

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Úloha fytochromů v regulaci exprese auxinových transportérů v hypokotylech rajčete *Solanum lycopersicum* L.

Anna Hýsková

STŘEDOŠKOLSKÁ ODBORNÁ ČINNOST

Obor č. 4: Biologie

Úloha fytochromů v regulaci exprese auxinových transportérů v hypokotylech rajčete *Solanum lycopersicum* L.

*The role of phytochromes in regulation
of auxin transporter expression in hypocotyls
of *Solanum lycopersicum* L.*

Autor: Anna Hýsková

Škola: Gymnázium J. A. Komenského a Jazyková škola s právem
státní jazykové zkoušky Uherský Brod, Komenského 169, 688 01

Kraj: Zlínský kraj

Konzultant: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

Výzkum byl proveden v Laboratoři růstových regulátorů, společném pracovišti Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky pod záštitou projektu Badatel, který je podporován Přírodovědeckou fakultou Univerzity Palackého v Olomouci.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svou práci SOČ vypracovala samostatně a použila jsem pouze prameny a literaturu uvedené v seznamu bibliografických záznamů.

Prohlašuji, že tištěná verze a elektronická verze soutěžní práce SOČ jsou shodné.

Nemám závažný důvod proti zpřístupnění této práce v souladu se zákonem č. 121/2000 Sb., o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších předpisů.

V Luhačovicích dne 15. 3. 2020

Anna Hýsková

Poděkování

Mé největší poděkování patří panu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za možnost být součástí Laboratoře růstových regulátorů, zasvěcení do problematiky a nekonečnou trpělivost při konzultaci výsledků a vypracování této práce. Jsem mu velmi vděčná za všechny poskytnuté rady a předané zkušenosti.

Za seznámení s metodami, trávení dnů se mnou v laboratoři, ochotu s čímkoliv mi pomoci a schopnost kdykoliv mě rozesmát velmi děkuji Bc. Janě Glogarové.

Velké poděkování patří také panu Mgr. Aleši Pěňčíkovi, Ph.D. za představení metod pro kvantitativní analýzu fytohormonů a možnost zpracovat vzorky pod jeho vedením.

Děkuji učitelskému sboru Gymnázia J. A. Komenského, zejména Mgr. Lence Ertlové, a Mgr. Veronice Říhové za vstřícnost, podporu a cenné rady.

A v neposlední řadě děkuji svým přátelům a své rodině za neustálou podporu.

Anotace

Světlo je pro rostliny, jakožto fotoautotrofní organismy, zásadním faktorem – jednak je nezbytné pro průběh fotosyntézy, jednak rostlinám poskytuje spolehlivé informace o čase i o aktuálních podmínkách na stanovišti. Na měnící se světelné podmínky rostlina reaguje regulací svého růstu a vývoje, tento proces se nazývá fotomorfogeneze. Mezi mechanismy, kterými světlo odpovědi rostlin zprostředkuje, patří mimo jiné také regulace hladiny a transportu rostlinných hormonů auxinů.

Tato práce navazuje na předchozí práci SOČ, v rámci které byly navrženy hypotézy popisující vliv světla na růst rostlin skrze fotoreceptory červeného světla fytochromy a fytohormony auxiny. Cílem letošní práce bylo zjistit o těchto mechanismech další podrobnosti, a to pomocí relativní kvantifikace exprese genů pro přenašeče auxinů *SIPIN1* a *SILAX4* a analýzou hladiny auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) kultivovaných *in vitro* ve tmě, na modrém a na červeném světle. Úloha fytochromů v signálních drahách byla zjišťována analýzou mutanta *tril* s defektem ve *PhyB1* a mutanta *yg-2* deficientního ve chromoforu fytochromů.

Výsledky experimentů ukázaly, že červené světlo snižuje expresi genu *SIPIN1* prostřednictvím *PhyB1*, na expresi genu *SILAX4* však zásadní vliv nemá. Působením modrého světla dochází ke snížení exprese genů *SIPIN1* i *SILAX4*, tento děj je však zprostředkován jinými fotoreceptory než fytochromy. Světlo rovněž ovlivňuje hladinu kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin, na množství auxinů však zásadní vliv nemá.

Tato práce tak přináší nové informace o vzájemných interakcích světla a rostlinných hormonů při regulaci růstu a vývoje rostlin a otevírá mnoho otázek, které jsou příležitostí k dalšímu výzkumu.

Klíčová slova: auxin, červené světlo, exprese genů, fytochromy, hypokotyl, modré světlo, polární transport auxinu, růst, *SILAX4*, *SIPIN1*, *Solanum lycopersicum*

Annotation

Light is an essential factor for plants as photoautotrophs – it is necessary for course of photosynthesis and it provides plants with reliable information about time and current conditions of their habitat, as well. Plants dynamically adjust their architecture to optimize growth and performance under fluctuating light environments, a process termed photomorphogenesis. Among the mechanisms by which light mediates plant responses belongs regulation of the level and transport of phytohormone auxin.

This thesis follows research summarized in the previous SOČ, in which the hypothesis was proposed explaining how light could influence plant growth and development via red light photoreceptors phytochromes and phytohormone auxin. The main purpose of this thesis was to find out more details about these mechanisms. Methods included relative quantification of gene expression of auxin transporters *SILAX4* and *SIPIN1* and analysis of auxin and abscisic acid in hypocotyls of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plants were grown *in vitro* in the dark, in blue light and in red light. The role of phytochromes in these pathways was examined by analysis of mutant *tri1* with the defect in PhyB1 and mutant *yg-2* deficient in phytochrome chromophore.

The results of performed experiments showed that red light decreased expression of *SIPIN1* gene via PhyB1. However, red light has almost no effect on *SILAX4* expression. Blue light reduces gene expression of both *SIPIN1* and *SILAX4* but this action is likely mediated by photoreceptors other than phytochromes. Light also influences concentration of abscisic acid in plant hypocotyls, nevertheless it has minimal effect on concentration of auxin.

This thesis brings new information about interactions of light and auxins in plant growth and development as well as raises new questions for further research.

Keywords: auxin, blue light, gene expression, growth, hypocotyl, phytochromes, polar auxin transport, red light, *SILAX4*, *SIPIN1*, *Solanum lycopersicum*

Obsah

1	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	9
2	ÚVOD.....	12
3	TEORETICKÝ ÚVOD.....	13
3.1	Růst rostlin.....	13
3.2	Reakce rostlin na vnější podněty.....	13
3.2.1	Reakce rostlin na světlo.....	14
3.2.2	Fotoreceptory.....	14
3.2.3	Receptory červeného světla.....	14
3.2.4	Receptory modrého světla.....	17
3.2.5	Receptory UV-B záření.....	19
3.3	Rostlinné hormony.....	19
3.3.1	Auxin.....	20
3.3.2	Kyselina abscisová.....	23
3.4	Interakce signálních drah auxinu a světla.....	24
3.4.1	Světlo ovlivňuje hladinu auxinu.....	25
3.4.2	Světlo ovlivňuje polární transport auxinu.....	25
3.4.3	Světlo a auxin sdílí cílové geny.....	26
3.4.4	Integrace signálních drah auxinu a světla.....	27
4	PŘEDCHOZÍ VÝSLEDKY A CÍLE PRÁCE.....	29
5	MATERIÁL A METODIKA.....	31
5.1	Rostlinný materiál.....	31
5.2	Příprava kultivačního média Murashige and Skoog.....	31
5.3	Pěstování rostlin, sklizeň a drcení vzorků.....	31
5.4	Kvantitativní analýza auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin ...	32
5.4.1	Extrakce auxinu a kyseliny abscisové.....	33
5.4.2	Kvantifikace auxinu a kyseliny abscisové.....	33
5.5	Relativní kvantifikace transkripce genů kódujících přenašeče auxinu.....	34
5.5.1	Extrakce a izolace RNA s použitím Isolate II RNA Plant Kit (Bioline) ..	34
5.5.2	Přečištění izolované RNA.....	35
5.5.3	Měření koncentrace RNA.....	35
5.5.4	Kontrola čistoty RNA pomocí PCR.....	36

5.5.5	Gelová agarózová elektroforéza.....	36
5.5.6	Syntéza cDNA s použitím SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline) .	37
5.5.7	Kontrola nasyntetizované cDNA.....	38
5.5.8	Kvantitativní Real-time PCR.....	38
5.5.9	Analýza dat	42
6	VÝSLEDKY	43
6.1	Relativní kvantifikace exprese genů pro transportéry auxinu	43
6.1.1	Exprese genu <i>SIPINI</i> v hypokotylech cv. GT a mutanta <i>tri1</i>	43
6.1.2	Exprese genu <i>SIPINI</i> v hypokotylech cv. Kokomo a mutanta <i>yg-2</i>	44
6.1.3	Exprese genu <i>SILAX4</i> v hypokotylech cv. GT a mutanta <i>tri1</i>	44
6.1.4	Exprese genu <i>SILAX4</i> v hypokotylech cv. Kokomo a mutanta <i>yg-2</i>	45
6.2	Kvantitativní analýza auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin ...	46
6.2.1	Množství IAA v hypokotylech rostlin	46
6.2.2	Množství ABA v hypokotylech rostlin	47
7	DISKUZE.....	48
7.1	Vliv světla na expresi genu <i>SIPINI</i>	48
7.2	Vliv světla na expresi genu <i>SILAX4</i>	49
7.3	Vliv světla na hladinu IAA v hypokotylech rostlin.....	49
7.4	Vliv světla na hladinu ABA v hypokotylech rostlin	50
7.5	Další možnosti výzkumu.....	50
8	ZÁVĚR.....	51
9	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	53
10	ZDROJE OBRÁZKŮ	66

1 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA – kyselina abscisová

ABCB – ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B

ABCG – ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY G

ABP1 – AUXIN BINDING PROTEIN 1

ARF – AUXIN RESPONSE FACTORS

ATHB2 – ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 2

ATHB4 – ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 4

ATP – adenosin trifosfát

Aux/IAA – Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID

AUX1/LAX – AUXIN1/LIKE AUX1

AXR2/IAA7 – AUXIN RESISTANT 2/INDOLE ACETIC ACID 7

A260 – absorbance vlnové délky 260 nm

BIC – BLUE-LIGHT INHIBITOR OF CRYPTOCHROMES 1

BL – *blue light*, modré světlo

CCA1 – CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1

cDNA – komplementární DNA

CIB – CRY2-INTERACTING-BASIC-HELIX-LOOP-HELIX

COPI – CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1

Cry – *cryptochrome*, kryptochrom

C_t – *cycle of threshold*

D – *dark*, tma

dNTP – deoxyribonukleosid trifosfát

DTX50 – DETOXIFICATION 50

EDTA – ethylendiamintetraoctové kyseliny

FAD – flavinadenindinukleotid

FKF1 – FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1

FMN – flavinadeninmononukleotid

FR-HIR – *FR-high irradiance response*, reakce k vysoké ozáření

FW – *fresh weight*

GAPDH – gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu

GH3 – GRETCHEN HAGEN 3

H⁺-ATPáza – protonová pumpa

HYH – HY5 HOMOLOG
HY5 – ELONGATED HYPOCOTYL 5
HFR1 – LONG HYPOCOTYL IN FAR RED 1
IAA – indol-3-octová kyselina
IAA19 – INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19
IAA29 – INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29
IAOx – indol-3-acetaldoximu
IBA – indol-3-máselná kyselina
IPA – indol-3-pyruvát
LAF1 – LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1
LC/MS-MS – *liquid chromatography/tandem mass spectrometry*, tandemová hmotnostní spektrometrie spojená s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií
LFR – *low fluence responses*, reakce k nízké ozáření
LHY – LATE ELONGATED HYPOCOTYL
LKP2 – LOV KELCH PROTEIN 2
LOV – *light oxygen voltage* doména
MES – 2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina
mRNA – messenger RNA
MS – kultivační médium Murashige-Skoog
NAA – 1-naftylactová kyselina
NPA – naftylftalamová kyselina
NPF – NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER
PAA – fenylactová kyselina
PAPP5 – PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 5
PAR – PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED
PCR – *polymerase chain reaction*, polymerázová řetězová reakce
Pfr – fyziologicky aktivní forma fytochromu
Phot – *phototropin*, fototropin
Phy – *phytochrome*, fytochrom
PIF – PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS
PIL1 – PIF3-LIKE 1
PIL2 – PIF3-LIKE 2
PIN – PIN-FORMED proteiny
PKS1 – PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1

PP2Acs – SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A

PP2C – PROTEIN PHOSPHATASE 2C

Pr – fyziologicky neaktivní forma fytochromu

PYR1/PYL/RCAR – PYRABACTIN RESISTANCE 1/PYR1-LIKE/REGULATORY
COMPONENTS OF ABA RECEPTORS

RL – *red light*, červené světlo

ROP-GTPase – Rho OF PLANTS-GTPase

rpm – *revolutions per minute*, otáčky za minutu

RVE1 – REVEILLE 1

SAUR – SMALL AUXIN UP-REGULATED

SCF – SKP1–CUL1–F-box

SE – *standard error*, standardní chyba

SKP2a – S-PHASE-KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2a

SLR/IAA14 – SOLITARY ROOT/INDOLE ACETIC ACID 14

SnRK2E/OST1 – SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE SRK2E/OPEN STOMATA 1

SPA – SUPPRESSOR OF PHYA-105

SUR2 – SUPERROOT 2

TAA1 – TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1

TBE – *tris/borate/EDTA*

TIR1/AFB – TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX
PROTEIN

tri1 – *temporarily red light-insensitive 1*

Trp – tryptofan

UV – *ultraviolet*, ultrafialové záření

UVR8 – *UV RESISTANCE LOCUS 8*

VLFR – *very-low fluence responses*, reakce k velmi nízké ozáření

yg-2 – *yellow-green-2*

WT – wild type, nemutovaný kontrolní genotyp

ZTL – *ZEITLUPE*

2,4-D – 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina

4-Cl-IAA – 4-chlor-indol-3-octová kyselina

2 ÚVOD

Světlo je pro život rostlin zcela zásadní. Jednak je zdrojem energie pro fotosyntézu, jednak rostlinám poskytuje informace o čase i o aktuálních podmínkách na stanovišti, na které se rostlina musí co nejlépe adaptovat prostřednictvím regulace svého růstu a vývoje.

Informace poskytované světlem rostlina přijímá pomocí fotoreceptorů, mezi ty nejdůležitější patří kryptochromy, fototropiny a fytochromy. Fotoreceptory aktivované světlem pak spouští dráhy přenosu signálu, které vedou až ke specifické odpovědi rostliny. Významným elementem těchto signálních drah je rostlinný hormon auxin, který na buněčné úrovni stimuluje růst buněk, čímž zajišťuje prodlužovací růst stonku a kořene. Z mnoha studií vyplývá, že odpovědi rostlin na světlo mohou být zprostředkovány snížením hladiny auxinu v pletivech (Iino, 1982; Nishimura, 2006), snížením citlivosti buněk na auxin (Jones *et al.*, 1991) nebo regulací polárního transportu auxinu (Behringer *et Davies*, 1992). Některé mechanismy interakce světla a auxinů při regulaci růstu a vývoje rostlin však zatím nejsou dostatečně vysvětleny.

V minulé práci SOČ s názvem „Interakce světla a auxinů v růstu a vývoji rostlin“ bylo na modelové rostlině rajčeti jedlém (*Solanum lycopersicum* L.) zkoumáno, jak světlo interaguje s auxiny při regulaci růstu rostlin a zda mohou být růstové reakce rostlin na světlo zprostředkovány skrze fotoreceptory červeného světla fytochromy, konkrétně PhyB1. Výsledky vedly k navržení hypotéz vysvětlujících mechanismy vlivu světla na hladinu endogenních auxinů v pletivech a na polární transport auxinu.

Cílem této práce bylo ověřit pravdivost těchto hypotéz analýzou exogenních auxinů a zjišťováním exprese genů zapojených v polárním transportu auxinu pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce.

3 TEORETICKÝ ÚVOD

3.1 Růst rostlin

Téměř všechny rostliny jsou fotoautotrofní organismy, což znamená, že energii pro syntézu organických sloučenin získávají ze slunečního záření a jako zdroj uhlíku jim slouží atmosférický CO₂. Rostliny tedy přizpůsobily svou anatomii potřebě efektivně zachycovat sluneční záření a získávat z něj energii. V důsledku toho ale nejsou schopné pohybu z místa na místo, nemohou se přemístit do prostředí s optimálními podmínkami a musí se adaptovat na podmínky jejich aktuálního stanoviště. Tohoto přizpůsobení rostliny dosahují regulací svého růstu a vývoje.

Rostliny jsou modulární organismy, to znamená, že se jejich tělo skládá z proměnlivého počtu opakujících se modulů. Díky tomu jsou značně plastické, dokážou se rychle adaptovat na změny vnějších podmínek a jejich růst je neukončený (Taiz *et* Zeiger, 2010).

Vývoj rostlin se dělí na tři hlavní etapy: embryogenezi, vegetativní vývoj a reprodukční vývoj. Při embryogenezi dochází k dělení zygoty a její transformaci v embryo se základem děložních listů, hypokotylu a kořene, které je pak obsaženo v semeni. Po vyklíčení zahájí rostlina období vegetativního růstu. Mladé semenáčky nejprve čerpají ze zásob uložených v dělohách či endospermu, později začínají využívat jako zdroj energie sluneční záření. Svou základní podobu rostliny získávají díky aktivitě apikálních meristémů, které zajišťují primární růst, tedy prodlužování. Tato primární dělivá pletiva, která se nachází na vrcholu kořene a stonku, jsou rezervoárem buněk se schopností proliferace. Dělením a diferenciací buněk apikálního meristému stonku vznikají primární pletiva stonku a listů, dělením a diferenciací buněk apikálního meristému kořene vznikají primární pletiva kořene. Druhotné tloušťnutí kořene a stonku, neboli sekundární růst, je zajišťován sekundárními laterálními meristémy vzniklými činností apikálního meristému, mezi které patří kambium a felogen. Dělením kambia vzniká sekundární xylém a sekundární floém, činností felogenu vzniká sekundární krycí pletivo periderm, který je tvořen felogenem a vrstvou korku. Mezi sekundární meristémy patří i latentní sekundární meristémy, které se dělí pouze za určitých podmínek. Latentním meristémem je například pericykl, který tvoří vnější vrstvu buněk středního válce kořene a dává vzniknout postranním kořenům. Reprodukční vývoj rostliny je zajištěn změnou vegetativního meristému na meristém květenství tvořící listeny, v jejichž úžlabí pak vzniká meristém květu (Gifford *et* Foster, 1987; Taiz *et* Zeiger, 2010; Campbell, 2016).

3.2 Reakce rostlin na vnější podněty

Přesný program vývoje rostlin není předem dán a silně závisí na interakci konkrétního organismu s prostředím. Mezi faktory vnějšího prostředí ovlivňující růst a vývoj rostlin patří gravitace, mechanické stimuly a různé environmentální stresory, například sucho, zaplavování, vysoká salinita, extrémní teploty nebo přítomnost patogenů či herbivorů. Pravděpodobně nejdůležitějším signálem vnějšího prostředí je ale pro rostliny světlo (Kendrick *et* Kronenberg, 1994; Campbell, 2016).

3.2.1 Reakce rostlin na světlo

Světlo slouží rostlinám především jako zdroj energie, kromě toho je ale také stěžejním signálem, který poskytuje rostlinám informace o vnějším prostředí či o čase. Pro rostlinu je důležité vyhodnotit množství, směr a složení spektra světla a na základě těchto informací regulovat svůj růst a vývoj tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii co nejefektivněji. Proces, při kterém světlo jako signál změní vývoj rostliny, se nazývá fotomorfogeneze (Kendrick *et* Kronenberg, 1994; Parks, 2003).

Když semena klíčí pod zemí, nedostává se k nim žádné světlo potřebné k fotosyntéze a mladá rostlina je vyživována pouze ze zásob v semeni. Proto investuje energii hlavně do prodlužování stonku, netvoří chlorofyl ani listy – v důsledku toho má rostlina rostoucí ve tmě velmi dlouhý, tenký, světlý hypokotyl s apikálním háčkem, nevyvinuté listy a redukované kořeny. Toto přizpůsobení umožňuje výhonkům prorazit půdou dříve, než dojde k vyčerpání zásoby živin v semeni či v hlíze, a označuje se jako skotomorfogeneze.

Jakmile výhonek prorazí na světlo, dojde k přechodu od skotomorfogeneze k fotomorfogenezi – tzv. deetiolaci – a morfologie i biochemie rostliny projde velkými změnami. Prodlužování stonku se zpomalí, apikální háček se začne narovnávat, dojde k prodlužování kořenů, vývoji listů a syntéze pigmentů charakteristických pro zelené rostliny, především chlorofylu (Taiz *et* Zeiger, 2010; Campbell, 2013).

3.2.2 Fotoreceptory

Aby vnější signál vyvolal v organismu fyziologickou odpověď, musí jeho buňky obsahovat molekulu citlivou na daný signál, tzv. receptor. Receptory, které slouží pro detekci světla, se nazývají fotoreceptory. Kvůli neustálé potřebě monitorovat okolní světelné podmínky, vnímat jejich změny a získávat informace o různých vlnových délkách dopadajícího světla došlo u rostlin k vývoji pěti skupin fotoreceptorů, které můžeme obecně rozdělit na receptory červeného světla, receptory modrého světla a receptory pro středněvlnné ultrafialové záření (UV-B) (Paik *et* Huq, 2019).

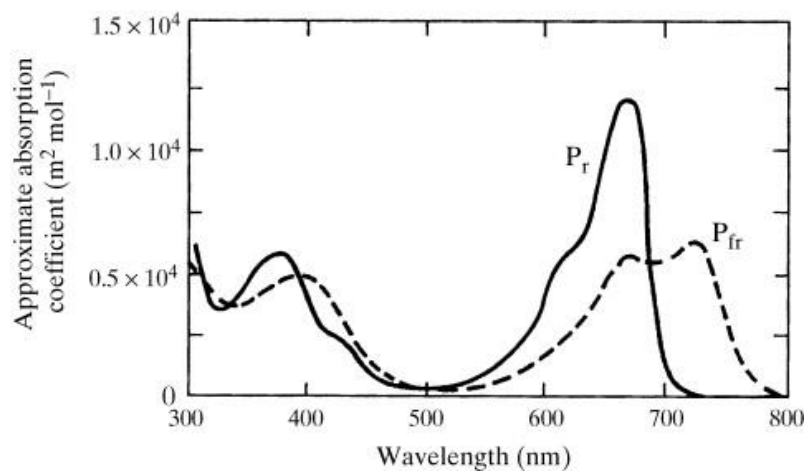
Přestože každá skupina fotoreceptorů používá jiné mechanismy přenosu signálu, všechny fotoreceptory sdílí některé obecné vlastnosti. Za prvé, energie přijatého fotonu se projeví změnou molekulární struktury fotoreceptoru, která vede k jeho aktivaci. Za druhé, aktivovaný receptor předává informaci signálním proteinům přímou interakcí a způsobením biochemické či fyzikální změny daného proteinu. Za třetí, pro každý fotoreceptor existuje mechanismus jeho deaktivace, který slouží k vyladění signálních kaskád. Díky několika skupinám fotoreceptorů s rozdílnými, ale vzájemně se překrývajícími funkcemi, mohou rostliny monitorovat okolní prostředí a zajistit správné fyziologické odpovědi (Paik *et* Huq, 2019).

3.2.3 Receptory červeného světla

Červené světlo je vnímáno skupinou úzce příbuzných proteinů, které se nazývají fytochromy. Fungují jako dimery, každá podjednotka se skládá z chromoforu kovalentně vázaného na apoprotein. Ve tmě jsou fytochromy lokalizovány v cytoplazmě a jejich chromoforem

je lineární tetrapyrrol označovaný jako fytochromobilin, který je syntetizován uvnitř plastidů z hemu.

Fytochromy (Phy) se v rostlinách nachází ve dvou vzájemně konvertibilních formách – Pr a Pfr. Pr je forma fytochromu absorbující červené světlo o vlnové délce 650 – 680 nm, která se nachází v cytoplazmě. Tato neaktivní forma je vystavením červenému světlu změněna na fyziologicky aktivní formu Pfr absorbující dlouhovlnné červené světlo o vlnové délce 710 – 740 nm (Obr. 1). Pfr může být změněna zpět na Pr buď působením dlouhovlnného červeného světla, nebo spontánně po delší době procesem zvaným temnostní reverze. Tato vlastnost je označována jako fotoreverzibilita (Taiz *et Zeiger*, 2010). Přestože monochromatické červené ani dlouhovlnné červené světlo se v přírodě nevyskytuje, přirozené světelné podmínky představují poměr červeného a dlouhovlnného červeného světla, který mohou rostliny vnímat právě pomocí fytochromů.

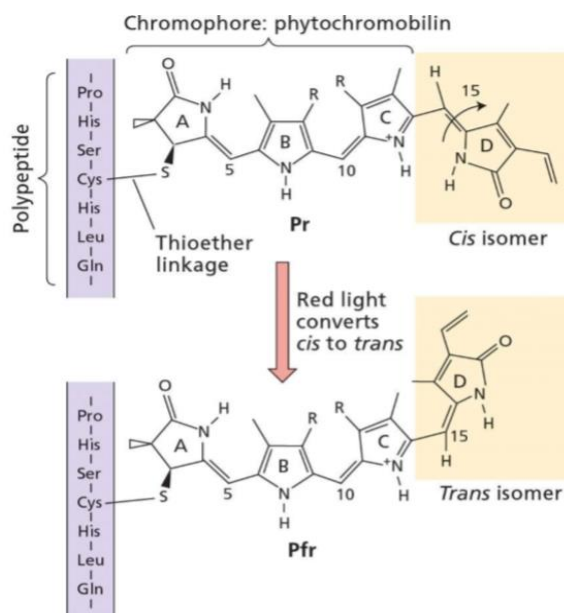


Obr. 1: Absorpční spektrum fytochromů ve formě Pr a Pfr. Mimo jiné lze z grafu vyčíst, že fytochromy absorbují kromě červeného a dlouhovlnného červeného světla i modré světlo. Převzato z Nobel, 2009

Absorpce červeného světla chromoforem způsobí změnu jeho konformace z cis-cis-cis do cis-cis-trans (Obr. 2). To má za následek změnu konformace apoproteinu z Pr do fyziologicky aktivní formy Pfr. V této formě získá fytochrom schopnost autofosforylace, kinázovou aktivitu a schopnost translokace do jádra. Díky kinázové aktivitě způsobí fosforylaci proteinů PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS (PIF), transkripčních faktorů, které slouží jako negativní regulátory odpovědi regulovaných fytochromy. V důsledku fosforylace jsou poté PIF proteiny degradovány v proteazomu (Ni *et al.*, 1998; Shin *et al.*, 2009). Menší část světlem aktivovaných fytochromů zůstává v cytosolu, kde zprostředkuje rychlé odpovědi regulací membránového potenciálu a toku iontů (Rösler *et al.*, 2007). Byly také identifikovány cytosolické proteiny, které s fytochromy interagují. Patří mezi ně například protein PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1 (PKS1) (Fankhauser *et al.*, 1999) nebo fosfatáza PHYTOCHROME-ASSOCIATED PROTEIN PHOSPHATASE 5 (PAPP5), která je pravděpodobně zapojena do defosforylace aktivní formy fytochromu (Ryu *et al.*, 2005).

Fytochromy také přímo inaktivují hlavní negativní regulátor světlem indukovaných signálních drah, který se nazývá CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1 (COP1) a SUPPRESSOR OF PHYA-105 (SPA) E3 ligáza (Lu *et al.*, 2015; Sheerin *et al.*, 2015).

V aktivní formě tento komplex zajišťuje degradaci několika transkripčních faktorů, které zprostředkují transkripci světlem indukovaných genů, mezi něž patří například ELONGATED HYPOCOTYL 5 (HY5), LONG AFTER FAR-RED LIGHT 1 (LAF1) nebo LONG HYPOCOTYL IN FR 1 (HFR1). Aktivita COP1 je silně závislá na jeho vazebném partnerovi SPA (Hoecker *et al.*, 2001; Seo *et al.*, 2003). Světem aktivované fytochromy oddělují COP1 a SPA, tím tento komplex inaktivují, dochází ke stabilizaci transkripčních faktorů a expresi světlem indukovaných genů. Fytochromy dokážou inaktivovat COP1-SPA E3 ligázu také přesunem COP1 z jádra do cytoplazmy, přesný mechanismus však zatím není známý (von Arnim *et al.*, 1997; Stacey *et al.*, 2003). Fytochromy interagují také s velkým množstvím dalších enzymů, mezi které patří kinázy, fosfatázy či E3 ligázy, které modifikují cílové proteiny (Bu *et al.*, 2011; Dong *et al.*, 2017; Ni *et al.*, 2017).



Obr. 2: Změna konformace fytochromobilinu po ozáření červeným světlem z neaktivní formy Pr do aktivní formy Pfr. Převzato z Taiz *et al.*, 2010

Ve vyšších rostlinách jsou fytochromy kódovány malou rodinou genů, konkrétně v *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. jsou to geny *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* a *PHYE*, v rajčeti byly identifikovány geny *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* (Hauser *et al.*, 1995; Mathews, 2010). Fytochromy lze dále rozdělit na dvě skupiny – na světlem labilní typ I, kam patří *PhyA*, a na světlem stabilní typ II, kam patří *PhyB* – *PhyE*. *PhyA* umožňuje klíčení a deetiolaci, když je světla nedostatek (*very-low fluence response* – VLFR) nebo je poměr červeného a dlouhovlnného červeného světla velmi nízký (*far red-high irradiance response* – FR-HIR). Tyto podmínky lze nalézt pod tenkou vrstvou půdy či ve stínu. U fytochromů typu II, tedy *PhyB* – *PhyE*, je naopak k vyvolání odpovědi potřeba vysoké množství fytochromů ve formě Pfr. Tyto fytochromy jsou tedy aktivní v podmínkách, kdy je poměr červeného a dlouhovlnného červeného světla relativně vysoký (*low fluence response* – LFR) (Franklin *et al.*, 2010). Nejdůležitějším fytochromem typu II je *PhyB*, který vykazuje mnohem rychlejší temnostní reverzi než *PhyA*. Nedávné výzkumy naznačují, že *PhyB* může sloužit i jako receptor pro teplotu, a tato vlastnost je považována za klíčovou pro tuto funkci (Lee *et al.*, 2016; Legris *et al.*, 2016).

V rostlinách jsou fytochromy přítomné ve všech pletivech, tím pádem jsou zahrnuty v regulaci téměř každého kroku životního cyklu rostliny. Ovlivňují klíčení, deetiolaci, gravitropismus, pigmentaci, cirkadiánní rytmy i kvetení (Galvão *et Fankhauser*, 2015).

3.2.4 Receptory modrého světla

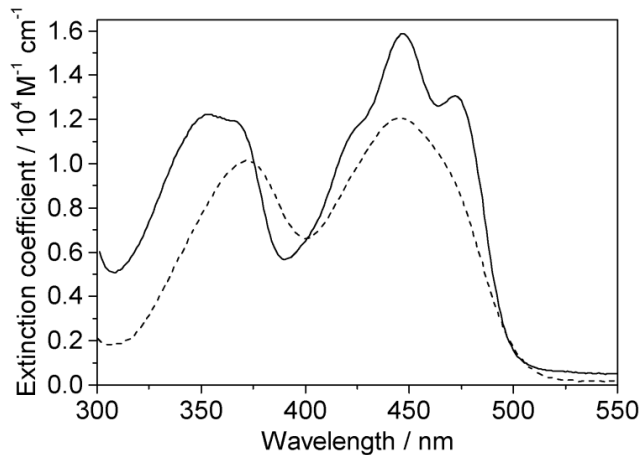
Odpovědi rostlin k modrému světlu jsou charakteristické přítomností odpovědi na signál i po jeho přerušení a delším časovým intervalem mezi přijetím signálu a pozorovatelnou odpovědí na něj. Tento jev lze vysvětlit existencí neaktivní formy fotoreceptoru, která se vlivem modrého světla změní na aktivní formu, jejíž návrat do fyziologicky neaktivní formy je pomalý (Iino *et al.*, 1982; Taiz *et Zieger*, 2010). Existuje několik různých skupin fotoreceptorů, které zajišťují odpovědi rostlin na modré světlo.

Krytochromy (Cry) jsou flavoproteiny podobné DNA fotolyázám, které opravují poškození DNA způsobené UV zářením (Sancar, 2003; Lin *et Shalitin*, 2003). Rostlinné krytochromy fotolyázovou aktivitu nevykazují, jsou však lokalizované v jádře a slouží jako receptory pro modré světlo a UV-A záření o vlnové délce 320 – 500 nm (Obr. 3). Podobně jako ostatní fotoreceptory se skládají z proteinové části zvané apoprotein a neproteinové části označované jako chromofor, kterým je u krytochromů flavinadenindinukleotid (FAD).

Krytochromy se podílí na deetiolaci, regulaci kvetení a cirkadiánních rytmě. V genomu *Arabidopsis* jsou kódovány celkem tři krytochromy – Cry1, Cry2 a Cry3. Cry1 a Cry2 fungují hlavně jako receptory modrého světla, regulují deetiolaci a kvetení (Guo *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 2012) Na rozdíl od Cry1, který je na světle stabilní, Cry2 je na světle rychle degradován (Ahmad *et al.*, 1998). Cry3 patří do skupiny CRY-DASH proteinů. Nachází se v mitochondriích a chloroplastech, kde opravuje poškození jednořetězcové DNA způsobené UV zářením, vykazuje tedy fotolyázovou aktivitu a je mezi krytochromy výjimkou (Kleine *et al.*, 2003; Pokorny *et al.*, 2008).

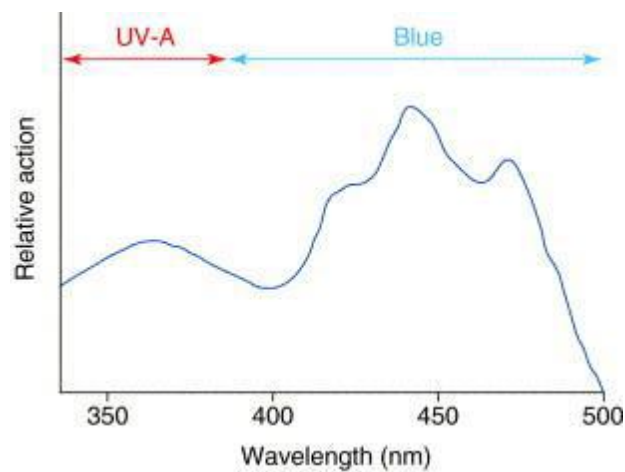
K aktivaci krytochromů je zapotřebí několika kroků. Po dopadu fotonů na FAD dojde k fosforylaci krytochromů a dimerizaci, fosforylovaný Cry2 podstupuje rychlou degradaci (Shalitin *et al.*, 2002; Shalitin *et al.*, 2003). Krytochromy zprostředkují odpovědi na modré světlo několika mechanismy. Světlem aktivovaný Cry2 interaguje s CRY2-INTERACTING-BASIC-HELIX-LOOP-HELIX (CIB) a zahajuje genovou expresi (Liu *et al.*, 2011). Nedávno byl objeven protein BLUE-LIGHT INHIBITOR OF CRYPTOCHROMES 1 (BIC), potenciální inhibitor krytochromů, který blokuje jejich dimerizaci a fosforylaci (Wang *et al.*, 2017)

Kromě přímé regulace transkripce interakcí s transkripčními faktory mohou krytochromy ovlivňovat expresi genů i nepřímo skrz inhibici proteolýzy, a to interakcí s ubikvitin ligázou COP1 (Yi *et Deng*, 2005, Liu *et al.* 2011). Ve tmě COP1 zajišťuje degradaci HY5, transkripčního faktoru, který stimuluje expresi genů zodpovědných za fotomorfogenezi. Po osvětlení se interakce mezi COP1 a HY5 přeruší. Jednak je COP1 vlivem světla degradován nebo transportován z jádra do cytoplazmy, jednak jsou za jeho degradaci zodpovědné také krytochromy. V důsledku toho se zvýší akumulace HY5, což vede k expresi genů zajišťujících fotomorfogenezi (Nemhauser, 2008).



Obr. 3: Absorpční spektrum kryptochromů. Převzato z List *et al.*, 2014

Další skupinou receptorů modrého světla jsou fototropiny (Phot), proteiny lokalizované v plazmatické membráně, které absorbují světlo v oblasti modrého světla a UV-A záření (320 – 500 nm). Na C-konci fototropinu se nachází serin/threonin kináza, na N-konci je umístěna light oxygen voltage (LOV) doména, na kterou je navázaný chromofor flavinadeninmononukleotid (FMN). Tyto receptory hrají důležitou roli ve fototropismu (pohybech rostlin směrem ke světlu nebo od světla), jsou zodpovědné za inhibici prodloužení hypokotylu během prvních sekund po ozáření rostliny modrým světlem, otevírání průduchů, pohyby chloroplastů v listech a pohyb jader. V *Arabidopsis* se nachází celkem dva fototropiny – Phot1 a Phot2 (Quail, 1994). Oba jsou zapojeny ve fototropických odpovědích rostlin, ale Phot2 funguje pouze při vyšší intenzitě ozáření (Briggs *et Christie*, 2002).



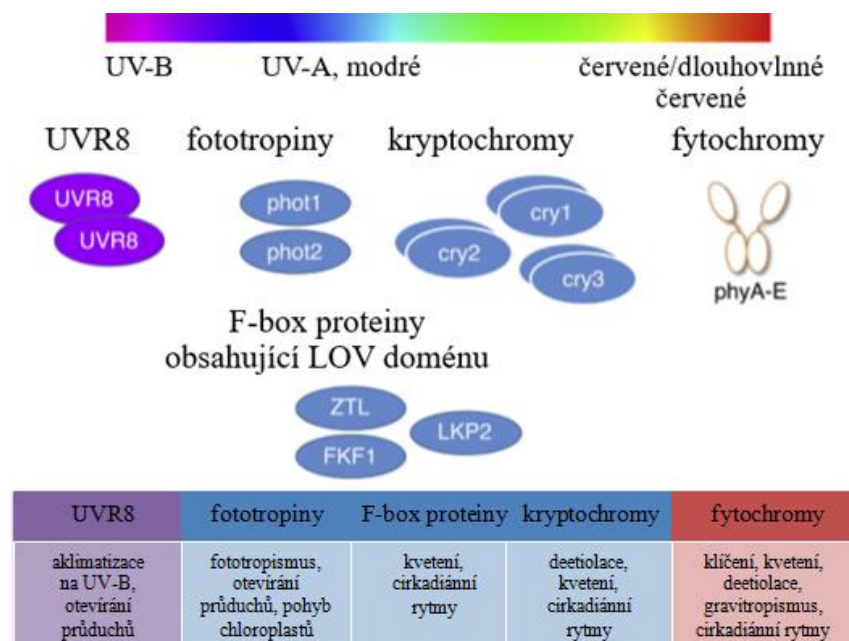
Obr. 4: Absorpční spektrum fototropinů. Převzato z Briggs *et Christie*, 2002

Mezi receptory modrého světla patří i F-box proteiny, které stejně jako fototropiny obsahují LOV doménu, na kterou je navázaný flavin. Do této skupiny patří proteiny ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN-BINDING KELCH REPEAT F-BOX 1 (FKF1) a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2), které ovlivňují kvetení a cirkadiální rytmy. Stejně jako ostatní receptory modrého světla vnímají vlnové délky v rozmezí 320 – 500 nm (Song *et al.*, 2014; Zoltowski *et Imaizumi*, 2014).

Jako receptory modrého světla neslouží v rostlinách pouze proteiny, ale také karotenoid zeaxantin. Ve svěřacích buňkách funguje jako receptor zprostředkující otevírání průduchů (Frechilla *et al.*, 1999; Taiz *et Zeiger*, 2010).

3.2.5 Receptory UV-B záření

Zatím jediným identifikovaným fotoreceptorem, který vnímá UV-B záření (280 – 320 nm), je protein UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8). Tento fotoreceptor neobsahuje chromofor, detekce UV-B záření je zajištěna pomocí několika tryptofanových zbytků. Absorpce UV-B záření indukuje rozpad dimeru UVR8 a výsledný monomer se přesouvá do jádra, kde interaguje s COP1. Tato interakce vede ke stabilizaci HY5 a zahájení exprese cílových genů. Mezi odpovědi rostlin na UV-B záření patří aklimatizace a otevírání průduchů (Rizzini *et al.*, 2011; Cloix *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2012).



Obr. 5: Shrnutí typů rostlinných fotoreceptorů specifických pro určité vlnové délky a jejich funkcí. Převzato z Paik *et Huq*, 2019

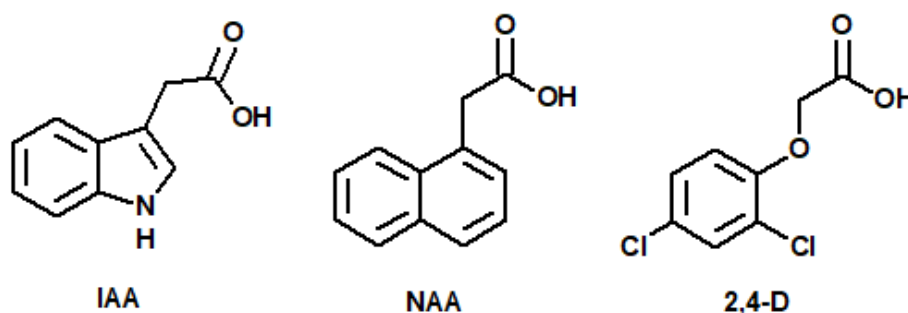
3.3 Rostlinné hormony

Rostlinné hormony neboli fytohormony jsou přirozeně se vyskytující organické sloučeniny, které slouží jako signální molekuly a ovlivňují fyziologické procesy v rostlinách i při velmi nízkých koncentracích. V cílových buňkách se molekula hormonu váže na specifický receptor a spouští dráhu přenosu signálu, která vede k určité odpovědi buňky. Vývoj rostlin je regulován několika typy hormonů, mezi které patří auxiny, giberelliny, cytokininy, ethylen, kyselina abscisová, kyselina salicylová, jasmonáty, brassinosteroidy a strigolaktony (Taiz *et Zieger*, 2010; Campbell, 2016).

3.3.1 Auxin

Auxiny jsou významná skupina rostlinných hormonů, která je nepostradatelná pro jakýkoliv vývojový či tropický proces v rostlinách. Spolu s cytokininy jsou auxiny jedinými rostlinnými hormony, které jsou pro životaschopnost rostliny nutné. Na buněčné úrovni auxiny ovlivňují buněčné dělení, expanzi a diferenciaci buněk, na úrovni celé rostliny se podílí na embryogenezi, prodlužovacím růstu stonku, tvorbě postranních kořenů, apikální dominanci, fototropismu a gravitropismu (Taiz *et* Zeigler, 2010).

Termín auxin je užíván pro označení jakékoliv látky, která indukuje prodlužování buněk v izolovaných částech stonku nebo koleoptile, proto do této skupiny rostlinných hormonů patří velké množství různých organických sloučenin. Byly identifikovány celkem čtyři přírodní auxiny. Nejrozšířenějším auxinem je indol-3-octová kyselina (IAA), jednoduchá molekula skládající se z indolového kruhu a postranního řetězce karboxylové skupiny. Mezi další tři přirozeně se vyskytující auxiny patří indol-3-máselná kyselina (IBA), fenylactová kyselina (PAA) a 4-chlorindol-3-octová kyselina (4-Cl-IAA) (Simon *et* Petrášek, 2011). Podobné účinky jako IAA vykazují i některé syntetické organické sloučeniny, které mají široké využití jak při výzkumu, tak v zemědělství či zahradnictví jako růstové regulátory nebo herbicidy. Nejpoužívanějšími syntetickými auxiny jsou například 1-naftyloctová kyselina (NAA) nebo 2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina (2,4-D) (Taiz *et* Zeigler, 2010).



Obř. 6: Struktura přírodního auxinu IAA (vlevo) a struktura syntetický auxinů NAA (uprostřed) a 2,4-D (vpravo) (podle Ma *et al.*, 2017)

Auxinová signalizace může být regulována na mnoha úrovních – lokalizace hormonu v rostlinných pletivech je ovlivněna regulací jeho biosyntézy, metabolismu a transportu, výsledný efekt auxinu závisí na vnímání hormonu rostlinnou buňkou či na interakci s dalšími rostlinnými hormony.

3.3.1.1 Biosyntéza a metabolismus auxinu

Přestože schopnost produkovat nízké hladiny IAA mají prakticky všechna rostlinná pletiva, hlavními místy syntézy auxinu jsou apikální meristémy stonku a mladé listy (Ljung *et al.*, 2001). Apikální meristémy kořene jsou také důležitým místem biosyntézy auxinů, přesto je kořen závislý na auxinu syntetizovaném ve stonku (Ljung *et al.*, 2005).

Hlavním prekurzorem syntézy IAA je aminokyselina tryptofan (Trp). Při Trp-dependentní syntéze IAA dochází nejprve ke změně Trp na indol-3-pyruvát (IPA) enzymem TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF *ARABIDOPSIS* 1 (TAA1). Oxidativní dekarboxylací katalyzovanou enzymem flavin monooxygenázou YUCCA je poté z IPA

syntetizována IAA. Byly však objeveny i další Trp-dependentní dráhy syntézy IAA, stejně jako dráhy na Trp nezávislé, kdy je IAA syntetizována z prekurzorů Trp, hlavně kyseliny indol-3-propionové (Mashiguchi *et al.*, 2011; Tivendale *et al.*, 2014; Zhao, 2014).

Aby byla hormonální signalizace efektivní, nesmí se hormony začít časem akumulovat. Deaktivace IAA probíhá jednak skrze vazbu na aminokyseliny, cukry nebo tvorbou esterů – vázaná IAA je považována za hormonálně neaktivní (Ludwig-Müller, 2011; Korasick *et al.*, 2013), jednak oxidací pomocí enzymů na kyselinu 2-oxoindol-3-oxovou. IAA může být oxidována i neenzymaticky, například je-li vystavena světlu (Mellor *et al.*, 2016; Porco *et al.*, 2016).

3.3.1.2 *Transport auxinu*

IAA se pohybuje převážně z apikální do bazální části rostliny. Tento způsob jednosměrného transportu auxinu, který je nazýván jako polární transport, je specifický jak pro přírodní, tak pro syntetické auxiny, vyžaduje energii a není závislý na gravitaci, což naznačuje, že transport auxinu probíhá z buňky do buňky a je zprostředkován proteinovými přenašeči plazmatické membrány (Taiz *et Zeiger*, 2010). Polární transport auxinu umožňuje asymetrickou distribuci tohoto hormonu v různých buňkách a pletivech. Díky tomu se vytváří lokální auxinová minima, maxima a gradienty, které jsou zásadní pro tvorbu orgánů a určení tvaru.

Chemiosmotický model transportu auxinu předpokládá, že to, zda IAA jako slabá kyselina odštěpí nebo neodštěpí vodíkový kation (H^+), závisí na pH prostředí, ve kterém se nachází (Rubery *et Sheldrake*, 1973; Raven, 1975; Goldsmith *et Goldsmith*, 1977). Prostředí buněčné stěny (apoplast) má díky aktivitě protonové pumpy H^+ -ATPázy pH přibližně 5,5, proto zde významná část auxinu přijme proton, stane se lipofilní a snadno projde cytoplazmatickou membránou. Uvnitř buňky je pH neutrální a většina molekul IAA se zde nachází ve formě aniontu (IAA^-), který nemůže procházet cytoplazmatickou membránou. Proto existují celkem tři hlavní skupiny transmembránových proteinů, které transportují IAA z jedné strany cytoplazmatické membrány na druhou.

Transport do buňky, tedy tzv. influx, zajišťuje malá skupina proteinů AUXIN1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX), která transportuje IAA^- společně s $2H^+$ (Yang *et al.*, 2006; Swarup *et al.*, 2008). Tyto proteiny mají pravděpodobně 11 transmembránových domén a jejich umístění v cytoplazmatické membráně buňky je polární jen v některých pletivech, například v protofloému nebo epidermis kořene (Armengot *et al.*, 2016).

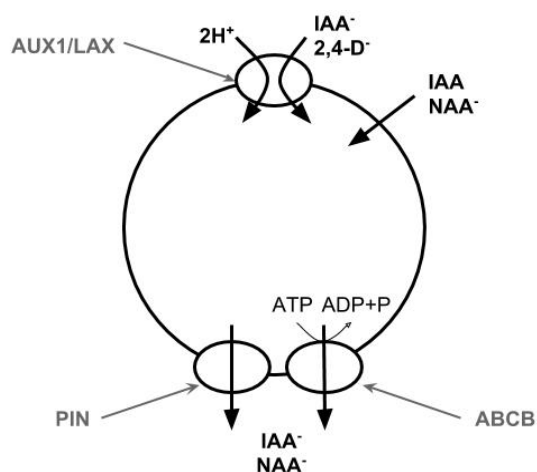
Z buňky je auxin transportován pomocí tzv. effluxových přenašečů, kterými jsou PIN-FORMED proteiny (PIN) a ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY B (ABCB). Skupina proteinů PIN je tvořena celkem osmi proteiny, které lze rozdělit na dva typy lišící se délkou hydrofilní smyčky ve středu polypeptidového řetězce, který tvoří celkem 10 transmembránových domén (Armengot *et al.*, 2016; Zažímalová *et al.*, 2018). Proteiny typu PIN I, kterými jsou PIN1, PIN2, PIN3, PIN4 a PIN7, mají dlouhou hydrofilní smyčku a jsou lokalizovány v plazmatické membráně buňky převážně polárně, čímž určují směr proudu auxinu (Petrášek *et al.*, 2006; Wiśniewska *et al.*, 2006). Proteiny typu PIN II, mezi které patří PIN5 a PIN8, mají naopak krátkou hydrofilní smyčku a jsou umístěny v membráně endoplazmatického retikula. Výjimkou je PIN6, který má hydrofilní smyčku zkrácenou pouze

částečně (Cazzonelli *et al.*, 2013; Bennett, 2015; Armengot *et al.*, 2016). Žádná sekvence proteinů PIN neobsahuje místo pro vazbu ATP, proto jsou PIN proteiny obecně považovány za sekundární aktivní přenašeče (Zažímalová *et al.*, 2018).

Proteiny ABCB, na rozdíl od PIN, používají jako zdroj energie ATP, transport pomocí ABCB se proto uplatňuje hlavně tehdy, když je třeba transportovat auxin proti gradientu. Přenašeče ABCB jsou tvořeny dvěma skupinami transmembránových domén, každá z nich je následována doménou, která váže ATP. Tyto přenašeče nejsou lokalizovány v cytoplazmatické membráně buňky polárně.

Přestože všechny tři skupiny transportují auxin nezávisle na sobě, proteiny PIN a ABCB mohou vytvářet komplexy, které stabilizují proteiny PIN v membráně (Blakeslee *et al.*, 2007; Titapiwatanakun *et al.*, 2009).

Účinek auxinů na rostliny je často zkoumán pomocí syntetických auxinů. Ty vyvolávají stejné odpovědi jako IAA, ale na rozdíl od ní jsou chemicky stabilní, nejsou degradovány světlem a jejich metabolismus v rostlině je pomalejší (Yamakawa *et al.*, 1979; Jackson *et al.*, 2001). Molekula NAA je lipofilní, díky tomu snadno vstupuje do buňky difuzí. Z buňky je aktivně transportována proteinovými přenašeči. S proteiny transportujícími auxin do buňky není NAA kompatibilní, proto je používána k výzkumu vlastností proteinů, které transportují auxin z buňky. Naopak molekula 2,4-D není lipofilní a její vstup do buňky zajišťují proteinové transportéry. K proteinům transportujícím auxin z buňky se ale neváže, proto slouží jako nástroj k výzkumu proteinů zajišťujících vstup auxinu do buňky (Delbarre *et al.*, 1996; Simon *et al.*, 2013).



Obr. 7: Schéma transportu auxinů do buňky a z buňky (podle Morris, 2000)

3.3.1.3 Auxinová signalizace

Přítomnost auxinu v buňce aktivuje signální dráhy, které vedou ke změnám na úrovni transkripce a specifickým odpovědím buňky. Byly charakterizovány tři systémy receptorů auxinu s různým rozsahem působení v buňce. Jsou jimi SKP1–Cullin–F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEIN Auxin/INDOLE-3-ACETIC ACID (TIR1/AFB-Aux/IAA), S-PHASE-KINASE-ASSOCIATED PROTEIN 2a (SKP2a) a AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1).

Nejlépe prozkoumaným systémem je TIR1/AFB-Aux/IAA, který reguluje transkripci auxinem podmíněných genů v jádře. Komponenty této signální dráhy patří do tří rodin proteinů: koreceptory auxinu F-box proteiny TIR1/AFB, transkripční represory Aux/IAA a transkripční faktory AUXIN RESPONSE FACTORS (ARF). TIR1/AFB je podjednotkou komplexu ubikvitin ligázy typu SKP1–CUL1–F-box (SCF) pojmenované jako SCF^{TIR1/AFB}. Pokud je hladina auxinu v buňce nízká, Aux/IAA inhibuje transkripci genů pomocí vazby na transkripční faktor ARF (Wang *et al.*, 2014; Salehin *et al.*, 2015). Auxin funguje jako „molekulární lepidlo“ a pomáhá vytvořit komplex mezi TIR1/AFB a Aux/IAA, což vede k ubikvitinaci Aux/IAA a jeho degradaci v proteazomu. Zvýšení hladiny auxinu v buňce tedy vede k odblokování transkripčního faktoru ARF a expresi auxinem indukovaných genů (Tan *et al.*, 2007; Calderón Villalobos *et al.*, 2012; Ma *et al.*, 2018).

Dalším proteinem, který slouží jako receptor pro auxin je SKP2a, který se také váže na auxin a zajišťuje degradaci transkripčních faktorů, které potlačují dělení buňky (Calderón Villalobos *et al.*, 2012).

ABP1 reguluje expresi auxinem indukovaných genů, předpokládá se ale, že se podílí na zprostředkování odpovědi na auxin, které nezahrnují změny v transkripci. ATB1 aktivuje Rho OF PLANTS-GTPase (ROP-GTPase), jejíž signální dráha vede k reorganizaci cytoskeletu, formaci tvaru buňky a je zapojena v klatrinové exocytóze ovlivňující rozmístění PINů v cytoplazmatické membráně (Tao *et al.*, 2002; Shi *et al.*, 2011; Chen *et al.*, 2012). V posledních letech však byla úloha proteinu ABP1, jako nezbytného auxinového receptoru, zpochybněna (Dai *et al.*, 2015; Gao *et al.*, 2015; Michalko *et al.*, 2015; Enders *et al.*, 2015; Paponov *et al.*, 2019).

3.3.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová je signální molekula, která byla objevena několika výzkumnými skupinami v 60. letech minulého století a pojmenována podle efektů, které u rostlin vyvolávala, jako abscisin II a dormin (Cutler *et al.*, 2010). Chemické analýzy následně odhalily, že se jedná o stejnou sloučeninu, která byla označena jako kyselina abscisová (ABA). V rostlinách je ABA klíčovým regulátorem mnoha procesů, mezi které patří například dormance, vývoj semen, klíčení a odolnost vůči abiotickým stresům (Vishwakarma *et al.*, 2017).

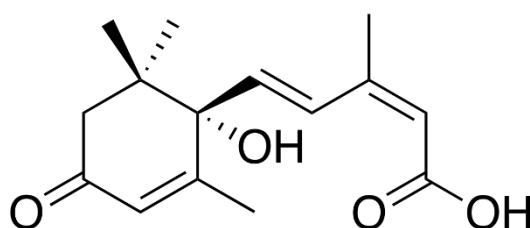
ABA je patnáctiuhlíkatá seskviterpenoidní molekula, která se skládá ze tří isoprenoidních jednotek. Rostliny syntetizují ABA tzv. nepřímou cestou z karotenoidů, jako prekurzor slouží β -karoten (Nambara *et al.*, 2005; Arc *et al.*, 2013). V chloroplastech a dalších plastidech je β -karoten oxidován na zeaxanthin a violaxanthin, v cytosolu pak dochází k syntéze xanthotinu z violaxantinu. Finálním krokem syntézy ABA je pak otevření epoxidového kruhu a oxidací abscisového aldehydu na ABA (Eisenreich *et al.*, 2000; Finkelstein, 2013). Inaktivace ABA probíhá její vazbou na další látky nebo degradací na kyselinu fazeovou (Kushiro *et al.*, 2004).

ABA se v rostlinách nachází jak v protonované formě (ABAH), která může volně difundovat skrz plazmatickou membránu, tak ve formě aniontu (ABA⁻), který musí být transportován aktivně. K aktivním transportérům ABA patří ATP-BINDING CASSETTE SUBFAMILY G (ABCG) a rodina proteinů NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE

TRANSPORTER (NPF), které transportují ABA do buňky, a exportní protein DETOXIFICATION 50 (DTX50) (Hauser *et al.*, 2017).

V buňce se ABA váže na proteiny z velké skupiny receptorů PYRABACTIN RESISTANCE 1/PYR1-LIKE/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS (PYR1/PYL/RCAR) (Ma Y *et al.*, 2009; Park *et al.*, 2009. Vazba ABA na tyto receptory způsobuje jejich interakci s PP2C protein fosfatázami, které jsou v důsledku této interakce inhibovány. Inhibicí PP2C dochází k aktivaci protein kinázy SERINE/THREONINE-PROTEIN KINASE SRK2E/OPEN STOMATA 1 (SnRK2E/OST1), která fosforyluje a aktivuje cílové proteiny – iontové kanály, které způsobují uzavření průduchů, a transkripční faktory, které spouští expresi genů zajišťujících odolnost vůči abiotickým stresům. Mezi další cílové proteiny defosforylované PP2C patří také iontové kanály a transkripční faktory (Hauser *et al.*, 2017).

ABA hraje v rostlinách důležitou roli při regulaci mnoha fyziologických procesů, mezi které patří odpověď na stres nebo přítomnost patogenů, regulace vývoje a klíčení semen, opad listů a oddalování zrání plodů, je ale zásadní i pro regulaci růstu hypokotylu (Cutler *et al.*, 2010; Vishwakarma *et al.*, 2017). Přestože je ABA často považována za hlavní inhibitor růstu stonku, neustále přibývá studií, které naznačují, že ABA růst stonku naopak stimuluje (Hansen *et Grossmann*, 2000; Barrero *et al.*, 2005; Rai *et al.*, 2011). Efekt ABA na růst nadzemních částí rostliny je důležitý zvláště při reakcích rostlin na světlo. Bylo dokázáno, že ABA v průběhu skotomorfogeneze podporuje růst mladých rostlin, u kterých je její hladina mnohem vyšší, než u rostlin rostoucích na světle. Je možné, že ABA stimuluje expresi inhibitorů cyklin dependentních kináz, které ovlivňují dělení buněk. K ovlivňování růstu stonku dochází i interakcí ABA s ostatními fytohormony – ethylenem a cytokininy (Humplík *et al.*, 2015; Humplík *et al.*, 2017).



Obr. 8: Struktura kyseliny abscisové (podle Cutler *et al.*, 2010)

3.4 Interakce signálních drah auxinu a světla

Světlo poskytuje rostlinám spolehlivé informace o vnějším prostředí i o čase, je tedy jedním z nejvýznamnějších faktorů ovlivňujících růst a vývoj rostlin. Důležitou růstovou reakcí, kterou světlo u rostlin vyvolává, je inhibice prodlužování hypokotylu během fotomorfogeneze. Přestože všechny mechanismy světlem indukované růstové inhibice dosud nejsou zcela objasněny, již nyní víme, že zahrnují mnoho různých procesů, včetně světlem indukované regulace hormonálních drah. Světelné a hormonální dráhy interagují na mnoha úrovních. Světlo ovlivňuje biosyntézu hormonů, jejich hladinu v rostlinných pletivech, jejich distribuci a citlivost pletiv na hormony. Tyto procesy poté vedou ke změně exprese různých genů. Světlo a hormony mohou také sdílet společné signální prvky, například regulátory transkripce (Nemhauser, 2008; Kurepin *et Pharis*, 2014; de Wit *et al.*, 2016). Pro zajištění odpovědi rostlin na světelné signály je obzvláště významný rostlinný hormon auxin.

3.4.1 Světlo ovlivňuje hladinu auxinu

Hladina auxinu v pletivech rostlin úzce souvisí se změnami růstu a vývoje, které jsou způsobeny světlem. To dokazují pokusy provedené s rostlinami neschopnými auxin syntetizovat, například s mutanty *sav3/taa*, kteří mají oproti nemutovaným rostlinám kratší hypokotyly a zvětšené dělohy (Tao *et al.*, 2008). Tento fenotyp je často pozorován také u mutantů ve světelné signalizaci se zesílenou fotomorfogenezí (Castillon *et al.*, 2007). Naopak nadbytek auxinu v mutantech *yucca* či *red1* vede k prodlužování hypokotyly a redukci růstu děloh, což je fenotyp charakteristický i pro mutanty s deficitem fotoreceptorů (Hoecker *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2007). Světlo má tedy na hladinu auxinu zásadní vliv.

Fytochromy dokážou ovlivňovat hladinu auxinu regulací jeho biosyntézy. SUPERROOT 2 (SUR2) je cytochrom P450 monooxygenáza CYP83B1, která katalyzuje jeden z kroků syntézy glukosinolátů z indol-3-acetaldoximu (IAOx). Tento protein je však důležitý i při regulaci auxinové homeostázy, IAOx je totiž také jedním z prekurzorů syntézy IAA, proto zablokování SUR2 vede ke zvýšení produkce auxinu (Hoecker *et al.*, 2004). PhyB v aktivní formě Pfr se naopak podílí na aktivaci SUR2, což přispívá ke snížení hladiny auxinů v buňkách (Halliday *et al.*, 2009). Dalšími proteiny zapojenými v biosyntéze auxinu jsou Trp aminotransferáza TAA1 nebo skupina flavin monooxygenáz YUCCA. Aktivované fytochromy přispívají ke snížení exprese některých genů kódujících tyto proteiny pravděpodobně degradací transkripčních faktorů PIF, mezi jejichž cílové geny *TAA1* i některé *YUCCA* patří (Hornitschek *et al.*, 2012; Li *et al.*, 2012).

Hladina IAA ale není kontrolována výhradně prostřednictvím biosyntetických drah. Enzymy kódované rodinou genů *GRETCHEN HAGEN 3 (GH3)* katalyzují vazbu IAA na aminokyseliny, což vede buď k uložení, nebo k degradaci molekul IAA (Staswick *et al.*, 2005). Tento mechanismus používají k regulaci hladiny aktivního auxinu hlavně PhyA a PhyB, které jsou schopné ovlivňovat transkripci několika genů GH3 (Devlin *et al.*, 2003). Regulace genů *GH3* tedy může umožňovat doladění hladiny auxinu v rostlině podle světelných signálů z vnějšího prostředí (Halliday *et al.*, 2009).

3.4.2 Světlo ovlivňuje polární transport auxinu

Již na začátku 90. let minulého století se objevily předpoklady, že světlo může inhibovat prodlužování buněk skrze regulaci polárního transportu auxinu, později byl vztah mezi polárním transportem auxinu a růstovými reakcemi indukovanými světlem prokázán mnoha dalšími studii (Jones *et al.*, 1991; Behringer *et al.*, 1992; Tian *et al.*, 2001; Fuchs *et al.*, 2003).

Polární transport auxinu může být inhibován kyselinou naftylftalamovou (NPA). U *Arabidopsis* bylo prokázáno, že tento inhibitor redukuje prodlužování hypokotyly u rostlin pěstovaných na světle, u rostlin pěstovaných ve tmě nikoliv. To znamená, že ve tmě není růst dost citlivý na změny v koncentracích auxinu způsobené ovlivněním transportu auxinu, zatímco na světle se polární transport auxinu stává pro kontrolu růstu zásadním. Účinek NPA byl silně snížen také u mutantů *phyA*, *phyB* nebo *cry1* rostoucích na světle. Inhibice prodlužování hypokotyly řízená fytochromy je tedy alespoň částečně způsobena regulací distribuce auxinu (Jensen *et al.*, 1998).

Světlo může ovlivňovat distribuci auxinu kontrolou množství přenašečů auxinu PIN a ABCB. ABCB1, ABCB19 a PIN3 se podílí na asymetrickém transportu auxinu, což způsobuje rozdílný růst buněk v určitých částech pletiva při fototropismu či gravitropismu. Tyto přenašeče nejsou důležité pouze při zprostředkování tropických odpovědí. To naznačuje fakt, že mutantní rostliny s poruchami v těchto genech mají i ve tmě krátký hypokotyl, což je fenotyp typicky způsobený světlem (Sidler *et al.*, 1998; Friml *et al.*, 2002; Lin *et al.*, 2005). Protože auxin způsobuje prodlužování buněk, změna v symetrické radiální distribuci auxinu způsobená ztrátou funkce ABCB1, ABCB19 a PIN3 by mohla vést k fenotypu s krátkým hypokotylem.

Bylo prokázáno, že PhyB snižuje množství transkriptů genu *PIN3* a že PhyA, PhyB, Cry1, a Cry2 ovlivňují množství proteinu *ABCB19* (Nagashima *et al.*, 2008). Výsledky dalších studií naznačují, že světlo hraje klíčovou roli při regulaci přenašečů PIN1, PIN2 a PIN7, konkrétně ovlivňováním jejich rozmístění uvnitř buňky. Tento děj je pravděpodobně zprostředkován receptory modrého světla skrze signální dráhu, která aktivuje transkripční faktor HY5 (Friml *et al.*, 2002; Laxmi *et al.*, 2008).

Příkladem děje, který je v rostlinách zprostředkován právě změnami v transportu auxinu, je fototropismus. Pozitivní fototropismus neboli růst rostlin směrem ke zdroji světla je indukovan především skrze fototropiny, menší mírou se na něm podílí i kryptochromy, PhyA, a UVR8. Ozáření rostliny z určitého směru vede ke zvýšení hladiny auxinu na zastíněné straně stonku, což vede ke zrychlení růstu a zakřivení stonku (Went, 1926; Christie *et al.*, 2013). K ustanovení auxinového gradientu pravděpodobně vede několik procesů. Je známo, že aktivita a lokalizace proteinů PIN v buňce závisí na jejich fosforylaci. Přestože studie dokázaly, že dochází ke změně umístění PIN3 směrem od ozářené strany v buňkách endodermis, jejich přímá fosforylace fototropiny zatím prokázána nebyla (Ding *et al.*, 2011; Barbosa *et al.*, 2014). Bylo ale zjištěno, že ozáření modrým světlem vede k fosforylaci protonové pumpy H⁺-ATPázy vlivem fototropinů (Hohm *et al.*, 2014). Fosforylace H⁺-ATPázy vede k její aktivaci, pH apoplastu klesá a zvyšuje se množství IAAH, která může prostupovat do buňky přes cytoplazmatickou membránu a podporovat její prodlužování a dělení. Další možností, jak mohou fototropiny indukovan ustanovení auxinového gradientu, je přímá fosforylace effluxového přenašeče ABCB19 aktivovaným Phot1, která vede ke snížení jeho aktivity. Redukce transportu auxinu ven z buňky směrem od její apikální části může zvyšovat hladinu auxinu v místě zakřívování (Christie *et al.*, 2011).

3.4.3 Světlo a auxin sdílí cílové geny

Světlo má vliv na hladinu auxinů i jejich transport, jeho účinek se však neomezuje pouze na tyto procesy. Kontrolou odpovědi buňky na přítomnost auxinu může světlo vliv auxinu tlumit či zvyšovat. Regulace signálních drah auxinu umožňuje světlu indukovan odpovědi v konkrétních částech rostliny (Halliday *et al.*, 2009).

Na molekulární úrovni auxin aktivuje transkripční geny *Aux/IAA*, *SMALL AUXIN UP-REGULATED (SAUR)*, a *GH3*. Proteiny *Aux/IAA* jsou transkripčními represory zapojené v signálních drahách auxinu, které inhibují transkripční faktor ARF. Zvýšení hladiny auxinu v buňce vede k jejich odbourávání a expresi genů indukovaných ARF, mezi které patří i *Aux/IAA*. Tato negativní zpětná vazba pomáhá regulovan odpovědi buňky v závislosti

na hladině auxinu. (Kepinski *et Leyser*, 2004; Dharmasiri *et al.*, 2005; Kepinski *et Leyser*, 2005).

Geny *SAUR* kódují malé proteiny, jejichž funkce byla dlouho neznámá. Nedávno bylo objeveno, že tyto proteiny inhibují funkci skupiny fosfatáz PROTEIN PHOSPHATASE 2C (PP2C). To vede ke snížení defosforylace proteinové pumpy H⁺-ATPázy, tím její aktivita vzroste a dochází k okyselení apoplastu. Následné prodlužování buněk je způsobeno zvýšením aktivity enzymů citlivých na pH, které rozvolňují buněčnou stěnu, stejně jako zvýšením osmotického vtoku vody do buňky (Hager, 2003; Spartz *et al.*, 2017; Stortenbeker *et Bemer*, 2019).

Geny *GH3* kódují skupinu enzymů, které jsou zodpovědné za adenylaci IAA a vazbu molekul IAA na aminokyseliny, čímž snižují množství aktivního auxinu a slouží jako citlivý zpětnovazebný mechanismus (Staswick *et al.*, 2005; Halliday *et al.*, 2009).

Mnoho proteinů patřících do těchto skupin je regulováno i světlem, zvláště prostřednictvím fytochromů v průběhu deetiolace i reakcí k zastínění. Rostliny vnímají zastínění jako snížení poměru dopadajícího červeného světla k dlouhovlnnému červenému světlu. Tento poměr je detekován skrze fytochromy díky jejich fotoreverzibilitě. V největší míře indukuje tyto odpovědi PhyB, PhyC – E hrají spíše doplňkovou roli. PhyB se ve fyziologicky aktivní formě Pfr přesouvá do jádra, kde interaguje s transkripčními faktory PIF, hlavně tedy s PIF4, PIF5 a PIF7 (Li *et al.*, 2012; Leivar *et Monte*, 2014). Tato interakce vede k fosforylaci PIF a jeho následné inaktivaci nebo degradaci. Inaktivace PhyB způsobená snížením poměru dopadajícího červeného světla k dlouhovlnnému červenému světlu vede k redukci inhibice PIF, která způsobí velké změny v transkripci. Mezi cílové geny PIF patří například geny *SAUR* nebo geny *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 19 (IAA19)* a *INDOLE-3-ACETIC ACID INDUCIBLE 29 (IAA29)* patřící do skupiny *Aux/IAA* (Hornitschek *et al.*, 2012).

3.4.4 Integrace signálních drah auxinu a světla

Jedno z nejsilnějších propojení signálních drah auxinu a světla bylo pozorováno při deetiolaci a reakcích rostlin k zastínění. Mezi geny s klíčovou rolí při propojení signálních drah auxinu a světla patří *PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED (PAR)*. Některé z těchto genů, například *HFR1*, *PIF3-LIKE 1 (PIL1)*, *PIF3-LIKE 2 (PIL2)*, *PAR1* nebo *PAR2*, patří do skupiny transkripčních faktorů typu basic helix–loop–helix (bHLH) (Sessa *et al.*, 2005; Roig-Villanova *et al.*, 2007). Mezi *PAR* geny patří i několik členů skupiny transkripčních faktorů homeodomain-leucine zipper (HD-ZIP), konkrétně *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 2 (ATHB2)*, *ARABIDOPSIS THALIANA HOMEBOX 4 (ATHB4)*, *HAT1*, *HAT2* a *HAT3* (Steindler *et al.*, 1999; Sorin *et al.*, 2009). Mechanismy působení těchto proteinů jsou různé. HFR1 nefunguje jako klasický transkripční faktor, jeho funkce spočívá ve vazbě na PIF4 a PIF5, čímž inhibují jejich schopnost vytvářet dimery a vázat se na promotory cílových genů (Hornitschek *et al.*, 2009). PAR1 a PAR2 fungují podobně jako HFR1, inhibují PIF4 tvorbou heterodimerů, tím zabraňují jeho vazbě na DNA a následné expresi genů (Hao *et al.*, 2012). Bylo také prokázáno, že tyto proteiny přímo potlačují expresi auxinem indukovaných genů *SAUR18* a *SAUR65*, přestože se sami na DNA nevážou. Pravděpodobně tedy fungují jako transkripční kofaktory interagující s klasickými

transkripčními faktory (Roig-Villanova *et al.*, 2007). Světlo ovlivňuje aktivitu proteinů PAR1, PAR2 a HFR1 pomocí fotoreceptory zprostředkované inhibice COP1, ubikvitin ligázy, která tyto proteiny označuje pro degradaci (Zhou *et al.*, 2013).

Mezi geny s důležitou rolí v auxinové signalizaci patří také *HY5* a *HY5 HOMOLOG (HYH)* kódující transkripční faktory, jejichž úlohou je stimulaci fotomorfogeneze. Tyto proteiny jsou také aktivovány světlem prostřednictvím interakce s COP1 (Sibout *et al.*, 2006). Cílovými geny *HY5* je spousta genů zapojených v signálních drahách světla, například *HFR1*, *COP1*, *HYH* i *HY5* samotný (Lee *et al.*, 2007; Huang *et al.*, 2012; Ciolfi *et al.*, 2013; Abbas *et al.*, 2014), ale také geny, které jsou součástí auxinové signalizace, konkrétně *SOLITARY ROOT/INDOLE ACETIC ACID 14 (SLR/IAA14)* a *AUXIN RESISTANT 2/INDOLE ACETIC ACID 7 (AXR2/IAA7)* patřící do skupiny genů *Aux/IAA* (Cluis *et al.*, 2004). Je tedy zřejmé, že prostřednictvím těchto transkripčních faktorů světlo reguluje jak signální dráhy světla, tak i odpovědi buňky na hormon auxin (Halliday *et al.*, 2009; Gangappa *et Botto*, 2016).

Kromě množství transkripčních faktorů, které se na integraci signálních drah světla a auxinu podílí, je možné, že i samotné fytochromy dokážou přímo ovlivňovat auxinovou signalizaci. Například bylo dokázáno, že *PhyA* může *in vitro* fosforylovat proteiny *SHY2/IAA3*, *AXR3/IAA17*, *IAA1* a *IAA9* a ovlivňovat tak jejich funkci (Colon-Carmona *et al.*, 2000). *PhyB* také dokáže interagovat s *SHY2/IAA3* a *AXR3/IAA17* (Tian *et al.*, 2003). Tyto interakce nejsou závislé na tom, zda se fytochrom nachází ve formě Pr nebo Pfr, takže jejich význam v signalizaci zatím není jasný. V buňce, kde se proteiny *Aux/IAA* nacházejí převážně v jádře, by mohl světlem aktivovaný přesun fytochromů do jádra a následná fosforylace *Aux/IAA* představovat důležitý mechanismus, skrze který by světlo přímo ovlivňovalo signální dráhy auxinu (Reed, 2001; Tian *et al.*, 2003; Halliday *et al.*, 2009).

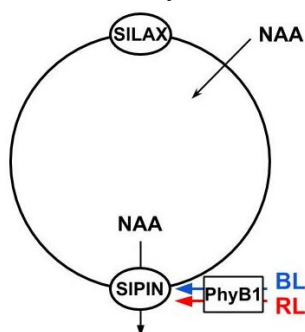
Součástí společných signálních drah auxinu a světla je také transkripční faktor *REVEILLE 1 (RVE1)*. Tento protein je homologický k proteinům *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)* a *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*, které se podílí na regulaci denního rytmu. Na rozdíl od nich však inaktivace *RVE1* neovlivní denní rytmicitu, ale odrazí se změnami růstu. *RVE1* během dne stimuluje expresi genu *YUCCA8*, což vede k vyšší produkci auxinů a stimulaci růstu hypokotylu (Rawat *et al.*, 2009).

4 PŘEDCHOZÍ VÝSLEDKY A CÍLE PRÁCE

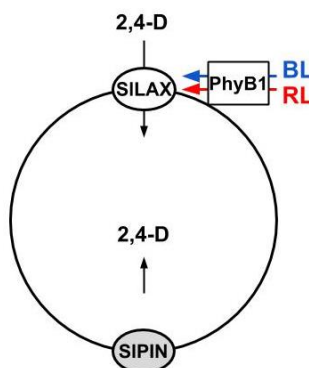
V minulé práci SOČ bylo studováno, jaký vliv má světlo na hladinu endogenních auxinů a jejich transport a zda je tento vliv zprostředkován skrze fotoreceptory červeného světla fytochromy, konkrétně fytochrom B1. Byl použit tzv. genetický přístup, který spočívá v analýze rostlin s mutacemi v konkrétních genech. Srovnáním reakcí těchto mutantů s kontrolními nemutovanými rostlinami (označovanými též jako wild type – WT) lze zjistit, zda je daný gen zapojený ve zkoumaných dráhách. Experimenty byly prováděny na čtyřech genotypech experimentální rostliny rajčete jedlého – cv. GT, od něj odvozeném mutantu *tril* s mutací ve *PhyB1*, cv. Kokomo a od něj odvozeném mutantu *yg-2* postrádajícím chromofor fytochromů (viz kapitola 5.1 Rostlinný materiál).

Rostliny byly pěstovány v různých světelných podmínkách (ve tmě, na modrém a na červeném světle) na médiu s různými koncentracemi exogenních auxinů NAA a 2,4-D. Po týdnu růstu byla u každé rostliny změřena délka hypokotylu a kořene. Z výsledků těchto experimentů byly na základě znalostí o transportu syntetických auxinů vyvozeny následující hypotézy.

Modré a červené světlo snižuje inhibici růstu hypokotylu způsobenou exogenním auxinem NAA u cv. GT, u mutantu *tril* je tento jev také pozorovatelný, ale v mnohem menší míře. Vysvětlením by mohla být modrým a červeným světlem způsobená stimulace exprese effluxových přenašečů SIPIN. V těchto signálních dráhách je pravděpodobně zapojený i *PhyB1*. Naopak inhibiční účinek auxinu 2,4-D je u cv. GT modrým a červeným světlem zvyšován, u mutantu *tril* se zvýšení inhibice projeví až při vyšších koncentracích 2,4-D. Tento jev by mohl být vysvětlen stimulací exprese influxových přenašečů SILAX způsobenou modrým a červeným světlem prostřednictvím *PhyB1*.

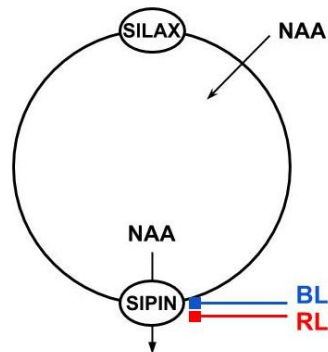


Obr. 9: Schéma hypotetického modelu (podle Morris, 2000) vlivu modrého a červeného světla na hladinu NAA v buňce hypokotylu

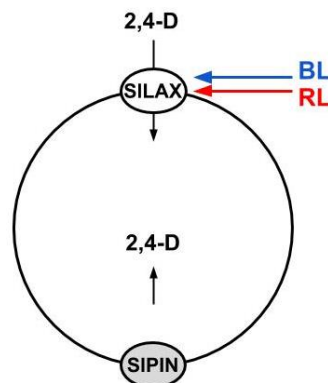


Obr. 10: Schéma hypotetického modelu (podle Morris, 2000) vlivu modrého a červeného světla na hladinu 2,4-D v buňce hypokotylu

U kontrolního genotypu cv. Kokomo i u mutanta *yg-2* dochází působením modrého a červeného světla ke zvýšení citlivosti hypokotylu k exogenním auxinům NAA i 2,4-D. Tento jev by mohl být objasněn stimulací exprese přenašečů *SILAX* a inhibicí exprese přenašečů *SIPIN* působením modrého a červeného světla. Hodnota inhibice růstu hypokotylu *yg-2* je však při těchto nízkých koncentracích exogenních auxinů výrazně nižší, než je tomu u cv. Kokomo, a to nezávisle na použitých experimentálních světelných podmínkách. Při vyšších koncentracích se rozdíl v inhibici růstu hypokotylu mezi těmito genotypy stírá. Tento jev by mohl být objasněn hypotézou, která říká, že mutant *yg-2* má přirozeně nižší hladinu endogenních auxinů než kontrolní genotyp.



Obr. 11: Schéma hypotetického modelu (podle Morris, 2000) vlivu modrého a červeného světla na hladinu NAA v buňce hypokotylu



Obr. 12: Schéma hypotetického modelu (podle Morris, 2000) vlivu modrého a červeného světla na hladinu 2,4-D v buňce hypokotylu

Cílem této práce bylo ověřit, zda modré a červené světlo skutečně ovlivňuje polární transport auxinu zvyšováním či snižováním exprese genů pro přenašeče auxinu *SILAX* a *SIPIN*, a zjistit, jak se mění hladina endogenních auxinů v závislosti na experimentálních světelných podmínkách a jestli se hladina přirozených auxinů u jednotlivých genotypů liší.

5 MATERIÁL A METODIKA

Vliv modrého a červeného světla na expresi genů pro přenašeče auxinu *AUX/LAX* a *PIN* byl zkoumán pomocí kvantitativní polymerázové řetězové reakce na základě porovnávání množství transkriptů mRNA daných genů v hypokotylech čtyř genotypů rostlin rostoucích v různých světelných podmínkách – ve tmě, na modrém a na červeném světle. Hladina auxinů v rostlinách byla měřena pomocí hmotnostní spektrometrie spojené s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií.

5.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena čtyř genotypů rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) – kultivarů GT (cv. GT) a Kokomo (cv. Kokomo) a od nich odvozených mutantů *temporarily red light-insensitive 1* (*tri1*) a *yellow-green-2* (*yg-2*) s poruchou fotomorfogeneze.

Recesivní mutant *tri1*, odvozený od cv. GT, je deficientní ve PhyB1. To způsobuje necitlivost rostlin k červenému světlu asi dva dny po transferu ze tmy na červené světlo (van Tuinen *et al.*, 1995). Mutantní rostliny jsou světlejší a mají delší hypokotyl než cv. GT.

Mutant *yg-2*, odvozený od cv. Kokomo, vykazuje poruchu enzymu hemoxygenázy, který syntetizuje biliverdin IX α z hemu, což vede ke ztrátě chromoforu fytochromů – fytochromobilinu (Terry *et Kendrick*, 1996). Rostliny s touto mutací mají prodloužený hypokotyl a nízkou hladinu chlorofylu i antocyaninu, což se projevuje světle zeleným až žlutým zbarvením, podle něhož byl tento mutant pojmenován.

5.2 Příprava kultivačního média Murashige and Skoog

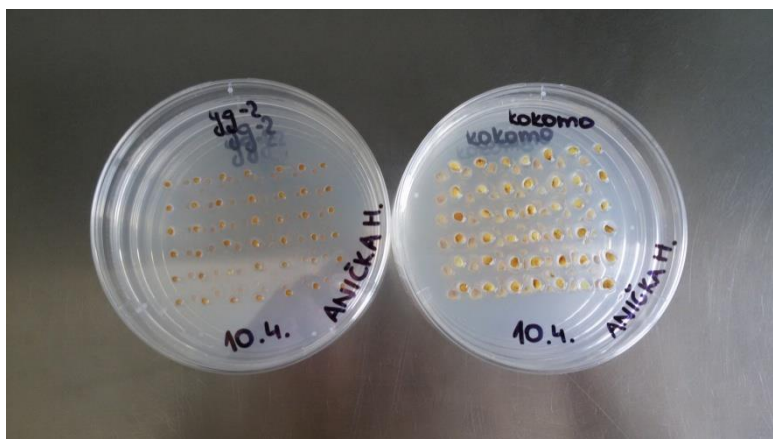
Pro kultivaci rostlin bylo použito médium Murashige-Skoog (MS) (Murashige *et Skoog*, 1962). Jeho příprava probíhá za stálého míchání pomocí magnetické míchačky. Do 1 l destilované vody se přidá 8,66 g lyofilizovaného MS média (kat. č. M5524, Caisson, USA), 20 g sacharózy a 390,4 mg pufru MES (2-(N-morfolino)ethansulfonová kyselina). Vzniklý roztok se doplní destilovanou vodou na celkový objem 2 l a hodnota pH je s použitím pH metru upravena na 6,1 pomocí 1M roztoku KOH. Do pěti 500ml varných lahví se naváží agar a následně se do nich rozlije připravené médium – do každé lahve 2,8 g agaru a 400 ml média. Poté se lahve uzavřou a uzávěr se obalí alobalem, na který se nalepí autoklávovací páska, jejíž proužky po správném autoklávování zčernají. Médium je sterilizováno v horkovzdušném autoklávu horkou párou za vysokého tlaku (110 °C, 120 kPa).

5.3 Pěstování rostlin, sklizeň a drcení vzorků

Pro každý pokus je třeba nejprve vypěstován rostlinný materiál. Samotná práce s médiem a semeny kvůli zajištění sterility probíhá v laminárním flowboxu.

Od každého genotypu je napočítáno 250 semen, která se umístí do 50ml plastové centrifugační zkumavky. V ní jsou semena povrchově vydesinfikována působením 40 ml vodného roztoku NaClO, který obsahuje 3% aktivního chloru. Po uplynutí 30 minut se roztok ze zkumavky odstraní a pomocí 10ml automatické pipety se semínka pětikrát propláchnou

sterilní destilovanou vodou. V mikrovlnné troubě se rozežřeje kultivační médium a do každé sterilní plastové kulaté Petriho misky o průměru 90 mm se nalije 20 ml média. Semena se vysejí pomocí sterilní pinzety na připravené Petriho misky tak, aby na každé misce bylo cca 50 semínek. Každá miska se zalepí dvakrát dokola po obvodu páskou z netkané textilie (Urgopore nebo Softpore), zabalí do alobalu a uloží ve vertikální poloze do kultivační komory (Microclima MC1000E, Snijders, Tilburg, Holandsko). Tam jsou semínka inkubována po dobu tří dní při teplotě 23 °C bez přístupu světla.



Obr. 13: Semena rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) vyšetá na kultivační médium v Petriho miskách (Anna Hýsková 2018)

Po třech dnech jsou vyklíčená semena transferována na nové kultivační MS médium do jedné řady doprostřed Petriho misky. Podle počtu vyklíčených semen je na každou misku přeneseno 5 až 10 semenáčků. Misky zalepené dvakrát dokola páskou z netkané textilie jsou uloženy ve vertikální poloze do kultivačních komor s kontinuálním modrým nebo červeným světlem. Misky s rostlinami kultivovanými ve tmě jsou zabaleny do alobalu a umístěny do stejné kultivační komory. Rostliny jsou uloženy v kultivačních komorách po dobu 7 dní při teplotě 23 °C. Zdrojem modrého světla je 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 jsou trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností 10 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ při 660 nm.

Po sedmidenní kultivaci jsou hypokotyly sklizeny, u každého semenáčku je odstřížen kořen s bází a vrchol s děložními lístky. Každý vzorek (všechny hypokotyly určitého genotypu rostoucího v konkrétních světelných podmínkách) je zvážen, zabalěn do alobalu a zmražen v tekutém dusíku. Vzorky jsou uchovávány v mrazáku při teplotě - 80 °C.

Následně jsou vzorky nadrceny. Do předem vychlazené sterilní třecí misky se nalije tekutý dusík, do něj se nasype 250 – 260 mg vzorku a ten se pomocí floučku rozdrťí na jemný prášek, který se pak pomocí špachtle přenesení do 2ml sterilní mikrozkušavky. Takto připravené vzorky jsou opět uloženy do mrazáku a lze je použít na kvantitativní analýzu auxinů nebo zjišťování exprese genů.

5.4 Kvantitativní analýza auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin

Množství rostlinných hormonů auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin rostoucích na různých světelných podmínkách bylo zjišťováno metodou tandemové hmotnostní spektrometrie spojené s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií (LC/MS-MS).

5.4.1 Extrakce auxinu a kyseliny abscisové

Do mikrozkušavky s 10 mg nadrceného vzorku se přidá 1 ml 50mM fosfátového pufru obsahujícího 0,1 % sodné soli diethyldithiokarbamové kyseliny, která slouží jako antioxidant. Fosfátový pufr se připraví zředěním 0,5M zásobního roztoku, který je získán smícháním 57,7 ml 0,5M Na₂HPO₄ × 12 H₂O a 42,3 ml 0,5M NaH₂PO₄ × 2 H₂O. Do každé mikrozkušavky se přidá interní standard [¹³C]IAA a [²H]ABA, což jsou molekuly IAA a ABA označené pomocí izotopu uhlíku ¹³C, respektive těžkého vodíku ²H. Vzorky jsou 1 minutu homogenizovány pomocí oscilačního mlýnu (MixerMill MM 301 bead mill; Retsch GmbH, Haan, Germany), 10 minut inkubovány v lednici a neustále protřepávány, při čemž dochází k extrakci, a následně centrifugovány 15 minut při 20 000 otáčkách za minutu (revolutions per minute (rpm)).

Poté jsou vzorky přečišťovány metodou extrakce na pevné fázi pomocí kolon připravených vložením tří vrstev každého ze sorbentů C₁₈ a SDB-XC (Empore™; 3M™, Saint Paul, USA) do sterilní plastové pipetovací špičky. Kolony jsou kondicionovány postupným promytím 50 µl acetonu, 50 µl methanolu a 50 µl H₂O.

Před nanesením na kolonu je 200 µl extraktu smícháno se 100 µl 0,1M HCl. pH vzorku sníží na 2,7 a deprotonovaná polární forma IAA přijme vodíkový ion, díky čemuž se stane méně rozpustnou a zachytí se v nepolárním sorbentu. 300 µl extraktu naneseného v koloně se vloží na 30 min do centrifugy na 4 200 rpm na 4 °C. Poté jsou kolony promyty 50 µl 0,1M kyseliny octové a vloženy do centrifugy na 20 minut při 3 200 rpm, tím dojde k vymytí iontů a solí. K eluci dojde přidáním 50 µl 80% methanolu a stočením v centrifuze 20 minut při 3 000 rpm. Eluáty jsou přeneseny do skleněných vialek s inzertem a odpařeny (Pěňčík *et al.*, 2018).

5.4.2 Kvantifikace auxinu a kyseliny abscisové

Odpařené vzorky jsou před LC/MS-MS rozpuštěny ve 40 µl 5% vodného roztoku methanolu, který slouží jako mobilní fáze. Analýza se provádí pomocí 1290 Infinity LC system a 6490 Triple Quadrupole LC/MS system (Agilent Technologies, Santa Clara, USA). 20 µl každého vzorku je vstříknuto do kolony s reverzní fází (Kinetex C18 100A; Phenomenex, Torrance, USA), tedy se sorbentem, který má větší polaritu než mobilní fáze. Kolona je promývána stálým průtokem mobilní fáze. Analyty jsou eluovány pomocí tzv. gradientové eluce, při které dochází k pozvolné změně poměru methanolu a vody v roztoku mobilní fáze z počátečního poměru 5:95 na 50:50. Následně je poměr zvýšen až na 99:1 methanolu ku H₂O, tím dojde k úplnému promytí kolony, a opětovně snížen na 5:95, tím je kolona kondicionována a připravena na nanesení dalšího vzorku.

Eluát protéká z kolony do hmotnostního spektrometru. Dojde k ionizaci molekul ve vzorku, které poté prochází kvadrupólem. Ten se skládá z elektrického pole vytvořeného ze čtyř paralelních tyčí – elektrod. Při průchodu iontů elektrickým polem dojde k dalšímu přečištění, na detektor náboje tedy dopadají pouze zvolené molekuly. Pro větší specifitu měření je použit systém tří po sobě jdoucích kvadrupólů. První kvadrupól se chová jako hmotnostní filtr, druhý působí jako kolizní cela, kde jsou vybrané ionty rozděleny do fragmentů. Výsledné fragmenty jsou analyzovány třetím kvadrupólem (Yost *et Enke*, 1979).

Hladina hormonů ve vzorcích je kvantifikována metodou izotopového zředování (Rittenberg *et* Foster, 1940).

5.5 Relativní kvantifikace transkripce genů kódujících přenašeče auxinu

Expres genů pro proteinové přenašeče byla zjišťována kvantitativní polymerázovou řetězovou reakcí (qPCR, Real-time PCR). Při klasické polymerázové řetězové reakci (PCR) dochází k amplifikaci konkrétního úseku DNA pomocí enzymu DNA polymerázy. Reakce probíhá v několika krocích. Při teplotě 94 °C dojde k oddělení řetězců DNA, na které se v další fázi vážou primery, oligonukleotidy se specifickou sekvencí, která je komplementární k počáteční (forward primer) a koncové (reverse primer) sekvenci úseku, který chceme amplifikovat. Vazba primerů se označuje jako hybridizace a probíhá při teplotách v rozmezí 55 – 60 °C. Na úseky s navázanými primery se váže DNA polymeráza, která syntetizuje nový komplementární řetězec DNA. Tyto tři fáze se při reakci neustále opakují, díky tomu dojde k syntéze obrovského množství konkrétního úseku DNA (Waters *et* Shapter, 2013).

Real-time PCR je téměř shodný proces jako klasická PCR, rozdíl je v použití flouorescenčního barviva, které se váže na dvouřetězovou DNA a umožňuje nám sledovat nárůst konkrétního produktu v čase.

Real-time PCR slouží pro kvantifikaci DNA. Při zjišťování změn exprese konkrétních genů jsou sledovány změny v množství messenger RNA (mRNA), je tedy nutné mRNA z hypokotylů izolovat a použít jako templát pro syntézu komplementární DNA (cDNA).

Jako cílové geny, jejichž exprese byla sledována, byl zvolen gen pro effluxový přenašeč auxinu *SIPIN1* a influxový přenašeč *SILAX4*.

5.5.1 Extrakce a izolace RNA s použitím Isolate II RNA Plant Kit (Bioline)

Expres určitého genu se hodnotí na základě množství transkriptů mRNA, proto je třeba nejprve provést izolaci celkové RNA ze vzorků. RNA je velice náchylná na působení ribonukleáz (RNáz), je tedy nutné při práci dodržovat čistotu, používat inhibitory RNáz a vodu, která RNázy neobsahuje.

Práce se vzorky probíhá v digestoři. Do každé z mikrozkušavek s nadrcenými vzorky se přidá 350 µl Lysis Buffer RLY (30% - 60% roztok guanidin thiokyanátu; Bioline, London, UK) a 3,5 µl β-merkaptioethanolu. Mikrozkušavky jsou následně prudce vortexovány, aby došlo k homogenizaci vzorků a lýzi buněk. Lyzát je přepipetován do kolony s filtrem (ISOLATE II Filter; Bioline, London, UK), která se vloží do centrifugy na 2 minuty na 13 000 rpm při 24 °C. Supernatant se přepipetuje do 1,5ml sterilní mikrozkušavky, do které je následně přidáno 350 µl 70% ethanolu. Roztok je důkladně vortexován a přepipetován do izolační kolony (ISOLATE RNA II Plant Column; Bioline, London, UK). Kolony se vloží do centrifugy na 30 sekund, tím dojde k přefiltrování roztoku a navázání RNA na kolonu, přefiltrovaný roztok se vylije. Do kolony se přidá 350 µl Membrane Desalting Buffer MEM (1% - 10% roztok guanidin hydrochloridu; Bioline, London, UK), kolony se vloží do centrifugy na 1 minutu a přefiltrovaný roztok se vylije. Kontaminující DNA je odstraněna nanesením 10 µl RNase-free DNase I (enzym deoxyribonukleáza; Bioline, London, UK) na střed membrány v koloně společně s 90 µl Reaction Buffer for DNase I RDN. Reakce probíhá 15 minut při pokojové teplotě, poté je deoxyribonukleáza deaktivována

200 μ l Wash Buffer RWE1 (24% - 36% roztok guanidin hydrochloridu v ethanolu; Bioline, London, UK) a kolona se dvakrát vymyje Wash Buffer RW2 (Bioline, London, UK), poprvé 600 μ l, podruhé 250 μ l. Kolony se vloží do centrifugy na 2 minuty a přefiltrovaný roztok se vylíje. Kolony se přenesou na 1,5ml sterilní mikrozkuřavky. Na membránu v koloně se nanese 40 μ l RNase-free water (voda bez RNázové aktivity; Bioline, London, UK), která se nechá 5 minut působit při pokojové teplotě, a poté se kolony vloží do centrifugy na 1 minutu na 13 000 rpm při 24 °C, čímž dojde k eluci RNA. Ihned po izolaci je nutné vzorky přečistit.

5.5.2 Přečištění izolované RNA

Pro odstranění případné kontaminace genomovou DNA je třeba roztok celkové RNA ošetřit DNázou, enzymem, který degraduje DNA.

Do každého vzorku izolované RNA se přidá 4 μ l 10x DNase I Buffer (Takara Bio, Kusacu, Japonsko), 4 μ l Recombinant DNase I (RNase-free) (enzym deoxyribonukleáza; Takara Bio, Kusacu, Japonsko), 0,5 μ l Recombinant RNase Inhibitor (inhibitor ribonukleáz; Takara, Kusacu, Japonsko) a 1,5 μ l H₂O nuclease free. Mikrozkuřavky se vzorky se vloží do heateru předehřátého na 37 °C na 1 hodinu. Po uplynutí stanovené doby se mikrozkuřavky přenesou na led, do každého vzorku se přidají 2 μ l 0,5M ethylendiamintetraoctové kyseliny (EDTA), která deaktivuje DNázu, mikrozkuřavky se vzorky se vloží do heateru předehřátého na 80 °C na 2 minuty a poté zpět na led. Do každého vzorku se přidá 48 μ l H₂O, 10 μ l 3M octanu sodného, 250 μ l vychlazeného 96% ethanolu a 2 μ l glykogenu (Glycogen RNA Grade 20 mg/ml). Vzorky se promíchají a uloží do mrazáku do - 80 °C přes noc.

Následující den se mikrozkuřavky nechají pomalu rozmrznout na ledu, vloží se do centrifugy vychlazené na 4 °C na 30 minut při 13 000 rpm a poté se veškerý supernatant vylíje. Do každého vzorku se přidá 500 μ l vychlazeného 70 % ethanolu a poté 500 μ l vychlazeného 96% ethanolu, po každém kroku se mikrozkuřavky vloží na 5 minut do centrifugy a supernatant se vylíje. Mikrozkuřavky se vloží na 2 minuty zpět do centrifugy na 13 000 rpm při 4 °C, vzniklý supernatant se poté odpipetuje a mikrozkuřavky se nechají 5 minut schnout otevřené a položené dnem vzhůru na ubrousku. Pellet je rozpuštěn v 15 μ l RNase-free water (Bioline, London, UK).

Změří se koncentrace a čistota celkové RNA ve vzorcích a mikrozkuřavky se vzorky jsou uloženy do mrazáku do - 80 °C.

5.5.3 Měření koncentrace RNA

Koncentrace celkové RNA se měří spektrofotometrem (NanoDrop™ One/One c, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA). Absorbance roztoku RNA je měřena pro vlnové délky 260 nm a 280 nm. Koncentrace nukleové kyseliny je spočítána s použitím Lambertova-Beerova zákona, který předpokládá lineární změnu absorbance v závislosti na koncentraci. Absorbance vlnové délky 260 nm (A₂₆₀) rovna 1 odpovídá přibližně 40 μ g/ml jednořetězcové RNA. Podíl A₂₆₀/A₂₈₀ se používá k posouzení čistoty RNA – hodnota podílu A₂₆₀/A₂₈₀ v rozmezí 1,8 – 2,1 indikuje neznečištěnou RNA.

5.5.4 Kontrola čistoty RNA pomocí PCR

Před syntézou cDNA je nutné zkontrolovat, zda není vzorek znečištěn obsahem DNA. K tomu se používá PCR, při které se amplifikuje úsek genu kódujícího glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenázu (*GAPDH*), enzym, který katalyzuje jeden z kroků glykolýzy, fosforylaci glycerinaldehyd-3-fosfátu na 1,3-bisfosfoglycerát.

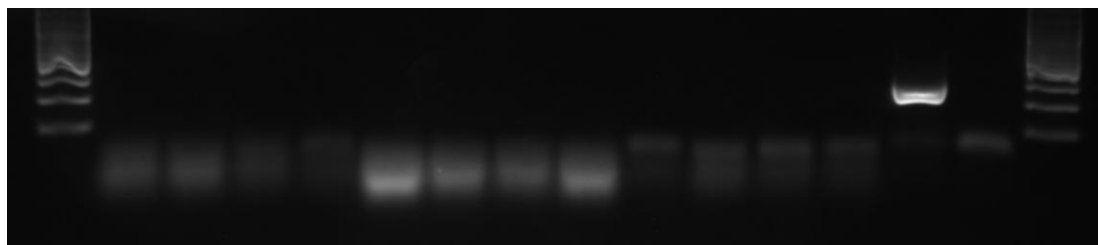
Reakční směs je připravena v 0,2ml mikrozkušavkách z 2 μ l vzorku izolované a přečištěné RNA, 13 μ l nuclease-free H₂O, 4 μ l MyTaq Buffer (Takara Bio, Kusacu, Japonsko), 0,5 μ l 10 μ M reverse primer *GAPDH*, 0,5 μ l 10 μ M forward primer *GAPDH* (Tab. 1) a 0,1 μ l MyTaq Polymerase (DNA-dependentní DNA polymeráza; Takara Bio, Kusacu, Japonsko). Mikrozkušavky jsou vloženy do cycleru (C1000 Thermal Cycler, Bio-Rad Laboratories, Hercules, USA). Po proběhnutí PCR podle stanoveného programu (Tab. 2) je výsledek PCR zobrazen pomocí gelové agarózové elektroforézy. Pokud je vzorek RNA bez znečištění, neměla by být na gelu u jednotlivých vzorků viditelná žádná výrazná skupina molekul DNA, tzv. band (Obr. 14).

Tab. 1: Sekvence primerů pro gen *GAPDH*

sekvence primeru <i>GAPDH</i> (forward)	5'-ATC CAT TTA TTT CCA CTG ATT ACA A-3'
sekvence primeru <i>GAPDH</i> (reverse)	5'-CAT GGG AGC ATC TTT GCT A-3'

Tab. 2: Program PCR pro gen *GAPDH*

teplota	čas	} 45 cyklů
94 °C	3 minuty	
94 °C	30 sekund	
55 °C	30 sekund	
72 °C	1 minuta	
72 °C	5 minut	
4 °C	...	



Obr. 14: Výsledek elektroforézy po PCR pro kontrolu izolované RNA (zleva GeneRuler DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA), 12 vzorků, pozitivní kontrola, negativní kontrola a GeneRuler DNA Ladder)

5.5.5 Gelová agarózová elektroforéza

Gelová agarózová elektroforéza je separační metoda používaná pro analýzu nukleových kyselin založená na pohybu záporně nabitých částic nukleových kyselin v elektrickém poli směrem ke kladnému pólu, tedy k anodě. Dělení probíhá v agarózovém gelu tvořeném sítí polymerních molekul za přítomnosti elektrického proudu. Rychlost pohybu molekul nukleových kyselin v gelu je nepřímě úměrná jejich velikosti, menší molekuly se gelem pohybují rychleji.

Gel se připraví smícháním 1,2 g agarózy a 80 ml 0,5x TBE pufru (tris/borate/EDTA roztok; Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a rozpouštěním při teplotě zvýšené na bod varu, dokud není roztok čirý. Roztok se obarví 5 µl GelRed (Biotium, Hayward, California, USA), nalije do formy a nechá alespoň 30 minut tuhnout. Při tuhnutí je do gelu vložen hřebínek, tím se vytvoří jamky pro nanášení vzorků.

Vzorky se obarví 1 µl DNA Gel Loading Dye (6x, Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) a nanesou do jamek v gelu. Elektroforéza probíhá horizontálně v roztoku 0,5x TBE pufru při napětí 80 V přibližně 30 minut, poté jsou vzorky v gelu zviditelněny pomocí UV záření a fotografie gelu je zpracována pomocí počítačového programu GeneSys.

5.5.6 Syntéza cDNA s použitím SensiFAST™ cDNA Synthesis Kit (Bioline)

Real-time PCR slouží pro kvantifikaci DNA, je tedy nutné izolovanou mRNA, která je součástí celkové RNA, přepsat do komplementární DNA (cDNA). Tuto reakci katalyzuje enzym reverzní transkriptáza, což je RNA-dependentní DNA polymeráza, která začíná syntézu v místě, kde je na mRNA navázaný primer. Při post-transkripční modifikaci je na 3' konec mRNA přidán poly-A konec, úsek tvořený za sebou uspořádanými adenosinmonofosfáty. Jako primery jsou proto používány oligonukleotidy tvořené thymidinmonofosfáty.

Syntéza cDNA se provádí z 1 µg izolované celkové RNA, je tedy třeba spočítat objem roztoku RNA, který použijeme pro reakci, z koncentrace naměřené spektrofotometrem. Do 0,2ml mikrozkušavky se napipetuje spočítaný objem RNA a H₂O tak, aby celkový objem roztoku byl 8 µl. Poté se do mikrozkušavky přidá 1 µl 10mM dNTP (deoxyribonukleosid trifosfáty; Bioline, London, UK) a 1 µl 50µM Oligo dT primer (Bioline, London, UK). Mikrozkušavky se vloží na 5 minut do cycleru předeřátého na teplotu 65 °C (Tab. 3). Při této teplotě dochází k denaturaci RNA, tedy odstranění sekundárních struktur, které mohou být na molekule formovány, a vazbě primerů. Poté se do každé mikrozkušavky přidá 4,5 µl RNase/DNase free-water (Bioline, London, UK), 4 µl 5x Prime Script Buffer (Bioline, London, UK), 0,5 µl RNase Inhibitor (enzym inhibitor RNáz; Bioline, London, UK) a 1 µl Prime Script Reverse Transcriptase (enzym reverzní transkriptáza; Bioline, London, UK). Mikrozkušavky se vloží do cycleru, kde 60 minut probíhá syntéza cDNA při 42 °C, reakce je následně ukončena zvýšením teploty na 70 °C po dobu 15 minut. Poté se do každé mikrozkušavky přidá 0,5 µl RNase H (enzym endoribonukleáza; Bioline, London, UK) a mikrozkušavky se vloží na 15 minut zpět do cycleru na 37 °C, aby došlo k odstranění RNA. Po skončení programu se mikrozkušavky se vzorky cDNA uloží do mrazáku do teploty - 20 °C.

Tab. 3: Průběh syntézy cDNA

teplota	čas
65 °C	5 minut
42 °C	60 minut
70 °C	15 minut
37 °C	15 minut
4 °C	...

5.5.7 Kontrola nasyntetizované cDNA

Před provedením kvantitativní real-time PCR je nutné zkontrolovat, zda opravdu došlo k syntéze dostatečného množství cDNA. K tomu se používá PCR, při které se amplifikuje úsek genu kódujícího SERINE/THREONINE PROTEIN PHOSPHATASE 2A (PP2Acs), enzym se serin/threonin fosfatázovou aktivitou, který je exprimován ve všech buňkách.

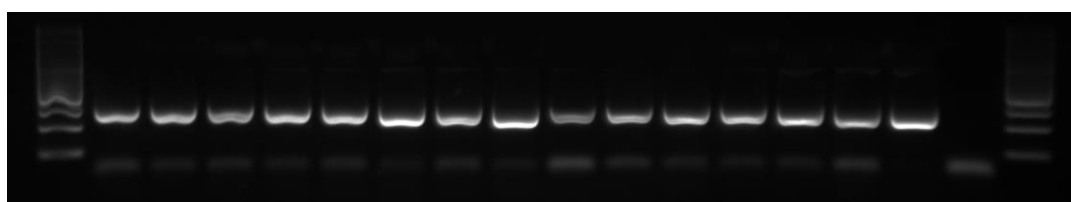
Do 0,2ml mikrozkušavky se napipetuje 2 μ l roztoku cDNA naředěného na $\frac{1}{2}$ (1 μ l cDNA : 1 μ l H₂O), 13 μ l nuclease-free H₂O, 4 μ l MyTaq Buffer (Takara Bio, Kusacu, Japonsko), 0,5 μ l 10 μ M reverse primer PP2Acs, 0,5 μ l 10 μ M forward primer PP2Acs (Tab. 4) a 0,1 μ l MyTaq Polymerase (Takara Bio, Kusacu, Japonsko). Mikrozkušavky se vloží do cycleru a nechá se proběhnout PCR podle zvoleného programu (Tab. 5). Výsledek PCR je poté zobrazen na gelové agarózové elektroforéze. Pokud syntéza cDNA proběhla ve všech vzorcích v pořádku, je na gelu u každého vzorku viditelný band srovnatelný s pozitivní kontrolou (Obr. 15).

Tab. 4: Sekvence primerů pro gen *PP2Acs*

sekvence primeru PP2Acs (forward)	5'-CGA TGT GTG ATC TCC TAT GGT C-3'
sekvence primeru PP2Acs (reverse)	5'-AAG CTG ATG GGC TCT AGA AAT C-3'

Tab. 5: Průběh PCR pro gen *PP2Acs*

teplota	čas	} 30 cyklů
94 °C	3 minuty	
94 °C	30 sekund	
60 °C	30 sekund	
72 °C	45 sekund	
72 °C	5 minut	
4 °C	...	



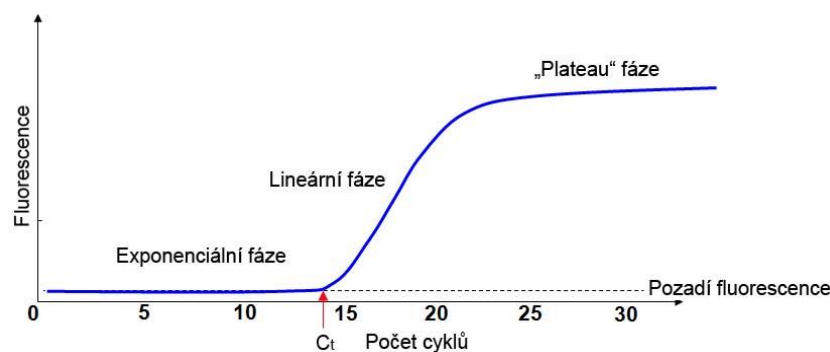
Obr. 15: Výsledek elektroforézy po PCR pro kontrolu nasyntetizované cDNA (zleva GeneRuler DNA Ladder, 14 vzorků, pozitivní kontrola, negativní kontrola a GeneRuler DNA Ladder)

5.5.8 Kvantitativní Real-time PCR

Metoda Real-time PCR je založena na klasické PCR, tedy postupné amplifikaci konkrétního úseku DNA. PCR probíhá ve speciálním cycleru (CFX96 Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA), který v průběhu každého cyklu zaznamenává množství DNA. Detekce DNA je umožněna použitím fluorescenčního substrátu, který se váže na přítomnou DNA, fluorescenční záření je vyzařováno až po navázání substrátu na DNA. Hladina fluorescence substrátu navázaného na DNA je detekována detektorem a odráží množství přítomné DNA. Jako fluorescenční substrát byl použit SYBR Green (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA), zelené fluorescenční barvivo, které

v navázaném stavu absorbuje vlnové délky okolo 497 nm a emituje fluorescence vlnové délky okolo 520 nm (Wilhelm *et al.*, 2003).

Průběh PCR reakce lze rozdělit do čtyř částí (Obr. 16). V první fázi lze očekávat exponenciální nárůst množství DNA. V této fázi je však množství DNA nízké a fluorescence není detekovatelná. V druhé fázi pokračuje exponenciální průběh reakce, množství DNA už je dostatečné, aby fluorescence přesáhla úroveň pozadí a byla zachycena detektorem. V ideálním případě lze nárůst množství DNA vyjádřit jako 2^n , kde n je pořadí cyklu. Intenzita fluorescence a množství DNA věrně odráží množství templátové DNA původně dodané do reakce, proto se kvantifikace templátové DNA provádí na základě fluorescence detekované právě v této fázi. Třetí fáze je lineární fází, množství DNA lze vyjádřit jako $2n+1$, kde n je pořadí cyklu. V této fázi dochází ke strmému nárůstu fluorescence. Ve čtvrté fázi, která je nazývána také jako „plateau“ fáze, dochází k vyčerpání některých komponent reakce a kinetika reakce se výrazně zpomaluje (Vu *et al.*, 2000).



Obr. 16: Kinetika PCR reakce

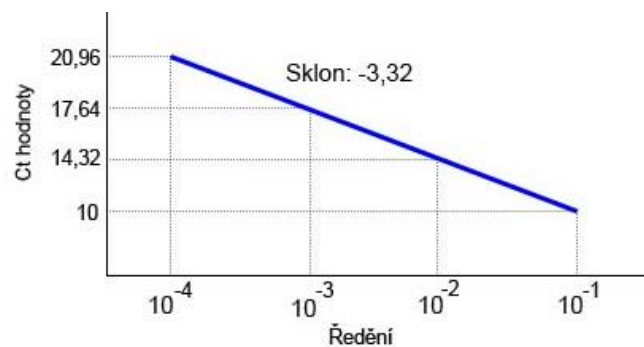
Real-time PCR je založena na konceptu C_t hodnot (cycle of treshold). C_t hodnota udává cyklus, ve kterém došlo k nárůstu fluorescence nad práh pozadí a došlo k jejímu zachycení detektorem. Čím je C_t hodnota nižší, tím více bylo do reakce dodáno templátové DNA.

Kvantifikace je prováděna buď jako relativní, kdy se hladina fluorescence testovaného vzorku srovnává s hladinou fluorescence jiného vzorku, nebo jako absolutní, kdy množství DNA odečítáme z kalibrační křivky, kterou nám poskytne vzorek DNA o dané koncentraci. Pro tento experiment byla použita relativní kvantifikace.

U testovaných vzorků je třeba ověřit, zda bylo do reakce vloženo srovnatelné množství DNA. Proto se při real-time PCR vyhodnocují i tzv. referenční geny. Koncentrace DNA referenčního genu by měla být v testované DNA přibližně stejná jako koncentrace templátu. Jako referenční geny se používají tzv. housekeeping geny, tedy geny nutné pro udržení základních funkcí buňky, které jsou exprimovány stále při normálních i patofyziologických podmínkách. Pro tento experiment byly vybrány dva housekeeping geny – *GAPDH*, který kóduje enzym katalyzující jeden z kroků glykolýzy, a *PP2Acs*, jehož produktem je enzym se serin/threonin fosfatázovou aktivitou důležitý při přenosu informace v buňce (Joseph *et al.*, 2018). Kalkulace s použitím housekeeping genů jako kontroly pak tedy je $2^{\Delta C_t1 - \Delta C_t2}$, kde $\Delta C_t1 = C_t(cil\ 1) - C_t(ref\ 1)$, $\Delta C_t2 = C_t(cil2) - C_t(ref\ 2)$, kde *cil 1* je cílový gen u vzorku 1, *cil 2* cílový gen u vzorku 2, *ref 1* referenční gen u vzorku 1 a *ref 2* referenční gen u vzorku 2.

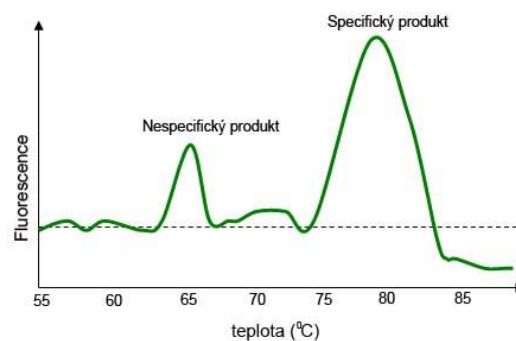
Pro přesnější kvantifikaci při real-time PCR je nutné zohlednit i účinnost vlastní reakce. Pokud by efektivita reakce byla 100 %, platilo by, že v každém cyklu reakce dojde ke zdvojnásobení počtu molekul a množství molekul lze vyjádřit jako 2^n , kde n je počet proběhlých cyklů. Pokud je efektivita reakce snížena, reakce běží dle eff^n , kde eff je efektivita a n je počet proběhlých cyklů. Účinnost reakce lze spočítat ze sklonu standardní křivky, která je vyjádřením vztahu C_t hodnoty vzhledem k množství templátové DNA vložené do reakce. Standardní křivka je získána přípravou ředící řady templátové DNA, pro tento experiment byla zvolena dvojková ředící řada. S jednotlivými vzorky je provedena real-time PCR a ze získaných C_t hodnot je sestrojena standardní křivka (Obr. 17). Účinnost reakce je spočítána pomocí hodnoty sklonu standardní křivky dle $eff = (10^{(-1/sklon)} - 1) \cdot 100$, kde eff je účinnost reakce a $sklon$ je lineární koeficient standardní křivky. Efektivita reakce by se měla blížit 100 %. Pokud je účinnost reakce výrazně nižší, snižuje se přesnost kvantifikace, příliš vysoká hodnota účinnosti naopak indikuje nízkou kvalitu vzorku.

Získaná hodnota efektivy real-time PCR se zahrne při kvantifikaci srovnávaných vzorků. Pro výpočet se využívá vzorec $R = eff_{(ref)}^{Ct_{(ref)}} / eff_{(cil)}^{Ct_{(cil)}}$, kde $Ct_{(ref)}$ je C_t hodnota získaná pro referenční gen, $Ct_{(cil)}$ je C_t hodnota získaná pro gen zájmu, $eff_{(ref)}$ je efektivita reakce k referenčnímu genu a $eff_{(cil)}$ je efektivita reakce k cílovému genu. Získaná hodnota R pak slouží ke srovnávání exprese daných genů u jednotlivých vzorků (Wilhelm *et* Pingoud, 2003).



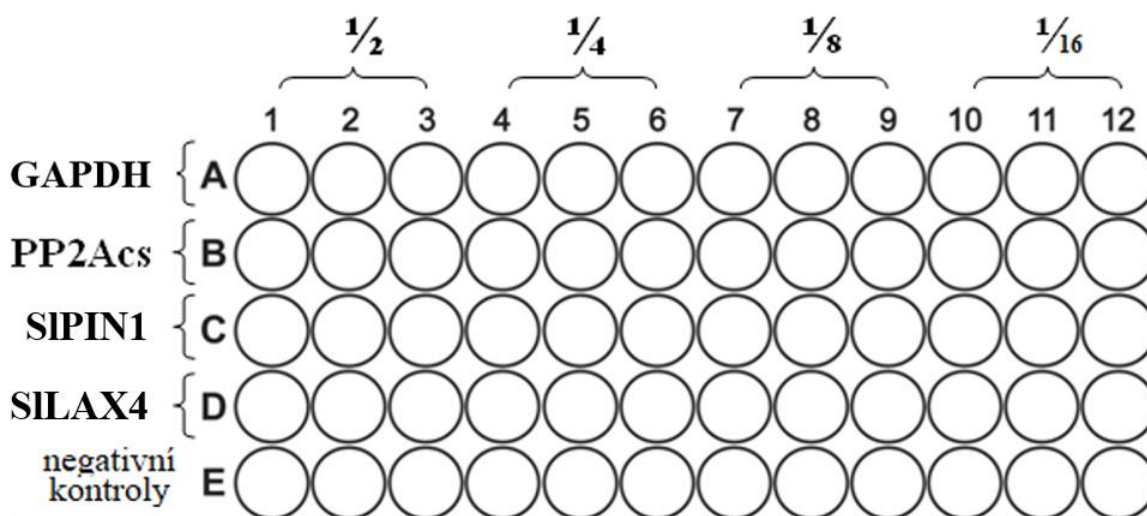
Obr. 17: Příklad sestrojení standardní křivky pro desetivou ředící řadu templátové DNA

Při použití SYBR Green jako fluorescenčního substrátu je třeba zkontrolovat, zda při PCR nevznikají nescifické produkty či dimery primerů. K tomu se využívá křivka tání, která ukazuje změny intenzity fluorescence při různých teplotách (Obr. 18). Pokud má křivka pouze jeden vrchol, reakce je specifická, pokud má křivka vrcholů více, znamená to, že kromě specifických produktů vznikají při reakci i produkty nescifické (Ririe *et al.*, 1996).



Obr. 18: Křivka tání pro PCR, při které vzniká specifický i nescifický produkt (vlevo vrchol indikující vznik nescifického produktu, vpravo vrchol indikující vznik specifického produktu)

Real-time PCR se obvykle provádí v 96ti jamkových destičkách (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA), fluorescence je cyclerem zaznamenávána v každé jamce zvlášť. Nejdříve je třeba provést optimalizaci primerů pro zjištění efektivity primerů, specifity primerů a zvolení ředění cDNA, které bude při real-time PCR dále používáno. Pro optimalizaci byla zvolena dvojková ředící řada, vzorek nasyntetizované cDNA byl tedy naředěn na $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{16}$. Do jamek na destičce se nanese 4 μ l vzorku naředěné cDNA, každý vzorek se pipetuje na desku v triplicátu pro zamezení chybovosti. Do každé jamky se přidá 10 μ l SYBR Green, 0,8 μ l forward primeru a 0,8 μ l reverse primeru pro zvolený gen a 4,4 μ l nuclease-free H₂O dle schématu (Obr. 19). Na destičku se napipetují také negativní kontroly, které místo vzorku naředěné cDNA obsahují 4 μ l nuclease-free H₂O. Destička s připravenými vzorky se vloží do cycleru a spustí se příslušný program (Tab. 7). Pomocí CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, Hercules, Kalifornie, USA) se poté vyhodnotí výsledky, spočítá se účinnost primerů a na základě C_t hodnot, které by měly být v rozmezí od 18 – 30, se zvolí nejvhodnější ředění cDNA pro následující pokusy.



Obr. 19: Schéma nanesení vzorků a primerů pro zvolené geny na destičku při optimalizaci primerů

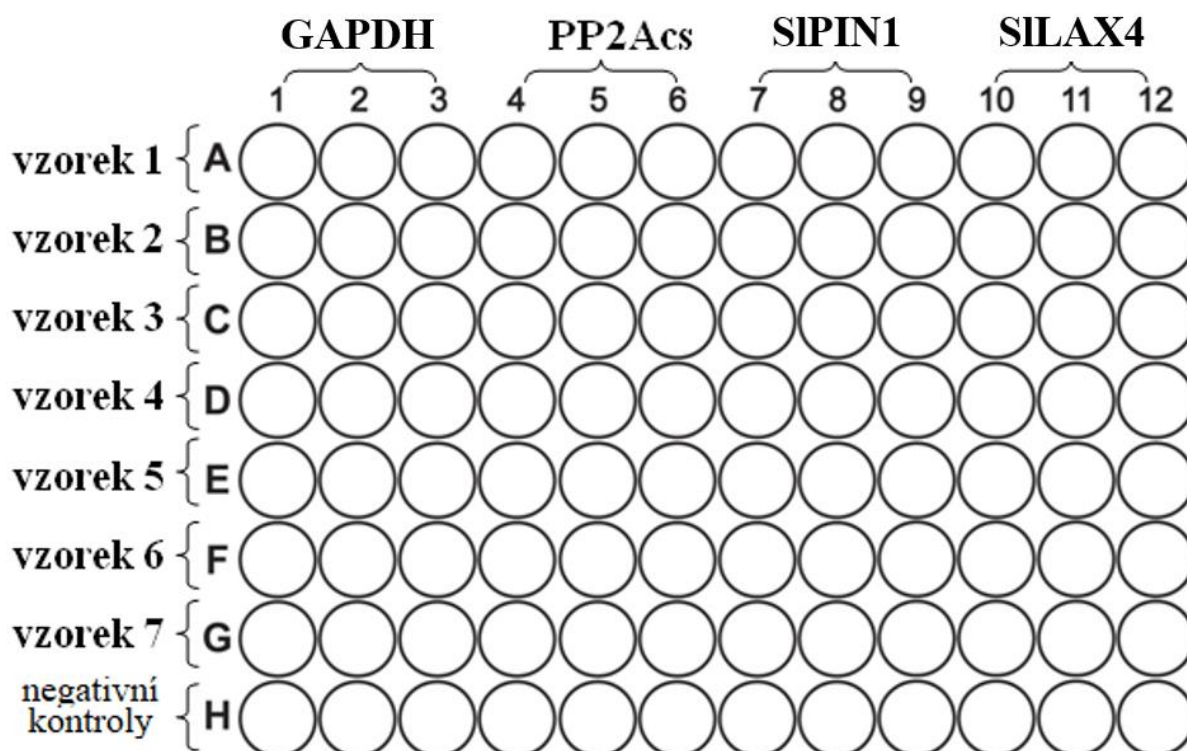
Pro samotné zjišťování exprese jsou vzorky naředěny dle zvoleného ředění, pro tento experiment bylo zvoleno ředění na $\frac{1}{4}$. Do každé jamky na destičce se napipetuje 10 μ l SYBR Green, 4,4 μ l nuclease-free H₂O, 0,8 μ l forward primeru a 0,8 μ l reverse primeru pro dva housekeeping geny *GAPDH* a *PP2Acs* (Tab. 1 a Tab. 4) a pro dva geny zájmu *SIPIN1* a *SILAX4* (Tab. 6) tak, aby primery pro *GAPDH* byly napipetovány do prvních tří jamek každého řádku, primery pro *PP2Acs* do dalších tří jamek každého řádku, primery pro *SIPIN1* do následujících tří jamek každého řádku a primery pro *SILAX4* do posledních tří jamek každého řádku. Do každé jamky jsou poté přidány naředěné cDNA tak, aby daný vzorek cDNA byl ve všech dvanácti jamkách jednoho řádku (Obr. 20). Připravená deska se poté vloží do cycleru a spustí se připravený program (Tab. 7). Výsledky real-time PCR se zpracují pomocí CFX Maestro™ Software a vyhodnotí v programu Microsoft Office Excel.

Tab. 6: Sekvence primerů pro geny *SIPIN1* a *SILAX4* (podle Pattison *et* Catalá, 2012)

sekvence primeru <i>SIPIN1</i> (forward)	5'-GCT GCA GGC TGG TCT AGA TT-3'
sekvence primeru <i>SIPIN1</i> (reverse)	5'-AAC AAT GGC AAC AAA GCA CA-3'
sekvence primeru <i>SILAX4</i> (forward)	5'-GAT CCC AGT CGG TGT TCC TA-3'
sekvence primeru <i>SILAX4</i> (reverse)	5'-GAT GGG CCA GTA TGA GCA AT-3'

Tab. 7: Průběh Real-time PCR

teplota	čas	} 40 cyklů
95 °C	2 minuty	
95 °C	5 sekund	
58 °C	20 sekund	
75 °C	10 sekund	
postupné zvyšování teploty až na 95 °C	...	

**Obr. 20:** Schéma nanesení vzorků a primerů pro zvolené geny na destičku pro real-time PCR

5.5.9 Analýza dat

Se všemi genotypy pěstovanými za všech vybraných světelných podmínek byly provedeny celkem čtyři nezávislé experimenty. Výsledky jednotlivých pokusů byly zprůměrovány a byla pro ně vypočítána standardní chyba (SE). Pro stanovení signifikance změn v relativní expresi genů byl použit randomizační test provedený programem REST 2009 (Quiagen, Hilden, Německo).

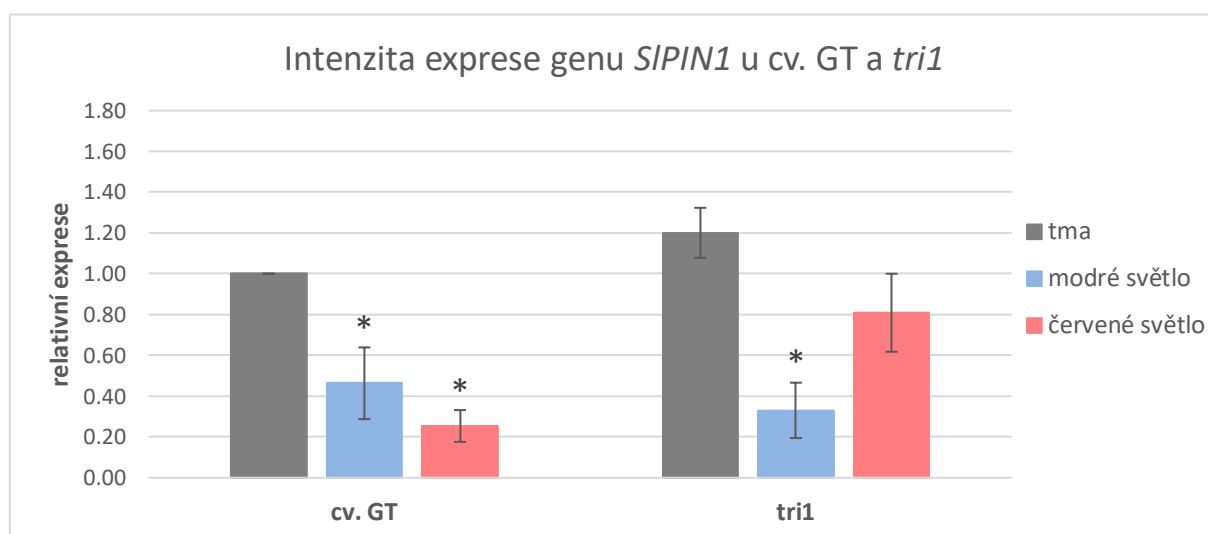
6 VÝSLEDKY

6.1 Relativní kvantifikace exprese genů pro transportéry auxinu

V experimentech se pracovalo celkem se čtyřmi genotypy rajčete jedlého - kontrolními nemutovanými genotypy cv. GT a cv. Kokomo a od nich odvozenými mutanty *tri1* a *yg-2*. U těchto genotypů byla zjišťována relativní změna exprese genů pro přenašeče auxinu PIN a LAX v závislosti na různých světelných podmínkách. Rostliny byly týden kultivovány *in vitro* ve tmě a na kontinuálním modrém a červeném světle. Hypokotyle těchto rostlin byly poté sklizeny a pomocí RT-PCR byly zjišťovány relativní změny v transkripci genů kódujících transportéry auxinu. Na základě znalosti o tkáňové specifitě exprese jednotlivých proteinů patřících mezi přenašeče auxinu PIN a LAX byly jako geny zájmu zvoleny *SIPIN1*, gen pro effluxový transportér auxinu, a *SILAX4*, gen pro influxový přenašeč, jejichž exprese je v hypokotylu nejvyšší (Pattison *et Catalá*, 2012). Celkem byly provedeny čtyři nezávislé experimenty.

6.1.1 Exprese genu *SIPIN1* v hypokotylech cv. GT a mutanta *tri1*

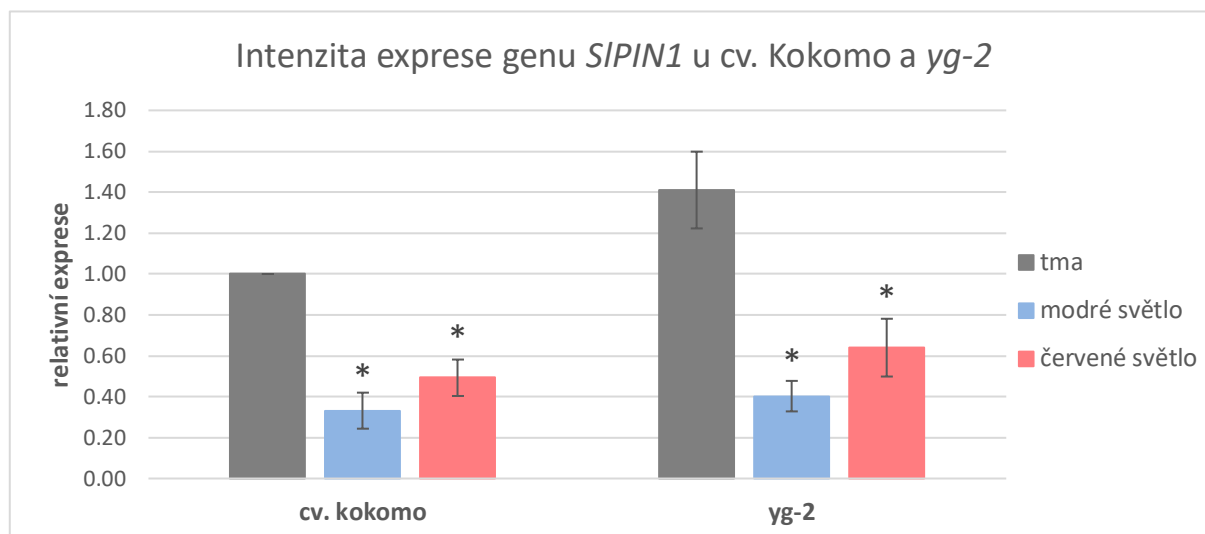
Ze získaných dat vyplývá, že exprese genu *SIPIN1* u cv. GT je působením modrého a červeného světla signifikantně snížena (Obr. 21). Oproti rostlinám rostoucím ve tmě, vůči kterým expresi genu zájmu srovnáváme a je tedy rovna 1,00, je na modrém světle je exprese *SIPIN1* rovna 0,46 a na červeném světle 0,25. U mutanta *tri1* je relativní exprese *SIPIN1* ve tmě rovna 1,20, je tedy podobná jako u nemutované rostliny. Modré světlo stejně jako u cv. GT signifikantně snižuje expresi *SIPIN1*, na červeném světle ale k signifikantnímu snížení exprese nedochází. Exprese *SIPIN1* u mutantních rostlin *tri1* rostoucích na modrém světle je rovna 0,33, na červeném světle 0,81 (Obr. 21).



Obr. 21: Závislost relativní exprese genu *SIPIN1* v hypokotylech standardního genotypu cv. GT a mutanta *tri1* na různých světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné hodnoty relativní exprese vypočítané na základě C_t hodnot \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů. Jako housekeeping geny byly použity *PP2Ac*s a *GAPDH*. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi *SIPIN1* v hypokotylech rostlin cv. GT kultivovaných ve tmě. Hvězdička označuje statisticky signifikantní odlišnost dané hodnoty relativní exprese od hodnoty relativní exprese v hypokotylech daného genotypu kultivovaného ve tmě (* $p < 0,05$).

6.1.2 Exprese genu *SIPIN1* v hypokotylech cv. Kokomo a mutanta *yg-2*

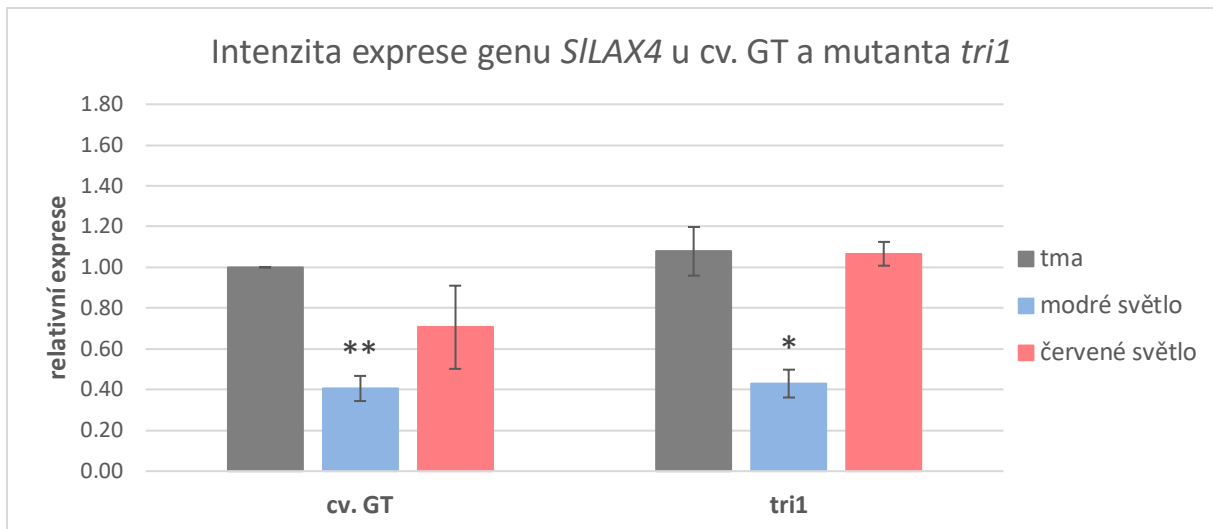
U kontrolního genotypu cv. Kokomo dochází působením modrého a červeného světla k signifikantnímu snížení exprese genu *SIPIN1* – na modrém světle je exprese rovna 0,33, na červeném světle 0,49 (Obr. 22). U mutantních rostlin *yg-2* rostoucích ve tmě je hodnota relativní exprese rovna 1,46, je tedy vyšší než u kontrolního genotypu, tento rozdíl však není statisticky významný. Na modrém a na červeném světle je u mutanta *yg-2* exprese genu *SIPIN1* signifikantně snížena, podobně jako bylo pozorováno u cv. Kokomo. Modré světlo snižuje relativní expresi tohoto genu na hodnotu 0,40, červené světlo na hodnotu 0,64 (Obr. 22).



Obr. 22: Závislost relativní exprese genu *SIPIN1* v hypokotylech standardního genotypu cv. Kokomo a mutanta *yg-2* na různých světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné hodnoty relativní exprese vypočítané na základě C_t hodnot \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů. Jako housekeeping geny byly použity *PP2Acs* a *GAPDH*. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi *SIPIN1* v hypokotylech rostlin cv. Kokomo kultivovaných ve tmě. Hvězdička označuje statisticky signifikantní odlišnost dané hodnoty relativní exprese od hodnoty relativní exprese v hypokotylech daného genotypu kultivovaného ve tmě (* $p < 0,05$).

6.1.3 Exprese genu *SILAX4* v hypokotylech cv. GT a mutanta *tri1*

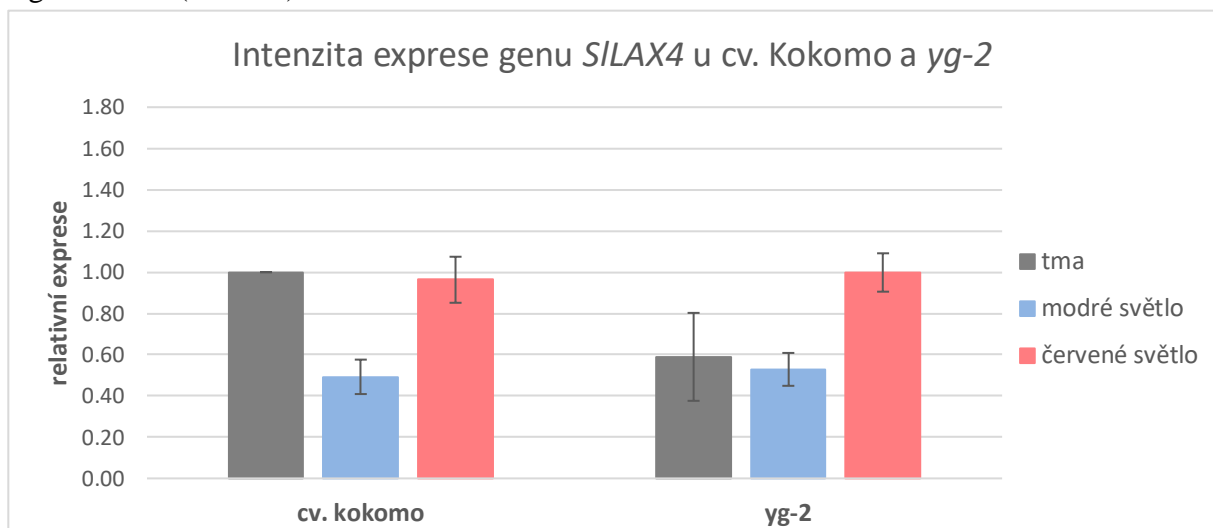
Jak můžeme vidět na Obr. 24, modré světlo signifikantně snižuje intenzitu exprese genu *SILAX4* jak u kontrolního genotypu cv. GT, tak u mutanta *tri1*. U rostlin cv. GT kultivovaných na modrém světle je hodnota relativní exprese *SILAX4* rovna 0,41, u mutantních rostlin 0,43. Červené světlo mírně snižuje relativní expresi *SILAX4* u kontrolního genotypu na hodnotu 0,71, toto snížení ale není statisticky významné. U mutanta *tri1* nemá červené světlo na expresi genu *SILAX4* téměř žádný výrazný vliv, hodnota relativní exprese je 1,07. Mezi kontrolním genotypem cv. GT a mutantem *tri1* rostoucími ve tmě se intenzita exprese genu *SILAX4* prakticky neliší (Obr. 23).



Obr. 23: Závislost relativní exprese genu *SILAX4* v hypokotylech standardního genotypu cv. GT a mutanta *tri1* na odlišných světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné hodnoty relativní exprese vypočítané na základě C_t hodnot \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů. Jako housekeeping geny byly použity *PP2Acs* a *GAPDH*. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi *SILAX4* v hypokotylech rostlin cv. GT kultivovaných ve tmě. Hvězdička označuje statisticky signifikantní odlišnost dané hodnoty relativní exprese od hodnoty relativní exprese v hypokotylech daného genotypu kultivovaného ve tmě (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

6.1.4 Exprese genu *SILAX4* v hypokotylech cv. Kokomo a mutanta *yg-2*

U rostlin kontrolního genotypu cv. Kokomo dochází vlivem modrého světla ke snížení exprese genu *SILAX4* na hodnotu 0,49, u mutanta *yg-2* modré světlo snižuje hodnotu relativní exprese na 0,53. Ani u jednoho genotypu však není snížení exprese statisticky významné. Při kultivaci rostlin cv. Kokomo na červeném světle se exprese genu *SILAX4* téměř nemění, její hodnota je rovna 0,96. Podobně u mutanta *yg-2* je hodnota relativní exprese *SILAX4* rovna 1,00. Intenzita exprese genu *SILAX4* v hypokotylech rostlin rostoucích ve tmě je u mutanta *yg-2* nižší než u cv. Kokomo – dosahuje hodnoty 0,59, toto snížení se však také neukázalo signifikantní (Obr. 24).



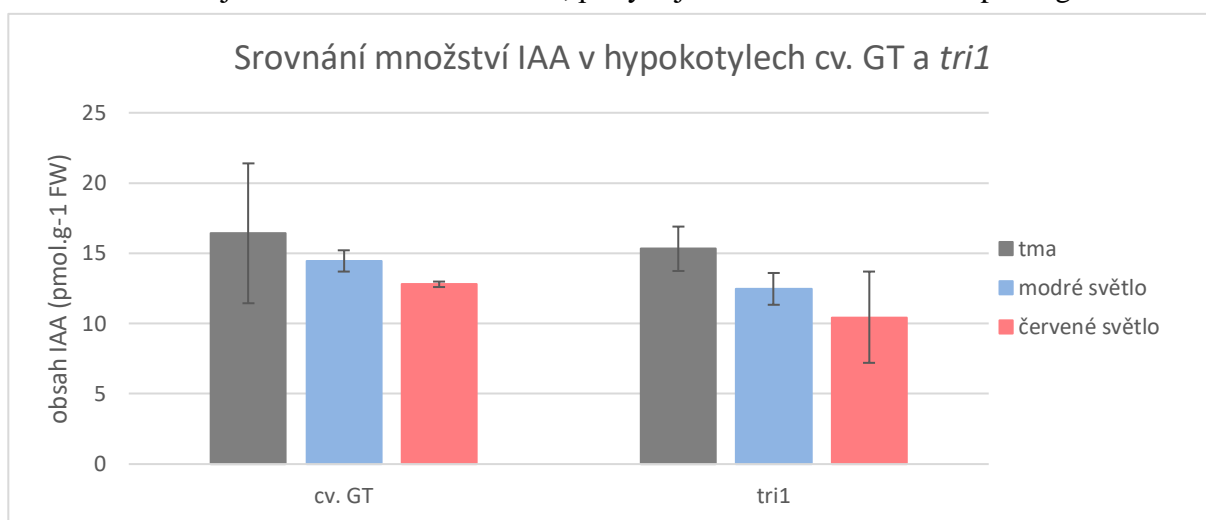
Obr. 24: Závislost relativní exprese genu *SILAX4* v hypokotylech standardního genotypu cv. Kokomo a mutanta *yg-2* na různých světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné hodnoty relativní exprese vypočítané na základě C_t hodnot \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů. Jako housekeeping geny byly použity *PP2Acs* a *GAPDH*. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi *SILAX4* v hypokotylech rostlin cv. Kokomo kultivovaných ve tmě. Hvězdička označuje statisticky signifikantní odlišnost dané hodnoty relativní exprese od hodnoty relativní exprese v hypokotylech daného genotypu kultivovaného ve tmě (* $p < 0,05$).

6.2 Kvantitativní analýza auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin

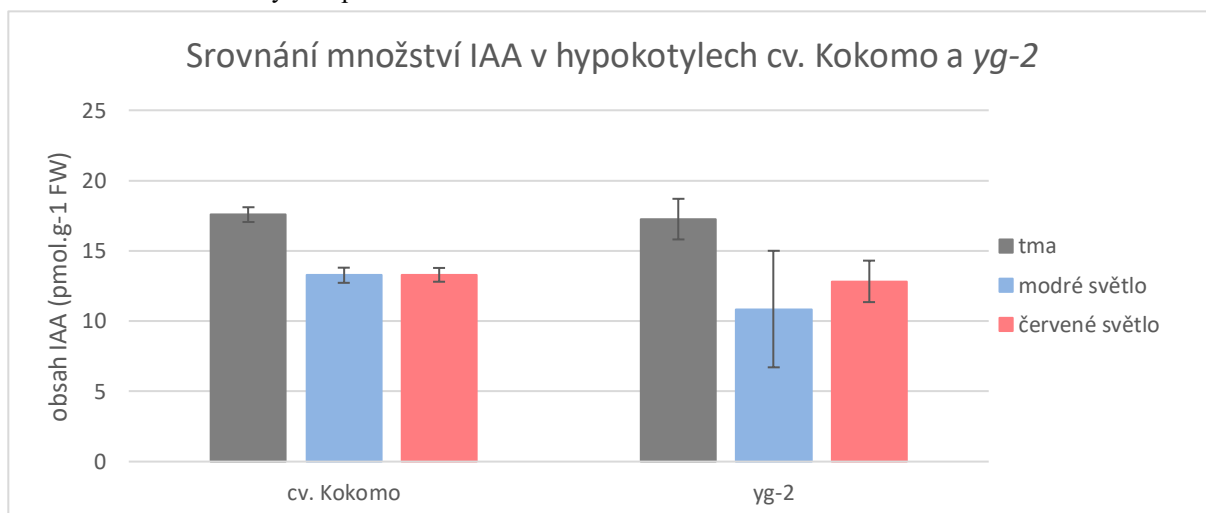
Hladina endogenních fytohormonů IAA a ABA byla analyzována v hypokotylech čtyř genotypů rajčete jedlého – kontrolních genotypů cv. GT a cv. Kokomo a od nich odvozených mutantů *tri1*, respektive *yg-2*. Rostliny byly kultivovány sedm dní *in vitro* na různých světelných podmínkách – ve tmě, na modrém a na červeném světle, poté byly jejich hypokotyly sklizeny a dále zpracovány. Množství hormonů bylo měřeno metodou tandemové hmotnostní spektrometrie spojené s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií. Celkem byly provedeny dva nezávislé experimenty.

6.2.1 Množství IAA v hypokotylech rostlin

Z výsledků měření vyplývá, že hladina endogenního auxinu IAA se působením světla výrazně nemění (Obr. 25 a Obr. 26). U rostlin všech genotypů rostoucích ve tmě se množství IAA pohybuje mezi 15 a 18 pmol/g fresh weight (FW). U rostlin rostoucích na modrém nebo červeném světle je hladina IAA mírně nižší, pohybuje se v rozmezí 10 – 15 pmol/g FW.



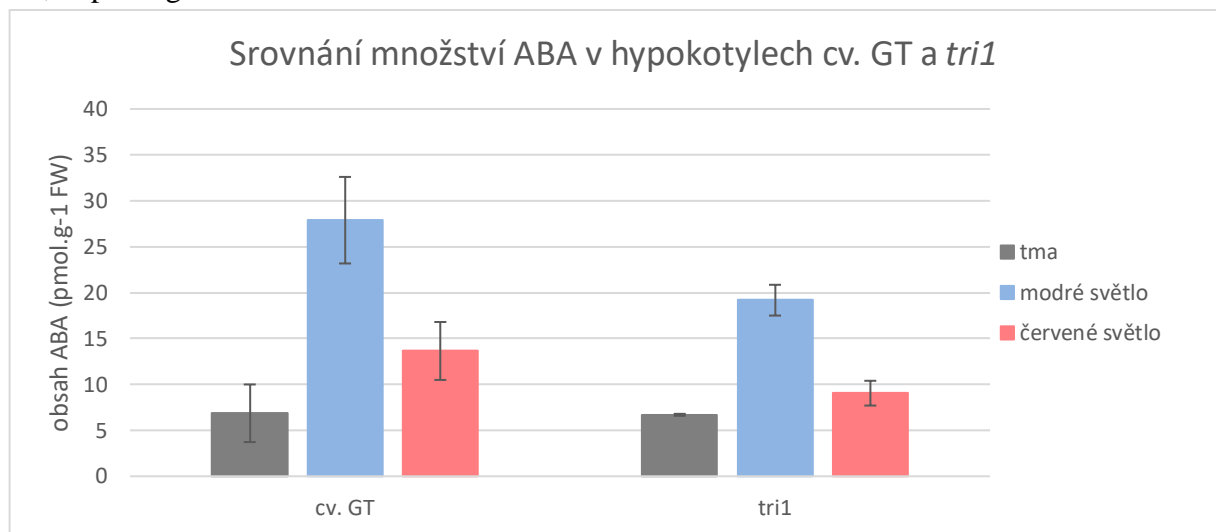
Obr. 25: Závislost hladiny endogenního fytohormonu IAA v hypokotylech standardního genotypu cv. GT a mutantu *tri1* na odlišných světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné množství IAA v pmol/g FW \pm SE získané ze dvou nezávislých experimentů.



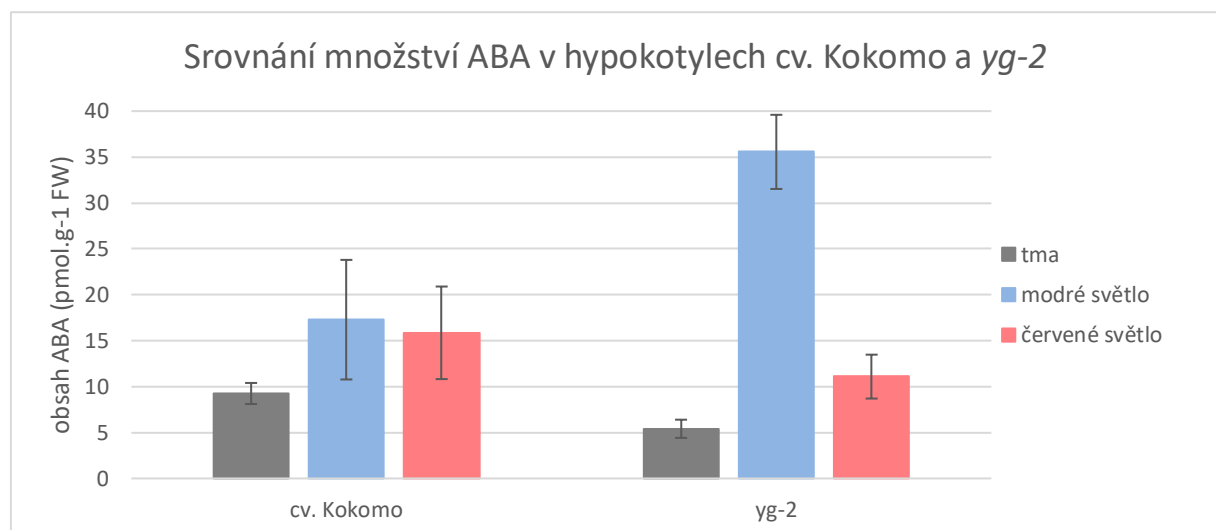
Obr. 26: Závislost hladiny endogenního fytohormonu IAA v hypokotylech standardního genotypu cv. Kokomo a mutantu *yg-2* na odlišných světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné množství IAA v pmol/g FW \pm SE získané ze dvou nezávislých experimentů.

6.2.2 Množství ABA v hypokotylech rostlin

Analýza množství ABA v hypokotylech rostlin ukázala, že u rostlin rostoucích na světle je její hladina obecně vyšší než u rostlin rostoucích ve tmě (Obr. 27 a Obr. 28). V hypokotylech všech genotypů kultivovaných ve tmě se množství ABA pohybuje mezi 5 a 10 pmol/g FW. U cv. GT modré světlo zvyšuje množství ABA na 27,89 pmol/g FW, červené světlo na 13,65 pmol/g FW. V hypokotylech mutantu *tri1* dojde působením modrého světla ke zvýšení hladiny ABA na 19,18 pmol/g FW, působením červeného světla pouze na 9,05 pmol/g FW. U cv. Kokomo je množství ABA z 9,25 pmol/g FW ve tmě zvýšeno modrým světlem na 17,29 pmol/g FW a červeným světlem na 15,86 pmol/g FW. U mutantu *yg-2* se vliv světla projevuje ještě výrazněji – v hypokotylech rostlin kultivovaných ve tmě je hladina ABA 5,41 pmol/g FW, na modrém světle 35,56 pmol/g FW a na červeném světle 11,09 pmol/g FW.



Obr. 27: Závislost hladiny endogenního fytohormonu ABA v hypokotylech standardního genotypu cv. GT a mutantu *tri1* na odlišných světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné množství ABA v pmol/g FW \pm SE získané ze dvou nezávislých experimentů.



Obr. 28: Závislost hladiny endogenního fytohormonu ABA v hypokotylech standardního genotypu cv. Kokomo a mutantu *yg-2* na odlišných světelných podmínkách. Data zahrnují průměrné množství ABA v pmol/g FW \pm SE získané ze dvou nezávislých experimentů.

7 DISKUZE

V rámci minulé práce SOČ byla provedena série experimentů se čtyřmi genotypy rajčete jedlého – cv. GT, od něj odvozený mutant *tril* s mutací ve PhyB1, cv. Kokomo a od něj odvozený mutant *yg-2* postrádající chromofor fytochromů, které byly pěstovány ve tmě, na modrém a na červeném světle na médiu s různými koncentracemi exogenních auxinů NAA a 2,4-D. Na základě výsledků těchto experimentů pak byly navrženy hypotézy popisující vliv světla na růst rostlin, mimo jiné skrze fotoreceptor PhyB1. Dle těchto hypotéz by světlo mohlo ovlivňovat polární transport fytohormonu auxinu skrze regulaci exprese přenašečů auxinu, popřípadě regulovat hladinu endogenních fytohormonů v rostlinách.

Letošní práce navazuje na předchozí výsledky a jejím cílem bylo zjistit, zda světlo může ovlivňovat expresi přenašečů auxinu na úrovni genové exprese, jakým způsobem jsou v těchto dějích zapojeny fotoreceptory červeného světla fytochromy a zda dochází působením světla nebo vlivem mutací ve fotoreceptorech ke změnám hladiny auxinu a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin.

7.1 Vliv světla na expresi genu *SIPIN1*

Vliv světla na expresi genů effluxových přenašečů byl zjišťován na jednom z genů patřících do skupiny PIN, *SIPIN1*. V rajčeti jedlé se nachází celkem deset genů patřících do této skupiny (*SIPIN1* až *SIPIN10*), jejichž exprese se v různých rostlinných pletivech liší. *SIPIN1* byl vybrán na základě vysoké exprese v hypokotylu (Pattison *et al.*, 2011).

Z výsledků analýzy exprese genu *SIPIN1* vyplývá, že modré i červené světlo obecně výrazně snižuje expresi genu *SIPIN1*. Vzhledem k tomu, že snížení exprese *SIPIN1* modrým světlem je u kontrolních genotypů cv. GT a cv. Kokomo i mutantů *tril* a *yg-2* stejné, musí být toto snížení zprostředkováno jinými fotoreceptory než fytochromy. U mutantu *tril* působením červeného světla ke snížení exprese *SIPIN1* nedochází, je tedy pravděpodobné, že se na snížení exprese *SIPIN1* červeným světlem podílí fotoreceptor PhyB1. Toto zjištění souhlasí i s dalšími studiemi, které uvádí například snížení transkriptu *PIN3* prostřednictvím PhyB u *Arabidopsis*, vliv PhyB1 na regulaci polárního transportu auxinu byl prokázán i v rajčeti jedlé (Nagashima *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2011).

Hypotéza navržená na základě předchozích fyziologických experimentů pro cv. GT a mutantu *tril* však tvrdí, že by červené a modré světlo mělo expresi přenašečů PIN stimulovat. Je možné, že každý z genů pro přenašeče PIN je světlem regulován jinak, a ačkoliv je exprese *SIPIN1* světlem inhibována, expresi jiných proteinů PIN může světlo naopak zvyšovat. Dalším možným vysvětlením je fakt, že analýza exprese těchto přenašečů byla provedena zjišťováním množství mRNA. Nedávné studie ale prokázaly, že světlo může regulovat expresi genů v buňkách rostlin i na dalších úrovních, například ovlivňováním stability mRNA a proteinů, stimulací translace nebo různými zpětnovazebnými interakcemi. Je tedy možné, že i přes malé množství mRNA genu *SIPIN1* v rostlinách rostoucích na světle je u nich výsledné množství proteinu vyšší než u etiolizovaných rostlin, ve kterých je množství *SIPIN1* mRNA vysoké (Shikata *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016; Jang *et al.*, 2019).

Výsledky experimentů naopak podporují hypotézu navrženou pro cv. Kokomo a *yg-2*, podle které modré a červené světlo expresi přenašečů PIN inhibuje. U mutantu dochází

ke snížení exprese *SIPINI* ve stejné míře, jako u kontrolního genotypu. Je možné, že na rozdíl od cv. GT se fytochromy na zprostředkování tohoto děje vůbec nepodílí a mezi těmito kultivary se vyskytují rozdíly v regulaci fotomorfogeneze. Významná rozdílnost různých kultivarů daného druhu není výjimkou jak u rajčete, tak např. u různých ekotypů *Arabidopsis thaliana* (Giuffrè *et* Capocasale, 2015; Stewart *et al.*, 2015). Jiným vysvětlením by mohlo být částečné zachování funkce mutovaného enzymu hemoxygenázy u *yg-2* nebo přítomnost jiných genů, jejichž produkty funkci hemoxygenázy nahrazují, a tím pádem také přítomnost funkčních fytochromů i v mutantním genotypu. Toto vysvětlení by mohlo být podpořeno pozorováním normálních odpovědí na dlouhovlnné červené světlo u vyvinutějších mutantních rostlin (Terry *et* Kendrick, 1996).

7.2 Vliv světla na expresi genu *SILAX4*

Je známo, že influxové přenašeče hrají důležitou roli v mnoha vývojových procesech zprostředkovaných auxinem, např. při gravitropismu, vývoji postranních kořenů a kořenového vlášení nebo formování apikálního háčku. Role těchto přenašečů při procesech fotomorfogeneze však zatím příliš studována nebyla (Swarup *et al.*, 2008; Péret *et al.*, 2012).

Ze skupiny genů pro influxové přenašeče auxinu AUX1/LAX, kterých je v rajčeti identifikováno celkem pět (*SILAX1* až *SILAX5*), byl na základě vysoké exprese v hypokotylu pro zkoumání exprese vybrán gen *SILAX4* (Pattison *et* Catalá, 2011).

Analýza exprese ukázala, že u cv. GT i u mutantu *tri1* dochází působením modrého světla k signifikantnímu snížení exprese genu *SILAX4*, zatímco červené světlo na expresi *SILAX4* výrazný vliv nemá. Podobný trend je patrný i u cv. Kokomo a mutantu *yg-2*, zde však výsledky nejsou statisticky významné. Inhibice exprese *SILAX4* je tedy zprostředkována jinými fotoreceptory, než fytochromy, pravděpodobně receptory modrého světla.

Tento výsledek však odporuje hypotézám navrženým na základě výsledků předchozích experimentů, které předpokládají světlem indukovanou stimulaci exprese přenašečů *SILAX*. Vysvětlením by mohla být odlišná regulace exprese dalších genů pro přenašeče *SILAX*, stejně jako odlišná regulace na úrovni genové a proteinové exprese podobně jako v případě genů *SIPIN*.

7.3 Vliv světla na hladinu IAA v hypokotylech rostlin

Z výsledků analýzy hladiny endogenních fytohormonů v hypokotylech rostlin vyplývá, že světlo nemá na hladinu IAA výrazný vliv. Rozdílnou citlivost genotypů cv. Kokomo a mutantu *yg-2* k exogenním auxinům NAA a 2,4-D zjištěnou v předchozích experimentech tedy nelze jednoduše vysvětlit přirozeným rozdílem v hladině endogenní IAA mezi těmito genotypy. Při analýze exprese proteinových přenašečů se však projevil mírný rozdíl – intenzita exprese *SIPINI* je u *yg-2* mírně vyšší než u cv. Kokomo, intenzita exprese *SILAX4* je u *yg-2* naopak mírně nižší než u cv. Kokomo. Tyto rozdíly by sice mohly odlišnou citlivost těchto genotypů k exogenním auxinům vyvětlit, nejsou však statisticky signifikantní.

7.4 Vliv světla na hladinu ABA v hypokotylech rostlin

Ačkoliv je ABA obecně považována za inhibitor růstu rostlin a mnoho studií uvádí její inhibiční efekt při regulaci růstu (Lorrai *et al.*, 2018), v poslední době je prosazován fakt, že efekt ABA může být stimulační či inhibiční v závislosti na jejím množství a citlivosti daného pletiva. Výsledky některých studií naznačují její stimulační efekt zvláště v etiolizovaných rostlinách (Humplík *et al.*, 2015; Humplík *et al.*, 2017).

Výsledky analýzy ABA v hypokotylech zkoumaných genotypů ukazuje zvýšení množství ABA působením modrého a červeného světla. Je tedy možné, že vyšší hladina ABA se u rostlin rostoucích na světle podílí na inhibici růstu a zprostředkování fotomorfogeneze. K největšímu zvýšení hladiny ABA dochází u všech genotypů působením modrého světla. V tomto procesu tedy budou pravděpodobně zapojeny fotoreceptory modrého světla. U mutantních rostlin *tril* kultivovaných na modrém a červeném světle je množství ABA mírně nižší než u kontrolního genotypu cv. GT, jistý vliv PhyB1 na hladinu ABA tedy nelze vyloučit. Zvýšení biosyntézy ABA zprostředkované PhyB bylo potvrzeno například v *Arabidopsis* (Gil *et al.*, 2018). Rozdíl v množství ABA mezi cv. Kokomo a mutantem *yg-2* se projevuje zvláště při kultivaci na modrém světle, menší mírou také ve tmě, mutace v hemoxygenáze tedy může mít na hladinu ABA vliv.

Výzkum interakcí mezi auxiny a ABA při regulaci růstu hypokotylu je teprve v začátcích. Je známo, že v mnoha procesech jsou auxiny podřízeny regulaci ABA, například bylo zjištěno, že exogenní ABA snižuje expresi genů *YUCCA* důležitých pro biosyntézu auxinů, čímž může hladinu auxinů přímo ovlivňovat (Lorrai *et al.*, 2018). K lepšímu pochopení vzájemných interakcí ABA a auxinů je však třeba dalšího výzkumu (Emenecker *et Strader*, 2020).

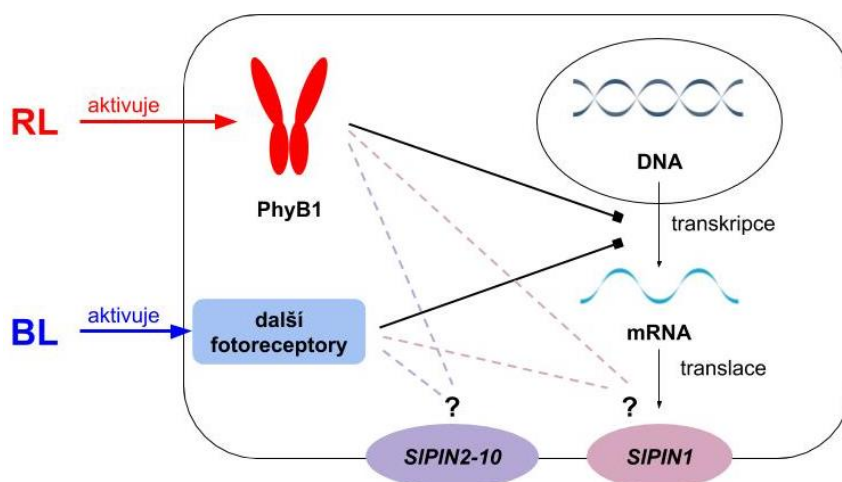
7.5 Další možnosti výzkumu

Výsledky tohoto výzkumu přináší úplně nové informace a otevírá další otázky týkající se komplexních a poměrně málo probádaných mechanismů, prostřednictvím kterých světlo ovlivňuje růst rostlin interakcemi s rostlinnými hormony. Předmětem dalšího výzkumu by mohlo být zkoumání vlivu světla na expresi ostatních genů ze skupin *SILAX* a *SIPIN* a to jak na úrovni mRNA, tak na úrovni proteinů. Zajímavou možností by mohlo být také podrobnější studium metabolismu exogenního auxinu NAA v buňkách a jeho hladiny v hypokotylech, které by mohlo objasnit skutečný mechanismus vlivu NAA na růst rostlin. Dále je možné studovat přímo polární transport auxinů v hypokotylech experimentálních rostlin a jeho ovlivnění světlem. Transport auxinů se dá studovat u celé řady rostlin pomocí radioaktivně značených auxinů (Fellner 1997; Fellner *et al.* 2000). Chybí také podrobnější informace o vzájemných interakcích rostlinných hormonů auxinů a kyseliny abscisové.

8 ZÁVĚR

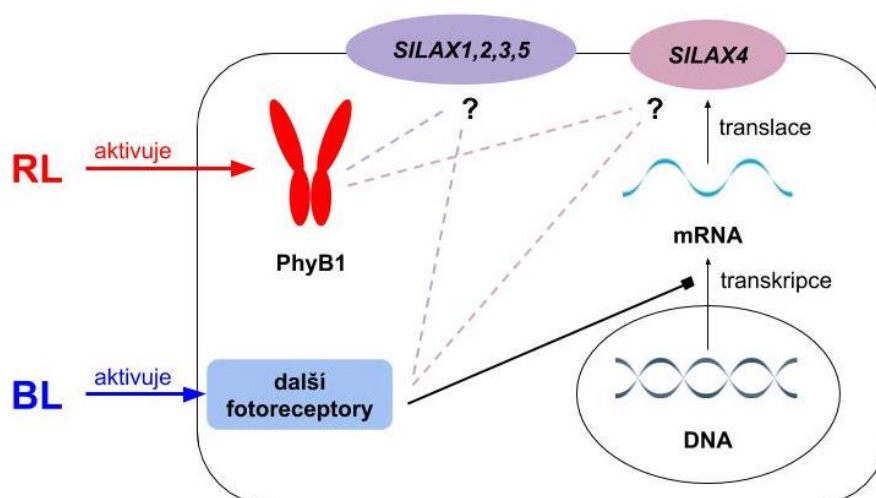
Cílem experimentů bylo na základě hypotéz navržených v rámci loňské práce SOČ zjistit další podrobnosti o vlivu světla, a zvláště fotoreceptorů fytochromů, na polární transport auxinů a hladinu endogenních fytohormonů auxinů a kyseliny abscisové v hypokotylech rostlin rajčete jedlého. Experimenty byly provedeny na kontrolních genotypech cv. GT a cv. Kokomo a od nich odvozených mutantech *tri1* a *yg-2* s poruchou ve fytochremech. Rostliny byly kultivovány *in vitro* ve tmě, na modrém a na červeném světle. Pomocí kvantitativní real-time PCR byl zkoumán vliv světla na expresi dvou vybraných genů kódujících přenašeče auxinu zapojené v polárním transportu – *SIPIN1* a *SILAX4*. Hladina endogenních auxinů v hypokotylech a její závislost na světle byla analyzována metodou tandemové hmotnostní spektrometrie spojené s vysoce účinnou kapalinovou chromatografií.

Z výsledků analýzy exprese genu *SIPIN1* vyplývá, že modré i červené světlo obecně výrazně snižuje expresi genu *SIPIN1*, na tomto ději se pravděpodobně podílí jak PhyB1, tak i další fotoreceptory (Obr. 29). Toto zjištění odporuje hypotéze navržené pro cv. GT a mutanta *tri1* v předchozích experimentech. Je možné, že každý ze skupiny proteinů PIN je světlem ovlivňován jinak, případně že regulace exprese genů na úrovni mRNA se liší od regulace na úrovni proteinů. Hypotéza navržená pro cv. Kokomo a mutanta *yg-2* byla naopak výsledky experimentů podpořena.



Obr. 29: Schéma vlivu červeného a modrého světla na regulaci exprese genů pro přenašeče auxinu *SIPIN*. Zatím neobjasněné interakce jsou znázorněny přerušovanými čarami.

Experimenty dále ukázaly, že modré světlo významně snižuje expresi genu *SILAX4*, zatímco červené světlo na expresi tohoto genu výraznější vliv nemá. Inhibice exprese *SILAX4* je tedy zprostředkována jinými fotoreceptory než fytochromy, pravděpodobně receptory modrého světla. Nesoulad s hypotézami navrženými na základě předchozích experimentů je opět možné vysvětlit rozdíly v regulaci exprese genů na úrovni mRNA a proteinů, nebo rozdílnou regulací různých přenašečů skupiny LAX (Obr. 30).



Obr. 30: Schéma vlivu červeného a modrého světla na regulaci exprese genů pro přenašeče auxinu *SILAX*. Zatím neobjasněné interakce jsou znázorněny přerušovanými čarami.

Analýza fytohormonů nepotvrdila významné rozdíly v hladině endogenního auxinu IAA ani mezi jednotlivými genotypy, ani mezi rostlinami kultivovanými v odlišných světelných podmínkách. Množství ABA v hypokotylech rostlin je naopak zvyšováno působením světla, zvláště modrého. Tento děj je tedy pravděpodobně zprostředkován fotoreceptory modrého světla, nelze však vyloučit ani zapojení fytochromů v těchto dějích.

Tento výzkum přináší nové informace o vlivu světla na regulaci růstu rostlin prostřednictvím rostlinného hormonu auxinu a otevírá další otázky související s těmito mechanismy. Možnostmi dalšího výzkumu jsou studium exprese genů dalších přenašečů auxinu ze skupin *SILAX* a *SIPIN* na úrovni mRNA a proteinů, metabolismu exogenního auxinu NAA nebo studium zatím málo objasněných vzájemných interakcí auxinů a kyseliny abscisové.

9 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

- Abbas N, Maurya JP, Senapati D, Gangappa SN, Chattopadhyay S. (2014) Arabidopsis CAM7 and HY5 physically interact and directly bind to hy5 promoter to regulate its expression to promote photomorphogenesis. *Plant Cell* 26(3), 1036-1052
- Ahmad M, Jarillo JA, Cashmore AR. (1998) Chimeric proteins between cry1 and cry2 Arabidopsis blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability. *Plant Cell* 10(2), 197-207
- Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A. (2013) ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Frontiers in Plant Science* 4, 63
- Armengot L, Marquès-Bueno MM, Jaillais Y. (2016) Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *Journal of Experimental Botany* 67(14), 4015-4037
- Barbosa ICR, Zourelidou M, Willige BC, Weller B, Schwechheimer C. (2014) D6 PROTEIN KINASE activates auxin transport-dependent growth and PIN-FORMED phosphorylation at the plasma membrane. *Developmental Cell* 29(6), 674–685
- Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez P, Ponce MR. (2005) A mutational analysis of the ABA1 gene of Arabidopsis thaliana highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany* 56(418), 2071–2083
- Behringer FJ, Davies PJ. (1992) Indole-3-acetic acid levels after phytochrome-mediated changes in the stem elongation rate of dark- and light-grown *Pisum* seedlings. *Planta* 188(1): 85-92
- Bennett T. (2015) PIN proteins and the evolution of plant development. *Trends in Plant Science* 20(8), 498-507
- Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Lee OR, Mravec J, Titapiwatanakun B, Sauer M, Makam SN, Cheng Y, Bouchard R, Adamec J, Geisler M, Nagashima A, Sakai T, Martinoia E, Friml J, Peer WA, Murphy AS. (2007) Interactions among PIN-FORMED and P-glycoprotein auxin transporters in Arabidopsis. *Plant Cell* 19(1),131-147
- Briggs WR, Christie JM. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7(5), 204-210
- Bu Q, Zhu L, Huq E. (2011) Multiple kinases promote light-induced degradation of PIF1. *Plant Signaling & Behavior* 6(8), 1119-1121
- Campbell NA, Urry L, Cain ML, Wasserman SA, Minorsky PV, Urry LA. Campbell Biology. 11th ed., Hoboken: Pearson Higher Education, 2016. ISBN 9780134093413.
- Calderón Villalobos Li, Lee S, De Oliveira C, Ivetac A, Brandt W, Armitage L, Sheard LB, Tan X, Parry G, Mao H, Zheng N, Napier R, Kepinski S, Estelle M. (2012) A combinatorial TIR1/AFB-Aux/IAA co-receptor system for differential sensing of auxin. *Nature Chemical Biology* 8(5), 477-485

- Castillon A, Shen H, Huq E. (2007) Phytochrome Interacting Factors: central players in phytochrome-mediated light signaling networks. *Trends in Plant Science* 12(11): 514-521
- Cazzonelli CI, Vanstraelen M, Simon S, Yin K, Carron-Arthur A, Nisar N, Tarle G, Cuttriss AJ, Searle IR, Benkova E, Mathesius U, Masle J, Friml J, Pogson BJ. (2013) Role of the *Arabidopsis* PIN6 auxin transporter in auxin homeostasis and auxin-mediated development. *PLoS One* 8(7), e70069
- Ciolfi A, Sessa G, Sassi M, Possenti M, Salvucci S, Carabelli M, Morelli G, Ruberti I. (2013) Dynamics of the shade-avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 163(1), 331-353
- Cloix C, Kaiserli E, Heilmann M, Baxter KJ, Brown BA, O'hara A, Smith BO, Christie JM, Jenkins GI. (2012) C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(40), 16366-16370
- Cluis CP, Mouchel CF, Hardtke CS. (2004) The *Arabidopsis* transcription factor HY5 integrates light and hormone signaling pathways. *The Plant Journal* 38(2), 332-347
- Colón-Carmona A, Chen DL, Yeh KC, Abel S. (2000) Aux/IAA proteins are phosphorylated by phytochrome in vitro. *Plant Physiology* 124(4), 1728-1738
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651-679
- Dai X, Zhang Y, Zhang D, Chen J, Gao X, Estelle M, Zhao Y. (2015) Embryonic lethality of *Arabidopsis* *abp1-1* is caused by deletion of the adjacent *BSM* gene. *Nature Plants* 1, 15183
- De Wit M, Galvao VC, Fankhauser C. (2016) Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology* 67, 513-537
- Delbarre A, Muller P, Imhoff V, Guern J. (1996) Comparison of the mechanism controlling uptake and accumulation of 2,4-dichlorophenoxy acetic acid, naphthalene-1-acetic acid and indole-3-acetic acid in suspension-cultured tobacco cells. *Planta* 198(4), 532-554
- Devlin PF, Yanovsky MJ, Kay SA. (2003) A genomic analysis of the shade avoidance response in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133(4), 1617-1629
- Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, Łangowski Ł, Kleine-Vehn J, Fan Y, Morita MT, Tasaka M, Fankhauser C, Offringa R, Friml J. (2011) Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* 13(4): 447-452
- Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M. (2005) The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435 (7041): 441-445
- Dong J, Ni W, Yu R, Deng XW, Chen H, Wei N. (2017) Light-Dependent Degradation of PIF3 by SCF^{EBF1/2} Promotes a Photomorphogenic Response in *Arabidopsis*. *Current Biology* 27(16), 2420-2430

- Eisenreich W, Bacher A, Arigoni D, Rohdich F. (2000) Biosynthesis of isoprenoids via the non mevalonate pathway. *Cellular and Molecular Life Sciences* 61(12), 1401-1426
- Emenecker RJ, Strader LC. (2020) Auxin-Abscisic Acid Interactions in Plant Growth and Development. *Biomolecules* 10(2), E281
- Enders TA, Oh S, Yang Z, Montgomery BL, Strader LC. (2015) Genome Sequencing of *Arabidopsis* *abp1-5* Reveals Second-Site Mutations That May Affect Phenotypes. *Plant Cell* 27(7), 1820-1826
- Fankhuser C, Yeh KC, Lagarias JC, Zhang H, Elich TD, Chory J (1999) PKS1, a substrate phosphorylated by phytochrome that modulates light signaling in *Arabidopsis*. *Science* 284(5419), 1539–1541
- Fellner M (1997) Search for selection screens of auxin-response mutants in *Arabidopsis thaliana*. Genetic and physiological characterization of the first isolated mutants. Ph.D. thesis, Universite de Paris-Sud XI, Orsay, France
- Fellner M, Horton LA, Cocke AE, Stephens NR, Ford ED, Van Volkenburgh E. (2003) Light interacts with auxin during leaf elongation and leaf angle development in young corn seedlings. *Planta* 216, 366-376
- Finkelstein R. (2013) Abscisic acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* 11:e0166
- Franklin KA, Quail PH. (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany* 61(1), 11-24
- Frechilla S, Zhu J, Talbott LD, Zeiger E. (1999) Stomata from *npq1*, a zeaxanthin-less *Arabidopsis* mutant, lack a specific response to blue light. *Plant & Cell Physiology* 40(9), 949-954
- Friml J, Wišnievska J, Benková E, Mendgen K, Palme K. (2002) Lateral relocation of auxin efflux regulator PIN3 mediates tropism in *Arabidopsis*. *Nature* 415(6873), 806-809
- Fuchs I, Philippar K, Ljung K, Sandberg G, Hedrich R. (2003) Blue light regulates an auxin-induced K⁺-channel gene in the maize coleoptile. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 100(20): 11795-11800
- Galvão VC, Fankhauser C. (2015) Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology* 34, 46-53
- Gangappa SN, Botto JF. (2016) The Multifaceted Roles of HY5 in Plant Growth and Development. *Molecular Plant* 9(10), 1353-1365
- Gao Y, Zhang Y, Zhang D, Dai X, Estelle M, Zhao Y. (2015) Auxin binding protein 1 (ABP1) is not required for either auxin signaling or *Arabidopsis* development. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 112(7), 2275-2280
- Gifford EM, Foster AS. *Morphology and evolution of vascular plants*. 2nd ed. New York: W. H. Freeman and Co., 1987. Series of books in biology (W. H. Freeman and Company). ISBN 07-167-1946-0.

- Gil KE, Ha JH, Park CM. (2018) Abscisic acid-mediated phytochrome B signaling promotes primary root growth in Arabidopsis. *Plant Signaling & Behavior*. 13(5), e1473684
- Giuffrè AM, Capocasale M. (2015) Policosanol in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seed Oil: The Effect of Cultivar. *Journal of Oleo Science* 64 (6), 625-631
- Goldsmith M, Goldsmith T. (1977) Chemiosmotic model for polar transport of auxin. *Plant Physiology* 59, 90
- Guo H, Yang H, Mockler TC, Lin C. (1998) Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. *Science* 279(5355), 1360-1363
- Hager A. (2003) Role of the plasma membrane H⁺-ATPase in auxin-induced elongation growth: historical and new aspects. *Journal of Plant Research* 116(6), 483-505
- Halliday KJ, Matínez-García JF, Josse EM. (2009) Integration of light and auxin signaling. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 1(6), a001586
- Hansen H, Grossmann K (2000) Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology* 124(3), 1437-1448
- Hao Y, Oh E, Choi G, Liang Z, Wang ZY. (2012) Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Molecular Plant* 5(3), 688-697
- Hauser BA, Cordonnier-Pratt MM, Daniel-Vedele F, Pratt LH. (1995) The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Molecular Biology* 29(6), 1143-1155
- Hauser F, Li Z, Waadt R, Schroeder JI. (2017) SnapShot: Abscisic Acid Signaling. *Cell* 171 (7), 1708-1708.e0
- Hoecker U, Ortiz GT, Bender J, Quail PH. (2004) 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(2), 195-200
- Hoecker U, Quail PH. (2001) The phytochrome A-specific signaling intermediate SPA1 interacts directly with COP1, a constitutive repressor of light signaling in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* 276(41), 38173-38178
- Hohm T, Demarsy E, Quan C, Allenbach Petrolati L, Preuten T, Vernoux T, Bergmann S, Fankhauser C. (2014) Plasma membrane H⁺-ATPase regulation is required for auxin gradient formation preceding phototropic growth. *Molecular Systems Biology* 10, 751
- Hornitschek P, Lorrain S, Zoete V, Michielin O, Fankhauser C. (2009) Inhibition of the shade avoidance response by formation of non-DNA binding bHLH heterodimers. *EMBO Journal* 28(24), 3893-3902
- Hornitschek P, Kohnen MV, Lorrain S, Rougemont J, Ljung K, López-Vidriero I, Franco-Zorrilla JM, Solano R, Trevisan M, Pradervand S, Xenarios I, Fankhauser C. (2012) Phytochrome interacting factors 4 and 5 control seedling growth in changing light conditions by directly controlling auxin signaling. *Plant Journal* 71(5), 699-711

- Huang X, Ouyang X, Yang P, Lau OS, Li G, Li J, Chen H, Deng XW. (2012) Arabidopsis FHY3 and HY5 positively mediate induction of COP1 transcription in response to photomorphogenic UV-B light. *Plant Cell* 24(11), 4590-4606
- Humplík JF, Bergougnoux V, Jandová M, Šimura J, Pěňčík A, Tomanec O, Rolčík J, Novák O, Fellner M (2015) Endogenous Abscisic Acid Promotes Hypocotyl Growth and Affects Endoreduplication during Dark-Induced Growth in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS One* 10(2), e0117793
- Humplík JF, Bergougnoux V, Van Volkenburgh E. (2017) To Stimulate or Inhibit? That Is the Question for the Function of Abscisic Acid. *Trends in Plant Science* 22(10), 830–841
- Chen X, Naramoto S, Robert S, Tejos R, Löffke C, Lin D, Yang Z, Friml J. (2012) ABP1 and ROP6 GTPase signaling regulate clathrin-mediated endocytosis in *Arabidopsis* roots. *Current Biology* 22(14), 1326-1332
- Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J, Titapiwatanakun B, Ennis M, Kaiserli E, Lee OR, Adamec J, Peer WA, Murphy AS. (2011) phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biology* 9(6), e1001076
- Christie JM, Murphy AS. (2013) Shoot phototropism in higher plants: new light through old concepts. *American Journal of Botany* 100(1), 35-46
- Iino M. (1982) Inhibitory action of red light on the growth of the maize mesocotyl: Evaluation of the auxin hypothesis. *Planta* 156(5), 388-395
- Ito S, Song YH, Imaizumi T. (2012) LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 5(3), 573-582
- Jackson RG, Lim EK, Li Y, Kowalczyk M, Sandberg G, Hoggett J, Ashford DA, Bowles DJ. (2001) Identification and biochemical characterization of an *Arabidopsis* indole-3-acetic acid glucosyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 276(6), 4350–4356
- Jang GJ, Yang JY, Hsieh HL, Wu SH. (2019) Processing bodies control the selective translation for optimal development of *Arabidopsis* young seedlings. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 116(13), 6451–6456
- Jensen PJ, Hangarter RP, Estelle M. (1998) Auxin transport is required for hypocotyl elongation in light-grown but not dark-grown *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 116(2), 455-462
- Jones AM, Cochran DS, Lamerson PM, Evans ML, Cohen JD. (1991) Changes in the abundance of Indoleacetic Acid and a 22-Kilodalton auxin-binding protein in the maize mesocotyl. *Plant Physiology* 97: 352-358
- Joseph JT, Poolakkalody NJ, Shah JM. (2018) Plant reference genes for development and stress response studies. *Journal of Biosciences* 43(1), 173-187
- Kendrick RE, Kronenberg GHM. Photomorphogenesis in plants. Boston: Kluwer Academic, 1994. ISBN 07-923-2550-8.

- Kepinski S, Leyser O. (2004) Auxin-induced SCFTIR1-Aux/IAA interaction involves stable modification of the SCFTIR1 complex. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 101(33), 12381-12386
- Kepinski S, Leyser O. (2005) The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* 435(7041), 446-451
- Kim JI, Sharkhuu A, Jin JB, Li P, Jeong JC, Baek D, Lee SY, Blakeslee JJ, Murphy AS, Bohnert HJ, Hasegawa PM, Yun DJ, Bressan RA. (2007) yucca6, a dominant mutation in Arabidopsis, affects auxin accumulation and auxin-related phenotypes. *Plant Physiology* 145(3), 722-735
- Kleine T, Lockhart P, Batschauer A. (2003) An Arabidopsis protein closely related to Synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal* 35(1), 93-103
- Korasick DA, Enders TA, Strader LC. (2013) Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany* 64(9), 2541-2555
- Kurepin LV, Pharis RP. (2014) Light signaling and the phytohormonal regulation of shoot growth. *Plant Science* 229, 280-289
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshihara T, Kamiya Y, Nambara E. (2004) The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *EMBO Journal* 23(7), 1647-1656
- Laxmi A, Pan J, Morsy M, Chen R. (2008) Light plays an essential role in intracellular distribution of auxin efflux carrier PIN2 in Arabidopsis thaliana. *PLoS One* 3(1), e1510
- Lee J, He K, Stolz V, Lee H, Figueroa P, Gao Y, Tongprasit W, Zhao H, Lee I, Deng XW. (2007) Analysis of transcription factor HY5 genomic binding sites revealed its hierarchical role in light regulation of development. *Plant Cell* 19(3), 731-749
- Lee HJ, Ha JH, Kim SG, Choi HK, Kim ZH, Han YJ, Kim JI, Oh Y, Fragoso V, Shin K, Hyeon T, Choi HG, Oh KH, Baldwin IT, Park CM. (2016) Stem-piped light activates phytochrome B to trigger light responses in Arabidopsis thaliana roots. *Science Signaling* 9(452), ra106
- Legris M, Klose C, Burgie ES, Rojas CC, Neme M, Hiltbrunner A, Wigge PA, Schäfer E, Vierstra RD, Casal JJ. (2016) Phytochrome B integrates light and temperature signals in Arabidopsis. *Science* 354(6314), 897-900
- Leivar P, Monte E. (2014) PIFs: systems integrators in plant development. *Plant Cell* 26(1), 56-78
- Li L, Ljung K, Breton G, Schmitz RJ, Pruneda-Paz J, Cowing-Zitron C, Cole BJ, Ivans LJ, Pedmale UV, Jung H-S, Ecker JR, Kay SA, Chory J. (2012) Linking photoreceptor excitation to changes in plant architecture. *Genes & Development* 26(8), 785-790
- Lin C, Shalitin D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology* 54, 469-496

- Lin R, Wang H. (2005) Two homologous ATP-binding cassette transporter proteins, AtMDR1 and AtPGP1, regulate Arabidopsis photomorphogenesis and root development by mediating polar auxin transport. *Plant Physiology* 138(2), 949-964
- Liu X, Cohen JD, Gardner G. (2011) Low-fluence red light increases the transport and biosynthesis of auxin. *Plant Physiology* 157(2), 891–904
- Liu Y, Beyer A, Aebersold R. (2016) On the Dependency of Cellular Protein Levels on mRNA Abundance. *Cell* 165(3), 535-550
- Ljung K, Bhalerao RP, Sandberg G. (2001) Sites and homeostatic control of auxin biosynthesis in Arabidopsis during vegetative growth. *Plant Journal* 28(4), 465-474
- Ljung K, Hull AK, Celenza J, Yamada M, Estelle M, Normanly J, Sandberg G. (2005) Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots. *Plant Cell* 17(4), 1090-1104
- Lorrai R, Boccaccini A, Ruta V, Possenti M, Costantino P, Vittorioso P. (2018) Abscisic acid inhibits hypocotyl elongation acting on gibberellins, DELLA proteins and auxin. *AoB Plants* 10(5), ply061
- Lu XD, Zhou CM, Xu PB, Luo Q, Lian HL, Yang HQ. (2015) Red-light-dependent interaction of phyB with SPA1 promotes COP1-SPA1 dissociation and photomorphogenic development in Arabidopsis. *Molecular Plant* 8(3), 467-478
- Ludwig-Müller J. (2011) Auxin conjugates: their role for plant development and in the evolution of land plants. *Journal of Experimental Botany* 62(6), 1757-1773
- Ma Q, Groner P, Robert S. (2018) Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany* 69(2), 313-328
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E. (2009) Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* 324(5930), 1064-1068
- Mashiguchi K, Tanaka K, Sakai T, Sugawara S, Kawaide H, Natsume M, Hanada A, Yaeno T, Shiasu K, Yao H, Mcsteen P, Zhao Y, Hayashi K, Kamiya Y, Kasahara H. (2011) The main auxin biosynthesis pathway in Arabidopsis. *Proceedings in the National Academy of Sciences of the United States of America* 108(45), 18512-18517
- Mathews S. (2010) Evolutionary studies illuminate the structural-functional model of plant phytochromes. *Plant Cell* 22(1), 4-16
- Mellor N, Band LR, Pěňčík A, Novák O, Rashed A, Holman T, Wilson MH, Voß U, Bishopp A, King JR, Ljung K, Bennett MJ, Owen MR. (2016) Dynamic regulation of auxin oxidase and conjugating enzymes AtDAO1 and GH3 modulates auxin homeostasis. *Proceedings in the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(39), 11022-11027
- Michalko J, Dravecká M, Bollenbach T, Friml J. (2015) Embryo-lethal phenotypes in early abp1 mutants are due to disruption of the neighboring BSM gene. *F1000Research* 4, 1104

- Murashige T, Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, 473–497
- Nagashima A, Suzuki G, Uehara Y, Saji K, Furukawa T, Koshiba T, Sekimoto M, Fujioka S, Kuroha T, Kojima M, Sakakibara H, Fujisawa N, Okada K, Sakai T. (2008) Phytochromes and cryochromes regulate the differential growth of Arabidopsis hypocotyls in both a PGP19-dependent and a PGP19-independent manner. *Plant Journal* 53(3), 516–529
- Nambara E, Marion-Poll A. (2005) Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology* 56, 165-185
- Nemhauser JL. (2008) Dawning of a new era: photomorphogenesis as an integrated molecular network. *Current Opinion in Plant Biology* 11(1), 4-8
- Ni W, Xu SL, González-Grandío E, Chalkley RJ, Huhmer AFR, Burlingame AL, Wang ZY, Quail PH. (2017) PPKs mediate direct signal transfer from phytochrome photoreceptors to transcription factor PIF3. *Nature Communications* 8, 15236
- Nishimura T, Mori Y, Furukawa T, Kadota A, Koshiba T. (2006) Red light causes a reduction in IAA levels at the apical tip by inhibiting de novo biosynthesis from tryptophan in maize coleoptiles. *Planta* 224(6), 1427-1435
- Paik I, Huq E. (2019) Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 92, 114-121
- Paponov IA, Dindas J, Król E, Friz T, Budnyk V, Teale W, Paponov M, Hedrich R, Palme K (2019) Auxin-Induced Plasma Membrane Depolarization Is Regulated by Auxin Transport and Not by AUXIN BINDING PROTEIN1. *Frontiers in Plant Science* 9, 1953
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR. (2009) Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* 324(5930), 1068-1071
- Parks BM. (2003) The Red Side of Photomorphogenesis. *Plant Physiology* 133(4), 1437-1444
- Pattison RJ, Catalá C. (2012) Evaluating auxin distribution in tomato (*Solanum lycopersicum*) through an analysis of the *PIN* and *AUX/LAX* gene families. *The Plant Journal* 70, 585–598
- Pěňčík A, Casanova-Sáez R, Pilařová V, Žukauskaitė A, Pinto R, Micol JL, Ljung K, Novák O. (2018) Ultra-rapid auxin metabolite profiling for high-throughput mutant screening in Arabidopsis. *Journal of Experimental Botany* 69(10), 2569-2579
- Péret B, Swarup K, Ferguson A, Seth M, Yang Y, Dhondt S, James N, Casimiro I, Perry P, Syed A, Yang H, Reemmer J, Venison E, Howells C, Perez-Amador MA, Yun J, Alonso J, Beemster GTS, Laplaze L, Murphy A, Bennett MJ, Nielsen E, Swarup R. (2012) AUX/LAX genes encode a family of auxin influx transporters that perform distinct functions during Arabidopsis development. *Plant Cell* 24(7), 2874-2885

- Perrot-Rechenmann C. (2010) Cellular responses to auxin: division versus expansion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(5), a001446
- Petrášek J, Mravec J, Bouchard R, Blakeslee JJ, Abas M, Seifertová D, Wisniewska J, Tadele Z, Kubeš M, Covanová M, Dhonukshe P, Skůpa P, Benková E, Perry L, Křeček P, Lee OR, Fink GR, Geisler M, Murphy AS, Luschnig C, Zažímalová E, Friml J. (2006) PIN proteins perform a rate-limiting function in cellular auxin efflux. *Science* 312(5775), 914-918
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO. (2008) Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings in the National Academy of Sciences of the United States of America* 105(52), 21023-21027
- Porco S, Pěnčík A, Rashed A, Voß U, Casanova-Sáez R, Bishopp A, Golebiowska A, Bhosale R, Swarup R, Swarup K, Peňáková P, Novák O, Staswick P, Hedden P, Phillips AL, Vissenberg K, Bennett MJ, Ljung K (2016) Dioxygenase-encoding AtDAO1 gene controls IAA oxidation and homeostasis in Arabidopsis. *Proceedings in the National Academy of Sciences of the United States of America* 113(39): 11016-11021
- Quail PH. (1994) Spotlight on Phytochrome Nomenclature. *Plant Cell* 6(4), 468-471
- Rai MK, Shekhawat NS, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, Jaiswal U. (2011) The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 106(2), 179–190.
- Raven JA. (1975) Transport of indole-3-acetic acid in plant cells in relation to pH and electrical potential gradients, and its significance for polar IAA transport. *New Phytologist* 74, 163-172
- Rawat R, Schwartz J, Jones MA, Sairanen I, Cheng Y, Andersson CR, Zhao Y, Ljung K, Harmer SL. (2009) REVEILLE1, a Myb-like transcription factor, integrates the circadian clock and auxin pathways. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 106(39), 16883-16888
- Reed JW. (2001) Roles and activities of Aux/IAA proteins in Arabidopsis. *Trends in Plant Science* 6(9), 420-425
- Ririe KM, Rassmusen RP, Wittwer CT (1996). Product differentiation by analysis of DNA melting curves during the polymerase chain reaction. *Analytical Biochemistry* 245(2), 154-160
- Rittenberg D, Foster L (1940). A new procedure for quantitative analysis by isotope dilution, with application to the determination of amino acids and fatty acids. *Journal of Biological Chemistry* 133, 727-744
- Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'hara A, Kaiserli E, Baumeister R, Schäfer E, Nagy F, Jenkins GI, Ulm R. (2011) Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein. *Science* 332(6025), 103-106

- Roig-Villanova I, Bou-Torrent J, Galstyan A, Carretero-Paulet L, Portolés S, Rodríguez-Concepción M, Martínez-García JF. (2007) Interaction of shade avoidance and auxin responses: a role for two novel atypical bHLH proteins. *EMBO Journal* 26(22), 4756-4767
- Rösler J, Klein I, Zeidler M. (2007) Arabidopsis fhl/fhy1 double mutant reveals a distinct cytoplasmic action of phytochrome A. *Proceedings of National Academy of Science of the United States of America* 104(25), 10737-10742
- Rubery PH, Sheldrake AR. (1973) Effect of pH and surface charge on cell uptake of auxin. *Nature New Biology* 244(139), 285-288
- Ryu JS, Kim JI, Kunkel T, Kim BC, Cho DS, Hong SH, Kim SH, Fernández AP, Kim Y, Alonso JM, Ecker JR, Nagy F, Lim PO, Song PS, Schäfer E, Nam HG. (2005) Phytochrome-specific type 5 phosphatase controls light signal flux by enhancing phytochrome stability and affinity for a signal transducer. *Cell* 120(3), 395-406
- Salehin M, Bagchi R, Estelle M. (2015) SCF^{TIR1/AFB}-based auxin perception: mechanism and role in plant growth and development. *Plant Cell* 27(1), 9-19
- Sancar A. (2003) Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews* 103(6), 2203-2237
- Seo HS, Yang JY, Ishikawa M, Bolle C, Ballesteros ML, Chua NH. (2003) LAF1 ubiquitination by COP1 controls photomorphogenesis and is stimulated by SPA1. *Nature* 423(6943), 995-999
- Sessa G, Carabelli M, Sassi M, Ciolfi A, Possenti M, Mittempergher F, Becker J, Morelli G, Ruberti I. (2005) A dynamic balance between gene activation and repression regulates the shade avoidance response in Arabidopsis. *Genes & Development* 19(23): 2811-2815
- Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC, Lin C. (2002) Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* 417(6890), 763-767
- Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T, Lin C. (2003) Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plant Cell* 15(10), 2421-2429
- Sheerin DJ, Menon C, Zur Oven-Krockhaus S, Enderle B, Zhu L, Johnen P, Schleifenbaum F, Stierhof YD, Huq E, Hiltbrunner A. (2015) Light-activated phytochrome A and B interact with members of the SPA family to promote photomorphogenesis in Arabidopsis by reorganizing the COP1/SPA complex. *Plant Cell* 27(1), 189-201
- Shi JH, Yang ZB. (2011) Is ABP1 an auxin receptor yet? *Molecular Plant* 4(4), 635-640
- Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, Matsushita T. (2014) Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(52), 18781-18786
- Shin J, Kim K, Kang H, Zulfugarov IS, Bae G, Lee CH, Lee D, Choi G. (2009) Phytochromes promote seedling light responses by inhibiting four negatively-acting

- phytochromeinteracting factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 106(18), 7660–7665
- Sibout R, Sukumar P, Hettiarachchi C, Holm M, Muday GK, Hardtke CS. (2006) Opposite root growth phenotypes of *hy5* versus *hy5 hyh* mutants correlate with increased constitutive auxin signaling. *PLoS Genetics* 2(11), e202
- Sidler M, Hassa P, Hasan S, Ringli C, Dudler R. (1998) Involvement of an ABC transporter in a developmental pathway regulating hypocotyl cell elongation in the light. *Plant Cell* 10(10), 1623-1636
- Simon S, Kubeš M, Baster P, Robert S, Dobrev PI, Friml J, Petrášek J, Zažímalová E. (2013) Defining the selectivity of processes along the auxin response chain: a study using auxin analogues. *New Phytologist* 200(4), 1034-1048
- Simon S, Petrášek J. (2011) Why plants need more than one type of auxin. *Plant Science* 180(3), 454-460
- Song YH, Estrada DA, Johnson RS, Kim SK, Lee SY, Maccoss MJ, Imaizumi T. (2014) Distinct roles of FKF1, Gigantea, and Zeitlupe proteins in the regulation of CONSTANS stability in Arabidopsis photoperiodic flowering. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(49), 17672-17677
- Sorin C, Salla-Martret M, Bou-Torrent J, Roig-Villanova I, Martínez-García JF. (2009) ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in Arabidopsis seedlings. *Plant Journal* 59(2), 266-277
- Spartz AK, Lor VS, Ren H, Olszewski NE, Miller ND, Wu G, Spalding EP, Gray WM. (2017) Constitutive expression of Arabidopsis SMALL AUXIN UP RNA19 (SAUR19) in tomato confers auxin-independent hypocotyl elongation. *Plant Physiology* 173(2), 1453–1462
- Stacey MG, Hicks SN, Von Arnim AG. (2003) Discrete domains mediate the light-responsive nuclear and cytoplasmic localization of Arabidopsis COP1. *Plant Cell* 11(3), 349-64
- Staswick PE, Serban B, Rowe M, Tiryaki I, Maldonado MT, Maldonado MC, Suza W. (2005) Characterization of an Arabidopsis enzyme family that conjugates amino acids to indole-3-acetic acid. *Plant Cell* 17(2), 616-627
- Steindler C, Matteucci A, Sessa G, Weimar T, Ohgishi M, Aoyama T, Morelli G, Ruberti I. (1999) Shade avoidance responses are mediated by the ATHB-2 HD-zip protein, a negative regulator of gene expression. *Development* 126(19), 4235-4245
- Stewart JJ, Adams WW, Cohu CM, Polutchko SK, Lombardi EM, Demmig-Adams B. (2015) Differences in light-harvesting, acclimation to growth-light environment, and leaf structural development between Swedish and Italian ecotypes of Arabidopsis thaliana. *Planta* 242(6), 1277-1290.
- Stortenbeker N, Bemer M. (2019) The SAUR gene family: the plant's toolbox for adaptation of growth and development. *Journal of Experimental Botany* 70(1), 17-27

- Swarup K, Benková E, Swarup R, Casimiro I, Péret B, Yang Y, Parry G, Nielsen E, De Smet I, Vanneste S, Levesque MP, Carrier D, James N, Calvo V, Ljung K, Kramer E, Roberts R, Graham N, Marillonnet S, Patel K, Jones JD, Taylor CG, Schachtman DP, May S, Sandberg G, Benfey P, Friml J, Kerr I, Beeckman T, Laplaze L, Bennett MJ. (2008) The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence. *Cell Biology* 10(8), 946–954
- Taiz L, Zeiger E. *Plant physiology*. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010. ISBN 08-789-3866-4.
- Tan X, Calderon-Villalobos LI, Sharon M, Zheng C, Robinson CV, Estelle M, Zheng N. (2007) Mechanism of auxin perception by the TIR1 ubiquitin ligase. *Nature* 446(7136), 640-645
- Tao LZ, Cheung AY, Wu HM. (2002) Plant Rac-like GTPases are activated by auxin and mediate auxin-responsive gene expression. *Plant Cell* 14(11), 2745-2760
- Tao Y, Ferrer JL, Ljung K, Pojer F, Hong F, Long JA, Li L, Moreno JE, Bqwoman ME, Ivans LJ, Cheng Y, Lim J, Zhao Y, Ballaré CL, Sandberg G, Noel JP, Chory J. (2008) Rapid synthesis of auxin via a new tryptophan-dependent pathway is required for shade avoidance in plants. *Cell* 133(1), 164-176
- Terry MJ, Kendrick RE. (1996) The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *Journal of Biological Chemistry* 271(35), 21681-21686
- Tian Q, Nagpal P, Reed JW. (2003) Regulation of Arabidopsis SHY2/IAA3 protein turnover. *Plant Journal* 36(5), 643-651
- Tian Q, Reed JW. (2001) Molecular links between light and auxin signaling pathways. *Journal of Plant Growth Regulation* 20(3), 274-280
- Titapiwatanakun B, Blakeslee JJ, Bandyopadhyay A, Yang H, Mravec J, Sauer M, Cheng Y, Adamec J, Nagashima A, Geisler M, Sakai T, Friml J, Peer WA, Murphy AS. (2009) ABCB19/PGP19 stabilises PIN1 in membrane microdomains in Arabidopsis. *Plant Journal* 57(1), 27-44
- Tivendale ND, Ross JJ, Cohen JD. (2014) The shifting paradigms of auxin biosynthesis. *Trends in Plant Science* 19(1), 44-51
- Van Tuinen A, Kerckhoffs LHJ, Nagatani A, Kendrick RE, Koornneef M. (1995) A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. *Plant Physiology* 108(3), 939-947
- Vishwakarma K, Upadhyay N, Kumar N, Yadav G, Singh J, Mishra RK, Kumar V, Verma R, Upadhyay RG, Pandey M, Sharma S. (2017) Abscisic acid signaling and abiotic stress tolerance in plants: a review on current knowledge and future prospects. *Frontiers in Plant Science* 8, 161
- Von Arnim AG, Osterlund MT, Kwok SF, Deng XW. (1997) Genetic and developmental control of nuclear accumulation of COP1, a repressor of photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 114(3), 779-788

- Wu D, Hu Q, Yan Z, Chen W, Yan C, Huang X, Zhang J, Yang P, Deng H, Wang J, Deng XW, Shi Y. (2000) Structural basis of ultraviolet-B perception by UVR8. *Nature* 484(7393), 214–219
- Wang X, Wang Q, Han YJ, Liu Q, Gu L, Yang Z, Su J, Liu B, Zuo Z, He W, Wang J, Liu B, Matsui M, Kim JI, Oka Y, Lin C. (2017) A CRY-BIC negative-feedback circuitry regulating blue light sensitivity of Arabidopsis. *Plant Journal* 92(3), 426-436
- Wang R, Estelle M. (2014) Diversity and specificity: auxin perception and signaling through the TIR1/AFB pathway. *Current Opinion in Plant Biology* 21, 51-58
- Waters DL, Shapter FM. (2013) The polymerase chain reaction (PCR): general methods. *Methods in Molecular Biology* 1099, 65-75
- Went FW. (1926) On growth accelerating substances in the coleoptile of *Avena sativa*. *Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen* 30, 1019
- Wilhelm J, Pingoud A. (2003) Real-Time Polymerase Chain Reaction. *Chembiochem* 4(11), 1120-1128
- Wisniewska J, Xu J, Seifertová D, Brewer PB, Růžička K, Blilou I, Rouquié D, Benková E, Scheres B, Friml J. (2006) Polar PIN localization directs auxin flow in plants. *Science* 312(5775), 883
- Wu Y, Fang M, Yue M, Chai Y, Wang H, Li Y. (2012) Advances in influence of UV-B radiation on medicinal plant secondary metabolism. *China Journal of Chinese Materia Medica* 37(15), 2247-2251
- Yamakawa T, Kurahashi O, Ishida K, Kato S, Kodama T, Minoda Y. (1979) Stability of indole-3-acetic acid to autoclaving, aeration and light illumination. *Agricultural and Biological Chemistry* 43, 879–880
- Yang Y, Hammes UZ, Taylor CG, Schachtman DP, Nielsen E. (2006) High-affinity auxin transport by the AUX1 influx carrier protein. *Current Biology* 16(11), 1123-1127
- Yi C, Deng XW. (2005) COP1 - from plant photomorphogenesis to mammalian tumorigenesis. *Trends in Cell Biology* 15(11), 618-625
- Yost RA, Enke CG (1979). Tandem Quadrupole Mass Spectrometry. *Analytical Chemistry* 51, 1251-1264
- Zažimalová E, Murphy AS, Yang H, Hoyerová K, Hošek P. (2018) Auxin transporters-why so many? *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 2(3), a001552
- Zhao Y. (2014) Auxin biosynthesis. *Arabidopsis Book* 12, e0173
- Zhou P, Song M, Yang Q, Su L, Hou P, Guo L, Zheng X, Xi Y, Meng F, Xiao Y, Yang L, Yang J. (2013) Both PHYTOCHROME RAPIDLY REGULATED1 (PAR1) and PAR2 promote seedling photomorphogenesis in multiple light signaling pathways. *Plant Physiology* 164(2), 841-852
- Zoltowski BD, Imaizumi T. (2014) Structure and function of the ZTL/FKF1/LKP2 group proteins in Arabidopsis. *Enzymes* 35, 213-239

10 ZDROJE OBRÁZKŮ

Obr. 1: NOBEL, Park S. *Physicochemical and Environmental Plant Physiology*. 4th edition. San Diego: Academic Press, 2009

Obr. 2: TAIZ L, ZEIGER E. *Plant physiology*. 5th ed. Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010. ISBN 08-789-3866-4.

Obr. 3: List NH, Pimenta FM, Holmegaard L, Jensen RL, Etzerodt M, Schwabe T, Kongsted J, Ogilby PR, Christiansen O. (2004) Effect of chromophore encapsulation on linear and nonlinear optical properties: the case of “miniSOG”, a protein-encased flavin. *Physical Chemistry Chemical Physics* 16, 9950

Obr. 4: Briggs WR, Christie JM. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 7, 204-210

Obr. 5: Paik I, Huq E. (2019) Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 92, 114-121

Obr. 6: vytvořeno v programu ChemSketch podle Ma Q, Grones P, Robert S. (2017) Auxin signaling: a big question to be addressed by small molecules. *Journal of Experimental Botany* 69, 313-328

Obr. 7: vytvořeno v programu Nákresy Google podle MORRIS DA. (2000) Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *Planta* 32, 161-172

Obr. 8: Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR. (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology* 61, 651-679

Obr. 9 – 12: vytvořeno v programu Nákresy Google podle Morris DA. (2000) Transmembrane auxin carrier systems – dynamic regulators of polar auxin transport. *Planta* 32: 161-172 na základě výsledků loňských experimentů

Obr. 13 – 15: vlastní fotografie

Obr. 16 – 18: Autor neuveden. *labguide.cz* [online]. Dostupný na WWW: <https://labguide.cz/metody/pcr/> (13. 3. 2020)

Obr. 19 – 20: vytvořeno v programu Microsoft Word for Office 365 na základě pracovního postupu při provádění experimentů

Obr. 21 – 28: vytvořeno v programu Microsoft Excel for Office 365 na základě výsledků experimentů

Obr. 29 – 30: vytvořeno v programu Nákresy Google na základě výsledků experimentů