

UNIVERZITA PALACKÉHO OLMOUC
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



2011

Jiří Skořepa

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Úloha fytochromů v reakcích rajčete k abiotickým stresům

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Jiří Skořepa

doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

2011

Všestary

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval svému vedoucímu, doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za čas, který mi věnoval a trpělivost, kterou se mnou měl při zpracování zadané problematiky. Práce byla vypracována na katedře Molekulární a buněčné biologie Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D., a že jsem použil pouze literární zdroje uvedené v kapitole 7. Zdroje.

Ve Vřestarech dne 28. 7. 2011

Podpis

SOUHRN

Předkládaná bakalářská práce je zaměřena na studium inhibičního vlivu abiotických stresorů (NaCl a mannitol) na klíčivost semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). NaCl nebo mannitol vyvolává osmotický stres, který inhibuje klíčení. Cílem této práce bylo zjistit, které fytochromy se zapojují do zvýšení citlivost k abiotickému stresu v závislosti na kvalitě světla. K těmto pokusům byl použit mutantní genotyp rajčete *fri* s deficientním fytochromem A, mutantní genotyp *tri1* s deficientním fytochromem B1 a mutantní genotyp *hpl* se zvýšenou fytochromovou odpovědí.

Z výsledků pozorovaných na médiích s NaCl vyšlo najevo, že PhyA zvyšuje citlivost k abiotickému stresu na modrém světle, PhyB1 snižuje citlivost k abiotickému stresu ve tmě a částečně na červeném světle. Gen *HPI* se zapojuje do zvýšení citlivosti ve tmě. Produkty zkoumaných genů se do ovlivňování citlivosti k mannitolu nezapojují.

SUMMARY

The present thesis is focused on the study of the inhibitory influence of abiotic stressors (NaCl and mannitol) on the germination of seeds of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). NaCl or mannitol causes osmotic stress, which inhibits germination. The aim of this study was to determine which phytochrome engage in increased sensitivity to abiotic stress, depending on the quality of light. These experiments used a mutant tomato genotype *fri* with deficient phytochrome A, mutant genotype *tri1* with deficient phytochrome B1 and *HP1* mutant genotype with increased phytochrome answer.

The results observed on media with NaCl revealed that PhyA increases sensitivity to abiotic stress in the blue light, PhyB1 reduces sensitivity to abiotic stress in the dark and partly on a red light. *HP1* gene is involved in increasing the sensitivity in the dark. Products examined genes in influencing susceptibility to mannitol are not engaged.

OBSAH

1.	ÚVOD	8
2.	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1.	Klíčení.....	9
2.2.	Světlo	11
2.2.1.	Červené světlo	12
2.2.2.	Modré světlo.....	13
2.3.	Světelné receptory	13
2.3.1.	Fytochromy.....	13
2.3.2.	Kryptochromy	14
2.3.3.	Fototropiny	15
2.4.	Stres.....	16
2.4.1.	Vodní deficit.....	18
2.4.2.	Zasolení	18
2.5.	Osmoprotektanty	19
2.5.1.	Sacharidy.....	19
2.5.1.1.	Trehalosa	20
2.5.1.2.	Mannitol	21
3.	MATERIÁL A METODIKA	24
3.1.	Rostlinný materiál.....	24
3.2.	MS médium	25
3.3.	Sterilizace semen.....	25
3.4.	Kultivace semen	25
3.5.	Sčítání semen	26
4.	VÝSLEDKY	26
4.1.	Klíčení semen v přítomnosti NaCl.....	27
4.2.	Klíčení semen v přítomnosti mannitolu	31
5.	DISKUZE	37
6.	ZÁVĚR	39
7.	ZDROJE	40
8.	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	45

1. ÚVOD

Jedním z nejdůležitějších faktorů v růstu rostlin je světlo. Různé vlnové délky viditelného spektra a část UV spektra mají na rostlinu různý vliv (indukce a inhibice klíčení, fotomorfogeneze, indukce a inhibice kvetení, aktivace a inhibice metabolismu atp.). Světlo je také hlavním zdrojem energie pro fotosyntézu, ovlivňuje růst rostlin (fototropismus), diferenciaci rostlinných orgánů (fotomorfogeneze). Světlo, fungující jako signál při fotomorfogenezi, je detekováno několika typy fotoreceptorů. Hlavní druhy fotoreceptorů jsou fytochromy pro červené světlo, kryptochromy a fototropiny pro modré světlo a UV-A. Tyto receptory mají značný vliv i klíčení semen (Schäfer et Nagy, 2006; Reed et al., 1994). Klíčení a růst rostlin je silně ovlivňován stresovými faktory. Z abiotických faktorů jsou důležité zasolení a osmotický stres. Dříve bylo zjištěno, že modré světlo je schopno zesilovat citlivost klíčení semen k těmto dvěma stresorům (Fellner et Sawhney, 2001, 2002).

Cílem této bakalářské práce bylo studovat inhibiční vliv abiotických stresorů (NaCl a mannitol) na klíčivost semen rajčete (*Solanum lycopersicum L.*) a dále zjistit, které fotoreceptory zprostředkují zesilující účinek světla na citlivost klíčení semen k zasolení a osmotickému stresu. Ke splnění tohoto cíle jsme použili genetického přístupu, který spočíval ve fyziologické analýze klíčení semen mutantů s defekty ve fotoreceptorech phyA a phyB.

Moje bakalářská práce byla řešena v Laboratoři molekulární fyziologie na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v rámci Výzkumného záměru, financovaného MŠMT (grant č. MSM6198959215) a projektu Kontakt financovaného, MŠMT (grant č. ME10020).

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1. Klíčení

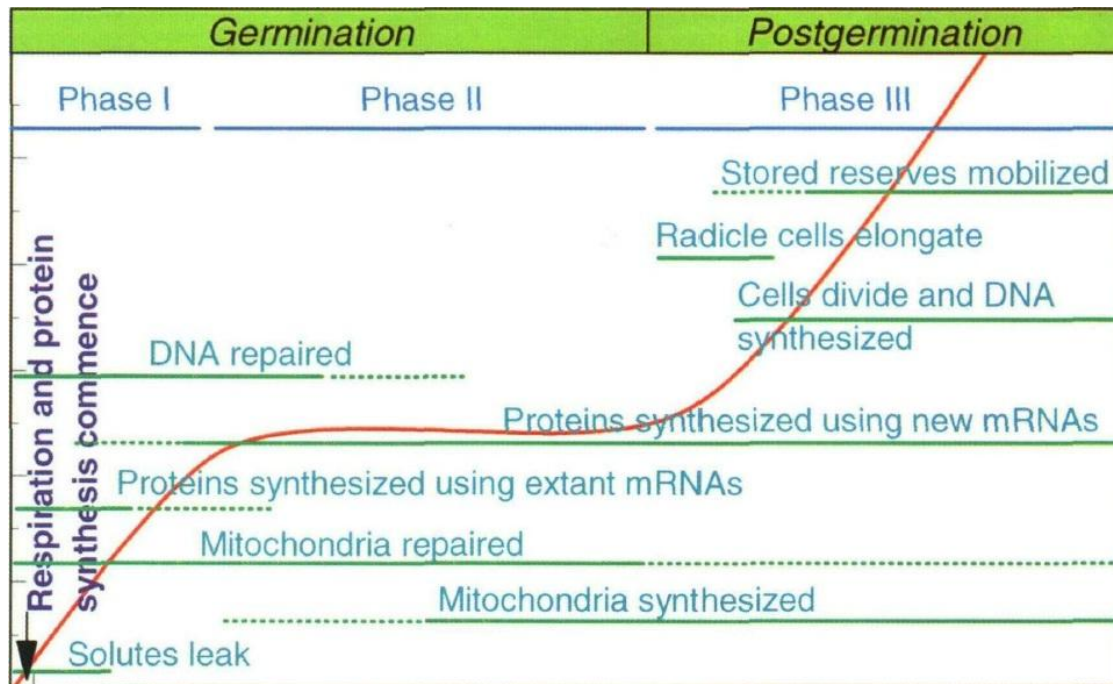
Klíčení je proces, kterým se embryo mění, za součinnosti dalších částí semene, v klíčící rostlinu (Luštinec et Žárský, 2005). Klíčení je zahájeno příjmem vody semenem a končí proražením osemení radikulou.

Semeno přijímající vodu bobtná. Z tohoto důvodu často praskne osemení (testa). Příjem vody semenem lze rozdělit do tří fází. V první fázi semeno rychle přijímá vodu, druhá fáze je plató a ve třetí fázi semeno opět absorbuje vodu a embryo roste (Kucera et al., 2005); (Obr. 1). Z důvodu rychlé absorpce v první fázi dochází k mnoha poruchám v membránách semena. Kvůli tomu vytékají nízkomolekulární látky a metabolity ven z buněk. Při rehydrataci se ale membrány opět stabilizují. Není jasné, jakým mechanismem se membrány opravují, ale předpokládá se, že je v tomto procesu zapojen fosfolipid N-acetylfosfaridylethanolamin stabilizující membrány (Bewley, 1997). Během imbibice se metabolismus semene obnoví pomocí enzymů, které jsou nejspíš přítomny už v suchém semeni. Nejdříve se obnovuje respirace a glykolýza, pentařádkový cyklus i Krebsův cyklus (Bewley, 1997). V první části klíčení (asi do 24 – 36 hodin) probíhá metabolismus anaerobně. Z tohoto důvodu je vysoká aktivita alkoholdehydrogenázy (Procházka et al., 1998).

V následující, růstové, fázi klíčení probíhá dlouhivý růst klíčící rostliny. Prudce se zrychluje metabolismus a štěpí se zásobní látky z endospermu nebo děloh, které slouží jako energie před nastartováním fotosyntézy. Endosperm je složen především ze škrobů. Dále obsahuje oleje a proteiny. Zásobní látky štěpí enzymy, zvané hydrolázy. Jejich syntéza je indukována gibereliny. U dvouděložných rostlin se klíčení rozlišuje na epigeické (nadzemní) a hypogeické (podzemní). Při epigeickém ze země nejdříve vyrůstají dělohy, které fungují určitou dobu jako asimilační orgány. Až později začne růst epikotyl se vzrostným vrcholem a listy. Při hypogeickém klíčení zůstávají dělohy pod zemí, kde jsou zdrojem živin. Hypokotyl je krátký a epikotyl se vyvíjí jako lodyžka. U trav se ze země vynořuje koleoptile kryjící plumulu (Luštinec et Žárský, 2005).

Obr. 1: Rozvržení fází klíčení. Křivka zobrazuje absorpci vody semenem.

Převzato z Bewley, 1997.



V okamžiku, kdy radikula prorazí osemení (testu), se semeno považuje za vyklíčené. Dochází k tomu v otvoru klovém (mikropyle). Semeno začíná konečně interagovat s vnějším prostředím. Radikula pokračuje v dlouživém růstu. Tento proces je řízený turgorem. Z tohoto důvodu musí být buňky kořínku pružné, aby při zvyšování vnitřního tlaku nepraskaly a nedocházelo k plasmoptýze. Existuje několik názorů, na to jak dochází k prodlužování radikuly. První možnost růstu je z důvodu akumulace rozpuštěných látek, které vznikají při hydrolýze zásobního pletiva. Vzniká tak záporný osmotický potenciál a buňky radikuly absorbují vodu. Bohužel neexistuje důkaz o změně osmotického tlaku v radikule.

Druhá možnost růstu radikuly je schopnost roztažení buněčné stěny. Není jisté, jakým mechanismem se buněčné stěny můžou prodlužovat. Buněčná stěna se může rozvolňovat, až vznikne mezera, která se zpětně zaplní xyloglukanem a proplete celulósovými mikrofibrily. Děje se tomu pomocí enzymu xyloglukanendotransglykázy (XET). Jeho koncentrace se u kukuřice zvyšuje při prodlužování, ale až po dokončení klíčení. Další mechanismus k rozvolňování buněčné stěny je pomocí expansinů. Expansiny rozpojují vodíkové vazby v polymerech. Tento mechanismus se potvrdil v hypokotylech okurky, ale ne v klíčících semenech. Aktivita XET a expansinů se zvyšuje auxiny, které ale nejsou

účinné při klíčení. Aktivita XET v kukuřici se zvyšuje pomocí ABA, která je ale inhibitor klíčení. Třetí možností může být ochabování pletiva osemení. Buňky radikuly tlačí na osemení, dokud osemení nepraskne.(Bewley, 1997).

Klíčící semeno je významně ovlivňováno některými hormony. Jsou to například gibereliny, brassinosteroidy, etylén a kyselina abscisová. Gibereliny inaktivují dormanci semen, podporují klíčení a růst embrya. Dalšími hormony podporující růst jsou brassinosteroidy a etylén. Tyto hormony mají vliv až po přerušení dormance gibereliny. Mají opačný účinek než kyselina abscisová (ABA), která indukuje dormanci a inhibuje dlouhý růst (Kucera et al., 2005).

2.2. Světlo

Jeden z hlavních faktorů ovlivňujících klíčení a růst rostliny je světelné záření. Rostliny jsou schopny využít spektrum okolo 380 až 740 nm (Pavlová, 2005). Rostliny, klíčící ve tmě (D), jsou etiolizované neobsahují chlorofyl, mají prodloužené hypokotyle a složené dělohy. Tento vývoj se nazývá skotomorfogeneze. Probíhá u nich rychlý dlouhý růst, dokud se nedostanou na světlo (Taiz et Zeiger, 2006).

V okamžiku, kdy se rostlina dostane na světlo, přechází vývoj do fotomorfogeneze. Nastává zpomalení růstu hypokotylu, zvětšují se dělohy a syntetizuje se chlorofyl. Aby k tomu došlo, musí mít rostlina už správně vyvinuté všechny fotoreceptory. Přejít od skotomorfogeneze k fotomorfogenezi nejspíše probíhá mechanismem řízené proteolýzy. Po obdržení světelného signálu fotoreceptorem se v jádře inhibují transkripční faktory genů pro skotomorfogenezi a začnou se exprimovat geny fotomorfogeneze (Schäfer et Nagy, 2006).

K výrobě energie rostliny využívají světlo o vlnové délce 700 nm ve fotosystému I a 680 nm ve fotosystému II. Dále se různé vlnové délky využívají k regulaci směru růstu rostliny (fototropismus), k vývoji a diferenciaci pletiv (fotomorfogeneze) nebo třeba k indukci rašení pupenu nebo kvetení (fotoperiodismus); (Schäfer et Nagy, 2006; Luštinec et Žárský, 2005).

Semena, u nichž je klíčení ovlivňováno světlem, se nazývají fotoblastická. Mohou být ovlivňovány kladně (světlo indukuje klíčení). Mezi kladně fotoblastické rostliny patří

například salát (*Lactuca sp.*) nebo tabák (*Nicotiana sp.*). Semena obsahují málo zásobních látek, proto u nich rychleji dochází k fotosyntéze. Záporně fotoblastické rostliny (světlo inhibuje klíčení) jsou například laskavec (*Amaranthus*) nebo tykev (*Cucurbita*), které mají v semenech velké množství zásobních látek (Pavlová, 2005).

2.2.1. Červené světlo

Pro rostliny je důležité červené světlo o vlnové délce 650 až 680 nm (red, R) a dlouhovlnné červené světlo o vlnové délce 710 až 740 nm (far-red, FR). Obě tato světla významně ovlivňují klíčení. R a FR působí proti sobě antagonisticky. Tento jev byl poprvé pozorován při klíčení semen salátu. Při střídavém ozařování se zjistilo, že klíčení je ovlivněno podle světla, které se použilo jako poslední. R indukovalo klíčení semen salátu, zato FR klíčení inhibovalo (Taiz et Zeiger, 2006). Oproti tomu FR způsobuje dlouhivý růst u rostlin. Brání se tak zastínění. Salát (cv. Grand Rapids) byl ozářen R, po 1 hodině ve tmě (D) bylo aplikováno FR, které úplně zvrátilo účinek R. Hladina Pfr (viz kapitola 2.3.1. Fytochromy) musela být po celou dobu udržována na vysoké úrovni. Po 8 hodinách nemělo FR již žádný inhibiční vliv, což svědčí, že procesy vedoucí ke klíčení se staly nevratnými. Mezi 1. až 8. hodinou procento klíčících semen vzrůstalo navzdory aplikaci FR (Luštinec et Žárský, 2005).

Tab. 1: Klíčení po ozáření R a FR. Semena byla nějakou dobu ponechána ve vodě v D a poté ozařována 5 minut jedním nebo druhým světlem. (Upraveno podle Luštinec et Žárský, 2005)

světelný režim	% vyklíčených semen
R	70
R / FR	6
R / FR / R	74
R / FR / R / FR	6
R / FR / R / FR / R	76
R / FR / R / FR / R / FR	7
R / FR / R / FR / R / FR / R	81
R / FR / R / FR / R / FR / R / FR	7

Tab. 2: Klíčení semen salátu (cv. Grand Rapids) po 5 minutovém ozáření R a následně 5 minut FR, které bylo od ozáření odděleno různě dlouhými intervaly D. (Upraveno podle Luštinec et Žárský, 2005)

Způsob ozáření	% vyklíčených semen
R	100
R / tma 0 hod. / FR	15
R / tma 1 hod. / FR	15
R / tma 2 hod. / FR	20
R / tma 4 hod. / FR	40
R / tma 6 hod. / FR	60
R / tma 8 hod. / FR	80

2.2.2. Modré světlo

Rostliny nejvíce ovlivňuje modré světlo (BL) o vlnové délce v rozmezí 380 až 450 nm. V rostlinách inhibuje klíčení a zvyšuje vliv inhibice klíčení při osmotickém, má vliv na otevírání průduchů, fototropismus a fotonastii, dlouhivý růstu, reakci na zastínění a deetiologizaci (Luštinec et Žárský, 2005; Taiz et Zeiger, 2006). Modré světlo indukuje pohyb chloroplastů při zvýšené intenzitě světla, aby nedošlo k jejich porušení (Taiz et Zeiger, 2006). Za účasti fototropinů (viz dále) se začnou pumpovat protony do apoplastu, aktivují se iontové kanály a transportují ionty do buňky. Následně dochází k vyrovnávání zvýšeného osmotického potenciálu čerpáním vody do buňky. To zvýší turgor ve svěracích buňkách, což vede k rozevření průduchu (Kinoshita et al., 2001).

2.3. Světelné receptory

2.3.1. Fytochromy

Fytochromy jsou modré pigmenty rozpustné ve vodě, tvořící dimery (cca 125 kDa na 1 monomer). Většinou vytváří homodimery (mimo fytochromy C a E). Každá podjednotka dimeru se skládá z chromoforu a apoproteinu (Taiz et Zeiger, 2006). Chromofor u vyšších rostlin je lineární tetrapyrrol – fytochromobilin. Fytochromobilin je tvořen hemem v plastidech, poté je transportován do cytoplasmy. Na polypeptid se váže kovalentně a vzniká v chlorofylu. Bakteriální chromofory jsou tvořeny biliverdinem. Fytochromy absorbují hlavně R a FR světlo ale jsou schopny absorbovat i UV-B a BL (Schäfer et Nagy, 2006).

Při pokusech na *Arabidopsis thaliana* bylo objeveno 5 genů pro fytochromy (PHYA, PHYB, PHYC, PHYD a PHYE), ale například u některých jednoděložných rostlin (rýže a kukuřice) byly objeveny jen geny pro PHYA, PHYB a PHYC. Fytochromy se neliší chromoforem,

ale sekvencí aminokyselin v proteinové části. Fytochromy spolu dohromady interagují. Fytochromy phyA a phyB spolu mohou interagovat synergicky i antagonisticky. Fytochromy phyB, phyD a phyE spolu většinou interagují synergicky (Taiz et Zeiger, 2006). Fytochromy mají 2 formy, aktivní Pfr a inaktivní Pr. Pr dosahuje maximální absorpce při 660 nm a Pfr při 730 nm. Fytochrom A je přítomen hlavně v etiolizovaných pletivech, jeho Pfr forma má poločas rozpadu 30 až 60 minut. Fytochromy B až E mají delší životnost (Luštinec et Žárský, 2005). Monomery fytochromů, transportované do cytoplasmu dimerují na inaktivní Pr formu. Po absorpci světla z nich vzniká aktivní Pfr izomer. Většina Pfr formy se transportuje do jádra, kde spouští expresi příslušných genů. Zbylé fytochromy slouží k regulaci membránového potenciálu v závislosti na R nebo FR. V buňkách je equilibrická hodnota 97 % Pr a 3 % Pfr. Absorpční spektra forem se totiž z části překrývají. Pr forma po absorpci R se izomeruje na Pfr formu, ale malá část Pfr, která také absorbovala, R se mění zpět na Pr. Izomerizace Pr na Pfr a opačně může být vyvolána i působením BL. Fytochromy ovlivněné BL lze odlišit od ostatních receptorů zvrácením reakce za užití FR (Taiz et Zeiger, 2006).

Fotomorfogeneze je regulována ubiquitinací proteinů. Tento proces je regulován z velké části pomocí enzymu COP1 (CONstitutive Photomorfogenesis 1). COP1 interaguje s fytochromy i kryptochromy. Více o COP1 v kapitole o kryptochromech.

Do klíčení se zapojují především fytochromy A a B. Ve FR fytochrom A indukuje klíčení, ale fytochrom B klíčení naopak inhibuje. Fytochrom B aktivuje klíčení ve tmě. Regulace probíhá prostřednictvím Pfr a Pr formy (Reed et al., 1994).

2.3.2. Kryptochromy

Kryptochromy jsou fotoreceptory, které absorbují modré světlo, zelené světlo a UV-A v rozmezí 320 až 500 nm (Xu et al., 2009). Kryptochromy se dělí do 3 skupin. Existují rostlinné kryptochromy, živočišné kryptochromy a DASH kryptochromy. DASH je zkratka z latinských názvů *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* a human.

Strukturně jde o flavoproteiny, podobné svou strukturou i sekvencí fotolyasám. Oproti fotolyasám ale nemají schopnost reparace pyrimidinových dimerů v DNA, až na DASH kryptochromy, které umí opravit ssDNA. Evoluce kryptochromů proběhla několikrát nezávisle na sobě a z různých typů fotolyas. CRY1 a CRY2 vznikly z CPD fotolyas prvního typu. Jsou to klasické rostlinné kryptochromy. Živočišné kryptochromy se vyvinuly z 6-4 fotolyas. U kryptochromů DASH není přesně jasné, ze kterých fotolyas se vyvinuly (Schäfer et Nagy, 2006; Bouly et al., 2007).

U kryptochromů se rozlišují 2 domény - C a N. C konec je potřeba v signalizaci a reakci se signálními partnery, jako je například COP1. C doména se sekvenčně nepochodá žádnému osekvenovanému proteinu. N doména je sekvenčně podobná fotolyasám.

Dále interaguje s receptorem CRY1, který spouští tvorbu homodimerů potřebných aktivaci C domény. Homodimery se tvoří nezávisle na světle, ale nejspíš mají různé vlastnosti za světla nebo za tmy. Jejich vlastnosti se mění při absorpci modrého světla flavinem z C domény. Proto se mění vlastnosti celé C domény (Sang et al., 2005).

U kryptochromu 1 existují 3 mezi sebou přechodné redoxní formy. Je to FAD – oxidovaná, FADH[•] – semichinon a FADH⁻ - redukováná forma. Semichinonová forma je nejstabilnější. Přes noc se akumuluje oxidovaný flavin z neaktivního CRY1. Modré světlo redukuje flavin a vytváří se fotoequilibrium (Bouly et al., 2007).

U *Arabidopsis* byly nalezeny 3 kryptochromy – CRY1, CRY2 a CRY3 (Taiz et Zeiger, 2006). Kryptochrom CRY1 zprostředkovává inhibici prodloužení hypokotylu, růst děloh a akumulaci antokyanů. Jeho mutant, *cry1*, býval označován jako *hy4* (Sang et al., 2005). CRY1 lokalizován v jádře, ale podle světelných podmínek je transportován mezi jádrem a cytoplasmou.

Kryptochrom CRY2 má svou funkci v inhibici růstu, reguluje fotoperiodu a kvetení. Je lokalizovaný v jádře. Fosforylovaný CRY2 se degraduje modrým světlem. Fosforylace i ubiquitinace probíhá v jádře (Yu et al., 2007).

Kryptochrom CRY3 je zatím posledním popsáným kryptochromem. Patří mezi DASH-CRY proteiny. Je kódovaný jadernou DNA, ale pak se transportuje do mitochondrií a chloroplastů. Tento transport zajišťuje N koncová doména (Schäfer et Nagy, 2006; Huang et al., 2006).

Hlavní mechanismus kryptochromů probíhá ve spolupráci s COP1 vázaném na C doméně. COP1 má funkci E3-ubiquitinligasy. Ve tmě COP1 katalyzuje ubiquitinaci proteinů, které pozitivně regulují fotomorfogenezi.

2.3.3. Fototropiny

Fototropiny jsou receptory modrého světla ($\lambda = 390$ až 500 nm) a UV-A ($\lambda = 320$ až 390 nm). Jsou zapojeny v regulaci fototropismu, pohybu chloroplastů, otevírání stomat, pohybu listů a inhibici růstu etiolizovaných rostlin. Jejich funkce se liší, ale i částečně překrývají. Jsou to hydrofilní proteiny, ale jsou lokalizovány na plazmatické membráně. Při ozáření modrým světlem se PHOT1 odděluje od plazmatické membrány a PHOT2 je transportován

na membránu Golgiho aparátu (pozorováno u *Arabidopsis*). PHOT1 rychle inhibuje růst hypokotylu rostlin, které se dostaly ze tmy na světlo. PHOT2 se uplatňuje v transportu chloroplastů k bazální straně buněk za silného ozáření, aby nedocházelo ke zničení chloroplastů, a za tmy/slabého světla k apikální straně buněk (Kaiserli et al., 2009).

Fototropiny mají C a N terminální domény. Na C terminální doméně je Ser/Thr kinasa. Na N terminální doméně jsou lokalizovaná 2 vazebná místa – LOV1 a LOV2 (Light, Oxygen, Voltage). Na každé vazebné místo se váže FMN (Schäfer et Nagy, 2006). Domény LOV se velmi podobají svou sekvencí i terciální strukturou, mají rozdílné fotochemické vlastnosti a funkce.

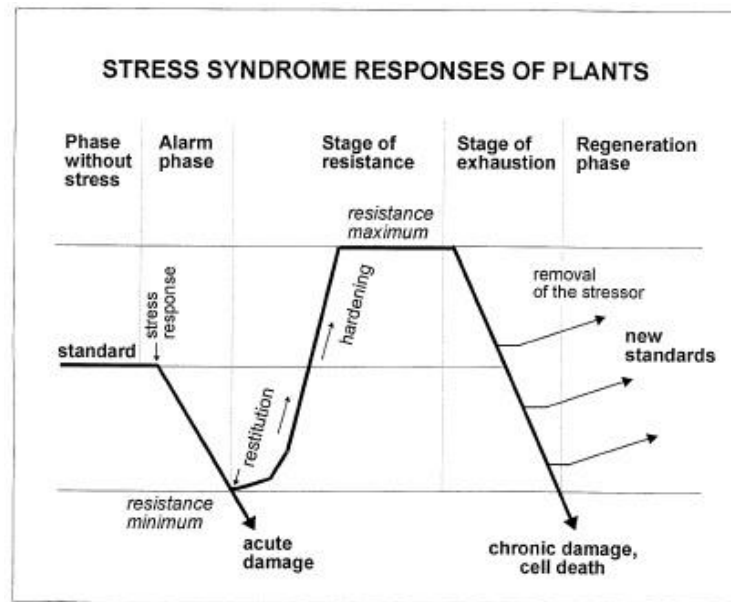
Funkce LOV1 není ještě úplně známa. Nejspíš reguluje funkci LOV2 a dimeruje receptory (Jones et Christie, 2008).

Doména LOV2 je potřebná při autofotofosforylaci za světla a inhibitor kinasové aktivity fototropinů za tmy (Kaiserli et al., 2009).

2.4. Stres

J. Levitt definoval stres jako jakýkoliv přírodní faktor, který je potencionálně nepříznivý pro organismus (Levitt, 1980). Rostliny jsou celý život vystavovány stresovým faktorům. V průběhu evoluce si vyvinuly různé mechanismy na svou ochranu. Tyto mechanismy se nazývají získání tolerance. Reakce na stres se může rozdělit do 4 fází. První fáze se jmenuje „poplachová“. Rostlina začíná reagovat na vyvolaný stres. Další je „kompenzační fáze“. Následuje „restituční fáze“, kdy vzniká tolerance k danému stresovému faktoru. Poslední je „fáze rezistence“. Ne ke všem stresovým faktorům vzniká tolerance. Pokud stres trvá dlouhou dobu, rostlina může uhynout (Lichtenthaler, 1998; Procházka et al., 1998). V různých ekosystémech jsou rostliny vystaveny různým typům stresu, ale všechny rostliny reagují sníženým přežíváním a nízkou produkcí biomasy. Různé druhy na stres reagují rozdílně (Grover et al., 2001).

Obr. č. 2: Odpovědi rostlin na stres. Převzato z Lichtenthaler, 1998



Hlavní rozdělení stresových faktorů je na abiotické a biotické.

Abiotické faktory se dále dělí na:

- **fyzikální**
 - vítr
 - prudké světlo (VIS i UV)
 - velké výkyvy teplot

- **chemické**
 - sucho
 - hypoxie/anoxie
 - nadbytek nebo nedostatek živin v půdě
 - toxické látky

Biotické faktory jsou například:

- herbivorové
- patogeny a paraziti
- alelopatie (konkurence mezi rostlinami)

(Procházka et al., 1998).

2.4.1. Vodní deficit

Voda je hlavní rozpouštědlo v rostlinách. Díky jejímu proudění v těle rostliny se ve směru od kořenů k listům transportují rozpuštěné živiny. V buňce slouží dále také jako rozpouštědlo a donor elektronů a protonů. Nedostatek vody způsobuje vodní stres, už při ztrátě 15 až 20 % vody mesofytické rostliny vadnou. Extrémní ztráta vody se nazývá desikace. Vodní deficit může být vyvolán suchem, chladovým stresem nebo zvýšenou salinitou v hypertonickém prostředí. Snížený objem vody v buňkách vyvolává snížení turgoru, zahuštění látek v cytoplasmě, destabilizaci membrán a denaturaci proteinů. Rostliny žijící v aridním prostředí si v průběhu evoluce vyvinuly různé typy ochrany. Výparu vody z listů se brání zesílenou kutikulou menší plochou listů a vyšším množstvím trichomů. Aby z prostředí byly schopné získat více vody, mají dlouhé kořeny a větší hustotu kořenového vlášení.

Na buněčné úrovni se rostliny vysychání brání změnou některých metabolických procesů. U rostlin adaptovaných na sucho (kaktusy, sukulenty, pryšce, tropické trávy) se vyvinul zvláštní typ fotosyntézy (CAM a C₄). V cytoplasmě akumulují osmolity, antioxidanty a proteiny LEA (Late Embryogenesis Abundant). LEA jsou proteiny, které se chovají podobně jako chaperony. Její reakce probíhá synergicky s disacharidem trehalosou. Mimo vodním stresem poničených proteinů opravují i proteiny poničené chladovým šokem. V reakci na vodní deficit se také uplatňuje kyselina abscisová (ABA). Její zvýšená koncentrace má vliv na uzavírání průduchů (Bray, 1997; Goyal, 2005; Luštinec et Žárský, 2005).

2.4.2. Zasolení

S vodním deficitem souvisí i zasolení, které způsobuje vyšší osmotický tlak a zhoršuje příjem vody rostlinou a zvyšuje absorpci solí. Vysoká koncentrace solí je pro rostlinu toxická. Způsobuje předčasný opad listů (senescence) a zpomaluje fotosyntézu (Munns, 2002). Koncentrace solí v půdě se zvyšuje například zaplavováním území mořskou vodou, dlouhodobým zavlažováním, silným výparem, převyšujícím srážky, posypem silnic solí nebo nadbytečným hnojením. Na zasolení se dokázali adaptovat takzvané halofytické rostliny. Zvýšenou salinitu přežívají díky vysoce selektivnímu transportu iontů přes cytoplasmatickou membránu do kořenů. Soli se hromadí v kořenech nebo listech. Aby koncentrace NaCl nedosahovaly toxických hodnot, ukládají se ionty Na⁺ a Cl⁻ ve vakuole nebo apoplastu. Aby se vyrovnal osmotický tlak, akumuluje se v cytoplasmě K⁺ nebo organické látky jako například prolin, betain, glycin nebo sacharidy (Hasegawa et al., 2000; Luštinec et Žárský, 2005). U rostlin *Arabidopsis*, které akumulovaly mannitol, se zvýšila resistance

proti zvýšené koncentraci NaCl. Semena, která obsahovala 10 $\mu\text{mol/g}$ mannitolu ve své sušině (DW), byla schopna klíčit v médiu s 400mM koncentrací NaCl. Kontrolní semena přestávala klíčit ve 100mM koncentraci NaCl (Chen et Murata, 2002).

Při obraně buněk proti osmotickému stresu se v buňkách hromadí osmolity. Aby buňka byla schopná dále fungovat, nesmí být osmolit pro buňku toxický ani ve vysokých koncentracích. Mezi nejčastější osmolity patří z organických látek například sacharidy, prolin, kvarterní amoniové soli, terciální sulfonylové kyseliny a polyaminy. Z anorganických látek se na toleranci osmotického stresu podílejí ionty Na^+ , K^+ a Cl^- z vakuoly (Voetberg et Sharp, 1991). Jako první do reakce vstupují anorganické ionty, organické sloučeniny až později.

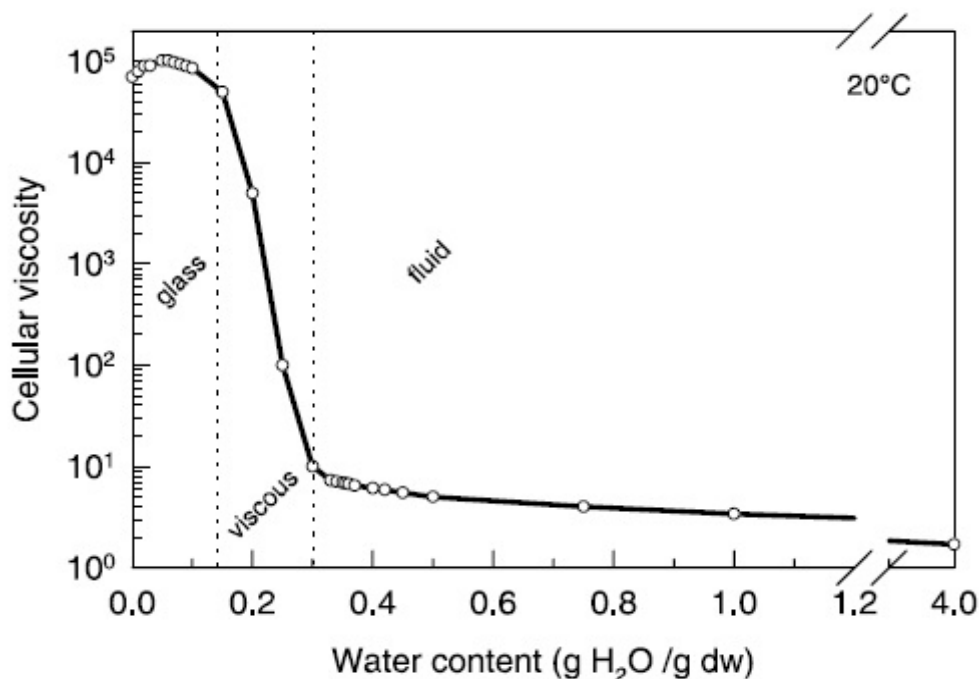
Rostliny, které vyhledávají extrémní stanoviště s vysokým zasolením, se nazývají halofyty. Mezi halofyty patří například *Suaeda salsa*, která byla vystavena stresovému prostředí zasolení s různými koncentracemi NaCl. Pokusem se zjišťovala reakce plazmatické membrány. Optimální zasolení pro tuto rostlinu bylo 50 mM NaCl a její růst inhibovala koncentrace 250 mM NaCl. Se zvyšující se koncentrací soli se zvyšovala koncentrace iontových i organických solutů. Spolu s tím se zvyšovala aktivita H^+ -ATPasy na plazmatické membráně až do 150 mM NaCl (Chen et al., 2010).

2.5. Osmoprotektanty

2.5.1. Sacharidy

Sacharidy v rostlinách mají význam jako základní stavební, zásobní a transportní látky. Jejich velký význam je i v ochraně rostliny před stresem. Rostliny *Nicotiana tabacum* s genem *sacB* pro levancukrasu z *Bacillus subtilis*, které generovaly fruktan z fruktosy, měly větší přírůstky než WT v suchém prostředí. Transformované rostliny rostly o 55 % rychleji, měly o 33 % vyšší čerstvou hmotnost a o 59 % větší hmotnost sušiny oproti WT. Transgenní rostliny akumulovaly fruktan do koncentrace 0,35 mg/g čerstvé hmoty (FW); (Chen et Murata, 2002). Při vysušení buněk pod 0,3 g $\text{H}_2\text{O/g}$ DW se v cytoplasmě tvoří amorfni hmota z neredukujících sacharidů podobná sklu. Díky tomu se zastaví metabolické pochody a nedenedaturují se proteiny (Buitink et Leprince, 2004).

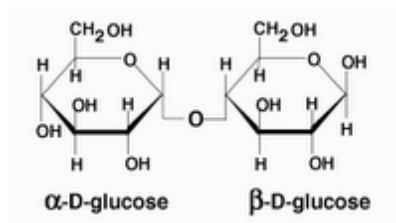
Obr. č. 3: Zvyšování molekulární viskozity embryonální osy hrachu (*Pisum sativum*).
Převzato z Buitink J. et Leprince O., 2004.



2.5.1.1. Trehalosa

Trehalosa, (α -D-glucopyranosyl-[1, 1]- α -D-glucopyranosid), je neredukující disacharid se sumárním vzorcem $C_{12}H_{22}O_{11}$ a molární hmotnosti 342,296 g/mol. Tvoří jí 2 molekuly glukosy. Vyskytuje se v bakteriích, řasách, houbách i bezobratlých, kde se uplatňuje v obraně proti abiotickému stresu. Myslelo se, že se ve vyšších rostlinách nevyskytuje, až na plavuň *Selaginella lepidophylla* a dvouděložnou rostlinu *Myrothamnus flabellifolia*.

Obr. č. 5: Chemický vzorec trehalosy



Podobné sekvence DNA pro syntézu trehalosy z *E. coli* nebo *S. cerevisiae* byly nalezeny i u *Arabidopsis thaliana* a dalších rostlin. Vyšší rostliny obsahují malé koncentrace trehalosy, kvůli vysoké aktivitě trehalasy, která má nejvyšší aktivitu při pH 4,5 až 6,3. Největší aktivita trehalasy u *Arabidopsis thaliana* byla naměřena ve stigatech, proti tomu nejnižší aktivita

byla v listech. Trehalosa se navíc vykytuje i v pylu a má nejspíš nějakou funkci v reprodukci (Müller et al. 2001).

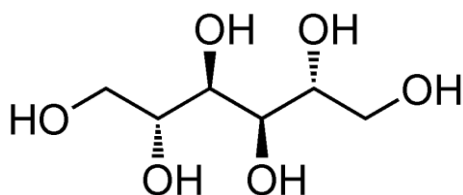
Syntéza trehalosy v bakteriích probíhá ve 2 krocích. V prvním trehalosa-6-fosfát syntasa (TPS) katalyzuje syntézu trehalosa-6-fosfátu z glukosa-6-fosfátu a uridinu difosfát-glukosy na trehalosu-6-fosfát. Trehalosa-6-fosfát se poté fosfátasou defosforyluje (Müller et al. 2001).

Mutant *Arabidopsis* AtTPS1, který nadbytečně exprimuje TPS, obsahuje zvýšené koncentrace trehalosy. Tito mutanti oproti kontrolním rostlinám v sobě akumulují větší množství vody. Při dvacetidenním vystavení vodnímu deficitu a navrácení do normálního prostředí se mutantní rostliny nedokázaly vzpamatovat, na rozdíl od WT. Autoři ale tento efekt připisují jiným změnám v mutantovi AtTPS1. Při klíčení semen na MS médiu s různými koncentracemi ABA, semena mutanta AtTPS1 klíčila lépe, než semena WT. Mutant je insensitivní k ABA (Grennan, 2007).

2.5.1.2. Mannitol

Mannitol je šestiuhlíkatý cukerný alkohol o molekulové hmotnosti 182,172 g/mol. Sumární vzorec má $C_6H_{14}O_6$ a systematický název (2*R*,3*R*,4*R*,5*R*)-hexan-1,2,3,4,5,6-hexol.

Obr. č. 5: Chemický vzorec mannitolu



Je to nejrozšířenější cukerný alkohol v přírodě, který se vyskytuje u více než sta různých rostlinných druhů. U celeru (*Apium graveolens*) se ho 80 % akumulují ve vakuole a 20 % je v cytosolu. Ve vyšších rostlinách se syntetizuje z manosa-6-fosfátu, který je redukován manosa-6-fosfát reduktázou za přítomnosti NADPH. Vznikne manosa-1-fosfát, který je defosforylován na mannitol. Mannitol vzniká hlavně ve vyzrálých listech (Stoop, et al., 1996).

Mannitol se v rostlině uplatňuje při ochraně rostliny proti abiotickému stresu, hlavně proti stresu ze zasolení (Stoop et Pharr, 1994). Funguje jako zhášec hydroxylových radikálů,

tím brání poškozování proteinů. Po vložení genu pro mannitol-1-fosfát dehydrogenasu z bakterie do chloroplastu tabáku (*Nicotiana tabacum*) do chloroplastu, tabák akumuloval mannitol v chloroplastu a fenotypově byl stejný s WT. Transgenní rostlina byla poté rezistentnější vůči oxidativnímu stresu. Oxidativní stres byl vyvolán herbicidem methylviologen (Shen et al., 1997). Rostliny tabáku a *Arabidopsis* s genem mt1D pro mannitol-1-fosfát dehydrogenasu z *E.coli* akumulovaly více než 6 $\mu\text{mol/g}$ FW v listech. Listy transformovaného *Arabidopsis* obsahovaly jen skoro 3 $\mu\text{mol/g}$ FW. Tyto rostliny vykazovaly zřetelnou toleranci k zasolení. Transgenní rostliny tabáku byly za normálních podmínek o 20 až 25 % menší než WT, ale v silně zasoleném prostředí (150 mM NaCl) se množství DW u WT zmenšilo o 44 %. Na DW transgenních rostlin nemělo zasolení žádný vliv (Chen et Murata, 2002).

Po odeznění stresu rostlina potřebuje dostatek energie ke své regeneraci. I v tomto případě je výhodný mannitol. Při jeho metabolismu vznikají 3 adenosytrifosfáty (ATP), to je víc, než by získala ze sacharosy (Stoop, et al., 1996).

2.6. Charakteristika mutantních rostlin

2.6.1. *fri*

Třetí použitý mutant je PHYA deficientní mutant *fri* (far red insensitive). Růst hypokotylu je inhibován FR a částečně B, chlorofyl se vyvíjí normálně. Starší rostliny mutantu *fri* jsou ve sklenicích za slunečných dnů náchylné k vadnutí, čímž se zpomaluje jejich růst. Podle předběžných testů to ale není způsobeno abnormálním chováním stomat. (Kendrick et al, 1997). PHYA deficientní rostliny jsou „slepé“ k FR, ale na R mají normální odpověď (Terry, 1997). Mutant se nazývá *fri*, protože je absolutně nesenzitivní k FR. Lokus pro sensitivitu k FR je na 10. chromozomu. Při imunologické a spektrofotometrické detekci se nenalezl protein pro PHYA. Protein PHYB-like fytochrom se vyskytoval v obvyklém množství.

Při ozařování *fri* a cv. MM červeným světlem každé 4 hodiny vykazoval mutant i WT skoro stejnou inhibici. Tento efekt je do značné míry reversibilní, pokud je ozařování R ihned následováno ozářením FR. Při jiném pokusu byli po 7 dnech ve tmě byli mutant i *fri* přeneseni do WL a oba se zazelenali oproti tomu po 7 dnech ve FR a přenesení do WL, ztratil WT schopnost deetiologace, ale *fri* se normálně deetiologoval (van Tuinen et al., 1995).

2.6.2. *tri1*

Mutant *tri* (temporary red insensitive) vznikl mutací 3 monogenních recesivních mutantů rajčete (*Lycopersicon esculentum*) kultivaru Moneymaker (cv. MM) a rodovou linií GT. Semena byla vystavena působení ethylmethylsulfonátu (EMS). Tímto vznikli nezávislí mutanti *tri1*, *tri2*. Třetí mutant *tri3* vznikl ve tkáňové kultuře (somatoklonální varianta). Při hledání rostlinek s delším hypokotylem v nepřetržitém R se objevil i čtvrtý mutant *tri4*. Alely *tri1* a *tri2* jsou isogenní s cv. GT a alely *tri3* a *tri4* jsou isogenní s cv. MM.

Všichni 4 mutanti se vyznačují delšími hypokotyly s nižším obsahem anthokyaninů než wild-type (WT). Rozevírání apikálního háčku je u nich zpomalené a dělohy syntetizují chlorofyl v pořádku. Tyto 2 procesy ale nejsou ve vztahu k nižší akumulaci anthokyaninů. Zpomalené otevírání apikálního háčku může ovlivnit rostliny klíčící v malých kontejnerech zvýšenou koncentrací etylenu. Mutanti *tri* mohou být citlivější k etylenu. Mutanti *tri2* pěstovaní ve tmě nadměrně ohýbali apikální háčky, což je známo jako „trojitá odpověď“ a výsledek aplikace ethenu na etiolizovanou rostlinu (Kerckhoff et al., 1996); (Guzmán and Ecker, 1990).

Pokud se *tri* pěstovali v cyklu 16-h světlo / 8-h tma po 28 dní, byli o něco vyšší, než isogenní WT. U mutantních rostlin *tri1* se brzy objevovaly chlorosy spodních listů a předčasný opad listů oproti WT a ostatním mutantům.

Tri lokus je pravděpodobně strukturní gen pro PHYB1. Mutace u *tri* pravděpodobně není ve chromoforu, jako u mutantů *au* (aurea) a *yg-2* (yellow-green 2), protože všichni obsahují správné množství na světle rozkládajícího se phyA.

Po 4-6 hodinovém vystavení WT a *tri1* se zdá, že mutant *tri1* nevytváří PHYB-like apoprotein. Předpokládá se, že jde o PHYB1, protože u *tri2* a *tri4* byla nalezena jeho sekvence aberantní mRNA specifickou probou. *Tri* lokus pravděpodobně reguluje transkripci nebo translaci fytochromu. U mutantu *tri1* nebyl imunodetekcí nalezen protein PHYB1, ale mRNA se objevovala normálně. Možné vysvětlení je, že mRNA obsahuje předčasný stop kodon. U mutantu *tri2* pravděpodobně došlo k nesprávnému splicingu mRNA. Alela *tri2* tvoří zkrácený protein, který je nejspíš ještě částečně fotoaktivní. Alela *tri3* tvoří nižší množství proteinu o správné velikosti, který asi obsahuje změněné aminokyseliny, které ovlivňují jeho stabilitu (Kerckhoffs et al., 1996). Při pokusech s *tri* se zjistilo, že PHYB1 je velmi důležitý při biosyntéze anthokyaninů (Kerckhoff et al., 1996).

Při pokusech s různými světly se zjistilo, že délka hypokotyly, velikost děloh a množství anthokyaninů a chlorofylu se u homozygotního *tri1*, *tri3* a WT nijak neliší v D a FR. V B je hypokotyl lehce prodloužený u *tri1*, *tri3* oproti WT. V R mají tito mutanti delší hypokotyl,

obsahují méně anthokyaninů a mají menší, tmavě zelené dělohy. Fenotyp *tri1*, *tri3* je celkově velmi podobný. Rozdíly mezi nimi a WT jsou lépe rozeznatelné až u starších rostlin (Tuinen et al., 1995).

2.6.3. *hp1*

Dalším použitým mutantem rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) v mé práci je *hp-1* (High Pigment - 1). Tento kultivar byl objeven v roce 1917 jako jedna rostlina neznámé variety na polích Campbell Soup CO. Homozygotní mutant *hp-1* má zvýšenou fytochromovou odpověď. Jeho fenotyp se vyznačuje zvýšeným obsahem pigmentu – tmavšími listy a tmavě červenými plody, nadzemní části hypokotylu jsou fialové. Anthokyaniny se syntetizují až po vystavení rostliny světlu. Po vystavení R, žlutému světlu a UV-A se silně inhibuje prodlužování hypokotylu. Dospělé rostliny mají v mladých i zralých listech dvojnásobné množství chlorofylu (mají větší chloroplasty) a karotenoidů ve zrajících plodech oproti WT. (Cookson et al. 2003; Kerr, 1965). *hp-1* dále syntetizují ve zralých plodech zvýšené množství karotenoidů (provitamin A), lykopenu a kyseliny askorbové oproti WT. Zvýšená množství anthokyaninů umožňují kompletní deetiologizaci. Peters et al. (1992) předpokládají, že produkt *hp-1* potlačuje transdukci světelného signálu. HP-1 obsahuje obdobné množství PHYA i PHYB1. Pod stálým FR dochází k blokaci zelenání děloh, pokud byly rostliny následně ozářeny bílým světlem (WL). Je to způsobeno ireversibilní represí phyA dependentního chlorofylid reduktázového genu (Kendrick et al., 1997).

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Rostlinný materiál

Experimenty byly prováděny s mutanty rajčete (*Solanum lycopersicum* L.): *tri1* (phyB1-deficientní mutant; van Tuinen et al. 1995), *fri* (phyA-deficientní mutant; Kerckhoffs et al. 1997) a *hp* (mutant se zvýšenou reakcí fytochromů; Kendrick et al. 1997). Odpovídajícími kontrolními genotypy (izogenními liniemi) byly kultivary cv. GT, cv. Money Maker a cv. Rutgers. Všichni mutanti byly laskavě poskytnuty C. M. Rickem, TGC (Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>).

3.2. MS médium

Na přípravu 1 l kultivačního média Murashige et Skoog (MS) je potřeba 10 g (1 %) sacharosu, 4,3 g MS média, 0,1952 g (1 mM) MES pufru (Murashige et Skoog, 1962). Do sklenic byla přidána NaCl nebo mannitol dle potřebných koncentrací (viz tabulka č. 3). Roztok byl připraven na magnetické míchačce. Po rozpuštění všech složek bylo pH upraveno 1M KOH na 6,1. Do každé 0,5 l sklenice bylo dáno 2,8 g fytoagaru na 400 ml (0,7%) a doplněno roztokem MS média. Médium ve sklenicích bylo sterilizováno autoklávováním a skladováno v lednici.

Tab. č. 3: Navážky NaCl a mannitolu

Koncentrace soli [Mr= 58,44]	Navážka	Koncentrace mannitolu [Mr=182,172]	Navážka
0 mM	0 g/l	0 mM	0 g/l
50mM	2,922 g/l	50mM	9,109 g/l
75mM	4,383 g/l	100mM	18,271 g/l
100mM	5,844 g/l	150mM	27,326 g/l

3.3. Sterilizace semen

Na každý pokus bylo potřeba 360 semen od každého kultivaru. Semena byla vložena do plastových 50ml zkumavek a zalita 3% roztokem Sava. Za občasného protřepání byla semena sterilizována po 30 minut. Po této době byla semena flow-boxu šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou pomocí 10ml pipety.

3.4. Kultivace semen

Semena jsem za sterilních podmínek vyséval ve flow-boxu do 10cm Petriho misek s MS médiem s různou koncentrací NaCl nebo mannitolu. MS médium jsem po vyndání z lednice rozehrál v mikrovlnné troubě. Do každé Petriho misky jsem odměřil pomocí 50ml plastové zkumavky 20 ml teplého MS média. Na jeden pokus jsem potřeboval 6 Petriho misek od každé koncentrace NaCl nebo mannitolu. Médium jsem nechal zchladit na teplotu okolí. Na každou Petriho misku jsem pomocí pinzety vysadil 30 semen, obdobně pro ostatní genotypy. Po vysetí jsem každou misku zalepil páskou z netkané textilie (Urgopore). Misky jsem si rozdělil. Od každého genotypu jsem vzal sadu všech 4 koncentrací pro R, další sadu

pro D a třetí sadu pro B. Sadu B a R Petriho misek jsem vložil příslušné automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific B. V., The Netherlands) s B nebo R světlem. Třetí sadu Petriho misek pro D jsem obalil alobalem a vložil do růstové komory s R. Semena byla kultivována při teplotě 23 °C. Zdrojem modrého a červeného světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue a TLD-36W/15-Red. Maximální svítivost modrého světla při 440 nm byla 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Maximální svítivost červeného světla při 660 nm bude 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$. Vlhkost regulována nebyla.

3.5. Sčítání semen

Semena začínala klíčit 3. až 4. den po výsevu. Sčítat jsem začal 4. den po výsevu a pokračoval do 14. dne. Klíčení přestávalo okolo 12. dne po výsevu. Ze získaných hodnot jsem vytvořil tabulky a grafy pomocí MS Excel 2007.

4. VÝSLEDKY

Cílem mé práce bylo zkoumat vliv různých koncentrací abiotických stresorů (NaCl a mannitol) na klíčivost rajčat. Dále jsem sledoval, které fotoreceptory zprostředkovávají zvýšenou citlivost k tomuto typu stresu.. Pokusy byly prováděny na mutantech rajčete *fri*, *tri1* a *hp* a jim odpovídajících kontrolních rostlinách cv. MM, cv. GT a cv. Rutgers.

Byla sledována inhibice klíčení způsobená vzrůstající koncentrací abiotického stresoru (NaCl, mannitol) na modrém a červeném světle a ve tmě. Rajčata byla pěstována na Petriho miskách s MS médiem s přídavkem 0 – 100 mmol.l^{-1} NaCl nebo 0 - 150 mmol.l^{-1} mannitolu. Pokusy pro každý genotyp byly provedeny ve čtyřech opakováních. Počty vyklíčených semen byly zaznamenávány od 4. dne po výsevu každý druhý den. Pokus byl ukončen 14. den po výsevu. Z průměrných výsledků jsem sestavil grafy kinetiky klíčení vyjádřené v procentech. Z průměrných hodnot klíčení 12. den po výsevu jsem vytvořil grafy průměrné klíčivosti pro jednotlivé koncentrace abiotického stresoru v závislosti na kvalitě světla. Semena začínala klíčit 3. den a klíčení končilo 12. den po výsevu. Klíčení bylo nejrychlejší 6. až 8. den. Po 14. dnu v podstatě žádné další semeno nevzklíčilo. Toto bylo velmi podobné u všech barev světla a koncentrací NaCl.

4.1. Klíčení semen v přítomnosti NaCl

Semena cv. MM klíčící ve tmě na médiu bez NaCl nebyla ovlivňována stresovým faktorem. Průměrně vyklíčilo 98 % semen. S postupně zvyšující se koncentrací NaCl klesala klíčivost semen. Na Petriho miskách s 50mM koncentrací NaCl vzešlo 78 % semen. V 75mM koncentraci vyklíčilo 52 % semen. Inhibice se nejvíce projevila u 100 mM koncentrace NaCl a dosáhla 27 % (Graf 1).

Mutant *fri* byl ve tmě méně citlivý k vlivu abiotického stresu oproti WT. Na médiu bez NaCl vzešlo 100 % semen. Na médiu 50 mM NaCl dosáhla klíčivost semen *fri* průměrně 83 %. Na Petriho miskách se 75mM koncentrací NaCl klíčilo 75 % semen. U média se 100 mM NaCl byla klíčivost semen nejnižší. Vyklíčilo jen 38 % semen (Graf 2).

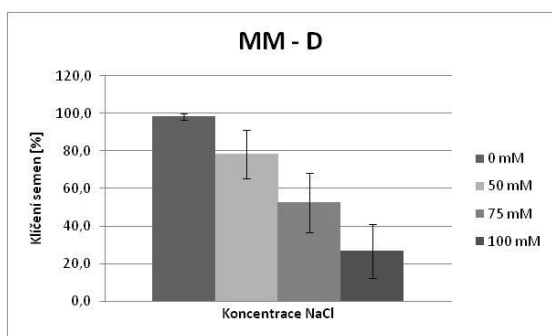
U semen cv. MM, klíčících v modrém světle (B) na médiu bez NaCl, se neprojevovала inhibice klíčení. Vyklíčilo 98 % semen. Semena s 50 mM NaCl byla silně inhibována, vyklíčilo 47 % semen. Snížená klíčivost se projevovала mnohem silněji než ve tmě. Na médiu s koncentrací 75mM NaCl vyklíčilo 17 % semen. Inhibice na médiu se 100mM koncentrací NaCl se projevila nejvyšší inhibice klíčivosti ze všech světél i ze tmy. Klíčivost byla v této koncentraci jen 8 % (Graf 3).

Na modrém světle byla nižší inhibice klíčení *fri* oproti WT. Na médiu bez NaCl vzešlo 94 % semen. Nejvyšší klíčivost u mutanta *fri* byla v 50mM koncentraci NaCl, kde vyklíčilo 96 % semen. Inhibice NaCl neměla na klíčení vliv. Inhibice klíčení se více začala projevovat až na médiu se 75 mM soli, kde byla klíčivost 62%. Ve 100mM koncentraci soli vzešlo 23 % semen (Graf 4).

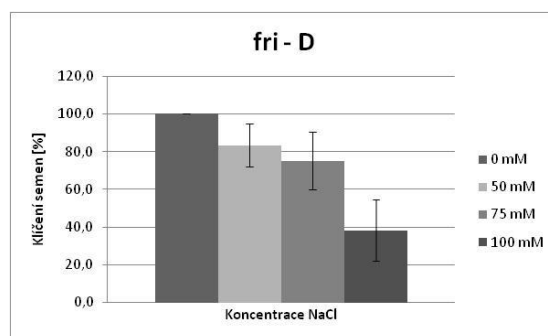
Klíčovost semen cv. MM na červeném světle a na médiu bez NaCl byla vysoká (98 %). Semena inkubovaná na médiu s koncentrací 50 mM NaCl klíčila z 69 %. Inhibice semen na médiu se 75mM koncentrací NaCl byla 43%. Ve 100 mM NaCl vzešlo 29 % semen (Graf 5).

Klíčovosti semen *fri* na médiu bez NaCl na červeném světle byla vysoká, vyklíčilo zde 93 % semen. Na médiu s 50 mM NaCl byla klíčivost také 93 %. V 75mM NaCl vyklíčilo 82 % semen. Na médiu se 100mM koncentrací NaCl vyklíčilo 31 % (Graf 6).

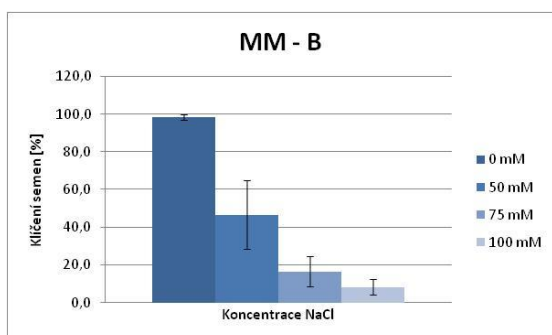
Graf 1: Průměrná klíčivost cv. MM v D



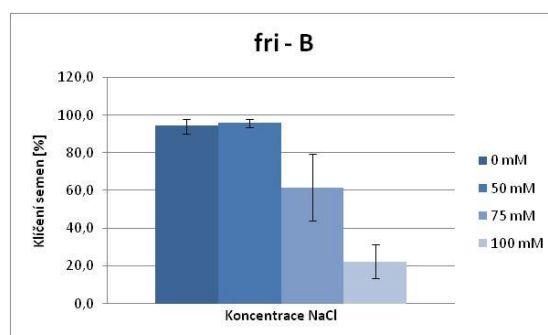
Graf 2: Průměrná klíčivost *fri* v D



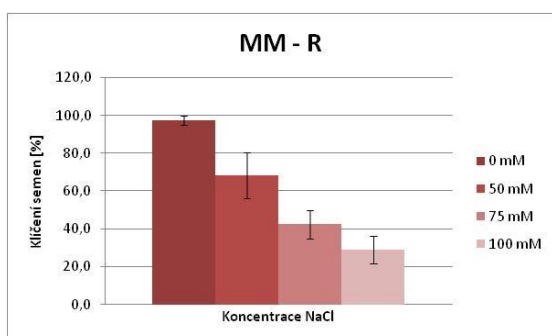
Graf 3: Průměrná klíčivost cv. MM v B



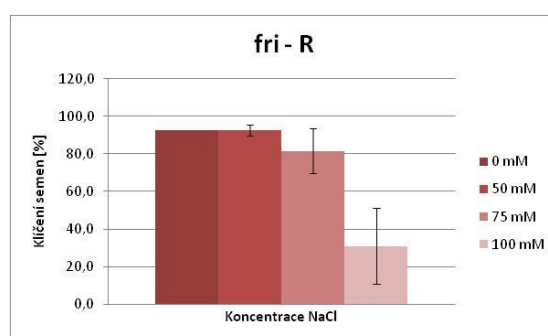
Graf 4: Průměrná klíčivost *fri* v B



Graf 5: Průměrná klíčivost cv. MM v R



Graf 6: Průměrná klíčivost *fri* v R



Genotyp GT kultivovaný ve tmě vykazoval nejvyšší klíčivost ve všech koncentracích oproti ostatním kvalitám světla. Na médiu bez NaCl ve tmě byla klíčivost 83%. V 50 mM koncentraci vyklíčilo 76 % semen. Na médiu se 75 mM NaCl se stále neprojevila výrazná inhibice. Vyklíčilo 70 % semen. Nejvyšší inhibice se projevila na médiu se 100mM koncentrací. Vyklíčilo 58 % semen (Graf 7).

Klíčovost mutanta *tri1* na médiu bez NaCl ve tmě byla 79%. Semena s 50mM koncentrací NaCl klíčila ze 71 %. Výrazné zvýšení inhibice se projevilo se 75 mM, kde klíčilo 12 %. Oproti tomu se 100 mM NaCl vyklíčilo průměrně 17 % semen (Graf 8).

Semena cv. GT rostoucí pod modrým světlem bez NaCl měla klíčivost 75 %. Výrazný pokles klíčivosti se projevilo už na 50mM koncentraci, vzešlo 29 % semen. Ještě vyšší inhibice

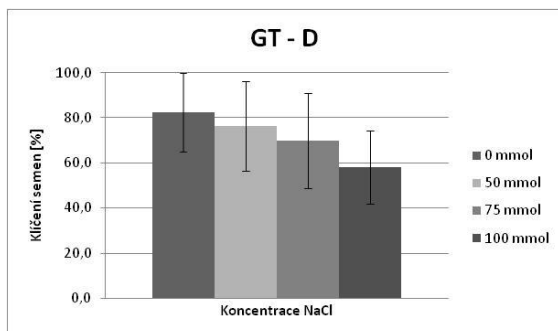
klíčení byla na médiu se 75 mM NaCl, kde vyklíčilo 7 % semen. Na 100mM koncentraci byla skoro všechna semena inhibována, klíčila jen 3 % semen (Graf 9).

U mutanta *tri1*, na modrém světle, byla semena zainhibována více než u WT (mimo 100 mM NaCl). Na médiu bez NaCl vyklíčilo 35 % semen. V 50mM koncentraci byla klíčivost ještě slabší (17 %). Na médiu se 75mM koncentrací NaCl klíčilo 12 % semen. U média se 100 mM NaCl byla klíčivost vyšší než na médiích s 50mM a 75mM koncentrací NaCl. Vyklíčilo zde 23 % semen (Graf 10).

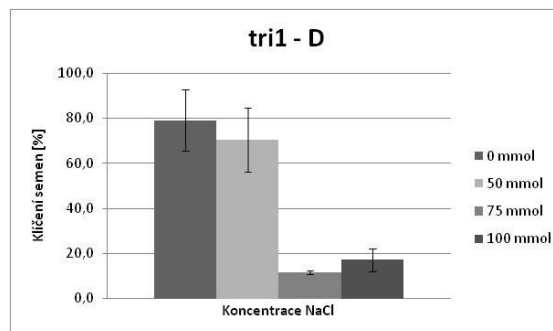
Semena cv. GT, kultivovaná na červeném světle na médiu bez NaCl vykazovala průměrnou klíčivost 77 %. Klíčivost na médiu s 50 mM a 75 mM byla obdobná. Na médiu s 50 mM NaCl vyklíčilo 36 % semen a na médiu se 75 mM NaCl vyklíčilo 39 % semen. Na médiu se 100mM koncentrací NaCl byla klíčivost 27 % (Graf 11).

Semena mutanta *tri1* kultivovaná na červeném světle vykazovala zvýšenou citlivost k osmotickému stresu vyvolaného zvýšenými koncentracemi NaCl. Na médiu bez NaCl byla 80% klíčivost. Značný nárůst inhibice se projevil již na médiu s 50 mM NaCl, kde klíčilo jen 28% semen. Další pokles klíčivosti byl pozorován u 75mM koncentrace NaCl. Vyklíčilo 14 % semen. Nejvyšší inhibice byla pozorována u semen klíčících ve 100 mM NaCl, klíčivost byla 7% (Graf 12).

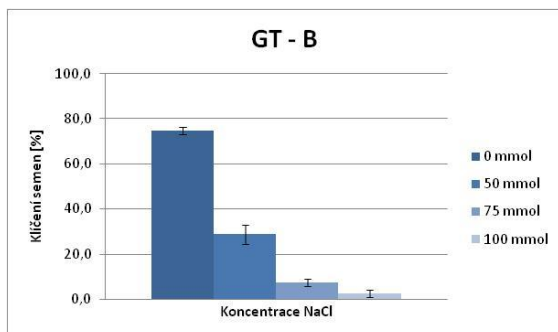
Graf 7: Průměrná klíčivost cv. GT v D



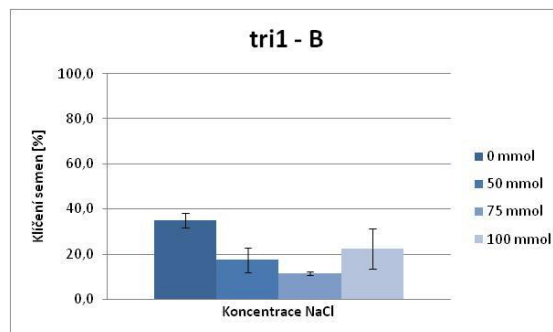
Graf 8: Průměrná klíčivost *tri1* v D



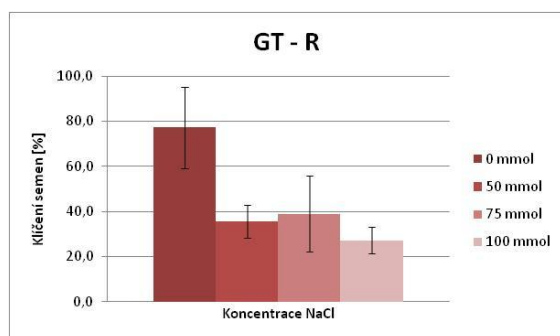
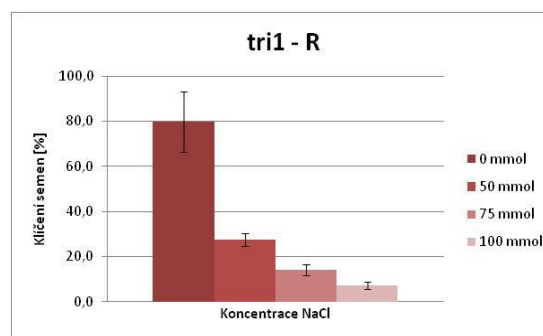
Graf 9: Průměrná klíčivost cv. GT v B



Graf 10: Průměrná klíčivost *tri1* v B



Graf 11: Průměrná klíčivost cv. GT v R

Graf 12: Průměrná klíčivost *tri1* v R

Semena cv. Rutgers kultivovaná ve tmě vykazovala nejnižší citlivost k abiotickému stresoru oproti semenům kultivovaným na modrém nebo červeném světle. Na mediu bez NaCl rostla se 100% klíčivostí. Na Petriho miskách s 50 mM NaCl vyklíčilo 65 % semen. Ve 75mM koncentraci byla klíčivost 44 %. Ve 100mM koncentraci byla semena silně zainhibována, vzklíčilo 20 % semen (Graf 13).

Klíčivost mutanta *hp* byla prokazatelně vyšší oproti WT. Ve tmě na Petriho misce bez NaCl vyklíčilo 94 % semen. Podobné hodnoty byly naměřeny v 50 mM NaCl, kde klíčilo 92 % semen, a 75 mM NaCl, kde vyklíčilo 89 % semen. Vyšší inhibice se projevila až u 100 mM koncentrace, kde byla klíčivost 60% (Graf 14).

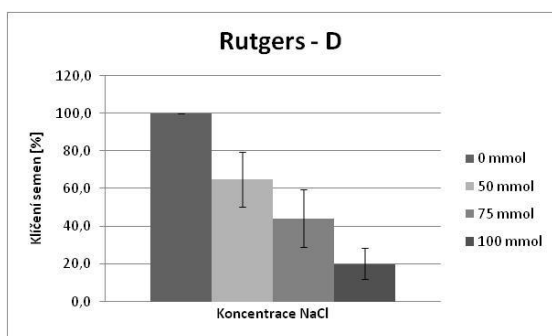
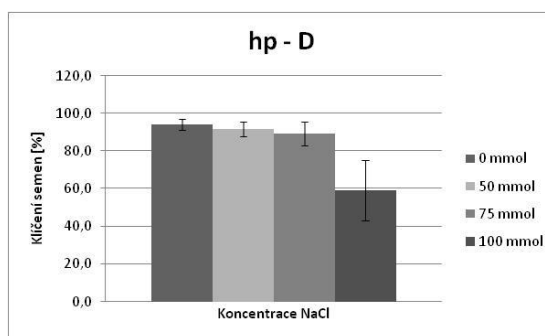
Na Petriho miskách kultivovaných pod modrým světlem klíčil cv. GT s vyšší inhibicí než ve tmě. Na mediu bez soli vyklíčilo 88 % semen. Se zvyšující se koncentrací NaCl se zvyšovala inhibice. V 50 mM koncentraci NaCl vyklíčilo 51 % semen. V 75mM koncentraci NaCl se inhibice více než dvakrát zvýšila, klíčilo 20 % semen. Podobně tomu bylo i ve 100mM koncentraci NaCl, kde byla 18% klíčivost (Graf 15).

V mediu bez NaCl v modrém světle vykazovala semena *hp* 87% klíčivost. Semena klíčící v 50mM koncentraci měla klíčivost 61 %. V 75 mM NaCl vyklíčilo 29 % semen. Nejvyšší inhibice se projevila ve 100mM koncentraci NaCl, kde klíčilo 6% semen (Graf 16).

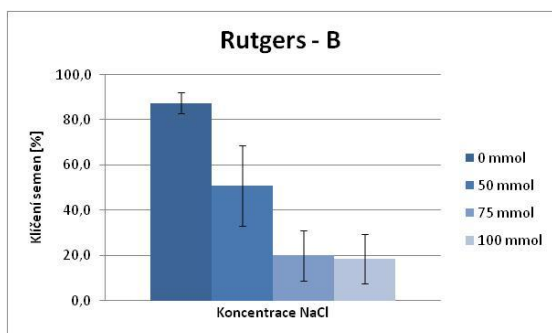
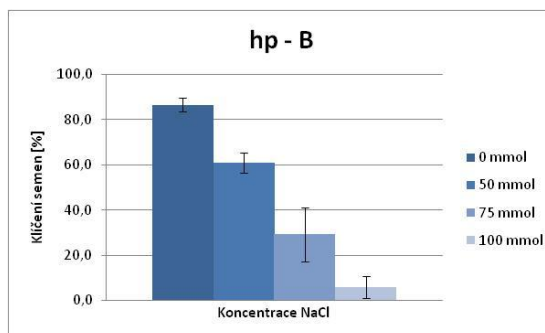
Pod červeným světlem v mediu bez NaCl vzešlo 90 % semen cv. GT. Již v 50mM koncentraci NaCl se projevila vysoká inhibice, vyklíčilo zde 33 % semen. Silná inhibice se projevila již v 75 mM, kde klíčilo 18 % semen a ve 100 mM NaCl jen 13 % semen (Graf 17).

Semena genotypu *hp* v červeném světle bez NaCl vykazovala 93% klíčivost. Při klíčení v 50 mM vzešlo 81 % semen. Ve vyšších koncentracích byla semena silně zainhibována. V 75mM koncentraci vyklíčilo 38 % semen a ve 100mM koncentraci 12 % semen (Graf 18).

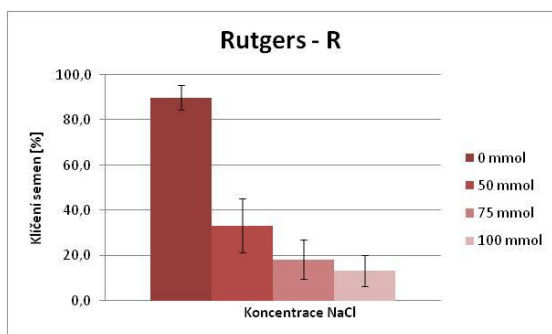
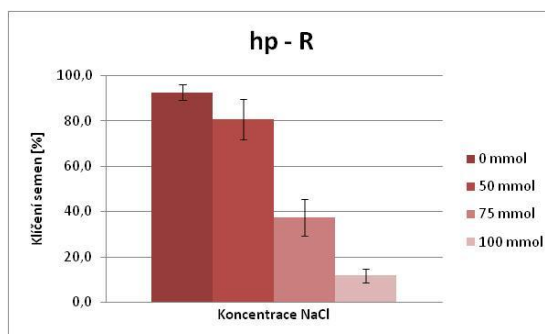
Graf 13: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v D

Graf 14: Průměrná klíčivost *hp* v D

Graf 15: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v B

Graf 16: Průměrná klíčivost *hp* v B

Graf 17: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v R

Graf 18: Průměrná klíčivost *hp* v R

4.2. Klíčení semen v přítomnosti mannitolu

Semena cv. MM kultivovaná na médiu bez mannitolu ve tmě klíčila z 98 %. Semena pěstovaná na Petriho miskách s 50 mM mannitolu klíčila z 96 % semen. Slabé snížení klíčivosti na 82 % se projevilo se 100 mM mannitolu. Silně zainhibovaná semena byla na médiu se 150 mM mannitolu, kde klíčilo 32 % semen (Graf 19).

Semena genotypu *fri* vykazovala obdobnou inhibici klíčení jako WT. Na médiu bez mannitolu ve tmě byla klíčivost 98 %. Slabý pokles klíčení se projevil s 50 mM, kdy vyklíčilo 85 % semen. Ve 100mM koncentraci mannitolu klíčilo 88 % semen. Silná inhibice klíčení se projevila ve 150 mM mannitolu. Vyklíčilo 41 % semen (Graf 20).

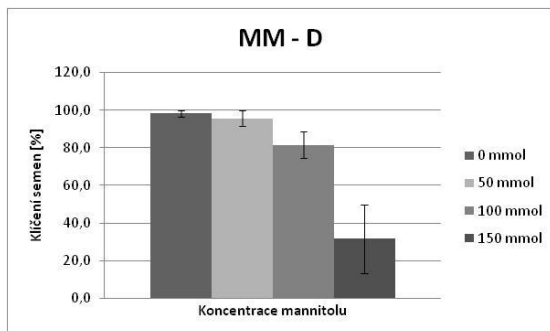
Na médiu bez mannitolu na modrém světle byla klíčivost semen cv. MM 74%. Hned v 50mM koncentraci mannitolu se projevila silná inhibice klíčivosti s 32 % vyklíčených semen. Ve 100 mM mannitolu klíčilo už jen 21 % semen. Nejvyšší inhibice byla pozorována na Petriho miskách se 150 mM mannitolu, kde vyklíčily 3 % semen (Graf 21).

Semena *fri* byla na inhibici zvýšenými koncentracemi mannitolu podobně citlivá jako WT. V médiu bez mannitolu v modrém světle vyklíčilo 89 % semen. Na Petriho miskách s 50 mM mannitolu vzešlo 47 % semen. Další inhibice byla zaznamenána na médiu se 100mM koncentrací, kde vyklíčilo 20 % semen. Nejsilnější inhibice se 2 % vyklíčených semen byla na ve 150mM koncentraci mannitolu (Graf 22).

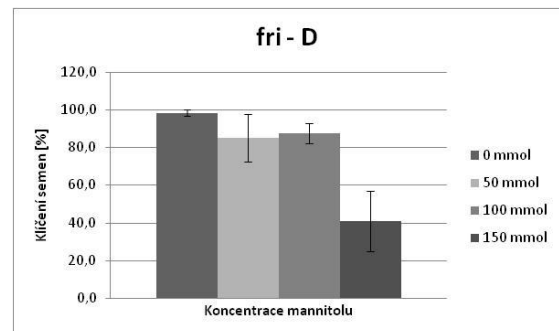
Semena cv. MM kultivovaná na médiu bez mannitolu na červeném světle klíčila z 98 %. V 50mM koncentraci mannitolu vyklíčilo 73 % semen. Vysoká inhibice klíčivosti se projevila na médiu se 100 mM mannitolu, kde vyklíčilo 36 % semen. Ještě silněji byla zainhibována klíčivost na médiu se 150 mM mannitolu s 17% klíčivostí (Graf 23).

Na médiu bez mannitolu na červeném světle vyklíčilo 98 % semen *fri*. Na Petriho miskách s 50 mM koncentrací mannitolu vyklíčilo 76 % semen. Klíčivost semen na médiu se 100 mM mannitolu byla 40%. Semena na médiu se 150 mM byla silně zainhibována. Vyklíčilo jen 10 % semen (Graf 24).

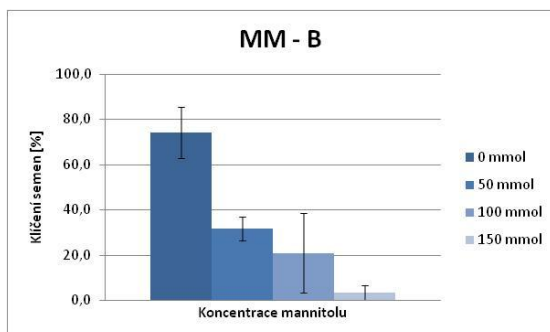
Graf 19: Průměrná klíčivost cv. MM v D



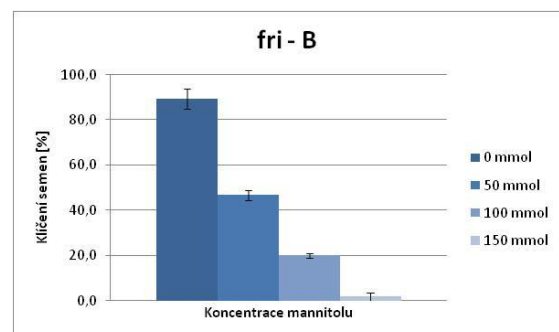
Graf 20: Průměrná klíčivost *fri* v D



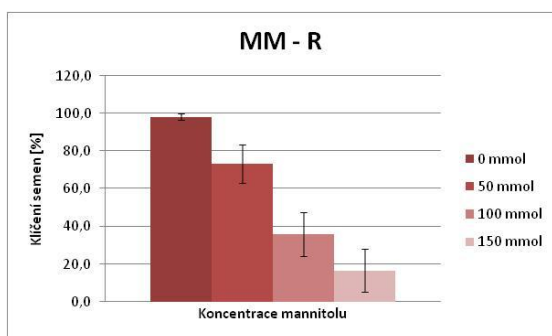
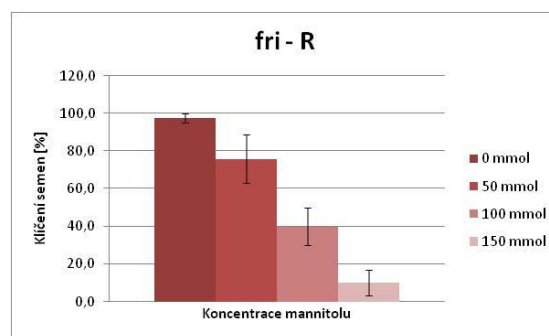
Graf 21: Průměrná klíčivost cv. MM v B



Graf 22: Průměrná klíčivost *fri* v B



Graf 23: Průměrná klíčivost cv. MM v R

Graf 24: Průměrná klíčivost *fri* v R

Semena cv. GT klíčící ve tmě na médiu bez mannitolu vyklíčila z 92 %. Na médiu s 50 mM mannitolu vyklíčilo 86 % semen. V Petriho miskách se 100mM koncentrací mannitolu vzešlo 74 % semen. Semena na médiu se 150mM koncentrací mannitolu vyklíčila ze 48 % (Graf 25).

Ve tmě na médiu bez mannitolu klíčila semena *tri1* z 98 %. Na médiu s 50 mM koncentrací mannitolu byla klíčivost 90%. Na petriho miskách se 100 mM mannitolu vyklíčilo 73 % semen. Na médiu se 150 mM mannitolu se projevila vysoká inhibice klíčení. Vzešlo 31 % semen (Graf 26).

Semena cv. GT kultivovaná Petriho miskách na modrém světle bez mannitolu byla 76% klíčivost. Zvýšená inhibice klíčení se projevila již na médiu s 50 mM mannitolu, kde vyklíčilo 48 % semen. Silně zainhibovaná byla semena klíčící na médiích se 100 mM mannitolu, kde vyklíčilo 7 % semen, i na médiu se 150 mM mannitolu, kde vyklíčila 2 % semen (Graf 27).

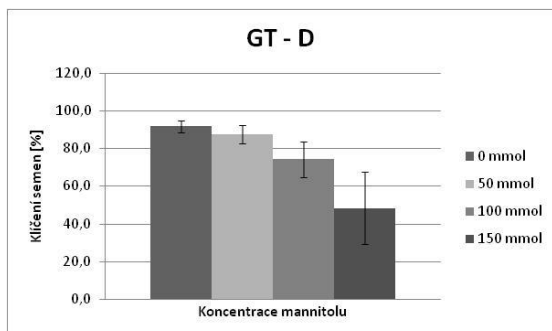
Na médiu kultivovaném na modrém světle bez mannitolu klíčila semena *tri1* z 89 %. Na médiu s 50 mM mannitolu se projevila zvýšení inhibice klíčení. Vyklíčilo 51 % semen. Velmi vysoká inhibice klíčivosti byla u Petriho misek se 100mM koncentrací mannitolu, kde vyklíčilo 8 % semen, i 150mM koncentrací mannitolu, kde vyklíčilo 1 % semen (Graf 28).

Semena cv. GT kultivovaná na médiu bez mannitolu na červeném světle vyklíčila z 92 %. V 50mM koncentraci mannitolu vyklíčilo 70 % semen. Na médiu se 100mM koncentrací mantilolu byla semena silně zainhibovaná. Vyklíčilo 28 % semen. Na Petriho miskách se 150 mM mannitolu byla klíčivost skoro úplně zainhibována. vyklíčila jen 3 % semen (Graf 29).

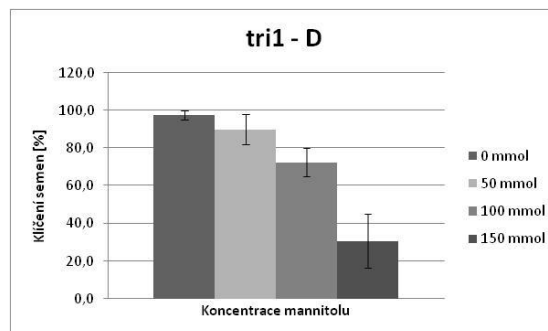
Na Petriho miskách bez mannitolu na červeném světle vyklíčilo 96 % semen *tri1*. Na médiu s 50mM koncentrací mannitolu vyklíčilo 82 % semen. Zvýšená inhibice klíčení

se projevovala na médiu se 100mM koncentrací mannitolu, kde vzklíčilo 18 % semen. Průměrná klíčivost 8 % byla na médiu se 150 mM mannitolu (Graf 30).

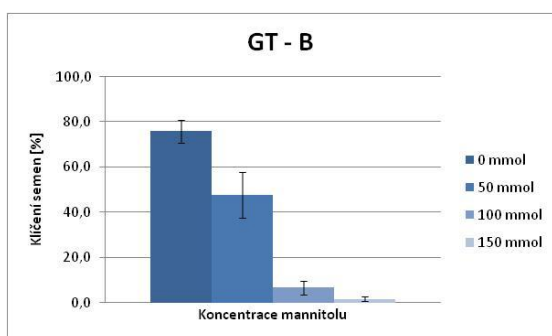
Graf 25: Průměrná klíčivost cv. GT v D



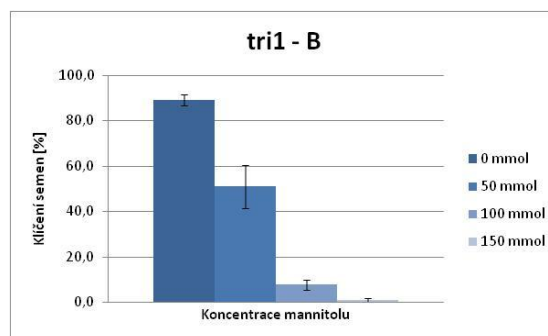
Graf 26: Průměrná klíčivost *tri1* v D



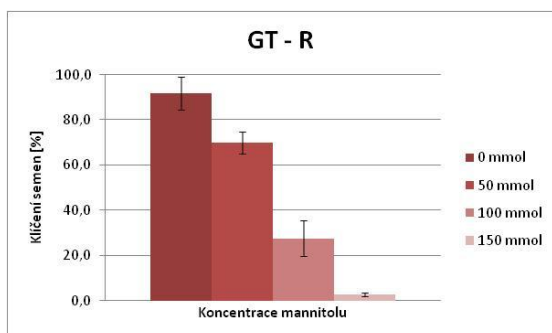
Graf 27: Průměrná klíčivost cv. GT v B



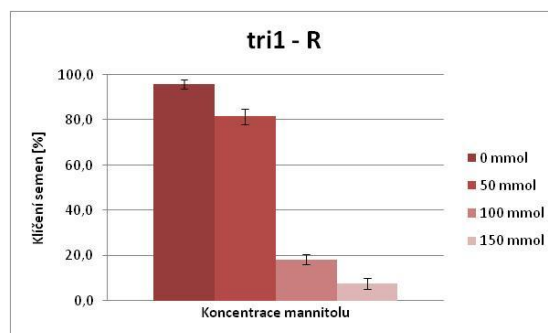
Graf 28: Průměrná klíčivost *tri1* v B



Graf 29: Průměrná klíčivost cv. GT v R



Graf 30: Průměrná klíčivost *tri1* v R



Klíčovost semen cv. Rutgers kultivovaných ve tmě bez mannitolu byla 98 %. Na Petriho miskách s 50 mM mannitolu průměrně vyklíčilo 95 % semen. Semena kultivovaná v přítomnosti 100 mM mannitolu klíčila z 88 %. Slabší zvýšení inhibice se projevilo jen na médiu se 150mM koncentrací mannitolu, kde vyklíčilo 73 % semen (Graf 31).

Na Petriho miskách se semeny *hp*, kultivovaných ve tmě bez mannitolu, vyklíčilo 99 % semen. V přítomnosti 50 mM mannitolu klíčilo 97 % semen. I na médiu se 100mM koncentrací mannitolu se projevovala vysoká klíčivost. Vzešlo 98 % semen. Stále vysoká

klíčivost byla pozorována i na médiu se 150 mM mannitolu, kde vyklíčilo 86 % semen (Graf 32).

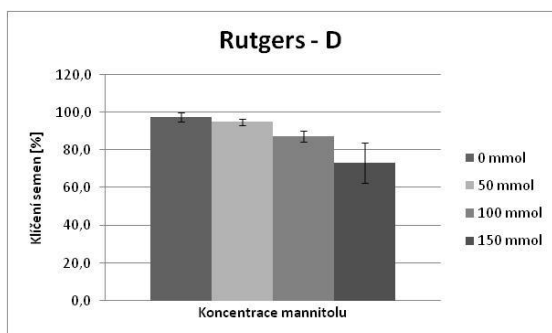
Semena cv. Rutgers kultivovaná na modrém světle na médiu bez mannitolu vyklíčila z 94 %. Na Petriho miskách s médiem s 50 mM mannitolu vyklíčilo 83 % semen. Silná inhibice klíčení se projevila na médiu se 100mM koncentrací mannitolu, kde vyklíčilo 35 % semen. Velmi silná inhibice s klíčivostí 3 % byla pozorována na médiu se 150 mM mannitolu (Graf 33).

Semena *hp* na médiu bez mannitolu na modrém světle klíčila z 89 %. Na médiu s 50mM koncentrací mannitolu vyklíčilo 90 % semen. Inhibice klíčení se projevila na médiu se 100mM koncentrací mannitolu, kde vyklíčilo 64 % semen. Nejvyšší inhibice byla pozorována na médiu se 150 mM mannitolu s 5% klíčivostí (Graf 34).

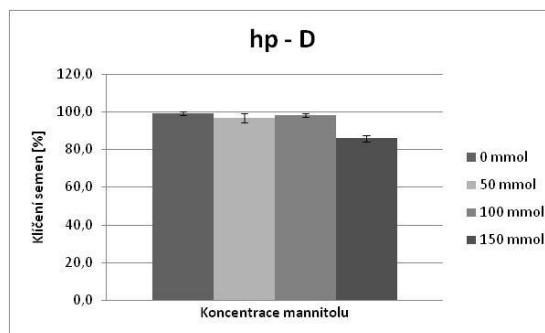
Na červeném světle na médiu bez mannitolu vyklíčilo 93 % semen cv. Rutgers. Semena kultivovaná na médiu v přítomnosti 50 mM mannitolu klíčila z 83%. Zvýšená inhibice klíčení byla pozorována na Petriho miskách se 100mM koncentrací mannitolu, kde klíčilo 52 % semen. Semena klíčící na médiu se 150 mM mannitolu byla silně zainhibována. Vyklíčilo 12 % semen (Graf 35).

Semena *hp* kultivovaná na médiu bez mannitolu na červeném světle klíčila z 93 %. Klíčivost semen v přítomnosti 50 mM mannitolu byla 95%. Ve 100mM koncentraci mannitolu byla pozorována klíčivost 74 %. Značná inhibice se projevila na médiu se 150 mM mannitolu, kde vyklíčilo 29 % semen (Graf 36).

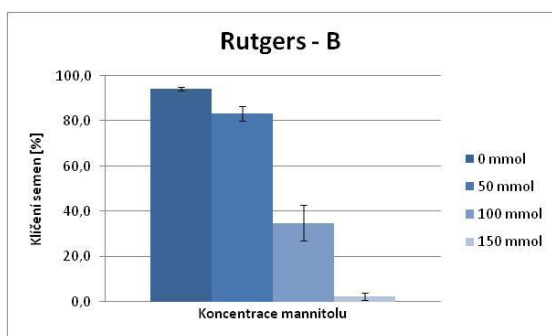
Graf 31: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v D



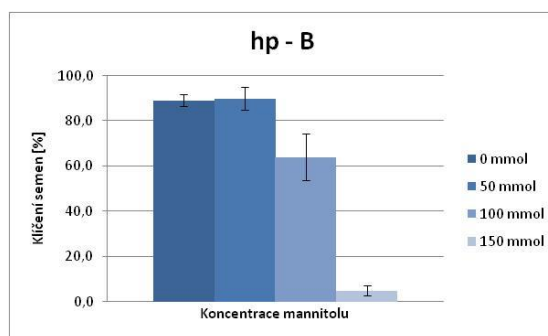
Graf 32: Průměrná klíčivost *hp* v D



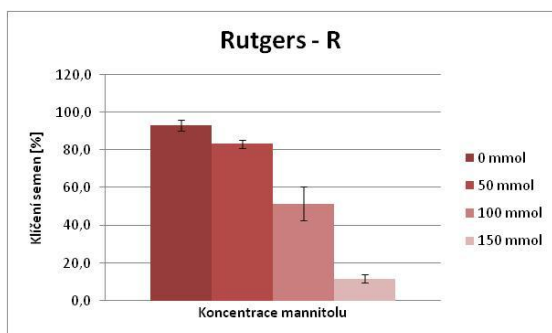
Graf 33: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v B



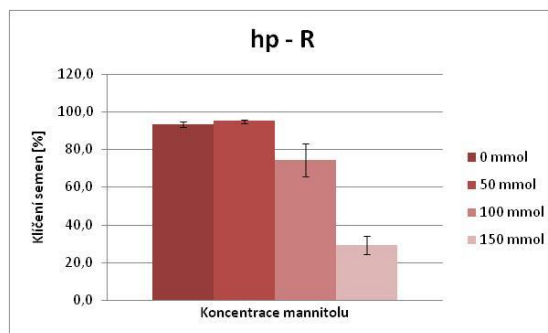
Graf 34: Průměrná klíčivost hp v B



Graf 35: Průměrná klíčivost cv. Rutgers v R



Graf 36: Průměrná klíčivost hp v R



5. DISKUZE

Tato bakalářská práce se zabývá studiem inhibičního vlivu abiotických stresorů (NaCl a mannitol) na klíčivost semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Dále jsem sledoval, které fotoreceptory zprostředkují zesilující účinek světla na citlivost klíčení semen k zasolení a osmotickému stresu. K pokusům byly použity mutantní genotypy *fri*, *tri*¹ a *hp* s příslušnými kontrolními rostlinami Money Maker, GT a Rutgers. Semena byla kultivována na Petriho miskách s koncentrací 0 mM až 100 mM NaCl nebo 0 mM až 150 mM mannitolu.

Mutantní semena *fri* jsou PHYA deficientní. Jsou úplně nesenzitivní k FR, ale k R mají obvyklou odpověď. Tma a R aktivuje jejich klíčení, naopak B klíčení inhibuje (Kendrick et al., 1994); (Terry, 1997). V experimentech jsme zjistili, že modré světlo zvyšuje citlivost semen k NaCl u kontrolních rostlin cv. MM, nikoliv však u mutantu *fri*. Tento fakt naznačuje, že modré světlo zvyšuje citlivost semen rajčete k NaCl prostřednictvím fotoreceptoru PhyA. Klíčivosti semen cv. MM kultivovaných na mannitolu byly přibližně stejné jako u semen *fri*. Tohoto typu stresu vyvolaného se PHYA nezúčastňuje.

Mutant *tri*¹ je PHYB1 deficientní. Jeho odpověď k R je slabší než u WT (Kerckhoff et al., 1996). Naše experimenty ukázaly, že receptor PHYB1 snižuje sensitivitu k abiotickému stresu při klíčení. Snížená citlivost se projevovala ve tmě. V 75mM a 100mM koncentraci NaCl již nezáleželo na kvalitách světla a ve tmě, semena *tri*¹ byla skoro úplně inhibována. Fotoreceptor PHYB1 se nezapojuje do regulace citlivosti k osmotickému stresu, který je vyvolaný mannitolem. Klíčivost mutantních semen *tri*¹ a WT se shodovala.

Mutant *hp1* má zvýšenou fytochromovou odpověď. V práci R. Peterse et al. (1992) předpokládají, že produkt genu HP1 potlačuje transdukci světelného signálu. Dospělé rostliny mají v mladých i zralých listech dvojnásobné množství chlorofylu (mají větší chloroplasty) a karotenoidů ve zrajících plodech oproti WT (Cookson et al. 2003; Kerr, 1965).

Z našich experimentů vyplývá, že gen *HP1* zvyšuje citlivost k abiotickému stresu v přítomnosti NaCl ve tmě. Na modrém a červeném světle se projevovala jen slabě zvýšená citlivost k abiotickému stresu. Gen *HP1* pravděpodobně není zapojen do ovlivnění citlivosti k mannitolu. Na modrém a červeném světle byla pozorována mírně zvýšená citlivost k mannitolu.

Při pokusech K. N. Scorera (1985) se salátem (*Lactuca sativa* L. cv. *Grand Rapids*) nemá NaCl vliv na fotokonverzi Pr na Pfr v přítomnosti červeného světla, ale naznačuje, že ovlivňuje reakce, ke kterým dochází před klíčením. Nedostatek vody v rostlině vyvolaný

osmotickým stresem prodlužuje dobu potřebnou, kterou potřebuje rostlina k úniku z fytochromové kontroly a může indukovat reakci mezi Pfr a jeho primárním receptorem.

6. ZÁVĚR

V této bakalářské práci jsem se zabýval studiem inhibičního vlivu abiotických stresorů (NaCl a mannitol) na klíčivost semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). NaCl nebo mannitol vyvolává osmotický stres, který inhibuje klíčení. Dříve bylo zjištěno, že vliv abiotických stresů na růst a vývoj rostlin je ovlivňován světlem. Cílem této práce bylo zjistit, jak a prostřednictvím kterých fotoreceptorů modré a červené světlo ovlivňuje citlivost klíčení semen rajčete k osmotickému stresu a zasolení. K těmto pokusům byl použit mutantní genotyp rajčete *fri* s deficientním fytochromem A, mutantní genotyp *tri1* s deficientním fytochromem B1 a mutantní genotyp *hpl* se zvýšenou fytochromovou odpovědí. Semena byla kultivovaná na médiích s různou koncentrací NaCl nebo mannitolu na modrém a červeném světle a ve tmě. Výsledky provedených experimentů vedly k závěru, že fotoreceptor fytochrom A (PhyA) zvyšuje citlivost k abiotickému stresu vyvolanému NaCl na modrém světle. Na médiích s mannitolem nebylo pozorováno ovlivnění PhyA. Fotoreceptor fytochrom B1 (PhyB1) snižuje citlivost k abiotickému stresu vyvolanému NaCl ve tmě a částečně na červeném světle. Na médiích s mannitolem nebylo ovlivnění citlivosti pozorováno. Gen *HPI* se zapojuje do zvýšení citlivosti k abiotickému stresu z NaCl ve tmě. Na červeném a modrém světle byla pozorována slabě zvýšená citlivost k abiotickému stresu. Na rozdíl od NaCl, *HPI* není pravděpodobně zapojen ve světle ovlivňované citlivosti k mannitolu.

Různé fytochromy mají různý vliv na změnu citlivosti k abiotickému stresu. V přítomnosti NaCl fytochrom A zvyšuje citlivost ke stresu, gen *HPI* zvyšuje citlivost ke stresu jen ve tmě fytochrom B1 citlivost naopak snižuje. Výše zmíněné geny se nezapojují do regulace abiotického stresu z mannitolu.

7. ZDROJE

Bakrim N., Meier S., Batschauer A., Galland P., Bittl R. et Ahmad M. (2007): Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated through Interconversion of Flavin Redox State. – *Journal of Biological Chemistry*, 282 (13): 9383-9391.

Bewley J. D. (1997): Seed Germination and Dormancy. – *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Bouly J. P., Schleicher E., Dionisio-Sese M., Vandebussche F., Van Der Straeten D., Bray, E.A. (1997). Plant responses to water deficit. – *Trends in Plant Science* 2:48-54.

Buitink J. et Leprince O. (2004): Glass formation in plant anhydrobiotes: survival in the dry state. – *Cryobiology*, 48: 215-228.

Chen M., Song J., Wang B-S. (2010): NaCl increases the activity of plasma membrane H⁺-ATPase in C3 halophyte *Suaeda salsa* callus. – *Acta Physiol Plant*, 32:27-36.

Chen T. et Murata N. (2002): Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes. – *Current Opinion in Plant Biology*, 5:250-257.

Cookson P. J Kiano J. W., Shipton C. A., Fraser P. D., Romer S., Schuch W., Bramley P. M., Pyke K. A. (2003): Increases in cell elongation, plastid compartment size and phytoene synthase activity underlie the phenotype of the high pigment-1 mutant of tomato. – *Planta* 217: 896–903.

Grennen A.K. (2007): The Role of Trehalose Biosynthesis in Plants. – *Plant Physiology* 144: 3-5.

Goyal K., Walton L. J., Tunnacliffe A. (2005): LEA proteins prevent protein aggregation due to water stress. – *Biochem. J*, 388: 151-157.

Grover A., Kapoor A., Lakshmi O.S., Agarwal S., Sahi C., Katiyar-Agarwal S., Ararwal M., Dubey H. (2001): Understanding molecular alphabets of the plantabiotic stress responses. – Current science, Vol. 80, No. 2: 206-216.

Guzmfin P, Ecker J. R. (1990): Exploiting the triple response of *Arabidopsis* to identify ethylene-related mutants. – Plant Cell 2: 513-523.

Hasegawa, P.M., Bressan, R.A., Zhu, J.-K., Bohnert, H.J. (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. – Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology 51: 463-499.

Huang Y., Baxter R., Smith B. S., Partch C. L., Colbert C. L. et Deisenhofer J. (2006): Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. – PNAS, 103 (47): 17701-17706.

Jones M. A. et Christie J. M. (2008): Phototropin receptor kinase activation by blue light. – Plant Signaling & Behavior, 3(1): 44-46.

Kaiserli E., Sullivan S., Jones M. A., Feeney K. A. et Christie J.M. (2009): Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of *Arabidopsis* Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light. – The Plant Cell, 21: 3226-3244.

Keith N. Scorer B. L. Epel, Waisel Y. (1985): Interactions between Mild NaCl Stress and Red Light during Lettuce (*Lactuca sativa* L. cv Grand Rapids) Seed Germination – Plant Physiol. 79, 149-152

Kempf, B., Bremer, E. (1998): Uptake and synthesis of compatible solutes as microbial stress responses to high-osmolality environments. – Arch Microbiol., 170: 319-30.

Kendrick R. E., Kerckhoffs L. H. J., Van Tuinen A., Koornneef M. (1997): Photomorphogenic mutants of tomato – Plant, Cell and Environment 20: 746-751.

Kerckhoffs L. H. J., Van Tuinen A., Hauser B. A., Cordonnier-Pratt M.- M., Nagatani A., Koornneef M., Pratt L. H. et Kendrick R. E. (1996): Molecular analysis of

tri-mutant alleles in tomato indicates the *Tri* locus is the gene encoding the apoprotein of phytochrome B1 – *Planta* 199:152-157.

Kerckhoffs L. H. J., Sengers M. M. T., Kendrick R. E. (1997): Growth analysis of wild-type and photomorphogenic-mutant tomato plants. – *Physiologia Plantarum*, 99: 309-315.

Kerr E. A. (1965): Identification of high pigment, hp, tomatoes at the seedling stage. *Can J Plant Sci* 45:104–105.

Kinoshita T., Doi M., Suetsugu N., Kagawa T., Wada M., Shimazaki K. (2001): Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. – *Nature* 414(6864): 656-660.

Kucera B., Cohn M. A. et Leubner-Metzger G. (2005): Plant hormone interactions during seed dormancy and release and germination. – *Seed Science Research*, 15: 281-307.

Lichtenthaler H.K. (1998): The Stress Concept in Plants: An Introduction. – *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851: 187–198.

Levitt J. (1972): Responses of Plants to Environmental Stresses. – Academic Press. New York, 177: 786.

Luštinec J. et Žárský V. (2005): Úvod do fyziologie vyšších rostlin. – Karolinum, Praha, 261p.

Matsuoka D. et Tokutomi S. (2005): Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. – *PNAS*, 102 (37): 13337-13342.

Müller J., Aeschbacher R.A., Wingler A., Boller T., Wiemken A. (2001): Trehalose and Trehalase in *Arabidopsis* - *Plant Physiology*, 125: 1086–1093.

Munns, R. (2002). Comparative physiology of salt and water stress. – *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.

Murashige T. et Skoog A. (1962): A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – *Physiol Plant*, 15: 473-497.

Pavlová L. (2005): Fyziologie rostlin. – Karolinum, Praha, 253 p.

Peters J. L., Schreuder M. E. L., Verduin S. J. W., Kendrick R. E. (1992): Physiological characterization of a high-pigment mutant of tomato. – *Photochemistry and Photobiology* 56: 75-82.

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998): Fyziologie rostlin. – Academia, Praha, 484 p.

Reed J. W., Nagatani A., Elich T. D., Fagan M. et Chory J. (1994): Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in Arabidopsis Development. – *Plant Physiology*, 104: 1139-1149.

Sang Y., Li Q. H., Rubio V., Zhang Y. C., Mao J., Deng X. W. et Yang H. Q. (2005): N-Terminal Domain-Mediated Homodimerization Is Required for Photoreceptor Activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. – *The Plant Cell*, 17: 1569-1584.

Schäfer E. et Nagy F. (2006): Photomorphogenesis in plants and bacteria, 3rd ed. – Springer, Dordrecht, 662 p.

Shen B., Jensen R. G., Bohnert H. J. (1997) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants by targeting mannitol biosynthesis to chloroplasts. – *Plant Physiology* 113: 1177-1183.

Stoop, J.M.H., Williamson, J.D., Pharr, D.M. (1994). Mannitol metabolism in celery stressed by excess macronutrients. – *Plant Physiol.* 106: 503-511.

Stoop J. M. H., Williamson J. D., Pharr D. M. (1996): Mannitol metabolism in plants: a method for coping with stress. - *Trends in Plant Science*, Vol.1, No.5: 139-144.

Taiz L. et Zeiger E. (2006): *Plant physiology*, 4th Ed. – Sinauer Associates, Inc., USA, 623 p.

Tatematsu K., Nakabayashi K., Kymiya Y. et Nambara E. (2008): Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. – *The Plant Journal*, 53: 42-52.

Terry M. J. (1997): Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment* 20: 740-745.

Tuinen A., Kerckhoffs L. H. J., Nagatani A., Kendrick R. E., Koornneef M. (1995): Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficient mutants of tomato. *Molecular and General Genetics* Vol. 246 No. 2: 133-141.

Tuinen A., Kerckhoffs H. J., Nagatani A., Kendrick R. E., Koornneef M. (1995): A Temporarily Red Light- Insensitive Mutant of Tomato Lacks a Light-Stable, B-Like Phytochrome. - *Plant Physiol.* (1995) 108: 939-947.

Voetberg, G.S., Sharp, R.E. (1991). Growth of the maize primary root at low water potentials. – *Plant Physiol.* 96: 1125-1130.

Xu P., Xiang Y., Zhu H., Xu H., Zhang Z., Zhang C., Zhang L. et Ma Z. (2009): Wheat Cryptochromes: Subcellular Localization and Involvement in Photomorphogenesis and Osmotic Stress Responses. – *Plant Physiology*, 149: 760-774.

Yu X., Klejnot J., Zhao X., Shalitin D., Maymon M., Yang H., Lee J., Liu X., Lopez J. et Lin C. (2007): Arabidopsis Cryptochrome 2 Completes Its Posttranslational Life Cycle in the Nucleus. – *The Plant Cell*, 19: 3146-3156.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ATP	adenosintrifosfát
AtTPS1	mutant <i>A. thaliana</i> trehalosa-6-fosfát synthasa 1
<i>au</i>	aurea
BL	modré světlo
COP1	constitutive photomorphogenesis 1
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
CRY1	kryptochrom 1
CRY2	kryptochrom 2
CRY3	kryptochrom 3
cv. GT	kultivar rajčete
cv. MM	kultivar Money Maker
cv. Rutgers	kultivar Rutgers
D	tma
DASH	<i>Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, human</i>
DW	dry weight - sušina
EODFR	end of day far red light – dlouhovlnné červené světlo před setměním
FAD	flavinadeninukleotid
FADH	flavinadeninukleotid redukovaný
FMN	flavin mononukleotid
FR	dlouhovlnné červené světlo
<i>FRI</i>	far red insensitive
FW	fresh weight – čerstvá hmotnost
<i>HP</i>	high pigment
hy4	hypocotyl 4, bývalé označení mutanta cry1
LEA	Late Embryogenesis Abundant
LOV1	light-oxygen-voltage 1
LOV2	light-oxygen-voltage 2
MES	2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina (pufř)
MS medium	Murashige a Skoog médium
NaCl	chlorid sodný

Pfr	forma fytochromu absorbující far-red (aktivní)
PHOT1	fototropin 1
PHOT2	fototropin 2
PHR	doména příbuzná fotolyázám
PHY A-E	fytochrom A-E
Pr	forma fytochromu absorbující červené světlo (neaktivní)
R	červené světlo
Ser	serin
Thr	threonin
TPS	trehalosa-6-fosfat synthasa
<i>TRI</i>	temporary red insensitive
UV	ultrafialové záření
UV-A	320-400 nm UV
UV-B	280-320 nm UV
VIS	viditelné světlo pro lidské oko
WT	wild type, kontrolní rostlina
XET	xyloglukanendotransglykáza
<i>yg2</i>	yelow-green