

**MENDELOVA UNIVERZITA V BRNĚ
AGRONOMICKÁ FAKULTA**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

BRNO 2017

Bc. MARTINA PSOTOVÁ

Mendelova univerzita v Brně
Agronomická fakulta
CEITEC MENDELU



**Expresní profily vybraných genů při vyrůstání kotylárních
pupenů hrachu**
Diplomová práce

Vedoucí práce:
Ing. Jozef Balla, Ph.D.

Vypracovala:
Bc. Martina Psotová

Brno 2017



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

Autorka práce: Bc. Martina Pačtová
Studijní program: Fyziotechnika
Obor: Biotechnologie rostlin
Vedoucí práce: Ing. Josef Balla, Ph.D.

Název práce: **Expresní profily vybraných genů při vyrůstání kotylárních pupenů hrachu**

Jazyková varianta: Čeština

Zásady pro vypracování:

1. Seznámení s problematikou apikální dominance a polárního transportu auxinu a dále s problematikou studie genové exprese u rostlin.
2. Vynacování širšího přehledu na téma regulace apikální dominance a systém polárního transportu auxinu u rostlin.
3. Praktické provedení experimentů na klíčících rostlinách hrachu a studium změny expresí vybraných genů v kotylárních pupenech.
4. Vyhodnocení výsledků, sepsání a odevzdání diplomové práce.

Rozsah práce: 60 stran

Literatura:

1. LEYSER, O. – DAY, S. Mechanisms of plant development. Oxford: Blackwell, 2003. 241 s. ISSN 0-88542-742-0.
2. ŠEBÁNEK, J. – SLADKÝ, Z. – PROCHÁZKA, S. Experimentální morfologie rostlin. 1. vyd. Praha: Academia, 1983. 320 s.
3. BALLA, J. – KALOUŠEK, P. – REINÖHL, V. – FRIML, J. – PROCHÁZKA, S. Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from seedley buds controls pea bud outgrowth. *Plant Journal*. 2010. sv. 65, č. 4, s. 571–577. ISSN 0960-7412. URL: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-3113.2010.04443.x/full>
4. KALOUŠEK, P. – BUCHTOVÁ, D. – BALLA, J. – REINÖHL, V. – PROCHÁZKA, S. Cytokines and polar transport of auxin in seedling pea buds. *Acta Universitatis agriculturae et silviculturae Mendelianae Brunensis = Acta of Mendel University of agriculture and forestry Brno = Acta Mendelovy zemědělské a lesnické univerzity v Brně*. 2010. sv. 58, č. 4, s. 79–88. ISSN 1211-8518.
5. SAUER, M. – BALLA, J. – LUSCHNIG, C. – WISNIEWSKA, J. – REINÖHL, V. – FRIML, J. – BENKOVÁ, E. Canalization of auxin flow by Aux/IAA-ARF-dependent feed-back regulation of PIN polarity. *Genes and Development*. 2008. sv. 22, č. 20, s. 2902–2910. ISSN 0890-9399.

Datum zadání: říjen 2015

Datum odevzdání: duben 2017

Bc. Martina Pačtová
Autorka práce

Ing. Josef Balla, Ph.D.
Vedoucí práce

Mgr. Vilém Reinöhl, CSc.
Vedoucí ústavu

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

ČESTNÉ PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že jsem práci: *Expresní profily vybraných genů při vyrůstání kotylárních pupenů hrachu* vypracovala samostatně a veškeré použité prameny a informace uvádím v seznamu použité literatury. Souhlasím, aby moje práce byla zveřejněna v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách ve znění pozdějších předpisů, a v souladu s platnou Směrnicí o zveřejňování vysokoškolských závěrečných prací.

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

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

V Brně dne:.....

.....

Bc. Martina Psotová

PODĚKOVÁNÍ

Zde bych ráda poděkovala svému vedoucímu práce panu Ing. Jozefu Ballovi, Ph.D. za odborné vedení a cenné rady při tvoření diplomové práce. Dále bych ráda poděkovala Ing. Michaele Opletalové za pomoc a čas strávený v laboratoři. Za cenné rady, nové zkušenosti a přátelský přístup.

Dále děkuji své rodině za podporu a trpělivost při studiu na Mendelově univerzitě v Brně.

ABSTRAKT

Psotová, M. *Expresní profily vybraných genů při vyrůstání kotylárních pupenů hrachu*. Diplomová práce. Brno 2017.

Cílem této diplomové práce bylo studium expresních profilů vybraných genů při iniciaci vyrůstání kotylárních pupenů hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Byly použity dekapitované rostliny s aplikací 0,5 % IAA pasty na stonkový pahýl. Z takto ošetřených rostlin byly odebrány kotylární pupeny s časovým rozestupem 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 120 hodin. Biologický materiál byl podroben analýze exprese genů *PsDRM1*, *PsBRC1*, *PsAUX1*, *PsPIN1* a *PsYUC1*. Výsledná exprese byla normována na expresi genů *PsEF1- α* , *PsActin* a *Ps β -tubulin*. Aplikace auxinu namísto dekapitovaného vrcholu zabrzдила vyrůstání kotylárních pupenů. Tato inhibice růstu kotylárních pupenů byla doprovázena zvýšenou expresí genů spojovaných s dormancí, *PsDRM1*, *PsBRC1* a genu pro biosyntézu auxinu *PsYUC1* a sníženou expresí genů auxinových přenašečů *PsPIN1* a *PsAUX1*.

Klíčová slova: auxin, apikální dominance, polární transport, *PsAUX1*, *PsBRC1*, *PsDRM1*, *PsPIN*, *PsYUC1*.

ABSTRACT

Psotová, M. *Expression profiles of selected genes during outgrowth of pea cotyledonary buds*. Thesis. Brno 2017.

The diploma thesis was aimed to monitor the expression profiles of selected genes in the growing of cotyledonary buds in pea (*Pisum sativum* L.). The apical stem was decapitated and 0.5% auxin paste was applied to the stump. From the treated plants cotyledonary buds were collected in intervals 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 and 120 hours. The biological material was analyzed for expression of genes *PsDRM1*, *PsBRC1*, *PsAUX1*, *PsPIN1*, *PsYUC1*. A gene expression normalization factor was calculated based on constitutive genes *PsEF1- α* , *PsActin* and *Ps β -tubulin*. Application of auxin to the stem stump prevented the growth of cotyledonary buds. This inhibition of cotyledonary buds was accompanied by increased expression of dormancy markers *PsDRM1*, *PsBRC1* and auxin biosynthesis gene *PsYUC1* and decreased expression of the auxin transporter genes *PsPIN1* and *PsAUX1*.

Key words: auxin, apical dominance, polar auxin transport *PsAUX1*, *PsBRC1*, *PsDRM1*, *PsPIN*, *PsYUC1*

OBSAH

1	Úvod.....	10
2	Cíl práce.....	11
3	Literární přehled	12
3.1	Apikální dominance	12
3.1.1	Historie teorií apikální dominance.....	13
3.2	Auxin.....	15
3.2.1	Historie auxinu.....	15
3.2.2	Účinky auxinu.....	16
3.2.3	Přirozené auxiny	18
3.2.4	Syntetické auxiny.....	18
3.2.1	Biosyntéza auxinu.....	19
3.2.2	Signalizace auxinu	20
3.2.3	Transport auxinu	23
4	Materiál a metodika	29
4.1	Rostlinný materiál	29
4.2	Založení a průběh experimentu.....	30
4.2.1	Izolace RNA	31
4.2.2	Měření koncentrace RNA	31
4.2.3	Reverzní transkripce	33
4.2.4	Kvantitativní PCR.....	36
5	Výsledky	38
6	Diskuze	47
7	Závěr	50
8	Přehled použité literatury.....	52
9	Seznam obrázků,.....	59

10	Seznam tabulek	61
11	Seznam grafů	62
12	Seznam zkratk	63
13	Seznam příloh	65

1 ÚVOD

Auxin patří k nejdéle známým rostlinným hormonům. Je produkován mladými listy a orgány rostliny. Během životního cyklu rostliny se hladina auxinu mění. Mezi hlavní funkce auxinu řadíme především jeho vliv na apikální dominanci

Apikální dominance je jedna z nejsledovanějších korelací rostlinného růstu. Jde o mechanismus, kde stonkový apex inhibuje růst a vývoj axilárních pupenů. Jakmile je vrchol odstraněn, dochází k uvolnění postranních pupenů ze spánku. Díky apikální dominanci lze regulovat větvení stonku u mnoha kulturních rostlin. Klíčovou roli v apikální dominanci je připisována auxinu. Auxiny ovšem nejsou zdaleka jediným rostlinným hormonem, který ovlivňuje mechanismus apikální dominance. Například cytokininy hrají důležitou roli ve stimulaci postranních pupenů. Auxin je transportován bazipetálně prostřednictvím proteinových přenašečů. Lokalizace auxinového transportu je v buňkách xylémového parenchymu. Mezi vstupní přenašeče řadíme AUX1/LAX proteiny. U výstupních přenašečů jsou to proteiny PIN rodiny. Tento hlavní proud auxinu znemožňuje export auxinu z postranních meristémů. Je tak tedy udržena v růstové inhibici.

V této diplomové práci byla sledována exprese genů *PsPIN1*, *PsAUX1*, které jsou důležité pro syntézu přenašečových proteinů auxinu. Dále exprese genů *PsDRM1*, *PsBRC1*, které slouží jako markery dormance. V neposlední řadě byla sledována exprese genu *PsYUC*, který je klíčovým genem kódující enzym, který je nepostradatelný u biosyntetické dráhy auxinu.

2 CÍL PRÁCE

- Seznámení s problematikou apikální dominance, polárního transportu auxinu a s problematikou studia genové exprese u rostlin.
- Vypracování literárního přehledu na téma regulace apikální dominance a systém polárního transportu auxinu u rostlin.
- Praktické provádění experimentu na klíčcích rostlinách hrachu a studium změny expresí vybraných genů v kotylárních pupenech.
- Vyhodnocení a diskuse vlastních výsledků.

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Apikální dominance

U apikální dominance jde o jev, při kterém stonkový apex inhibuje růst a vývoj axilárních pupenů (Cline, 1991). Jakmile je vrchol odstraněn, postranní pupeny jsou uvolněny z této inhibice (Balla *et al.*, 2011; Snow, 1930). Apikální dominance je studována pro pěstitelské a šlechtitelské potřeby. Díky jejímu ovlivnění je možné regulovat větvení stonku u mnoha kulturních rostlin (ovocné stromy, vinice, jahodníky atd. Ne všechny druhy rostlin mají všechny stupně apikální dominance. Některé, jako např. hrách setý (*Pisum sativum* L.), mají silně vyvinutou apikální dominanci a některé, jako např. bytel metlatý (*Kochia scoparia* L.), nemají apikální dominanci vyvinutou vůbec. Mechanismus apikální dominance můžeme popsat ve čtyřech vývojových stádiích.



Obr. 1: Vývojová stádia apikální dominance. Upraveno podle Cline 1997.

- I. Formování laterálního pupenu.
- II. Iniciacie růstu laterálního pupenu.
- III. Po provedení dekapitace, elongace laterálního výhonu.
- IV. Vývoj postranního stonku.

Zmíněná stádia se mezi sebou prolínají. Každé stádium zahrnuje různé procesy a každý proces je ovlivněn jiným rostlinným hormonem (Cline, 1997). Ovšem pozor, ne každé rostliny mají všechny stupně apikální dominance.

Klíčová role při regulaci apikální dominance je připisována fytohormonům (Blažková *et al.*, 1999). Ve stonkovém vrcholu a mladých listech probíhá biosyntéza auxinu. Ten je transportován bazipetálně do kořenů. Na význam auxinu poukázali v roce 1934 ve svém experimentu Thimann a Skoog, kde nepřímo prokázali inhibiční účinek auxinu na růst axilárních pupenů (Thimann a Skoog, 1933)

Auxiny nejsou jedinými rostlinnými hormony, které ovlivňují mechanismus apikální dominance. Například cytokininy, hrají důležitou roli ve stimulaci postranních pupenů nebo při stimulaci transportu auxinu z postranních pupenů (Müller *et al.*, 2015). Je dokázáno, že po 1,5 – 6 hodinách od nanesení cytokininů dochází ke stimulaci růstu laterálních pupenů.

3.1.1 Historie teorií apikální dominance

3.1.1.1 Nutritivní teorie apikální dominance

Na přelomu 19. a 20. století se předpokládalo, že určujícím faktorem v lodyžní apikální dominanci je soutěžení o výživu mezi meristémy pupenů vrcholových a postranních. Bylo předpokládáno, že živiny přednostně proudí k vrcholovým pupenům a z tohoto důvodu jsou ochuzeny postranní pupeny, a proto nejsou schopny růstu. Mezi zastánci této teorie patřil Goebel. Ten se podle svých experimentů domníval, že pokud odřízne některé listy, tok živin se bude soustředit na zbývající listy a jejich velikost se mnohokrát zvýší. Tuto teorii také zastával Loeb. Ten vysvětloval zadržování růstu adventivních pupenů na intaktních rostlinách tak, že vrcholový pupen lodyhy k sobě strhává proud živin a teprve až po odstranění těchto listů se může proud živin strhávat k okrajovým adventivním pupenům a tím jim umožnit růst (Goebel, 1900).

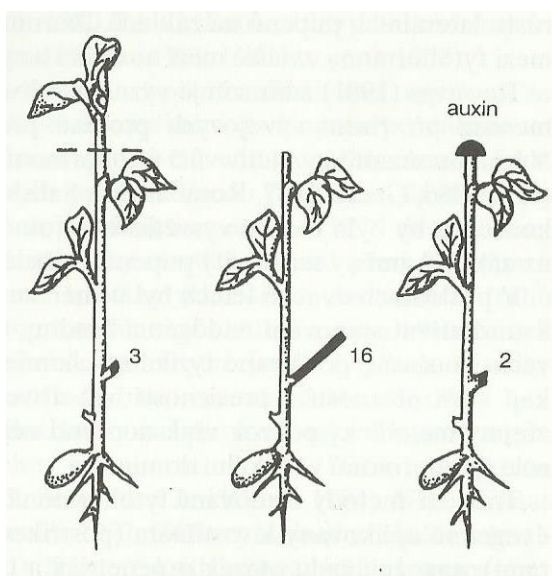
3.1.1.2 Korelačně inhibiční vlivy v apikální dominanci

První pokusy na hrachu, fazolu a bobu vedly k poznání, že za lodyžní apikální dominanci můžou inhibiční látky. Dostál (1908) vycházel z experiment, kde dekapitoval rostliny hrachu a sledoval uvolnění kotyláru z inhibice Proto Dostál předpokládal přítomnost inhibičních látek v ponechané děloze. Následné důkazy o existenci

inhibičních látek přišly od Snowa, které korelačně brzdí růst postranních pupenů (Snow, 1925).

3.1.1.3 Teorie „přímé inhibice“ auxinové v apikální dominanci

Thimann a Skoog byli první, kteří napodobili konkrétní látku u korelačně inhibičního vlivu. Na dekapitovanou plochu epikotyly nanесли auxin (IAA), čímž napodobili vrchol v inhibičním vlivu na růst postranních pupenů. Proto byla vyslovena hypotéza, že bazipetálně proudící auxin vycházející z vrcholu stonku je zodpovědný za korelační inhibici růstu postranních pupenů (Thimann a Skoog, 1933).



Obr. 2: Vyrůstající axilární pupeny po dekapitaci vrcholu. Upraveno podle Procházka, Šebánek *et al.*, 1997.

3.1.1.4 Teorie „nepřímé inhibice“ auxinové v apikální dominanci

Proti teorii Thimanna a Skooga stály některé výsledky Snowových pokusů. V experimentech byla snaha prokázat, že apikální dominance je způsobena látkami regulační povahy, které jsou odlišné od auxinu. Podle Snowa auxin v lodyze chrání lodyhu před inhibicí. Proto vrcholové části bohaté na auxin mohou oproti postranním pupenům chudších na obsah auxinu by měly být více chráněny před inhibičními látkami (Thimann a Skoog, 1933).

3.1.1.5 Teorie nutričně diverzní

V roce 1936 Went předložil modifikaci nutriční teorie (tzv. nutričně diverzní teorii). Podle této teorie vytvářený auxin v apexu způsobuje proud látek významných pro růst k místu aplikace auxinu. Tato teorie předpokládá, že u intaktních rostlin je tok auxinu z lodyžního vrcholu opačný, teprve po dekapitaci vrcholu je tok živin k axilární části dovolen. Mechanismus spočívá pravděpodobně ve vytváření metabolického a růstového sinku v místech, kde jde hladina auxinu vysoká, s tím, že bazipetální transport auxinu je schopen vyvolat akropetální transport nutričních látek (Went, 1936).

3.2 Auxin

Auxiny patří k nejdéle známým rostlinným hormonům. Jeho název je odvozen z řeckého slova *auxein*, který znamená zvětšovat se. Byl objeven ve dvacátých letech minulého století díky studiu fototropismu a gravitropismu. Rostlinný hormon auxin je produkován mladými listy a orgány rostliny. Je řazen mezi morfogeny. Mezi jeho hlavní funkce řadíme především stimulaci prodlužovacího růstu buněk nadzemních částí rostlin a také jejich diferenciální dělení. Pokud se hovoří o funkci na buněčné úrovni, podílí se na stimulaci elongace, reguluje buněčný cyklus a reguluje diferenciaci. U orgánové a meziorgánové funkce se jedná především o vlivu na apikální dominanci rostliny, stimulaci rhizogeneze a tropismy (Tromas a Rechenmann, 2010). Během životního cyklu rostliny se hladina auxinu mění. Dochází tak například v závislosti na metabolismu a transportu (Petrášek a Friml, 2009).

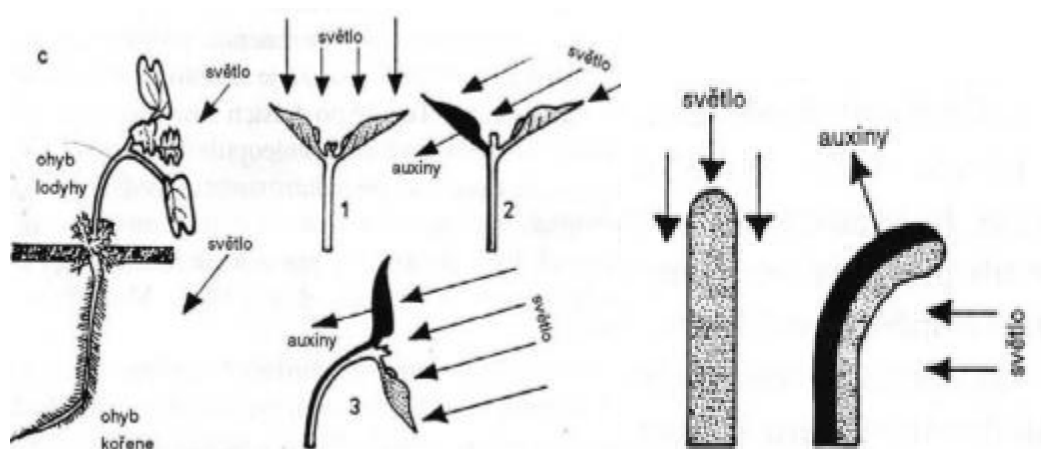
3.2.1 Historie auxinu

Existence auxinu byla zaznamenána ve dvacátých letech minulého století. Charles Darwin byl první z vědců, který se zabýval studiem rostlinných růstových korelací. Později existenci látky stimulující prodlužovací růst potvrdil i Fritz Went, který pracoval s koleoptilemi ovsa. Izoloval látku do agaru a umístil jej pod koleoptile, kde prokázal stimulaci růstu (Went, 1928). Dalším významným objevem byla izolace auxinu z lidské moči, o kterou se zasloužil v roce 1933 Kögl (Kögl, 1933). Později izoloval z lidské moči i další látky podobné strukturou i funkcí auxinu. Jednou z těchto látek byla i kyselina indol-3-octová (IAA). IAA byla také nalezena u kvasinek a v houbě *Rhizopus suinus* (Procházka *et al.*, 1997).

3.2.2 Účinky auxinu

3.2.2.1 Fototropizmus

Jde o ohyb vyvolaný jednostranným působením světla na rostlinu. Rozhodující není směr světla, ale jeho intenzita. Went a Cholodnyj byli první, kteří poukázali na roli auxinu u fototropizmu. Vliv jednostranného osvětlení má za následek přesun auxinu ze strany osvětlené, na stranu neosvětlenou. Ta následně rychleji roste a odpovídá na nerovnoměrnou distribuci auxinu ohybem (Arteca, 1996).

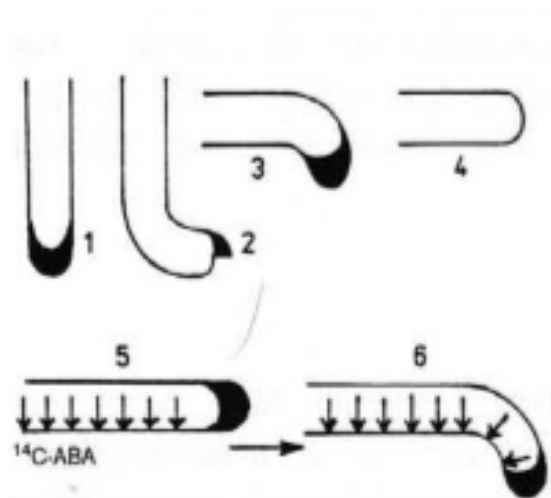


Obr. 3: Fototropizmus. Upraveno podle Procházka et al., 1997.

3.2.2.2 Geotropizmus (gravitropizmus)

U geotropizmu se jedná o ohyb orgánu působením zemské tíže. U kořene rostliny se jedná o geotropizmus pozitivní. Kořen roste paralelně se směrem zemské tíže. Hovoříme-li o stonku, jedná se o geotropizmus negativní. Stonek roste proti směru působení zemské tíže. Změny gravitace rostliny vnímají pomocí statolitů (jde o amyloplasty, tedy plastidy obsahující škrob). Statolity se vyskytují především v kořenové špičce. Pokud dojde k poškození těchto buněk, dochází ke ztrátě schopnosti reagovat na změny zemské tíže. První, kdo vyslovili teorii gravitropizmu, byli Went a Cholodnyj. Po podráždění protoplazmy statolity dojde k nestejnomořné distribuci auxinů, což má za následek nahromadění hormonu na spodní straně vodorovně uloženého orgánu. Pokud jde o koleoptili nebo lodyhu dochází k rychlejšímu růstu spodní strany orgánu (negativnímu ohybu). Pokud je u kořene auxin ve vyšší koncentraci nahromaděný na spodní straně, působí na tuto stranu inhibičně. Naopak

strana chudší na auxin roste rychleji (pozitivní ohyb). Pokud odřízneme špičku se statolity koleoptile a lodyha dále reagují na geotropismus (Evans, 1985).



Obr. 4: Gravitropismus kořene. Upraveno podle Procházka et al., 1997.

3.2.2.3 Růst plodů

Prvním signálem pro tvorbu plodů je auxin produkovaný v pylu, endospermu a embryu. Signál vzniká už při opylení. Jakmile transport auxinu do plodu klesne, dochází k opadu plodu. U druhu tvořící plody se semeny, je možné získat plody bez oplození, a to v takové situaci, pokud dodáme včas květu auxin (Psota a Šebánek, 1999).

3.2.2.4 Stimulace prodlužovacího růstu

Stimulace prodlužovacího růstu patří mezi hlavní funkce auxinu. Jde o nejlépe prostudovaný účinek auxinů. Koncentrace auxinů, která stimuluje dlouhivý růst nadzemní části naopak inhibuje růst kořenové části rostliny. Aplikujeme-li auxinovou pastu na rostlinu, odpověď se dostaví po deseti minutách od aplikace. Odpověď rostliny na aplikaci je ve formě až pětikrát rychlejší růst rostliny (Evans et al. 1994). Pro projev auxinu na prodlužovací růst se musí hormon navázat na receptor, ten se nachází na plasmatické membráně v buňce.

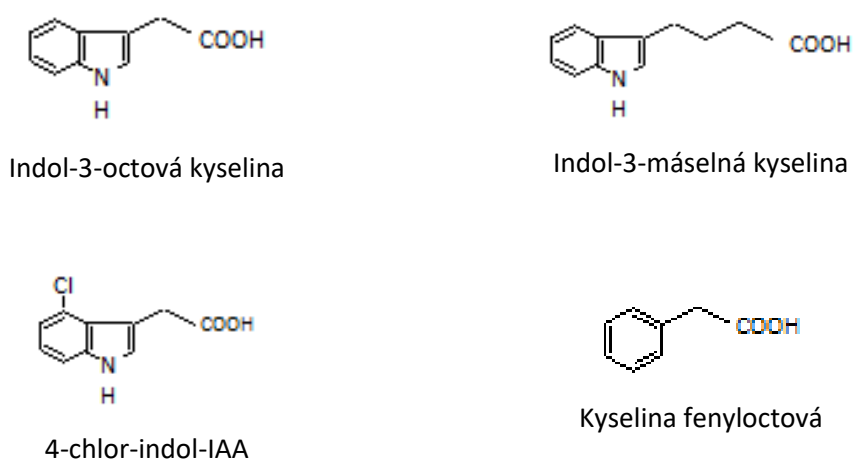
Růst buňky je propojen se dvěma procesy. První proces se týká příjmu vody (osmózou), ten je poháněn gradientem vodního potenciálu. Druhý proces je poháněn turgogenerovaným stresem a zapříčiňuje roztažení buněčné stěny (Cosgrove, 2002).

3.2.3 Přírodní auxiny

Kyselina indol-3-octová (IAA) byla dlouho jediný známý přírodní auxin. Byla nalezena i celá škála indolových sloučenin, z nichž hodně sloučenin byla ve vztahu k IAA, ale nevykazovaly biologickou aktivitu. Po zavedení nových analytických technik byly nalezeny další přírodní auxiny jako kyselina indol-3-másečná (IBA) a 4-chlor-indol-3-octová kyselina (4-Cl-IAA). Dalším přírodním auxinem je kyselina fenylactová (PAA).

IAA společně s PAA patří mezi látky krystalické, které se špatně rozpouští ve vodě, kyselém a neutrálním prostředí. Oproti tomu se velmi dobře rozpouští v organických rozpouštědlech a ve vodném alkalickém prostředí. IAA je také velmi citlivá na světlo (hlavně na UV záření). UV záření má za následek rozklad kyseliny.

PAA byla nalezena jen u některých rostlin. Hlavním výskytem jsou plody ovocných stromů (Procházka *et al.*, 1997).



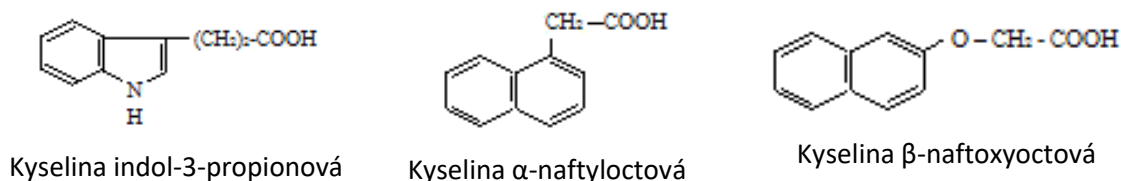
Obr 5: Struktury přírodních auxinů.

3.2.4 Syntetické auxiny

Typickým znakem pro syntetické auxiny je aromatický kruhový systém, kde v postranních řetězcích je umístěna karboxylová skupina. Jsou to slabé organické kyseliny. Mezi aromatickým kruhem a karboxylovou skupinou vždy leží uhlíkový atom.

Syntetické auxiny rozdělujeme do 5 skupin:

1. Indolové kyseliny: Zde se řadí kyselina indol-3-propionová (IPA).
2. Naftalenové kyseliny: α -naftyloctová kyselina (NAA), β -naftoxyoctová kyselina (NOA).
3. Chlorfenoxy kyseliny: 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina (2,45-T) a kyselina 2-metyl-4-chlorfenoxyoctová (MCPA).
4. Benzoové kyseliny: 2,3,6-trichlorbenzoová kyselina, 2,4,5-trichlorbenzoová kyselina a dicamba.
5. Deriváty kyseliny pikolinové: do této poslední skupiny řadíme pouze picloram.



Obr. 6: Struktura vybraných syntetických auxinů.

3.2.1 Biosyntéza auxinu

Během posledních let byl učiněn velký pokrok ve výzkumu biosyntézy auxinu. Vytváří se v rostlinách *de novo* několika způsoby (Zhao, 2010). Samotná biosyntéza auxinu probíhá dvěma hlavními dráhami. První dráha je klasifikována jako dráha závislá na tryptofanu (Trp), kde IAA je odvozená z tryptofanu. Druhá dráha je klasifikována jako dráha nezávislá na tryptofanu, přičemž IAA je tvořena přes

kyselinu indol-3-pyruvátovou (Normaly, 2010; Woodward a Bartel, 2005). Přeměna IAA z tryptofanu probíhá několika způsoby. Jsou popsány čtyřmi dráhami:

- Tryptaminová (TAM).
- Indol-3-acetamidová (IAM).
- Indol-3-pyruvátová (IPA).
- Indol-3-acetaldoximová (IAOX).

Dráhy nejsou mezi sebou úplně odděleny a vytvářejí meziprodukty, jako jsou indolyl-3-pyruvát; tryptamin; indol-3-acetamid; indol-3-acetaldoxim a indol-3-acetonitril (Zhao, 2010).

IAM je nejrozšířenější dráha u rostlin a fytopatogenních bakterií. Přeměna indol-3-acetamidu na IAA není dodnes úplně objasněná. Předpokládá se, že přeměna je uskutečněna za pomoci amidázy I.

Dráha IPA je nejrozšířenější dráhou u vyšších rostlin. Enzymem aminotransferázou 1 je Trp přeměněn na kyselinu-3-pyrohroznovou. Za pomoci dekarboxylace se kyselina-3-pyrohroznová mění na indol-3-acetaldehyd. Následnou oxidací dochází k vytvoření finálního IAA (Mashiguchi *et al.* 2011).

U dráhy TAM je Trp nejprve dekarboxylován na tryptamin pomocí tryptofandekarboxylázovým enzymem. Následným krokem je hydroxylace aminové skupiny tryptaminu za pomoci účasti produktů genů YUCCA. Vzniká N-hydroxyl-tryptamin a dále díky modifikaci vzniká finální IAA (Woodward a Bartel, 2005).

3.2.2 Signalizace auxinu

IAA kontroluje růstové a vývojové reakce po celou dobu vývoje rostliny (Hager, 2015). Signální dráha auxinu je aktivována tehdy, jakmile rostlina zaregistruje pomocí receptorů přítomnost auxinu. Receptory jsou umístěny po celé buňce někdy i na povrchu buňky a jejich úkolem je rozpoznat auxin a navázat ho specificky s vysokou afinitou (Davies, 2004).

3.2.2.1 Hlavní molekulární složky podílející se na signalizaci auxinu.

Po exogenní aplikaci IAA se odpověď rostliny dostaví maximálně do patnácti minut. Geny primární odpovědi na auxin rozdělujeme do tří skupin (AUX/IAA; GH3; SAUR).

AUX/IAA

Transkripce genů Aux/IAA je indukována během 10–20 minut od aplikace auxinu. Fungují jako transkripční receptory exprese genů reagující na expresi auxinu. Tyto geny kódují malé jaderné proteiny s krátkou dobou existence. Proteiny Aux/IAA obsahují čtyři domény označované jako domény I, II, III, IV. Doména I je aktivní, přenosná a dominantní represivní doménou. Doména II uděluje nestabilitu proteinů Aux/IAA prostřednictvím malé konzervované sekvence nazývané jako degron (protein degradation signal). Domény III a IV fungují jako interakční domény protein-protein (Hager, 2015).

GH3

Tyto geny kódují enzym pro katalyzaci konjugace auxinu s aminokyselinou. Tímto způsobem vzniká inaktivovaná zásobní forma auxinu. *GH3* je lokalizovaný v cytoplasmě a řadí se mezi stabilní enzymy (Staswick *et al.*, 2005).

SAUR (small auxin up RNAs)

Jde o krátké RNA, které jsou uspořádány na chromozómech v klastrech za sebou. Mohou vyvolat jednu z nejrychlejších auxinem indukovaných odpovědí. Po aplikaci IAA se odpovědná transkripce *SAUR* genů projeví do pěti minut. Transkripty *SAUR* jsou nestabilní (Yang a Poovaiah, 2000).

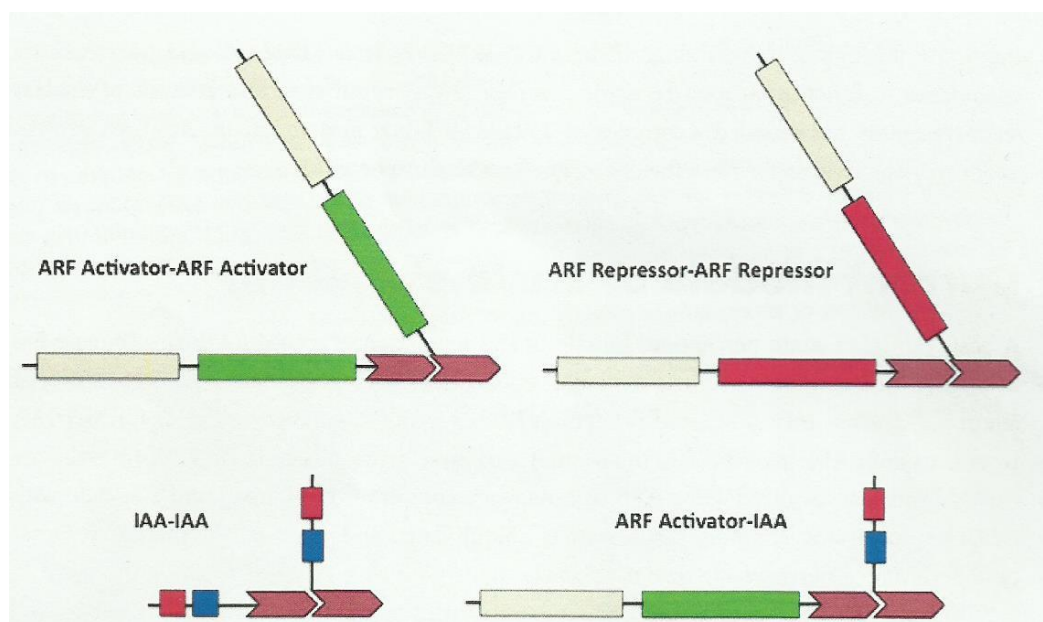
3.2.2.2 Receptory auxinu

Jako první izolovaný protein byl ABP1 (auxin-binding protein 1). Jde o protein, který s velkou afinitou váže auxiny. ABP1 je lokalizován v lumenu endoplasmatického retikula. ABP1 protein nemá žádnou funkci ve změnách exprese genů regulovaných auxinem. Jako první byl izolován ze *Zea mays* L., ovšem byl nalezen i v dalších rostlinných druzích jako například *Arabidopsis thaliana* L. (Hager, 2015).

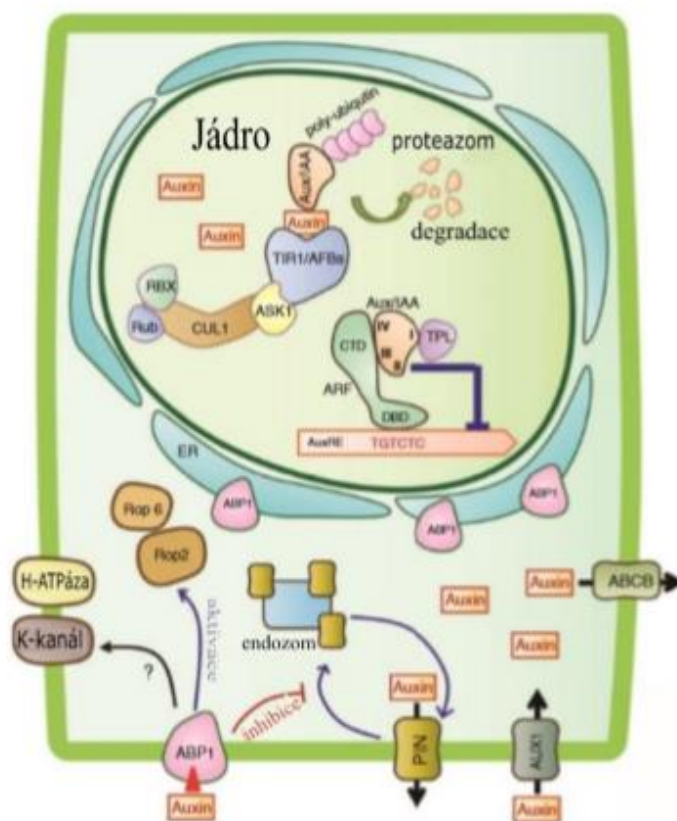
TIR1 protein (transport inhibitor response 1) je primární receptor auxinu patřící do skupiny proteinů F-box. Tyto proteiny determinují substrátovou specifitu Skp1/Cullin/F-box (SCF) komplexů. Komplexy ubiquitinují cílové proteiny. Ty jsou následně degradovány za pomoci proteasomu. Ubiquitinaci AUX/IAA stimuluje auxin za pomoci SCF^{TIR1} komplexu. Dále dochází k degradaci AUX/IAA, k následnému uvolnění ARF z inhibice. Posledním krokem dochází k transkripci indukovaných genů působením auxinu (Dharmasiri *et al.* 2005).

3.2.2.3 Model signalizace auxinu

Byl navržen základní model percepcie auxinu (Hager, 2015). Jestliže se na receptor nenaváže auxin, dochází k navázání proteinu AUX/IAA na ARF. Celý vzniklý dimer se připojí na AuxRE v promotoru genů auxinové odpovědi. Přepis genů je inhibován. Protein TIR1/AFB je receptor auxinu, který pochází z rodiny F-box, který vytváří SCF E3 ubiquitin ligázový komplex mezi SKP (AKK) a kulinem 1 (CUL1). SCF^{TIR1} katalyzuje ubiquitinaci proteinů AUX/IAA v přítomnosti auxinu. Ty svojí vazbou brání aktivitě transkripčních faktorů ARF. Po navázání auxinu na TIR1 protein dochází k proteolytické degradaci AUX/IAA represorů. Také se uvolní ARF z inhibice a způsobí transkripci genů auxinové odpovědi (Hayashi, 2012).



Obr. 7: Schéma ARF a Aux/IAA interakce. Podle Hager, 2015.



Obr. 8: Model signalizace v buňce. Podle Hayashi 2012.

3.2.3 Transport auxinu

Auxin je syntetizován primárně v apexu a mladých listech, kde je následně transportován bazipetálně po rostlině (Tromas a Rechenmann, 2010). V rostlině se auxin transportuje dvěma způsoby, a to z buňky do buňky polárně a na dlouhé vzdálenosti nepolárně. Transport z buňky do buňky (polární transport) vyžaduje k aktivnímu přenosu auxinu protein, které zprostředkovávají vstup auxinu z buňky (Bennett *et al.*, 1996; Gälweiler *et al.*, 1998; Luschnig *et al.*, 1998). U transportu na dlouhé vzdálenosti je auxin transportován nepolárně vodivým pletivem - floémem (Tromas a Rechenmann, 2010). Tento transport byl prokázán pomocí radioaktivně značených molekul auxinu (Morris a Thromas, 1978).

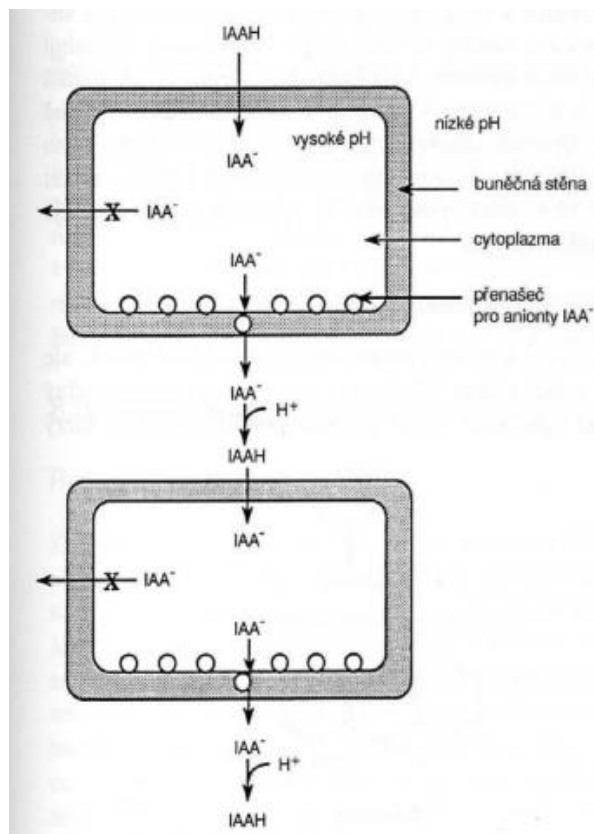
3.2.3.1 Polární transport auxinu

Stonkový polární transport auxinu se uskutečňuje v buňkách xylémového parenchymu. Ve stonkové části probíhá transport bazipetální (Morris a Thomas, 1978). Oproti tomu v kořenové části se odehrává akropetální transport, ovšem v kořenové špičce se směr transportu auxinu otáčí a pomocí PIN2 proteinů pokračuje jako transport bazipetální. Polární transport auxinu je náročný na energii a vyžaduje proteinové přenašeče do buňky a z buňky (Rubery a Shelldrake, 1974).

Chemiosmotický model polárního transportu auxinu

Chemiosmotický model byl navržen v polovině sedmdesátých let. Vysvětluje polární transport auxinu na úrovni jedné buňky (Rubery a Shelldrake, 1974). Pro lepší pochopení transportu auxinu bychom měli znát fyzikálně-chemické vlastnosti molekuly auxinu. Auxiny patří mezi slabé kyseliny (disociované, nedisociované formy). Z toho vyplývá, že její schopnost prostupovat membránou závisí na pH hodnotě (Zažímalová *et al.*, 2010). Hodnota pH v plasmatické membráně mezi apoplastem a symplastem je rozdílná, díky působení protonové pumpy. V prostředí buněčné stěny se hodnota pH pohybuje okolo 5,5. Molekula auxinu se v takovémto prostředí vyskytuje částečně disociované formě ($pK_a = 4,85$). To zajišťuje, že IAA je z 16 % ve formě nedisociované (IAA) a zbytek je ve formě disociované (IAA⁻) z 84 % (Thomas a Rechenmann, 2010). Negativní náboj disociované karboxylové skupiny brání molekule v přechodu přes membránu. Pouze nedisociovaná IAA umí do buňky vstoupit pasivní difúzí, bez asistence proteinových přenašečů (Zažímalová *et al.*, 2010).

Hodnota pH se v cytoplazmě pohybuje okolo 7. Proto se všechny molekuly IAA nacházejí v disociované formě a nemohou volně prostupovat přes cytoplazmatickou membránu. Z tohoto důvodu jsou pro výstup molekul auxinu potřebné proteinové přenašeče (Petrášek a Friml, 2009).



Obr. 9: Schéma chemiosmotického modelu. Podle Procházka et al. 1998.

3.2.3.2 Proteinové přenašeče

Polární transport auxinu z buňky do buňky je zprostředkován speciálními přenašeči. Rozdělujeme je na přenašeče vstupní a výstupní. Do typu vstupních přenašečů řadíme AUX1/LAX proteiny, které umožňují transport auxinu do buňky (Bennett *et al.*, 1996). Zatímco do skupiny výstupních přenašečů řadíme proteiny, které napomáhají transportovat auxin z buňky. V této skupině se vyskytují nejméně dvě proteinové rodiny, a to PIN a ABC rodiny (Vieten *et al.*, 2005).

AUX1/LAX proteiny

Pro vstup auxinu do buňky je zapotřebí protein rodiny AUX1/LAX (De Smet *et al.*, 2011). Genom z *Arabidopsis thaliana* L. kóduje jeden AUX1 (AUXIN RESISTANT1) a tři LIKE AUXIN RESISTANT1 (LAX1, LAX2, LAX3) proteiny. Proteiny AUX1 a LAX jsou z 80 % sekvenčně podobné aminokyselinám (Parry *et al.*, 2001).

Nejlépe prozkoumána a popsána je funkce AUX1 proteinu. Ta hraje klíčovou roli v gravitropismu u kořene. AUX1 je exprimován ve tkáních, které vnímají zemskou tíži (Swarup *et al.*, 2005). AUX1/LAX proteiny se účastní i v procesech vývoje laterálních kořenů a tvorby kořenového vlášení (Swarup *et al.*, 2001). Tkáně, které exprimují AUX1 přijmou IAA aktivně pomocí přenašečů až o patnáctkrát víc než u pasivní difúzi (Swarup *et al.*, 2005). AUX1 proteiny zajišťují transport auxinu ze stonku do kořene. LAX proteiny mají hlavní funkci v udržování lokálních auxinových gradientů (Swarup *et al.*, 2002, 2004, 2008).

Transport auxinu za pomoci AUX1 proteinů lze blokovat kyselinou 2,3,5-trijódbenzoovou (TIBA), kyselinou 1-naftoxyoctovou (1-NOA) a kyselinou 2-naftoxyoctovou (2-NOA) (Parry *et al.*, 2001; Yang *et al.*, 2006).

PIN proteiny

PIN proteiny řadíme do skupiny sekundárních přenašečů. Ty přenášejí látky přes membránu za pomoci energie elektrochemického gradientu na membráně (Gälweiler *et al.* 1998). Jedná se o výstupní přenašeče auxinu. PIN proteiny jsou integrální membránové proteiny. Identifikace proteinu byla na základě *pin1* mutantních rostlin u *Arabidopsis thaliana* L. Vykazovaly poruchu v tvorbě květů a listů. Na základě identifikace *pin1* mutantních jedinců se zjistilo, že PIN proteiny mají hlavní funkci při zabezpečení výstupu auxinu z buňky (Gälweiler *et al.* 1998; Okada *et al.*, 1991).

U *Arabidopsis thaliana* L. bylo identifikováno osm sekvencí řazených do PIN rodiny. Ty se dále dělí do dvou podskupin rozdělených podle délky hydrofilní smyčky, která se vyskytuje ve středu polypeptidového řetězce (Tromas a Rechenmann, 2010). Mezi tzv. „dlouhé“ PIN proteiny řadíme PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 a PIN7, které mají dlouhou hydrofilní smyčku. Tyto proteiny jsou polárně lokalizovány na plazmatické membráně. Prokazují funkci k určování směru toku auxinu (Wisniewska *et al.*, 2006). „Dlouhé“ PIN proteiny prochází dynamickým cyklováním mezi plazmatickou membránou a endozomálními kompartmenty (Zažímalová *et al.*, 2010). Toto dynamické cyklování určuje množství PIN proteinů vyskytujících se na cytoplazmatické membráně. Do skupiny „krátkých“ PIN proteinů řadíme PIN5, PIN6 a PIN8. Jejich centrální hydrofilní smyčka je částečně nebo značně redukována. Skupina „krátkých“

PIN proteinů se nachází především na endoplazmatickém retikulu. Umístění na endoplazmatickém retikulu vypovídá o jejich funkci u vnitrobuněčné distribuci auxinu a regulaci jako homeostáze uvnitř buňky (Mravec *et al.*, 2009).

Hlavní roli hrají PIN proteiny při transportu auxinu, avšak jednotlivé PIN proteiny mají různé specifické funkce při vývojových procesech rostliny. PIN1 proteiny zabezpečují organogenezi a diferenciaci cévních pletiv. Role PIN2 proteinu je při změně gravitropické reakce. PIN3 protein zabezpečuje laterální distribuci auxinu při fototropické a gravitropické odpovědi rostliny. PIN4 protein ovlivňuje aktivitu kořenového meristému. V neposlední řadě PIN7 protein se podílí na raném vývoji embrya (Vieten *et al.*, 2005).

ABCB proteiny

ABC proteiny patří do velké rodiny transportérových proteinů. Jednotlivé členy této skupiny mohou být zapojeny i do procesů souvisejících s rezistencí vůči chorobám nebo transportu. Činnost proteinů je spojena s pohybem malých molekul, živin a xenobiotik (Verrier *et al.*, 2008).

Podtřída ABC rodiny, ABC-B/multidrug resistance/P-glykoprotein (ABCB/MDR/PGP) zahrnuje 21 členů. Vyskytují se ve spojitosti s transportem auxinu nebo auxinových derivátů (Murphy *et al.*, 2002). Nejznámějšími výstupními auxinovými přenašeči jsou ABCB1 a ABCB19, kteří působí jako influx přenašeče. Protein ABCB4 mění svojí funkci podle hladiny auxinu v buňce. Pokud je hladina auxinu vyšší jeho funkce je výstupní. Naopak, pokud je hladina auxinu menší, působí protein jako vstupní přenašeč (Yang a Murphy, 2009).

ABCB proteiny transportující auxin jsou nepolárně lokalizovány na cytoplazmatické membráně. V některých výjimečných případech je možná lokalizace i polární (Vieten *et al.*, 2007).

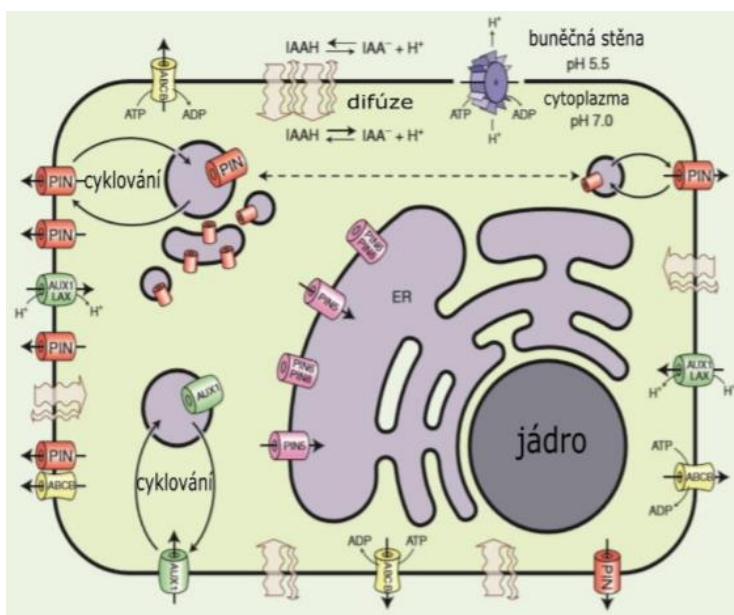
Inhibitory polárního transportu auxinu

Prostřednictvím inhibitorů polárního transportu auxinu je možné sledovat úlohu a důležitost polárního transportu auxinu v regulaci růstu a vývoji rostlin. Polární

transport je možné blokovat látkami jako je trijódbenzoová kyselina (TIBA), NPA (N-(1-naftyl)ftalamová kyselina), NOA (naftoxyoctová kyselina) fluorenol nebo 1-pyrenoylbenzoová kyselina (Rubery, 1990).

NPA je klasifikována jako syntetický fytotropin, který silně inhibuje růst rostliny (Morgan, 1964; Katekar a Geissler, 1980). Děje se to na základě efektivní redukce transportu auxinu v nadzemní části rostliny (Benková *et al.*, 2003; Bhalerao *et al.*, 2002; Casimiro *et al.*, 2003).

TIBA funguje jako inhibitor polárního transportu auxinu, zabraňující internalizaci PIN1 proteinů vyskytujících se na cytoplasmatické membráně. Také inhibuje zacelování PIN1 proteinů na cytoplasmatické membráně (Morgan, 1964; Katekar a Geissler, 1980; Geldner *et al.*, 2001).



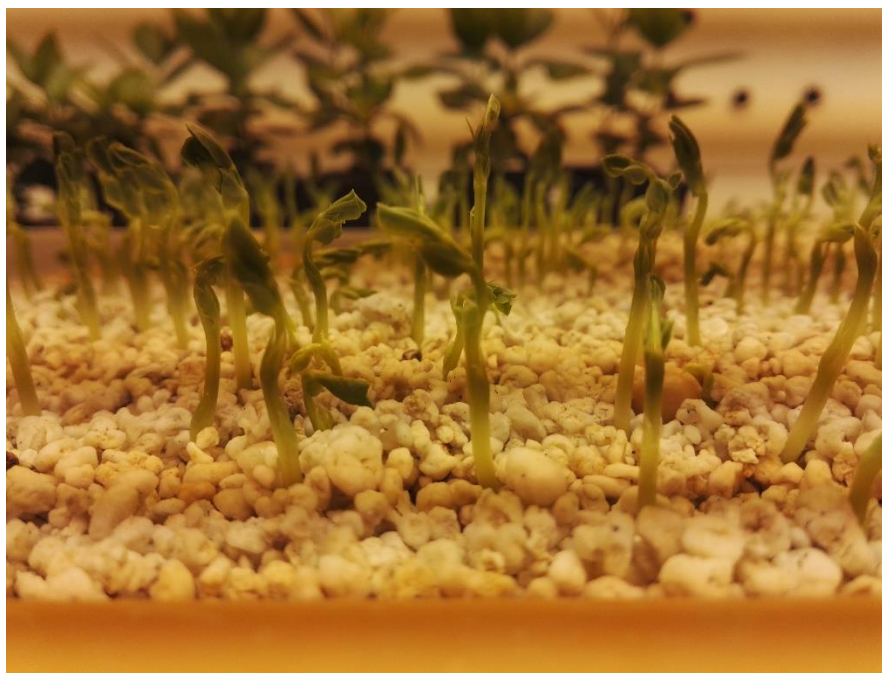
Obr. 10: Transport auxinu. Podle Zažímalová 2010.

4 MATERIÁL A METODIKA

4.1 Rostlinný materiál

K experimentu byly použity rostliny hrachu setého (*Pisum sativum* L.), odrůdy Vladan (Semo a.s., Smržice, ČR). Mořená semena hrachu byla nejprve nechána 24 hodin bobtnat v destilované vodě při laboratorní teplotě. Poté byla důkladně propláchnuta a vyseta do plastových nádob s vlhkým perlitem, kde po 4 dnech vyklíčila. Po sedmi dnech od bobtnání byly již několika centimetrové rostliny hrachu přesazeny do kultivačních nádob s perlitem a byly dále zalévány pomocí Richterova živného roztoku.

Průběh kultivace probíhal v klimaboxu při teplotě 20/18 °C a fotoperiodě 16/8 hodin (den/noc).

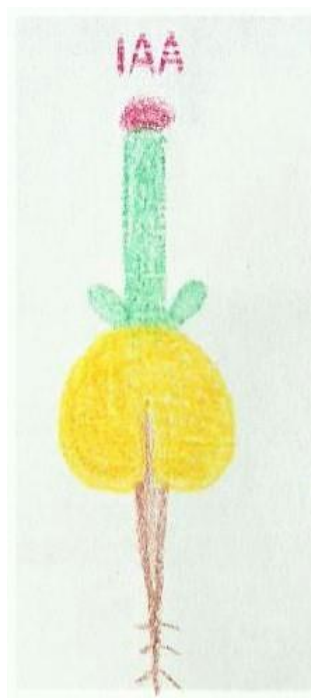


Obr. 11: Rostliny hrachu v perlitu.

4.2 Založení a průběh experimentu

Po uplynutí osmi dnů od nabobtnání rostlin hrachu byla provedena dekapitace přibližně 1 cm nad dělohami. Následně byla na řez aplikovaná auxinová pasta. Pasta byla vyrobena rozpuštěním IAA (Sigma-Aldrich, USA) ve vodním lanolinové pastě při teplotě 40°C v takovém množství, aby výsledná koncentrace IAA byla 0,5 %. Pro stanovení expresních profilů vybraných genů byly skalpelem odebrány kotylární pupeny od obou děloh. Odběry byly prováděny v intervalech 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 hodin po dekapitaci a nanesení pasty na stonkový pahýl (u varianty 120 hodin byly odebrány apexy zvlášť z již rostoucích výhonů (120 - R) a pupeny stále inhibované (120 - I). Pupeny byly vloženy do mikrozkušavek. 1 vzorek obsahoval pupeny 20 rostlin. Odběry se prováděly ve třech biologických opakováních. Po odběru byly mikrozkušavky s pupeny ihned ponořeny do tekutého dusíku. Poté byly vzorky skladovány při teplotě -77 °C v hlubokomrazícím boxu (MDF-U3286S (Sanyo, Japonsko)).

Vzorky byly podrobeny analýze exprese genů *PsDRM1*, *PsBRC1*, *PsAUX1*, *PsPIN1*, *PsYUC1*. Výsledná exprese byla porovnána vůči i konstitutivním genů *PsEF1- α* , *PsActin* a *Ps β -tubulin*.



Obr. 12: Schéma dekapitace rostliny a aplikace 0,5 % IAA.

4.2.1 Izolace RNA

Po celou dobu izolace RNA byly použity sterilní latexové rukavice, sterilní špičky a mikrozskumavky. Postup práce byl proveden dle návodu RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen, Německo). Před úplným začátkem práce byly pipety, pracovní plochy a centrifugy vyčištěny roztokem RNase Zap (Sigma-Aldrich, USA). Tento krok se provádí, aby nenastala náhodná degradace RNA enzymem RNázou.

Tento typ izolace stojí na principu selektivních vazebných vlastností silikonové membrány společně s centrifugací. Použitý biologický materiál byl nejdříve homogenizován v tekutém dusíku za přítomnosti vysoce denaturujícího pufru. Pufř obsahoval guanidin thiokyanát a β -merkaptóetanol. Poté byl přidán etanol, který zajistil podmínky pro vazbu RNA na membránu a vymytí kontaminantů. Potřebná čistota izolované RNA byla docílena přidáním DNázy I, která rozštěpila kontaminující DNA na membráně kolony a byla poté následnou centrifugací z kolony odstraněna. Vzorek přečištěné RNA byl poté eluován vodou, bez RNázy a byla ihned měřena koncentrace RNA na speciálním spektrofotometru (Picodrop, Spojené království). Vzorky RNA byly vloženy do $-77\text{ }^{\circ}\text{C}$ v hlubokomrazícím boxu.

4.2.2 Měření koncentrace RNA

Koncentrace izolované RNA vzorků byla stanovena změřením absorbance při vlnové délce 260nm za pomoci spektrofotometru Picodrop Pico100 (Picodrop, Spojené království). Výsledná koncentrace RNA ve vzorku byla vypočítána ze vztahu $A_{260\text{nm}} = 1$. Kdy hodnota 1 odpovídá roztoku RNA o koncentraci 40 $\mu\text{g/ml}$.

1. biologické opakování			
<i>Čas odběru</i>	<i>Koncentrace ng.μl⁻¹</i>	<i>A 260/A 280</i>	<i>A 260/ A 230</i>
0 h	362,8	1,906	2,694
1 h	461,4	2,01	1,127
3 h	479,8	2,014	0,077
6 h	587	1,978	1,219
12 h	535,7	1,949	2,413
24 h	504,1	1,906	1,846
48 h	488,7	1,987	2,471
120 h I	701,4	0,991	1,641
120 h R	780,8	0,959	1,395

Tab. 1: Koncentrace RNA u 1. biologického opakování

2. biologické opakování			
<i>Čas odběru</i>	<i>Koncentrace ng.μl⁻¹</i>	<i>A 260/A 280</i>	<i>A 260/ A 230</i>
0 h	501,2	1,951	2,287
1 h	592	1,928	1,743
3 h	485,7	1,849	2,644
6 h	579	1,701	1,387
12 h	286	1,483	1,617
24 h	473,7	1,994	2,577
48 h	493,1	1,862	2,261
120 h I	722,9	1,165	1,664
120 h R	808,6	0,994	1,433

Tab. 2: Koncentrace RNA u 2. biologického opakování

3. biologické opakování			
<i>Čas odběru</i>	<i>Koncentrace ng.μl⁻¹</i>	<i>A 260/A 280</i>	<i>A 260/A 230</i>
0 h	674,9	1,824	2,142
1 h	318,1	1,729	0,873
3 h	486,7	1,808	1,667
6 h	338,8	2,056	2,789
12 h	281,6	1,561	1,21
24 h	301,6	2,151	1,107
48 h	562	1,941	2,288
120 h I	676,3	1,806	2,221
120 h R	841,8	1,273	1,494

Tab. 3: Koncentrace RNA u 3. biologického opakování

4.2.3 Reverzní transkripce

Izolovaná RNA byla následnou dvoukrokovou reverzní transkripcí pomocí kitu SuperScript® III Reverse Transcriptase, (Invitrogen, USA) přepsána do cDNA.

Reverzní transkripce probíhala ve dvou fázích. U první fáze bylo provedeno napipetování vypočítaného množství RNA a H₂O do popsaných mikrozkušavek. Reakce obsahovala RNA o koncentraci 0,5 ng.μl⁻¹. Celkový objem H₂O s RNA byl 23,7μl. Složení úplné reakční směsi této fáze je popsáno v tabulce (Tab. 7). Směs pro reakci byla krátce promíchána pipetou. Po protřepání byly vzorky a směs vloženy do centrifugy a poté následně vloženy do termocykleru (T3 Thermocycler Biotron T3 Thermoblock (Biometra, Německo)). Termocykler byl nastaven na program číslo 12, kde teplota 72 °C působila na vzorky po dobu 10 minut. Oligo dT₂₀ fungoval jako primer, který se vázal na polyadenylovaný konec mRNA. V první fázi docházelo k denuraci sekundární struktury RNA a následného připojení primeru již zmiňovaného oligo dT₂₀.

Dalším krokem byla příprava reakční směsi pro druhou fázi reverzní transkripce. Složení směsi pro tuto fázi je popsána v tabulce (Tab. 8). Směs pro druhou fázi byla následně rozpipetována po 12,3 μl do každého vzorku v mikrozkušavce z první reakce. Následovala krátká centrifugace vzorků. Následně byly vzorky vloženy

do termocyklieru a zapnut program číslo 13, kde byly vzorky vystaveny teplotě 42 °C po dobu 50 minut a dále 72 °C po dobu 10 minut. V této fázi dochází k přepisu původního řetězce RNA do cDNA za pomoci enzymu reverzní transkriptázy. Ta byla získána z viru ptačí myeloblastózy (AMV-RT).

Čas odběru	1. biologické opakování			
	Koncentrace RNA		Dopočítané množství	
	$ng.\mu l^{-1}$	$ng.\mu l^{-1}$	μl RNA	μl H ₂ O
0 h	501,2	0,5012	1,00	22,7
1 h	592	0,592	0,84	22,9
3 h	485,7	0,4857	1,03	22,7
6 h	579	0,579	0,86	22,8
12 h	286	0,286	1,75	22,0
24 h	473,7	0,4737	1,06	22,6
48 h	493,1	0,4931	1,01	22,7
120 h I	722,9	0,7229	0,69	23,0
120 h R	808,6	0,8086	0,62	23,1

Tab. 4: Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce

1. biologického opakování

Čas odběru	2. biologické opakování			
	Koncentrace RNA		Dopočítané množství	
	$ng.\mu l^{-1}$	$ng.\mu l^{-1}$	μl RNA	μl H ₂ O
0 h	362,8	0,3628	1,38	22,3
1 h	461,4	0,4614	1,08	22,6
3 h	479,8	0,4798	1,04	22,7
6 h	587	0,587	0,85	22,8
12 h	535,7	0,5357	0,93	22,8
24 h	504,1	0,5041	0,99	22,7
48 h	488,7	0,4887	1,02	22,7
120 h I	701,4	0,7014	0,71	23,0
120 h R	780,8	0,7808	0,64	23,1

Tab. 5: Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce

2. biologického opakování

Čas odběru	3. biologické opakování			
	Koncentrace RNA		Dopočítané množství	
	$ng \cdot \mu l^{-1}$	$ng \cdot \mu l^{-1}$	μl RNA	μl H ₂ O
0 h	674,9	0,6749	0,74	23,0
1 h	318,1	0,3181	1,57	22,1
3 h	486,7	0,4867	1,03	22,7
6 h	338,8	0,3388	1,48	22,2
12 h	281,6	0,2816	1,78	21,9
24 h	301,6	0,3016	1,66	22,0
48 h	562	0,562	0,89	22,8
120 h I	676,3	0,6763	0,74	23,0
120 h R	841,8	0,8418	0,59	23,1

Tab. 6: Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce
3. biologického opakování

Reakční směs	Objem (μ l)
H ₂ O	Individuální
RNA	Individuální
dNTPs	2
Oligo dT	2
Celkový objem	27,7

Tab. 7: Složení reakční směsi pro první fázi RT.

Reakční směs	Objem (μ l)
Pufř (5 x FS)	8
DTT	4
cAMV transkriptáza	0,3
Celkový objem	12,3

Tab. 8: Složení reakční směsi pro druhou fázi RT.

4.2.4 Kvantitativní PCR

Získaná cDNA pomocí reverzní transkripce byla dále využita pro kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci (Real-Time PCR, qPCR). Při metodě qPCR se analyzuje každý cyklus PCR v reálném čase, a to na principu fluorescence (fluorescenčně značený primer nebo sonda). Z tohoto důvodu byl využit termocykler, který umí vzorek ozářit excitačním zářením. Během experimentu bylo využito interakční barvivo Sybr Green Mastermix v kitu (Light Cycler[®] 480 SYBR Green I (ROCHE, Diagnostics GmbH, Německo)).

cDNA byla naředěna v poměru 1:10, kdy celkový objem byl 100 μ l (90 μ l H₂O + 10 μ l cDNA). Zmíněný objem postačil pro 50 reakcí, kde do každé reakce bylo přidáno 2 μ l naředěné cDNA. Dalším krokem bylo namíchání mixů pro každý gen.

Pro analýzu genové exprese byly zpracovány následující pokusní varianty 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48 a 120 I, 120 R (ve třech biologických a dvou technických opakováních). Pro každý gen bylo pipetováno 96 reakcí včetně 4 negativních kontrol. Zde byla místo cDNA pipetována H₂O.

Na destičku Hard-Shell[®] PCR Plates 96-Well WHT/CLR (Bio-Rad, USA)) byly napipetovány reakční směsi. Po ukončení pipetování byla destička přelepena adhezivním těsněním (Microseal[®] 'B' Seal (Bio-Rad, USA)) a následně vložena do centrifugy (Z 366 (Hermle, Německo)) na 30 sekund při 2000 rpm. Poté destička byla vložena do termocykleru (C1000[™] Thermal Cycler/CFX96[™] RealTime Systém (Bio-Rad, USA)), kde proběhla celá reakce. Pro snadnější orientaci u každé destičky byly popsány pozice vzorků. Destičky byly popsány a uloženy za pomoci programu Bio-Rad-CFX Manager. Jako posledním krokem bylo spuštění protokolu pro specifickou PCR. Sekvence specifických primerů byly poskytnuty pracovištěm CEITEC MENDELU.

Reakční směs	Objem (μl)
H ₂ O	1,4
Primer F	0,8
Primer R	0,8
Sybr Green Mastermix	5
cDNA	2
Celkový objem	10

Tab. 9: Složení reakční směsi pro qPCR (1 reakce)

Gen	Primer	Sekvence primeru	Reakční podmínky
<i>Actin</i>	ACTIN-F ACTIN-R	5'-TGT CAG CCA CAC TGT CCC TAT C-3' 5'-CAA GAC GAA GGA TGG CAT GT-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>β-tub</i>	TB-F TB-R	5'-GCT CCC AGC AGT ACA GGA CTC T-3' 5'-TGG CAT CCC ACA TTT GTT GA-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>EF1-α</i>	EF1-F EF1-R	5'-CTG TCA TGG ATG CAC CT-3' 5'-TCC TTA GAG ATA CCG GCT T-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>PIN1</i>	PIN-F PIN-R	5'-CTG CGT CCG ACA ATA TAG AT-3' 5'-AGT TAT GCC ACC AGC TAG T-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→60°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>AUX1</i>	AUX1-F AUX1-R	5'-GGG TTT GGG TTT GGA GGA TGG TC-3' 5'-TGG TGG TGG AGG CTT GCA TTG G-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>DRM1</i>	DRM1-F DRM1-R	5'-AAC TCA CCA CCA CCC TCA AAG ATG-3' 5'-GAT GTA GAC ACG TGG CAG AAG ATG-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>BRC1</i>	BRC1-F BRC1-R	5'-AGG CAA GAG AAA GAG CAA GG-3' 5'-TTG CAT TGC TTT GAG TTT GA-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→62°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C
<i>YUC</i>	YUC-F YUC-R	5'-ATG GTG CAA AAT TTA TGG AT-3' 5'-TCA CTT CCC TTA AGC CAA C-3'	95°C/10'→40x(95°C/15''→58°C/15''→72°C/ 15'')→72°C/30''→70°C/1''→tání 50-93°C

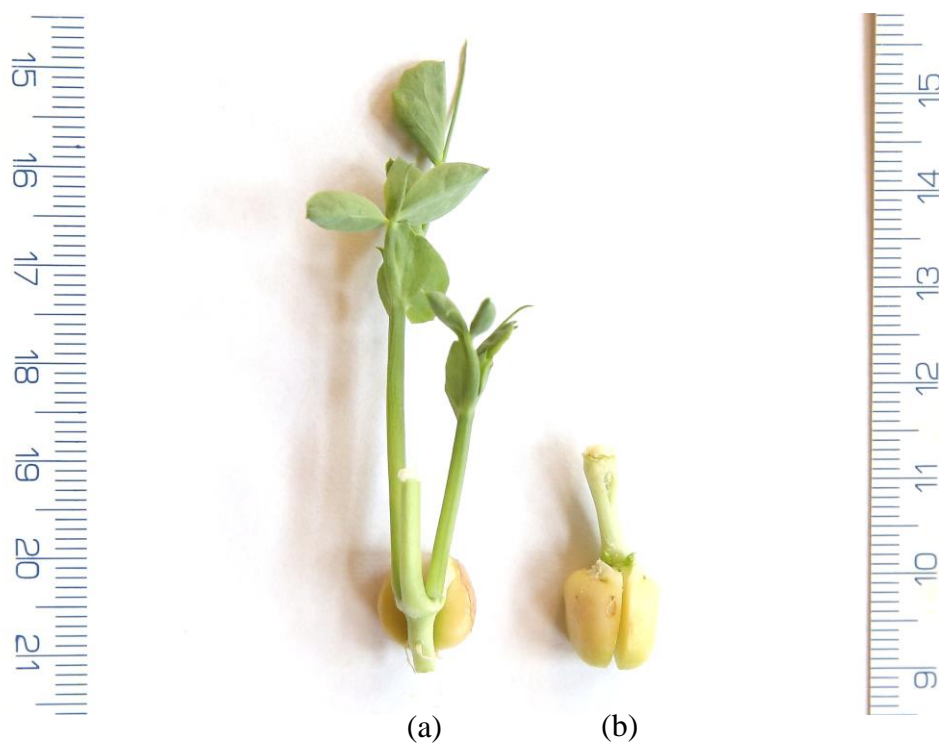
Tab. 10: Seznam genů, primerů a podmínek jednotlivých qPCR reakcí.

5 VÝSLEDKY

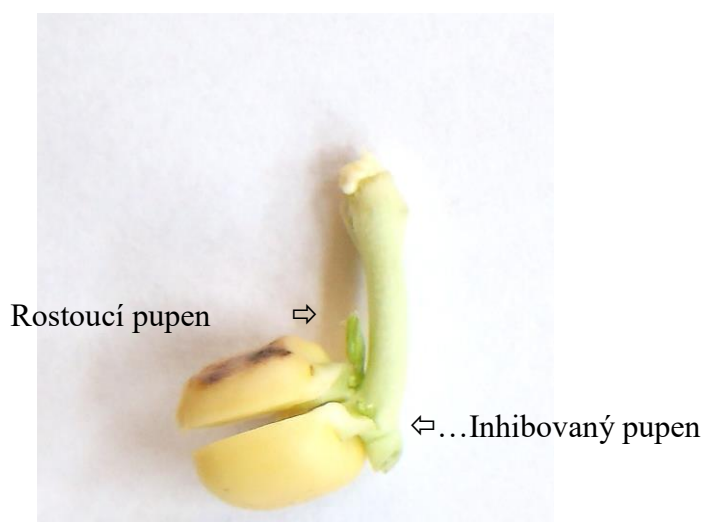
Sedmý den od nabobtnání hrachu setého byla provedena dekapitace růstového vrcholu a aplikace 0,5 % IAA pasty na stonkový pahýl. V časových intervalech odebraných kotylárních pupenech byla provedena analýza exprese genů, které souvisí s růstem pupenů uvolněných z inhibice. Získané hodnoty qPCR analýzy byly přepočítány na procenta. Hodnoty byly dále normalizovány na expresi tří konstitutivních genů *PsEF1-α*, *PsActin* a *Psβ-tubulin*. Dále byly vytvořeny grafy exprese genů ve sledovaných časech. Směrodatné odchylky jsou zachyceny chybovými úsečkami. Průkaznost byla ověřena Studentovým T-testem, kde byly hodnoty $\alpha=0,05^*$ a $\alpha=0,01^{**}$.



Obr. 13: *Pisum sativum L.* kontrolní varianty v čase 0 hodin.



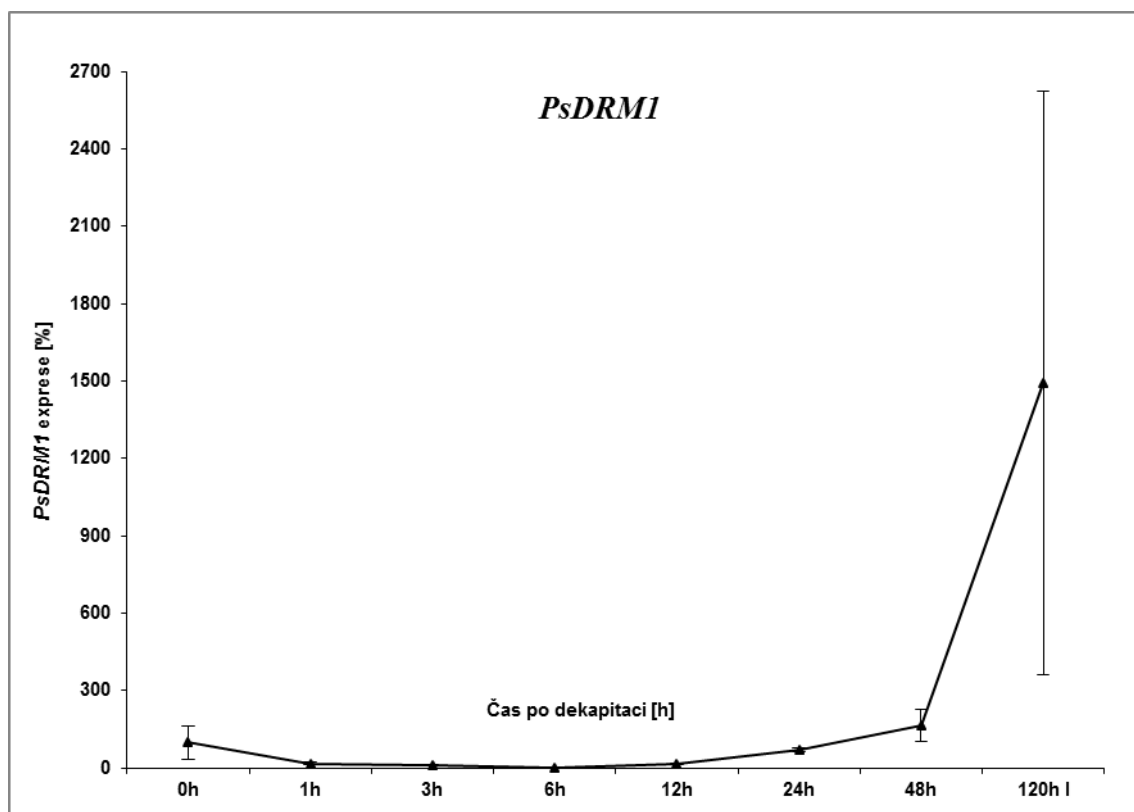
Obr. 14: *Pisum sativum* L. srovnání varianty kontroly (a) a varianty dekapitace s aplikovaným 0,5 % IAA (b).



Obr. 15: *Pisum sativum* L. s inhibovaným pupenem (120 h - I) a rostoucím pupenem (120 h - R).

120 hodin po dekapitaci a aplikaci 0,5 % IAA pasty 88 % z celkového počtu kotylárních pupenů zůstávala v inhibici, zatím co 12 % kotylárních pupenů již vykazovala růst.

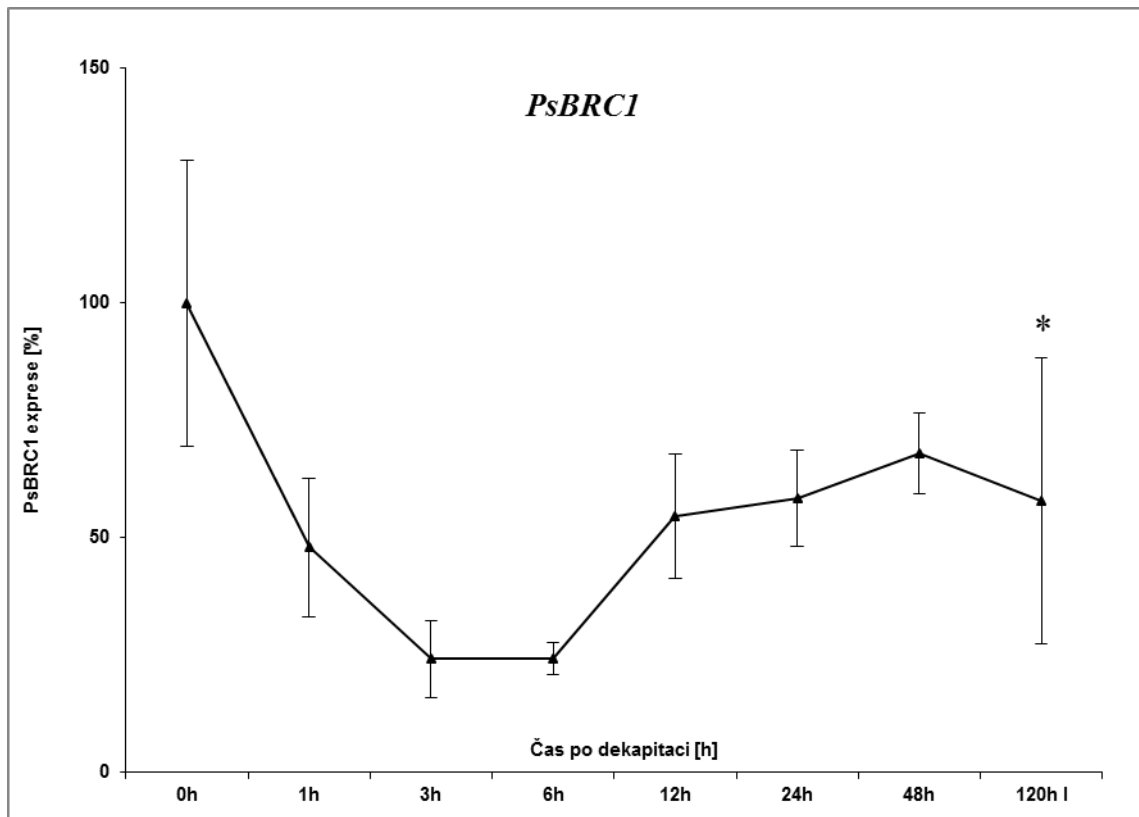
PsDRM1



Graf 1: Exprese genu *PsDRM1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.

Hladina exprese genu *PsDRM1* se snížila až na hodnoty okolo nuly v čase šesti hodin po dekapitaci a nanesení IAA pasty. Od dvanácté hodiny se exprese postupně zvyšovala. Maximálních hodnot dosahovala po stodvaceti hodinách od experimentálního zásahu.

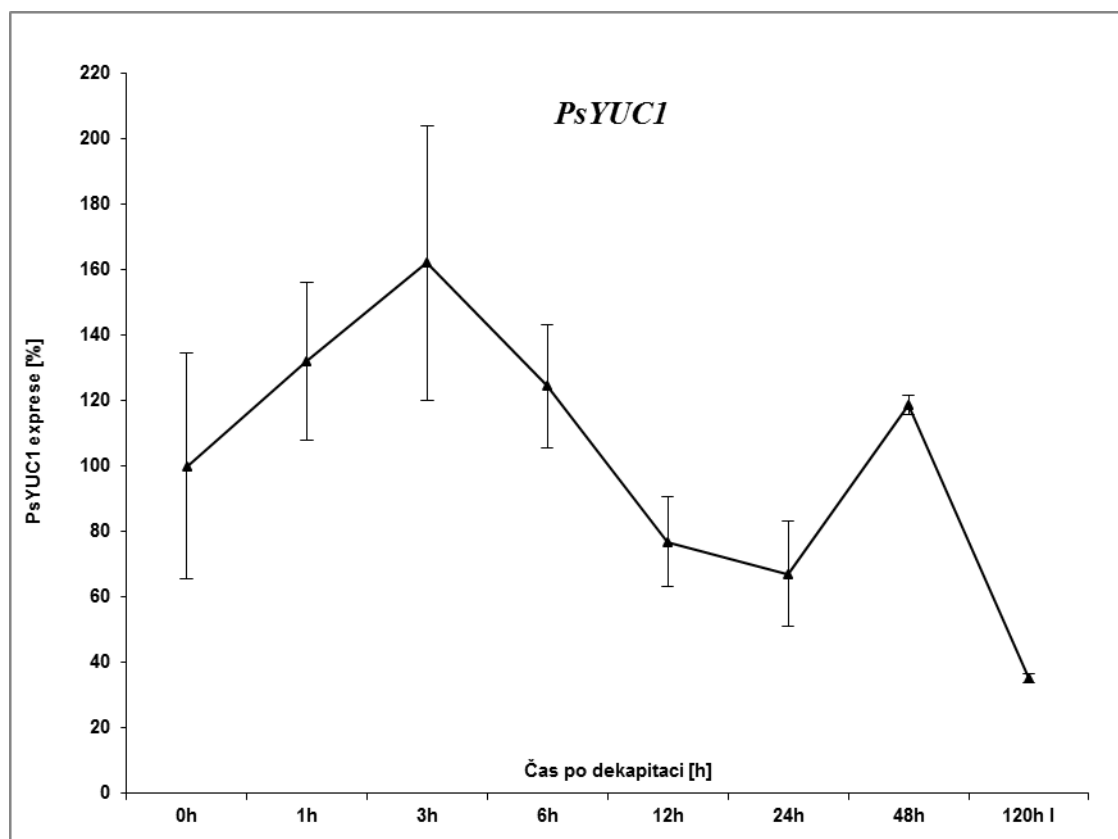
PsBRC1



Graf 2: Exprese genu *PsBRC1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.

Exprese genu *PsBRC1* se postupně snižovala od nulté hodiny. Ve třech hodinách od dekapitace a aplikace 0,5 % IAA pasty byla exprese snížena více jak o polovinu. Od dvanácté hodiny byl zaznamenán postupný nárůst exprese. Hodnoty ovšem zdaleka nedosáhly hodnot jako u kontrolní varianty času nula hodin.

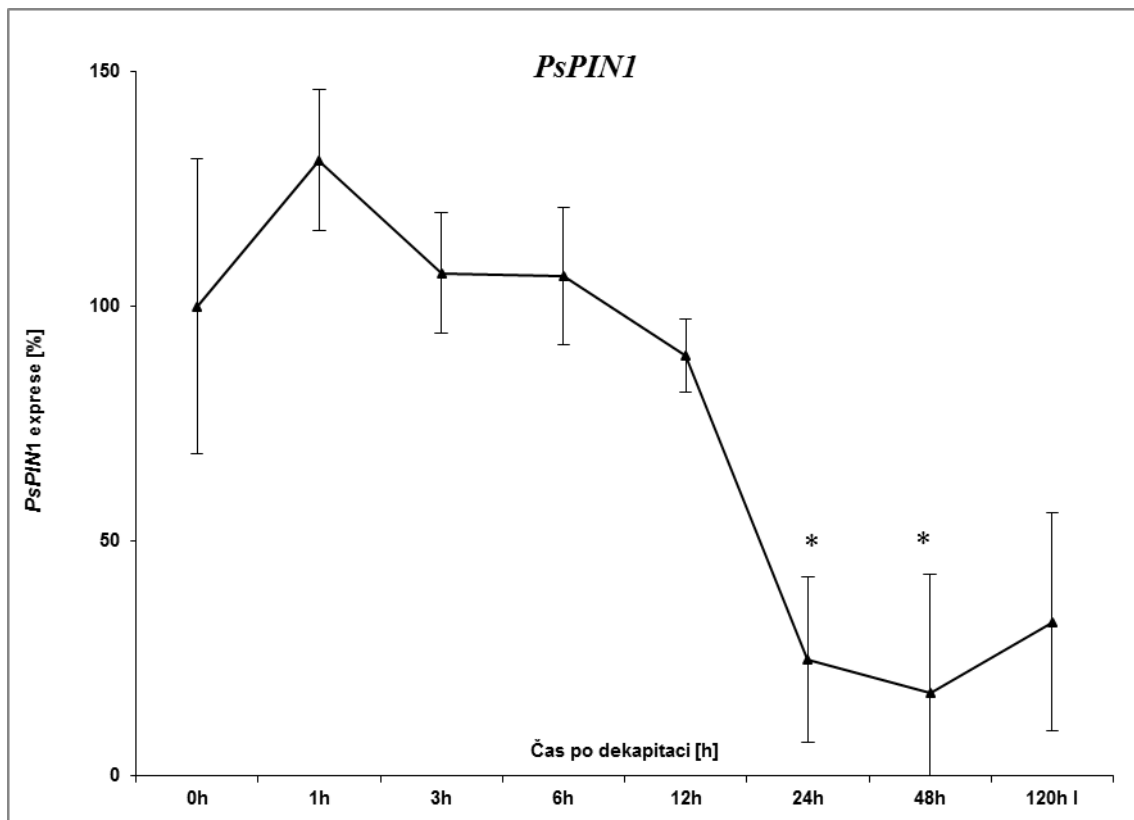
PsYUC1



Graf 3: Exprese genu *PsYUC1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.

Exprese genu *PsYUC1* se postupně zvyšovala až na maximum ve třech hodinách po dekapitaci a aplikaci 0,5 % IAA pasty. Od tří hodin exprese klesala. Slabý nárůst exprese byl ještě zaznamenán ve čtyřicetiosmi hodinách od dekapitace a aplikace auinové pasty. Následná exprese u stodvaceti hodin klesla více jak o polovinu.

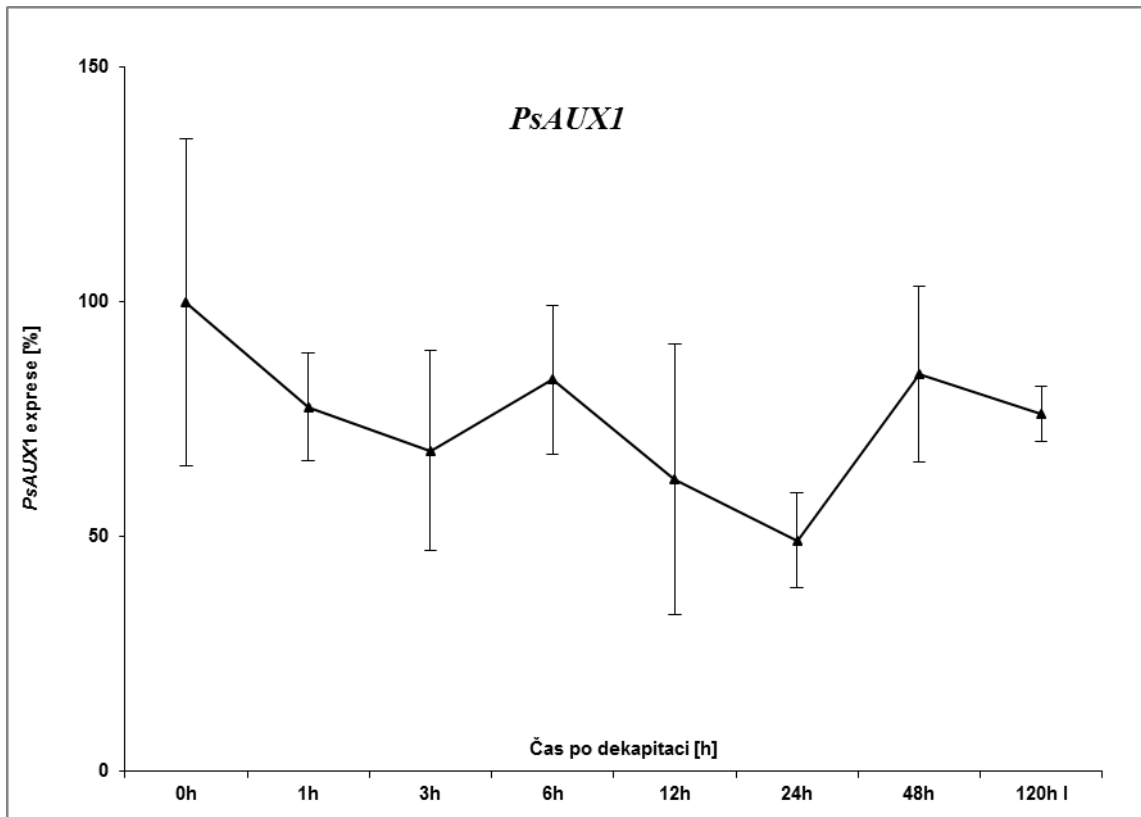
PsPIN1



Graf 4: Exprese genu *PsPIN1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.

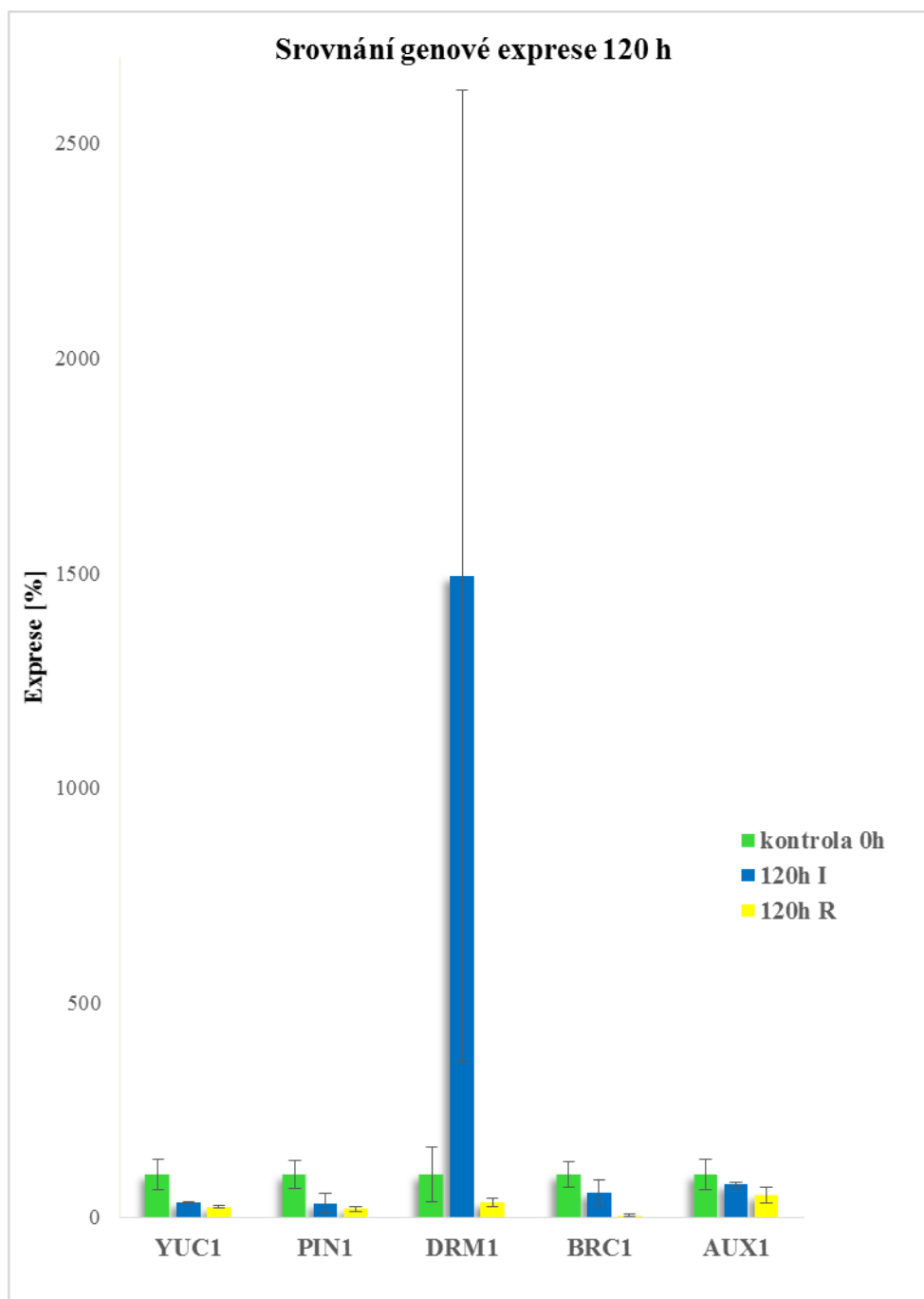
V kotylárních pupenech rostlin se exprese genu *PsPIN1* v první hodině po dekapitaci a nanesení 0,5 % IAA pasty zvýšila na maximální hodnotu. Od této hodiny se exprese postupně snižovala. Ovšem po dvanácté hodině exprese *PsPIN1* byla významně snížena.

PsAUX1



Graf 5: Exprese genu *PsAUX1* v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.

U genu *PsAUX1* všechny hodnoty nepředčily 100 % hodnoty zaznamenané u kontrolní varianty v čase nula hodin. Nebyl pozorovaný žádný trend.



Graf 6: Srovnání exprese genů 120 h po dekapitaci v inhibovaném a rostoucím výhonu.

Jelikož v průběhu experimentu nebyla provedena výměna 0,5 % IAA pasty na dekapitovaném stonkovém pahýlu, bylo provedeno srovnání exprese genů varianty kontroly (0 h), stále inhibovaného pupenu (120 h – I) a již vyrůstajícího pupenu (120 h – R) po pěti dnech od provedení experimentálního zásahu. Velké rozdíly

v expresích byly pozorovány u genu *PsDRM1* mezi stále inhibovanými a rostoucími pupeny. U varianty BRC1 byl rozdíl mezi 120 h-I a 120 h-R viditelný, ovšem nebyl tak velký jako v případě varianty DRM1. U genů *PsAUX1*, *PsYUC1* a *PsPIN1* nebyly významné rozdíly mezi expresemi u variant inhibovaného pupenu a rostoucího pupenu.

6 DISKUZE

Dekapitace růstového vrcholu má za následek uvolnění kotylárních pupenů z růstové inhibice. Formované výhony zpočátku rostou stejnoměrně, ovšem posléze jeden z nich přebere funkci hlavního růstového vrcholu. Zřejmě tato kompetice je zprostředkována kompeticí mezi auxinovými zdroji (Balla *et al.*, 2016). Růst kotylárních výhonů může být inhibován exogenní aplikací auxinu (Šebánek, 1975). Po aplikaci IAA na dekapitovaný stonkový pahýl byla pozorována výrazná inhibice růstu obou kotylárních pupenů. Po čtvrtém dni bylo ale pozorováno, že 88 % pupenů zůstává stále v inhibici, zatím co 12 % pupenů již vykazovalo mírný růst. Tato nedokonalá inhibice mohla být způsobena tím, že během experimentu nebyla vyměněna aplikovaná auxinová lanolinová pasta na dekapitovaném stonkovém pahýlu, a IAA díky fotodegradaci pomalu ztrácela svojí inhibiční funkci.

Hladina exprese genu *PsDRM1*, markeru dormance (Stafstrom *et al.*, 1998), v kotylárních pupenech po dekapitaci a aplikaci 0,5 % IAA pasty se snížila až na hodnoty okolo nuly v čase šesti hodin. Od dvanácté hodiny se exprese postupně zvyšovala. Maximálních hodnot dosahovala po stodvaceti hodinách od experimentálního zásahu. Jelikož gen *PsDRM1* patří mezi markery dormance, v experimentu, kde byla použita auxinová pasta, zpočátku měla exprese tohoto genu podobný trend jako u varianty pouze dekapitované. U této varianty exprese zůstala na nulové hodnotě minimálně do 48 hodin (Macoszek, 2016).

Hladina exprese genů *PsBRC1* v kotylárních pupenech po experimentálním zásahu se postupně snižovala od varianty kontroly (0 hodin). Ve třech hodinách byla exprese snížena téměř o 75 %. Od dvanácté hodiny byl zaznamenán postupný nárůst exprese. Při analýze exprese genu *PsBRC1*, který má roli při větvení stonku hrachu (Braun *et al.* 2012), v kotylárních pupenech u pouze dekapitovaného stonku byl zaznamenán podobný trend jako při aplikaci auxinové pasty. Exprese pomalu klesala, až se dostala po šesti hodinách na více jak o polovinu nižší hodnoty oproti nulté hodině. Následně se exprese mírně zvedla (Macoszek, 2016). Gen *PsBRC1* je rovněž jako *PsDRM1* řazen mezi markery dormance.

K iniciaci růstu pupene je potřebný export auxinu z pupene, k čemu slouží transmembránové přenašeče auxinu, a to vstupní přenašeč AUX1/LAX a výstupní přenašeč PIN1 (Balla *et al.* 2011, Balla *et al.* 2016).

V kotylárních pupenech se exprese genu *PsPIN1*, výstupního přenašeče auxinu (Gälweiler *et al.*, 1998), v první hodině po dekapitaci a nanesení 0,5 % IAA lanolinové pasty zvýšila na maximální hodnotu, poté se postupně snižovala. Po dvanácté hodině již byla výrazně snížena. Při samotné dekapitaci se exprese *PsPIN1* genu razantně zvýšila až o 170 % v první hodině a maximální exprese dosáhla v šesti hodinách od dekapitace. Posléze se exprese mírným klesáním vracela na původní úroveň (Macoszek, 2016).

Expresa *PsAUX1*, vstupního přenašeče auxinu (Balla *et al.*, 2016), po experimentálním zásahu v kotylárních pupenech nevykazovala žádný charakteristický trend na rozdíl od varianty pouze dekapitované, kde se exprese postupně zvyšovala až na maximum v šesti hodinách po dekapitaci, a poté klesala (Macoszek, 2016).

PsYUC1 gen je součástí biosyntézy auxinu *de novo*. Expresa genu *PsYUC1* se postupně u varianty dekapitovaného stonku s následnou aplikací 0,5 % IAA zvyšovala až na maximum ve třech hodinách. Od tří hodin exprese klesala. Expresa v čase stodvaceti hodin byla snížena více jak o polovinu. Při aplikaci 1 % IAA na dekapitovaný stonek byl zjištěn podobný trend exprese v druhých axilárních pupenech hrachu. Ovšem u varianty pouze s dekapitací stonku byl od třetí hodiny zaznamenán velký nárůst exprese. Maximální dosažená expresa byla ve dvanácté hodině po dekapitaci (Procházková, 2013).

Ze získaných výsledků je možné usuzovat, že dekapitace, přestože byla následně aplikovaná IAA na stonkový pahýl, aktivovala mechanismy související s vyrůstáním pupenů. Dočasné snížení exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1* a zvýšení exprese genů *PsYUC1* a *PsPIN1* dokládá tuto aktivaci. Naopak, následné zvýšení exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1* a snížení exprese genů *PsYUC1* a *PsPIN1* poukazuje na znovunastolenou a přetrvávající inhibici růstu kotylárních pupenů v důsledku naplnění stonkového transportního systému exogenně aplikovaným auxinem. Podle teorie kompetitivní kanalizace, pokud je auxin polárním transportem veden z aktivního rostoucího stonkového apexu nebo primárního externího zdroje, zabraňuje tak exportu auxinu z axilárního pupenu nebo jiného sekundárního zdroje (Balla *et al.*, 2011).

Dále, oslabení primárního toku auxinu např. fotodegradací auxinu umožňuje iniciaci exportu auxinu ze sekundárních zdrojů, jakými jsou i kotylární pupeny. Taková iniciace byla pozorována u 12 % kotylárních pupenů a byla doprovázena i sníženou expresí markerů dormance, genů *PsDRM1* a *PsBRC1*.

7 ZÁVĚR

Apikální dominance je fyziologický jev, při kterém stonkový apex inhibuje růst a vývoj axilárních pupenů. Pokud je vrchol odstraněn, postranní pupeny jsou uvolněny z této inhibice. Regulace apikální dominance se uplatňuje i v zahradnické praxi při tvarování okrasných a kulturních rostlin, dále při zvyšování výnosů.

V této diplomové práci byly získány expresní profily vybraných genů při vyrůstání kotylárních pupenů hrachu setého (*Pisum sativum* L.). Rostlina hrachu je vhodná jako modelová rostlina ke studiu apikální dominance, protože má silně vyvinutou apikální dominanci. Pro experimenty byly použity dekapitované rostliny s následnou aplikací 0,5 % IAA pasty na stonkový pahýl. Z takto ošetřených rostlin byly odebrány kotylární pupeny s časovým rozestupem 0, 1, 3, 6, 12, 24, 48, 120 hodin po třech biologických opakováních.

Z odebraných kotylárních pupenů byla izolována RNA. Po přepisu RNA do cDNA byly stanovány expresní profily následujících genů: *PsDRM1* (marker dormance), *PsBRC1* (gen kódující transkripční faktory s TCP (TB1 CYCLOIDEA PCF) doménou), *PsYUC1* (gen biosyntézy auxinu *de novo*), *PsPIN1* (gen výstupního přenašeče auxinu) a *PsAUX1* (gen vstupního přenašeče auxinu). Ze získaných výsledků je možné usuzovat, že dekapitace, přestože byla následně aplikovaná IAA na stonkový pahýl, aktivovala mechanismy související s vyrůstáním pupenů. Dočasné snížení exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1* a zvýšení exprese genů *PsYUC1* a *PsPIN1* dokládá tuto aktivaci. Naopak, následné zvýšení exprese genů *PsDRM1* a *PsBRC1* a snížení exprese genů *PsYUC1* a *PsPIN1* poukazuje na znovunastolenou a přetrvávající inhibici růstu kotylárních pupenů v důsledku naplnění stonkového transportního systému exogenně aplikovaným auxinem. Pokud stonkový transportní systém nebyl zcela naplněn, např. v důsledku fotodegradaci auxinu exogenně aplikovaného na stonkový pahýl, mohlo docházet k iniciaci exportu auxinu z kotylárních pupenů. Taková iniciace poté umožnila vyrůstání některých pupenů, což bylo doprovázeno i sníženou expresí merkerů dormance, genů *PsDRM1* a *PsBRC1*.

Výsledky experimentu dokazují klíčovou roli auxinu v regulaci apikální dominanci i ve vztahu ke kotylárním pupenům. Otázkou ovšem nadále zůstává role

auxinu v dělohách a jeho tok a kanalizace kolem kotylárního pupenu. Proto tedy bude potřeba udělat ještě velký kus práce v prozkoumání auxinového toku.

8 PŘEHLED POUŽITÉ LITERATURY

BALLA, J., KALOUSEK, P., REINÖHL, V., PROCHÁZKA, S., 2011: *Competitive canalization of PIN-dependent auxin flow from axillary buds controls pea bud outgrowth*. The plant journal, 65: 571-577.

BALLA J, MEDVEĐOVÁ Z, KALOUSEK P, MATIJEŠČUKOVÁ N, FRIML J, REINÖHL V, PROCHÁZKA S., 2016: *Auxin flow-mediated competition between axillary buds to restore apical dominance*.

BENNETT, M. J., MARCHANT, A., GREEN, H. G. MAY, S. T., WARD, S. P., MILLNER, P. A. *et al.*, 1996a: *Arabidopsis AUX1 gene: a permease-like regulator of root gravitropism*. Science, 273: 948-950.

BENNETT, M. J., MARCHANT, A., GREEN, H. G., MAY, S. T., WARD, S. P., MILLNER, P. A., WALKER, A. R., SCHULZ, B., FELDMANN, K. A., 1996b: *ARABIDOPSIS AUX1 GENE: A PERMEASE-LIKE REGULATOR OF ROOT GRAVITROPISM*. SCIENCE 273: 948-950.

BLAŽKOVÁ, J., KREKULE, J., MACHÁČKOVA, I., PROCHÁZKA, S., 1999: *Auxin and Cytokinins in the Control of Apical Dominance in Pea — A Differential Response Due to Bud Position*. Journal of Plant Physiology, Volume 154, Issue 5, Pages 691-696, ISSN 0176-1617

CLINE, M. G., 1991: *Apical dominance*. The botanical review, 57: 318-358.

COSGROVE, D.J., LI, L.C., CHO, H.T., HOFFMANN-BENNING, S., MOORE, R.C., BLECKER, D., 2002: *The Growing world of expansins*. Plant Cell Physiol.

DAVIES, P.J., 2004: *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!*. 3rd ed. Dordrecht: Springer, 750 s.

DE SMET, I., VOß, U., LAU, S., WILSON, M., SHAO, N., TIMME, R., *et al.*, 2011: *Unraveling the evolution of auxin signaling*. Plant Physiol., 155, 209-221.

DHARMASIRI, N., DHARMASIRI, S., WEIJERS, D., LECHNER, E., YAMADA, M., HOBBIE, L., EHRISMANN, J.S., JUERGENS, G., ESTELLE, M., 2005: *Plant development is regulated by a family of auxin receptor F box proteins*. Dev. Cell., 9: 109-119.

EVANS, M. L., 1985: *The action of auxin on plant cell elongation*. Critical Rev. Plant Sci., 2: 317-365.

GÄLWEILER, L., GUAN, C., MÜLLER, A., WISMAN, E., MENDGEN, K., YEPHREMOV A., *et al.*, 1998: *Regulation of polar auxin transport by AtPIN1 in Arabidopsis vascular tissue*. Science, 282: 2226-2230.

GOEBEL K., 1900: Beiträge zur Morphologie und Physiologie des Blattes, *Botanische Zeitung*, 38: 809.

GOLDSMITH, M. H. M., 1977: *Polar transport of auxin*. Annual Review of Plant Physiology, 28: 439-478.

HAGEN G., 2015: *Auxin signal transduction*. Essays Biochem. 2015;58:1-12. doi: 10.1042/bse0580001. Review. PubMed PMID: 26374883

KÖGL, F., HAAGEN-SMIT, A. J., ERXLEBEN, H., 1933: *Über ein Phytohormon der Zell-streckung. Reindarstellung des auxins aus menschlichem Harn*. Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem. 214:241-261.

LUSCHNIG, C., GAXIOLA, R. A., GRISAFI, P., FINK, G. R., 1998: *EIR1, a rootspecific protein involved in auxin transport, is required for gravitropism in Arabidopsis thaliana*. Genes and Development, 12: 2175-2187.

MACOSZEK, O., 2016: *Vliv transportu auxinu na regulaci vyrůstání kotylárních pupenů hrachu*. Diplomová práce, depozitní knihovna Mendelovy university v Brně Brno.

MASHIGUCHI, K., TANAKA, K., SAKAI, T., SUGAWARA, S., KAWAIDE, H., NATSUME, M., HANADA, A., YAENO, T., SHIRASU, K., YAO, H., *et al.* 2011: *The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108: 18512-18517.

MICHNIEWICZ, M., BREWER, P.B., FRIML, J., 2007: *Polar auxin transport and asymmetric auxin distribution*. The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists, 5:e0108. doi:10.1199/tab.0108.

MORRIS, D.A., THOMAS, A.G., 1978: *A microautoradiographic study of auxin transport in the stem of intact pea seedlings*. J. Exp. Bot., 29: 147-157.

MRAVEC, J., SKŮPA, P., BAILLY, A., HOYEROVÁ, K., KŘEČEK, P., BIELACH, A., PETRÁŠEK, J., ZHANG, J., GAYKOVA, V., STIERHOF, Y-D., *et al.*, 2009: *Subcellular homeostasis of phytohormone auxin is mediated by the ER-localized PIN5 transporter*. *Nature*, 459: 1136-1140.

MÜLLER, D., WALDIE, T., MIYAWAKI, K., TO, J. P., MELNYK, C. W., KIEBER, J. J., LEYSER, O., 2015: *Cytokinin is required for escape but not release from auxin mediated apical dominance*. *Plant J.*, 82: 874-886

MURPHY, A.S., HOOGNER, K.R., PEER, W.A., TAIZ, L., 2002: *Identification, purification, and molecular cloning of N-1-naphthylphthalamic acid-binding plasma membrane associated aminopeptidases from Arabidopsis*. *Plant Physiol.*, 128: 935-950.

NORMANLY, J., SLOVIN, J.P., COHEN, J.D., 2004: *Auxin Metabolism*. In *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action!*, 3rd ed., Dordrecht: Springer, 750 s.

NORMANLY, J., 2010: *Approaching cellular and molecular resolution of auxin biosynthesis and metabolism*. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 2:a001594.

OKADA, K., UEDA, J., KOMAKI, M.K., BELL, C.J., SHIMURA, Y., 1991: *Requirement of the auxin polar transport system in the early stages of Arabidopsis floral bud formation*. *Plant Cell*, 3: 677-68.

PARRY, G., DELBARRE, A., MARCHANT, A., SWARUP, R., NAPIER, R., PERROT-RECHENMANN, C., *et al.*, 2001: *Novel auxin transport inhibitors phenocopy the auxin influx carrier mutation aux1*. *The Plant Journal*, 25: 399-406.

PETRÁŠEK, J., FRIML, J., 2009: *Auxin transport routes in plant development*. *Development*, 136, 2675-2688.

PROCHÁZKA, S. & ŠEBÁNEK, J., 1997: *Regulátory rostlinného růstu*. Praha: Academia, ISBN 80-200-0597-8.

PROCHÁZKA, S., MACHÁČKOVÁ, I., KREKULE, J., ŠEBÁNEK, J., *et al.*, 1998: *Fyziologie rostlin*. Academia Praha, 484 s.

PROCHÁZKOVÁ, L., 2013: Analýza exprese biosyntetických genů auxinu při iniciaci růstu laterálních pupenů hrachu. Diplomová práce, depozitní knihovna Mendelovy university v Brně, Brno.

PSOTA, V & ŠEBÁNEK, J., 1993: *Za tajemstvím růstu rostlin: návody k experimentům*. Praha: Scienti, ISBN 80-7183-093-3.

RUBERY, P.H., SHELDRAKE, A.R., 1974: *Carrier-mediated auxin transport*. *Planta*, 118: 101-121.

RUBERY, P.H., 1990: *Phytotropins: Receptors and endogenous ligands*. *Symposia of the society for experimental biology*, 44: 119-46.

SWARUP, R., FRIML, J., MARCHANT, A., LJUNG, K., SANDBERG, G., PALME, K., *et al.*, 2001: *Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally*

distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex. Genes and Development, 15: 2648-2653.

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

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

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

ŠEBÁNEK, J., SLADKÝ, Z. & PROCHÁZKA, S., 1983: *Experimentální morfologie rostlin.* Praha: Academia. Metodické příručky experimentální botaniky.

TEPPER, H. B., 1993: *Developmental features accompanying the imposition and release of apical dominance in pea.* Journal of Plant Physiology., 142: 722-729.

TROMAS, A., RECHENMANN, C. P., 2010: *Recent progress in auxin biology.* Comptes Rendus Biologies, 333: 297-306.

VERRIER, P.J., BIRD, D., BURIA, B., DASSA, E., FORESTIER, C., GEISLER, M., KLEIN, M., KOLUKISA OGLU, U., LEE, Y., MARTINOIA, E., *et al.*, 2008: *Plant*

ABC proteins- a unified nomenclature and updated inventory. Trends Plant Sci., 13: 151-159.

VIETEN, A., VANNESTE, S., WISNIEWSKA, J., BENKOVÁ, E., BENJAMINS, R., BEECKMAN, T., LUSCHNIG, CH., FRIML, J., 2005a: *Functional redundancy of PIN protein is accompanied by auxin-independent cross-regulation of PIN expression.* Development 132: 4521-4531.

VIETEN, A., VANNESTE, S., WISNIEWSKA, J., BENKOVÁ, E., BENJAMINS, R., BEECKMAN, T., LUSCHNIG, C., FRIML, J., 2005b: *Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of PIN expression.* Development, 132: 4521-4531.

WENT, F. W., 1928: Rec. Trav. Bot. Neerl. 25:1-116.

WENT, F. W., 1936: Allgemeine Betrachtungen über das Auxinproblem. *Biologische Zeitblätter*, 56: 449-463.

WISNIEWSKA, J., XU, J., SEIFERTOVÁ, D., BREWER, P.B., RŮŽIČKA, K., BLILOU, I., ROUQUIÉ, D., BENKOVÁ, E., SCHERES, B., FRIML, J., 2006: *Polar PIN localization directs auxin flow in plants.* Science, 312, 883.

WOODWARD A. W., BARTEL B., 2005: *Auxin: regulation, action, and interaction.* Annals of Botany, 95, 707-735.

YANG, Y., HAMMES, U. Z., TAYLOR, C. G., SCHACHTMAN, D. P., NIELSEN, E., 2006: *High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein.* Current Biology, 16: 1123-1127.

YANG, H., MURPHY, A.S., 2009: *Functional expression and characterization of Arabidopsis ABCB, AUX 1 and PIN auxin transporters in Schizosaccharomyces pombe*. Plant J., 59: 179-191.

ZAŽÍMALOVÁ, E., MURPHY, A. S., YANG, H., HOYEROVÁ, K., HOSEK, P., 2010: *Auxin transporters: Why so many? Cold spring harbory perspectives in Biology* 2: A001552.

ZHAO, Y., 2010: *Auxin biosynthesis and its role in plant development*. Annu. Rev. Plant Biol., 61: 49-64.

9 SEZNAM OBRÁZKŮ,

Obr. 1: *Vývojová stádia apikální dominance. Upraveno podle Cline 1997.*

Obr. 2: *Vyrůstající axilární pupeny po dekapitaci vrcholu. Upraveno podle Procházka, Šebánek et al., 1997.*

Obr. 3: *Fototropizmus. Upraveno podle Procházka, Šebánek a kol., 1997.*

Obr. 4: *Gravitropizmus kořene. Upraveno podle Procházka, Šebánek a kol., 1997.*

Obr 5: *Struktury přirozených auxinů.*

Obr. 6: *Struktura vybraných syntetických auxinů.*

Obr. 7: *Schéma ARF a Aux/IAA interakce. Upraveno podle Hager, 2015.*

Obr. 8: *Model signalizace v buňce. Podle Hayashi 2012.*

Obr. 9: *Schéma chemiosmotického modelu. Upraveno podle Procházka et al. 1998.*

Obr. 10: *Transport auxinu. Podle Zažímalová 2010.*

Obr. 11: *Rostliny hrachu v perlitu.*

Obr. 12: *Schéma dekapitace rostliny a aplikace 0,5 % IAA.*

Obr. 13: *Pisum sativum L. kontrolní varianty v čase 0 hodin.*

Obr. 14: *Pisum sativum L. srovnání varianty kontroly (a) a varianty dekapitace s aplikovaným 0,5 % IAA (b).*

Obr. 15: *Pisum sativum L. s inhibovaným pupenem (120 h - I) a rostoupím pupenem (120 h - R).*

Obr. 16: *Termocykler - C1000TM Thermal Cycler/CFX96TM RealTime Systém (Bio-Rad, USA).*

Obr. 17: *Smektrofotometr - Picodrop Pico100 (Picodrop, Spojené království).*

Obr. 18: *Termocykler - T3 Thermocycler Biotron T3 Thermoblock (Biometra, Německo).*

Obr. 19: *Hlubokomrazící box.*

Obr. 20: *Nástroje používané k pipetování vzorků qPCR.*

10 SEZNAM TABULEK

Tab. 1: *Koncentrace RNA u 1.biologického opakování.*

Tab. 2: *Koncentrace RNA u 2.biologického opakování.*

Tab. 3: *Koncentrace RNA u 3.biologického opakování.*

Tab. 4: *Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce 1.biologického opakování.*

Tab. 5: *Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce 2.biologického opakování.*

Tab. 6: *Koncentrace RNA + přepočet objemu vstupující do reakce 3.biologického opakování.*

Tab. 7: *Složení reakční směsi pro první fázi RT.*

Tab. 8: *Složení reakční směsi pro druhou fázi RT.*

Tab. 9: *Složení reakční směsi pro qPCR (1 reakce)*

Tab. 10: *Seznam genů, primerů a podmínek jednotlivých qPCR reakcí.*

11 SEZNAM GRAFŮ

Graf 1: *Exprese genu PsDRM1 v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.*

Graf 2: *Exprese genu PsBRC1 v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.*

Graf 3: *Exprese genu PsYUC1 v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.*

Graf 4: *Exprese genu PsPIN1 v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.*

Graf 5: *Exprese genu PsAUX1 v kotylárních pupenech po dekapitaci rostliny.*

Graf 6: *Srovnání exprese genů 120 h po dekapitaci v inhibovaném a rostoucím výhonu.*

12 SEZNAM ZKRATEK

1-NOA:	Kyselina 1-naftoxyacetová
2-NOA:	Kyselina 2-naftoxyacetová
2,4-D:	2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina
2,4,5-T:	2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina
AUX1:	Protein přenášející auxin (vtok do buňky)
cDNA:	Komplementární deoxyribonukleová kyselina
Cl-IAA:	4-chlor-indolyl-ocotvá kyselina
DNA:	Deoxyribonukleová kyselina
IAA:	Indolyl-3-octová kyselina
IBA:	Indolyl-3-máselná kyselina
IPA:	Indolyl-3-propionová kyselina
LAX:	Proteiny umožňující buňce příjem auxinu (Like AUX1)
Lys:	Lysin
MCPA:	2-metyl-4-chlorfenoxyoctová kyselina
Met:	Methionin
NAA:	α -naftyloctová
NOA:	β -naftoxyoctová
PAA:	Kyselina fenylloctová
PIN:	Proteiny přenášející auxin (výtok z buňky)
qPCR:	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce
RNA:	Ribonukleová kyselina

RT: Reverzní transkripce
Thr: Threonin
TIBA: Kyselina 2,3,5-trijódbenzoová
Trp: Tryptofan

13 SEZNAM PŘÍLOH



Obr. 16: Termocykler - C1000™ Thermal Cycler/CFX96™ RealTime System (Bio-Rad, USA).



Obr. 17: Smektrofotometr - Picodrop Pico100 (Picodrop, Spojené království).



Obr. 18: Termocyklyer - T3 Thermocycler Biotron T3 Thermoblock (Biometra, Německo).



Obr. 19: Hlubokomrazicí box.



Obr. 20: Nástroje používané k pipetování vzorků qPCR.