

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

2018

Tereza Mičkerová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Biologická aktivita aminokyselinových konjugátů kyseliny
abscisové**

Bakalářská práce

Tereza Mičkerová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

OLOMOUC 2018

Vedoucí práce: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně, s použitím citovaných zdrojů, pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.

.....

V Olomouci, dne

.....

Podpis

Poděkování

Velké poděkování patří především vedoucímu bakalářské práce, prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D, za odborné vedení, konzultace a poskytování cenných rad během vypracovávání celé mé bakalářské práce. Také bych chtěla poděkovat své rodině za velkou podporu po celou dobu studia.

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Tereza Mičkerová
Název práce	Biologická aktivita aminokyselinových konjugátů kyseliny abscisové (ABA-AA)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Kyselina abscisová (ABA) je stresový rostlinný hormon, který inhibuje klíčení semen. V předložené bakalářské práci byly testovány účinky aminokyselinových konjugátů ABA (ABA-AA) na klíčení semen rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré světlo). Konkrétně se jednalo o konjugáty ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr a ABA-Tyr syntetizované v Laboratoři růstových regulátorů. Účinky ABA-AA byly testovány v podmínkách *in vitro* na genotypech cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* se sníženou citlivostí k modrému světlu.

Inhibiční efekt ABA-AA byl pozorován u ABA-Val, ABA-Gly a ABA-Tyr. Genotyp *7B-1* vykazoval nižší citlivost než cv. Rutgers k ABA-Val a ABA-Gly. Zároveň bylo zjištěno, že na modrém světle byl inhibiční účinek ABA-AA vždy silnější než ve tmě. To lze vysvětlit pomalejším poklesem hladiny ABA při klíčení v semenech inkubovaných na modrém světle.

Klíčová slova	ABA, aminokyselinové konjugáty, mutant <i>7B-1</i> , klíčení, rajče jedlé, <i>Solanum lycopersicum</i> L. světlo
Počet stran	42
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:

Author's first name and surname	Tereza Mičkerová
Title of thesis	Biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid (ABA-AA)
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Abscisic acid (ABA) is a stress plant hormone that inhibits germination of seeds. In the submitted bachelor thesis were tested effects of amino acid conjugates (ABA-AA) on germination of tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L.) depending on the lighting conditions (dark, blue light). Specifically were tested effect of ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr and ABA-Tyr, synthesized in Laboratory of growth regulators. Effects of ABA-AA were tested *in vitro* on genotypes cv. Rutgers (WT) and mutant *7B-1* which has a reduced sensitivity to a blue light.

Inhibition effect of ABA-AA was observed at ABA-Val, ABA-Gly and ABA-Tyr. Genotype *7B-1* showed lower sensitivity than cv. Rutgers to ABA-Val and ABA-Gly. Also was found that inhibition effect was always stronger in the blue light than in the dark. This can be explained by a slower decrease of ABA level during seed germination in the blue light.

Keywords	ABA, amino acid conjugates, germination, light, mutant <i>7B-1</i> , tomato,
Number of pages	42
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

OBSAH

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:	2
BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:	3
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1. Kyselina abscisová (ABA)	9
2.1.1. Chemická struktura ABA.....	9
2.1.2. Biosyntéza ABA.....	10
2.1.3. Metabolismus ABA	12
2.1.4. Signální dráha ABA.....	13
2.2. Konjugáty ABA	14
2.3. Světlo	15
2.3.1. Receptory světla	16
2.4. Interakce ABA a světla	19
3 MATERIÁL A METODY	21
3.1. Rostlinný materiál	21
3.2. Pracovní postupy	21
3.2.1. Příprava kultivačního média Murashige and Skoog (MS)	21
3.2.2. Sterilizace a výsev semen	22
4 VÝSLEDKY	23
4.1. Výsledky s ABA	23
4.2. Klíčivost semen v přítomnosti ABA-Val	25
4.3. Reakce klíčení semen k ABA-Phe	26
4.4. Výsledky s ABA-Gly	28
4.5. Výsledky s ABA-Thr	29
5 DISKUZE	32
6 ZÁVĚR	35
POUŽITÁ LITERATURA	36
SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	41

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Klíčení představuje jeden ze základních dějů pro růst a vývoj rostliny a je ovlivňováno celou řadou vnějších i vnitřních faktorů. Mezi nejvýznamnější vnější faktory ovlivňující klíčení rostlin patří voda, nezbytná pro zbobtnání semen, přítomnost kyslíku uplatňujícího se při oxidační fosforylaci, teplota a světlo (Procházka et al., 1998). Důležitými vnitřními faktory ovlivňující klíčení jsou například rostlinné hormony, jako je ABA, která inhibuje klíčení, nebo gibberelliny, které klíčení stimulují (Procházka et al., 1998). Předložená bakalářská práce je věnována právě kyselině abscisové (ABA), konkrétně aminokyselinovým konjugátům ABA. Aminokyselinové konjugáty kyseliny abscisové jsou chemické sloučeniny, vznikající spojením aminokyseliny a molekuly ABA.

Semena rajčete klíčí velice dobře a ve většině případů ke klíčení světlo nepotřebují. Naopak bylo zjištěno, že klíčivost semen rajčete je u většiny kultivarů redukována modrým světlem. K experimentům byl využit genetický přístup spočívající v analýze mutantů. Konkrétně byl použit mutant rajčete *7B-1*, který se vyznačuje sníženou citlivostí k modrému světlu a tím i tolerancí k inhibici klíčení indukované modrým světlem (Piterková et al., 2012). Dále vykazuje toleranci k abiotickým stresům, a to specificky na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002). Bylo rovněž zjištěno, že vegetativní části rostliny obsahují vyšší hladinu endogenní ABA ve srovnání s kontrolním kultivarem cv. Rutgers (Fellner et al., 2001).

Cílem bakalářské práce bylo otestovat v podmínkách *in vitro* biologickou aktivitu řady aminokyselinových konjugátů kyseliny abscisové (ABA-AA) pomocí biotestu klíčení semen rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), kultivaru cv. Rutgers a mutanta *7B-1* a určit, zda testované konjugáty svými vlastnostmi způsobují inhibici klíčení, podobně jako ABA, popřípadě stimulaci klíčení, či zda mají na klíčení semen rajčete nevýznamný vliv. Pro testování klíčivosti byly použity aminokyselinové konjugáty ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr, ABA-Tyr syntetizované v Laboratoři růstových regulátorů Dr. Astou Žukauskaitė. Současně byl studován vliv modrého světla na klíčení semen v přítomnosti konjugátů s cílem, zjistit, zda modré světlo ovlivňuje účinek konjugátů na klíčivost semen a současně, jakou úlohu v tomto procesu hraje funkční produkt genu *7B-1*, který zesiluje citlivost klíčení semen k modrému světlu.

Bakalářská práce byla vypracována v Laboratoři růstových regulátorů PřF Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1. Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová (ABA) je všudypřítomný rostlinný hormon vyšších cévnatých rostlin, tedy rostlin, které jsou přizpůsobeny životu na souši vytvořením cévních svazků, ve kterých se nacházejí vodivá pletiva.

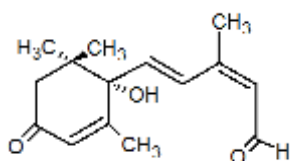
Přítomnost ABA však není závislá na existenci cévních svazků, neboť byla rovněž detekována také u mechorostů (*Bryophytae*), s výjimkou játrovek (*Marchantiophyta*), a to i přesto, že u mechorostů (*Bryophytae*) nenalezneme cévní svazky. ABA můžeme nalézt také u některých rodů hub, které vytvářejí ABA jako sekundární metabolit. V rámci celého rostlinného těla byla ABA detekována v každém orgánu či pletivu, od kořenové čepičky až po apikální meristém (Taiz and Zeiger, 2010).

ABA byla poprvé identifikována v roce 1963 a byly identifikovány její inhibiční vlastnosti. ABA je jedním z nejdůležitějších hormonů hrající roli ve stresu rostlin a v klíčových fyziologických procesech rostlin jako je pohyb průduchů rostlin, zrání plodů a odpovědi na biotický a abiotický stres, který představuje například sucho, zasolení a chlad. (Dong et al., 2015). ABA hraje klíčovou roli také při dormanci semen a jejich klíčení. ABA-deficientní nebo ABA-necitlivé mutantní rostliny vykazují předčasné klíčení a viviparózní fenotypy, kdy dochází ke klíčení rostlin ze semene přímo na mateřské rostlině. Tato skutečnost zdůrazňuje zásadní úlohu ABA při regulaci klíčení a dozrávání semen (Dong et al., 2015).

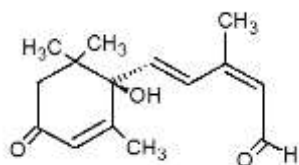
2.1.1. Chemická struktura ABA

ABA je isoprenoid skládající se z 15 uhlíků, který svou strukturou připomíná terminální část některých molekul karotenoidů. Na základě orientace karboxylové skupiny na druhém uhlíku molekuly ABA rozlišujeme dva druhy izomerie, a to *cis* a *trans* izomery ABA. Vzhledem ke skutečnosti, že téměř všechna přirozeně se vyskytující ABA nabývají *cis* konformace, odkazuje název *abscisic acid* podle dohodnuté konvence na *cis* izomer.

ABA patří mezi látky opticky aktivní (opticky otáčivé), které stáčí rovinu polarizovaného světla buď po směru hodinových ručiček (látky pravotočivé) nebo proti směru hodinových ručiček (látky levotočivé). Optická aktivita souvisí s přítomností asymetrického (chirálního) uhlíku v molekule. Jako chirální je označován uhlík, který má na každé ze svých čtyř chemických vazeb navázán jiný substituent, včetně vodíku. Tento asymetrický uhlík je v případě ABA umístěn na pozici 1' v cyklickém řetězci. Z toho vyplývá, že se vyskytuje ve formě izomerů S a R (+/-). Zatímco S enantiomer (Obr. 1) je přirozeně se vyskytující aktivní formou, R enantiomer (Obr. 2) je formou inaktivní a vyskytuje se ve stomech rostlin. Komerčně dostupná ABA je kombinací přibližně stejného množství S a R forem (Taiz and Zeiger, 2010).



Obrázek č. 1: Chemická struktura (S)-cis ABA. Vlastní tvorba, vytvořeno pomocí aplikace ChemSketch

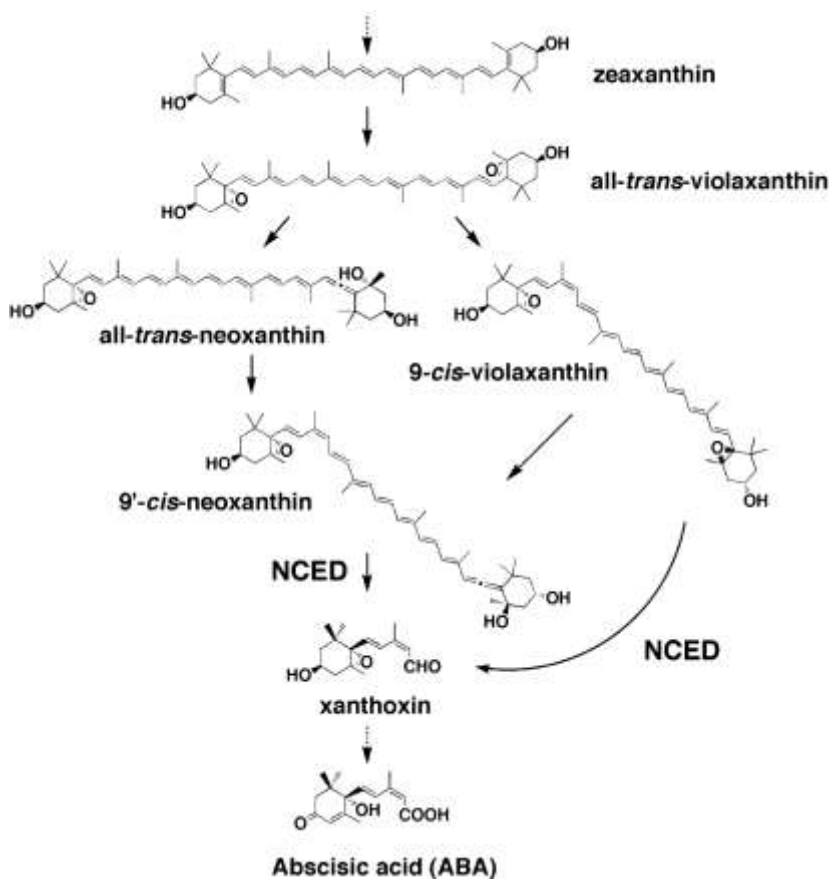


Obrázek č. 2: Chemická struktura (R)-cis ABA. Vlastní tvorba, vytvořeno pomocí aplikace ChemSketch

2.1.2. Biosyntéza ABA

ABA je syntetizována téměř ve všech buňkách obsahující chloroplasty nebo amyloplasty (Taiz and Zeiger, 2010). Biosyntéza ABA začíná biologickým isoprenem isopentenylidifosfát (IPP), který je zároveň prekurzorem fytohormonů cytokininů, gibberelinů a brassinosteroidů. IPP je primárně syntetizován v plastidech z glycerinaldehyd-3-fosfátu a pyruvátu, prostřednictvím dráhy methylethylerythritolfosfátu. Touto cestou dochází ke vzniku meziproduktů fytoenu a lykopenu. Lykopen podléhá

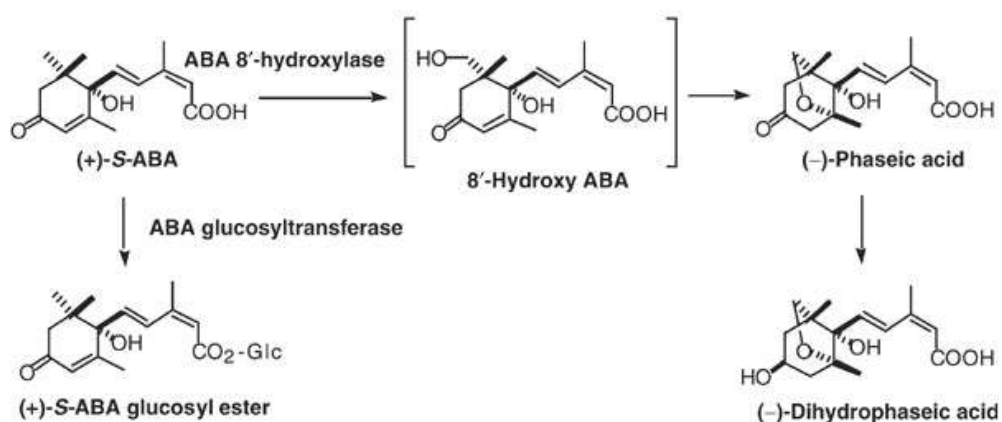
cyklizaci a hydroxylaci za vzniku zeaxanthinu, který je prvním oxidovaným karotenoidem. Dalším krokem je syntéza *trans*-violaxanthinu, která je katalyzována zeaxanthin epoxidasou (ZEP) a jeho následné převedení na *trans*-neoxanthin. Procesem izomerace je *trans*-neoxanthin převeden na 9'-*cis*-neoxanthin, který je pomocí klíčového enzymu NCED (označován také jako AtNCED) štěpen na xanthoxin, a převeden do cytosolu, kde se za účasti enzymu SDR a pomocí několika oxidativních reakcí mění na ABA-aldehyd. Poslední reakcí je reakce ABA-aldehydu s enzymem AAO, vedoucí ke vzniku ABA (Taiz and Zeiger, 2010; Dong et al., 2015; Seo et al., 2006).



Obrázek č. 3: Biosynтетická dráha kyseliny abscisové (převzato z Han et. al., 2004)

2.1.3. Metabolismus ABA

Metabolismus ABA je stejně jako biosyntéza mechanismus, který slouží ke kontrole její hladiny. Metabolismus ABA probíhá řadou chemických reakcí, jako je oxidace, redukce a konjugace a je nejčastěji uskutečňován dvěma cestami. První cestou je ABA hydroxylace zprostředkována monooxygenázami typu P450 a druhou cestou je konjugace ABA s glukózou zprostředkovaná glukosyltransferázami. Převládající hydroxylační cestou je 8'-hydroxylace, kdy hydroxylovaná ABA spontánně izomeruje na kyselinu faseovou (PA), která je v porovnání s ABA biologicky méně aktivní, a následně redukcí přechází na biologicky neaktivní kyselinu dihydrofaseovou (DPA). PA a DPA jsou nejhojnějšími katabolyty metabolické dráhy ABA. Během inaktivace volné ABA kovalentní konjugací s jinou molekulou, nejčastěji s glukózou, je nejběžnější konjugovanou formou glukosylester kyseliny abscisové (ABA-GE). Glukózová konjugace ovlivňuje fytohormonovou aktivitu ABA, její polaritu a buněčnou distribuci. ABA-GE se akumuluje ve vakuolách a apoplastickém prostoru, na rozdíl od volné ABA, která se syntetizuje v cytosolu (Kushiro et al., 2004; Dong et al., 2015)



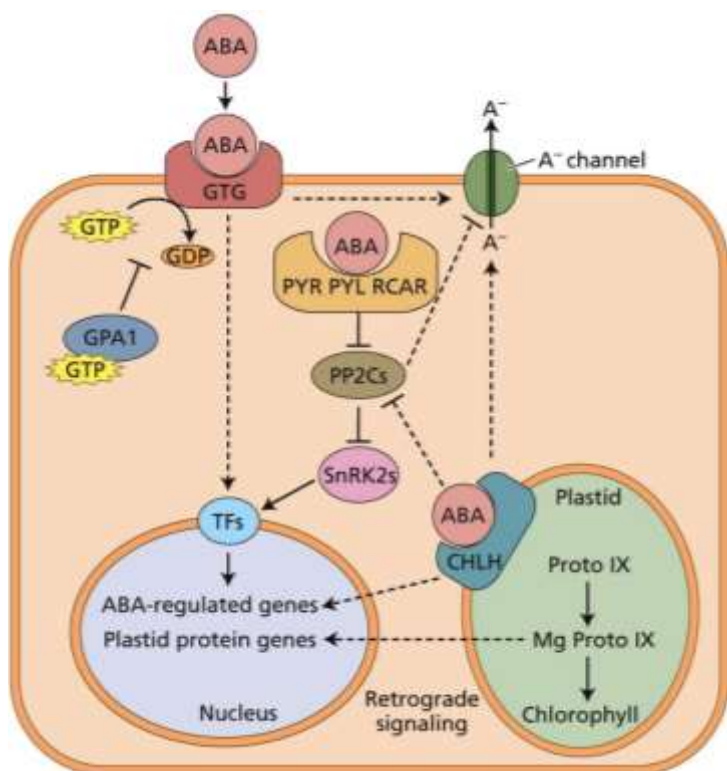
Obrázek č. 4: Metabolická dráha kyseliny abscisové (převzato z Kushiro et.al. 2004)

2.1.4. Signální dráha ABA

ABA se u rostlin podílí na reakcích způsobující krátkodobou a dlouhodobou odpověď. Rychlé reakce způsobující krátkodobou odpověď zahrnují změny rychlosti toku iontů přes membránu či regulaci některých genů. Skutečnost, že transkripční ABA-stimulované faktory regulují zavírání průduchů, dokazuje regulaci genů pomocí ABA krátkodobého fyziologického efektu (Taiz and Zeiger, 2010). Druhým typem reakcí jsou reakce způsobující dlouhodobou odpověď zahrnující zásadní změny v genové expresi, dormanci a klíčení či reakci na abiotický stres. V obou případech je signální dráha zesilována primárním signálem, který je generován v okamžiku interakce hormonu s jeho receptorem, avšak pro každou cestu je využíván jiný receptor (Taiz and Zeiger, 2010; Jones et al., 2013).

Receptory pro ABA mohou být rozpustné či vázané na membráně a v současné době jsou rozdělovány do tří základních skupin, zahrnující na plazmatické membráně lokalizované G proteiny GTG1 a GTG2, na plastidech lokalizovaný enzym, koordinující jádro s plastidovou signalizací a v cytosolu se vyskytující ligandy vážící proteiny START (steroidogenic acute regulatory protein-related lipid-transfer) nadřazené domény (Jones et al., 2013; Taiz and Zeiger, 2010). ABA percepce a signalizace je kontrolována skrz navázání na receptory pyrabactinové resistance (PYR/PYL/RCAR), označující se zkráceně PYL (Takeuchi et al., 2015; Ma et al., 2009; Park et al., 2009), které patří do skupiny START, zahrnující 14 členů (PYR1 a PYL 1-13) rozdělených do 2 základních podskupin dimerních receptorů (PYR1 a PYL1-3) a monomerních receptorů (PYL4-12). Díky vazbě ABA mohou dimerní receptory disociovat v monomerní, a poté zahajují uzavření mobilní smyčky, která vytváří kapsu pro navázání ligandu. V přítomnosti ABA tyto receptory zvyšují schopnost vazby na protein A fosfatázy, typu 2Cs (PP2C) a poté inhibují aktivitu fosfatáz, včetně ABI1, ABI2 a HAB1. Inhibice PP2C prostřednictvím navázání receptorů vede k aktivaci SnRK2 kináz, které naopak fosforylují a aktivují efekty vedoucí ke spuštění programů, např. reakcí na stres.

V porovnání s dimerními receptory je u monomerních receptorů v nepřítomnosti ABA rovnováha mezi otevřeným a uzavřeným stavem receptoru. Tudíž monomerní receptory mohou inhibovat aktivitu PP2C v nepřítomnosti ABA, ačkoli na mnohem nižší úrovni, než je pozorována v přítomnosti ABA (Han et al., 2015).



Obrázek č. 5: Signální dráha ABA (zdroj Taiz and Zeiger, 2010)

2.2. Konjugáty ABA

Konjugáty ABA jsou sloučeniny vznikající spojením ABA s jinou chemickou sloučeninou aromatického nebo alifatického charakteru. Příkladem sloučenin tvořící ABA konjugát je bicyklická aromatická sloučenina tetralone (Nyangulu et al., 2006) alifatické a aromatické aminokyseliny vytvářející aminokyselinové konjugáty (Todoroki et al., 2011), analogy cyklopropylu (Han et al., 2015) či 8'-metylen ABA (Abrams et al., 1997). Nejznámějším analogem ABA je ABA-GE, který pravděpodobně nevykazuje téměř žádnou biologickou aktivitu, ale za to nejspíš funguje jako transportní forma ABA (Piotrowska and Bajguz, 2011).

Byl syntetizován CycloABA (cycloabscisic acid), velmi účinný analog s dlouhodobým účinkem. Tento konjugát byl testován na sazenicích ředkviček, kdy sazenice ovlivněné CycloABA vykazovaly vyšší metabolickou toleranci než při ovlivnění samotnou ABA. Tato vysoká tolerance je pravděpodobně způsobena odolností vůči ABA hydroxyláze (Todoroki et al., 2003).

Různé konjugáty mají různé formy. Můžeme rozlišit formu skladovací, deaktivovanou nebo může mít podobu endogenní bioaktivní molekuly, jako je například (+)-7-iso-JA-

L-isoleucine. U ostatních rostlinných hormonů kyselé povahy, jako jsou gibberelliny (GA) a ABA, nejsou známy žádné aminokyselinové konjugáty, které by byly endogenními metabolity (Todoroki et al., 2011).

Některé z genů amidohydroláz, vyskytující se u rostlin, byly identifikovány jako hydrolázy aminokyselinových konjugátů kyseliny indolové. Vzhledem ke skutečnosti, že ABA není příliš odlišná ve velikosti a polaritě od IAA a JA, mohou tyto amidohydrolázy hydrolyzovat také aminokyseliny kyseliny abscisové (ABA-AA). Pokud má odlišný druh rostlin odlišný set amidohydroláz s odlišnou substrátovou specifitou, ABA-AA může fungovat jako druhově selektivní ABA-prohormon, a zároveň aktivita ABA konjugátů je u různých druhů rozdílná (Todoroki et al., 2011). Stabilní ABA analogy jsou vytvářeny především pro zemědělské účely. Vzhledem k tomu, že samotná ABA je v rostlinách rychle metabolizována a její hladina velmi kolísá, jsou vytvářeny ABA analogy za cílem zvýšit účinek, který vyvolává ABA u rostlin či tento účinek napodobit (Abrams et al., 1997).

V současné době bylo syntetizováno velké množství vysoce aktivních antimetabolitů analogů ABA, jejichž účinek na klíčivost je mnohdy lepší než u samotné ABA, avšak jen zřídka jsou syntetizovány analogy s vysokou fotostabilitou a dobrou aktivitou (Han et al., 2015).

2.3. Světlo

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňující růst a vývoj rostlin v mnoha aspektech (Xu et al., 2014). Je velmi důležitá kvalita (ozařování), kvantita (vlnová délka) a směr světla, působícího na růst a vývoj rostlin (Smith et al., 2010), neboť různá semena reagují na různé druhy světla odlišně. Pro rostliny mající malá semena, jako je například *Lactuca sativa* L. a *Arabidopsis thaliana* L., je světlo kritickým determinantem klíčení (Seo et al., 2006), u jiných rostlin, jako je například *Cucurbita pepo* L. či *Nigella damascena* L. naopak světlo klíčení inhibuje. Můžeme tedy říci, že světlo tedy není samotnou podmínkou klíčení semen všech rostlin (Procházka et al., 1998).

Světlo je důležité především pro rostliny přisedlé, a to jednak jako primární zdroj energie pro fotosyntézu, a jednak jako signál regulující jejich životní cyklus. Z hlediska fotomorfogeneze je světlo viditelné elektromagnetické vlnění, s rozsahem vlnových délek přibližně 380 (ultrafialové)–760 (dlouhovlnné červené) nm, přičemž

nejaktivnějšími oblastmi spektra záření, které ovlivňují růst a vývoj rostlin nejvíce, jsou oblasti 620-700 nm patřící červenému záření (RL), oblast 710-850 nm dlouhovlnnému červenému záření (FRL), 350-500 nm modrému záření (BL). Oblast 320-400 nm představuje oblast ultrafialového záření typu A (UV-A) a 290-320 nm oblast ultrafialového záření typu B (UV-B) a 100-280 nm oblast ultrafialového záření typu C (UV-C) (Xu et al., 2014; Taiz and Zeiger, 2015; Jones et al., 2013).

2.3.1. Receptory světla

Světelné signály jsou vnímány prostřednictvím molekul označovaných jako fotoreceptory, rozdělených do několika rodin, z nichž každý má své charakteristické absorpční spektrum. Vlnová délka světla, která je fotoreceptorem absorbována spouští specifickou odpověď pro daný receptor. Základními fotoreceptory rostlin jsou fytochromy, absorbující primárně červené světlo (RL) a dlouhovlnné červené světlo (FRL), kryptochromy a fototropiny, absorbující modré světlo (BL) a receptory UV-A a UV-B absorbující ultrafialové záření (UV). Každý fotoreceptor interaguje s fotony příslušné vlnové délky a má své charakteristické absorpční spektrum (Jones et al., 2013; Xu et al., 2014; Taiz and Zeiger, 2015).

2.3.1.1. Fytochromy

Fytochrom je homodimerní (funkčně aktivní nabývá formy dimerní) biliprotein, sestávající ze dvou identických polypeptidů – apoproteinu (120 kDa) s fotoreaktivní prostetickou skupinou tetrapyrolové struktury (chromofor). U vyšších rostlin je chromoforem fytochromu lineární tetrapyrrol fytochromobilin, syntetizován v chloroplastech. Fotoreceptor fytochrom existuje ve dvou fotoreverzibilních formách. Forma absorbující RL (P_R) absorbuje RL (vlnové délka okolo 660 nm) a je převáděno na formu absorbující FRL (P_{RF}), přičemž po expozici FRL (730 nm) je P_{RF} opět zpětně převáděno na P_R . Zároveň se mění také struktura celého bílkovinného komplexu a jeho biologická aktivita. RL a FRL působí antagonisticky, RL indukuje celou řadu růstových odpovědí, jako je například kvetení rostlin, klíčení semen salátu, zatímco FRL je inhibuje (Smith et al., 2010; Jones et al., 2013; Procházka et al., 1998; Ballaré, 2014).

Genom *Arabidopsis thaliana* (L.) obsahuje pět genů kódujících fytochromy, vyskytující se pouze ve formě homodimerů. Jedná se o fytochromy phyA-phyE. Nejdominantnějšími jsou phyA a phyB, které často regulují antagonisticky probíhající děje. Například regulují kvetení rostlin. U *Arabidopsis*, FRL prostřednictvím phyA podporuje kvetení a RL prostřednictvím phyB naopak inhibuje kvetení. Phy-A tedy

zprostředkovává reakce na FRL, zatímco phy-B reakce na RL (Lin, 2000). Tři zbývající fytochromy phyC-phyE hrají důležitou roli v regulaci odpovědí, které způsobují účinky RL a FRL. Příkladem je prodlužování internodií a kontrola času kvetení, zprostředkované fytochromy phyD a phyE (Taiz and Zeiger, 2015).

2.3.1.2. Kryptochromy

Kryptochromy jsou flavoproteinové fotoreceptory (70-80 kDa) BL a UV-A, které byly poprvé identifikovány a studovány u *Arabidopsis thaliana* (L.). Kryptochromy zprostředkovávají účinky BL, jako jsou například prodlužování hypokotylu, depolarizace membrán či produkce antokyanu. Kryptochromy nejsou přítomny pouze u rostlin, ale také u bakterií, hub a živočichů, s výjimkou hmyzu, ryb, obojživelníků a savců. Z evolučního hlediska se jedná pravděpodobně o evoluční pokračovatele DNA fotolýz, které jsou na světle závislé enzymy sloužící pro opravu DNA. Fotolýzová aktivita spočívá ve využívání BL k opravě poškození DNA, které vyvolaly účinky UV, odstraněním pyrimidinových dimerů z DNA. Kryptochromy tuto fotolýzovou aktivitu nevykazují.

Většina kryptochromů, s výjimkou CRY-DASH, je složena ze dvou domén, N-koncové domény PHR (fotolýze příbuzné) a C-koncové domény DAS. Kryptochromy obsahují dva kofaktorové chromofory, flavinadeninukleotid (FDA) a methyltetrahydrofolát-pterin (MTHF), připojené k PHR doméně (Taiz and Zeiger, 2015; Chaves et al., 2011; Lin and Todo 2005, Jones et al., 2013).

Genom *Arabidopsis thaliana* L. kóduje tři geny kryptochromů, CRY1 a CRY2 vyskytující se primárně v jádře a CRY3, který pravděpodobně funguje v mitochondriích a chloroplastech. CRY1 a CRY2 zprostředkovávají regulaci de-etiolizace prostřednictvím modrého světla (BL) a regulují jiné aspekty rostlinného růstu a vývoje, jako jsou cirkadiální rytmy či růst kořenů. CRY3 *Arabidopsis* patří do podskupiny CRY-DASH fotolýz/kryptochromů, kódující kryptochromy. Funkce CRY3 zatím nebyla přesně popsána (Liu et al., 2011; Jones et al., 2013). V případě genomu *Solanum lycopersicum* (L.) byly popsány čtyři geny, kódující kryptochromy CRY1a, zodpovědný za kontrolu fotomorfogeneze semen, akumulaci antokyanu, a vývoji dospělých rostlin CRY1b, CRY2 a CRY-DASH, který je pod kontrolou cirkadiálních rytmů se světelně regulovaným transkripčním vzorem (Facella et al., 2012).

3.3.1.3. Fototropiny

Fototropiny jsou druhou skupinou fotoreceptorů absorbujících modré světlo (BL) a UV-A záření. Kromě absorpce BL a zprostředkování reakcí na toto záření, je jejich důležitou funkcí také umožnění fototropních reakcí, díky čemuž dostaly své jméno. Jedná se o flavoproteinové receptory (120 kDa) lokalizované v plazmatické membráně (nejedná se však o integrální membránové proteiny), obsahující dva flavinmononukleotidové (FMN) chromofory, které mohou vyvolat konformační změny a absorbují světelné záření. Fototropin je složen ze dvou oblastí: Na N-konci, jsou přítomny 2 specializované fotosenzorické LOV domény (LOV1 a LOV2), které společně zprostředkovávají absorpci BL a na C-konci se nachází serin/threonin kinasová doména (Taiz and Zeiger 2015; Hopkins et al., 2009).

Fototropiny byly poprvé objeveny a popsány v *Arabidopsis*, kde jsou zastoupeny geny PHOT 1 a PHOT2. Phot1 je primárně fototropní receptor zprostředkovávající fototropismus v reakci na BL nízkých a vysokých plynulých frekvencí. Phot2 zprostředkovává fototropismus v reakci na záření o vysoké intenzitě. Hrají velmi důležitou roli v optimalizaci fotosyntetické účinnosti rostlin, jako je například regulace otevírání průduchů pro výměnu plynů či kumulace a pohyb chloroplastů a ochrana fotosyntetického aparátu před fotoinhibicí, způsobenou nadměrným působením světla. Genetická analýza *Arabidopsis* prokázala, že Phot1 a Phot2 se překrývají ve funkci hypokotylového a kořenového fototropismu, akumulace chloroplastů, otevírání průduchů, v pohybu a expanzi listů (Taiz and Zeiger, 2015; Hopkins et al., 2009; Jones et al., 2013; Christie et al., 2015).

3.3.1.4. Receptory UV záření

Ultrafialové záření (UV) je elektromagnetické záření kratších vlnových délek, než je viditelné světlo. Rozlišujeme tři typy UV záření: UV-A s rozsahem 400-320 nm, UV-B s rozsahem 320-280 nm a UV-C zahrnující kratší vlnové délky než 280 nm. UV záření má kromě svého cytotoxického účinku, jako je například poškození nukleových kyselin a proteinů, také vliv na fotomorfogenezi a růst rostlin. Pro rostliny má největší význam UV-A a UV-B záření. UV-B záření může vyvolat širokou škálu fotomorfogenetických odpovědí, jako je například biosyntéza flavonoidů, potlačení růstu hypokotylu či zvýšení fotosyntetické účinnosti.

Fotoreceptor UV-B záření je označován jako UVR8. Jedná se o protein, který v nepřítomnosti UV-B záření vytváří funkčně inaktivní homodimery. Na rozdíl od fotoreceptorů fytochromů, kryptochromů a fototropinů, UVR8 neobsahuje prosthetický chromofor. Dvě identické subjednotky UVR8 jsou spojeny v dimer, prostřednictvím sítě můstků mezi tryptofanovými residui, která slouží jako primární UV-B senzor, a argininovými residui. UV-A záření je absorbováno prostřednictvím fotoreceptorů fototropinů a kryptochromů, které jsou zároveň také fotoreceptory BL (Hopkins et al., 2009; Taiz and Zeiger, 2015; Vandenbussche et al., 2014).

2.4. Interakce ABA a světla

Vzhledem ke skutečnosti, že světlo a ABA patří mezi nejdůležitější faktory ovlivňující růst a vývoj rostlin, můžeme předpokládat, že jejich signální dráhy spolu mohou interagovat (Xu et al., 2014). Na endogenní hladinu rostlinných hormonů, především na ABA a GA má největší vliv RL, FRL a BL. Když dojde ke spojení účinků RL nebo FRL a BL, hladina ABA klesá. Tato skutečnost napovídá, že interakce BL a RL, popřípadě FRL moduluje hladinu endogenní ABA v rostlinných tkáních prostřednictvím regulace exprese genů, zapojených v metabolismu ABA. RL konkrétně ovlivňuje expresi genu NCDE, který kóduje klíčový enzym biosyntézy ABA, a expresi genu CYP707A, který kóduje enzym ABA-8'-hydroxylázu, uplatňující se při metabolismu ABA (Fellner and Sawhey, 2002; Seo et al., 2006; Volmaro et al., 1998).

V souvislosti s ABA je důležité uvést také GA, neboť tyto fytohormony ovlivňují klíčení rostlin antagonisticky. Zatímco ABA klíčení inhibuje, GA klíčení indukuje (Seo et al., 2006). Účinky světla na klíčení rostlin byly experimentálně testovány především na malých semenech rostlin, jako jsou semena *Lactuca sativa L.* či *Arabidopsis thaliana L.* Bylo zjištěno, že klíčení semen těchto rostlin je řízeno prostřednictvím fytochromu, především prostřednictvím phyB a účinek fytochromu zároveň ovlivňuje hladiny endogenní GA a ABA, přičemž metabolismus ABA, ať už biosyntéza či inaktivace, je fytochromově regulován opačným směrem, než metabolismus GA během fotoreverzibilního klíčení semen (Sawada et al., 2008, Seo et al., 2006). V souvislosti s regulací endogenní hladiny ABA prostřednictvím fytochromu byl prováděn experiment na rostlinách *Lemna gibba* uchovávaných ve tmě. Rostliny byly vystaveny účinku RL a po 4 hodinách od vystavení byl zjištěn výrazný pokles hladiny ABA, který byl reverzibilní prostřednictvím FRL. Ve třech z provedených

experimentů byly rostliny vystaveny FRL ihned po ozáření RL a ve všech testovaných případech byl účinek přinejmenším částečně reverzibilní. To naznačuje, že fytochrom způsobuje podstatné snížení hladiny ABA v *Lemna gibba* (Weatherwax et al., 1996).

Bylo prokázáno, že ABA hraje negativní roli v regulaci exprese LHCBs. LHCB (light-harvesting chlorophyll a/b binding) jsou apoproteiny světlo sběrného komplexu fotosystému II (PSII). Za normálních okolností interagují tyto proteiny s chlorofyly a xantofyly a slouží jako anténní komplex, který absorbuje sluneční záření a převádí excitační energii do jádra PSII. Za stresových podmínek je exprese genů LHCB regulována prostřednictvím ABA. Při aplikaci exogenní ABA ve vysokých koncentracích došlo k okamžité inhibici exprese genů LHCBs, naopak při aplikaci fyziologických koncentrací ABA došlo ke zvýšení exprese genů LHCBs. ABA ovlivňuje expresi genů LHCBs prostřednictvím transkripčního represoru WRKY40, který potlačuje expresi LHCBs (Liu et al., 2013).

Regulátor světelného signálu, HY5 u *Arabidopsis* rovněž zprostředkovává ABA odpovědi v pozdní embryogenezi, genové expresi, klíčení semen, růstu kořenového systému a vzniku semenáčků. HY5 je pozitivní regulátor fotomorfogeneze semen v širokém spektru vlnových délek, a společně s ABA insenzitivním genem *ABI5* kóduje transkripční faktor bZIP (basic leucine zipper) (Chen et al., 2008). Bylo zjištěno, že se HY5 váže na promotor transkripčního faktoru genu *ABI5* s vysokou afinitou a je zodpovědný za jeho expresi. Pomocí chromatinové imunoprecipitace bylo potvrzeno, že vazba HY5 na promotor genu *ABI5* je výrazně zesílena pomocí ABA. HY5 je tedy zapojen do světelné signální dráhy a do signální dráhy ABA navázáním na *ABI5* (Chen et al., 2008; Brocard et al., 2002).

Dalším transkripčním faktorem, zapojeným do signální dráhy ABA a světla je transkripční faktor ZBF1/MYC2bHLH *Arabidopsis*. Je represorem fotomorfogeneze, kryptochromem zprostředkované BL signalizace. Vystupuje jako prostředník mezi komunikací signální dráhy světla, ABA a JA a zároveň funguje jako pozitivní regulátor laterálního růstu kořenového systému a kvetení. Po objasnění funkce MYC2 při růstu a vývoji plodin by proveden experiment na rostlinách rajčete *Solanum lycopersicum* (L.), kdy byly šestidenní sazenice rajčete vystaveny účinkům ABA, která indukuje expresi LeMYC2 a byla monitorována úroveň hladiny transkriptu LeMYC2. Výsledky měření ukázaly, že LeMYC2 pozitivně reguluje inhibici klíčení semen, způsobenou účinkem ABA (Gupta et al., 2014).

3 MATERIÁL A METODY

3.1. Rostlinný materiál

Jednotlivé experimenty byly prováděny se semeny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum L.*). Pro experimenty byly použity dva genotypy, kultivar cv. Rutgers (WT) a spontánní mutant *7B-1*, který byl původně vyselektován pro svoji na fotoperiodě závislou samčí sterilitu (Sawhney, 1997). Tento recesivní „single-gene“ mutant se vyznačuje především zvýšenou tolerancí k abiotickým stresům, jako je například odolnost vůči osmotickému stresu, působení různých solí či nízké teplotě, přičemž tolerance je specificky zvýšená na BL (Fellner and Sawhney, 2001; Bergougnoux et al., 2009). Tato zvýšená tolerance vůči stresu je pravděpodobně způsobená zvýšenou hladinou již pre-existující endogenní ABA v semenech mutanta *7B-1*, což vede ke zvýšení odolnosti vůči stresu. Dřívější experimenty odhalily, že *7B-1* má narušeny některé reakce k modrému světlu, zprostředkované fototropiny (Fellner and Sawhney, 2001; Ježilová et al., 2012; Hlavinka et al., 2013), což vysvětluje zvýšenou toleranci mutanta ke stresům na BL.

3.2. Pracovní postupy

3.2.1. Příprava kultivačního média Murashige and Skoog (MS)

Pro kultivaci rostlin bylo používáno pevné kultivační MS médium. Vždy byly připraveny 2 l média smícháním 2 l destilované vody, 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (Murashige and Skoog, 1962; Caisson Labs USA, MSP01-50LT) a 390,4 mg MES pufru. Médium bylo připravováno v Erlenmayerově baňce o objemu 3l s použitím magnetického míchadla a elektromagnetické míchačky, na kterou byla umístěna Erlenmayerova baňka, aby došlo k úplnému rozpuštění krystalických látek. Po rozpuštění látek byl k médiu přidáván 1M roztok KOH, kterým se upravilo pH na hodnotu 6,1. Změny pH byly měřeny pomocí elektrody pH metru, vložené do připravovaného média. Po upravení pH média bylo připraveno 5 skleněných lahví o objemu 500 ml, do kterých bylo odváženo 2,8 g agaru a přidáno 400 ml připraveného média. Skleněné láhve s připraveným médiem byly vysterilizovány pomocí autoklávu a uchovávány v lednici.

3.2.2. Sterilizace a výsev semen

Každý experiment byl prováděn se 300 semeny genotypu cv. Rutgers (WT) a 300 semeny genotypu 7B-1. Semena byla napočítána a převedena do plastové zkumavky typu Falcon (50ml) a sterilizována pomocí sterilizačního roztoku NaClO (2,8 %) – SAVO (0,6 l SAVO + 0,4 l dH₂O) po dobu 30 minut. Obsah zkumavek byl protřepáván, aby byla sterilizace účinnější.

Po uplynutí doby sterilizace byl sterilizační roztok odpipetován pomocí automatické pipety s rozsahem 10 ml a semena byla pětkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Obsah zkumavky byl opět protřepáván, aby došlo k dokonalejšímu promytí semen. Při sterilizaci a promývání semen bylo nutné dbát na sterilní práci, která byla prováděna v laminárním flow boxu, aby bylo zabráněno případné kontaminaci.

Před samotným výsevem semen byly připraveny sterilní kulaté plastové Petriho misky (průměr 90 mm) s kultivačním médiem. Médium ve skleněné láhvi bylo rozeřháto v mikrovlnné troubě. Vždy 80 ml média bylo nalito do sterilní Erlenmayerovy baňky (300ml) a bylo přidáno příslušné množství ABA nebo testovaného ABA-konjugátu: (ABA-Valin, ABA-Glycin, ABA-Phenylalanin, ABA-Threonin, ABA-Tyrosin) (zásobní roztok 10⁻² mol/l). V případě ABA-Val byly použity koncentrace 5, 10, 15, 30, 45, 60 μmol/l, v případě ABA-Gly koncentrace 20, 40, 60 μmol/l, v případě ABA-Phe byly testovány koncentrace 40, 50, 60, 70 μmol/l, ABA-Thr byl testován o koncentracích 100, 125 a 150 μmol/l a při testování ABA-Tyr byly použity koncentrace 100, 115 a 150 μmol/l. Jednotlivé koncentrace ABA konjugátů vybíral vedoucí bakalářské práce Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D, který vycházel ze článku Todoroki et al., 2009, který poskytl představu o jednotlivých koncentracích testovaných konjugátů ABA. Takto připravené médium bylo rozděleno do 4 Petriho misek, vždy po 20 ml média.

Na takto připravené Petriho misky s pevným médiem byly pomocí pinzety opláchnuté v 96 % ethanolu a vyžíhané nad plamenem přenášeny sterilizovaná a propláchnutá semena. Na jednu misku bylo vždy umístěno 30-35 semen.

Misky se semeny byly vždy oblepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Urgopore), aby bylo zabráněno případné kontaminaci a byla zajištěna lepší manipulace s miskami. Polovina misek se semeny byla vždy umístěna do kultivační růstové komory (Microclima 1000; Snijders Scientific B.V., The Netherlands) na kontinuální modré světlo, polovina misek byla zabalená

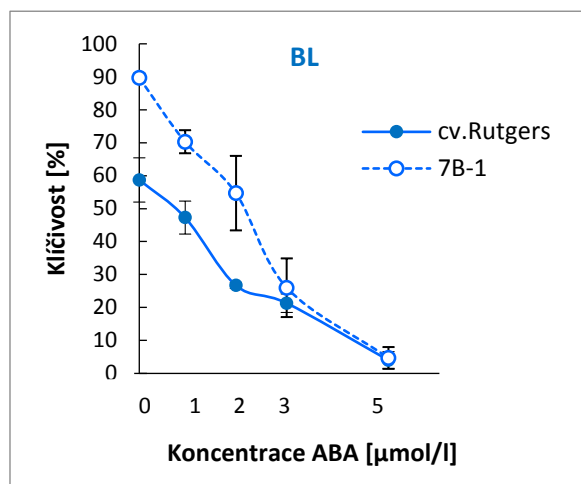
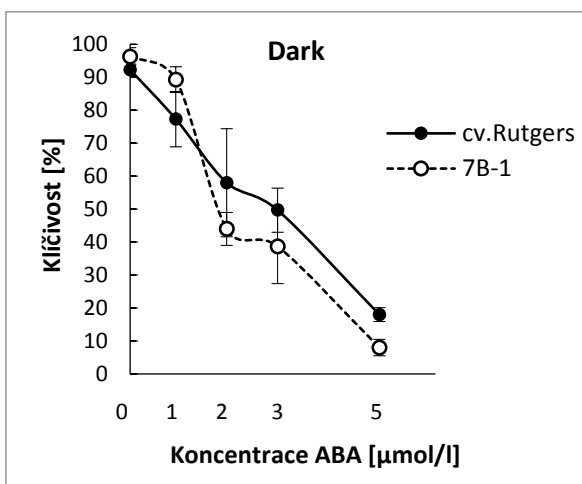
do alobalu a umístěna do stejné komory. Takto byla zajištěna inkubace semen ve tmě. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 440 nm. Semena byla inkubována při stálé teplotě 23 °C. Třetí až sedmý den od výsevu semen byla počítána klíčivost semen, která byla zaznamenávána do tabulky a následně byla určena procentuální klíčivost semen.

4 VÝSLEDKY

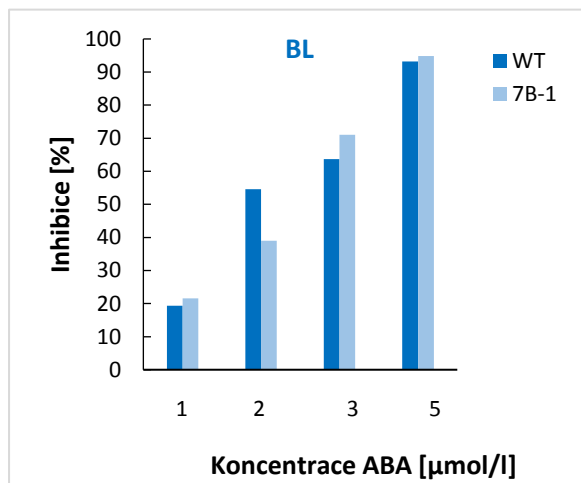
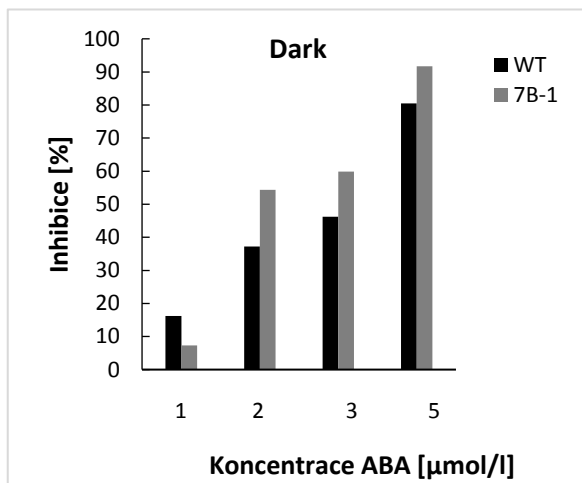
Cílem předložené bakalářské práce bylo otestování řady aminokyselinových konjugátů ABA pomocí biotestu klíčení semen. Pro experiment byly použity semena rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) genotypy cv. Rutgers (WT) a *7B-1*. Nejprve byl ověřen známý vliv ABA na klíčení semen (experiment provedla Marie Vitásková z Laboratoře růstových regulátorů) a za stejných podmínek pak byly testovány jednotlivé konjugáty ABA s aminokyselinami: ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr a ABA-Tyr. Současně bylo zjišťováno, jak modré světlo ovlivňuje působení ABA konjugátů na klíčení semen a jaký vliv má mutace *7B-1* na citlivost k testovaným konjugátům. Všechny konjugáty byly připravovány Dr. Astou Žukauskaite z Laboratoře růstových regulátorů. Jako kontrola klíčení bylo použito DMSO, ve kterém byly dané roztoky konjugátů připravovány. Biologická aktivita aminokyselinových konjugátů ABA byla experimentálně otestována s následujícími výsledky:

4.1. Výsledky s ABA

Při testování účinků čisté ABA na klíčení semen byly použity koncentrace 0, 1, 2, 3, 5 $\mu\text{mol/l}$. Jako kontrola bylo použito čisté MS médium. Inhibiční efekt na klíčení semen byl pozorován u všech použitých koncentrací ABA pro oba testované genotypy (Obr. 6 a 7). Inhibice klíčivosti vzrůstala v závislosti na koncentraci ABA. Při použití ABA o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ byla ve všech případech pozorována inhibice přesahující 80% (Obr. 8 a 9). Experiment byl proveden Marií Vitáskovou z Laboratoře růstových regulátorů.



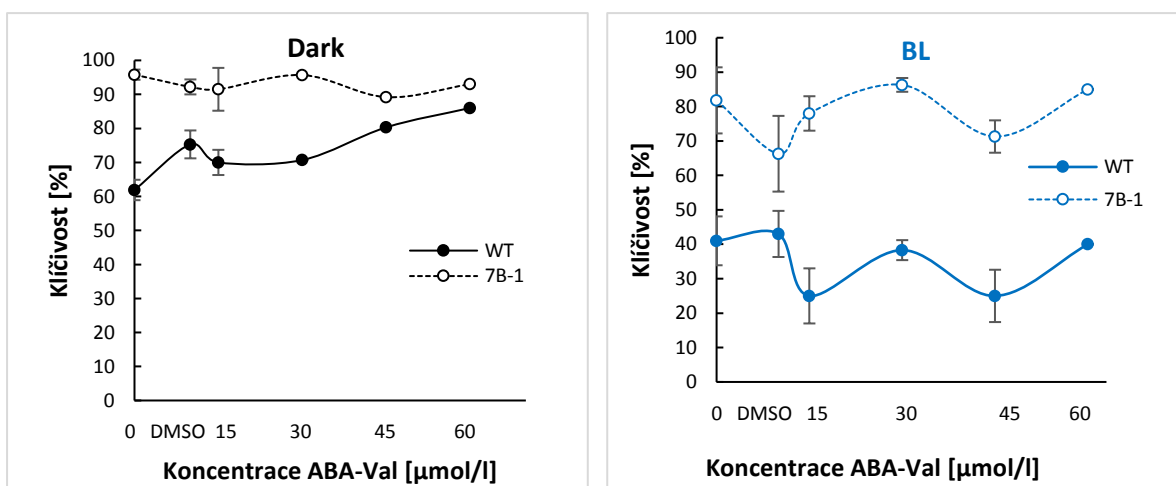
Obr. č. 6 a č. 7: Vliv ABA na klíčení semen rajčete cv. Rutgers a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito čisté médium. Vynesené hodnoty ukazují průměrné hodnoty \pm SE klíčivosti semen získané ze 3 nezávislých experimentů. Experiment provedla Marie Vitásková.



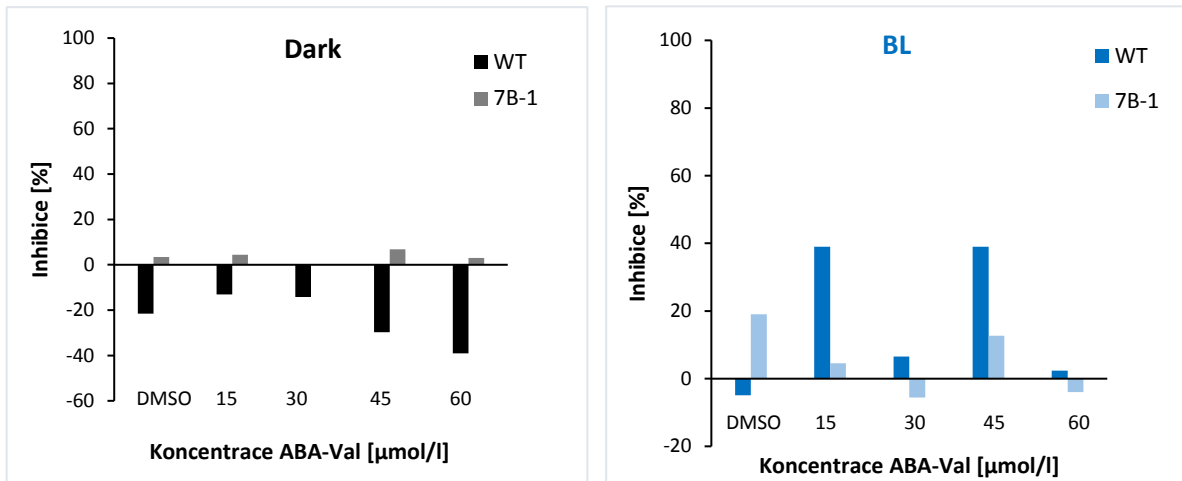
Obr. č. 8 a č. 9: Vliv ABA na klíčení semen rajčete cv. Rutgers a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Vynesené hodnoty ukazují procentuální inhibici v závislosti na koncentraci použité ABA ze 3 nezávislých experimentů. Experiment provedla Marie Vitásková.

4.2. Klíčivost semen v přítomnosti ABA-Val

Při testování účinků konjugátu ABA-Val byly použity koncentrace 0, 15, 30, 45, 60 $\mu\text{mol/l}$. Jako druhá kontrola bylo použito DMSO v koncentraci 0,3 % v médiu, která odpovídá finální koncentraci DMSO v médiu při použití nejvyšší testované koncentraci, tedy konkrétně při 60 μM koncentrace ABA-Val. Jak ukazuje (Obr. 10 a 11) bylo zjištěno, že při inkubaci ve tmě (D) nemá ABA-Val při použitých koncentracích žádný vliv na klíčení semen rajčete ani u jednoho z testovaných genotypů. Inhibiční efekt byl pozorován u semen inkubovaných na modrém světle (BL) při použití ABA-Val o koncentracích 15 a 45 μM v případě genotypu WT a 45 μM v případě genotypu *7B-1* (Obr. 12 a 13). V případě genotypu *7B-1* byl pozorovaný inhibiční efekt velmi slabý.



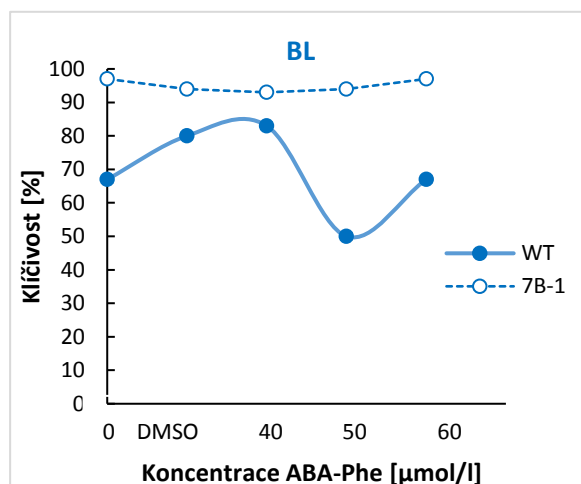
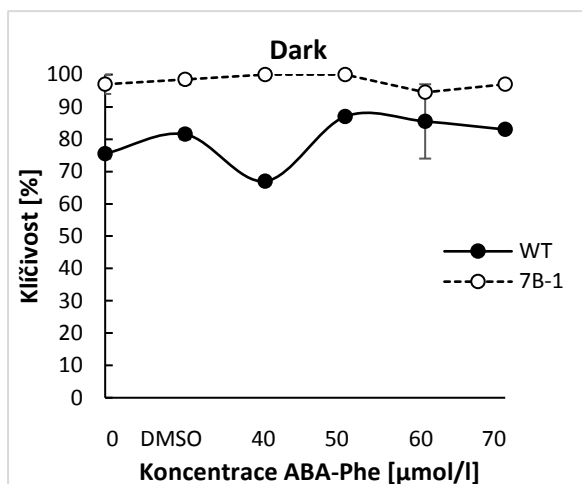
Obrázek č. 10 a 11: Vliv ABA-Val na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,3% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují průměrné hodnoty \pm SE klíčivosti semen získané ze 2-4 nezávislých experimentů.



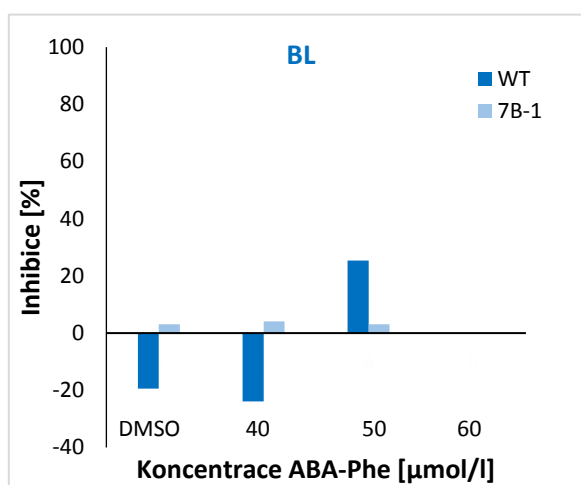
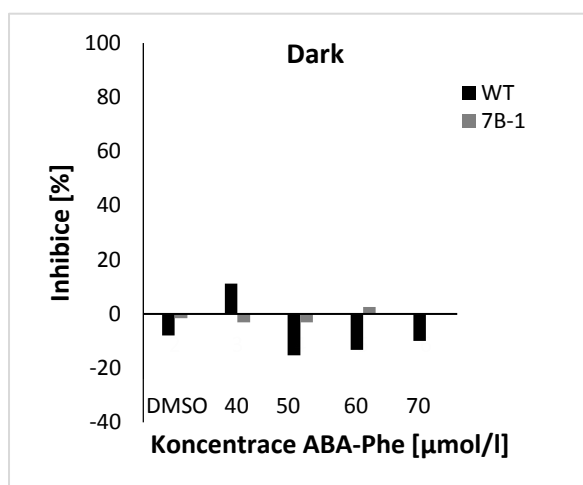
Obrázek č. 12 a 13: Vliv ABA-Val na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,3% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují procentuální inhibici, v závislosti na koncentraci použitého ABA-Val, ze 2-4 nezávislých experimentů.

4.3. Reakce klíčení semen k ABA-Phe

Při testování účinků konjugátu ABA -Phe byly použity koncentrace 0, 40, 50, 60, 70 $\mu\text{mol/l}$. Jako druhá kontrola bylo použito DMSO v koncentraci 0,08 % v médiu, která odpovídá finální koncentraci DMSO v médiu při použití 60 μM koncentrace ABA-Phe. Při inkubaci semen ve tmě (D) nebyl pozorován žádný významný inhibiční efekt ABA-Phe ani u jednoho z testovaných genotypů, klíčivost semen byla vysoká (Obr. 14, 15 a 16). Při inkubaci na modrém světle (BL) byl pozorován inhibiční efekt pouze u genotypu WT při použití 50 μM ABA-Phe (Obr. 17). Je však třeba zdůraznit, že na modrém světle byl kvůli nedostatku nasyntetizovaného ABA-Phe proveden pouze jediný experiment. U semen genotypu *7B-1* inkubovaných na BL inhibiční efekt pozorován nebyl (Obr. 17).



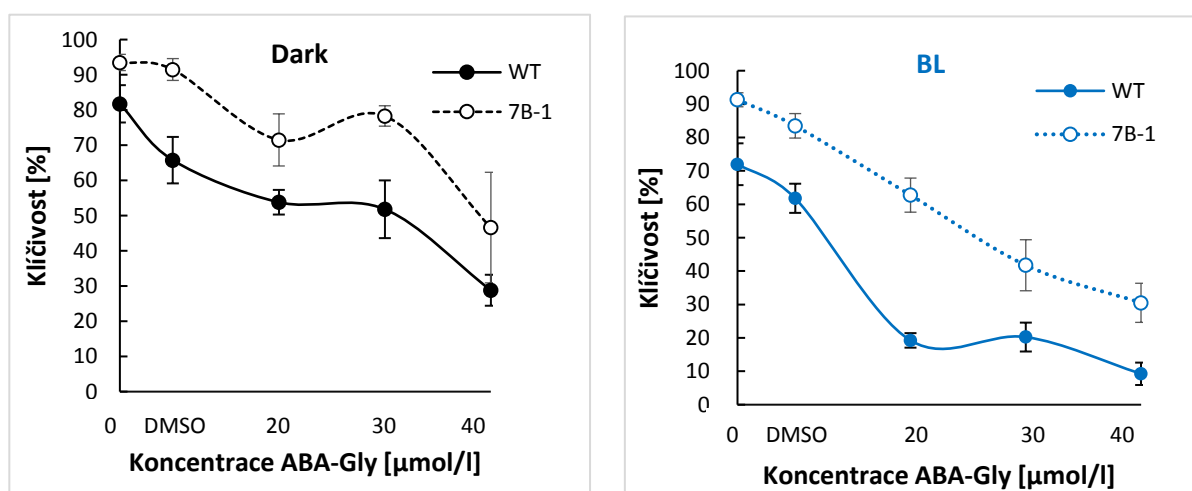
Obrázek č. 14 a 15: Vliv ABA-Phe na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,08% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují průměrné hodnoty ± SE klíčivosti semen získané ze 2 nezávislých experimentů (D), a hodnoty jediného experimentu (na BL).



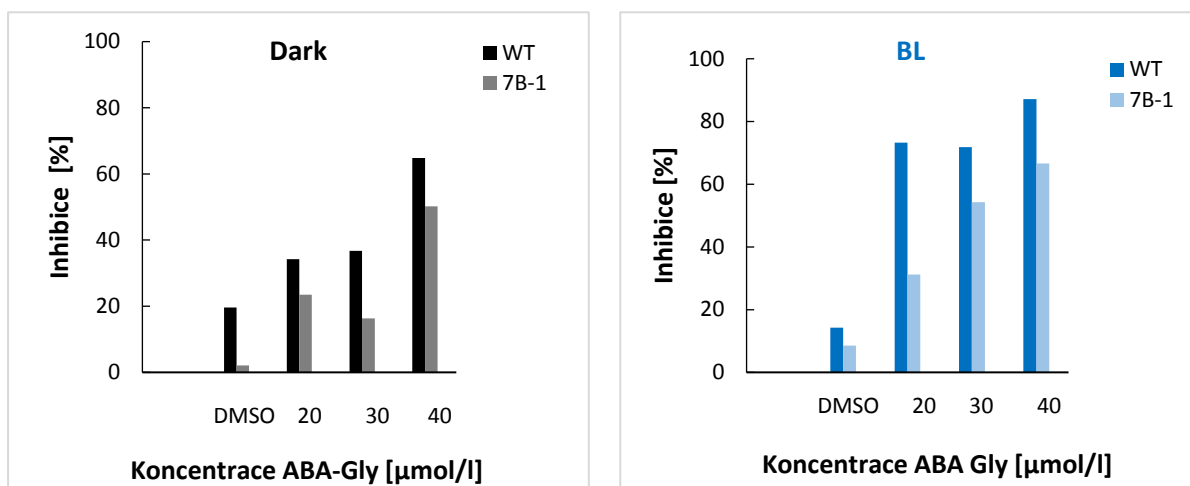
Obrázek č. 16 a 17: Vliv ABA-Phe na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,08% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují procentuální inhibici, v závislosti na koncentraci použitého ABA-Phe, ze 2 nezávislých experimentů (D), a hodnoty jediného experimentu (na BL). Při koncentraci 60 μmol/l a inkubaci semen na modrém světle byla zaznamenána nulová inhibice u obou testovaných genotypů.

4.4. Výsledky s ABA-Gly

Při testování účinků konjugátů ABA-Gly byly použity koncentrace 0, 20, 30 a 40 $\mu\text{mol/l}$. Jako druhá kontrola bylo použito DMSO v koncentraci 0,15% v médiu, která odpovídá finální koncentraci DMSO v médiu, při použití 40 μM koncentrace ABA-Gly. Obr. 18 a 19. Ukazují, že ABA-Gly významně snižuje klíčení semen rajčete obou použitých genotypů. Pro semena cv. Rutgers i *7B-1* inkubována ve tmě (D) byl zjištěn inhibiční efekt pro všechny testované koncentrace. (Obr. 18) Při inkubaci na modrém světle (BL) byla rovněž zjištěna inhibice klíčení obou testovaných genotypů, inhibiční účinek byl však znatelně silnější než při inkubaci ve tmě, a to pro oba testované genotypy (Obr. 20 a 21). Jak Obr. 20 a 21 také ukazují u mutanta *7B-1* byla zaznamenána slabší inhibice klíčivosti než u cv. Rutgers při obou testovaných světelných podmínkách.



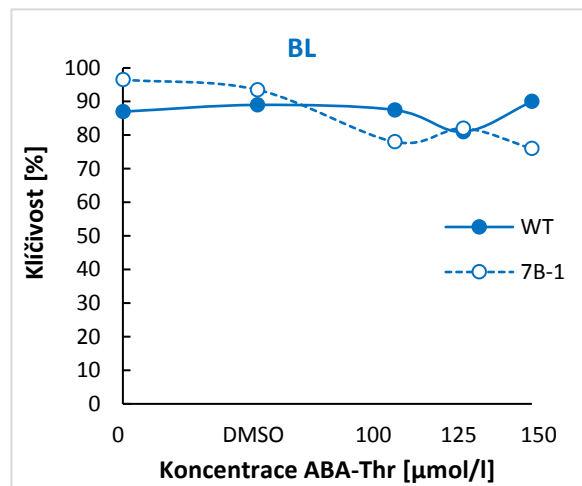
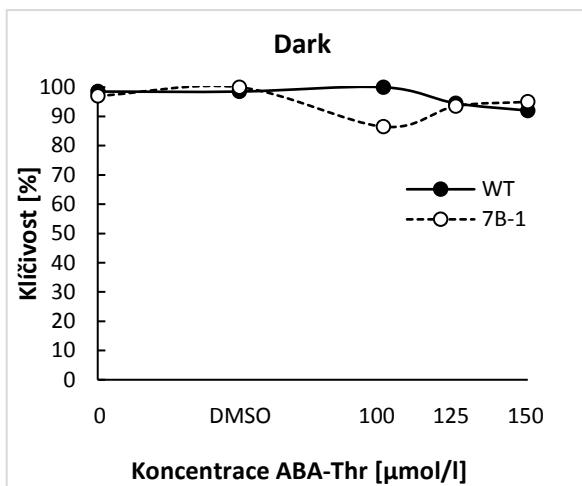
Obrázek č. 18 a 19: Vliv ABA-Gly na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,15% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují průměrné hodnoty \pm SE klíčivosti semen získané ze 4 nezávislých experimentů.



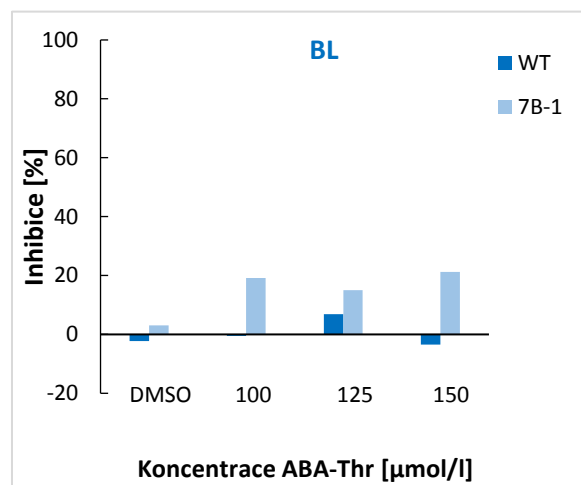
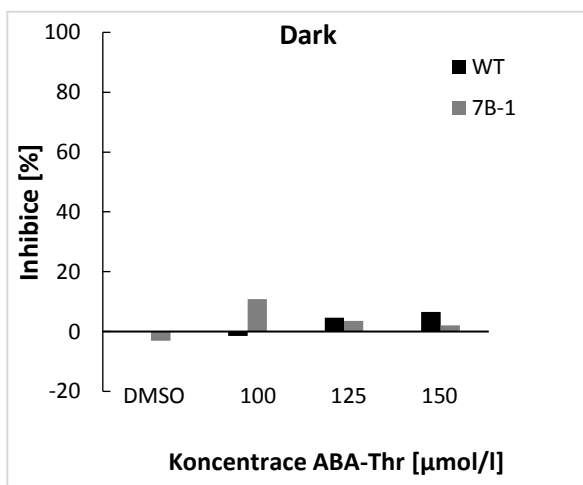
Obrázek č. 20 a 21: Vliv ABA-Gly na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,15% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují procentuální inhibici, v závislosti na koncentraci použitého ABA-Gly, ze 4 nezávislých experimentů.

4.5. Výsledky s ABA-Thr

Při testování účinků konjugátu ABA-Thr byly použity koncentrace 100, 125 a 150 μmol/l. Jako druhá kontrola bylo použito DMSO v koncentraci 0,10 % v médiu, která odpovídá finální koncentraci DMSO v médiu při použití 150 μM koncentrace ABA-Thr. Ze získaných výsledků bylo zjištěno, že ABA-Thr při použitých koncentracích nemá žádný vliv na klíčení semen rajčete (Obr. 22 a 23). Inhibiční efekt nebyl pozorován u semen genotypu WT ani *7B-1*. Vliv neměly ani rozdílné světelné podmínky (D, BL) při inkubaci semen (Obr. 24 a 25).



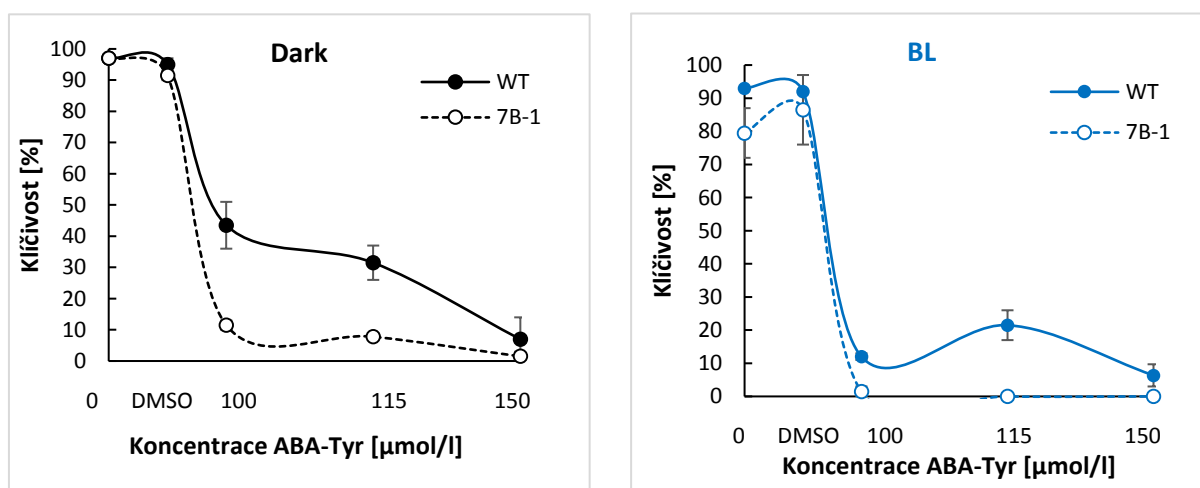
Obrázek č. 22 a 23: Vliv ABA-Thr na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,10% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují průměrné hodnoty \pm SE klíčivosti semen získané ze 2 nezávislých experimentů.



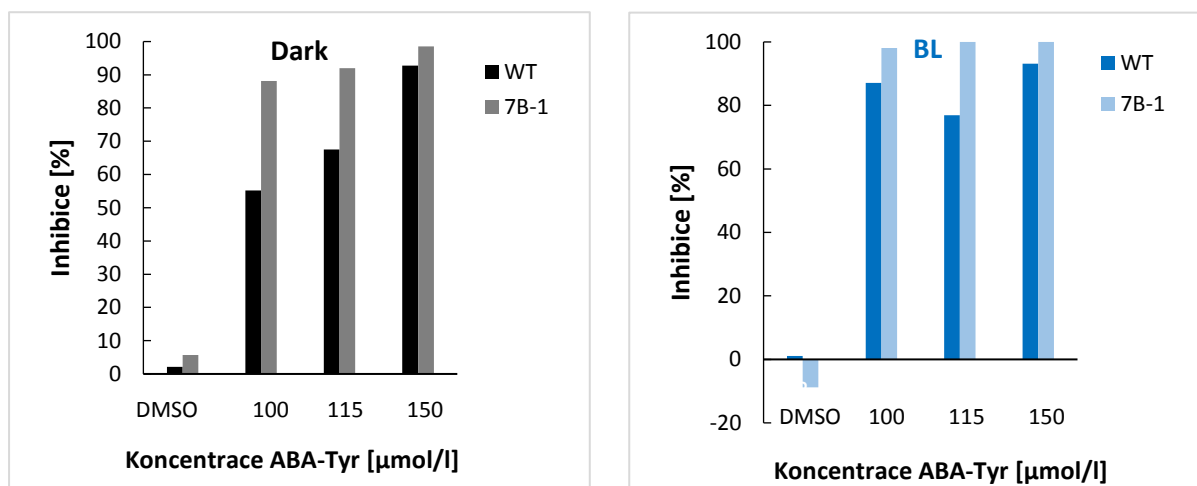
Obrázek č. 24 a 25: Vliv ABA-Thr na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,10% v médiu. Vynesené hodnoty ukazují procentuální inhibici, v závislosti na koncentraci použitého ABA-Thr ze 2 nezávislých experimentů.

4.6. Výsledky s ABA-Tyr

Při testování účinků konjugátu ABA-Tyr byly použity koncentrace 0, 100, 115 a 150 $\mu\text{mol/l}$. Jako druhá kontrola bylo použito DMSO v koncentraci 0,1% v médiu, která odpovídá finální koncentraci DMSO v médiu při použití 150 μM koncentrace ABA-Tyr. Výsledky ukazují, že ABA-Tyr inhibuje klíčení genotypu WT i *7B-1* při inkubaci ve tmě (D) při všech použitých koncentracích ABA-Tyr, přičemž silnější inhibiční efekt byl pozorován u genotypu *7B-1* (Obr. 26 a 28). Při inkubaci na modrém světle (BL) byl pozorován inhibiční efekt rovněž u obou testovaných genotypů, při všech použitých koncentracích ABA-Tyr (Obr. 27). Silnější inhibiční efekt při inkubaci na BL byl opět pozorován u genotypu *7B-1*, přičemž v případě koncentrací 115 a 150 μM činila inhibice 100% (Obr. 29).



Obrázek č. 26 a 27: Vliv ABA-Tyr na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,1% v médiu. Vynesené ukazují průměrné hodnoty \pm SE klíčivosti semen získané ze 2 nezávislých experimentů.



Obrázek č. 28 a 29: Vliv ABA-Tyr na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* inkubovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Jako kontrola bylo použito DMSO o koncentraci 0,1% v médiu. Vynesené grafy ukazují procentuální inhibici, v závislosti na koncentraci použitého ABA-Tyr, ze 2 nezávislých experimentů.

5 DISKUZE

Světlo a fytohormon ABA patří mezi nejdůležitější faktory regulující klíčové procesy probíhající v rostlinách (Tang et al., 2013). ABA je monocyklický seskviterpenoid karboxylové kyseliny regulující širokou škálu fyziologických a vývojových procesů v životním cyklu rostliny, od vývoje semen a klíčení po zrání plodů a zlepšení tolerance k biotickému a abiotickému stresu (Rajagopalan et al., 2016). Mezi nejdůležitější fyziologické procesy ovlivněné ABA patří dormance a zrání semen, uzavírání průduchů a reakce na biotický a abiotický stres (Nambara and Kuchitsu, 2011). Různé aminokyselinové konjugáty jsou považovány za zásobní formu, deaktivovanou formu nebo za endogenní bioaktivní molekuly, i když definitivní úloha těchto konjugátů nebyla zatím stanovena, kromě (+)-7-iso-JA-iso-leucinu (Fonseca et al., 2009; Todoroki et al., 2011). V případě ABA nebylo zatím publikováno, že by aminokyselinové konjugáty byly endogenními metabolity a ani na základě výzkumu metabolismu ABA nebyly zatím nalezeny důkazy, že by tomu tak mohlo být (Todoroki et al., 2011).

Endogenní hladina ABA je řízena spoluprací dráhy biosyntézy, transportu a katabolické inaktivace při reakci na abiotický stres, který představují například vysoké teploty, mráz či sucho. Když dojde ke zmírnění stresu je ABA metabolizována na inaktivní produkt prostřednictvím jedné ze dvou základních katabolických drah. První možností je esterifikace ABA na konjugát ABA-GE, který vykazuje pouze velmi slabou, až téměř žádnou biologickou aktivitu, ale zdá se být transportní formou ABA. Druhou možností je hydroxylace ABA na nestabilní meziprodukt 8'-hydroxy-ABA, která je převáděna na kyselinu faseovou (Todoroki et al., 2011; Piotrowska and Bajguz, 2011).

Nejznámější funkcí ABA je inhibice klíčení semen. Právě na tuto schopnost jsme se zaměřili a testovali jsme biologickou aktivitu aminokyselinových konjugátů ABA. Cílem zjistit, jak tyto syntetické konjugáty ovlivňují klíčení semen, zda mohou mít podobnou fyziologickou funkci jako ABA.

V rámci mé bakalářské práce bylo testováno pět aminokyselinových konjugátů kyseliny abscisové (ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr, ABA-Tyr). Inhibiční efekt byl pozorován u tří z těchto testovaných analogů, konkrétně se jednalo o konjugáty ABA-Val, ABA-Gly a ABA-Tyr. V rámci vyhodnocení inhibičních vlastností testovaných konjugátů byly řešeny dvě základní otázky:

V prvním případě byla řešena problematika schopnosti konjugátů inhibovat klíčení semen rajčete. ABA je látkou velmi nestabilní, její endogenní hladina velmi kolísá a je rychle metabolizována (Taiz and Zeiger, 2015). Na základě její nestability nelze přesně říci, zda sledovaný inhibiční efekt je způsoben testovaným konjugátem, či kyselinou abscisovou, která vznikla rozštěpením daného konjugátu. Z výsledků experimentů je patrné, že na BL byl pozorován vždy silnější inhibiční efekt než ve tmě. Domníváme se, že vzhledem k nestabilitě ABA může docházet k jejímu štěpení, přičemž tento efekt je silnější při působení BL, neboť jejich signální dráhy spolu v mnoha případech mohou interagovat. Pro objasnění výsledků by bylo nutné provést další experiment, kdy by byla změřena hladina ABA v rostlinách, a bylo by tak možné přesně říci, zda pozorovaný inhibiční efekt způsobil testovaný konjugát, či rozštěpená ABA.

Pouze teoreticky byla řešena problematika vazby testovaných konjugátů na známé ABA receptory. Bylo odhaleno, že ABA percepce a signalizace je zprostředkována vazbou na receptory pyrabactinové rezistence PYR/PYL/RCAR (označující se zkráceně PYL). Tyto receptory vnímají ABA intercelulárně, což má

za následek vytvoření komplexu s A proteinem fosfatázy typu 2Cs (PP2Cs), která je následně inhibována (González-Guzmán et al, 2014; Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Receptory se liší svou velikostí, strukturou, a tudíž i druhy molekul, které mohou vázat. Je známo, že receptor PYR1 se vyskytuje ve formě monomerické a také ve formě dimerické. V porovnání s receptory PYL1/2 mají receptor PYR1 menší velikost než PYL1/2 a zároveň mají rovnější tvar, díky čemuž se předpokládá, že mají schopnost vázat menší molekuly (Asta Žukauskaite slovní sdělení). Není možné přesně říct, který z receptorů je schopný vázat testované aminokyselinové konjugáty, domníváme se však, že vzhledem k velikosti molekuly konjugátu je pravděpodobná vazba na PYL1/2 receptor, neboť je tento receptor nejširší a největší. Na tuto otázku však nelze jednoznačně odpovědět, můžeme se pouze domnívat, neboť není možné přesně zjistit, který z receptorů bude konjugát vázat.

Klíčení semen je jeden ze základních fyziologických dějů, který je řízen světlem. Bylo prokázáno, že BL ve většině případů redukuje klíčení semen rajčete (Piterková et al., 2012) a zesiluje účinek osmotického stresu na klíčení semen (Fellner and Sawhey, 2002). *7B-1* mutant rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) je mutant vyznačující se samčí sterilitou závislou na fotoperiodě a zvýšenou tolerancí klíčení semen k abiotickému stresu specificky na BL (Fellner and Sawhney, 2001; Omidvar et al., 2017; Balarynová et al., 2018). I když mutant *7B-1* obsahuje v hypokotylech vyšší hladinu ABA (Fellner et al., 2001), nedávné analýzy doktorandky Pavly Pokorné ukázaly, že semena mutanta *7B-1* obsahují mnohem méně endogenní ABA než semena cv. Rutgers (Pokorná et al., 2018). Pavla Pokorná dále zjistila, že BL neovlivňuje přímo expresi genů pro většinu PYL receptorů pro ABA (s výjimkou *PYL5*), ale ovlivňuje degradaci ABA tím způsobem, že ji zpomaluje. Na základě toho klesá její hladina ABA ve tmě rychleji, než na modrém světle (Pokorná et al., 2018). P. Pokorná dále odhalila, že pokles ABA v semenech mutanta v prvních 24 hodinách inkubace na BL je rychlejší u *7B-1* než u WT (Pokorná et al., 2018). Tato fakta mohou vysvětlovat, že při porovnání výsledné procentuální klíčivosti semen cv. Rutgers a *7B-1*, mutant *7B-1* je v D i BL k testovaným konjugátům vždy méně citlivý (s výjimkou citlivosti k ABA-Tyr), než cv. Rutgers a inhibiční efekt je u něj tudíž nižší než u cv. Rutgers. Jak bylo zmíněno, semena *7B-1* ukazují vyšší citlivost k inhibičnímu účinku ABA-Tyr než cv. Rutgers. Zajímavé je, že po prvních 6 hodinách inkubace, exprese genu kódující receptor *PYL5* byla vyšší v semenech *7B-1* než v cv. Rutgers. Nabízí se tedy otázka (či

úvaha pro další experimenty), zda receptor PYL5 není schopen vázat ABA-Tyr. To by mohlo zvýšenou citlivost *7B-1* k ABA-Tyr vysvětlovat.

6 ZÁVĚR

Hlavním cílem přeložené bakalářské práce bylo otestovat biologickou aktivitu pěti vybraných aminokyselinových konjugátů kyseliny abscisové. Konkrétně byly testovány analogy ABA-Val, ABA-Phe, ABA-Gly, ABA-Thr a ABA-Tyr o různých koncentracích. U tří z testovaných analogů – ABA-Val, ABA-Gly, ABA-Tyr byl pozorován inhibiční efekt na klíčení semen rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Konjugáty byly testovány na dvou genotypech, cv. Rutgers a mutant *7B-1*. Genotyp *7B-1* vykazoval nižší citlivost k testovaným konjugátům než genotyp cv. Rutgers. Vysvětlení nabízí nezávislé experimenty doktorandky P. Pokorné, která zjistila, že semena mutanta *7B-1* obsahují mnohem méně endogenní ABA než semena cv. Rutgers, a že pokles ABA v semenech, ke kterému při klíčení dochází, je u *7B-1* rychlejší než u WT. Vyšší citlivost mutanta *7B-1* k ABA-Tyr by mohla být vysvětlena tím, že exprese genu kódujícího receptor PYL5 byla vyšší v semenech *7B-1* než v cv. Rutgers. To je však jen spekulace, pro kterou zatím nemáme důkazy. Silnější inhibiční účinek aminokyselinových konjugátů pozorovaný při inkubaci semen obou genotypů na BL lze vysvětlit tím, že při klíčení hladina ABA ve tmě klesá rychleji než na modrém světle.

Výsledky experimentů ukázaly, že syntetické aminokyselinové konjugáty ABA by mohly mít inhibiční účinek na klíčení semen rajčete, podobně jako ABA. Je však nutno prověřit stabilitu ABA-AA, protože může docházet ke štěpení ABA-AA na volnou ABA, která může inhibici klíčení způsobovat.

Výsledky experimentů vyvolaly řadu nových otázek, které by mohly být odrazovým můstkem pro další experimentální práci.

POUŽITÁ LITERATURA

Abrams RS, Rose AP, Cutler JA, Balsevich JJ, Lei B, Walker-Simmons KM. 8'-methylene abscisic acid' an effective and persistent analog of abscisic acid. *Plant Physiology*. (1997) 114: 89-97

Balarynová J, Danihlík J, Fellner M. Changes in plasma membrane aquaporin gene expression under osmotic stress and blue light in tomato. *Acta Physiologiae Plantarum* (2018) 40: 27

Ballaré LC. Light regulation of plant defense. *Annual Review of Plant Biology* (2014) 65: 15.1–15.29

Bergounoux V, Hlaváčková V, Ploztová R, Novák O, Fellner M. The 7B-1 mutation in tomato (*Solanum lycopersicum L.*) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Experimental Botany* (2009) 60 (4): 1219–1230

Bergounoux V, Zalabák D, Jandová M, Novák O, Wiese-Klinkenberg A, Fellner M. Effect of blue light on endogenous isopentenyladenine and endoreduplication during photomorphogenesis and de-etiolation of tomato (*Solanum lycopersicum L.*) seedlings. *Plos ONE* (2012) 7(9): e45255. doi:10.1371/ journal.pone.0045255

Brocard MI, Lynch JT, Finkelstein RR. Regulation and role of the Arabidopsis abscisic acid-intensitive 5 Gene in abscisic acid, sugar and stress response. *Plant Physiology* (2002) 129 (4): 1533-1543

Dong T, Park Y, Hwang I. Abscisic acid: biosynthesis, inactivation, homeostasis and signalling. *Essays Biochemistry* (2015) 58: 29-48

Facella P, Daddiego L, Giuliano G, Perrotta G. Gibberellin and auxin influence the diurnal transcription pattern of photoreceptor genes via CRY1a in tomato. *PLoS One*. (2012) 7(1): e30121

Fellner M, Sawhney KV. Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* (2001) 102: 21-5221

Fellner M, Sawhney KV. The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* (2002) 214: 675–682

Fonseca S, Chini A, Hamberg M, Adie B, Porzel A, Kramell R, Miersch O, Wasternack C, Solano R. (+)-7-iso-jasmonoyl-L-isoleucine is the endogenous bioactive jasmonate. *Natural Chemical Biology* (2009) 5: 344-350

Gupta N, Prasad R, Babu V, Chattopadhyay S. LeMYC2 acts as a negative regulator of blue light mediated photomorphogenic growth, and promotes the growth of adult tomato plants. *BMC Plant Biology* (2014) 14: 38

Han S-Y, Katahata N, Sekimata K, Saito T, Kobayashi M, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida S, Asami T. A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiology* (2004) 135: 1574–1582

Han X, Fan J, Lu H, Wan C, Li X, Li H, Yan D, Xiao Y, Qin Z. Synthesis, resolution and biological evaluation of cyclopropyl analogs of abscisic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2015) 18: 6210-6217

Hlavinka J, Nauš J, Fellner M. Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science* (2013) 209: 75-80

Hopkins GW, Hüner PAN. Introduction to plant physiology, 4th ed. Hoboken NJ: John Willey, 2008
ISBN 978-0-470-24766-2

Chaves I, Pokorný R, Byrdin M, Hoang N, Rizt T, Brettel K, Essen L-O, Horst TJ, Batschauer A, Ahmad M. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology* (2011) 62: 335–64

Chen H, Xiong L. Role of HY5 in abscisic acid response in seeds and seedlings. *Plant Signal Behav.* (2008) 11: 986–988

Chen H, Zhang J, Neff M, Hon S-W, Zhang H, Deng W-X, Xiong L. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceeding of the National Academy of Science of the USA.* (2008) 105(11): 4495–4500.

Christie MJ, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. Plant Flavoprotein Receptor. *Plant Cell Physiology* (2015) 56(3): 401-413

- Ježilová E, Bergougnoux V, Fellner M, Špundová M.** Is the rate of photosynthesis altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica* (2012) 50: 477-480
- Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S.** The molecular life of plants. Hoboken, NJ: Wiley-Blackwell, 2013. ISBN 978-0-470-87011-2
- Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E.** The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. *European molecular biology organization Journal* (2004) 23(7): 1647-1656
- Lin C.** Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiology* (2000) 123: 39-50
- Lin Ch, Todo T.** The cryptochromes. *Genome Biology* (2005) 6(5): 220
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C.** The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* (2011) 16: 684-691
- Liu R, Xu Y-H, Jiang S-C, Lu K, Li Y-F, Feng X-J, Wul Z, Liang S, Yul Y-T, Wang X-F, Zhang D-P.** Light-harvesting chlorophyll a/b-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor, WRKY40, to balance their function. *Journal of Experimental Botany* (2013) 64 (18): 5443–5456
- Ma Y, Szotkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E.** Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* (2009) 324(5930): 1064-1068
- Murashige T, Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (1962) 15: 473-497
- Nambara E, Kuchitsu K.** Opening a new era of ABA research. *Journal of Plant Research* (2011) 124: 431–435
- Nyangulu MJ, Nelson MK, Rose AP, Gai Y, Lowven M, Lougheed B, Quail JW, Cutler JA, Abrams RS.** Synthesis and biological activity of tetralone abscisic acid analogues. *Organic & Biomolecular Chemistry* (2006) 4 (7):1400-1412

Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Zheng Y, Fei Z, Pucci A, Mazzucato A, Večeřová V, Sedlářová M, Fellner M. Transcriptional regulation of male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *PLoS ONE* (2017) 12(2): e0170715

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. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* (2009) 324: 1068-1071

Piotrowska A, Bajguz A. Conjugates of abscisic acid, brassinosteroids, ethylene, gibberellins, and jasmonates. *Phytochemistry* (2011) 72: 2097–2112

Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* (2012) 110: 767–776

Pokorna P, Tureckova V, Strnad M, Fellner M. Interaction between blue light and ABA during tomato seed germination. *VISCEA International Science Conference and Events Association. Plant Abiotic Stress Tolerance V*, July 5-6, 2018, Vienna, Austria

Procházka S, Macháčková I, Krehule J, Šebánek J. a kolektiv. *Fyziologie rostlin*, Praha: Academia, 1998
ISBN 80-200-0586-2

Rajagopalan N, Nelson MK, Douglas FA, Jheengut V, Alarcon QI, McKenna AS, Surpin M, Loewen CM, Abrams RS. Abscisic acid analogues that act as universal or selective antagonists of phytohormone receptors. *Biochemistry* (2016) 55: 5155–5164

Sawada Y, Aoki M, Nakaminami K, Mitsunashi W, Tatematsu K, Kushiro T, Koshiba T, Kamiya Y, Inoue Y, Nambara E, Toyomasu T. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology* (2008) 146: 1386-1396

Sawhney V.K. Genic male sterility. In: Shivanna KR, Sawhney VK (eds) Pollen biotechnology for crop production and improvement. Cambridge University Press, Cambridge, UK (1997): 183–198

Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun T, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* (2006) 48: 354-366

Smith MA, Coupland G, Dolan L, Harberd N, Jones J, Martin C, Sablowski R, Amey A. *Plant Biology*. New York: Garland Science, 2010. ISBN 978-0-8153-4025-6

Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology and development*, 6th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers, 2015
ISBN 978-1605352558

Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiology*. 5th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, 2010
ISBN 978-0878938667

Todoroki Y, Narita K, Muramatsu T, Shimomura H, Ohnishi T, Mizutani M, Ueno K, Hirai N. Synthesis and biological activity of amino acid conjugates of abscisic acid. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*. (2011) 19:1743-1750

Todoroki Y, Sawada M, Matsumoto M, Tsukada S, Ueno K, Isaka M, Owakia M, Hirai N. Metabolism of 5'- α , 8'-cycloabscisic acid, a highly potent and long-lasting abscisic acid analogue, in radish seedlings. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* (2004) 12: 363–370

Vandenbussche F, Tillbrook K, Fierro AC, Marchal K, Poelman D, Straeten Van Der D, Ulm R. Photoreceptor-mediated bending towards UV-B in Arabidopsis. *Molecular Plant* (2014) 7(6): 1041-1052

Volmaro C, Pontin M, Luna V, Baraldi R, Bottini R. Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA3 and abscisic acid. *Plant Growth Regulation* (1998) 26: 165–173

Weatherwax CS, Ong SM, Degerhardt J, Bray AE, Tobin ME. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *plant physiology* (1996) 111: 363-370

Xu D, Li J, Gangappa NS, Hettiarachci C, Lin F, Andersson XM, Jiang Y, Deng WX, Holm M. Convergence of light and ABA signaling on the ABI5 promoter. *PLoS Genet* (2014) 10 (2): e1004197. doi:10.1371/ journal. pgen.1004197

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- AAO** enzym abscisic aldehyde oxidasa
- ABA** kyselina abscisová
- ABA-AA** aminokyseliny kyseliny abscisové
- ABA-GE** glukosylester kyseliny abscisové
- BL** modré světlo
- D** tma
- DPA** kyselina dihydrofaseová
- FDA** flavinadenindinukleotid
- FRL** dlouhovlnné červené světlo
- GA** gibberelliny
- IAA** kyselina indolová
- IPP** isopentenylidifosfát
- JA** kyselina jasmonová
- LHCB** light-harvesting chlorophyll a/b binding proteiny
- MTHF** methenyltetrahydrofolát-pterin
- NCED (AtNCED)** enzym 9'-cis-epoxycarotenoid dioxygenasa

PA kyselina faseová

PHR fotolyáze příbuzná doména kryptochromu

phyB fytochrom B

P_R forma fytochromu absorbující červené světlo

P_{RF} forma fytochromu absorbující dlouhovlnné červené světlo

PSII fotosystém II

PYL receptory pyrabactinové resistance

RL červené světlo

SA kyselina salicylová

SDR enzym - Short-chain dehydrogenase/reductase

START star-related-lipid transfer

UV ultrafialové záření

ZEP zeaxanthin epoxidasa