



Středoškolská technika 2016

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

INTERAKCE MODRÉHO SVĚTLA A HORMONU AUXINU V RŮSTU ROSTLIN

Tereza Kozáková

První soukromé jazykové gymnázium v Hradci Králové

Brandlova 875, Hradec Králové 3

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu RNDr. Michalu Hruškovi, svému vedoucímu práce na naší škole, za jeho dohled nade mnou. Dále jsem velmi vděčná panu Doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., za vedení mého výzkumu, trpělivost a ochotu při zaučování v prostorách Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého a jeho kolegům, kteří se na mé práci také podíleli. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat i rodičům za jejich neustálou podporu při práci a hlavně při dojíždění do Olomouce. Velké díky si zaslouží i Dagmar Pěnkavová za její neskutečnou ochotu pomoci s vyhotovením této práce.

V Hradci Králové dne 29. ledna 2016

Tereza Kozáková

Anotace práce v českém jazyce

KOZÁKOVÁ, T. *Interakce modrého světla a hormonu auxinu v růstu rostlin*. Hradec Králové, 2016. Práce soutěže SOČ. Vedoucí práce RNDr. Michal Hruška, odborný konzultant Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

Projekt zkoumá růstové reakce rostlin rajčete k syntetickému auxinu 2,4-D v závislosti na světelných podnětech. Teoretická část objasňuje pojmy týkající se tématu, jako například fotomorfogeneze a auxiny.

Je známo, že určité části světelného spektra ovlivňují růst rostliny více než jiné. Předmětem zkoumání byl vliv modrého a červeného světelného spektra a prostředí totální tmy na růst rostlin po aplikování kyseliny dichlorfenoxyoctové (2,4-D), tj. chlororganického selektivního herbicidu, a také syntetického auxinu. Fytohormon auxin byl aplikován v pěti různých koncentracích na dva genotypy rostlin - kontrolní genotyp rajčete kultivar GT a mutant *tri1*. Experimenty byly prováděny v Laboratoři růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty UP v Olomouci pro oba genotypy třikrát a celý výzkum tak trval necelé dva měsíce. V první fázi se nechalo naklíčit 300 semenek od každého genotypu na základním MS mediu, poté byla naklíčená semínka transferována na medium se syntetickým auxinem 2,4-D o pěti odlišných koncentracích a následně po dobu jednoho týdne rostlinky rostly ve třech různých světelných prostředích v automatických růstových komorách (červené a modré světlo a tma).

Byly prokázány odlišné vlivy frakcí světelného spektra na růstové reakce rostlin k exogennímu auxinu a bylo potvrzeno inhibiční působení narůstajícího množství auxinu na rostlinu ve všech těchto světelných spektrech.

Klíčová slova:

fytohormon, auxin, hypokotyl, červené a modré záření, fotomorfogeneze, růst, *Solanum lycopersicum*

Annotation

KOZÁKOVÁ, T. *Interaction of blue light and auxin hormone in plant's growth*. Hradec Králové, 2016. Project of the SOČ competition. Project Supervisor RNDr. Michal Hruška and Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D., also the external consultant.

The project focuses on the growth reaction of tomato plants to synthetic auxin 2,4-D depending on the light stimuli. The first part explains terms used in this work such as photomorphogenesis or auxins for instance.

It is known that certain types of light spectrum stimulate plant's growth more than the others. The project researches the influence of red and blue light spectrum and of total darkness on plant's growth after application of dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), i.e. chlororganic selective herbicide and synthetic phytohormone auxin. The auxin was applied on two genotypes - control genotype of tomato cultivar GT and mutant *tri1* - in five different concentrations. Experiments took place in Laboratory of growth regulators at Faculty of Science, University of Palacký in Olomouc and were repeated three-times for both genotypes and thus the research lasted for nearly two months. In the first part about 300 seeds of each genotype germinated on basic MS medium, so far without auxin, after a few days the sprouts were transferred on medium with synthetic 2,4-D auxin applied in five different concentrations and for the last part the sprouts grew for one-week time in automatic growth boxes (under blue light, red light and in total darkness).

Different effects of fractions of light spectrum on plant's growth reactions to exogenous auxin were proven and inhibitory effect of increasing quantity of applied auxin was confirmed in all spectrums.

Keywords:

phytohormone, auxin, red and blue radiation, photomorphogenesis, hypocotyl, growth,
Solanum lycopersicum

Obsah

Úvod.....	7
1 Teoretická část práce.....	8
1.1 Růst a vývoj rostlin.....	8
1.2 Regulátory rostlinného růstu.....	8
1.2.1 Aplikace růstových regulátorů.....	9
1.2.2 Fytohormony	9
1.2.3 Syntetické rostlinné regulátory	10
1.2.4 Podstata účinku rostlinných hormonů	10
1.3 Auxiny	11
1.3.1 Objev auxinu.....	11
1.3.2 Nativní auxiny	11
1.3.3 Syntetické regulátory růstu s účinky auxinu.....	12
1.3.4 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (auxin 2,4-D).....	12
1.3.5 Možnosti využití auxinů v rostlinné výrobě	12
1.4 Fotomorfogeneze	13
1.5 Světlo	14
1.6 Absorpce světla.....	14
1.7 Fotoreceptory	15
1.7.1 Fytochrom - receptor červeného záření	15
1.7.2 Kryptochrom - receptor modrého záření	16
1.7.3 Fototropiny	17
2 Praktická část práce	18
2.1 Materiál a metodika	18
2.2 Postupy jednotlivých fází experimentu	18
2.2.1 Postup při přípravě MS media	18
2.2.2 Postup vysévání semínek - 1. fáze.....	19
2.2.3 Postup při přenosu klíčících rostlinek na auxin - 2. fáze.....	21
2.2.4 Postup při měření kořenů a hypokotylů rostlinek - 3. fáze.....	22
2.3 Hypotéza.....	23
2.4 Výsledky	24
2.4.1 Výsledky hypokotylu.....	24
2.4.2 Výsledky kořene	26

Diskuse	28
Závěr	29
Seznam použité literatury	30
Knižní zdroje	30
Elektronické zdroje	30
Citace obrázků	32
Seznam obrázků, grafů a tabulek	33
Obrázky	33
Grafy	33
Tabulky	34

Úvod

Hlavní motivací k práci na tomto projektu byl můj zájem o biologii a práci na odborném pracovišti, v nějaké laboratoři. K výběru tohoto tématu došlo díky internetové stránce www.badatel.upol.cz Univerzity Palackého v Olomouci (UPOL), kde byl uveden výzkumný projekt z oblasti fyziologie rostlin pod vedením pana Doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D, a jeho týmu.

V teoretické části jde především o podání hlubších informací o fytohormonech, vztazích, souvislostech a dějích probíhajících v rostlinách, se kterými jsem se během vypracovávání praktické části setkala.

Praktická část se zaměřuje na výzkum, který jsem prováděla na Přírodovědecké fakultě Univerzity Palackého v Olomouci v Laboratoři růstových regulátorů, v prostorách Skupiny molekulární fyziologie. Obsahuje postupy vypracování jednotlivých částí, ze kterých se experiment skládal. Pro lepší pochopení celého pokusu jsou uvedeny ilustrační fotografie.

Vedlejším, ale pro mě neméně důležitým přínosem, kromě nových znalostí, byly zkušenosti s prací v laboratoři pod vedením zkušených lidí z oboru. Tyto zkušenosti by mi mohly výrazně pomoci při volbě mého dalšího zaměření. Myslím, že pro mě bylo velmi motivující být členem výzkumného týmu a de facto patřit po dobu práce mezi vysokoškolské studenty, stýkat se s nimi například v laboratoři a pracovat jako jedna z nich.

Cílem projektu je zjistit, jak světlo ovlivňuje citlivost hypokotylu k exogennímu auxinu 2,4-D a dále, jaká je role fytochromu B1 v citlivosti rostlin.

1 Teoretická část práce

1.1 Růst a vývoj rostlin

Růst rostlin je zpravidla definován jako ireverzibilní změna jejich velikosti. Často se u něho zdůrazňuje jeho kvantitativní stránka. Avšak růst je těsně spjat s diferenciací, tedy se změnami kvalitativními, které můžeme označit pojmem „vývoj“. Regulace rostlinného růstu i látek s ním spojených, označovaných jako regulátory rostlinného růstu, nemá tedy vztah pouze k růstu, ale i k vývoji rostlin.

Růst a vývoj rostlin byl dlouho spojován jen s vlivy trofickými (spojenými s výživou), avšak již od roku 1880 vyslovil německý botanik Julius Sachs, žák Jana Evangelisty Purkyně, hypotézu, že se v rostlinách tvoří specifické orgánovorné látky - morfogeny. Domníval se, že jedna látka způsobuje růst stonku a jiné růst listu, kořene nebo květu. Takové specifické organogenní látky však nikdy nebyly u rostlin identifikovány. Teprve koncem dvacátých let dvacátého století byl výzkum růstové fyziologie rostlin obrácen k tzv. růstovým látkám (Went, 1928), záhy označovaným jako rostlinné hormony (fytohormony).

Hormony jako látky schopné regulovat růst byly totiž již v roce 1904 objeveny v lidském těle zásluhou geniálního fyziologa Starlinga. I když rostlina nemá žlázy s vnitřní sekrecí obdobné žlázám živočišným, došlo po objevu rostlinných růstových látek záhy k formulaci hypotézy o existenci hormonů rostlin (fytohormonů). O jejich objev a počáteční výzkum se nejvíce zasloužila holandská fyziologická škola F. W. Went (1928), dále Američané F. Skoog¹ a K. V. Thimann (1934), R. Snow (1932), organický chemik F. Kögl (1932), botanici H. Söding (1932), F. Laibach (1934), H. Fitting (1936) a další. K objevu fytohormonů jako přirozených regulátorů rostlinného růstu přispěla i česká botanická škola profesorů Bohumila Němce a Rudolfa Dostála. První k němu přispěl výzkumem regenerace a bakteriálních „látek růstových“ (Němec 1930), druhý soustavným výzkumem korelací rostlinného růstu za použití experimentálně morfologických přístupů (Dostál 1926, 1930) (Procházka a kol., 1997).

1.2 Regulátory rostlinného růstu

Růstové regulátory se rozlišují podle toho, zda jsou tzv. přirozené (nativní), tj. zda si je rostlina syntetizuje sama, nebo to jsou látky na rostlinu aplikované. Tyto nativní (přirozené) regulátory se označují jako fytohormony. Regulátory, které si rostlina nedokáže vytvořit, se nazývají syntetické. Ty jsou syntetizovány organickými chemiky. Jedná se například o kyselinu dichlorfenoxycetovou (2,4-D) nebo kyselinu α -naftyloctovou (NAA). Samotný obecný název *růstové regulátory* však zahrnuje obě tyto skupiny.

Ve starších zdrojích byly tyto látky rozděleny ještě na látky stimulující růst a látky, které růst naopak inhibují. Dnes už toto rozdělení není možné, protože je známo, že tyto látky mohou v jisté koncentraci působit stimulačně, v jiné zase inhibičně. Také se ví, že efekt regulačních látek závisí také na dalších aspektech, jako například na konkrétním typu genotypu, stáří a fyziologickém stavu rostliny (Procházka, Macháčková a kolektiv, 1998).

¹ F. Skoog spolu s Murashigem vytvořili medium (zkráceně MS medium, Murashige and Skoog, 1962), které bylo při výzkumu použito

1.2.1 Aplikace růstových regulátorů

Regulační aktivity endogenních látek se obvykle testují jako účinek její aplikace. Látky aplikované na rostlinu externě jí nemusí být přijaty a metabolizovány jako látky endogenní. Systémy, na kterých se působení těchto růstově regulačních látek zkoumá, jsou zpravidla části rostlin: koleoptile, listy nebo dokonce pouze jejich části atd., které na aplikaci daných látek výrazně reagují. Nelze ale opomenout, že při těchto experimentech jsou segmenty odňaty ze vzájemných vlivů mezi nimi a ostatními částmi rostliny a stejně tak testované regulátory z interakce s ostatními růstově regulačními látkami.

Je velmi pravděpodobné, že odlišné typy buněk budou reagovat na jednu a tu samou látku jinak. Stává se tak nutností pohlížet na reakci rostlinných orgánů či rostliny samotné k některé z látek jako na souhrn reakcí individuálních pletiv až buněk.

1.2.2 Fytohormony

Kincl spolu s Faustusem (1978) tvrdí, že každá rostlina vytváří fytohormony jak stimulační, tak inhibiční růst svých orgánů. Ty jsou následně ještě s podmínkami prostředí, ve kterém se rostlina nachází, nezbytné k dosažení harmonické celistvosti rostlinného těla.

Většina rostlinných fyziologů přijímá stejnou definici jako pro hormony živočišné: rostlinný hormon je organická sloučenina syntetizovaná v jedné části rostliny a translokovaná do části jiné, kde fyziologickou reakci vyvolávají velmi malé dávky. Od živočišných se ale odlišují v mnoha aspektech - například, že rostliny nemají specifické žlázy s vnitřní sekrecí (jak již bylo výše zmíněno), které by hormony vytvářely, a většina fytohormonů je syntetizována na více než jednom místě v rostlině. Závislost účinku fytohormonu na jeho koncentraci není tak zřejmá, jako je tomu u živočišných hormonů, a proto může jeho vliv kolísat mezi stimulací a inhibiční růstové reakce.

Dá se tedy konstatovat, že fytohormony jsou mnohem méně specifické než ty živočišné. Tato fakta vystihuje definice rostlinných hormonů podle Pavlové a Fischera (2011), která zní takto: „*Fytohormony jsou definovány jako obecně se vyskytující, přirozené, organické, většinou nízkomolekulární metabolity, které ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až $10^{-9}M$, nižších než živiny a vitaminy) ovlivňují životní procesy rostlin. Slouží k endogenní signalizaci mezi buňkami, pletivy a orgány v rostlině.*“

Pavlová s Fischerem dále uvádějí, že k syntetizaci jednoho určitého typu fytohormonu může docházet v různých pletivech a jeho signál může být interpretován, jak v jiných rostlinných orgánech (parakrinní signál), tak i pletivem, ve kterém byl fytohormon původně syntetizován (autokrinní signál). K transportu fytohormonů na krátkou vzdálenost dochází zejména buněčným neboli membránovým přenosem, na vzdálenosti delší pasivně vodivými pletivy. Pokud se jedná o těkavé látky, tak jsou transportovány plynnou fází.

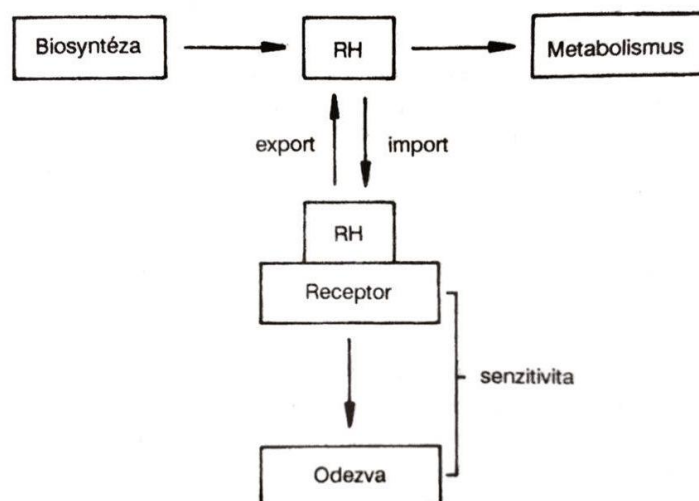
Na základě jistých spojitostí s působením živočišných hormonů se utvořilo pět základních skupin endogenních růstových regulátorů považovaných za fytohormony: auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová a etylen. Mimo ně ale existují v rostlinách jiné skupiny hormonů. Jedná se zejména o brassinosteroidy, kyselinu jasmonovou ($C_{12}H_{18}O_3$), kyselinu salicylovou, strigolaktony. Dalšími látkami, které regulují růst a neřadíme je mezi fytohormony, jsou například polyaminy, oligosacharidy a velká skupina fenolických látek.

1.2.3 Syntetické rostlinné regulátory

Jak již bylo výše zmíněno, jedná se o chemicky připravené látky strukturně se podobající fytohormonům. Když jsou na rostliny aplikovány, váží se na receptory nativních regulátorů a simulují jejich signál. V rostlině jsou obvykle stabilnější než přirozené metabolity a jejich koncentrace v rostlině může dosahovat podstatně vyšších hodnot než koncentrace samotných fytohormonů. Jejich efekty mohou být farmakologické a nemusí nutně vyvolávat přirozené fyziologické účinky fytohormonů. Další látky mohou vyvolat růstové i vývojové reakce tím, že nějakým určitým způsobem zasahují do signálního systému fytohormonů, a to například tak, že ovlivňují jejich transport v rostlině (např. kyselina trijodobenzoová neboli TIBA blokuje transport auxinu). Tyto látky vyvolají růstové a vývojové efekty a spolu s fytohormony se označují jako růstové látky, růstové regulátory nebo morforegulátory. (Pavlová a Fischer, 2011)

1.2.4 Podstata účinku rostlinných hormonů

Z výzkumu zákonitostí růstu a vývoje rostlin vyplývá, že v těchto procesech hrají významnou roli fytohormony a jejich interakce. Jak ve své knize uvádí Procházka a kol. (1997), „neexistuje růstový proces, který by byl ovlivňován (regulován) pouze jedním fytohormonem, a na druhé straně neexistuje fytohormon, který by ovlivňoval pouze jediný růstový proces. Tento pleiotropní účinek fytohormonů lze uvažovat jako následek interakcí dvou, resp. tří složek (viz obrázek níže). Hlavní složkou je počet aktivních molekul fytohormonu spojených s místem jejich účinku v buňce. Tato hodnota závisí na biosyntéze a metabolismu fytohormonů i na regulaci jejich importu a exportu (tj. transportu). Druhou složkou je senzitivita buněk k endogenním fytohormonům. Může být přesněji definována jako počet receptorů (vazebných míst) pro hormony a jejich afinita k fytohormonům.“



Obrázek 1 - Faktory ovlivňující účinek rostlinných hormonů (Procházka a kol., 1997)

Účinku samotnému musí vždy na prvním místě předcházet vazba na receptor (všechny doposud popsané receptory jsou bílkoviny). Samotný hormon se naváže na receptor umístěný většinou na plazmatické membráně a signál je pak dále do buňky vysílán *systemem druhých posílů* (second messenger; zesilovačů) nebo hormon pronikne do buňky a váže se na rozpustný receptor v cytoplasmě nebo v jádře.

Mezi druhé posly patří například cyklický adenosinfosfát (cAMP) či inozitoltrifosfát (IP₃). Ty přenáší signál dál do nitra buněk. Schopnost přenosu signálu je zatím prokázána u IP₃. U bílkovin bylo prokázáno, že umí vázat fytohormony.

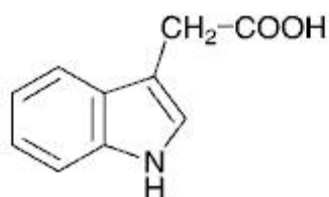
1.3 Auxiny

1.3.1 Objev auxinu

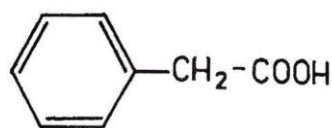
Auxin je vůbec nejdéle známým rostlinným hormonem - jeho existence byla prokázána již ve dvacátých letech minulého století, jak uvádí Procházka a kol. (1997). Objev auxinu vyšel ze studia fototropismu a gravitropismu, které započal sám slavný autor evoluční teorie Charles Darwin. Podstatu tohoto jevu se podařilo objasnit F. W. Wentovi v letech 1926-28 po té, co tento fytohormon 17. 4. 1996 objevil při práci s koleoptilemi ovsa, u nichž prokázal, že jejich špičky produkují látku, která difunduje do agaru a stimuluje růst. Díky této schopnosti dostal auxin své jméno; v řečtině *auxein* znamená růst, zvětšovat se. Identifikace této látky však nebyla jednoduchá. Při hledání zdrojů látek aktivních v ovesném koleoptilovém testu získal Kögl v roce 1933 z lidské moči aktivní látku, z nichž jedna, pojmenovaná heteroauxin, byla identifikována jako kyselina indolyl-3-octová (IAA, z angl. *indole-3-acetic acid*). Tato kyselina byla též nalezena v kvasinkách a v houbě *Rhizopus suinus* a teprve roku 1946 ve vyšší rostlině, a to v nezralých obilkách kukuřice. Od té doby byl výskyt kyseliny indolyl-3-octové (IAA) potvrzen v celé škále druhů vyšších rostlin, bakterií, hub i řas.

1.3.2 Nativní auxiny

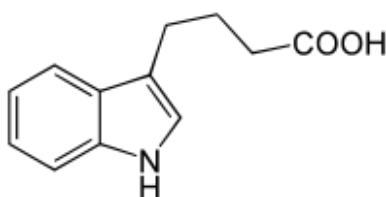
Přirozené auxiny představuje malá skupina strukturně podobných látek: již zmiňovaná IAA, kyselina indolyl-3-másečná (IBA, z angl. *indole-3-butyric acid*), kyselina 4-chlor-indolyl-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenyloctová (PAA, z angl. *phenylacetic acid*). Poslední kyselina se ale nenachází ve všech rostlinách, nejvíce jí můžeme nalézt v plodech ovocných stromů. Vyskytuje se v řádově vyšších koncentracích a její účinnost je podstatně nižší než účinnost IAA.



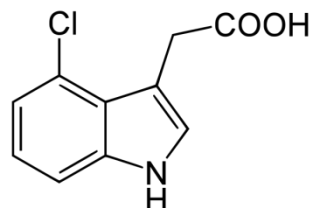
Obrázek 4 - chemický vzorec IAA
(Leporelo.info)



Obrázek 5 - chemický vzorec PAA
(Procházka a kol. 1997)



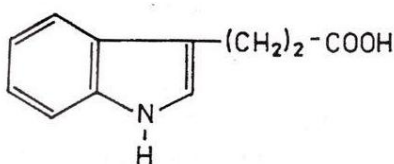
Obrázek 2 - chemický vzorec IBA
(Wikipedia.org, 2016)



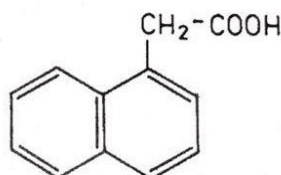
Obrázek 3 - chemický vzorec 4-Cl-IAA
(Wikimedia.org, 2016)

1.3.3 Syntetické regulátory růstu s účinky auxinu

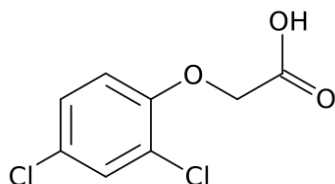
Při výzkumech za účelem objevit látky s růstově regulačním účinkem bylo nalezeno mnoho syntetických látek, jejichž účinky jsou podobné těm, které má IAA, jinými slovy *syntetické auxiny*. Společným znakem pro tyto látky je aromatický kruhový systém (s výjimkou alkyliokarbamátů), v jehož postranním řetězci v určité vzdálenosti od něj je umístěna karboxylová skupina (nebo skupina na karboxylovou snadno převeditelná). Všechny dosud známé syntetické auxiny jsou slabé organické kyseliny (viz níže).



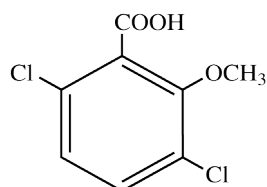
Obrázek 7 - chemický vzorec IPA
(Procházka a kol. 1997)



Obrázek 6 - chemický vzorec NAA
(Procházka a kol. 1997)



Obrázek 9 - chemický vzorec 2,4-D
(Profiplants.cz)



Obrázek 8 - chemický vzorec látky dicamba
(Ellotus.com)

1.3.4 Kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (auxin 2,4-D)

Čistá kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D) je bílá krystalická látka, téměř bez zápachu. Její Mr (relativní molekulová hmotnost) je 221, bod tání 138-141°C a bod varu 160°C. Je dobře rozpustná v alkoholu, acetonu, éteru i dalších organických rozpouštědlech. Špatně se rozpouští ve vodě a minerálních olejích. Pod vlivem ultrafialového záření se rozkládá. Komerční přípravky obsahující 2,4-D mají typický nepříjemný zápach, který získává od přimíšených, nezreagovaných chlorovaných fenolů.

Sodná sůl kyseliny 2,4-D je také bílá krystalická látka, která krystalizuje z vody jako monohydrát, o krystalovou vodu přichází při teplotách nad 105°C a taje při 215-218°C. Dobře se rozpouští v H₂O a částečně v metanolu.

Mimo soli sodné, draselné a amonné lze připravit také soli amoniové a alkanolamoniové. Ty lépe pronikají do listů rostlin, a tudíž mají rychlejší herbicidní účinek.

1.3.5 Možnosti využití auxinů v rostlinné výrobě

V praxi se většinou používají auxiny syntetické, IAA je pro praktické účely příliš nestálá. Dříve bylo významným využitím auxinů jejich použití jako herbicidů (2,4-D, MCPA), v dnešní době je toto z důvodu jejich toxicity pro živočichy zakázáno. Jak tvrdí Procházka a kol. (1997), svou roli ale auxiny hrají v zahradnictví, kde se využívají ke *stimulaci zakořeňování řízků*. Aplikací vysokých koncentrací auxinů lze vykonat probírku květů při vysokém nasazení. Auxiny spolu s cytokininy tvoří základní složku médií pro explantátové kultury (Procházka a kol., 1998).

1.4 Fotomorfogeneze

Světlo je pro rostlinu nesmírně důležité nejen jako zdroj energie, ale také jako zdroj podnětů, které ovlivňují její růst a vývoj. Je činitelem fotomorfogeneze. Přesnou definici ve své knize uvádí Pavlová (1996) takto: „*Fotomorfogeneze je soubor reakcí, jimiž rostlina podle světelných podmínek prostředí utváří svou vnější podobu i vnitřní strukturu, reguluje svůj metabolismus, ontogenezi i pohyby.*“ Obecně se tedy dá říct, že pojem *fotomorfogeneze* zahrnuje veškeré projevy růstu a vývoje závislé na viditelném záření. Obvykle se do této oblasti řadí děje zprostředkované specializovanými receptory záření a hlavně fytochromy, které jsou dosud nejlépe prozkoumány. Tím je myšlena například deetiolizace, což je reakce, při které rostlina po přechodu z tmy na světlo začíná nebo obnovuje fotosyntetický proces (Sedlecký, 2010). Dalším příkladem mohou být morfogenetické reakce na zastínění či naopak silné ozáření a klíčené závislé na záření.

Obecně mají fotomorfogenetické procesy 3 fáze:

1. **fotorecepce** = příjem světelného signálu = pohlcení (absorpce) fotonu (světelného kvanta) receptní molekulou – **fotosenzorem (fotoreceptorem)**
2. **transdukce signálu** = přenos signálu = přeměna světelného signálu v signál biologický. Transdukce je zatím neznámý biofyzikálně biochemický proces. V této fázi se také předpokládá **amplifikace** (zesílení) signálu
3. **interpretace** = vlastní reakce organismu na přijatý světelný signál. V organismu proběhnou takové změny metabolismu a struktury, které vedou ke stavu optimálně odpovídajícímu daným podmínkám.

Fotomorfogeneze v tomto pojetí významem odpovídá termínu percepce světla. Samotný pojem fotomorfogeneze zdůrazňuje konečný výsledek reakce na světelné podmínky, kterým jsou zpravidla změny externího vzhledu rostliny. Percepce světla je reakce na světelný podnět jako taková, bez ohledu na charakter jejího výsledku nebo zdůraznění nějaké její fáze.

Světelnými podmínkami se myslí:

kvalita světla - zastoupení jednotlivých vlnových délek v záření

kvantita světla - množství zářivé energie dopadající na jednotkovou plochu za jednotku času nebo celkové množství, které dopadne za určité

doba působení světla - délka období světla i jeho časové umístění vzhledem k období tmy

Morfogenně účinné světlo je červené a dlouhovlnné červené (R a FR) a modré (B), morfogenní efekty má dále i blízké ultrafialové (UV-A, UV-B) záření. V poslední době byly přineseny důkazy, že fyziologické účinky má i světlo zelené (Folta a Maruhnich, 2007). Senzitivita a schopnost k odpovědi na světelné signály závisí na genotypu rostliny a na fyziologickém stavu orgánu, který světelný podnět přijímá, i orgánu, který na světelný signál reaguje.

Jak již bylo výše zmíněno, samotný pojem fotomorfogeneze zahrnuje soubor více reakcí. Ty můžeme rozřadit do dvou skupin: reakcí pohybových (fototaxe, fototropismy a fotonastie), které jsou pouze přechodného (modulačního) charakteru, a reakcí fotoperiodických, které poukazují na délku trvání světla a mají vývojový charakter.

Tvrzení z 60. a 70. let minulého století se opírají o to, že fotomorfogenetické reakce jsou nezávislé na fotosyntéze. Tato definice ale není aplikovatelná obecně; platí pouze na některé fenomény ve fotoperiodismu. Opak je pravdou, „*vztah fotomorfogenetických a fotosyntetických procesů je velmi těsný*“, (Pavlová, 1996).

1.5 Světlo

Světlo je obecně chápáno jako záření, které člověk dokáže vnímat okem (viditelná radiace). Fyzikální definice zní, že světlo je elektromagnetické vlnění korpuskulární povahy. Vyzařování, šíření a pohlcování světla není plynulé, probíhá v malých diskretních jednotkách, které se nazývají fotony. Energie obsažená v jednom fotonu je světelné kvantum. Množství energie v jednom fotonu je závislé na vlastnostech vlnění. (Pavlová, 1996)

Vlnění lze charakterizovat frekvencí (dříve užíván termín kmitočet), která se obvykle značí písmenem f nebo řeckým písmenem ν a označuje počet cyklů za 1 s, nebo vlnovou délkou (značí se obvykle λ), která označuje vzdálenost mezi dvěma po sobě následujícími body, které jsou ve stejné fázi cyklu, např. vzdálenost mezi dvěma maximy; udává se v nm ($\text{nm} = 10^{-9}$).

O vztahu těchto veličin platí:

$$f = \frac{c}{\lambda}$$

$$c = \text{rychlost světla} = 3 \cdot 10^8 \frac{\text{m}}{\text{s}}$$

Fyziologické reakce u rostlin vyvolává radiace v rozmezí zhruba 280-800 nm, proto se ve fotomorfogenezi pod pojmem *světlo* rozumí záření v tomto rozsahu.

1.6 Absorpce světla

Záření, které dopadá na hmotu, se z části odráží, z části je propuštěno a zbytek se absorbuje (pohlcuje). Absorpce fotonu je pro fotomorfogenetickou reakci nezbytná.

Samotná absorpce fotonu znamená, že jeho energie je jako celek předána jednomu elektronu z elektronového obalu (v případě prvku) nebo molekuly (v případě sloučeniny). V atomech nebo molekulách v základním stavu, tj. ve stavu nejstabilnější konfigurace, se elektrony pohybují po určitých drahách - orbitech. Orbity nejsou jednoduché. Představují soubor několika vibračních úrovní, které se svou energetickou hladinou poněkud liší. Při pohybu po orbitech elektrony nevyzařují energii - jsou ve stacionárním stavu.

Při absorpci světelného kvanta přeskóčí elektron z orbite o nižší energetické hladině na orbit o vyšší energetické hladině, kde je opět ve stacionárním stavu. Rozdíl energií na těchto orbitech je právě jedno světelné kvantum. Energii potřebnou k tomuto přeskoku musí elektron přijmout v jednom fotonu, nikoli ve fotonech několika, a využít ji beze zbytku. Jedno světelné kvantum může být absorbováno pouze jedním elektronem. Uspořádání elektronového obalu atomu prvku nebo molekuly sloučeniny určuje, které fotony je daná látka schopna absorbovat.

Jedna molekula absorbuje vždy jen jeden foton. Složitější komplexní molekuly mohou absorbovat více než jeden typ fotonů (vždy však jen jeden foton, nikdy více fotonů současně). Absorpční spektra těchto látek mají více, zpravidla různě vysokých, vrcholů.

Absorpční spektrum látky znázorňuje závislost pravděpodobnosti absorpce fotonu na jejich vlnové délce. Vzhledem k tomu, že orbity jsou souborem několika energetických hladin, jsou absorbovány atomy v širší oblasti kolem určitého maxima, kde je pravděpodobnost absorpce nejvyšší.

1.7 Fotoreceptory

Absorbovaná energie ze světla je vnitřním prostředím rostliny využita jako energie chemických vazeb nebo má absorpce funkci signální - přináší informaci o světelných podmínkách vnějšího prostředí.

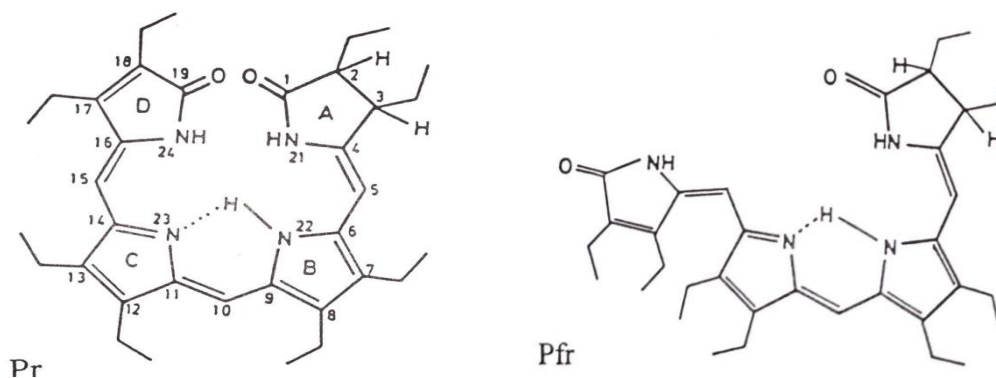
Nejpočetnější jsou v rostlinách fotoreceptory **fotosyntetické**. Ty se sice na zbarvení rostlin výrazně podílejí, jejich funkce však spočívá v zachycení energie fotonů, která je v dalších dějích přeměněna v energii chemickou a dále se hromadí a skladuje v primárních metabolitech. Chemicky jsou tyto látky v podstatě dvojího typu:

1. **pyrolové deriváty**, tvořené 4 pyrolovými jádry spojenými methinovými skupinami lineárně (fykobiliny) nebo do kruhu (chlorofyly)
2. **karotenoidy**, které tvoří komplexy s proteiny PS II a I a jsou lokalizovány v chloroplastech

Druhý typ fotoreceptorů jsou tzv. **fotosenzory**. Tyto látky jsou barevné, ale na zbarvení rostlin se nijak výrazně nepodílejí, protože množství jejich molekul je ve srovnání s ostatními pigmenty velmi malé. Fotosenzory absorbovanou energii nepředávají ani ji nemění na energii chemickou (Pavlová, 1996). Základními fotosenzory jsou: fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Nejlépe poznanými jsou fytochromy. Slouží především k získávání informací o fotosynteticky nejúčinnějších oblastech záření, což je krátkovlnné červené (R), modré a dlouho-vlnné červené (FR).

1.7.1 Fytochrom - receptor červeného záření

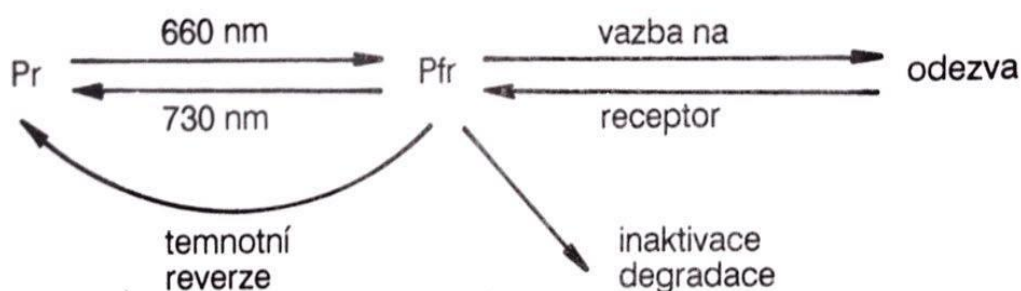
Podle *Leporelo.info* je základní jednotku fytochromu jeden chromofor a jeden protein. Absorbuje červené světlo (R) (620-700 nm) a dlouhovlnné červené světlo (far red - FR) (700-800 nm), což objevil roku 1952 Borthwick se svými kolegy při experimentech s klíčením nažek salátu. Při jeho pokusech zjistil, že toto klíčení lze stimulovat ozářením. Během své práce zjistil, že nejúčinnější je R světlo, ale ukázalo se, že jeho účinek byl kompletně zrušen následným ozářením FR světlem. Působení obou druhů světla se ukázalo být vzájemně reverzibilní a konečná reakce (zda nažky klíčily či nikoliv) záleželo na typu posledního záření. Na základě tohoto výzkumu byla vyslovena hypotéza, že je tato vratná reakce zprostředkována jedním společným fotoreceptorem, který se vyskytuje ve dvou odlišných konformacích, a to: Pr (P660) a Pfr (P730).



Obrázek 10 - Konformace prostetické skupiny fytochromu ve strukturálních formách Pr a Pfr (Procházka a kol., 1998)

Ty jsou schopny po působení záření příslušné vlnové délky přecházet jedna v druhou. Jinými slovy, po absorbování záření o vlnové délce 660 nm, čili R záření, změní svou konfiguraci a po následném ozáření FR světlem o vlnové délce 730 nm se vrací do původní formy (Procházka a kol., 1998). Za zmínku stojí, že absorpcí fotonů nikdy nedochází k úplné přeměně daného množství na druhou formu fytochromu, ale vždy zůstává určitá část molekul fytochromů, u nichž ke konverzi nedošlo, jak ve své práci uvádí Malečková (2013).

Přechody mezi konformacemi Pr a Pfr mají řadu spektrofotometricky zachytitelných meziproductů, jejichž význam pro samotný fytochrom není zatím jasný. Forma Pr je poměrně stálá na rozdíl od Pfr, u které ve tmě dochází k *temnotní reverzi* - rychlé změně zpět na Pr a zčásti se rozkládá. Tento úbytek je poté kompenzován syntézou fytochromu *de novo*, při které je syntetizován jako forma Pr.



Obrázek 11 - Schematické znázornění metabolických přeměn fytochromu (Procházka a kol.,1998)

Efekt vyvolaný R zářením, jak již bylo uvedeno, je možné anulovat ozářením FR světelným spektrem, ale pouze během určité doby po ukončení působení červeného záření. Tato doba je nazývána **únikový čas** (*escape time*) a může trvat v rozmezí několika minut až do několika hodin. Po uplynutí tohoto časového úseku „*proběhne reakce vyvolaná ozářením R do takové fáze, ve které již není ovlivnitelná ozářením FR. To ukazuje, že k vyvolání některých jevů je nutná přítomnost aktivní formy Pfr jen po určitou dobu, někdy velmi krátkou,*“ jak uvádí Procházka a kol.(1998).

Existují dva typy fytochromu: **fytochrom I** (fotolabilní) a **fytochrom II** (fotostabilní). Typ I se nachází především v etiolovaných rostlinách (poměr jeho obsahu k obsahu fytochromu II je asi 9:1) a jeho absorpční maximum je 666 nm. Po ozáření se velmi rychle rozkládá.

Typ II je ve větším množství zastoupen v zelených rostlinách (poměr jeho obsahu a obsahu typu I je asi 1:1) a má absorpční maximum při 654 nm a na světle je poměrně stálý.

1.7.2 Kryptochrom - receptor modrého záření

Záření modré spektrální oblasti (B) (380-450 nm) ovlivňuje především fototropismus, regulaci prodlužovacího růstu stonku a otevírání průduchů listů. Je zachycováno kryptochromy, které byly objeveny analýzou mutantu *Arabidopsis* značeného **hy4** (z angl. *hypocotyl 4*). Tento mutant ve stadiu klíčení rostliny nereagoval na modré světlo inhibicí růstu hypokotylu, která u normálních etiolovaných klíčících rostlin nastává v několika minutách (inhibici růstu hypokotylu způsobí R po půl hodině, FR po více než hodině) (Pavlová a Fischer, 2011).

Je zajímavé, že senzory podobné kryptochromům se vyskytují také u živočichů a u člověka a plní nezbytnou roli při vnímání času. Odhaduje se, že se rostlinné

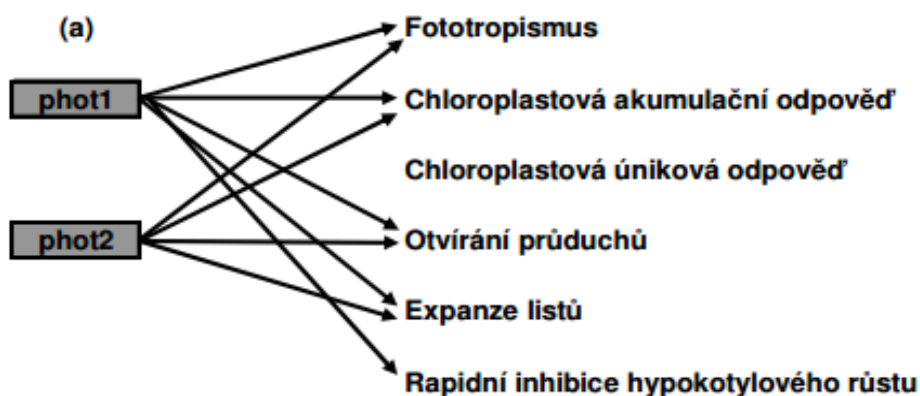
a živočišné kryptochromy vyvinuly nezávisle na sobě a prošly odlišným vývojem. Rostlinné se objevily v evoluci dříve.

Kryptochromy jsou u rostlin obecné, prokázány byly i u řas. *Arabidopsis* má podle novodobých poznatků dva různé kryptochromy - kryptochrom 1 (CRY1 z angl. cryptochrome 1) a kryptochrom 2 (CRY2). Oba jsou u *Arabidopsis* funkčně do značné míry vzájemně zastupitelné, signál kryptochrom 2 je významný v růstových reakcích během de-etiolace při nízkých ozářenostech a při fotoperiodické indukci kvetení. U hrachu byly nalezeny tři kryptochromy, které se podle podobností s kryptochromy u *Arabidopsis* značí CRY1 a CRY2a a CRY2b, u rajčete a ječmene jsou tři proteiny CRY1a, CRY1b a CRY2 (Pavlová a Fischer, 2011).

Struktura tohoto receptoru není doposud známa. Jak ve své knize uvádí Procházka a kol.(1998), na základě akčních spekter některých odezev vyvolaných modrým zářením se dlouho předpokládalo, že hlavní složkou receptoru modrého záření je *flavoprotein*.

1.7.3 Fototropiny

Fototropiny jsou senzory pro modrou oblast spektra. Doposud jsou známé dva: PHOT1 a PHOT2. Jsou zapojeny ve fototropismu a inhibici prodlužování hypokotylu či v otvírání průduchů a rozvoji listů vyvolanými modrým světlem.



Obrázek 12 - vlivy fototropinů PHOT1 a PHOT2
(Malečková, 2013)

Odpovědí na modré záření typickou pro PHOT2 je jeho role v řízení pohybu chloroplastů směrem od zdroje intenzivního záření (Malečková, 2013). PHOT1 je aktivní převážně ve slabém světle, zatímco PHOT2 naopak v silném. Oba fototropiny jsou umístěny zejména v plazmatické membráně, PHOT2 je také umístěn na vnější membráně chloroplastů (Malečková, 2013).

2 Praktická část práce

2.1 Materiál a metodika

Předmětem zkoumání byl vliv modrého a červeného světelného spektra na účinky fytohormonu auxinu, který ovlivňuje rostlinný růst. Experimentovalo se se syntetickým auxinem 2,4-D a dvěma genotypy rostliny rajčete - kontrolním genotypem, kultivarem GT a mutantem *tril* (transient red light insensitive; mutace v genu, který kóduje apoprotein fytochromu B1; Kerckhoffs a kol. 1996), který je necitlivý k červenému světlu. Cílem experimentů bylo získat informace o působení různých světelných spekter na účinky syntetického auxinu 2,4-D na prodlužovací růst rostlin rajčete.

Experiment byl proveden třikrát po dobu přibližně necelých dvou měsíců a se uskutečnil na Univerzitě Palackého v Olomouci (UP) v Laboratoři růstových regulátorů, která je společným pracovištěm přírodovědné fakulty UP a Ústavu experimentální botaniky AV ČR. Citovaná literární díla pochází z tamní univerzitní knihovny a ze Studijní a vědecké knihovny v Hradci Králové. Jeden pokus se skládal ze tří fází. Předcházela příprava média, se kterým se během experimentů pracovalo. Poslední, třetí fází bylo měření rostlinek a výsledky byly následně zaznamenány do tabulek a zpracovány v grafech.

2.2 Postupy jednotlivých fází experimentu

2.2.1 Postup při přípravě MS media

Pomůcky: 2l dH₂O, 20g sacharosu, 8,66 g MS media v prášku (4,33 g/l, Caisson Labs, USA), pufr MES 390 mg (195 mg/l), 2,8 g/400 ml agaru (7 g/l, Duchefa, Netherlands), Erlenmeyerova baňka (V = 3l), pH metr, 1 M KOH, magnetická míchačka, magnetické míchátko, předvážky, analytická váha, automatická pipeta, špachtle (lžička) a váženky (plastové kelímky), autokláv, barevná popisovací páska, autoklávovací páska a fixa.

Po lžičkách se navážilo 20 g sacharosu a nasypalo se do 1l destilované H₂O. Za neustálého míchání se přisypalo 8,66 g MS media a MES buffer (390 mg) pro udržování stálého pH. Po rozpuštění se doplnil objem do 2 l.



Obrázek 13 - Erlenmeyerova baňka na magnetické míchačce (Kozáková, 2016)

Do roztoku se zavedla elektroda pH metru, na kterém se kontrolovalo momentální pH. Po kapkách se přidává 1M KOH pro zvýšení zásaditosti, aby nedošlo ke sražení, dokud pH roztoku nedosáhne hodnoty 6,1.

Připravené medium se rozlilo do pěti půllitrových lahví po 400 ml, do kterých jsme si předtím navážili do každé 2,8 g agaru. Na láhev se nalepila barevná lepicí páska, která byla popsána jménem a datem. Hrdlo láhve a víčkem se překrylo alobalem a svrchu se nalepila bílá autoklávovací páska pruhovaná šikmo lesklými pruhy, které po správném autoklávování zčernají.



Obrázek 14 - médium připravené pro autoklávování (Kozáková, 2016)

Médium se potom nechá vysterilizovat autoklávováním (laborantka) a hotové se uloží do lednice.

2.2.2 Postup vysévání semínek - 1. fáze

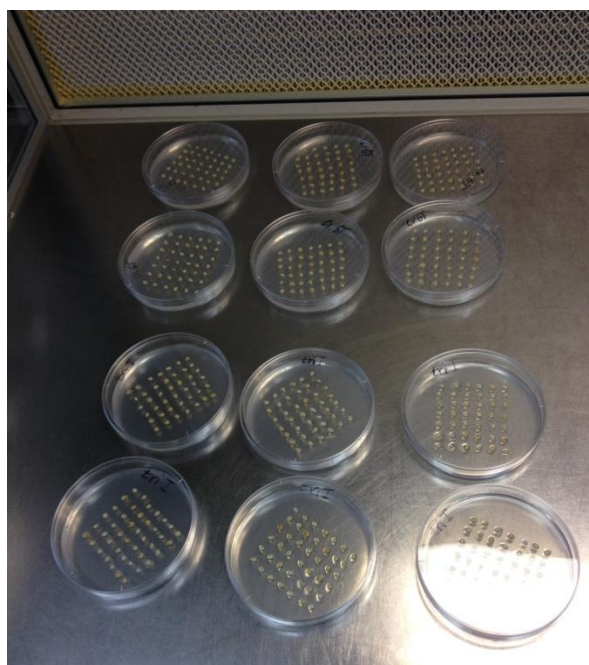
Pomůcky: 300 semínek od každého genotypu (cv.GT a *tri1*), SAVO (3% roztok Cl), 240 ml MS media, 2 plastové 50 ml centrifugační plastové zkumavky, 12 kulatých Petriho misek (průměr 90 mm), automatická 10 ml pipeta, sterilní špičky, lihový kahan, pinzeta, alobal, lepicí páska z netkané textilie Urgopore, laminární flowbox pro sterilní práci

Jako první se 300 experimentálních semínek od každého genotypu (tj. kultivaru cv.GT a mutanta *tri1*) nechalo povrchově sterilizovat v ředěném roztoku SAVO (3% koncentrace Cl) (k semínkům se přilije cca. 40 ml roztoku SAVO) přibližně 30 minut. Během této doby se s lahvičkami, ve kterých byla semínka uložena, několikrát zatřepalo.

Mezitím se medium v mikrovlnné troubě rozešlo do tekutého stavu a po 20 ml rozlilo do všech 12 misek a nechalo se ztuhnout. Po uplynutí dané doby se z lahviček se semínky pipetou odstranilo SAVO a semínka se 6x propláchnula sterilní destilovanou vodou.



Obrázek 16 - proplachování semínek dH₂O (Kozáková, 2016)



Obrázek 15 - nezalepené Petriho misky se semínky cv. GT a *tril* (Kozáková, 2016)

Důkladně propláchnutá semínka se nanášela pinzetou, dezinfikovanou v lihu a nad plamenem, v pravidelných řadách a sloupcích cca 7x6 na medium do každé misky.

Na závěr se misky po boční straně dokola zalepily páskou Urgopore a obalily alobalem, aby k nim neproniklo žádné světlo z okolí. Celá práce probíhala ve flowboxu ve sterilních podmínkách.

2.2.3 Postup při přenosu klíčících rostlinek na auxin - 2. fáze

Pomůcky: lihový kahan, pinzeta, zásobní roztok auxinu 2,4-D (2,4-dichlorfenoxycetová; $C_8H_6Cl_2O_3$) o koncentraci 10^{-2} M, automatické pipeta pro různé objemy a sterilní plastové špičky, vyklíčená semínka z předchozí práce, MS medium, alobal, lepicí páska, 30 Petriho misek, flowbox

Vytvořilo se medium o 5 různých koncentracích syntetického auxinu 2,4-D: 0; 0,5; 1; 5; $10 \cdot 10^{-6}$ M). Pro každou koncentraci se připravilo 6 misek po 20 ml - 3 pro každý genotyp a každá z misek určena do jednoho ze tří různých světelných prostředí.

Do 120 ml rozehrátého media se automatickou pipetou přidal vypočítaný počet ml auxinu, roztok se promíchal a rozlil do 6 misek. Kolik ml auxinu 2,4-D ($\cdot 10^{-2}$ M) bylo zapotřebí k přípravě daných koncentrací znázorňuje tabulka 1.

Tabulka 1 - přehled množství 2,4-D auxinu, potřebných k vytvoření daných koncentrací

Příprava různě koncentrovaných médií					
Koncentrace ($\cdot 10^{-6}$ M)	0	0,5	1	5	10
Množství 2,4-D auxinu ($\cdot 10^{-2}$) v M	0	0,006	0,012	0,06	0,12

K vypočítání koncentrací byl použit jednoduchý vzorec:

$$n = c \cdot V$$
$$x \cdot 10^{-2} = c \cdot 10^{-6} \cdot V$$

n = látkové množství 2,4-D ($\cdot 10^{-2}$ M)

c = koncentrace média ($\cdot 10^{-6}$ M)

V = objem

Tento proces se opakoval 4x, pro všech pět uvedených koncentrací, přičemž jedna koncentrace je 0 mM, tudíž nebylo potřeba přidávat auxin a do 6 misek se tedy nalilo čisté medium. Po ztuhnutí médií se misky rozdělily pro jednotlivé genotypy.

Misky s naklíčenými semínky obou genotypů se rozbaly a popořadě se do misek umístí 7 semínek s co nejkratšími kořínky od každého, pro přehlednost seřazené od semínka s nejkratším kořínkem po semínko s nejdelším. Jednotlivé genotypy mají 3 misky od každé koncentrace. Pokud možno, každá miska by měla mít co nejpodobněji vyklíčená semínka. Po přenesení semínek na média se všemi koncentracemi auxinu se všechny misky zavrou a zalepí páskou Urgopore.

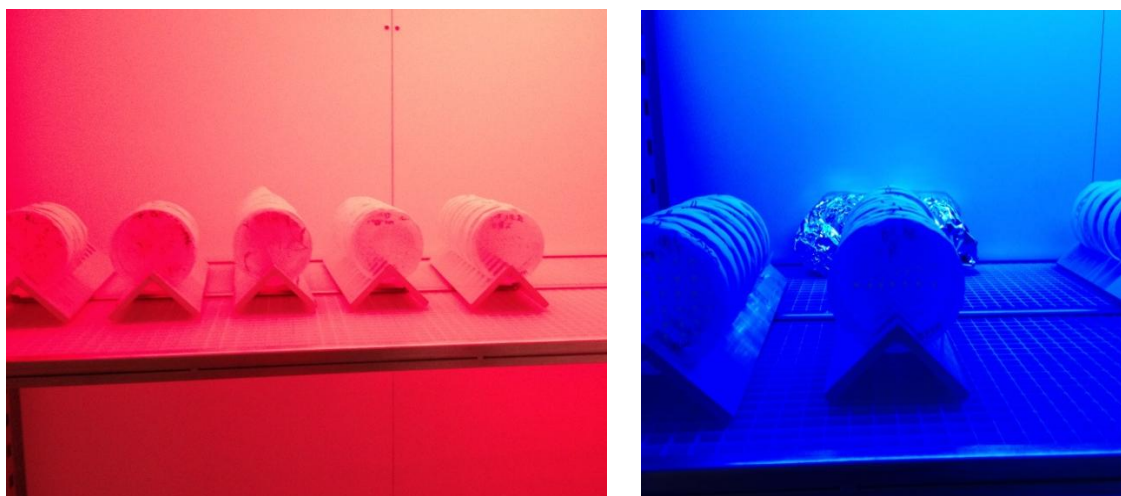
Misky se semínky každého genotypu se rozdělily na 3 skupinky, jedna skupina misek pro tmu (označeny D, podle angl. *darkness*), pro modré světlo (označeny BL, podle angl. *blue light*) a pro červené (označeny RL, podle angl. *red light*). Pod každé světlo se umístila jedna miska od každé koncentrace a od každého genotypu, čili například do tmy (D) půjde 10 misek - 5 misek s odlišnými koncentracemi (0; 0,5; 1; 5; $10 \cdot 10^{-6}$ M) od jednoho genotypu (cv.GT) a 5 misek od druhého (*tri1*).



Obrázek 17 - transferovaná semínka (cv. GT) na koncentraci 1 a 5 ($\cdot 10^{-6}$ M) (Kozáková, 2016)

Misky se semínky určenými pro kultivaci ve tmě se obalily dvěma vrstvami alobalu, aby k nim neproniklo žádné světlo, a umístily se do růstové kultivační komory (Microclima 1000; Snijders Scientific B. V., The Netherlands) s modrým světlem spolu s 10 nezabalenými miskami, které byly do modrého světla určeny. Poslední skupina misek se uložila do komory s červeným světlem. Rostlinky byly kultivovány 7 dnů při teplotě 23 °C.

Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue, Philips USA; maximální ozáření při 440 nm $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD-36 W/15-Red, Philips, USA; maximální ozáření při 660 nm $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



Obrázek 18 - transferovaná semínka uložená ve světelných komorách (Kozáková, 2016)

2.2.4 Postup při měření kořenů a hypokotylů rostlinek - 3. fáze

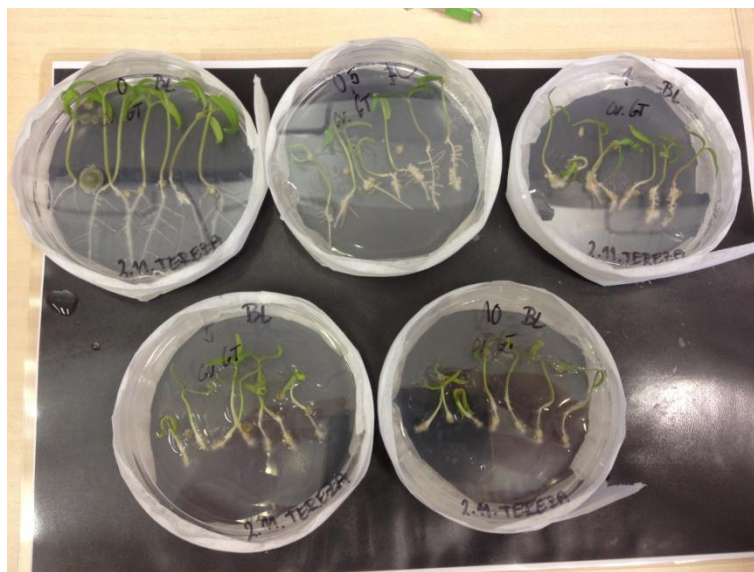
Pomůcky: černý papír, pravítko, pinzeta, vyrostlé semenáčky

Pro začátek se vynesly misky jednoho genotypu z jednoho světla, například červeného. Misky se rozlepily a vyklíčené rostlinky pro každou koncentraci se postupně pokládaly na černý papír, kde byly dobře vidět. S pomocí pravítka se změřila délka kořene a hypokotylu pro každou rostlinku dané koncentrace, a to na přesnost jednoho milimetru. Takto se postupovalo pro každou koncentraci obou genotypů z jednotlivých světél (D, RL, BL)

Naměřené hodnoty se zapisovali v milimetrech do tabulky, členěné pro každé světlo pěti sloupci - jeden pro každou koncentraci, stylem délka kořene/délka hypokotylu. Výsledky délek z jednotlivých koncentrací pro dané světlo se nakonec zprůměrovali a vynesli do grafu.



Obrázek 19 - rostlinky *tri1* (Kozáková, 2016)



Obrázek 20 - rostlinky cv. GT (Kozáková, 2016)

Na obrázcích 20 a 21 jsou zachyceny jako ukázka rostlinky cv. GT ze tmy a *tri1* z modrého světla.

2.3 Hypotéza

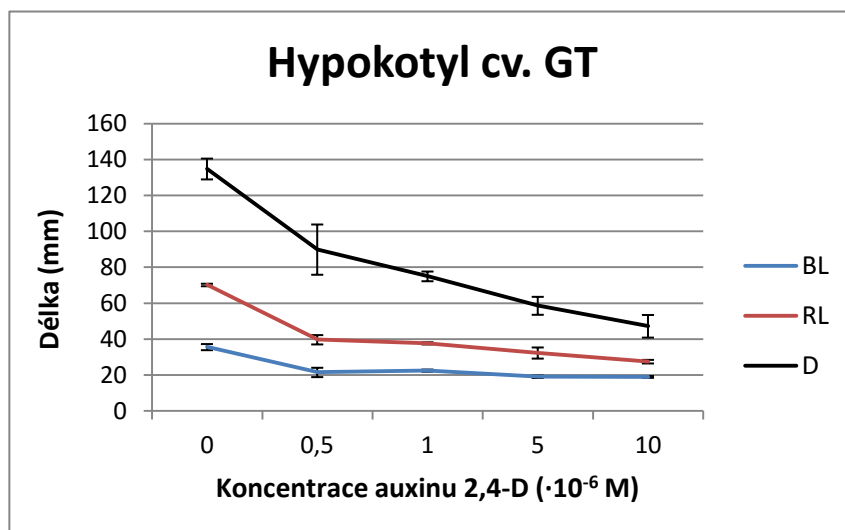
Vzhledem ke stanovenému cíli – zjištění, jak světlo ovlivňuje citlivost hypokotyly k inhibičním účinkům auxinu – lze pronést hypotézu, že světlo má vliv na citlivost hypokotylů k auxinu prostřednictvím fotoreceptoru pro červené světlo, fytochromu. O potvrzení či vyvrácení tohoto tvrzení jsem se snažila tím, že jsem při experimentech použila mutanta *tri1*, který má defekt ve fotoreceptoru fytochromu B1.

2.4 Výsledky

2.4.1 Výsledky hypokotylu

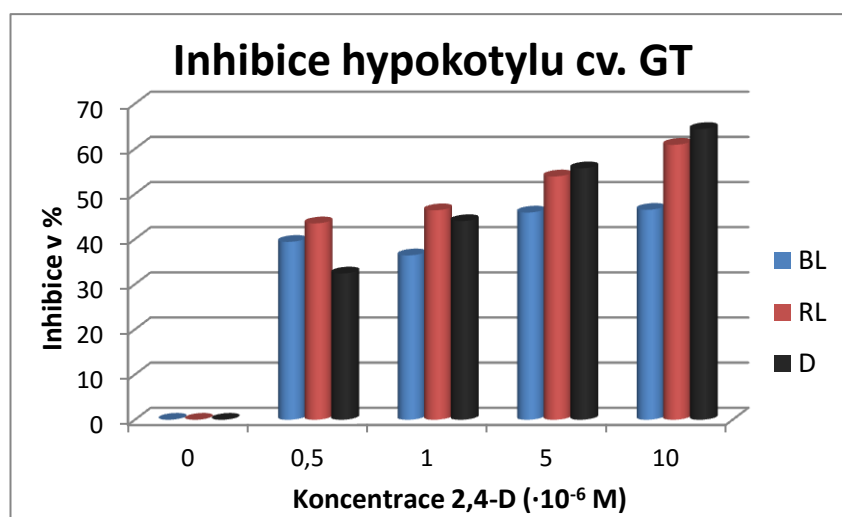
Cílem bylo zjistit, jak je citlivost hypokotylu k externímu auxinu 2,4-D ovlivňována světlem a dále jaká je role fytochromu B1 v citlivosti rostlin k tomuto auxinu. Při experimentu byl kromě hypokotylu zkoumán i kořen.

U hypokotylu genotypu cv. GT je viditelné, že působení červeného světla (RL) vyvolává zhruba 50%-ní zkrácení hypokotylu, což je zřejmé z toho, že červené křivka dosahuje přibližně polovičních hodnot černé křivky. Modré světlo pak způsobilo inhibici prodlužování hypokotylu asi o 70%. Výsledky v grafu 1 dále ukazují, že ve tmě, exogenní auxin 2,4-D inhibuje prodlužování hypokotylu rajčete cv. GT, a to úměrně koncentraci auxinu. Při nejvyšší použité koncentraci 10^{-6} M dosahovala inhibice kolem 60%. Na modrém světle stejná koncentrace auxinu způsobila inhibici kolem 40%, kdežto na červeném světle to bylo asi 50%.



Graf 1 - výsledné hodnoty hypokotylu cv. GT

Výsledky tedy ukazují, že vlivem světla dochází ke snížení citlivosti hypokotylu vůči exogennímu auxinu 2,4-D. Rozdíly mezi naměřenými výsledky ze všech koncentrací totiž nejsou tak markantní, jako u rostlinek z D prostředí (graf 1).



Graf 2 - inhibice růstu hypokotylu cv. GT v %

Graf 2 znázorňuje inhibiční účinek jednotlivých koncentrací auxinu 2,4-D na prodlužování hypokotyly cv. GT ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL). Výpočet inhibice v procentech vypadá následovně:

$$\% \text{ inhibice} = \frac{a - b}{a} \times 100\%$$

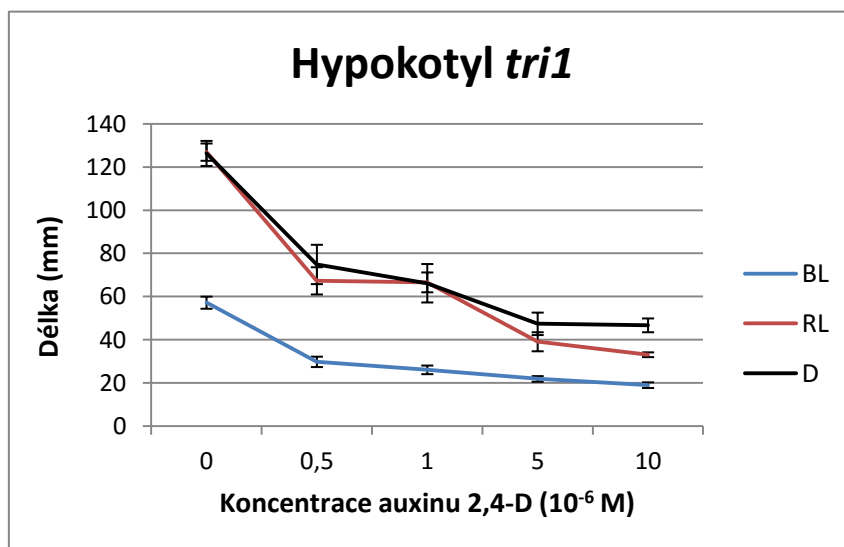
a = hodnota délky hypokotyly při koncentraci 0 M

b = hodnota délky hypokotyly při zvolené koncentraci, pro kterou počítáme inhibici

V grafu 2 vyplývá, že kromě nejnižší použité koncentrace auxinu je inhibice prodlužování hypokotyly vlivem auxinu nejvyšší ve tmě, podobná inhibice můžeme pozorovat na červeném světle, kdežto nejnižší inhibiční účinek auxinu byl pozorován na modrém světle. Z toho vyplývá, že BL i RL určitě snižují citlivost vůči aplikovanému auxinu, BL výrazně více, než RL.

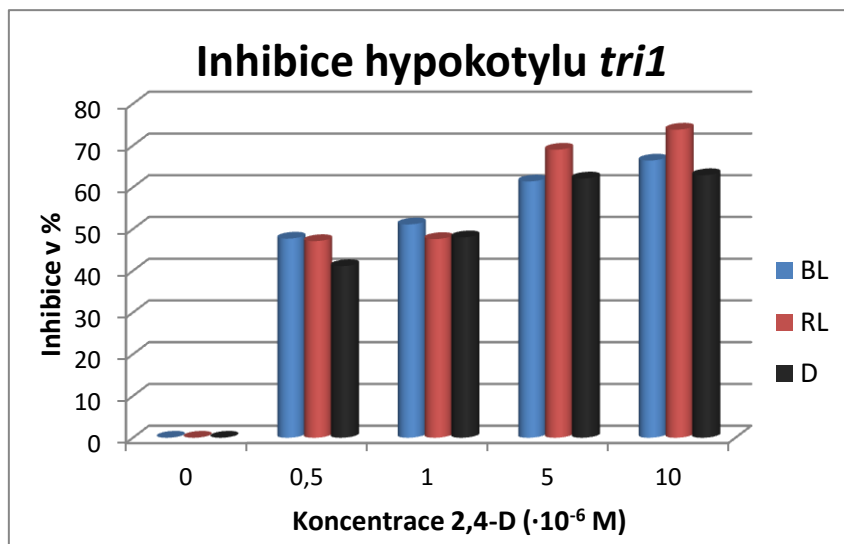
Abychom zjistili, zda vliv světla na citlivost hypokotyly k auxinu může být zprostředkován fytochromy, použili jsme mutanta *tri1*, který má defekt v genu kódující receptor červeného světla fytochrom B1 (phyB1), tudíž nevnímá červené světlo. Graf 3 (na druhé straně) potvrzuje, že mutant *tri1* jedna je opravdu necitlivý k červenému světle, protože červené světlo u mutanta neredukuje délku hypokotyly. Naproti tomu mutant *tri1* si uchoval citlivost k modrému světle, ale tato citlivost byla nižší (55%) než u cv. GT (70%).

Z grafu 3 je dále patrné, že exogenní auxin 2,4-D inhiboval, podobně jako u cv. GT, růst hypokotyly mutanta *tri1*.



Graf 1 - výsledné hodnoty hypokotyly *tri1*

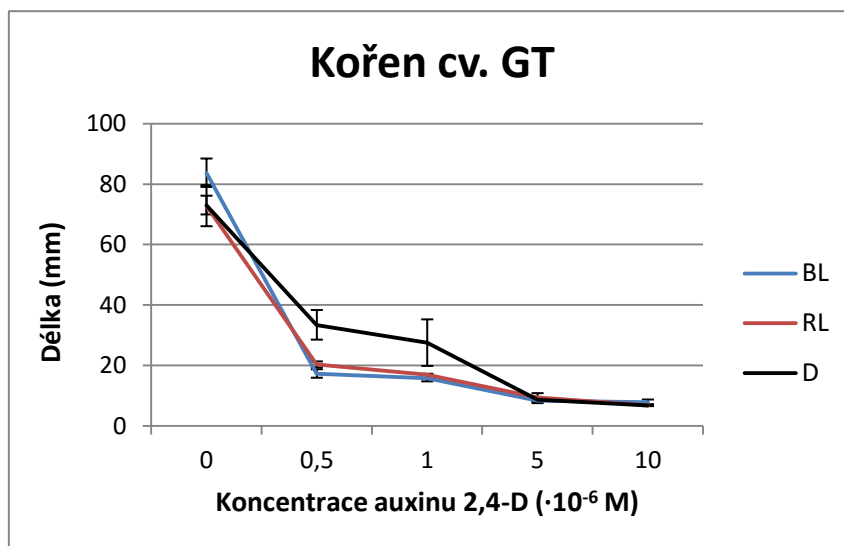
V grafu 4 (na další straně), znázorňujícím procentuální inhibici růstu hypokotyly po přidání různých množství auxinu 2,4-D, je názorně vidět, že citlivost mutanta *tri1* k auxinu na BL i RL je vyšší než citlivost rostlin rostoucích ve tmě. Nedochozí tedy ke snížení vlivu auxinu vlivem světla, jak bylo pozorováno u cv. GT.



Graf 2 – inhibice růstu hypokotylu *tri1* v %

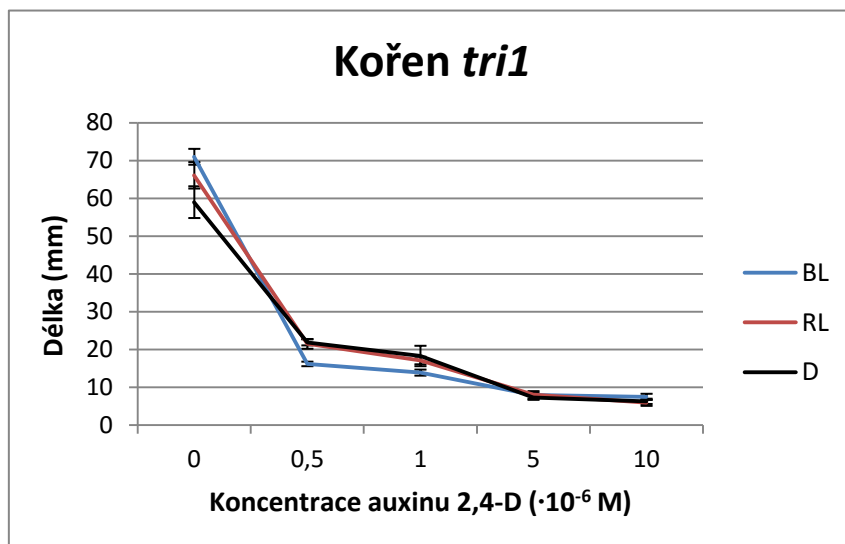
2.4.2 Výsledky kořene

Výsledky z měření kořene potvrdily známý fakt, že samotné světlo stimuluje růst kořene. V rostlině, na kterou působí světlo, začínají fyziologické procesy, jako je například fotosyntéza. Ta pro svůj průběh potřebuje nejen světlo, ale i vodu, a proto kromě toho, že se rostlinka začíná zelenat (syntéza chlorofylu), vytváří si kořenový systém se širším rozsahem pro lepší získání vody z okolí. Proto jsou kořeny rostlin na světle – zatím bez aplikace syntetického auxinu – delší než u rostlin rostoucích ve tmě.



Graf 3 - výsledné hodnoty kořene cv. GT

Výsledky uvedené v grafu 5 ukazují, že kořeny rostlin cv. GT jsou mnohem více inhibovány exogenním auxinem než hypokotylu. To lze usuzovat ze sklonu křivek. Je dále zřejmé, že vliv auxinu na růst kořene ve tmě byl podobný jako u rostlin rostoucích na modrém a červeném světle.



Graf 4 - výsledné hodnoty kořene *tri1*

Graf 6 ukazuje stejný jev, jako byl pozorován u cv. GT, tedy, že světlo stimuluje růst kořene, a na rozdíl od cv. GT dokonce i RL. Výsledky rovněž ukazují, že stejně jako u cv. GT světlo výrazně neměnilo citlivost rostlin k auxinu 2,4-D.

Diskuse

Výsledky experimentů potvrdily, že světlo vlivem fotomorfogeneze inhibuje prodlužovací růst rostlin a ověřily, a to díky pokusům s mutantem *tril*, že fytochrom B1 zprostředkovává vliv světla na prodlužování. Proč a jak ale světlo ovlivňuje snižování růstové reakce rostlin k auxinu se doposud neví. Auxiny stimulují roztažnost buňky, jak vyřkli Rayle a Cleland (1970, 1992). Jak bylo prokázáno, světlo snižuje citlivost rostliny k syntetickému auxinu. Jedním z důvodů, proč tomu tak je, by mohl být fakt, že působení RL a BL brání expanzi buněk. Povrch buňky je proto menší a tudíž je menší plocha plazmatické membrány, kde se nachází receptory auxinu auxin-binding proteiny ABP1. Čím větší plocha, tím více receptorů auxinu a tím větší citlivost na něj. Tím, že by roztažení plazmatické membrány bylo působením červeného a modrého záření zabráněno, by mohlo dojít k tomu, že se nesyntetizuje tolik proteinů na plazmatické membráně jako u rostlinek rostoucích ve tmě, jejichž buňkám nebylo bráněno v roztažení a plocha této membrány je tak větší. To by vysvětlovalo, proč rostlinky vyrostlé ve tmě prokazují už při velmi slabé koncentraci 2,4-D auxinu vysokou citlivost vůči aplikovanému hormonu, zatímco u rostlin rostoucích na světle je tato reakce utlumena.

Další důvodem tohoto působení světla na citlivost rostlin k auxinu by mohlo být, že světlo snižuje hladinu auxinu. Účinek auxinu je úměrný jeho koncentraci v buňce, a proto rostlina příjem a výdej auxinu jednotlivými buňkami přesně řídí. Světlo by mohlo tuto schopnost ovlivňovat hladinu auxinu tlumit, čímž by i zmírnila efekt auxinu (Kraepiel a kol. 1995).

Světlo by také teoreticky mohlo zabraňovat expresi genů, které kódují receptory auxinu, proteiny ABP1. V tomto případě by tak bylo zabráněno syntéze proteinů sloužících jako receptory auxinu a citlivost vůči němu by se snížila (Jones a kol. 1991).

Jelikož signál je těmito proteiny interpretován hyperpolarizací membrány a prodlužováním buněk, může záření této hyperpolarizaci membrány bránit. Nedošlo by tak k hyperpolarizaci a buňka by svůj tvar nemodifikovala – neprodloužila se.

Možné je také, že světlo přímo snižuje citlivost receptorů, které auxin vnímají. Třeba tím, že by bránilo navázání odpovídajících transfaktorů, značených ARF (z angl. auxin-response factor).

Závěr

Ve své středoškolské práci jsem zjistila, že růst (se zaměřením na hypokotyl) je inhibován auxinem 2,4-D a úroveň inhibice je závislá na vlnové délce světla. Vyplynuly dva nepopíratelné závěry:

- 1) Světlo inhibuje růst hypokotylu, což je potvrzení již známého závěru. Rostlina se tak přestane prodlužovat a využije energii na růst listů a syntézu chlorofylu.
- 2) Bylo také verifikováno, že fytochrom, konkrétně fytochrom B1, zprostředkovává inhibiční vliv světla na růst hypokotylu, a to díky porovnání výsledků experimentů s genotypem cv. GT a mutantem *tril* s defektem v genu kódující právě fytochrom B1 (*phyB1*).

Ohledně syntetického auxinu 2,4-D se potvrdilo, že exogenní auxin inhibuje prodlužovací růst intaktních rostlin. Novým výsledkem je fakt, že světlo snižuje reakci hypokotylu k inhibičním účinkům exogenního auxinu.

Kromě těchto hlavních výsledků byl potvrzen vliv světla na růst kořene, a to, že světlo tento růst stimuluje.

Došlo také k potvrzení hypotézy. Pokud by byly výsledky reakce k auxinu na světle stejné u *tril* jako u cv. GT, byla by hypotéza vyvrácena. Znamenalo by to, že fytochrom nemá ve zprostředkování světelného signálu žádný význam. Při experimentech jsem však zjistila, že *tril* reagoval na světle jinak než druhý genotyp.

Seznam použité literatury

Knižní zdroje

BORTHWICK, H.A. a kol. (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 38, 662–666. FOLTA KM, MARUHNICH SA (2007) Green light: a signal to slow down or stop J Exp Botany 58: 3099-3111

KINCL, M., FAUSTUS, L.. Základy fyziologie rostlin. Praha: Státní pedagogické nakladatelství, 1978. ISBN 14-752-78.

NĚMEC, B. Nauka o buňce (cytologie) a anatomie rostlin. 1. vydání. Praha: Ot. Štorch-Marien – KNIHOVNA NAUČNÝCH SPISŮ AVENTINA, 1930.

PAVLOVÁ, L. Fotomorfogeneze. 1. vydání. Praha: Karolinum, 1996. ISBN 80-7184-148-X.

PAVLOVÁ, L. a FISCHER L. Růst a vývoj rostlin. První vydání. Praha: Karolinum, 2011. ISBN 978-80-246-1913-2.

PROCHÁZKA. [ET AL.]. a Ivana MACHÁČKOVÁ. *Fyziologie rostlin*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1998. ISBN 978-802-0005-861.

PROCHÁZKA, S. a kol. Regulátory rostlinného růstu. Vyd. 1. Praha: Academia, 1997, 395 s. ISBN 80-200-0597-8.

Elektronické zdroje

BEDNÁŘOVÁ, M. Expresse auxin-binding proteinů ve fotomorfogenních mutantech rajčete v závislosti na auxinu a světle [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-02-02]. Dostupné z: <http://theses.cz/id/9ei94h/93220-803131050.pdf>. Bakalářská práce. Univerzita Palackého v Olomouci

CLELAND, Robert a David L. RAYLE. Enhancement of wall loosening and elongation by acid solutions. Plant Physiology [online]. 1970, (46), 250-253 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/46/2/250.full.pdf+html>

CLELAND, Robert E. a David L. RAYLE. The Acid Growth Theory of Auxin-induced Cell Elongation Is Alive and Well. Plant Physiology [online]. 1992, (99), 1271-1274 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/99/4/1271.full.pdf>

Fytochrom. In: Leporelo.info [online]. [cit. 2016-02-03]. Dostupné z: <https://leporelo.info/fytochrom>.

GLOSOVÁ, M. Vliv světelných podmínek a teplotního stresu na aktivaci antioxidačních mechanismů u *Solanum lycopersicum* [online]. Olomouc, 2010 [cit. 2016-01-31].

Dostupné z: <http://theses.cz/id/7ymjjn/82264-162869564.pdf>. Diplomová práce. Univerzita Palackého v Olomouci.

JONES, Alan M. a kol. Red Light-Regulated Growth. *Plant Physiology* [online]. 1991, (97), 352-358 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/97/1/352.full.pdf+html>

KRAEPIEL, Yvan a kol. In vitro morphogenic characteristics of phytochrome mutants in *Nicotiana plumbaginifolia* are modified and correlated to high indole-3-acetic acid levels. *Planta* [online]. 1995, (197), 142-146 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00239950#page-1>.

KERCKHOFFS, L. H. J. a kol. Molecular analysis of tri-mutant alleles in tomato indicates the Tri locus is the gene encoding the apoprotein of phytochrome B1. *Planta* [online]. 1996, (199), 152-157 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://link.springer.com/article/10.1007%2FBF00196891#page-1>

MALEČKOVÁ, E. Zapojení fotoreceptorů a iontových kanálů v klíčení semen [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/vi3tie/00175152-711527703.txt>. Bakalářská práce.

MURASHIGE, Toshio a Folke SKOOG. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* [online]. 1962, (3), 473-497 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/abstract;jsessionid=731E6F2B66F067A4A72245372D684EF0.f03t01>

Parní sterilizátory (autoklávy). In: LAB-MET [online]. Brno: LAB-MET, 1997 [cit. 2016-01-29]. Dostupné z: <http://www.labmet.cz/parni-sterilizatory-autoklavy>

SEDLECKÝ, L. 6. Vliv světla na fotomorfogenezi u rostlin ve výuce biologie na středních školách [online]. Praha, 2010 [cit. 2016-01-25]. Dostupné z: <http://kfrserver.natur.cuni.cz/studium/bakalar/prace/2010LS/sedlecky.pdf>. Bakalářská práce. Univerzita Karlova, Přírodovědecká fakulta.

WENT, F. W. Wuchsstoff und Wachstum. *Rec Trav Bot Neerl* [online]. 1928, (25), 1-116 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <http://garfield.library.upenn.edu/classics1985/A1985TY22600002.pdf>

Citace obrázků

2,4-D. In: Profi plants laboratory [online]. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <http://www.profiplants.cz/produkt/2-4-d-synteticky-auxin>
(obrázek 8)

Auxin. In: Wikipedia: the free encyclopedia [online]. San Francisco (CA): Wikimedia Foundation, 2016 [cit. 2016-03-07]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Auxin>
(obrázek 4, 5)

Herbicide - Dicamba. In: El Lotus [online]. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <http://www.ellotus.com/herbicide-dicamba.php>
(obrázek 9)

Heteroauxin. In: Leporelo.info [online]. [cit. 2016-02-05]. Dostupné z: <https://leporelo.info/heteroauxin>
(obrázek 3)

MALEČKOVÁ, Eva. *Zapojení fotoreceptorů a iontových kanálů v klíčení semen* [online]. Olomouc, 2013 [cit. 2016-01-31]. Dostupné z: <https://theses.cz/id/vi3tie/00175152-711527703.txt>. Bakalářská práce.
(obrázek 12)

PROCHÁZKA, S. a kol. *Regulátory rostlinného růstu*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1997, 395 s. ISBN 80-200-0597-8.
(obrázek 10, 11)

Seznam obrázků, grafů a tabulek

Obrázky

Obrázek 1 - Faktory ovlivňující účinek rostlinných hormonů	10
Obrázek 2 - chemický vzorec PAA.....	11
Obrázek 3 - chemický vzorec IAA.....	11
Obrázek 4 - chemický vzorec 4-Cl-IAA	11
Obrázek 5 - chemický vzorec IBA.....	11
Obrázek 6 - chemický vzorec NAA	12
Obrázek 7 - chemický vzorec IPA	12
Obrázek 8 - chemický vzorec 2,4-D	12
Obrázek 9 - chemický vzorec látky dicamba	12
Obrázek 10 - Konformace prostetické skupiny fytochromu ve strukturních formách Pr a Pfr	15
Obrázek 11 - Schematické znázornění metabolických přeměn fytochromu.....	16
Obrázek 12 - vlivy fototropinů PHOT1 a PHOT2	17
Obrázek 13 - Erlenmeyerova baňka na magnetické míchačce.....	18
Obrázek 14 - médium připravené pro autoklávování.....	19
Obrázek 15 - proplachování semínek dH ₂ O.....	20
Obrázek 16 - nezalepené Petriho misky se semínky cv. GT a <i>tril</i>	20
Obrázek 17 - transferovaná semínka (cv. GT) na koncentraci 1 a 5 ($\cdot 10^{-6}$ M)	22
Obrázek 18 - transferovaná semínka uložená ve světelných komorách (vlastní foto).....	22
Obrázek 19 - rostlinky cv. GT.....	23
Obrázek 20 - rostlinky <i>tril</i>	23

Grafy

Graf 1 - výsledné hodnoty hypokotylu cv. GT	24
Graf 2 - inhibice růstu hypokotylu cv. GT v %.....	24
Graf 3 - výsledné hodnoty hypokotylu <i>tril</i>	25
Graf 4 – inhibice růstu hypokotylu <i>tril</i> v %	26
Graf 5 - výsledné hodnoty kořene cv. GT	26
Graf 6 - výsledné hodnoty kořene <i>tril</i>	27

Tabulky

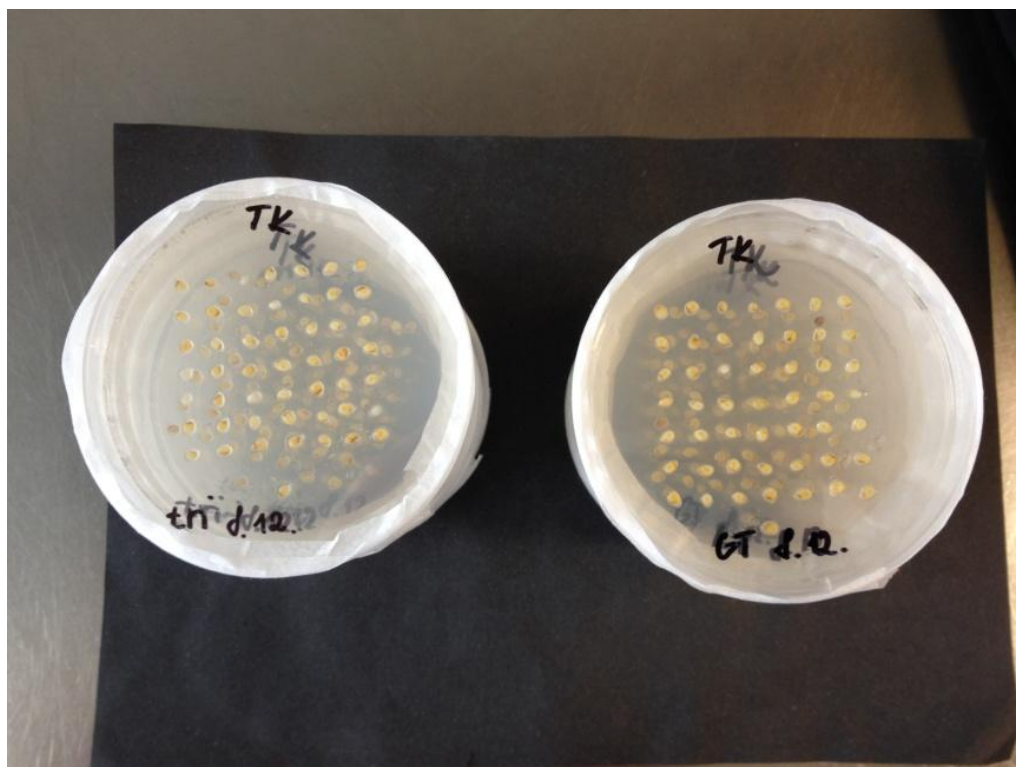
Tabulka 1 - přehled množství 2,4-D auxinu, potřebných k vytvoření daných koncentrací	21
---	----

Všechny grafy a tabulky pochází z archivu autorky.

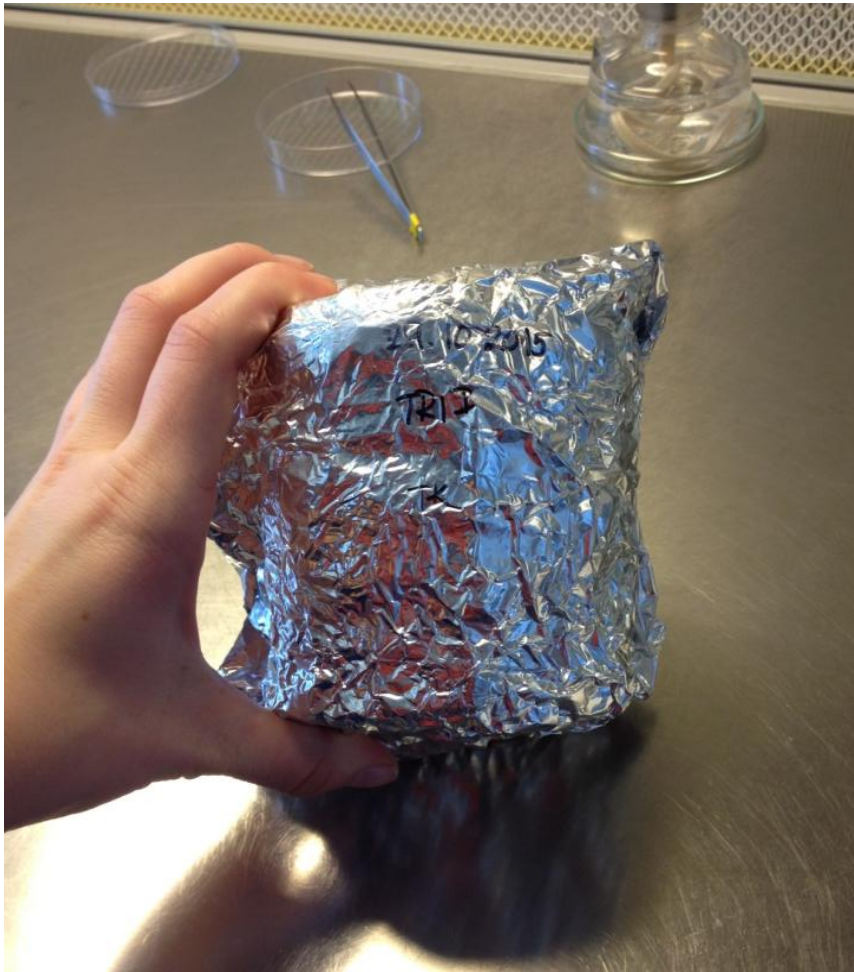
Přílohy



Příloha A: flowbox s pomůckami pro vysévání semínek



Příloha B vyšetá semínka v zalepených Petriho miskách



Příloha C: alobalem obalené misky se semínky



Příloha D: přenášení vyklíčených semínek na medium s exogenním auxinem



Příloha E: porovnání rostlinek cv. GT ze všech koncentrací (RL)



Příloha F: porovnání rostlinek *tril* ze všech koncentrací (RL)

Seznam příloh

Příloha A: flowbox s pomůckami pro vysévání semínek.....	1
Příloha B vyšetá semínka v zalepených Petriho miskách	1
Příloha C: alobalem obalené misky se semínky.....	1
Příloha D: přenášení vyklíčených semínek na medium s exogenním auxinem	1
Příloha E: porovnání rostlinek cv. GT ze všech koncentrací (RL)	1
Příloha F: porovnání rostlinek tri1 ze všech koncentrací (RL).....	1