



Středoškolská technika 2018

Setkání a prezentace prací středoškolských studentů na ČVUT

**INTERAKCE ROSTLINNÉHO HORMONU AUXINU
A SVĚTLA V RŮSTU ROSTLIN**

Anna Hýsková

Gymnázium J. A. Komenského a Jazyková škola s právem státní jazykové zkoušky
Uherský Brod
Komenského 169, 688 31 Uherský Brod

Poděkování:

Tímto bych chtěla velmi poděkovat panu Prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za trpělivost a pomoc při experimentech i vypracování této práce. Jsem mu velmi vděčná za každou poskytnutou radu i předanou zkušenost. Dále bych chtěla poděkovat členům Skupiny molekulární fyziologie a také profesorům z Gymnázia J. A. Komenského, kteří mě plně podporovali.

1. Obsah

1. Úvod.....	4
2. Teoretická část.....	5
Růst rostlin	5
Hypokotyl.....	5
Reakce rostlin na vnější podněty.....	5
Fotomorfogeneze.....	5
Fotoreceptory	6
Rostlinné hormony auxiny	6
Interakce světla a auxinu při prodlužovacím růstu hypokotylu	8
3. Materiál a metody.....	10
Rostlinný materiál	10
Roztoky a chemikálie	10
Přístrojová technika a pomůcky	10
Příprava kultivačního média Murashige and Skoog	11
Výsev semen	11
Růst rostlin na médiu s různými koncentracemi auxinu	11
Měření délky hypokotylu a kořene.....	12
4. Výsledky.....	13
Růst hypokotylu a kořene mutanta <i>tril</i> v závislosti na světelných podmínkách	13
Vliv auxinu na růst hypokotylu v závislosti na světelných podmínkách	13
Vliv auxinu na růst kořene v závislosti na světelných podmínkách	16
5. Diskuze.....	18
6. Závěr.....	19
7. Seznam zkratek	20
8. Seznam použité literatury	21
9. Internetové zdroje.....	24

1. Úvod

Práce se zabývá tématem z oboru fyziologie rostlin, konkrétně působením rostlinného hormonu auxinu na růst rostlin v závislosti na různých světelných podmínkách. Růst rostlin je ovlivňován mnoha faktory, jedním z nejvýznamnějších je právě světlo. Regulace růstu světlem probíhá často právě prostřednictvím auxinů – světlo může redukovat hladinu auxinů v buňce, polární transport auxinů či množství nebo aktivitu auxinových receptorů. Některé mechanismy spolupůsobení světla a auxinu při regulaci prodlužovacího růstu ale zatím nejsou dostatečně vysvětleny.

Hlavním cílem mé práce bylo zjistit, jak kvalita světla ovlivňuje růstové reakce hypokotylu a kořene k auxinům. Účinek auxinů na růst rostlin je často studován aplikací exogenních auxinů, které však růst rostliny inhibují. K experimentům byly použity dva genotypy rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.): kultivar cv. GT a od něj odvozený mutant *tr1*. Tento mutant je deficientní ve fytochromu B1, má tedy poruchu vnímání červeného světla. Rostliny byly pěstovány ve tmě, na modrém a červeném světle v podmínkách *in vitro* na kultivačním médiu obsahujícím exogenní auxin NAA v předem určených koncentracích.

Experimenty jsem prováděla ve Skupině molekulární fyziologie v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci.

2. Teoretická část

Růst rostlin

Růst rostliny je ireverzibilní přibývání její hmoty způsobené dělením buněk a jejich zvětšováním. Vývoj je souhrn všech kvalitativních změn, kterými postupně vzniká tělo organismu. Většina rostlin se vyvíjí po celou dobu svého života, tento stav se nazývá neukončený růst. Rostlina je schopna růst díky tzv. meristému, zárodečnému pletivu, lokalizovanému v místech růstu.

Způsob, jakým rostlina roste, se odvíjí od lokalizace meristémů. Apikální meristém, obsažený ve vzrostném vrcholu kořene a stonku, zajišťuje růst rostliny do délky. Díky těmto meristémům dochází k prodlužování a větvení kořenů a prodlužování stonků – primárnímu růstu. Laterální meristémy zajišťující sekundární růst (druhotné tloušťnutí) jsou rozmístěny podélně v kořenech a stoncích. Primární i sekundární růst se vyskytuje jen u dřevin, byliny podléhají pouze primárnímu růstu.

Apikální meristém stonku je kupolovitý shluk dělicích se buněk na špičce koncového pupenu. Z apikálního meristému vznikají meristémy primární, ze kterých vznikají primární pletiva (Campbell 2006).

Hypokotyl

Hypokotyl je nejspodnější článek stonku mezi kořínkem a děložními lístky. Dochází v něm pouze k několika buněčným dělením, růst probíhá hlavně díky podélné expanzi buněk. Z tohoto důvodu hypokotyl velmi silně reaguje na různé vnější i vnitřní faktory, které buněčnou expanzi regulují.

Reakce rostlin na vnější podněty

Růst rostlin je vysoce regulován vnitřními i vnějšími faktory. Rostliny mění rychlost růstu a vývoje podle průběžných změn v podmínkách jejich životního prostředí. Tato schopnost se označuje jako plasticita a závisí na síti interakcí mezi signalizačními cestami vyvolanými vnitřními a vnějšími podněty. To, jak změny vnitřních a vnějších faktorů interpretuje rostlina z hlediska vývoje a růstu, je jednou z hlavních otázek rostlinné biologie (Alabadí and Blázquez, 2008).

Fotomorfogeneze

Mezi nejvýznamnější faktory formující vývoj rostlin se řadí světlo. Rostliny vyvinuly systémy, které jim umožňují sledovat jak kvalitativní, tak kvantitativní rozdíly ve světle, které vnímají, což významně ovlivňuje klíčové události jejich růstu a vývoje. Fotomorfogeneze je definovaná jako světlem indukované změny v růstu a vývoji rostlin. Je to proces, při kterém světlo jako signál změní vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii (Taiz and Zeiger 2010).

Růst hypokotyly ve tmě (skotomorfogeneze) se podstatně liší od růstu hypokotyly na světle. Hypokotyl rostoucí ve tmě je velmi dlouhý, světlý – nedochází k syntéze chlorofylu a má apikální háček. Na světle dochází ke zpomalení prodlužovacího růstu, syntéze chlorofylu a stimuluje se růst listů.



Obr. č. 1: Růst rostliny na světle (fotomorfogeneze; vlevo) a růst rostliny ve tmě (skotomorfogeneze; vpravo)
Převzato z <http://slideplayer.com/slide/4980549/> 20. 5. 2018

Fotoreceptory

Světlo je zachycováno pigmenty, které jsou součástí fotoreceptorů. Nejdůležitější pro rostlinnou fotomorfogenezi je červené a modré světlo. Červené světlo je vnímáno skupinou úzce příbuzných fytochromů, receptory modrého světla jsou velmi heterogenní skupinou.

Receptory modrého světla

První skupinou receptorů modrého světla jsou kryptochromy, které zprostředkují inhibici růstu a hrají roli v indukci kvetení a denním rytmu. Druhou skupinou jsou fototropiny, které hrají důležitou roli ve fototropismu (pohyby směrem ke světlu nebo od světla), zprostředkovávají inhibici prodlužování hypokotylu během prvních sekund po ozáření rostliny modrým světlem, otevírání průduchů, pohyby chloroplastů v listech a pohyb jader. Dalším z receptorů modrého světla je také zeaxantin, karotenoid, který ve svěracích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání průduchů (Campbell 2006).

Receptory červeného světla

Receptory červeného světla se nazývají fytochromy. Jsou to proteinové pigmenty modré barvy, které stimulují klíčení, de-etiolizaci, tvorbu listových primordií a růst listů a inhibují prodlužování.

Fytochrom je tvořen proteinem kovalentně vázaným na neproteinovou složku, která má funkci chromoforu. Ten je schopen přecházet mezi dvěma izomerickými formami - jeden izomer absorbuje červené světlo (650-680 nm, inaktivní forma P_r), druhý dlouhovlnné červené světlo (710-740 nm, aktivní forma P_{fr}). Tyto dvě formy jsou navzájem fotoreverzibilní.

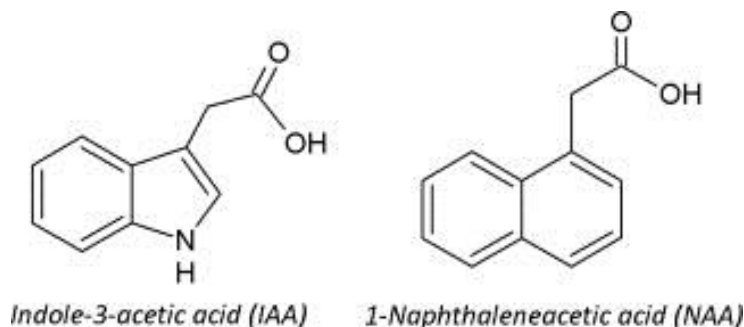
U dvouděložných rostlin je fytochromů celkem pět: fytochrom A, jehož stabilita je snižována světlem (a je tedy transkripčně aktivní v etiolizovaných rostlinách) a fytochromy B-E, které jsou fotostabilní (jsou transkripčně aktivní v etiolizovaných i zelených rostlinách).

Rostlinné hormony auxiny

Auxiny jsou rostlinné hormony zapojené v širokém spektru růstových a vývojových procesů. Na buněčné úrovni ovlivňují buněčné dělení, expanzi a diferenciaci buněk, na úrovni celé rostliny se podílí na embryogenezi, prodlužovacím růstu stonku, apikální dominanci, fototropismu, gravitropismu a tvorbě postranních kořenů. Hlavním místem biosyntézy auxinu jsou mladá dělící se pletiva a meristémy. Auxiny vzájemně spolupracují především

s cytokininy, ale rovněž gibereliny, kyselinou abscisovou, brasinosteroidy nebo etylenem. Auxiny a cytokininy jsou hormony, které rostlina potřebuje pro životaschopnost.

Auxin je po chemické stránce kyselina indolyl-3-octová (IAA). Vyskytuje se ve všech rostlinách a patří mezi fyziologicky nejdůležitější. Mezi další přírodní auxiny patří také kyselina fenylactová (PAA), kyselina indol-3-máselná nebo 4-chloroindolyl-3-octová kyselina. Syntetickými auxiny jsou například 2-methoxy-3,6-dichlorobenzoová kyselina, naftylactová kyselina (NAA) nebo 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D)(Taiz and Zeiger 2010).



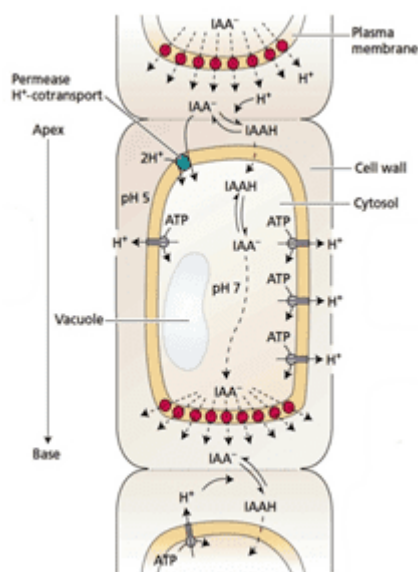
Obr. č. 2: Struktura přírodního auxinu IAA (vlevo) a struktura syntetického auxinu NAA (vpravo) (Flasiňsky and Hac-Wydro 2014)

Transport auxinu

Auxin je transportován polárně (z apikální do bazální části rostliny). Transport ale není ovlivněn gravitační silou, je při něm spotřebovávána energie. Dřívější výsledky ukázaly, že tento transport je řízen chemiosmoticky s využitím gradientu H^+ vzniklého činností protonových pump (Rubery and Sheldrake 1973; Raven 1975; Goldsmith and Goldsmith 1977).

Když se auxin setká s kyselým prostředím buněčné stěny, přijme vodíkový iont (proton), stane se elektricky neutrální a projde cytoplazmatickou membránou. Uvnitř buňky auxin vodíkový iont opět odevzdá. Auxin může vystupovat z buňky jen na bazálním konci, kde jsou v plazmatické membráně zabudované proteinové přenašeče auxinu.

Transport auxinu může být inhibován například kyselinou 1-N-naftylftalamovou (NPA), kyselinou 2,3,5-triiododbenzoovou (TIBA), genisteinem (inhibují výstup auxinu z buňky) či kyselinou 1-naftoxyoctovou (NOA) (inhibuje vstup auxinu do buňky). Auxinový transport je také regulován transkripcí genů, posttranskripčními ději, proteolytickými procesy nebo složením membrány. Mezi faktory regulující transport patří také pohyby proteinů, flavonoidy a hormony, zpětnou vazbou i auxiny samotné.



Obř. ř. 3: Schéma polárního transportu auxinu
Převzato z <https://alchetron.com/Polar-auxin-transport> 20. 5. 2018

Signální dráhy auxinů

U *Arabidopsisthaliana* byl popsán intracelulární receptor TIR1 (Transport Inhibitor Response 1), který zprostředkuje transkripční reakce k auxinu (Dharmasiri et al. 2005; Kepinski and Leyser 2005). Auxin se váže v jádře přímo k TIR1. Vazba auxinu k TIR1 umožňuje vazbu substrátového proteinu (represoru transkripce auxinem-indukovaných genů), což vede k degradaci substrátového proteinu a tak k uvolnění exprese auxinem-indukovaných genů. Substrát je poly-ubiquitinován a směřován do 26S proteazomu, kde je degradován.

Signální dráha receptoru TIR1 však není jediná, dalšími auxinovými receptory jsou např. receptor AFB nebo receptor ABP1.

Interakce světla a auxinu při prodluřovacím růstu hypokotylu

Světlo dokáže manipulovat s růstem a vývojem rostlin v reakci na časté změny ve vnějším prostředí prostřednictvím regulace hladiny auxinu (Halliday and Fankhauser 2003). Dokazují to pokusy provedené s mutanty *Arabidopsisthaliana* deficientními v auxinové biosyntéze (*sav3/taa1*). Tito mutanti měli tendenci mít krátké hypokotylly a rozšířenější dělohy než WT. Tento fenotyp je často pozorován u rostlin s mutací ve světelné signalizaci, kteří vykazují zvýšenou fotomorfogenezi (Tao et al. 2008; Castillon et al. 2007). Naopak, nadbytek auxinu u mutantů *yucca red1* vede k prodluřování hypokotylu a redukci rozvoje děloh, což je fenotyp charakteristický pro mutanty deficientní ve fotoreceptorech nebo světelné signalizaci, u kterých je fotomorfogeneze redukována (Zhao et al. 2001; Hoecker et al. 2004; Lorrain et al. 2006; Kim et al. 2007).

Světlo silně ovlivňuje účinky auxinu na prodluřovací růst. Světlo může sniřovat hladinu auxinu v pletivech a tím redukovat stimulační účinek auxinů na expanzi buněk. Bylo např. prokázáno, že červené světlo inhibuje syntézu IAA v koleoptile kukuřice (Ino 1982; Nishimura et al. 2006).

Dalším mechanismem, kterým by světlo mohlo ovlivňovat růst, je vyvolání produkce flavonoidů, které transport auxinu inhibují. U mutantu *Arabidopsis tt4* s poruchou syntézy flavonoidů je větší rychlost transportu auxinu než u WT (Jacobs and Rubery 1988; Brown et al. 2001).

Jiné experimenty podporují představu, že transport auxinu je důležitější za určitých světelných podmínek více, než u jiných. Například NPA (inhibitor polárního transportu) inhibuje růst hypokotylu u rostlin *Arabidopsis* rostoucích na světle. Do tohoto efektu jsou zapojeny fotoreceptory fytochromy A, B a kryptochrom 1. Naopak, NPA má malý efekt na prodlužování hypokotylu rostlin rostoucích ve tmě. Zdá se tedy, že auxin může řídit růst v závislosti na hladině světla a vývojové fázi rostliny (Jensen et al. 1998; Gray et al. 1998; Desnos et al. 1996).

Nedávné výzkumy ukázaly, že fytochromy mají velký vliv na transport a tedy hladinu auxinu v rostlině, v současné době však nevíme, jak přesně při regulaci transportu auxinu fytochromy působí. Studie ukázaly, že hladiny transkriptů genů kódujících přenašeče auxinu PIN3 a PIN7 jsou regulovány fytochromy (Devlin et al. 2003) a že fenotyp mutantu *pin3* je závislý na světle (Friml et al. 2002). U mutantu *phyB* je ve srovnání s WT zvýšena hladina proteinu PIN3 i hladina PIN3 mRNA. Také bylo prokázáno, že fytochrom ve stoncích může kontrolovat růst postranních kořenů a DR5:GUS reportér (auxinový senzor) je v mutantu exprimován blíže u báze hypokotylu, než u WT. Proto může fytochrom řídit transport auxinu změnou hladiny auxinu anebo buněčnou lokalizací proteinů PIN. Celkově důkazy naznačují, že de-etiolace může být doprovázena širokou ztrátou auxinového průtoku z místa nejvyšší koncentrace auxinu ve vrcholu rostliny (Salisbury et al. 2007).

3. Materiál a metody

Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena dvou genotypů rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.): kultivar GT (cv. GT) a recesivní mutant *tri1* (*temporarily red light-insensitive 1*), odvozený od kultivaru cv. GT. *Tri1* mutant je deficientní ve fytochromu B1 (phyB1), což způsobuje, že rostliny jsou necitlivé k červenému světlu (R) asi dva dny po transferu ze tmy na R (van Tuinen et al. 1995), jsou světlejší a mají delší hypokotyl než cv. GT.

Roztoky a chemikálie

auxin NAA (kyselina 1-naftyloctová)

médium Murashige and Skoog (Murashige and Skoog, 1962) (MSP01-50LT, Caisson, USA)

sacharóza

pufr MES

agar

roztok KOH (1M)

vodný roztok NaClO (3% aktivního chloru; 600 ml Savo+400 ml H₂O)

96% ethanol

sterilní destilovaná voda

destilovaná voda

Přístrojová technika a pomůcky

flowbox

automatické kultivační komory (Microclima MC1000E, Snijders, Holandsko)

horkovzdušný autokláv

mikrovlnná trouba

analytické váhy

předvážky

magnetická míchačka a míchátko

pH metr

Erlenmeyerova baňka o objemu 3 l

sterilní Erlenmeyerova baňka o objemu 500 ml

termolahve o objemu 500 ml

odměrný válec o objemu 1 l

stříčka s destilovanou vodou

nesterilní kádinka na odpad

plastová Pasteurova pipeta

kovová lžička

špachtle

plastové váženky

automatické pipety (10 ml, 2-10 μ l, 20-200 μ l)

sterilní špičky k pipetám

sterilní kulaté plastové Petriho misky (průměr 90 mm)

nesterilní a sterilní plastové zkumavky (objem 50 ml)

mikrozkumavky

sklenička na odkládání zkumavek

stojan na odkládání zkumavek

lihový kahan a zápalky

pinzeta
rozprašovač se 70% lihem
barevná a autoklávovací páska
páska z netkané textilie (Urgopore nebo Softpore)
lihový fix
alobal
pravítko

Příprava kultivačního média Murashige and Skoog

MS médium:

- sacharóza (10 g/l)
- MS médium (4,33 g/l)
- pufr MES (195,7 mg/l)
- agar (7 g/l)
- destilovaná voda

Semena jsem nechala klíčit na kultivačním médiu Murashige and Skoog, které jsem si připravila několik dní předem. Do 3l Erlemeyerovy baňky jsem nalila 1 l destilované vody a za stálého míchání jsem přidala 8,66 g MS média, 20 g sacharózy, 390,4 mg pufru MES a roztokdolila destilovanou vodou na konečný objem 2 l. Přikapáváním 1M roztoku KOH jsem upravila pH na 6,1. Připravila jsem si pět půllitrových varných lahví, do každé jsem navážila 2,8 g agaru a nalila 400 ml média. Médium jsem nechala vysterilizovat v autoklávu horkou párou za vysokého tlaku (110 °C, 120 kPa).

Výsev semen

Pro každý experiment jsem napočítala 250 semen od každého genotypu. Ty jsem povrchově vydesinfikovala působením 40 ml vodného roztoku NaClO, který obsahoval 3% aktivního chloru. Po uplynutí 30 minut jsem roztok odstranila a pomocí 10 ml automatické pipety pětkrát propláchla sterilní destilovanou vodou. V mikrovlnné troubě jsem rozeřála kultivační médium a sterilní plastovou zkumavkou nalila do každé Petriho misky 20 ml média. Semena jsem vysela pomocí sterilní pinzety (namočené do 96% etanolu a ožehnuté nad plamenem) na připravené Petriho misky tak, aby na každé misce bylo 50 semínek. Každou misku jsem zalepila dvakrát dokola po obvodu páskou z netkané textilie, zabalila do alobalu a uložila ve vertikální poloze do kultivační komory. Tam jsem semínka nechala klíčit v po dobu tří až čtyř dní při teplotě 23 °C bez přístupu světla.

Růst rostlin na médiu s různými koncentracemi auxinu

Po třech dnech semena obou genotypů vyklíčila. Připravila jsem si 30 Petriho miseks 20 ml kultivačního média s předem určenými koncentracemi auxinu NAA (0, $5 \cdot 10^{-7}$, 10^{-6} , $5 \cdot 10^{-6}$ a 10^{-5} mol/l), od každé koncentrace 6 misek: do 120 ml rozeřátého kultivačního média jsem pomocí automatické pipety přidala spočítaný objem 10^{-2} M roztoku NAA (6 μ l, 12 μ l, 60 μ l a 120 μ l), důkladně zamíchala a rozlila do Petriho misek. Vyklíčená semínka jsem přenesla sterilní pinzetou na povrch kultivačního média do jedné řady doprostřed misky. Na každou misku jsem přenesla stejný počet semínek s krátkými a dlouhými kořínky. Misky jsem zalepila dvakrát dokola páskou z netkané textilie, popsala a umístila vertikálně do stojanů. Takto připravené misky jsem uložila do kultivačních komor s kontinuálním modrým nebo červeným světlem. Misky s rostlinami kultivovanými ve tmě jsem zabalila do

alobalu a umístila do stejné kultivační komory. Rostliny byly uloženy v kultivačních komorách po dobu 7 dní při teplotě 23 °C. Zdrojem modrého světla byla trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ při 440 nm. Zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ při 660 nm.

Měření délky hypokotylu a kořene

Po týdnu růstu jsem rostliny změřila. Každou rostlinu jsem pomocí pinzety natáhla na podložku s černým podkladem a změřila pravítkem délku kořene a hypokotylu s přesností na jeden milimetr. Výsledky jsem zapsala do tabulky, zpracovala do grafů a analyzovala. S každým genotypem jsem provedla tři nezávislé experimenty.

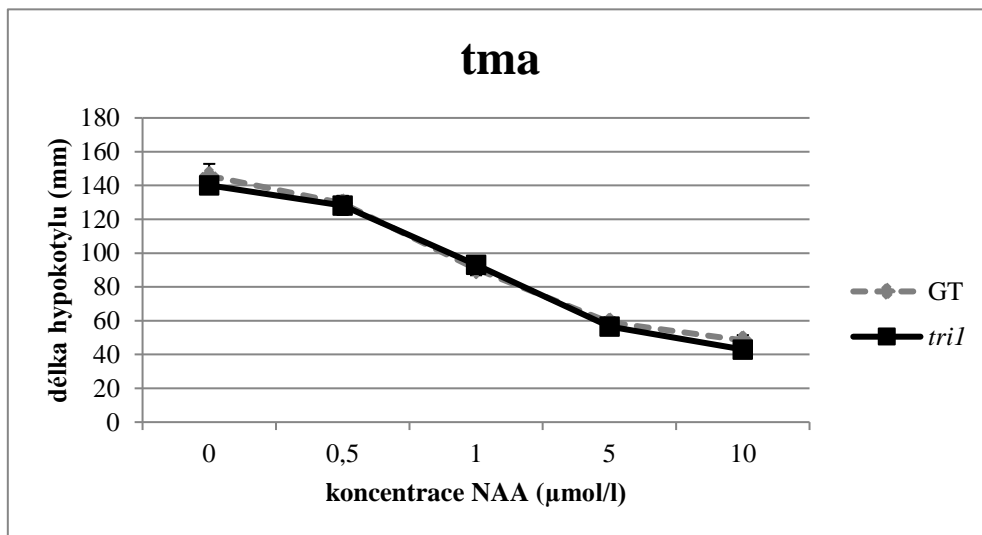
4. Výsledky

Růst hypokotylu a kořene mutanta *tri1* v závislosti na světelných podmínkách

V experimentech jsem zkoumala vliv exogenního auxinu NAA na růst kořene a hypokotylu dvou genotypů rajčete – kontrolního kultivaru cv. GT a od něj odvozeného mutanta *tri1* v závislosti na různých světelných podmínkách.

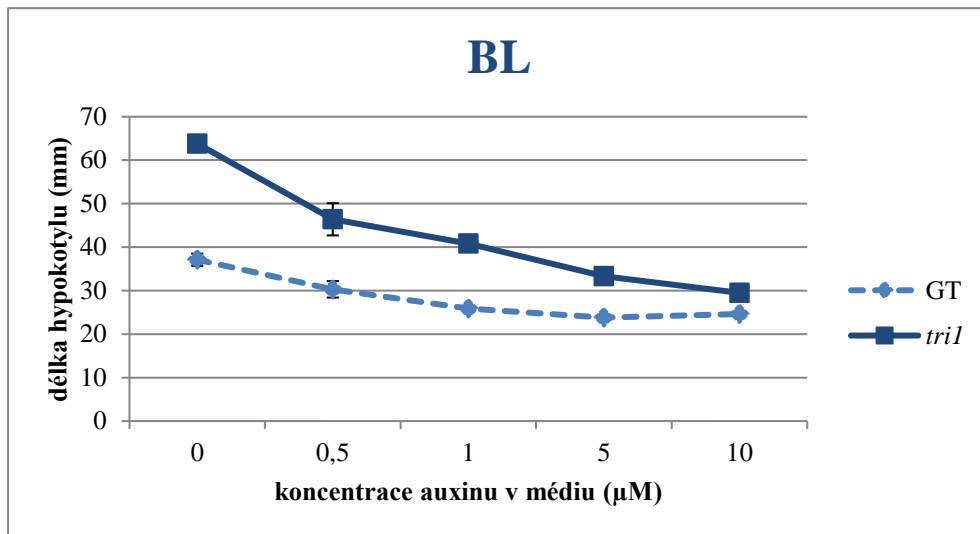
Vliv auxinu na růst hypokotylu v závislosti na světelných podmínkách

Při kultivaci rostlin ve tmě byl růst hypokotylu obou genotypů inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA (Obr. 4). Délka hypokotylu při absenci exogenního auxinu se u obou genotypů pohybovala kolem 140 mm, zatímco při nejvyšší použité koncentraci NAA byla délka hypokotylu u cv. GT i *tri1* asi 45 mm.



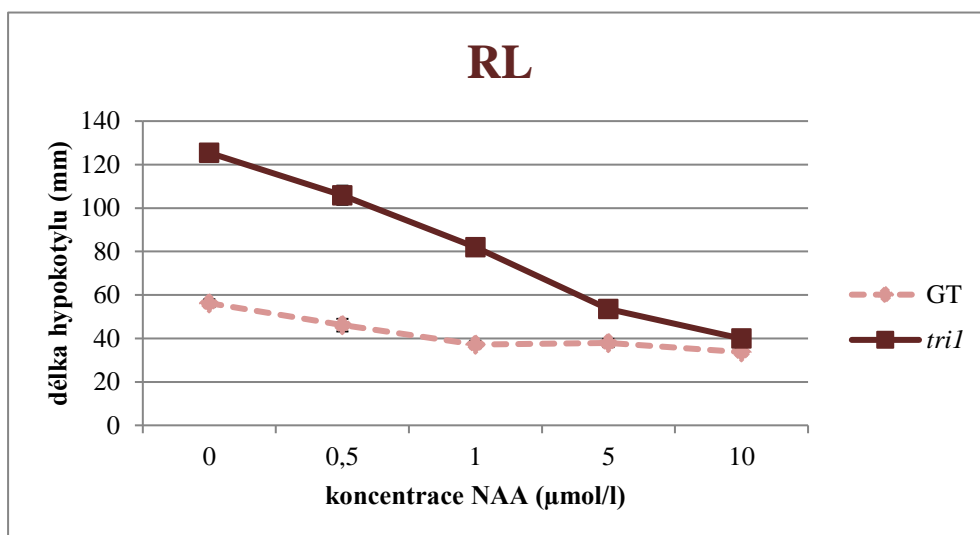
Obr. č. 4: Délky hypokotylu mutanta *tri1* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů ve tmě v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin na modrém světle byl růst hypokotylu opět inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA (Obr. 5). Délka hypokotylu při absenci exogenního auxinu se u *tril* pohybovala kolem 65 mm, u cv. GT jen kolem 40 mm. Při koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ NAA byla délka *tril* asi 30 mm a cv. GT přibližně 25 mm.



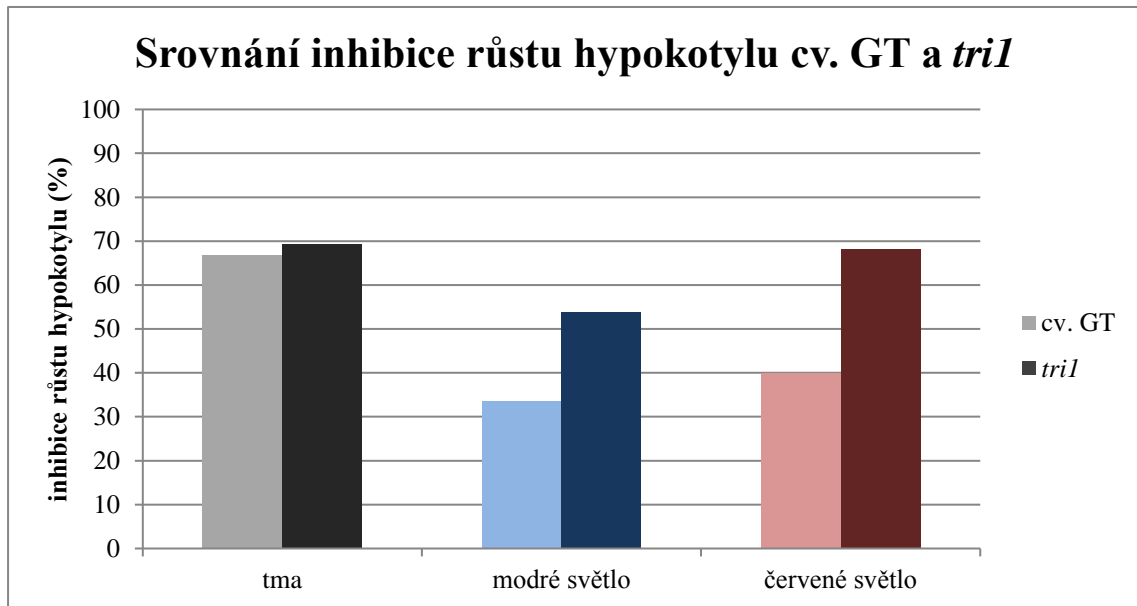
Obr. 5: Délky hypokotylu mutanta *tril* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů na modrém světle v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin na červeném světle byl růst hypokotylu inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA, u *tril* velmi výrazně (Obr. 6). Délka hypokotylu při absenci exogenního auxinu dosahovala průměrně 125 mm u mutanta *tril*, u cv. GT pouze 55 mm. Při nejvyšší použité koncentraci NAA se délka hypokotylu *tril* pohybovala kolem 40 mm, délka hypokotylu cv. GT kolem 35 mm.



Obr. 6: Délky hypokotylu mutanta *tril* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů na červeném světle v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

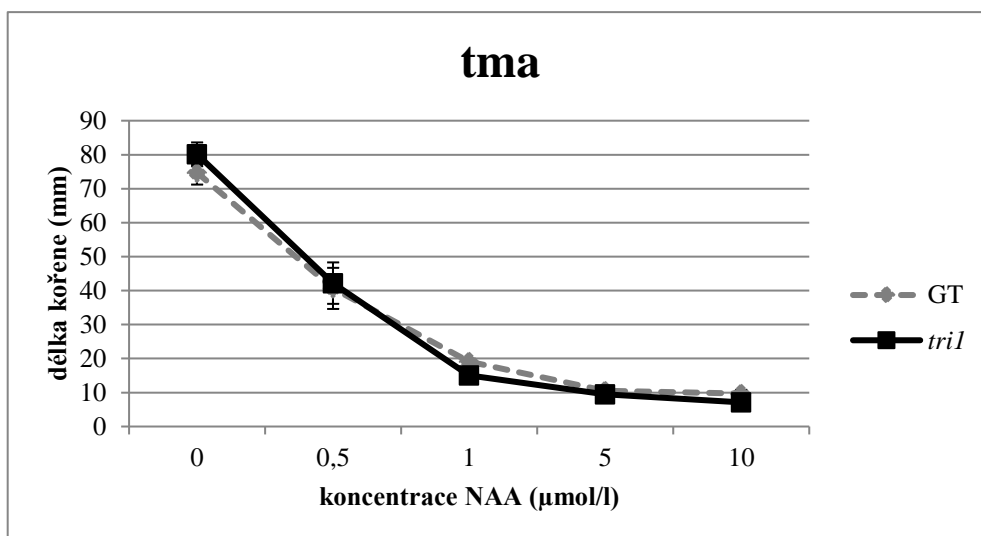
Obr. 7 ukazuje vliv světla na inhibiční účinky auxinu NAA (vybraná koncentrace 10 $\mu\text{mol/l}$) na růst hypokotylu. Při kultivaci rostlin ve tmě se inhibice růstu hypokotylu na médiu s koncentrací exogenního auxinu 10 $\mu\text{mol/l}$ pohybuje kolem 70 % jak u *tril*, tak u cv. GT. Při kultivaci rostlin na modrém a červeném světle je inhibice růstu hypokotylu kontrolního genotypu cv. GT výrazně nižší než ve tmě. Na modrém světle asi 35%, na červeném 40%. Naproti tomu, u mutantu *tril* červené světlo výrazně neovlivňovalo citlivost hypokotylu k NAA, protože procentuální inhibice růstu hypokotylu byla podobná jako u rostlin rostoucích ve tmě (kolem 70 %). Modré světlo pouze mírně snižovalo citlivostmutantatril k 10 $\mu\text{mol/l}$ NAA (inhibice pouze asi 55 %). Podobně tomu bylo i o ostatních testovaných koncentracích NAA.



Obr. č. 7: Inhibice růstu hypokotylu cv. GT a *tril* u rostlin rostoucích 7 dní na médiu s nejvyšší použitou koncentrací exogenního auxinu NAA (10 $\mu\text{mol/l}$) v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Data ukazují průměrné hodnoty inhibice získané ze tří nezávislých experimentů.

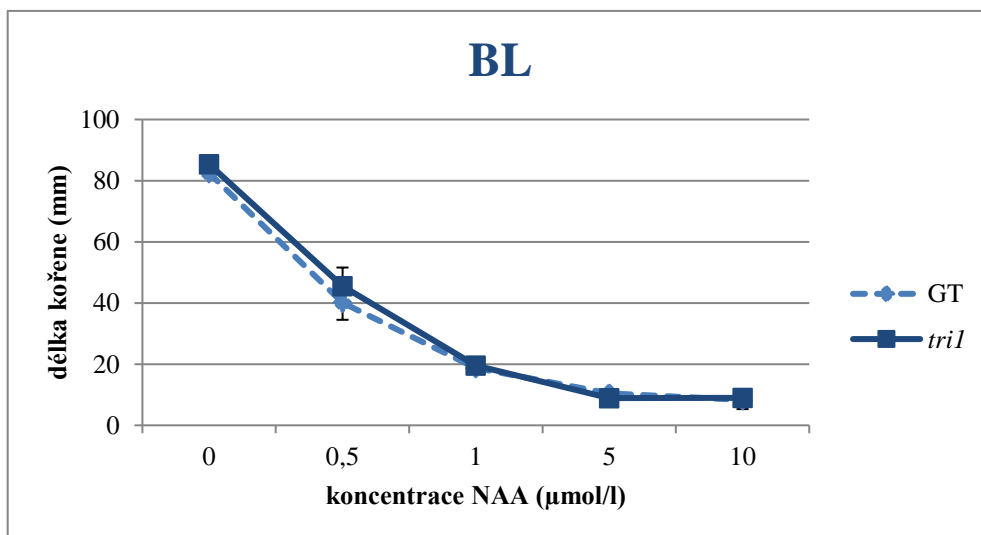
Vliv auxinu na růst kořene v závislosti na světelných podmínkách

Při kultivaci rostlin ve tmě byl růst kořene inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA (Obr. 8). Délka kořene při absenci exogenního auxinu se u obou genotypů pohybovala kolem 140 mm, při nejvyšší použité koncentraci NAA kolem 10 mm.



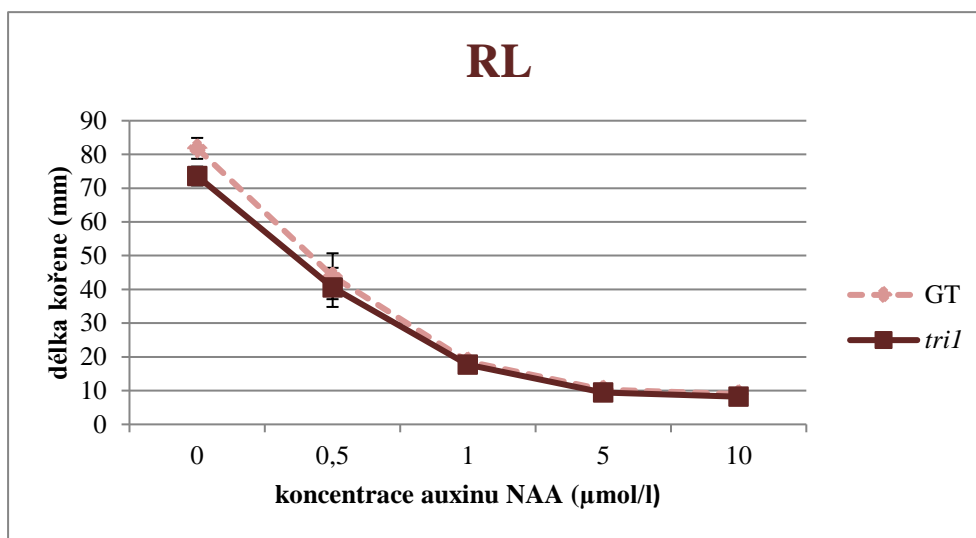
Obr. č. 8: Délky kořene mutanta *tril* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů ve tmě v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky kořene ± SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin na modrém světle byl růst kořene opět inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA (Obr. 9). Délka kořene při absenci exogenního auxinu se u *tril* i cv. GT pohybovala kolem 85 mm. Při koncentraci 10 µmol/l NAA byla délka kořene obou genotypů asi 10 mm.



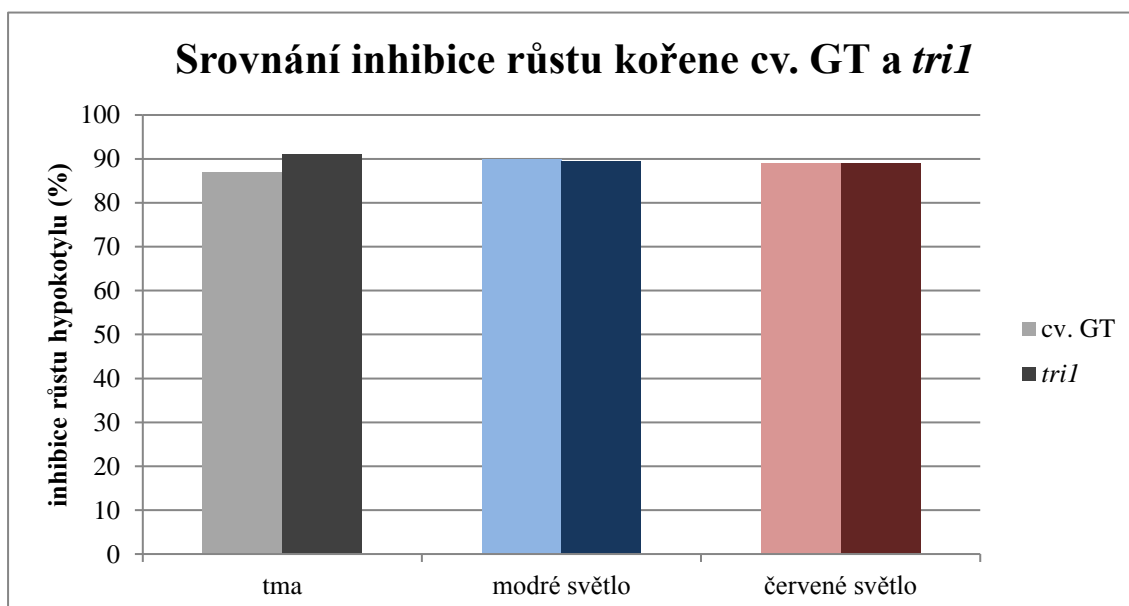
Obr. č. 9: Délky kořene mutanta *tril* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů na modrém světle v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky kořene ± SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin na červeném světle byl růst kořene inhibován se zvyšující se koncentrací auxinu NAA (Obr. 10). Délka kořene při absenci exogenního auxinu dosahovala asi 70 mm u mutantu *tri1*, u cv. GT 80 mm. Při nejvyšší použité koncentraci NAA se délka kořene *tri1* i cv. GT pohybovala kolem 10 mm.



Obr. č. 10: Délky kořene mutantu *tri1* a cv. GT u rostlin rostoucích 7 dnů na červeném světle v závislosti na koncentraci auxinu NAA. Data ukazují průměrné hodnoty délky kořene \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

Podobně jako u hypokotylu byl vliv auxinu na růst kořene vyjádřen v procentech. Růst kořene byl inhibován u obou genotypů se zvyšující se koncentrací exogenního auxinu NAA a za všech testovaných světelných podmínek. Jak ukazuje Obr. 11, inhibiční účinek auxinu (10 µmol/l) na růst kořene nebyl ovlivněn modrým ani červeným světlem, jelikož %inhibice růstu kořene vlivem auxinu byla za všech světelných podmínek podobná (kolem 90%). Podobně tomu bylo i o ostatních testovaných koncentracích NAA.



Obr. č. 11: Inhibice růstu kořene cv. GT a *tri1* u rostlin rostoucích 7 dní na médiu s nejvyšší použitou koncentrací exogenního auxinu (10 µmol/l) v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Data ukazují průměrné hodnoty inhibice získané ze tří nezávislých experimentů.

5. Diskuze

V této práci nás zajímalo, jak modré a červené světlo ovlivňuje citlivost rostlin rajčete k inhibičnímu účinku exogenního auxinu, konkrétně růstové reakce hypokotylu a kořene.

Výsledky této práce v první řadě potvrzují známý fakt, že modré i červené světlo inhibují růst hypokotylu (Obr. 4 až 6). Zvláště výrazná byla inhibice u kontrolního genotypu cv. GT. Naproti tomu u mutantu *tri1* byla de-etiolace způsobená červeným světlem velice nízká (ze 140 mm na 129 mm) a i na modrém světle byla mnohem nižší (ze 140 mm na 63 mm) než u cv. GT (ze 145 na 37 mm). Výsledky tedy potvrdily, že mutant *tri1* je opravdu méně citlivý především k červenému světlu než cv. GT.

Výsledky ukázaly, že světlo má výrazný vliv na citlivost rostlin k exogennímu auxinu. U rostlin rostoucích ve tmě při nejvyšší použité koncentraci exogenního auxinu NAA dosahovala inhibice růstu hypokotylu cv. GT téměř 70 %. Naproti tomu na modrém a červeném světle byla inhibice růstu hypokotylu auxinem o stejné koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ výrazně nižší, asi 35% na modrém a 40% na červeném světle. Podobný posun byl pozorován i u ostatních testovaných koncentrací NAA. Z výsledků je tedy zřejmé, že pokud rostliny rostly na modrém či červeném světle, byly výrazně odolnější k inhibičním účinkům aplikovaného auxinu. Je tedy možné učinit závěr, že modré i červené světlo snižují citlivost hypokotylu rajčete k inhibičním účinkům exogenního auxinu. U mutantu *tri1* byl podobný posun v citlivosti hypokotylu pozorován pouze na modrém světle, byl ale ve srovnání s cv. GT velice nízký. U červeného světla ke změně citlivosti hypokotylu k NAA nedocházelo vůbec. Jinými slovy lze říct, že mutant byl na červeném světle citlivý k auxinu podobně jako ve tmě. Z výsledků je tedy vidět, že necitlivost mutantu *tri1* ke světlu (defekt ve fotoreceptoru fytochromu B1) negativně ovlivnilo i jeho odolnost k negativnímu účinku auxinu – ukazoval vysokou citlivost k auxinu. Mutant *tri1* má defekt ve fytochromu B1, fotoreceptoru, který slouží k vnímání červeného a částečně i modrého světla. Z výsledků tedy vyplývá, že jednou z možností, jak červené a modré světlo snižuje citlivost rostlin k auxinu z hlediska růstu hypokotylu, je právě prostřednictvím fytochromu B1.

Na základě těchto výsledků je možno navrhnout vysvětlení, proč je mutant *tri1* k exogennímu auxinu citlivější než cv. GT. V teoretické části bylo zmíněno, že světlo může snižovat hladinu auxinu v pletivech rostlin. Je tedy pravděpodobné, že mutant *tri1* díky své nižší citlivosti ke světlu obsahuje vyšší hladinu endogenních auxinů než cv. GT (u *tri1* světlo nesníží hladinu auxinu v takovém rozsahu jako u cv. GT). Aplikace exogenního auxinu pak přispěje k navýšení celkové hladiny auxinů v pletivech na inhibiční hodnotu mnohem dříve u *tri1* než u cv. GT. Mutant *tri1* se pak projevuje jako citlivější k exogennímu auxinu než cv. GT.

Výsledky práce rovněž potvrdily další známý fakt, že na rozdíl od hypokotylu světlo stimuluje růst kořene. Dále bylo ukázáno, že exogenní auxin inhibuje prodlužovací růst kořene. Ze srovnání inhibičních účinků NAA na růst kořenů a hypokotylů však vidíme, že inhibice růstu kořene byla u obou genotypů (cv. GT i *tri1*) značně vysoká, a to již při nízkých koncentracích NAA. Je tedy zřejmé, že citlivost kořenů k inhibičním účinkům exogenního auxinu je mnohem vyšší než citlivost hypokotylů. Při těchto testovaných koncentracích NAA nebyly pozorovány výrazné odlišnosti v citlivosti kořenů auxinu ve tmě či na světle. To znamená, že při vyšších koncentracích exogenního auxinu NAA ($>0,5 \mu\text{mol/l}$) světlo citlivost kořene k auxinu nesnižuje. Bylo by potřeba otestovat mnohem nižší koncentrace auxinu, abychom byli schopni udělat definitivní závěr o vlivu světla na citlivost kořenů k exogennímu auxinu.

6. Závěr

Cílem mé práce bylo zjistit, jak kvalita světla ovlivňuje růstové reakce hypokotylu a kořene k exogennímu auxinu NAA v koncentracích vyšších než 0,5 $\mu\text{mol/l}$. Pomocí genetického přístupu, tedy srovnáním růstových reakcí cv. GT a od něj odvozeného mutantu *tri1* (deficientního ve fytochromu B1), jsem studovala, jakou konkrétní úlohu v těchto reakcích fytochrom B1 má.

Výsledky mé práce potvrdily, že světlo inhibuje růst hypokotylu a stimuluje růst kořene, a že v podmínkách *in vitro* exogenní auxin inhibuje růst hypokotylu i kořene. Z výsledků dále vyplývá, že světlo neovlivňuje působení auxinu NAA na růst kořene.

Mutant *tri1* rostoucí na světle je k exogennímu auxinu NAA citlivější, než kontrolní genotyp cv. GT. Je tedy zřejmé, že fytochrom B1 zprostředkuje vliv světla, především červeného, na snižování citlivosti hypokotylu rajčete k exogennímu auxinu NAA.

7. Seznam zkratek

IAA	kyselina indol-3-octová
NAA	kyselina 1-naftylactová
2,4-D	kyselina 2,4dichlorfenoxyoctová
PAA	kyselina fenylactová
NPA	kyselina naftylftalamová
TIBA	kyselina 2,3,5-trijodbenzoová
NOA	kyselina 1-naftoxyoctová
TIR	Transport Inhibitor Resistant
PIF	Phytochrome-Interacting factor
WT	wild-type - standardní typ, nemutovaná rostlina
SE	standardní chyba
MES	2- (N-morfolino) ethansulfonová kyselina
D	tma
BL	modré světlo
RL	červené světlo

8. Seznam použité literatury

- ALABADÍ D., BLÁZQUEZ M. A., Molecular interactions between light and hormone signaling to control plant growth. *Plant Molecular Biology* 69: 409-417, 2008
- BROWN D. E., RASHOTTE A. M., MURPHY A. S., NORMANLY J., TAGUE B. W., PEER W., TAIZ L., MUDAY G., Flavonoids act as negative regulators of auxin transport in vivo in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 126: 524-535, 2001
- CASTILLON A., SHEN H., HUQ E., Phytochrome interacting factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in plant science* 12: 514-521, 2007
- CAMPBELL N. A., REECE J. B., *Biologie*. Brno: Computer Press, c2006. ISBN 80-251-1178-4.
- DESNOS T., ORBOVIC V., BELLINI C., KRONENBERGER J., CABOCHE M., TRAAS J., HOFTE H., *Procuste1* mutants identify two distinct genetic pathways controlling hypocotyl cell elongation, respectively, in dark- and light- grown *Arabidopsis* seedlings. *Development* 122: 683-693, 1996
- DEVLIN P. F., YANKOVSKY M. J., KAY S. A., A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133: 1617–1629, 2003
- DHARMASIRI N., DHARMASIRI S., ESTELLE M., The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 441-445, 2005
- FLASIŃSKY M., HAC-WYDRO K., Natural vs synthetic auxin: Studies on the interactions between plant hormones and biological membrane lipids. *Environmental Research* 133: 123-34, 2014
- FRIML J., WIŚNIEWSKA J., BENKOVÁ E., MENDGEN K., PALME K., Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415: 806-809, 2002
- GOLDSMITH M., GOLDSMITH T., Chemiosmotic model for polar transport of auxin. *Plant Physiology* 59: 90-90, 1977
- GRAY W. M., OSTIN A., SANDBERG G., ROMANO C. P., ESTELLE M., High temperature promotes auxin-mediated hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 95: 7197-7202, 1998
- HALLIDAY K. J., FANKHAUSER C., Phytochrome-hormonal signaling networks. *New Phytologist* 157: 449–459, 2003
- HALLIDAY K. J., MARTINEZ-GARCÍA J. F., JOSSE E., Integration of Light and Auxin Signaling, *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1: 15-86, 2009
- HOECKER U., ORTIZ G. T., BENDER J., QUAIL P. H., The photomorphogenesis-related mutant *red1* is defective in CYP83B1, a red light-induced gene encoding a cytochrome P450 required for normal auxin homeostasis. *Planta* 219: 195-200, 2004

- IINO M., Inhibitory action of red light on the growth of the maize mesocotyl: Evaluation of the auxin hypothesis. *Planta* 156: 388, 1982
- JACOBS M., RUBERY P. H., Naturally occurring auxin transport regulators. *Science* 241: 346-349, 1988
- JENSEN P. J., HANGARTER R. P., ESTELLE M., Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116: 455-462, 1998
- KENDRICK R. E., KERCKHOFFS L. H. J., VAN TUINEN A., KOORNNEEF M., Photomorphogenic mutants of tomato, *Blackwell Science Ltd* 20: 746-751, 1997
- KEPINSKI S., LEYSER O., The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435: 446-451, 2005
- KIM J. I., SHARKHUU A., JIN J. B., LI P., JEONG J. C., BAEK D., LEE S. Y., BLAKESLEE J. J., MURPHY A. S., BOHNERT H. J., *yucca6*, a dominant station in *Arabidopsis*, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiology* 145: 722-735, 2007
- LORRAINE S., GENOUD T., FRANKHAUSER C., Let there be light in the nucleus! *Current Opinion in Plant Biology* 9: 509-514, 2006
- MURASHIGE T., SKOOG F., A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497, 1962
- NISHIMURA T., MORI Y., FURUKAWA T., KADOTA A., KOSHIBA T., Red light causes a reduction in IAA levels at the apical tip by inhibiting de novo biosynthesis from tryptophan in maize coleoptile. *Planta* 224: 1427-1435, 2006
- RAVEN J. A., Transport of indole-3-acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* 74: 163-172, 1975
- RUBERY P. H., SHELDRAKE A. R., Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature New Biology* 244: 285-288, 1973
- SALISBURY F. J., HALL A., GRIERSON C. S., HALLIDAY K. J., Phytochrome coordinates *Arabidopsis* shoot and root development. *Plant Journal* 50: 429-438, 2007
- TAIZ L., ZEIGER E., *Plant Physiology*, 5th ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers Sunderland, MA, USA, 2010. ISBN: 0878938664
- TAO Y., FERRER J. L., LJUNG K., POJER F., HONG F., LONG J. A., LI L., MORENO J. E., BOWMAN M. E., IVANS L. J., CHENG Y., LIM J., ZHAO Y., BALLARE C. L., SANDBERG G., NOEL J. P., CHORY J., Rapid synthesis of auxin via a new tryptofan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133: 164-176, 2008

TIAN Q., REED J. W., Molecular links between light and auxin signaling pathways. *Journal of Plant Growth Regulation* 20: 274-280, 2001

VAN TUINEN A., A Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato Lacks a Light-Stable, Blike Phytochrome, *Plant Physiology* 108: 939-947, 1995

ZHAO Y., CHRISTENSEN S. K., FANKHAUSER C., CASHMAN J. R., COHEN J. D., WEIGEL D., CHORY J., A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science* 291: 306-309, 2001

9. Internetové zdroje

<http://aix-slx.upol.cz/~fellner/> [vid. 19. května 2018]

<http://slideplayer.com/slide/4980549/> [vid. 20. května 2018]

<https://alchetron.com/Polar-auxin-transport> [vid. 20. května 2018]