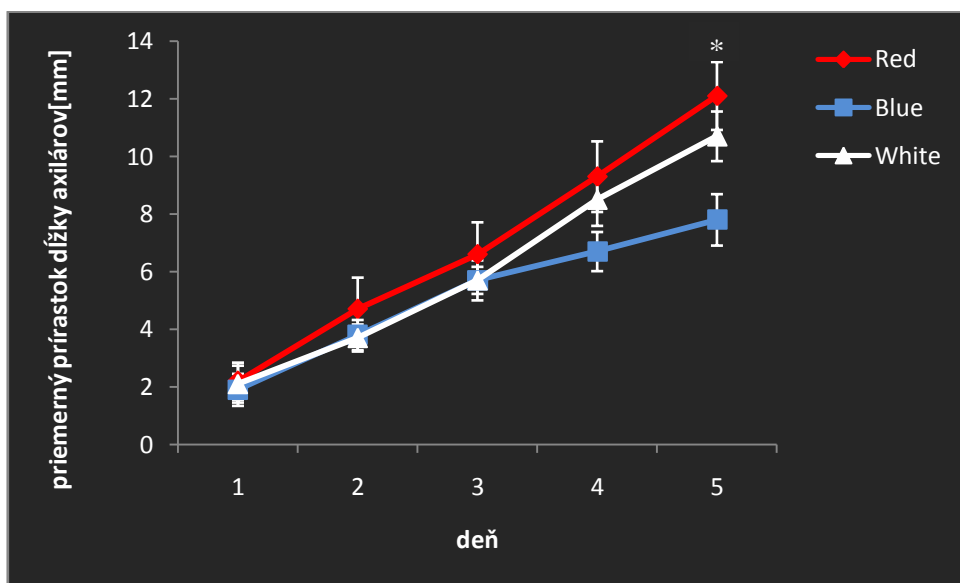
Obr. 30 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 8 hodinovej fotoperiódě.

Ako vyplýva z Obr. 30 v prvých štyroch dňoch nie je štatisticky významný rozdiel v raste vetiev druhého nodu. V piatom dni je rast pod červeným svetlom štatisticky významne vyšší ako pod modrým svetlom.



Obr. 31 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 16 hodinovej fotoperiódě.

Ako vyplýva z Obr. 31 v prvý deň je rast pod červeným svetlom štatisticky významne vyšší ako pod modrým svetlom. V druhom, treťom a piatom dni je rast pod červeným svetlom štatisticky významne vyšší ako rast pod modrým a bielym svetlom a rast pod bielym svetlom je štatisticky významne vyšší ako pod modrým svetlom. Vo štvrtom dni je rast pod modrým svetlom štatisticky významne nižší ako pod červeným a bielym svetlom.



Obr. 32 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 24 hodinovej fotoperióde.

Ako vyplýva z Obr. 32 v prvých štyroch dňoch nie je žiaden štatisticky významný rozdiel v raste vetiev druhého nodu. V piatom dni je rast pod modrým svetlom štatisticky významne nižší ako pod bielym a červeným svetlom.

5.1.3 Diskusia výsledkov rastových experimentov

Podľa niektorých zdrojov (Arumingtyas *et al.*, 1992, Leduc *et al.*, 2014) by rastliny hrachu (*Pisum sativum L.*) mali vetviť hlavne pri v podmienkach krátkeho dňa (8 hodín svetlo, 16 hodín tma). Toto sa čiastočne podali preukázať aj v týchto experimentoch, hlavne pri experimentoch pod LED diódovým osvetlením, keďže rastliny vetvili najviac pri osem poprípadne pri šestnásťhodinovej fotoperióde.

V prípade rastlín pestovaných pod bielim svetlom žiarivkového osvetlenia o nižšej intenzite bol trend odlišný. U väčšiny experimentálnych variantov bola zaznamenaná najvyššia rastová aktivita púčikov pri šestnásťhodinovej fotoperióde.

Pri raste kotylárov bol trend opačný. Krátka fotoperióda spôsobovala zvýšenie kompetície medzi kotylármi. Pri nepretržitej fotoperióde bol naopak rast oboch kotylárov bez významného rozdielu v raste.

Čo sa týka experimentov pod LED diódovým osvetlením, prakticky vo všetkých prípadoch bola zaznamenaná najnižšia intenzita rastu pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde, naopak najvyššia intenzita rastu bola u väčšiny variantov pri krátkej fotoperióde 8/16hod. Pestovanie pod bielim a modrým svetlom zvýraznilo rozdieli v raste axilárov jednotlivých nodov pri porovnaní rastlín pestovaných pod rôznymi fotoperiódami. Naopak u rastlín pestovaných pod červeným svetlom bola reakcia na fotoperiódou vo vzťahu k vteveniu menej výrazná. Dekapitácia rastlín pod bielim a modrým svetlom zvýraznila rozdiely medzi variantmi s rôznou fotoperiódou. V prípade rastlín pestovaných pod červeným svetlom všetky púčiky rástli po väčšinu pokusnej periódy s podobnou dynamikou a rozdiely v raste boli väčšinou nepreukázané.

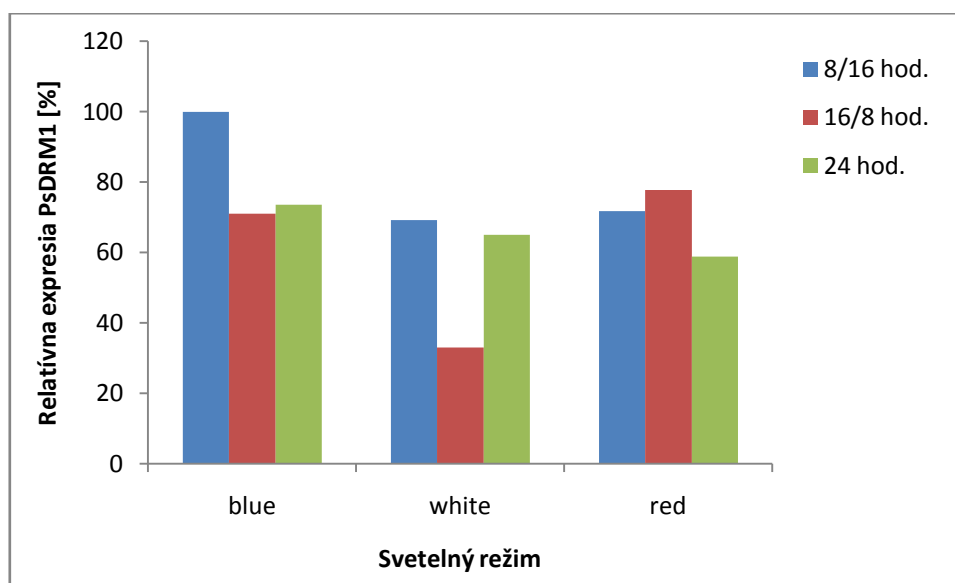
Čo sa týka spektrálneho zloženia svetla tak nízke hodnoty červeného svetla by mali spôsobovať inhibíciu vetvenia (Leduc *et al.*, 2014). To sa opäť preukázalo v experimentoch, keďže rastliny najviac vetvili pod červeným svetlom a najmenej pod modrým.

Málo sa vie o vplyve modrého svetla na vetvenie rastlín. U niektorých druhov vetvenie inhibuje u iných naopak podporuje (Leduc *et al.*, 2014). U rastlín *Arabidopsis* a *Rosa* modré svetlo spôsobuje rast púčikov (Girault, 2008). Keďže v týchto experimentoch rastliny pod modrým svetlom vetvili najmenej môže to naznačovať, že u hrachu modré svetlo rast postranných vetví inhibuje alebo spomaľuje.

5.2 Vyhodnotenie RT-PCR

Skúmala sa expresia troch génov: *PsDRM1*, *PsBRC1* a *PsPIN1* v axilároch intaktných rastlín pestovaných pri rôznych fotoperiódach pod LED diódovým osvetlením. K experimentu boli vybrané axiláry 2. nodu ktorej v predchádzajúcich experimentoch vykazovali najvyššiu rastovú aktivitu. Gén *PsDRM1* sa využíva ako marker dominantného/inhibovaného stavu púčikov a jeho expresia negatívne koreluje s rastovou aktivi-

tou púčikov. (Stafstrom *et al.*, 1998) Gén *PsBRC1* je represorom rastu púčikov a jeho expresia je regulovaná svetelnými podmienkami (González-Grandío *et al.*, 2013). Expresia génu *PsPIN1* súvisí s exportom auxínu s púčikov a tým pádom aj s ich rastovou aktivitou (Ferguson, Beveridge, 2009), (Lazar, Goodman, 2006). Výsledky boli prepočítané na expresiu konštitutívne exprimovaného génu *PsAct14*.

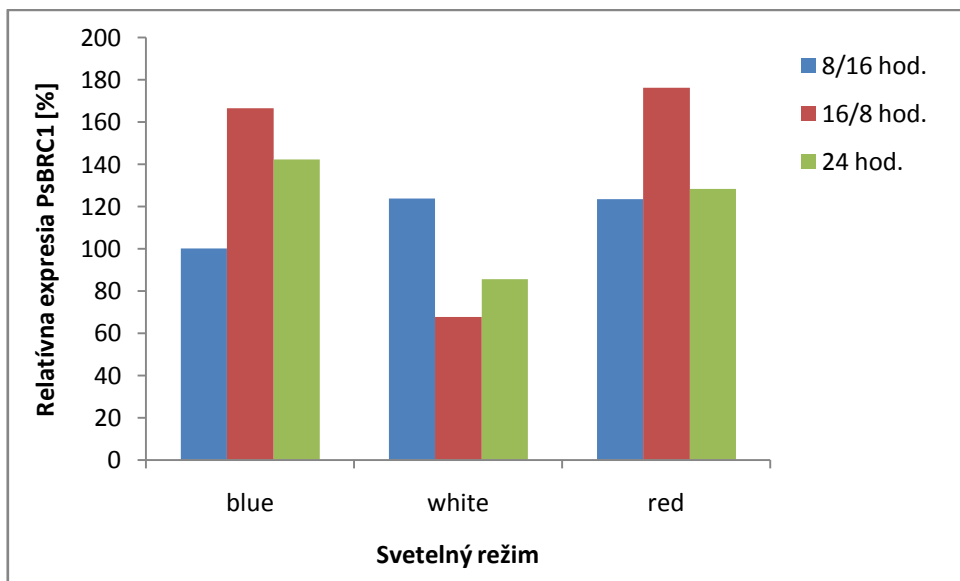


Obr. 33 Relatívna expresia génu *PsDRM1* pri rôznych fotoperiódach pod modrým, bielim a červeným svetlom.

Ako vyplýva s Obr. 33 gén *PsDRM1* bol pod modrým svetlom najviac exprimovaný pri osemhodinovej fotoperiódě a najmenej pri šestnásťhodinovej fotoperiódě. Medzi expresiou pri šestnásť a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě však nebol veľký rozdiel.

Pod bielim svetlom bol opäť najviac exprimovaný pri osemhodinovej fotoperiódě a najmenej pri šestnásťhodinovej. Bol tu však značný rozdiel medzi expresiou pri šestnásťhodinovej fotoperiódě a zvyšnými dvoma fotoperiódami.

Pod červeným svetlom bola expresia najvyššia pri šestnásťhodinovej fotoperiódě a najnižšia pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě.

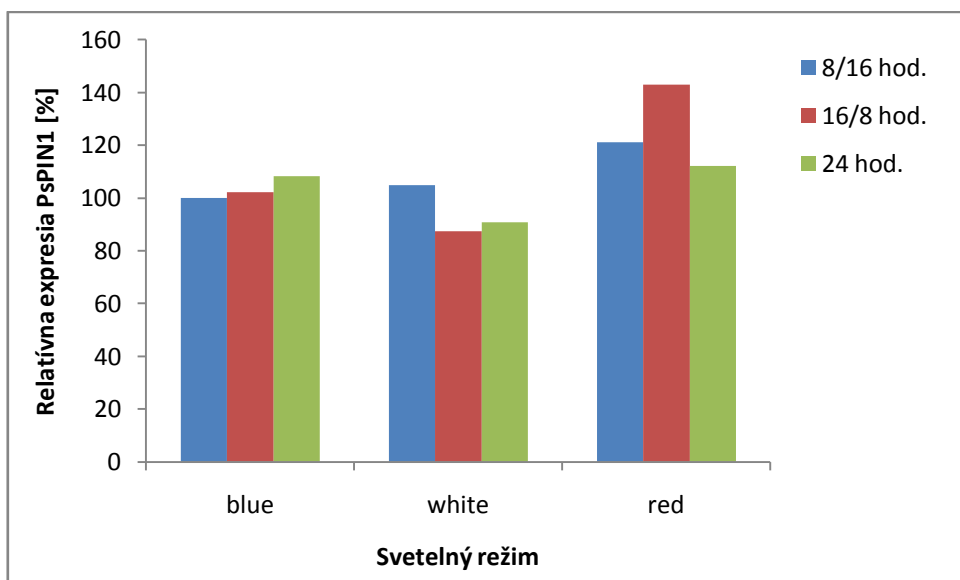


Obr. 34 Relatívna expresia génu *PsBRC1* pri rôznych fotoperiódach pod modrým, bielim a červeným svetlom.

Ako vyplýva z Obr. 34 gén *PsBRC1* bol pod modrým svetlom exprimovaný najviac pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě a najmenej exprimovaný pri osemhodinovej fotoperiódě.

Pod bielim svetlom bola expresia najvyššia naopak pri osemhodinovej fotoperiódě a najnižšia pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě.

Pod červeným svetlom bola expresia opäť najvyššia pri šesťnásťhodinovej fotoperiódě a najnižšia pri osemhodinovej. Medzi expresiou pri osem a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě však bol iba minimálny rozdiel.



Obr. 35 Relatívna expresia génu *PsPIN1* pri rôznych fotoperiódach pod modrým, bielim a červeným svetlom.

Ako vyplýva z Obr. 35 pod modrým svetlom nie sú žiadne výrazné rozdiely v expresii génu *PsPIN1*. Najvyššia expresia je však pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě a najnižšia pri osemhodinovej fotoperiódě.

Pod bielim svetlom bola expresia najnižšia pri šestnásťhodinovej fotoperiódě a najvyššia pri osemhodinovej fotoperiódě. Medzi expresiou pri šestnásť a dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě však bol iba minimálny rozdiel.

Pod červeným svetlom bola expresia najvyššia pri šestnásťhodinovej fotoperiódě a najnižšia pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódě.

5.2.1 Diskusia výsledkov RT-PCR

Obecne je z výsledkov zrejmé, že expresia génu *PsPIN1* je oproti ostatným svetelným režimom, mierne zvýšená pri kultivácii pod červeným svetlom, hlavne pri šestnásťhodinovej fotoperiódě, čo odpovedá aj predchádzajúcim výsledkom merania dynamiky rastu axilárov. Rastliny kultivované pod červeným svetlom vykazovali najvyššiu aktivitu vetvenia z druhého nodu v porovnaní s ostatnými svetelnými režimami.

Z výsledkov stanovenia expresie *PsDRM1* je zrejmé, že bola pomerne vyrovnaná u väčšiny variantov. Výraznejšie znížená expresia bola pozorovaná len pod bielim svetlom pri šestnásťhodinovej fotoperiódě. V týchto kultivačných podmienkach bol

v rastových krivkách zvýšený nárast axilárov, u iných variantov však úroveň expresie neodpovedala výsledkom zistením pri meraní axilárov.

Expresia *PsBRC1* v axilároch korelovala so zvýšenou rastovou aktivitou púčikov len v prípade rastlín pestovaných pod modrým svetlom pri osemhodinovej fotoperióde a v prípade rastlín pestovaných pod bielim svetlom pri šestnásťhodinovej fotoperióde. V týchto prípadoch bola expresia znížená, čo odpovedá zvýšenému rastu týchto púčikov v daných svetelných podmienkach. U ostatných variantov expresia tohto génu neodpovedá tomu, čo bolo pozorované pri rastových krivkách.

Pre zhodnotenie génovej expresie boli vybrané rastliny, ktoré boli kultivované v danom svetelnom režime po dobu troch dní. Cieľom bolo zistenie rýchlych reakcií na dané svetelné podmienky. Rastliny u ktorých bol sledovaný rast axilárov rástli v daných svetelných podmienkach 7 dní pred zahájením experimentu a ďalších 5 dní v priebehu experimentu. Je teda možné, že k zmenám expresie génov dochádza až po dlhšom pôsobení daného svetelného režimu. Okrem toho boli experimenty vykonané len v jednom biologickom a jednom technickom opakovaní. K definitívnym záverom by bolo nutné vykonať väčší počet biologických opakovaní tohto experimentu.

6 ZÁVER

V rámci literárnej rešerše boli zhrnuté poznatky o fotoperióde a jej vplyve na vetvenie rastlín hrachu. Boli zhrnuté poznatky o receptoroch ktoré prijímajú svetelný signál a následne tak podmieňujú chovanie rastliny v daných svetelných podmienkach. Ďalej bol zhrnutý vplyv fytohormónov (auxínov, cytokinínov a strigolaktónov) na vetvenie a tiež vplyv fotoperiód na produkciu a distribúciu týchto hormónov. Následne boli zhrnuté poznatky o génoch ktoré hrajú významnú rolu v regulácii vetvenia a to konkrétne gény *PsBRC1* a *PsDRM1*.

Praktická časť bakalárskej práce bola zameraná na porovnanie vplyvu troch svetelných režimov (8 hodín svetlo, 16hodín tma; 16 hodín svetlo, 8 hodín tma a 24 hodín svetlo) na vetvenie rastlín hrachu. Ďalej bol skúmaný vplyv spektrálneho zloženia svetla na vetvenie rastlín hrachu. Testovalo sa vetvenie z prvého, druhého a tretieho nodu.

Pri pokusoch so žiarivkovým osvetlením sa testovali tri varianty (intaktné rastliny, rastliny dekapitované nad 3. nodom. a rastliny dekapitované nad kľúčnymi listami. Intaktné aj dekapitované rastliny vetvili najintenzívnejšie pri šesťnásťhodinovej fotoperióde. Čo sa týka rastlín dekapitovaných nad kľúčnymi listami, tak dominantné kotyláry rástli najintenzívnejšie pri osemhodinovej fotoperióde . Pri osem a šesťnásť hodinovej fotoperióde bol výrazný rast dominantných kotylárov , zatiaľ čo rast druhých púčikov bol potlačený. Pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperióde rástli oba kotyláry viac menej zhodne.

Pri pokusoch s LED diódovým osvetlením sa skúmali dve varianty (intaktné rastliny a rastliny dekapitované nad 3. nodom) ktoré rástli pod bielim, modrým alebo červeným svetlom. Intaktné aj dekapitované rastliny rastúce pod modrým svetlom najintenzívnejšie vetvili z druhého a tretieho nodu pri osemhodinovej fotoperióde a z prvého nodu pri šesťnásťhodinovej fotoperióde. Intaktné aj dekapitované rastliny rastúce pod bielim svetlom najintenzívnejšie vetvili z prvého nodu pri osemhodinovej fotoperióde a z druhého a tretieho nodu pri šesťnásťhodinovej fotoperióde. Intaktné aj dekapitované rastliny rastúce pod červeným svetlom najintenzívnejšie vetvili pri osemhodinovej fotoperióde. Čo sa týka vplyvu spektrálneho zloženia svetla tak rastliny vetvili najintenzívnejšie pod červeným svetlom a najmenej intenzívne pod modrým svetlom.

V ďalšom kroku bola preskúmaná expresia génov *PsBRC1*, *PsDRM1* a *PsPIN1* pod modrým, bielim a červeným svetlom. Expresia týchto génov nie úplne korelovala

s výsledkami rastových experimentov. Bolo to pravdepodobne spôsobené rozdielne dlhým pôsobením daných svetelných podmienok na rastliny pri oboch experimentoch. Na potvrdenie týchto záverov by však bolo nutné vykonať viac biologických opakovaní pri skúmaní génovej expzie.

7 ZOZNAM POUŽITEJ LITERATÚRY

ARUMINGTYAS, E. L., FLOYD, R. S., GREGORY, M. J., MURFET, I.C. (1992). Branching in *Pisum*: inheritance and allelism tests with 17 ramosus mutants. *Pisum Genetics*, 24, 17-31.

BENNETT, T., SIEBERER, T., WILLETT, B., BOOKER, J., LUSCHNIG, C., LEYSER, O. (2006). The Arabidopsis MAX Pathway Controls Shoot Branching by Regulating Auxin Transport. *Current Biology*, 16(6), 553-563. ISSN 09609822.

BRAUN, N., DE SAINT GERMAIN, A., PILLOT, J. P., BOUTET-MERCEY, S., DALMAIS, M., ANTONIADI, I., LI, X., MAIA-GRONDARD, A., LE SIGNOR, C., BOUTEILLER, N., LUO, D., BENDAHDANE, A., TURNBULL, C., RAMEAU, C. (2012). The Pea TCP Transcription Factor PsBRC1 Acts Downstream of Strigolactones to Control Shoot Branching. *PLANT PHYSIOLOGY*, 158(1), 225-238. ISSN 00320889.

BREWER, P. B., DUN, E. A., FERGUSON, B. J., RAMEAU, C., BEVERIDGE, C. A. (2009). Strigolactone Acts Downstream of Auxin to Regulate Bud Outgrowth in Pea and Arabidopsis. *PLANT PHYSIOLOGY*, 150(1), 482-493. ISSN 00320889.

DIE, J.V., ROMÁN, B., NADAL, S., GONZÁLEZ-VERDEJO, C. I. (2010). Evaluation of candidate reference genes for expression studies in *Pisum sativum* under different experimental conditions. *Planta*, 232(1), 145-153. ISSN 00320935.

FERGUSON, B. J., BEVERIDGE, C. A. (2009). Roles for Auxin, Cytokinin, and Strigolactone in Regulating Shoot Branching. *PLANT PHYSIOLOGY*, 149(4), 1929-1944. ISSN 00320889.

GIRAULT, T., BERGOUGNOUX, V., COMBES, D., VIEMONT, J. D., LEDUC, N., (2008). Light controls shoot meristem organogenic activity and leaf primordia growth during bud burst in *Rosa* sp. *Plant, Cell & Environment*, 31(11), 1534-1544. ISSN 01407791.

GONZALEZ-GRANDIO, E., C. POZA-CARRION, C., SORZANO, C. O. S., P. CUBAS, P. (2013). BRANCHED1 Promotes Axillary Bud Dormancy in Response to Shade in Arabidopsis. *The Plant Cell*, 25(3), 834-850. ISSN 10404651.

JACKSON, S. D. (2009). Plant responses to photoperiod. *New Phytologist*, 181(3), 517-531. ISSN 0028646x.

JANSSEN, B. J., Revel SM DRUMMOND, R. SM., SNOWDEN, K. C. (2014). Regulation of axillary shoot development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 28-35. ISSN 13695266.

LAZAR, G., GOODMAN, H. M., (2006). MAX1, a regulator of the flavonoid pathway, controls vegetative axillary bud outgrowth in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(2), 472–476. ISSN 00278424.

LEDUC, N., ROMAN, H., BARBIER, F., PÉRON, T., THÉLIER, L. H., LOTHIER, J., MAINARD, S. D., SAKR, S. (2014). Light Signaling in Bud Outgrowth and Branching in Plants. *Plants*, 3, 223-250. ISSN 2223-7747

LEYSER, O. (2009). The control of shoot branching: an example of plant information processing. *Plant, Cell & Environment*, 32(6), 694-703. ISSN 01407791.

ONGARO, V., LEYSER, O. (2008). Hormonal control of shoot branching. *Journal of experimental botany*, 59(1), 67-74. ISSN 00220957.

PAVLOVÁ, L., FISCHER, L. (2011). *Růst a vývoj rostlin*. 1. vyd. Praha: Karolinum, 325 s. ISBN 9788024619132.

RICHTER, O. (1926). Beiträge zur Ernährungsphysiologie der Kulturgräser. I. Über das grosse Eisenbedürfnis der Reispflanze (*Oryza sativa*L.). *Sitzungsberichte der Berliner Akademie der Wissenschaften*, 203–242.

SCHMITZ, G., THERES, K. (2005). Shoot and inflorescence branching. *Current Opinion in Plant Biology*, 8(5), 506-511. ISSN 13695266.

STAFSTROM, J. P., RIPLEY, B. D., DEVITT, M. L., DRAKE, B. (1998). Dormancy-associated gene expression in pea axillary buds. *Planta*, 205(4), 547-552. ISSN 00320935.

UMEHARA, M., HANADA, A., YOSHIDA, S., KOHKI, A., TOMOTSUGU, A., NORIKO, T. K., HIROSHI, M., YUJI, K., KEN, S., KOICHI, Y., JUNKO, K., SHINJIRO, Y. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature*, 455(7210), 195-200. ISSN 00280836.

WALDIE, T., MCCULLOCH, H., LEYSER, O. (2014). Strigolactones and the control of plant development: lessons from shoot branching. *The Plant Journal*, 79(4), 607-622. ISSN 09607412.

YOUNG, N. F., FERGUSON, B.J., ANTONIADI, I., BENNETT, M. H., BEVERIDGE, C. A., TURNBULL, C. G. N. (2014). Conditional Auxin Response and Differential Cytokinin Profiles in Shoot Branching Mutants. *PLANT PHYSIOLOGY*, 165(4), 1723-1736. ISSN 00320889.

8 ZOZNAM OBRÁZKOV

<i>Obr. 1</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	31
<i>Obr. 2</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	32
<i>Obr. 3</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	32
<i>Obr. 4</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	33
<i>Obr. 5</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	34
<i>Obr. 6</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli so žiarivkovým osvetlením.	35
<i>Obr. 7</i> Rast kotylárnych púčikov pri osemhodinovej fotoperiódoy.	36
<i>Obr. 8</i> Rast kotylárnych púčikov pri šestnást' hodinovej fotoperiódoy.	36
<i>Obr. 9</i> Rast kotylárnych púčikov pri dvadsaťštyrihodinovej fotoperiódoy.	36
<i>Obr. 10</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky dominujúcich kotylárnych37	37
<i>Obr. 11</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky inhibovaných kotylárnych38	38
<i>Obr. 12</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	39
<i>Obr. 13</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	40
<i>Obr. 14</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	40
<i>Obr. 15</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	41
<i>Obr. 16</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	42
<i>Obr. 17</i> Vplyv fotoperiódoy na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým modrým osvetlením.	43

Obr. 18 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.....	44
Obr. 19 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.....	45
Obr. 20 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.....	45
Obr. 21 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.	46
Obr. 22 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.	47
Obr. 23 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým bielim osvetlením.	48
Obr. 24 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	49
Obr. 25 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	50
Obr. 26 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u intaktných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	50
Obr. 27 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 1. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	51
Obr. 28 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	52
Obr. 29 Vplyv fotoperiody na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 3. nodu u dekapitovaných rastlín pestovaných v Klimacelli s LED diódovým červeným osvetlením.	53
Obr. 30 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 8 hodinovej fotoperiode.	54

Obr. 31 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 16 hodinovej fotoperióde.	54
Obr. 32 Vplyv spektrálneho zloženia svetla na priemerný prírastok dĺžky axilárnych púčikov 2. nodu pri 24 hodinovej fotoperióde.	55
Obr. 33 Relatívna expresia génu <i>PsDRM1</i> pri rôznych fotoperiódách pod modrým, bielim a červeným svetlom.	57
Obr. 34 Relatívna expresia génu <i>PsBRC1</i> pri rôznych fotoperiódách pod modrým, bielim a červeným svetlom.	58
Obr. 35 Relatívna expresia génu <i>PsPIN1</i> pri rôznych fotoperiódách pod modrým, bielim a červeným svetlom.	59

9 ZOZNAM TABULIEK

Tab. 1 Zloženie pufri 10x FA gel buffer	26
Tab. 2 Zloženie nanášacieho pufri 5x RNA loading buffer	26
Tab. 3 Zloženie reakčnej zmesi pre prvú fázu RT-PCR	27
Tab. 4 Zloženie reakčnej zmesi pre druhú fázu RT-PCR	28
Tab. 5 Zloženie reakčnej zmesi pre vlastnú PCR reakciu	28
Tab. 6 Reakčné podmienky PCR.....	29
Tab. 7 Zloženie 1,2 % agarózového gélu pre elektroforetické rozdelenie PCR produktov	30
Tab. 8 Zloženie trisacetátového pufri.....	30