



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Úloha fotoreceptorů v ABA-regulovaném klíčení
semen a růstu rostlin rajčete *Solanum
lycopersicum***

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Barbora Drozdová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2023

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:

Jméno a příjmení autora	Barbora Drozdová
Název práce	Úloha fotoreceptorů v ABA-regulovaném klíčení semen a růstu rostlin rajčete <i>Solanum lycopersicum</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Světlo a kyselina abscisová (ABA) jsou důležitými faktory ovlivňujícími klíčení semen a následný vývoj semenáčků. Tato bakalářská práce byla zaměřena na vliv modrého a červeného světla na klíčení semen rajčete a růst hypokotylu a kořenu za působení různých koncentrací exogenní ABA. K experimentům byly použity mutované rostliny rajčete *Solanum lycopersicum* L. s defekty ve fytochromu B1 (*tri1*) a fytochromu A (*fri1*). Semena a semenáčky byly kultivovány ve tmě, na modrém a červeném světle na kultivačním médiu s různou koncentrací ABA. Výsledky této bakalářské práce potvrdily, že světlo má na klíčení semen a prodlužování hypokotylu rajčete inhibiční efekt, a na růst kořene naopak efekt stimulační. Zároveň bylo pomocí genetického přístupu zjištěno, že citlivost klíčících semen k exogenní ABA je ovlivňována modrým světlem prostřednictvím PHYA a červeným světlem prostřednictvím PHYB1. Dále bylo zjištěno, že PHYA zprostředkovává vliv BL a RL na citlivost hypokotylu k ABA, a také vliv BL na citlivost kořenů k ABA.

Klíčová slova	Fotoreceptory, ABA, klíčení, růst, <i>Solanum lycopersicum</i> , mutant <i>tri1</i> , mutant <i>fri1</i>
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Barbora Drozdová
Title of thesis	Role of photoreceptors in ABA-regulated seed germination and plant growth in tomato <i>Solanum lycopersicum</i>
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

Light and abscisic acid (ABA) are important factors affecting seed germination and subsequent seedling development. This bachelor thesis focused on the effect of blue and red light on tomato seed germination and hypocotyl and root growth under the influence of different concentrations of exogenous ABA. Mutant tomato plants of *Solanum lycopersicum* L. with defects in phytochrome B1 (*tri1*) and phytochrome A (*fri1*) were used for the experiments. Seeds and seedlings were cultured in the dark, under blue and red light on culture medium containing different concentrations of ABA. The results of this bachelor thesis confirmed that light has an inhibitory effect on seed germination and hypocotyl elongation in tomato, and a stimulatory effect on root growth. At the same time, using a genetic approach, it was found that the sensitivity of germinating seeds to exogenous ABA is influenced by blue light through PHYA and by red light through PHYB1. It was also found that PHYA mediates the effect of BL and RL on hypocotyl sensitivity to ABA, and also, the effect of BL on root sensitivity to ABA.

Key words	Photoreceptors, ABA, germination, growth, <i>Solanum lycopersicum</i> , mutant <i>tri1</i> , mutant <i>fri1</i>
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. za použití citované literatury.

.....

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování:

Ráda bych tímto poděkovala vedoucímu bakalářské práce prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, čas a trpělivost, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce poskytl.

OBSAH

1	ÚVOD A CÍLE PRÁCE	8
2	TEORETICKÁ ČÁST.....	9
2.1	Klíčení semen	9
2.2	Růst rostlin	10
2.3	Světlo.....	11
2.3.1	Receptory světla	11
2.3.1.1	Fytochromy	12
2.3.1.2	Krytochromy	14
2.3.1.3	Fototropiny	15
2.3.1.4	Rodina receptorů ZEITLUPE.....	16
2.4	Kyselina abscisová	17
2.4.1	Chemická struktura kyseliny abscisové	17
2.4.2	Biosyntéza kyseliny abscisové.....	18
2.4.3	Katabolismus kyseliny abscisové.....	20
2.4.4	Signální dráha kyseliny abscisové	21
2.4.5	Interakce světla a kyseliny abscisové.....	23
3	PRAKTICKÁ ČÁST	27
3.1	Rostlinný materiál	27
3.2	Pracovní postupy	27
3.2.1	Příprava kultivačního média	27
3.2.2	Klíčení semen.....	28
3.2.2.1	Povrchová sterilizace.....	28
3.2.2.2	Příprava kultivačního média se zvolenými koncentracemi ABA ...	28
3.2.2.3	Výsev semen.....	29
3.2.2.4	Vyhodnocení klíčivosti.....	29
3.2.3	Růst rostlin	30
3.2.3.1	Vyhodnocení růstu.....	31
4	VÝSLEDKY	32
4.1	Klíčivost a inhibice klíčivosti semen cv. GT a mutanta <i>tril</i>	32
4.1.1	Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta <i>tril</i>	34
4.2	Klíčivost a inhibice klíčivosti semen cv. MM a mutanta <i>fri1</i>	36
4.2.1	Kinetika klíčení cv. MM a mutanta <i>fri1</i>	38
4.3	Růst a inhibice růstu rostlin cv. GT a mutanta <i>tril</i>	40
4.4	Růst a inhibice růstu rostlin cv. MM a mutanta <i>fri1</i>	43

5	DISKUZE	47
5.1	Klíčení semen	47
5.2	Růst rostlin	48
6	ZÁVĚR	51
7	POUŽITÁ LITERATURA.....	52
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	57

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Klíčení semen je proces začínající prudkou absorpcí vody a končící penetrací kořene osemením (Bewley, 1997). Je ovlivňováno vnějšími faktory, jako je voda, teplota, kyslík či světlo (Bareke, 2018). Zároveň je ovlivňováno vnitřními faktory, a to především kyselinou abscisovou (ABA) a antagonisticky působícími gibereliny (Smith et al., 2010). Růst a vývoj semenáčků je proces začínající penetrací kořene a zahájením růstu hypokotylu (De Wit et al., 2016). Tento proces je taktéž ovlivňován vnějšími i vnitřními faktory. Na rozdíl od klíčení je proces růstu a vývoje semenáčků endogenně řízen především auxinem, ale také i antagonisticky působící ABA (Li et al., 2017). Tato bakalářská práce se soustředila na dva hlavní faktory ovlivňující jak klíčení semen, tak růst a vývoj semenáčků, a to na světlo a ABA. Světelné záření je rostlinami vnímáno pomocí fotoreceptorů, které jsou schopny detekovat velmi široké spektrum světla od 280-750 nm (Galvão and Fankhauser, 2015). Neaktivnějšími oblastmi spektra světelného záření je dlouhovlnné červené záření (710-740 nm), červené záření (650-680 nm) a modré záření (390-500 nm) (Taiz and Zeiger., 2010). Kyselina abscisová je rostlinný hormon, který je klíčový ve fyziologických procesech životního cyklu rostlin a zároveň hraje hlavní roli v odpovědi na biotický a abiotický stres (Li et al., 2017). Studiemi bylo prokázáno, že mezi signálními dráhami světla a ABA dochází ke vzájemným interakcím (De Wit et al., 2016).

Cílem předložené bakalářské práce bylo zkoumání vlivu světla na regulaci klíčení semen a růstu rostlin za působení aplikované ABA. Interakce těchto dvou vlivů byla studována na rostlině *Solanum lycopersicum L.* pomocí genetického přístupu spočívajícího v analýze mutantů. Experimenty byly konkrétně prováděny na mutantech s defektem ve fytochromu B1 (*tri1*, *temporarily red light-insensitive 1*) a s defektem ve fytochromu A (*fri1*, *far-red-insensitive 1*).

Tato bakalářská práce byla vypracována v Laboratoři růstových regulátorů, společném pracovišti PřF Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Klíčení semen

Semeno je samostatná heterotrofní jednotka, která je konstitučně a fyziologicky vybavena pro vznik nového autotrofního organismu – rostliny. Uvnitř semene se nachází embryo, které je obklopeno endospermem a osemením (testou). Zralá semena jsou udržována ve stavu metabolického klidu, tzv. dormance, která zabraňuje vývoji embrya za nepříznivých podmínek (Bewley, 1997). Vznik nového organismu začíná procesem, zvaným klíčení, které je zahájeno, pokud je semeno životaschopné, je překonána dormance a jsou přítomny vnější enviromentální podmínky. Mezi tyto podmínky patří voda, teplota, kyslík, světlo a přítomnost různých typů hub/mikroorganismů umožňujících rozložit obal semene (Bareke, 2018).

Klíčení semen je zahájeno prudkou absorpcí vody, tzv. imbibicí, kdy dochází k obnovení metabolické a respirační aktivity. Poté následuje trávení skladovaných zásob z endospermu a zvyšování metabolické aktivity. Tato fáze je reverzibilní a je možné opětovným vysušením uvést semeno do stavu dormance. Jelikož tyto fáze probíhají uvnitř semene, tak se nazývají neviditelné. Další fází je ukončení klíčení semene kompletní penetrací kořene testou, kdy je výsledkem tzv. viditelné klíčení, a následuje fáze růstu (Bewley, 1997; Nambara and Marion-Poll, 2005; Bareke, 2018). Některá semena vyžadují ke klíčení kromě imbibice také světlo. Taková semena se nazývají fotoblastická (Sawada et al., 2008).

Dormance a klíčení semen je ovlivňováno vnějšími a vnitřními (hormonálními) faktory. Vnější faktory, jako je teplota, množství vody, složení půdy či světlo, regulují endogenní hormony, dle nichž je podpořena dormance nebo klíčení semen (Bareke, 2018). Hlavními endogenními regulátory dormance a klíčení semen jsou fytohormony, a to primárně kyselina abscisová (ABA) a antagonisticky působící gibereliny (GA). GA podporují klíčení semen a negativně regulují jejich dormanci. Naopak endogenní ABA podporuje zrání semen, indukuje a udržuje fázi dormance a zabraňuje předčasnému vyklíčení semen. Význam ABA byl dokázán pomocí studie ABA-deficientních mutantů *Arabidopsis*, rajčat a kukuřice. Tito mutanti postrádali enzymy zapojené do biosyntézy ABA, což u mutantů *Arabidopsis* a rajčat způsobilo nedokončení procesu zrání semen, a u mutantů kukuřice došlo k předčasnému klíčení semen, tzv. viviparii (Smith et al., 2010). Viviparie je stav, kdy nezralá semena zahajují klíčení na mateřské rostlině ještě před oddělením, a je způsobena

nedostatečným množstvím ABA, která za normálních podmínek klíčení semen inhibuje (Penfield, 2017). Dalšími fytohormony účastníci se těchto procesů jsou brassinosteroidy, ethylen, auxiny, cytokininy, strigolaktony, kyselina jasmonová a kyselina salicylová (Shu et al., 2016).

2.2 Růst rostlin

Rostliny jsou přisedlé, fotoautotrofní organismy, které si v důsledku měnících se environmentálních faktorů vyvinuly vysokou plasticitu (Raghavendra et al., 2010). Jejich růst je výsledkem biochemických a biomechanických signálů, které způsobují změny rostlinné formy v průběhu času (Paľubicki et al., 2019).

Růst rostlin začíná po proniknutí kořene osemením a zahájením růstu embryonálního stonku (hypokotyly). Mechanismus prodlužování hypokotyly se znatelně liší dle toho, zda probíhá ve tmě či na světle. Ve tmě vznikají etiolované semenáčky, u nichž dochází k silnému prodloužení hypokotyly, vytvoření apikálního háčku, inhibici vývoje embryonálních listů (kotyledonů) a kořenového systému. A to s využitím růstové strategie zvané skotomorfogeneze, kdy rostlina využívá energetických rezerv z endospermu. Světlo vyvolává tzv. de-etiolizaci a fotomorfogenní růst, kdy dochází k inhibici růstu hypokotyly, rozvinutí apikálního háčku, vývoji kotyledonů a diferenciaci chloroplastů, čímž vzniká soběstačná fotoautotrofní rostlina (Gendreau et al., 1997; De Wit et al., 2016).

Růst rostlin je, stejně jako klíčení semen, regulován kombinací vnějších a vnitřních faktorů. Mezi vnější faktory patří světlo, množství vody, teplota, salinita a další. Růst a vývoj rostlin je endogenně řízen fytohormony, a to především auxinem, který reguluje prodlužování stonku, vývoj meristému, růst adventivních kořenů a apikální dominanci. Dalšími hormony indukujícími růst a diferenciaci rostlin jsou gibereliny a brassinosteroidy. Naopak cytokininy, kyselina abscisová a ethylen jsou fytohormony, které tento růst často potlačují (Gendreau et al., 1997; Li et al., 2017).

2.3 Světlo

Světlo je jedním z hlavních faktorů ovlivňující fyziologii a vývoj rostlin a je primárním zdrojem energie. Světlo však slouží i jako zdroj informace pro rostlinu, působí jako signál. Rostliny vnímají v tomto případě světlo prostřednictvím fotoreceptorů, které vnímají velmi široké spektrum světla od 280-750 nm (Galvão and Fankhauser, 2015). Fotoreceptorové systémy zaznamenávají kvalitu (vlnovou délku), kvantitu (ozáření), trvání a směr světla. Růst a vývoj rostlin je ovlivněn zvláště nejaktivnějšími oblastmi spektra světelného záření, kterými je dlouhovlnné červené záření (710-740 nm), červené záření (650-680 nm) a modré záření (390-500 nm), ultrafialové záření typu A (320-390 nm) a ultrafialové záření typu B (280-320 nm) (Smith et al., 2010; Taiz and Zeiger, 2010).

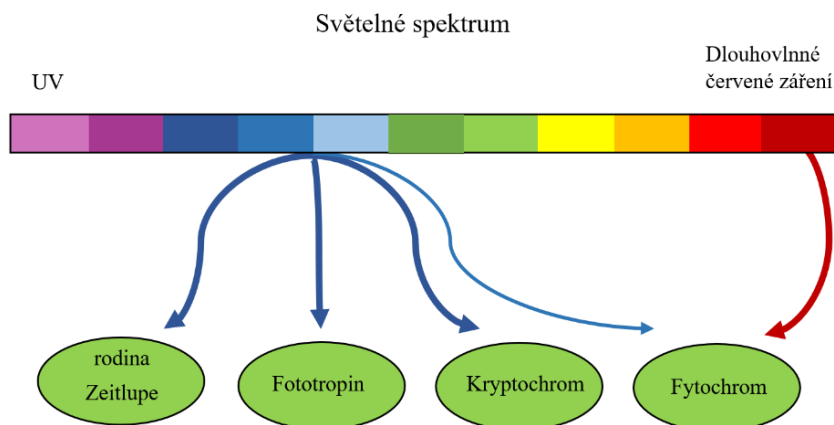
Vývoj a růst vyšších rostlin v důsledku přítomnosti či nepřítomnosti světla probíhá po odlišných drahách. Při růstu na světle vykazují semenáčky fotomorfogenezi. Naopak při růstu ve tmě vykazují klíčící rostlinky skotomorfogenezi a etiolizaci. Při proražení výhonku povrchem půdy dochází k vystavení klíčící rostlinky světlu a k de-etiolaci. Jedná se o proces přechodu ze skotomorfogeneze do fotomorfogeneze, kdy se v reakci na světlo semenáček prodlužuje pomaleji, začne zelenat, vrcholový meristém začne iniciovat vznik listů a vzniká vzrostlá sazenice (Smith et al., 2010).

2.3.1 Receptory světla

Fotoreceptory jsou molekuly, které jsou přítomny v celé rostlině, a které po absorpci světla podléhají strukturální, energetické nebo konformační změně. Hlavní funkcí fotoreceptorů je detekovat světlo o určité vlnové délce a následně pomocí signálně-transdukční kaskády vyvolat vhodnou odezvu. Reakce na světelný signál může být v místě vnímání světla (např. pohyb chloroplastů) nebo v místě vzdáleném od fotopercepce (Smith et al., 2010; Galvão and Fankhauser, 2015).

Fotoreceptory jsou podle své specifické molekulové struktury citlivé na světlo o různých vlnových délkách, dle čehož jsou rozděleny do jednotlivých rodin (Obrázek 1). Jako fytochromy se označují fotoreceptory, které reagují primárně na červené a dlouhovlnné červené světlo, které má největší vliv na fotomorfogenezi. Další skupinou jsou kryprochromy, které detekují primárně modré a ultrafialové oblasti spektra.

Modré světlo přijímají také fototropiny. Tato skupina fotoreceptorů je zodpovědná za fototropismus, světlem vyvolané otevírání a zavírání průduchů, pohyby chloroplastů, či ranou fází inhibice růstu hypokotylu. Poslední skupinou receptorů je rodina Zeitlupe, která také detekuje modré a UV-A záření (Christie, 2007; Smith et al., 2010).



Obrázek 1: Diagram ukazující různé vlnové délky aktivující čtyři rodiny fotoreceptorů. Vytvořeno v Microsoft Office Word. Inspirováno Smith et al., 2010.

2.3.1.1 Fytochromy

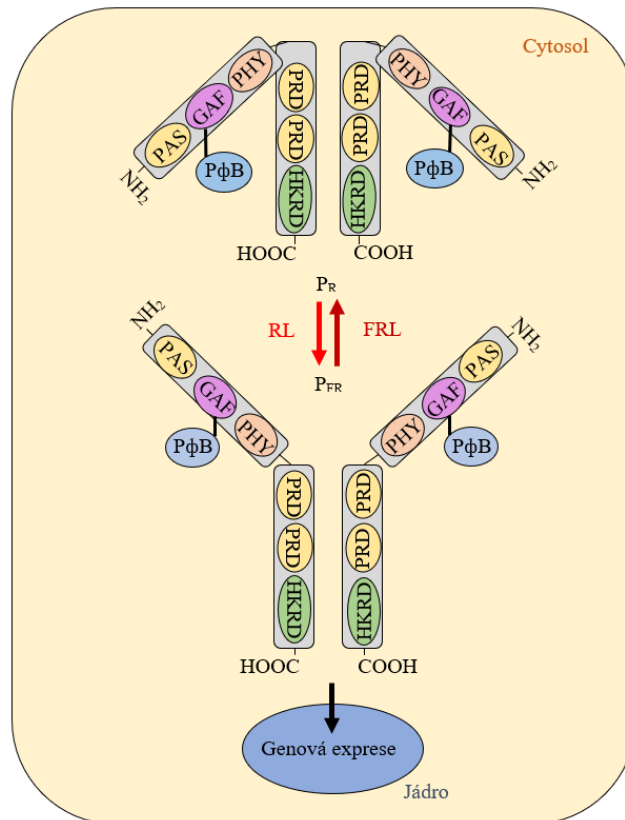
Fytochromy jsou homodimerní proteiny sestávající se ze dvou identických polypeptidových řetězců – apoproteinů. Na jejich cysteinovém zbytku je thioetherovou vazbou připojený fytochromobilin ($P\phi B$), což je fotoreaktivní lineární tetrapyrolový chromofor. Ten zachycuje světelné záření, čímž dochází ke konformační změně proteinu, který iniciuje změny v genové expresi, což vede ke vhodné růstové reakci rostliny. Tyto fotoreceptory regulují klíčení semen, vývoj semenáčků a všechny aspekty fotomorfogenního vývoje rostlin. Fytochromy se nenacházejí pouze ve vyšších rostlinách, ale jim podobné proteiny byly nalezeny i v nižších rostlinách, řasách, sinicích a bakteriích (Smith et al., 2010; Pham et al., 2018; Cheng et al., 2021; Kircher et al., 2011).

Fytochromy jsou schopny velmi rychle reagovat na změny ve složení dopadajícího světla, čímž umožňují dynamickou adaptaci rostlin. Této vlastnosti je dosaženo pomocí dvou fotoreverzibilních forem fytochromů – P_R a P_{FR} . Fytochrom se ve svém základním neaktivním stavu (P_R) nachází v cytosolu, kde absorbuje červené světlo ($\lambda_{max}=660$ nm), čímž dochází k přeměně na fyziologicky aktivní formu P_{FR} , která je následně translokována do jádra. Fyziologicky aktivní forma fytochromu může být absorpcí dlouhovlnného červeného záření ($\lambda_{max}=730$ nm) přeměněna zpět na P_R .

Při těchto přeměnách dochází ke změnám proteinové struktury a zároveň biologické aktivity (Hughes, 2013; Cheng et al., 2021). Tato reverzibilní přeměna P_R na P_{FR} a následný transport P_{RF} do jádra je zobrazena na obrázku 2.

Apoprotein fytochromu se skládá z N-terminální a C-terminální části, které jsou oddělené patovou oblastí, která hraje klíčovou roli při přeměně P_R na P_{FR} formu. N-terminální polovina fytochromu obsahuje doménu PAS (Period/Arnt/Single-minded), GAF (cGMP fosfodiesteráza/Adenylyl cykláza/Fh1A), sloužící k vazbě fytochromobilinu, a PHY, sloužící ke stabilizaci P_{FR} formy fytochromu. C-terminální část molekuly po směru od pantové části obsahuje dvě repetice domény PRD (PAS-Repeat Domain), jejichž funkcí je nasměrování aktivní formy P_{FR} do jádra, a doménu histidinkinázy (HKRD) (Taiz and Zeiger, 2010).

Fytochromy jsou kódovány rodinou genů, které byly poprvé popsány u *Arabidopsis thaliana*. Tato rodina se skládá z pěti strukturně příbuzných členů *PHYA* – *PHYE*. Funkčně dominantními jsou především *PHYA* a antagonicky působící *PHYB* (Taiz and Zeiger, 2010). Fytochromy se rozdělují na labilní na světle (typ I) a stabilní na světle (typ II). Do první skupiny se řadí pouze *PHYA*, který hraje hlavní roli ve vývoji semenáčků, a to primárně při přechodu ze tmy na světlo. Fytochrom A se hromadí v cytoplazmě etiolovaných rostlin, kdy při prvním kontaktu se světlem, dochází k jeho rychlé degradaci, což iniciuje fotomorfogenní vývoj rostliny (Smith et al., 2010; Cheng et al., 2021). Fytochrom A zprostředkovává odezvy s vysokou intenzitou (HIR), ale také odezvy s velmi nízkou ozářeností (VLFR), které ostatní fytochromy nejsou schopny odlišit od tmy. Do druhé antagonisticky působící skupiny se řadí *PHYB* – *PHYE*, které zprostředkovávají odezvy o nízké ozářenosti (LFR). Fytochrom B reguluje fotomorfogenní vývoj rostlin a zároveň termo-morfogenezi (Kircher et al., 2011; Cheng et al., 2021). Fytochromy C, D a E jsou strukturně podobné *PHYB*, s jehož funkcemi se zároveň překrývají. Tyto fytochromy jsou zodpovědné za kontrolu kvetení, prodlužování řapíku a internodií (Taiz and Zeiger, 2010). U *Solanum lycopersicum L.* bylo identifikováno pět genů kódující fytochromy značené A, B1, B2, E a F (Rosado et al., 2016).



Obrázek 2: Přeměna inaktivní formy (P_R) na aktivní formu (P_{FR}) fytochromu a zpět prostřednictvím červeného (RL)/dlouhovlnného červeného světla (FRL). A následný transport P_{FR} do jádra. Vytvořeno v Microsoft Office Word. Inspirováno Taiz and Zeiger, 2010.

2.3.1.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou hlavními receptory modrého a UV-A světla, které zprostředkovávají fotoreakce v rostlinách, jako je prodlužování hypokotylu, depolarizace membrán, podpora expanze kotyledonů, produkce anthokyanů či regulace cirkadiálních rytmů. Tyto fotoreceptory jsou lokalizované v jádře, a kromě rostlin jsou přítomny i v bakteriích, archeích, houbách a živočiších (Taiz and Zeiger, 2010).

Kryptochromy vykazují strukturální podobnost k DNA fotolyázám, což jsou fotoresponzivní enzymy katalyzující opravy DNA poškozené UV zářením (Wang and Lin, 2020). Kryptochromy jsou definovány dvoudoménovou strukturou, a to N-terminální fotolyázovou doménou (PHR) a C-terminální doménou (CCE), která se u DNA fotolyáz nevyskytuje. N-terminální doména váže dva chromofory: flavin adenin dinukleotid (FAD) a 5, 10 - methyltetrahydrofolát, tzv. pterin (Li and Yang, 2007).

Ten absorbuje modré světlo a získanou excitační energii přenáší do FAD, čímž je aktivována fotolyáza. Rostlinné kryptochromy, i přes stejný princip přenosu energie, tuto fotolyázovou aktivitu nevykazují (Taiz and Zeiger, 2010). C-terminální doména po absorpci modrého světla mění svou konformaci a zprostředkovává přenos signálu a následně světelnou odpověď (Lin and Shalitin, 2003).

Rodina kryptochromů byla poprvé identifikována v *Arabidopsis thaliana*, jejíž genom obsahuje tři členy: *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*. Jako první byl detekován gen *HY4*, později přejmenovaný na *CRY1*, kódující kryptochrom 1 (Mao et al., 2014). Protein *CRY1* je na světle stabilní, kdežto *CRY2* se na světle degraduje. *CRY1* a *CRY2* jsou proteiny lokalizované v jádře, které zodpovídají za regulaci světlem řízených procesů, jako jsou de-etiolace, programovaná buněčná smrt či navození kvetení (Fantini et al., 2019). Kryptochrom 3 je lokalizován v chloroplastech a mitochondriích, avšak jeho funkce je v současnosti neznámá. *CRY3* patří do podskupiny *CRY DASH* fotolyáz/kryptochromů, která je pomocí fotolyázové aktivity schopna opravy poškozené jednořetězcové DNA (Li and Yang, 2007; Mao et al., 2014).

U *Solanum lycopersicum L.* byly identifikovány čtyři kryptochromové geny: *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY3*. *CRY1a* se podílí na fotomorfogenním vývoji rostlin a biosyntéze antokyanů a karotenoidů. Ostatní kryptochromy jsou zodpovědné za regulaci cirkadiálních transkripčních rytmů (Fantini et al., 2019).

Nedávnými studiemi bylo zjištěno, že *Marchantia polymorpha* obsahuje jediný kryptochrom, a to *MpCRY*. Ten se po ozáření modrým světlem lokalizuje do jádra, kde dojde k vlastní interakci a fosforylaci, čímž se aktivuje protein potlačující inhibiční účinek ABA. *MpCRY* vykazuje vysokou homologii s receptory *CRY* nacházející se u *Arabidopsis thaliana*. *MpCRY* se podílí na regulaci dormance semen, prodlužování hypokotylu a kvetení rostlin (Liao et al., 2023).

2.3.1.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory modrého a UV-A světelného záření, jejichž název je odvozen od jejich funkční role ve fototropismu (Christie, 2007). Kromě fototropismu reguluje také další procesy, které zásadně zlepšují fotosyntetickou účinnost, jako je otevírání a zavírání průduchů či pohyby chloroplastů (Legrís and Boccaccini, 2020).

Pozemní rostliny obsahují dva fototropiny, a to PHOT1 a PHOT2. Ve fototropismu se role obou receptorů překrývá, avšak jejich relativní příspěvek závisí na podmínkách prostředí. PHOT1 i PHOT2 zprostředkovávají reakce za vysoké intenzity modrého světla, avšak pouze PHOT1 je schopný regulovat fototropismus hypokotylu i při nízké intenzitě záření, a to i pod $1 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2} \text{ s}^{-1}$. Za zhoršených světelných podmínek PHOT1 a PHOT2 podporují zachycení světla aktivací pohybu chloroplastů k hornímu povrchu buňky. Naopak při vysoké intenzitě záření PHOT2 reguluje vyhýbavý pohyb chloroplastů od místa ozařování, čímž se zabraňuje poškození fotosyntetického aparátu (Christie, 2007; Legris and Boccaccini, 2020).

Fototropiny jsou světlem aktivované flavinové proteiny, které obsahují dva segmenty: fotosenzorickou N-terminální doménu a C-terminální doménu obsahující na svém konci serin-threonin kinázu. N-terminální doména obsahuje dvě velmi podobné domény – LOV1 a LOV2 (Light – Oxygen – Voltage). Domény LOV váží chromofor flavin mononukleotid (FMN) a cysteinové zbytky. Přes svou strukturní podobnost mají domény LOV různé funkce. LOV1 pravděpodobně podporuje fotodimerizaci a moduluje fotoreaktivitu LOV2. Naopak LOV2 hraje hlavní roli v regulaci kinázové aktivity fotoreceptorů (Kimura and Kagawa, 2006; Christie, 2007; Legris and Boccaccini, 2020).

2.3.1.4 Rodina receptorů ZEITLUPE

Modré záření absorbuje také rodina receptorů ZEITLUPE, jejichž funkcí je regulace cirkadiálních rytmů a kvetení rostlin. Členy této rodiny jsou fotoreceptory ZTL (ZeiTLuPe), FKF1 (Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1) a LKP2 (Lov Kelch Protein 2).

Fotoreceptory ZEITLUPE jsou charakteristické obsahem N-terminální domény LOV, která je vázána s F-boxem a C-terminální doménou se šesti Kelchovými repeticemi. Funkcí domény LOV je absorpce modrého světla a následné zprostředkování vhodné biochemické odpovědi. F-box umožňuje interakce s proteiny. ZEITLUPE tak vytváří multiproteinový E3 ubiquitin ligázový komplex regulující degradaci proteinů zprostředkovanou světlem. ZTL a LKP2 proteiny regulují především cirkadiální rytmy a FKF1 zprostředkovává regulaci kvetení (Suetsugu and Wada, 2013; Galvão and Fankhauser, 2015).

2.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon, který hraje důležitou roli v odpovědi na biotický a abiotický stres, jako je sucho, chlad či vysoká salinita půdy. Je také klíčový ve fyziologických procesech životního cyklu rostlin, mezi které patří vývoj embryí a zrání semen, dormance a klíčení semen, vegetativní vývoj, růst kořenů, pohyb průduchů, kvetení a senescence. Jde o fytohormon, který je syntetizován téměř ve všech buňkách obsahujících chloroplasty nebo amyloplasty. ABA byla kromě rostlin nalezena i v některých bakteriích, houbách a v různých metazoanech, a to od mořských hub až po lidi. Avšak jako klíčová signální molekula funguje pouze v rostlinách, kdežto u jiných organismů se jedná o sekundární metabolickou složku (Li et al., 2017).

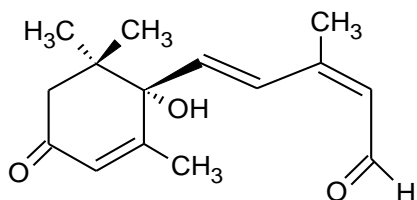
ABA byla izolována v různých nezávislých studiích. Na začátku 60. let 20. století byla z mladých plodů bavlny izolována sloučenina urychlující abscisi, označovaná jako „abscisin II“, a zároveň byla z listů platanu separována sloučenina vyvolávající dormanci, zvaná „dormin“. V roce 1965 bylo zjištěno, že chemická struktura abscisinu II a dorminu je totožná, a tak byla sloučenina přejmenována na kyselinu abscisovou. Tento název je odvozen od původního předpokladu, že tato sloučenina navozuje abscisi, avšak, jak později bylo zjištěno, tento proces navozuje ethylen (Buchanan et al., 2015).

2.4.1 Chemická struktura kyseliny abscisové

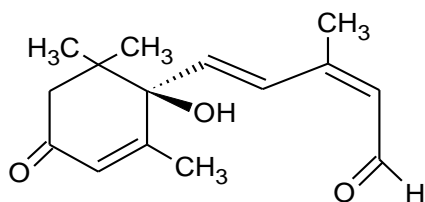
Kyselina abscisová je patnácti uhlíkatý seskviterpen odvozený od karotenoidů, jehož sumární vzorec je $C_{15}H_{20}O_4$. Molekulová struktura ABA obsahuje řadu vlastností ovlivňujících její biologickou aktivitu. Skládá se z cyklohexanového kruhu a uhlovodíkového postranního řetězce (Cutler et al., 2010; Ng et al., 2014).

Na cyklohexanový kruh je navázána monomethylová, dimethylová, ketonová a hydroxylová skupina. Na pozici 1' je přítomen chirální uhlík, který zajišťuje optickou aktivitu ABA. Tento asymetrický uhlík určuje, zda se jedná o *S* (+) nebo *R* (-) enantiomer. Dále se na tento kruh váže uhlovodíkový postranní řetězec, který obsahuje dvě dvojně vazby (pozice 2, 4) a je konjugovaný se skupinou karboxylové kyseliny. Karboxylová kyselina se nachází na 2 uhlíku postranního řetězce a její orientací jsou určeny *trans* nebo *cis* izomery ABA. Přirozeně vyskytující se biologicky aktivní izomer je (+)-2-*cis*-4-*trans*-ABA (Obrázek 3). Otočením cyklohexanového

kruhu kolem chirálního uhlíku dochází ke vzniku nepřírozeného *R* (-) enantiomeru s nízkou biologickou aktivitou (Obrázek 4). Působení světla na tyto konformace dochází k izomerizaci na neaktivní formu 2-*trans*-4-*trans*-ABA. Komerčně je ABA k dostání ve směsi *S* a *R* forem v přibližně stejných množstvích (Ng et al., 2014; Li et al., 2017).



Obrázek 3: Chemická struktura (*S*)-*cis*-ABA. Vytvořeno v aplikaci ChemSketch.



Obrázek 4: Chemická struktura (*R*)-*cis*-ABA. Vytvořeno v aplikaci ChemSketch.

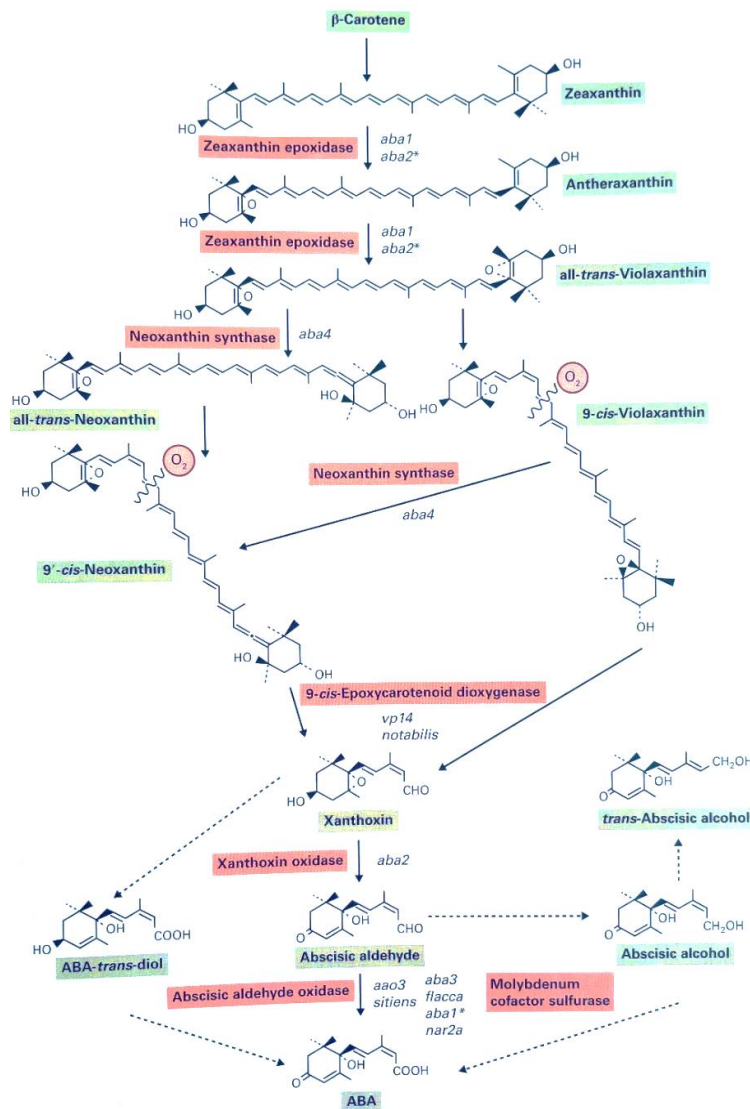
2.4.2 Biosyntéza kyseliny abscisové

Rozsah odpovědi ABA na biotické či abiotické stresy závisí na její koncentraci v konkrétní rostlinné tkáni a na citlivosti tkáně na ABA. Jedním z regulačních mechanismů koncentrace endogenní ABA je biosyntéza.

Rostliny syntetizují ABA nepřímou cestou pomocí meziproductů tzv. karotenoidní dráhou, která začíná v chloroplastech či dalších plastidech. Zde je syntetizována isoprenoidní jednotka C₅, tedy isopentenylidifosfát (IPP), který je také prekurzorem cytokininů, gibberelinů a brassinosteroidů. Následně, přidáním tří molekul IPP k dimethylallyldifosfátu, vzniká C₂₀, tedy geranylgeranyl difosfát (GGPP), což je prekurzor plastidových isoprenoidů včetně karotenoidů.

Biosyntéza karotenoidů začíná kondenzací dvou molekul GGPP za katalýzy fytoensyntázou a následným vznikem fytoenu. Poté dochází k desaturaci, izomeraci a cyklizaci, což vede k produkci α -, nebo β -karotenu. Avšak pouze β -karoten je dále hydroxylován na zeaxanthin, který je následně metabolizován na biologicky aktivní ABA (Li et al., 2017).

Ke konverzi zeaxanthinu na *trans*-violaxanthin dochází přes intermediální anthraxanthin, a to pomocí zeaxanthin epoxidázy (ZEP). Za katalýzy enzymu neoxanthinsyntáza vzniká *trans*-neoxanthin, který je izomerací převeden na 9'-*cis*-neoxanthin. Následuje hlavní regulační krok biosyntézy ABA, a to xantofylové štěpení, kdy je štěpena *cis* forma neoxanthinu enzymem NCED (9-*Cis*-Epoxykarotenoid Dioxygenases) za vzniku produktu C₁₅, xanthoxinu, a metabolitu C₂₅. Xanthoxin se následně přesouvá do cytosolu, kde je pomocí enzymu SDR (Short-chain Dehydrogenases/Reductases) přeměněn na ABA-aldehyd, který je enzymem AAO3 (Abscisic Aldehyd Oxygenases 3) oxidován na konečný produkt, a to na biologicky aktivní kyselinu abscisovou (Nambara and Marion-Poll, 2005; Ng et al., 2014). Výše popsaná biosyntetická dráha ABA je zobrazena na Obrázku 5.



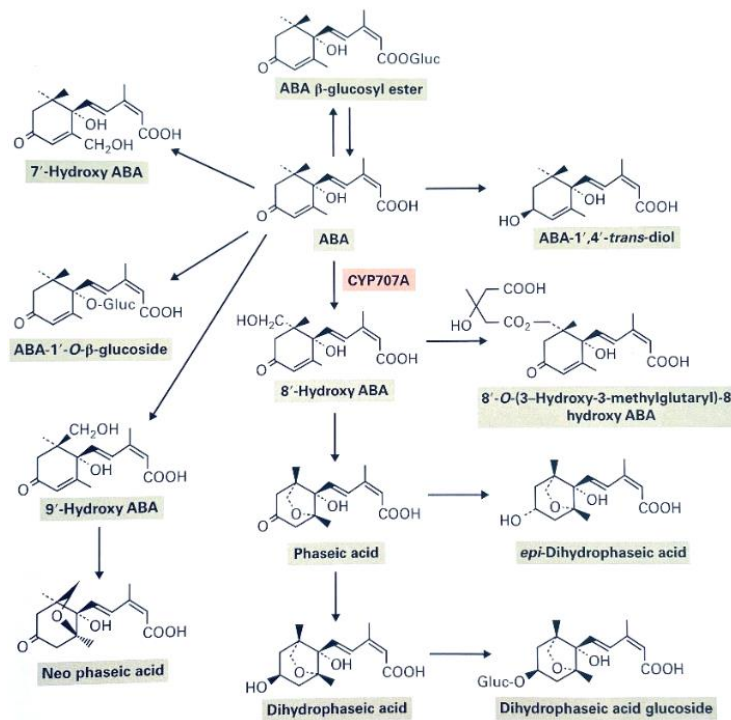
Obrázek 5: Biosyntetická dráha ABA v rostlinách. Převzato a upraveno z Buchanan et al., 2015.

2.4.3 Katabolismus kyseliny abscisové

Hladina endogenní ABA je v rostlinách regulována nejenom biosyntézou, ale také jejím katabolismem. K zahájení degradace ABA dochází v případě snížení stresových signálů. Její degradací vznikají biologicky neaktivní katabolity, čímž je snížena endogenní hladina ABA. Katabolismus ABA probíhá dvěma typy reakcí, a to hydroxylací nebo konjugací (Nambara and Marion-Poll, 2005).

K hydroxylaci ABA dochází jednou ze tří biologicky aktivních methylových skupin, které jsou vázané na kruhové strukturu – C-7', C-8' a C-9'. Za dominantní katabolický proces ABA je považována 8'-hydroxylační dráha. Tou dochází ke konverzi ABA na nestabilní meziproduct 8'-hydroxy ABA, a to za katalýzy ABA 8'-hydroxylázy, což je monooxygenáza typu CYP450, která je kódována rodinou genů *CYP707A*, k jejichž expresi dochází za sucha při dehydrataci nebo v reakci na vysokou vlhkost. ABA 8'-hydroxyláza je pravděpodobně hlavním regulačním enzymem mnoha fyziologických procesů rostlin (Ng et al., 2014). Nestabilní 8'-hydroxy ABA je dále spontánně cyklizována za vzniku kyseliny faseové (PA), která je rozpustnou reduktázou katabolizována na neaktivní kyselinu 4'-dihydrofaseovou (DPA). PA a DPA jsou nejhojnějšími katabolity ABA a jejich vznikem klesá biologická aktivita ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005; Buchanan et al., 2015).

Alternativní cestou v katabolismu ABA je konverze na 7'-hydroxy ABA a 9'-hydroxy ABA, která se cyklizuje na kyselinu neofaseovou (Neo PA) (Zhou et al., 2004; Nambara and Marion-Poll, 2005). Další možnou cestou je konjugace ABA či jejich hydroxylovaných katabolitů s glukózou. Nejrozšířenějším konjugátem je ABA- β -glukosylester (ABA-GE), který může fungovat jako zásobní molekula. Spolu s konjugátem ABA-1'-O-glukosidem jsou považovány za biologicky neaktivní a během stárnutí se hromadí ve vakuolách a apoplastu (Ng et al., 2014; Buchanan et al. 2015). Tato výše popsaná katabolická dráha ABA je zobrazena na Obrázku 6.



Obrázek 6: Katabolická dráha ABA v rostlinách. Převzato a upraveno z Buchanan et al., 2015.

2.4.4 Signální dráha kyseliny abscisové

Vyšší rostliny jsou přisedlé organismy, jejichž produktivita je neustále ovlivňována působením různých patogenů a abiotickým stresem. Fytohormon ABA je hlavním endogenním poslem těchto stresových situacích (Raghavendra et al., 2010). ABA se účastní reakcí způsobující jak krátkodobou fyziologickou, tak dlouhodobou vývojovou odpověď. Při krátkodobých reakcích nejčastěji dochází ke změně v tocích iontů přes membrány či k regulaci určitých genů (např. zavírání průduchů). Kdežto při dlouhodobých reakcích jsou prováděny významné změny v genové expresi (např. zrání semen). K aktivaci signální transdukční dráhy a získání fyziologické odpovědi na vnější vlivy dochází interakcí hormonu se specifickým extracelulárním nebo intracelulárním ABA receptorem (Taiz and Zeiger, 2010).

Pro identifikaci ABA receptorů se využívají biochemické, buněčné a genetické přístupy, avšak pouze tři třídy ABA receptorů jsou v současné době dostatečně popsány. Mezi ně se řadí podjednotka Mg^{2+} chelatázy (ChlH) lokalizovaná v plastidech, která se účastní syntézy chlorofylu, signalizace a koordinuje expresi plastidových a jaderných genů. Dalšími ABA receptory jsou GPCR (G-Protein Coupled Receptor), přesněji GTG1 a GTG2 (GPCR-Type G protein) proteiny. Jde o

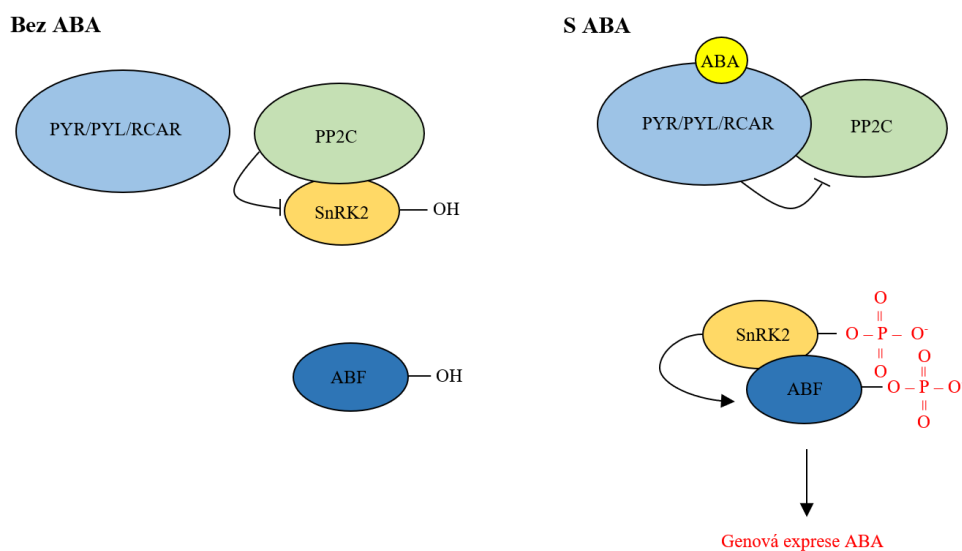
receptory spřažené s G proteiny nacházející se na plazmatické membráně regulující otevírání a zavírání průduchů. Třetí třídou nacházející se v cytosolu i v jádře je rodina rozpustných receptorů PYR/PYL/RCAR (PYrabactin Resistance/PYR1-Like/Regulatory Components of ABA Receptors), která patří do superrodiny vazebných proteinů START (STERoidogenic Acute Regulatory protein-related lipid-Transfer) (Cutler et al., 2010; Taiz and Zeiger, 2010).

Rodina PYR/PYL/RCAR je v současnosti nejdetailněji popsanou třídou ABA receptorů. Jako člen superrodiny START jsou charakteristické konzervovaným „helix-grip“ záhybem tvořícím hydrofobní kapsu, do které se váže ligand. Tato rodina receptorů ABA byla zkoumána čtyřmi samostatnými výzkumnými skupinami, kdy byl u *Arabidopsis thaliana* nejprve chemicko-genetickým screeningem identifikován agonista ABA, pyrabactin. Dalšími screeny byl u mutantů *Arabidopsis thaliana* rezistentních na pyrabactin identifikován gen *PYR1* a následujícími studii bylo detekováno 13 příbuzných členů této rodiny, označovaných jako *PYL1* – *PYL13*, kdy u všech členů (s výjimkou *PYL13*) je vnímání ABA aktivní (Cutler et al., 2010; Taiz and Zeiger, 2010; Weiner et al., 2010).

Základním mechanismem modulace přenosu signálu v živých organismech je reverzibilní fosforylace proteinů. Ta je zprostředkována kinázami a fosfatázami. V rostlinách představují hlavní rodinu fosfatáz PP2C (Protein Phosphatases C type 2), které fungují jako negativní regulátory ABA signalizace. V *Arabidopsis thaliana* se PP2C shlukují do 10 skupin označovaných A-J. Kdy ve skupině A bylo prokázáno, že nejméně 6 členů se účastní přenosu signálu ABA, z nichž jsou nejlépe charakterizovány ABI1, ABI2 a HAB1. Naopak pozitivním regulátorem ABA signalizace je protein kináza SnRK2 (SNF1-Related protein Kinase 2) patřící do skupiny SnRK, která je klasifikována do tří skupin – SnRK1, SnRK2 a SnRK3. Skupina SnRK1 má vysokou homologii s kvasinkovým SNF1 a savčím AMPK, které slouží jako metabolické regulátory. Kdežto SnRK2 a SnRK3 jsou skupiny jedinečné pro rostliny podílející se na buněčné signalizaci (Ng et al., 2014).

Receptory PYR/PYL/RCAR obsahují hydrofobní kapsu vázající ligand – hormon ABA. ABA se váže v hydrofobní dutině receptoru, čímž dochází ke konformační změně smyček lemujících hydrofobní kapsu. Tím vzniká interakční povrch umožňující navázání PPC2. Takto inhibovaná PP2C umožňuje akumulaci

aktivovaných SnRK2, čím dochází k fosforylaci ABFs (ABA-responsive element Binding Factors), aktivaci bZIP transkripčních faktorů (basic leucin ZIPper) a vzniku ABA odpovědi. V nepřítomnosti ABA nedochází k interakci mezi receptory PYR/PYL/RCAR a PP2C. Aktivní PP2C defosforyluje SnRK2 a nedochází tak ke vzniku ABA odpovědi. (Cutler et al., 2010). Tato výše popsaná signalizační dráha je zobrazena na Obrázku 7.



Obrázek 7: Signální dráha kyseliny abscisové. Vytvořeno v Microsoft Office Word. Převzato z Cutler et al., 2010.

2.4.5 Interakce světla a kyseliny abscisové

Světlo je jedním z nejdůležitějších enviromentálních faktorů ovlivňujících růst a vývojové procesy životního cyklu rostlin. Reakce na světelné podněty jsou v rostlinách zprostředkovány změnami v hormonálním metabolismu, což dokazuje, že mezi signálními drahami světla a hormonů dochází k interakcím. Znalost průběhu těchto interakcí je však v současnosti málo objasněná (De Wit et al., 2016).

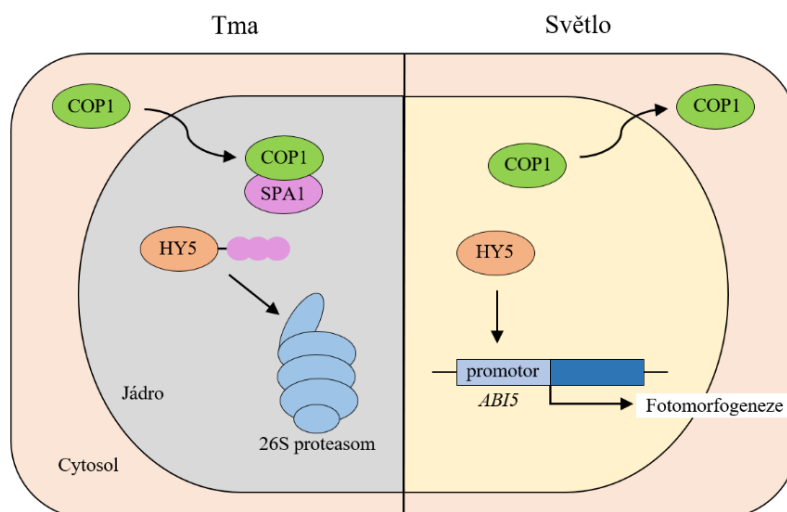
Klíčení semen je regulováno pomocí fotokonverktivních fytochromů, které ovlivňují hladiny fytohormonu ABA, která klíčení inhibuje, a GA, která klíčení indukuje (De Wit et al., 2016). Při kombinaci modrého (BL), červeného (RL) a dlouhovlnného červeného světla (FRL) se hladina ABA snižuje, což dokazuje, že interakce mezi BL a RL (či FRL) modulují endogenní ABA v rostlinných tkáních (Fellner and Sawhney, 2002).

U semen *Lactuca sativa* L. a *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že PHYA a PHYB jsou aktivovány po ozáření RL, čímž je snížena hladina ABA, zároveň je indukována biosyntéza GA a dochází k aktivaci klíčení. Ke snížení množství ABA dochází zvýšením exprese genů kódujících 8'-hydroxylázu, která degraduje aktivní ABA, a snížením exprese genů kódujících enzym NCED, jehož úkolem je aktivace biosyntézy ABA (Sawada et al., 2008; De Wit et al., 2016). Ke zvrácení procesu klíčení může dojít pulzem FRL v počáteční fázi imbibice, který inaktivuje PHYB v endospermu. Následně je aktivována biosyntéza ABA, která inhibuje biosyntézu GA stimulovanou PHYA, čímž inhibuje klíčení semene. Při ozáření semen v pozdější fázi imbibice FRL dochází k aktivaci PHYA, biosyntéze GA a opětovnému zahájení klíčení (De Wit et al., 2016).

Dalšími faktory účastníci se přenosu signálu ABA u *Arabidopsis thaliana* jsou proteinové fosfatázy ABI1 a ABI2 a transkripční faktory leucinových zipů (bZIP) ABI3 – ABI5 (ABA-Insensitive 1-5). K aktivaci exprese genu *ABI5* dochází po navázání pozitivního světelného regulátoru HY5 (elongated HYpocotyl 5) na promotor, což vede k inhibici klíčení semen a následného vývoje semenáčků. HY5 tedy podporuje fotomorfogenezi a reguluje téměř jednu třetinu genové exprese genomu *Arabidopsis*. V přítomnosti ABA je vazba HY5 na *ABI5* promotor zvýšena. (Xu et al., 2014; Bhagat et al., 2021).

Klíčovou roli v ABA signalizaci hraje gen označovaný *COP1* (*C*onstitutively *P*hotomorphogenic1). Jedná se o E3 ubiquitin ligázu, která funguje jako centrální represor fotomorfogenního vývoje semenáčků ve tmě. Nedávnými studiemi u *Arabidopsis thaliana* bylo potvrzeno, že během růstu semenáčků ve tmě funguje COP1 jako pozitivní regulátor signalizace ABA, kdy dochází k indukci akumulace transkripčního faktoru ABI5. Ve tmě se COP1 nachází v jádře, kde interaguje s proteinem SPA (Supressor of PhyA-105) za vzniku komplexu způsobující ubiquitizaci a degradaci faktorů podporujících fotomorfogenezi. K této degradaci dochází prostřednictvím proteasomu 26S. Po ozáření rostliny je COP1 transportován do cytosolu, což umožňuje akumulaci faktorů podporující fotomorfogenezi (Peng et al., 2022). Dochází tak k aktivaci dráhy HY5-ABI5 (Obrázek 8) a zároveň k akumulaci reaktivních forem kyslíku (ROS). Při nízkých hladinách ROS v semenech se zvyšuje katabolismus ABA. Naopak za stresových podmínek může dojít k nekontrolovatelné akumulaci ROS, což vede k poškození buněk a následné inhibici klíčení semen (Chen

et al., 2022). COP1 reguluje také kvetení, otevírání a zavírání průduchů a reakce na environmentální stresy (Peng et al., 2022).



Obrázek 8: Regulace dráhy HY5-ABI5 prostřednictvím COP1 za světla a za tmy. Vytvořeno v Microsoft Office Word. Inspirováno (Taiz et al., 2010).

Dalšími geny ovlivněnými světlem a ABA jsou geny *LHCB* (*Light-Harvesting Chlorophyll a/b Binding*). Jde o apoproteiny světlo sběrného komplexu fotosystému II (PSII) (Capel et al., 1998). *LHCB* interagují s chlorofyly a xantofyly, čímž vzniká hlavní a nejhojnější anténní komplex pigment-protein v zelených rostlinách. Tento anténní komplex absorbuje sluneční záření a transportuje excitační energii do jádra PSII (Fuciman et al., 2012). Exprese genů *LHCB* je regulována primárně světlem a cirkadiálními rytmy (Capel et al., 1998). Za stresových podmínek je exprese těchto genů regulována také fytohormonem ABA. Při exogenní aplikaci tohoto hormonu dochází ke snížení exprese genů *LHCB*. Naopak endogenní ABA je nutná pro úplnou expresi různých členů *LHCB* a její fyziologicky vysoká hladina zvyšuje expresi *LHCB* genů. ABA reguluje tyto geny prostřednictvím transkripčního faktoru WRKY40, který expresi genů *LHCB* potlačuje (Liu et al., 2013).

U *Arabidopsis thaliana* se nachází také transkripční faktor ZBF1/MYC2bHLH, který působí jako bod křížové komunikace mezi signálními drahami světla, ABA a kyseliny jasmonové. MYC2 je represor fotomorfozeneze, který může fungovat ale také jako pozitivní regulátor vývoje laterálních kořenů a doby květu. U *Solanum lycopersicum* L. se nachází aminokyselinová sekvence LeMYC2, který vykazuje vysokou homologii s MYC2 u *Arabidopsis thaliana*. LeMYC2 je

negativní regulátor fotomorfogeneze zprostředkovaného modrým světlem, jehož expresi pozitivně ovlivňuje ABA. Avšak u dospělých rostlin rajčete působí naopak jako stimulant růstu. Nadměrná exprese LeMYC2 způsobuje zvýšení délky kořene a množství laterálních kořenů. (Gupta et al., 2014).

Dalšími faktory ovlivňujícími ABA signalizaci jsou faktory PIF (Phytochrome Interacting Factors). Jde o negativní regulátory světelných reakcí, které jsou kódovány rodinou základních helix-loop-helix (bHLH) transkripčních faktorů. Ve tmě PIF udržují skotomorfogenní stav etiolovaných semenáčků. Po vystavení světlu interagují s fytochromy, které indukují degradaci PIF prostřednictvím proteasomu 26S a následnou aktivaci fotomorfogeneze. Faktory PIF se tedy podílejí na regulaci růstu a vývoji rostlin (Pham et al., 2018). Důležitým proteinem je PIL5 (PIF3-like 5), který je klíčovým negativním regulátorem klíčení semen zprostředkovaného fytochromem (Oh et al., 2004).

U semen *Arabidopsis thaliana* byla identifikována nekódující RNA *Hidden Treasure 1 (HID1)*, která reguluje klíčení semen závislé na fytochromu B potlačením biosyntézy ABA. Po ozáření PHYB dochází k akumulaci *HID1* v kořeni, čímž se inhibuje exprese genu *NCED9*, který kóduje klíčový enzym pro biosyntézu ABA (Wang et al., 2023). Za přítomnosti kontinuálního červeného světla je *HID1* represorem fotomorfogeneze – inhibuje zezelenání kotyledonů a prodlužování hypokotylu potlačením transkripce *PIF3* (Wang et al., 2017).

3 PRAKTICKÁ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

V experimentální části práce byla použita semena rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L., a to fotomorfogenní mutanti *tri1* a *fri1* s poruchou ve fytochrozech. Použitá semena obou mutantů byla laskavě poskytnuta prof. C. M. Rickem, TGC (Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu>).

Mutant *tri1* (*temporarily red light-insensitive 1*) je recesivní phyB1-deficientní mutant odvozený od kultivaru cv. GT. Tento mutant obsahuje defekt ve fytochromu B1 (PHYB1), který zapříčiňuje dočasnou necitlivost semen k červenému světlu při transferu ze tmy. Tato mutace byla způsobena vystavením semen mutagenní látce ethylmethan sulfonátu (EMS), a to ve tmě po dobu 24 hodin při 25 °C (van Tuinen et al., 1995).

Mutant *fri1* (*far-red-insensitive 1*) je recesivní phyA1-deficientní mutant odvozený od kultivaru cv. Money Maker (cv. MM). Tento mutant je charakteristický mutací ve fytochromu A (PHYA), která způsobuje necitlivost semen k dlouhovlnnému červenému světlu (Kerckhoffs et al., 1997).

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava kultivačního média

Kultivace semen a rostlin *Solanum lycopersicum* L. probíhala na pevném základním kultivačním médiu MS (Murashige and Skoog, 1962), kterého byly vždy připraveny 2 litry. Do 3l Erlenmeyerovy baňky bylo nalito 1,5 l destilované vody. Následně do ní bylo vloženo magnetické míchadlo a baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Na předvážkách bylo postupně naváženo 20 g sacharózy (Cat. no. 40135, Lach-Ner, s. r. o., Česká republika) a 8,6 g MS média (Cat. no. M0221.0100, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), které byly přidány do Erlenmeyerovy baňky. Na analytických váhách bylo naváženo 390,4 mg pufru MES (Morpholinoethane sulfonic acid) (Cat. no. 29834.02, Serva, Německo), který byl přidán do Erlenmeyerovy baňky. Po rozpuštění chemikálií byl objem baňky doplněn destilovanou vodou do 2 litrů. Poté byla do baňky ponořena elektroda pH metru a postupným přidáváním 1M hydroxidu draselného (KOH) Pasteurovou pipetou bylo upravováno pH až na hodnotu 6,1.

Na předvážkách bylo čtyřikrát naváženo 3,5 g Phytoagaru (Cat. no. P1001.1000, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), které byly přidány do čtyřech 500 ml skleněných termolahví se šroubovacím uzávěrem. Za pomoci odměrného válce o objemu 1 l bylo do jednotlivých lahví nalito 500 ml vytvořeného média. Lahve byly popsány a uzavřeny šroubovacím víkem, které bylo překryto hliníkovou fólií s nalepenou autoklávovací páskou. Skleněné lahve s médiem byly označeny barevnou páskou se jménem a datem. Následně byly sterilizovány pomocí parního tlakového autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa a poté uchovávány v lednici.

3.2.2 Klíčení semen

3.2.2.1 *Povrchová sterilizace*

Pro každý experiment bylo na listu papíru A4 napočítáno 450 semen mutanta rajčete a 450 semen standardního kultivaru k danému mutantovi. Napočítaná semena byla vložena do plastových nesterilních 50 ml zkumavek se šroubovacím uzávěrem – Falcon. Následně byla semena sterilizována pomocí 40–50 ml roztoku NaClO (SAVO; 2,8 % aktivního chloru). Za občasného protřepávání byla semena ponechána v roztoku SAVO 25 až 30 minut při pokojové teplotě. Dále bylo pracováno v laminárním flowboxu v aseptických podmínkách. Po uplynutí doby sterilizace byl sterilizační roztok odpipetován pipetou s maximálním objemem 10 ml a semena byla šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Po posledním promytí bylo k semenům přidáno 5 ml sterilní destilované vody.

3.2.2.2 *Příprava kultivačního média se zvolenými koncentracemi ABA*

V laminárním flowboxu bylo jménem, koncentrací ABA, genotypem rostliny a typem světla označeno 30 Petriho misek. V mikrovlnné troubě bylo rozehřáto kultivační MS médium. Pomocí sterilní 50 ml zkumavky bylo vždy odměřeno 120 ml MS média, které bylo nalito do sterilní 300 ml Erlenmeyerovy baňky. Z rozmraženého zásobního roztoku ABA o koncentraci 10^{-2} mol/l bylo automatickou pipetou do Erlenmeyerovy baňky s MS médiem napipetována ABA o objemech 0, 12, 24, 36 a 60 μ l, což odpovídalo finálním koncentracím ABA 0, 1, 2, 3 a 5 μ mol/l. Po přidání ABA bylo kultivační médium důkladně promícháno. Takto připravená média byla po 20 ml

rozlita do připravených 30 kulatých plastových sterilních Petriho misek (průměr 90 mm) a ponechána ztuhnout.

3.2.2.3 Výsev semen

Na ztuhlém kultivačním médiu byla pomocí pinzety, která byla opláchnuta v 96 % ethanolu a vyžíhaná nad plamenem lihového kahanu, nanesena povrchově vysterilizovaná a propláchnutá semena. Na každý experiment pro klíčení bylo na Petriho misku nanесeno 30-35 semen mutanta rajčete nebo semen standardního kultivaru k danému mutantovi. Po nanесení semen byly Petriho misky oblepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Cat. no. 1320103112, Batist Medical a.s., Česká republika). Jedna třetina Petriho misek byla umístěna ve vertikální poloze do plastových stojánek a umístěna do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s kontinuálním modrým světlem. Druhá třetina byla umístěna podobným způsobem do stejné kultivační komory opatřené kontinuálním červeným světlem. Třetí třetina popsaných Petriho misek byla zabalena ve vertikální poloze do hliníkové fólie a umístěna do stejné kultivační komory s modrým či červeným světlem. Díky tomu byla zajištěna inkubace semen ve tmě. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36 W/18 – Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 440 nm. Zdrojem červeného světla byla trubice Philips TLD- 36 W/15 – Red (Philips, USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 660 nm. Semena byla v růstových komorách kultivována po dobu 7 dnů při teplotě 23 °C.

3.2.2.4 Vyhodnocení klíčivosti

Vyklíčená semena byla od 3. do 7. dne kultivace v růstové komoře denně počítána a jejich počet byl zapisován. Z výsledných hodnot byla u každé misky vypočítána procentuální klíčivost. Experiment pro každého mutanta se standardním kultivarem byl čtyřikrát opakován. Ze získaných hodnot byly vypočteny průměrné procentuální hodnoty klíčivosti, inhibice a chybové úsečky (SE), a to u jednotlivých koncentrací ABA za různých světelných podmínek. Tyto hodnoty sloužily pro vytvoření grafů kinetiky klíčení. Pro grafy klíčivosti a inhibice klíčení byly použity hodnoty 7. dne od výsevu.

3.2.3 Růst rostlin

Pro každý experiment bylo napočítáno 250 semen mutanta rajčete a 250 semen standardního kultivaru k danému mutantovi. Napočítaná semena byla vložena do 50ml nesterilní zkumavky typu Falcon a povrchově vysterilizována metodou popsanou v kapitole 3.2.2.1.

V laminární flowboxu bylo názvem genotypu označeno 10 Petriho misek (stejného typu, jako bylo popsáno výše), do nichž bylo pomocí sterilní 50ml zkumavky nalito 20 ml rozehřátého MS média. Na připravené ztuhlé médium bylo vyžíhanou pinzetou naneseo 50 semen mutanta nebo 50 semen standardního kultivaru k danému mutantovi. Takto připravené Petriho misky byly oblepeny páskou z netkané textilie a ve vertikální poloze byly zabaleny do hliníkové fólie, která byla popsána názvem genotypu, jménem a datem. Následně byly vloženy do automatické růstové komory s modrým nebo červeným světlem, kde byla semena ponechána po dobu 3 až 4 dnů při teplotě 23 °C.

Po 3 až 4 dnech inkubace v automatické růstové komoře došlo k vyklíčení semen. V laminárním flowboxu bylo připraveno 30 Petriho misek s kultivačním médiem obsahující ABA o koncentracích 0, 1, 3, 5, 7 či 9 $\mu\text{mol/l}$ metodou uvedenou v kapitole 3.2.2.2. Pinzetou, sterilizovanou v 96 % ethanolu a vyžíhanou nad plamenem kahanu, byla vyklíčená semena přenesena na nové kultivační médium. Rostlinky byly pokládány do řady do středu misky kořenem dolů. Na každou Petriho misku bylo umístěno 7 rostlinek s krátkými i dlouhými kořínky. Následně byly misky oblepeny páskou z netkané textilie, jak bylo popsáno výše. Jedna třetina misek s rostlinkami byla umístěna ve vertikální poloze do plastových stojánek a do kultivační komory s kontinuálním modrým světlem. Druhá třetina byla umístěna stejným způsobem do kultivační komory s kontinuálním červeným světlem a třetí třetina připravených misek byla zabalena ve vertikální poloze do hliníkové fólie a umístěna do stejné kultivační komory s modrým či červeným světlem, čímž byla umožněna kultivace rostlinek ve tmě. Misky byly označeny názvem genotypu, datem a jménem. Rostlinky byly kultivovány po dobu 7 dní při teplotě 23 °C.

3.2.3.1 *Vyhodnocení růstu*

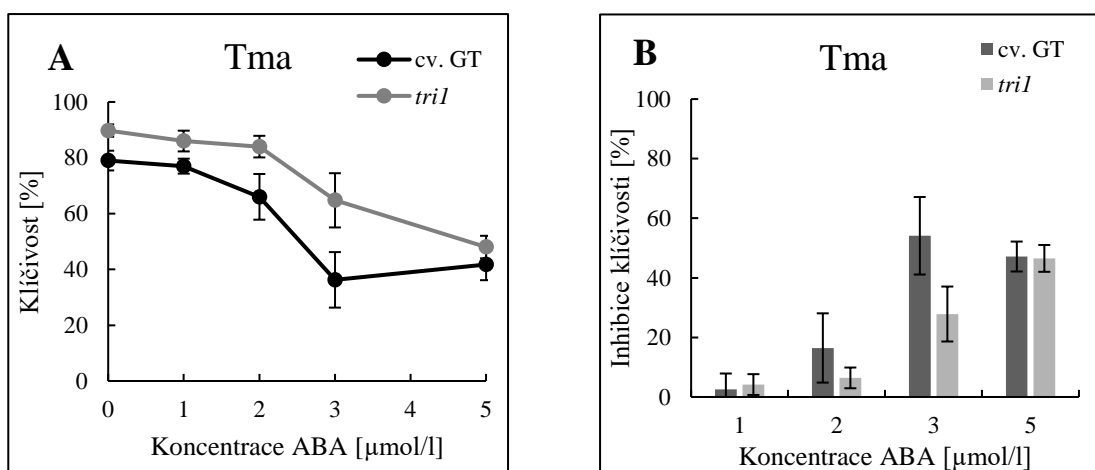
Po týdenní kultivaci vyklíčených semen byla pomocí pravítka změřena s přesností na 1 mm délka kořenů a hypokotylů. Ke každému mutantu se standardním kultivarem byly provedeny minimálně 3 nezávislé experimenty. Ze získaných hodnot byl vypočítán procentuální růst a inhibice růstu hypokotylů a kořenů. Získané hodnoty byly vyneseny do grafů.

4 VÝSLEDKY

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumání vlivu světla na regulaci klíčivosti semen a růstu rostlin působením kyseliny abscisové (ABA). Interakce těchto dvou vlivů byla studována na rostlině *Solanum lycopersicum L.* pomocí genetického přístupu spočívajícího v analýze mutantů. Konkrétně byli použiti mutanti s defektem ve fytochromu B1 (*tri1*, *temporarily red light-insensitive 1*) a s defektem ve fytochromu A (*fri1*, *far-red-insensitive 1*). Kultivace mutantů a k nim odpovídajících kontrolních kultivarů probíhala ve tmě, na modrém a červeném světle na kultivačním médiu s obsahem ABA o koncentracích 0, 1, 2, 3 a 5 $\mu\text{mol/l}$ u klíčení a 0, 1, 3, 5 a 7 či 9 $\mu\text{mol/l}$ u růstu.

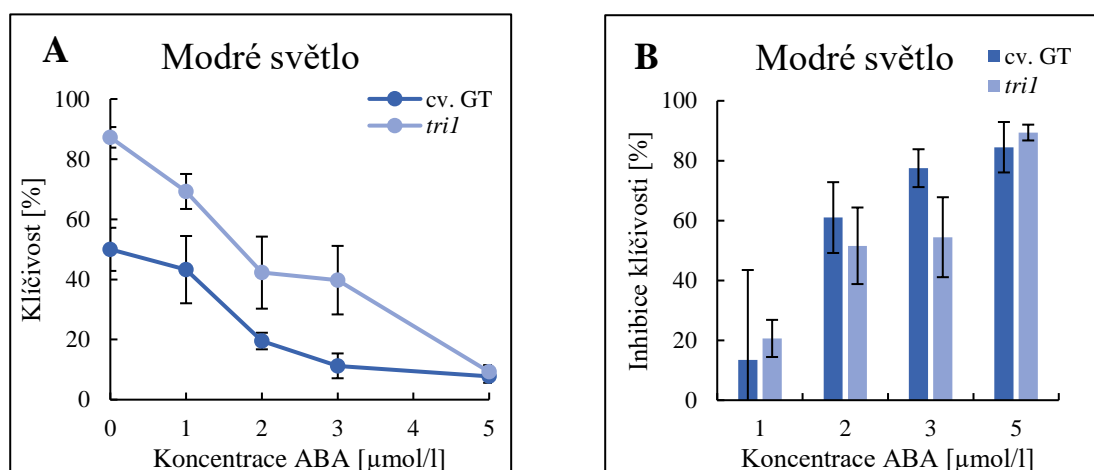
4.1 Klíčivost a inhibice klíčivosti semen cv. GT a mutantu *tri1*

Kyselina abscisová redukovala klíčivost semen obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací. Výsledné hodnoty maximální klíčivosti semen cv. GT a mutantu *tri1* byly po 7. denní kultivaci ve tmě v závislosti na stanovených koncentracích ABA velmi podobné. Výjimkou byla klíčivost při koncentraci ABA 3 $\mu\text{mol/l}$, která byla u cv. GT výrazně nižší (Obrázek 9 A). Z hodnot klíčivosti byla vypočítána inhibice klíčivosti semen, kdy výsledné hodnoty mezi cv. GT a mutantem *tri1* byly rozdílné pouze u koncentrace ABA 3 $\mu\text{mol/l}$. (Obrázek 9 B).



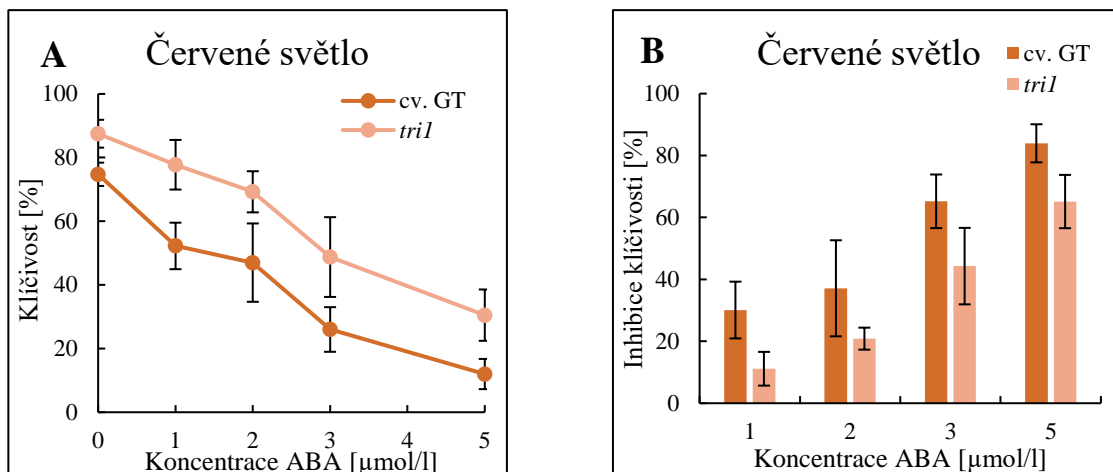
Obrázek 9: Klíčivost semen (A) a inhibice klíčivosti semen (B) cv. GT a mutantu *tri1* v závislosti na vybraných koncentracích ABA při kultivaci ve tmě 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm standartní chybu (SE) vypočítanou ze 4 nezávislých experimentů.

Z obrázku 10 A je patrné, že hodnoty klíčivosti na modrém světle při nulové koncentraci ABA u genotypu cv. GT byly znatelně nižší než u mutanta *tri1*. K překryvu hodnot zmíněných genotypů došlo pouze u koncentrace ABA 5 $\mu\text{mol/l}$. Rozdílný inhibiční efekt exogenní ABA byl pozorovatelný pouze u koncentrace 3 $\mu\text{mol/l}$. U ostatních testovaných koncentrací ABA byly rozdíly v inhibici klíčivosti semen zanedbatelné (Obrázek 10 B).



Obrázek 10: Klíčivost (A) a inhibice (B) semen cv. GT a mutanta *tri1* v závislosti na vybraných koncentracích ABA při kultivaci na modrém světle 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítána ze 4 nezávislých experimentů.

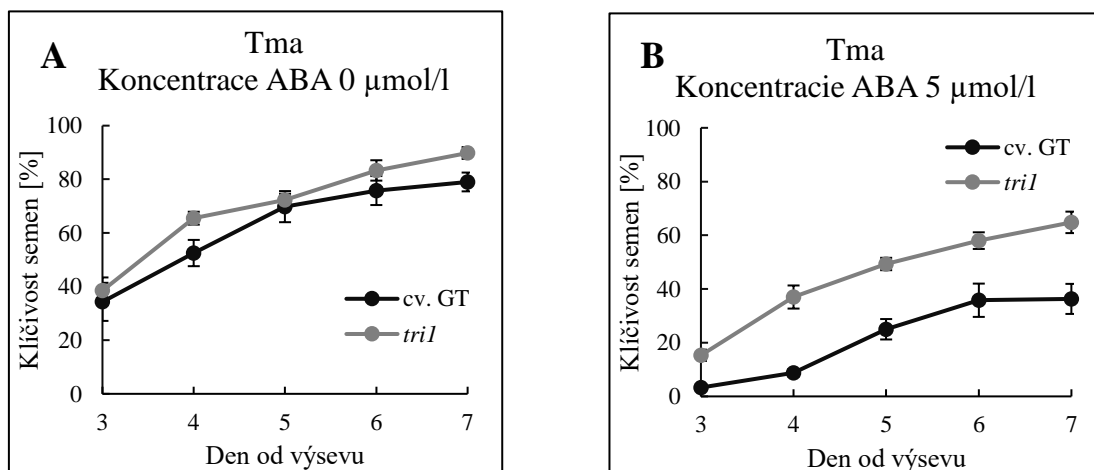
Při kultivaci semen na červeném světle byly pozorovány vyšší hodnoty klíčivosti u mutanta *tri1* oproti cv. GT, a to při všech testovaných koncentracích ABA (Obrázek 11 A). Obrázek 11 B dále ukazuje, že výsledná inhibice klíčivosti semen mutanta *tri1* indukovaná ABA byla oproti cv. GT výrazně nižší.



Obrázek 11: Klíčivost (A) a inhibice (B) semen cv. GT a mutanta *tri1* v závislosti na vybraných koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

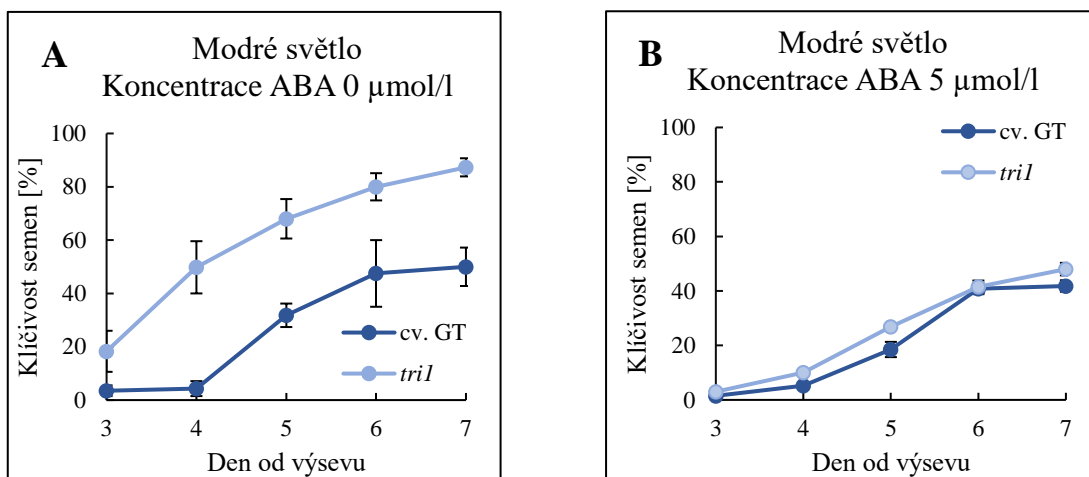
4.1.1 Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *tri1*

Obrázek 12 A ukazuje, že kinetika klíčení semen obou genotypů se ve tmě při nulové koncentraci inhibitoru zásadně nelišila. Při porovnání kinetiky klíčení semen v přítomnosti ABA o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ je zřejmé, že maximální klíčivost i kinetika klíčení byla u obou genotypů snížena, a to ztelněji u cv. GT (Obrázek 12 B).



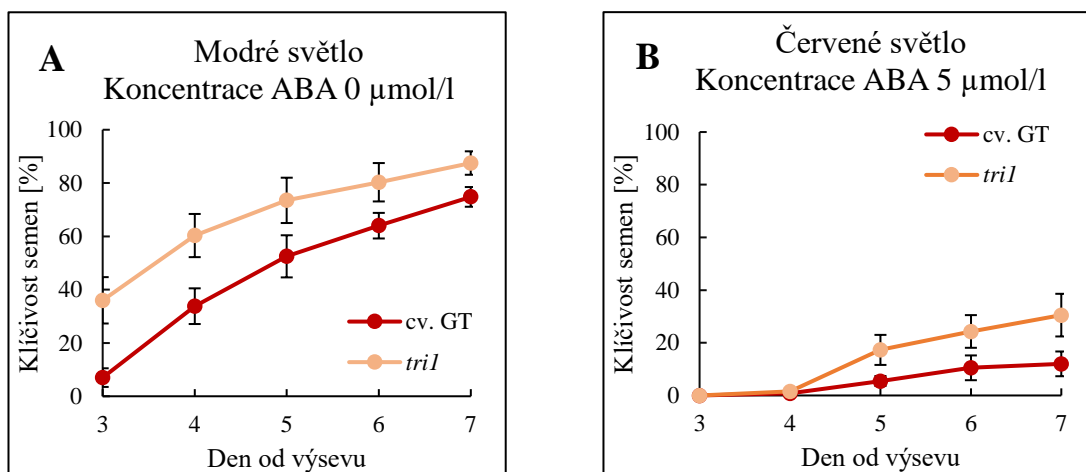
Obrázek 12: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *tri1* kultivovaných ve tmě po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

Z obrázku 13 A je patrné, že kinetika klíčení i klíčivost semen na modrém světle na médiu bez ABA byla vyšší u mutanta *tri1*. U cv. GT došlo ke zvýšení počtu klíčících semen až od 5 dne. Při koncentraci ABA 5 $\mu\text{mol/l}$ byla kinetika klíčení semen obou genotypů podobná. V porovnání s hodnotami klíčivosti při nulové koncentraci ABA, došlo ke snížení kinetiky klíčení semenu mutanta *tri1*, kdežto u cv. GT se výrazně nezměnila (Obrázek 13 B).



Obrázek 13: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *tri1* kultivovaných na modrém světle po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

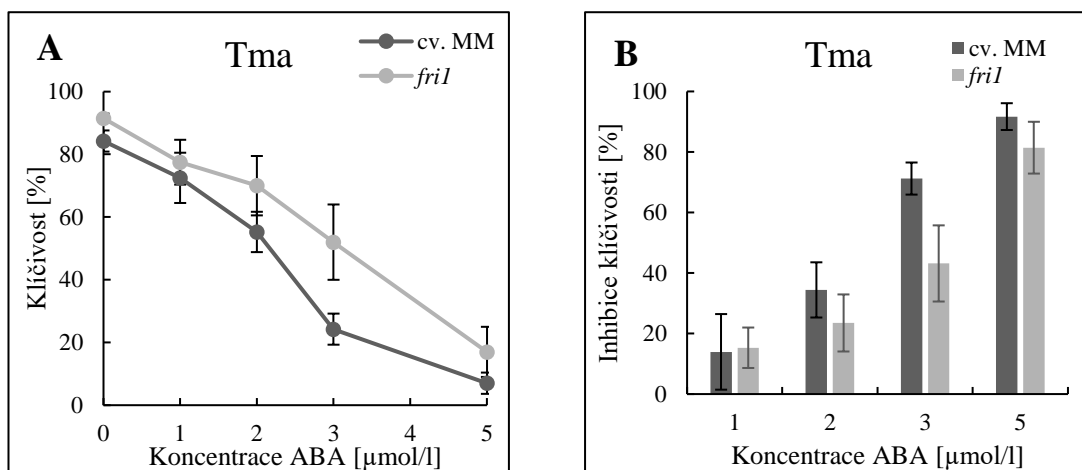
Na obrázku 14 A je vidět, že na červeném světle a při absenci ABA v médiu semena mutanta *tri1* dosahovala vyšší maximální klíčivosti, naopak rychlejší kinetiky klíčení dosahovala semena cv. GT. Při aplikaci ABA o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ bylo možné pozorovat radikální zpomalení kinetiky klíčení i snížení maximální klíčivosti u obou genotypů s tím, že u mutanta *tri1* byla kinetika klíčení vyšší než u cv. GT (Obrázek 14 B). Oproti kultivaci ve tmě a na modrém světle, došlo na červeném světle ke zpomalení kinetiky klíčení, jak u cv. GT, tak u mutanta *tri1*.



Obrázek 14: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *tril* kultivovaných na červeném světle po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

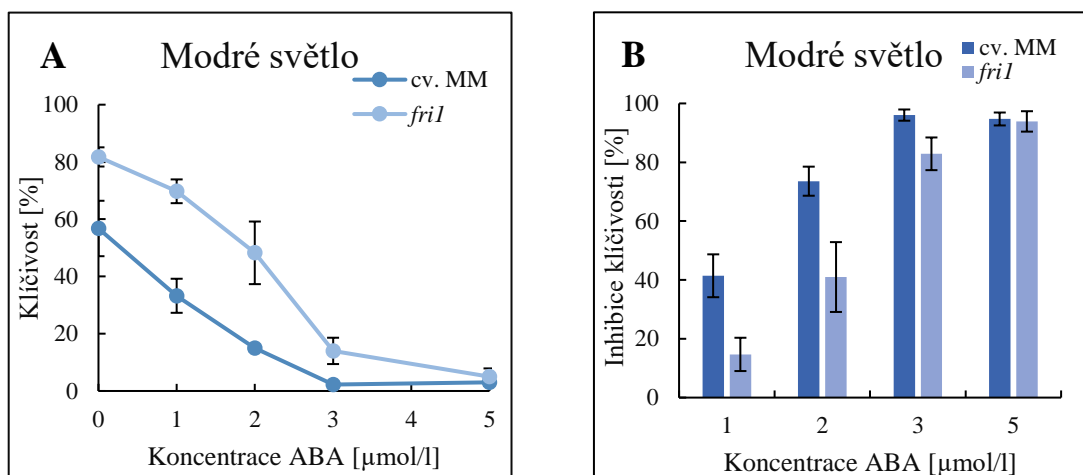
4.2 Klíčivost a inhibice klíčivosti semen cv. MM a mutanta *fri1*

Zobrazené hodnoty klíčivosti semen cv. MM a mutanta *fri1* se při kultivaci ve tmě lišily pouze u koncentrace ABA 3 $\mu\text{mol/l}$, kdy vyšší klíčivosti semen dosahoval mutant *fri1* (Obrázek 15 A). Z těchto hodnot byla vypočítána procentuální inhibice klíčivosti semen, kdy semena genotypu cv. MM dosahovala vyšší redukce klíčivosti pouze při koncentraci ABA 3 $\mu\text{mol/l}$ (Obrázek 15 B).



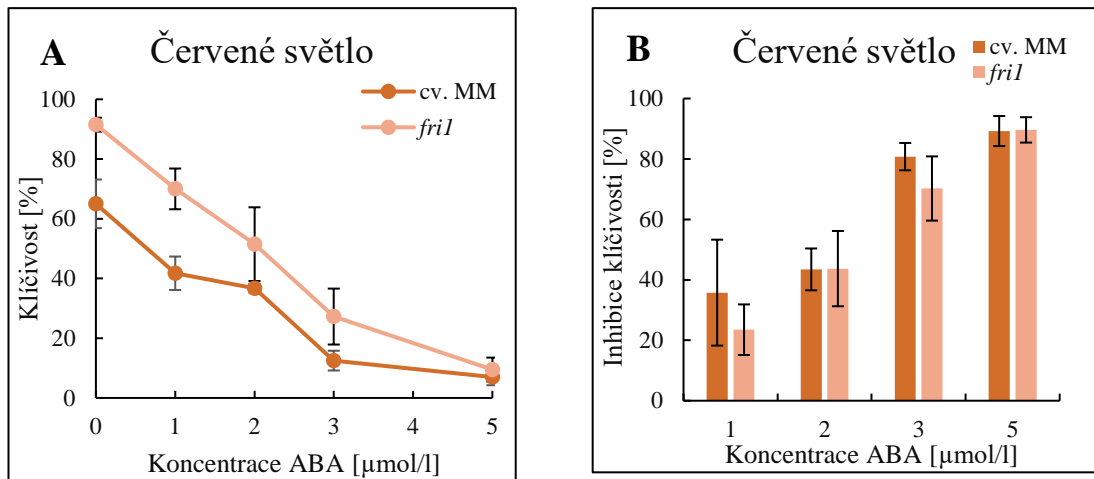
Obrázek 15: Klíčivost (A) a inhibice (B) semen cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti vybraných koncentracích ABA při kultivaci ve tmě 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

Z obrázku 16 A je patrné, že na modrém světle byla klíčivost semen znatelně vyšší u mutantu *fri1*. Výjimkou byla koncentrace ABA 5 $\mu\text{mol/l}$, kdy se výsledné hodnoty klíčivosti semen *fri1* a cv. GT překrývaly. Hodnoty inhibice klíčivosti semen *fri1* a cv. GT byly stejné pouze při koncentraci ABA 5 $\mu\text{mol/l}$. U zbylých koncentrací dosahoval vyšší redukce klíčivosti semen genotyp cv. MM (Obrázek 16 B).



Obrázek 16: Klíčivost (A) a inhibice (B) semen cv. MM a mutantu *fri1* v závislosti vybraných koncentrací ABA při kultivaci na modrém světle 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

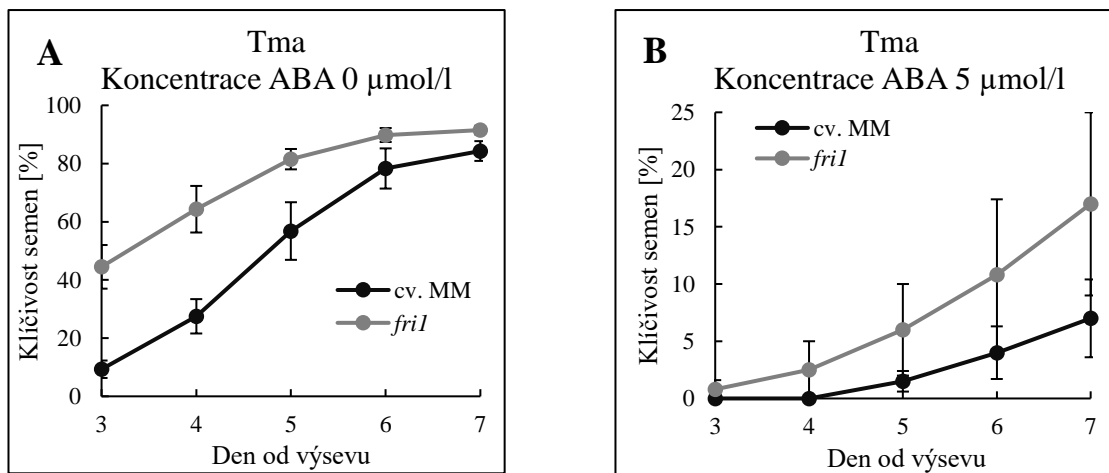
Obrázek 17 A ukazuje, že při kultivaci na červeném světle dosahoval celkově vyšší klíčivosti semen mutant *fri1*. Avšak rozdíly mezi hodnotami klíčivosti semen obou genotypů nebyly při koncentraci exogenní ABA 2 až 5 $\mu\text{mol/l}$ výrazné. Z obrázku 17 B je patrné, že se zvyšující se koncentrací ABA došlo k úměrnému zvyšování hodnot inhibice klíčivosti semen obou genotypů. Rozdíly v inhibici klíčivosti semen *fri1* a cv. GT však byly při jednotlivých koncentracích zanedbatelné.



Obrázek 17: Klíčivost (A) a inhibice (B) semen cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na vybraných koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle 7. den od výsevu. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

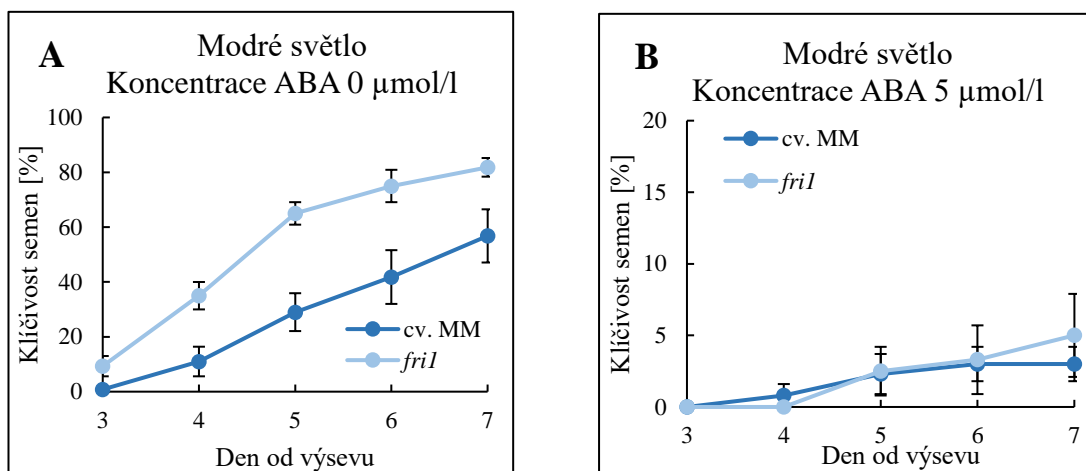
4.2.1 Kinetika klíčení cv. MM a mutanta *fri1*

Obrázek 18 A ukazuje, že kinetika klíčení semen ve tmě při nulové koncentraci ABA byla vyšší u cv. GT. Dále ukazuje, že sedmý den se maximální klíčivost mezi genotypy téměř nelišila. Při 5 μM koncentraci ABA došlo k radikálnímu poklesu kinetiky klíčení i maximální klíčivosti semen obou genotypů, přičemž semena mutanta *fri1* klíčila rychleji než semena cv. GT (Obrázek 18 B).



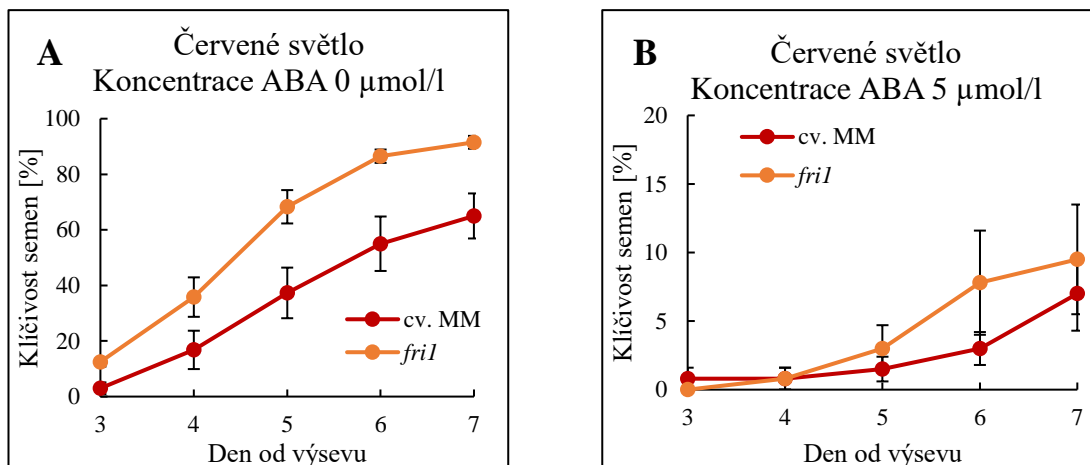
Obrázek 18: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *fri1* kultivovaných ve tmě po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

Při kultivaci na modrém světle a při nulové koncentraci ABA byla kinetika klíčení semen u mutantu *fri1* zpočátku větší, kdežto od 5. dne klíčení semen cv. GT narůstalo rychleji (Obr. 19 A). Vyšší klíčivosti semen dosahoval po celou dobu měření mutant *fri1*. Při koncentraci ABA 5 $\mu\text{mol/l}$ byla kinetika klíčení i maximální klíčivost semen obou genotypů podobná. V porovnání s nulovou koncentrací hormonu došlo v přítomnosti ABA o koncentraci 5 $\mu\text{mol/l}$ k výraznému zpomalení kinetiky klíčení i maximální klíčivosti semen (Obrázek 19 B).



Obrázek 19: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutantu *fri1* kultivovaných na modrém světle po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

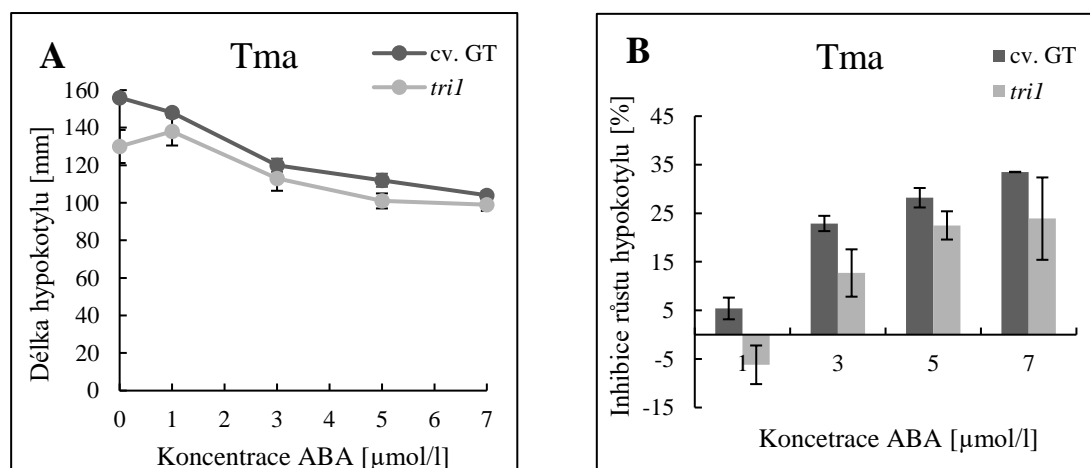
Při kultivaci semen na červeném světle při nulové koncentraci ABA bylo možné pozorovat, že mutant *fri1* dosahoval vyšších hodnot maximální klíčivosti semen a zpočátku byla vyšší i kinetika klíčení (Obrázek 20 A). Při porovnání s koncentrací 5 $\mu\text{mol/l}$ exogenní ABA byla maximální klíčivost i kinetika klíčení semen razantně snížena (Obrázek 20 B).



Obrázek 20: Kinetika klíčení semen cv. GT a mutanta *fri1* kultivovaných na červeném světle po dobu sedmi dní při koncentraci ABA 0 $\mu\text{mol/l}$ (A) a 5 $\mu\text{mol/l}$ (B). Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou klíčivost \pm SE, která byla vypočítaná ze 4 nezávislých experimentů.

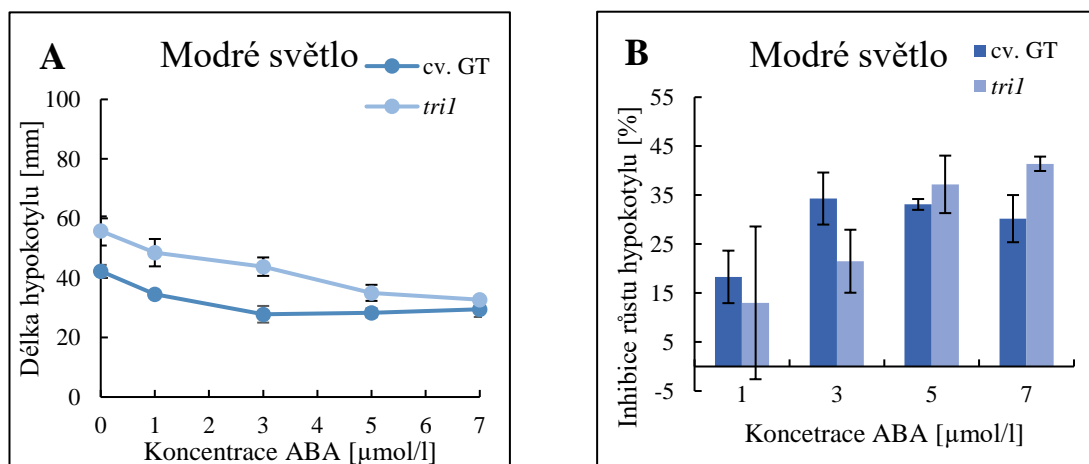
4.3 Růst a inhibice růstu rostlin cv. GT a mutanta *tril*

Na obrázku 21 A je možné pozorovat, že etiolizované hypokotyly mutanta *tril* při absenci ABA byly ztlačně kratší než hypokotyly cv. GT. Délka hypokotyly u obou genotypů se se zvyšující se koncentrací exogenní ABA snižovala, avšak rozdíly mezi hodnotami u obou genotypů byly zanedbatelné při všech testovaných koncentracích. Inhibice růstu hypokotyly dosahovala mírně vyšších hodnot u cv. GT při koncentraci 1 a 3 $\mu\text{mol/l}$ (Obrázek 21 B).



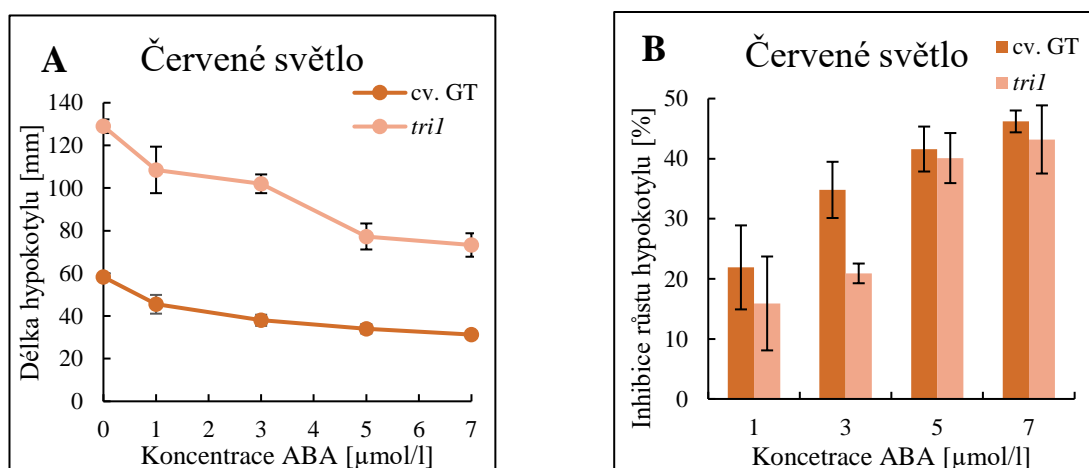
Obrázek 21: Růst hypokotyly (A) a inhibice růstu hypokotyly (B) cv. GT a mutanta *tril* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci ve tmě po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotyly \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Hodnoty délky hypokotylu při kultivaci na modrém světle byly vyšší u mutanta *tril*, ty se však se zvyšující se koncentrací inhibitoru snižovaly a překrývaly se s hodnotami naměřenými u cv. GT (Obrázek 22 A). Mezi genotypy nebyl pozorován výraznější rozdíl v inhibici růstu hypokotylu vlivem ABA (Obrázek 22 B).



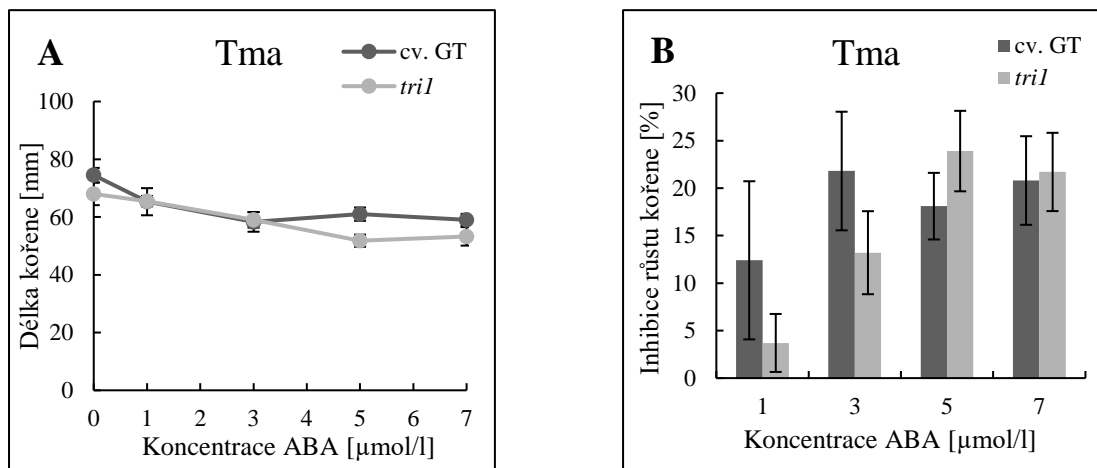
Obrázek 22: Růst hypokotylu (A) a inhibice růstu hypokotylu (B) cv. GT a mutanta *tril* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na modrém světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotylu \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Při kultivaci na červeném světle dosahoval mutant *tril* podstatně větší délky hypokotylu než cv. GT, a to nejen při absenci ABA v médiu, tak při všech koncentracích ABA (Obrázek 23 A). Výsledná inhibice růstu se mezi genotypy lišila pouze při koncentraci 3 $\mu\text{mol/l}$, kdy byl vyšší inhibiční účinek ABA pozorován u cv. GT (Obrázek 23 B).



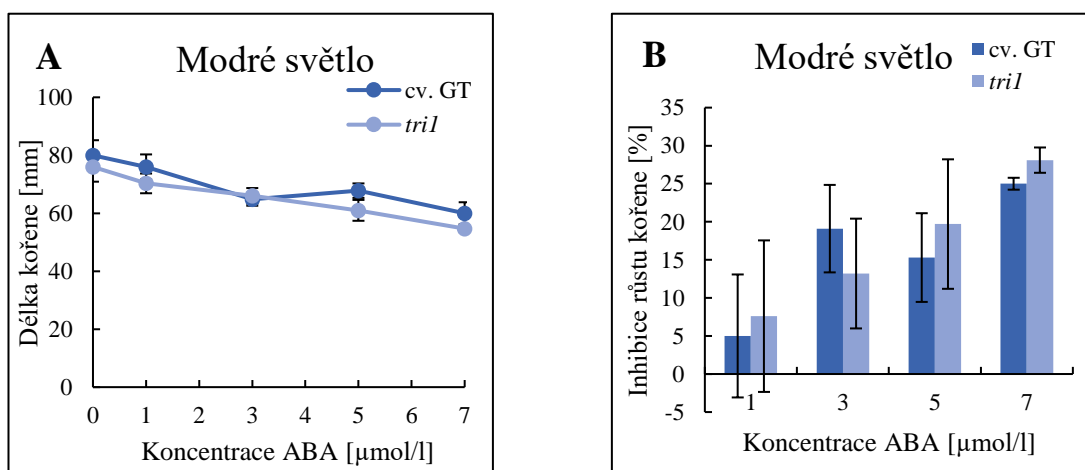
Obrázek 23: Růst hypokotylu (A) a inhibice růstu hypokotylu (B) cv. GT a mutanta *tril* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotylu \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

U etiolizovaných rostlin ve tmě při absenci i za přítomnosti ABA v médiu byla délka kořene u jednotlivých genotypů velmi podobná a ve srovnání s hypokotyly dosti variabilní. Vypočítané inhibice růstu vlivem ABA pak byly u testovaných genotypů podobné (Obrázek 24).



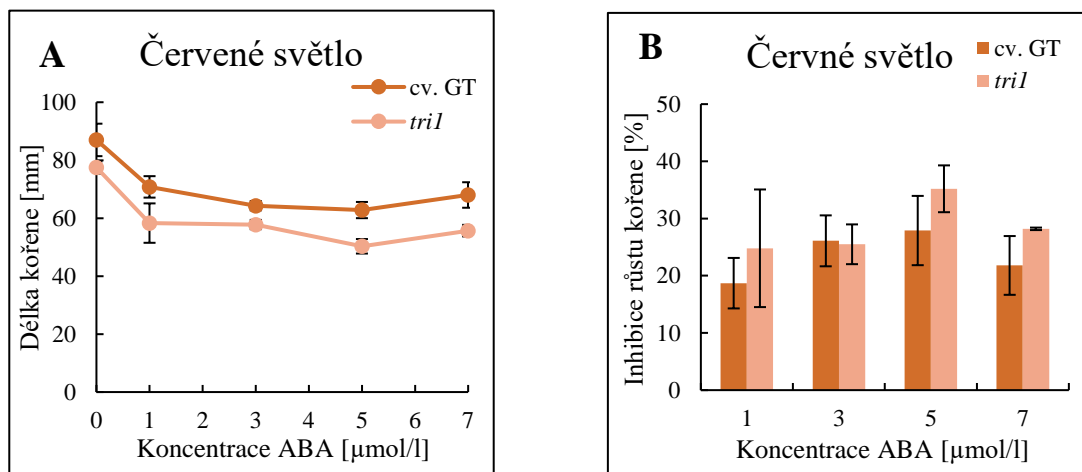
Obrázek 24: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. GT a mutanta *tril* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci ve tmě po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin na modrém světle se hodnoty délky kořene mezi jednotlivými genotypy zásadně nelišily při absenci ABA ani při žádné z testovaných koncentrací hormonu (Obrázek 25 A). Zároveň se nijak výrazněji nelišily hodnoty vypočítaných inhibicí růstu kořene u jednotlivých genotypů (Obrázek 25 B).



Obrázek 25: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. GT a mutanta *tril* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na modrém světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

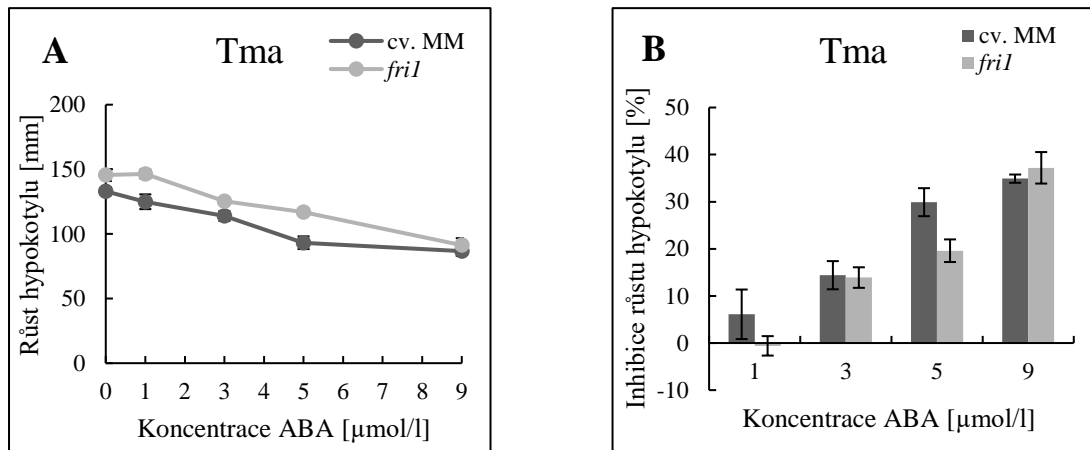
Na obrázku 26 A bylo možné pozorovat, že kořeny cv. GT byly delší než kořeny mutanta *tri1*, a to při všech testovaných koncentracích aplikované ABA. Těmto výsledkům odpovídaly zjištěné hodnoty inhibice růstu, které byly u obou genotypů podobné (Obrázek 26 B).



Obrázek 26: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. GT a mutanta *tri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítána ze 3-5 nezávislých experimentů.

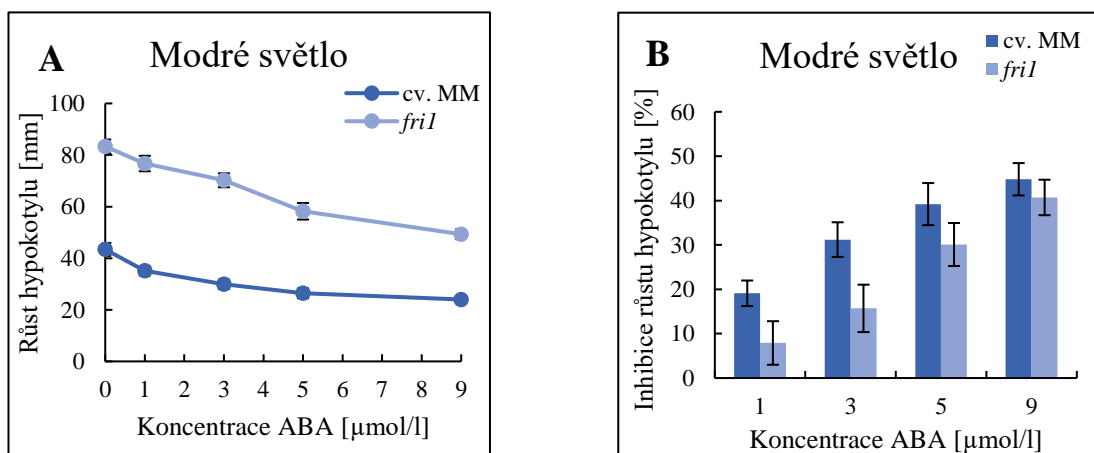
4.4 Růst a inhibice růstu rostlin cv. MM a mutanta *fri1*

Při kultivaci rostlin ve tmě bylo zjištěno, že délka hypokotylu mutanta *fri1* dosahovala mírně vyšších hodnot než u hypokotylů kontrolního genotypu cv. MM. Zanedbatelný rozdíl mezi délkou hypokotylu obou genotypů byl pozorován u koncentrace ABA 3 a 9 $\mu\text{mol/l}$. (Obrázek 27 A). Určitý rozdíl v inhibici růstu hypokotylu mezi genotypy byl patrný pouze u koncentrace 5 $\mu\text{mol/l}$, kdy vyšší redukce růstu hypokotylu byla pozorována u cv. MM (Obrázek 27 B).



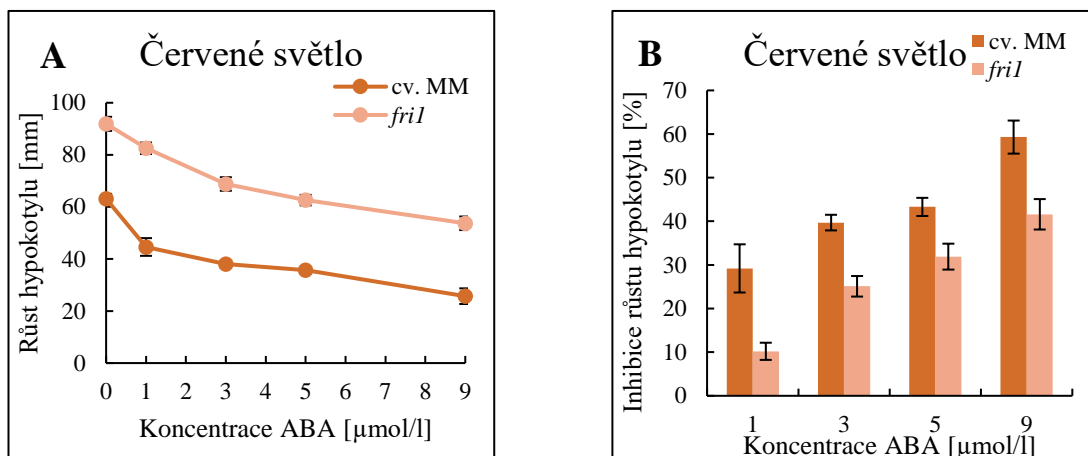
Obrázek 27: Růst hypokotyly (A) a inhibice růstu hypokotyly (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci ve tmě po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotyly \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Z obrázku 28 A je zřejmé, že na modrém světle byla délka hypokotyly u mutanta *fri1* větší při všech měřených koncentracích. Výsledný inhibiční efekt byl výraznější u cv. MM, a to při koncentracích ABA 1 a 3 $\mu\text{mol/l}$ (Obrázek 28 B).



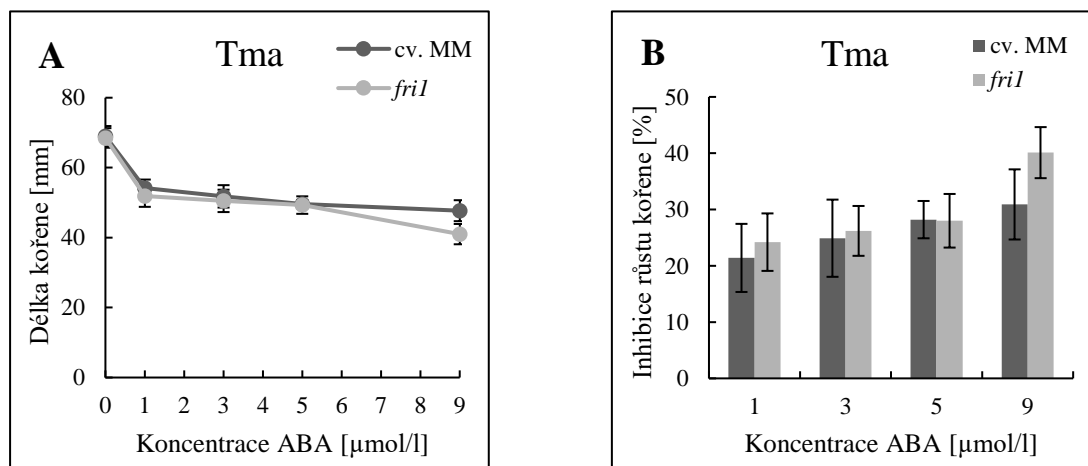
Obrázek 28: Růst hypokotyly (A) a inhibice růstu hypokotyly (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na modrém světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotyly \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Na obrázku 29 A je patrné, že při kultivaci na červeném světle byla délka hypokotyly u mutanta *fri1* (stejně jako při kultivaci na modrém světle) větší při všech měřených koncentracích. Vyšší inhibiční efekt ABA na růst hypokotyly byl pozorován u genotypu cv. MM, a to při všech testovaných koncentracích hormonu (Obrázek 29 B).



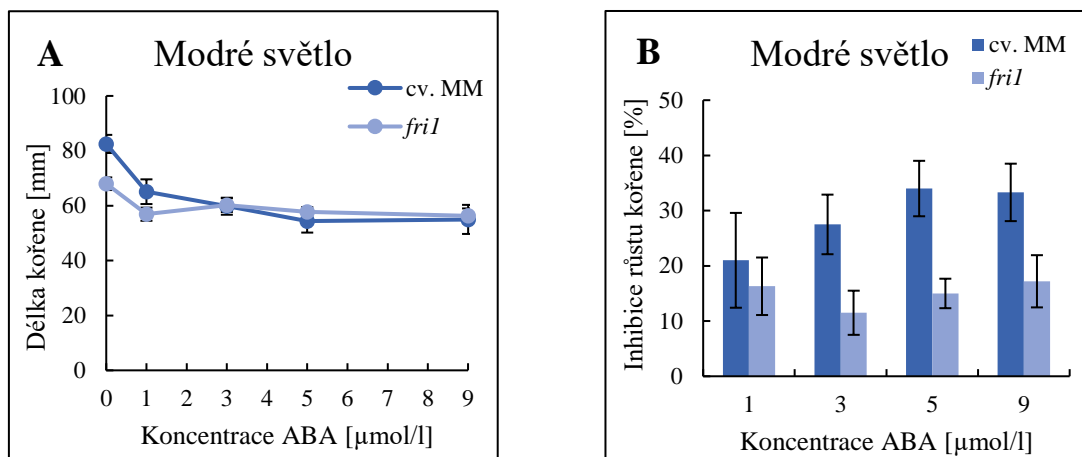
Obrázek 29: Růst hypokotyly (A) a inhibice růstu hypokotyly (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku hypokotyly \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Při kultivaci rostlin cv. MM a mutanta *fri1* ve tmě dosahovaly délky kořenů podobných hodnot, a to jak při absenci ABA v kultivačním médiu, tak při všech testovaných koncentracích hormonu (Obrázek 30 A). Na obrázku 30 B bylo možné pozorovat vyrovnané hodnoty inhibice růstu kořene u obou genotypů při všech testovaných koncentracích ABA.



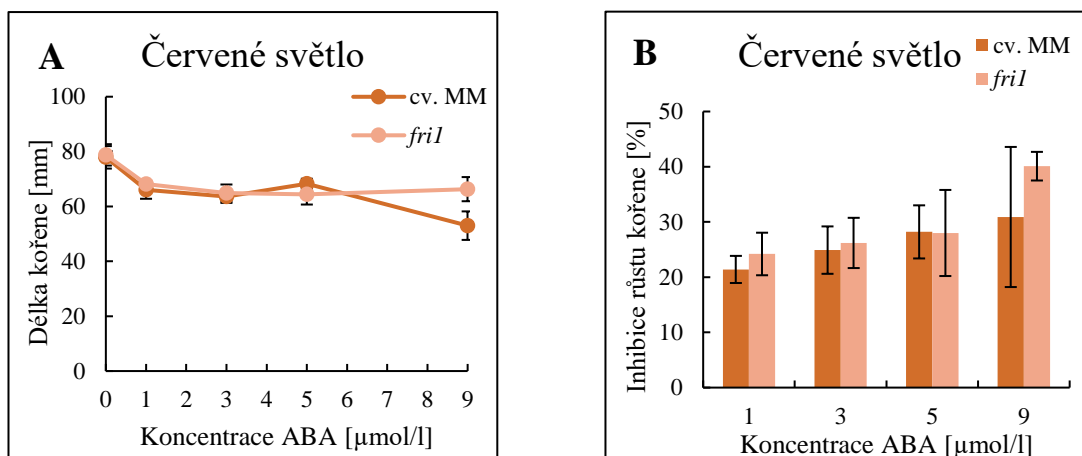
Obrázek 30: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci ve tmě po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítaná ze 3-5 nezávislých experimentů.

Z Obrázku 31 A je zřejmé, že kultivaci na modrém světle byla délka kořene při nulové koncentraci ABA u cv. MM větší než u mutanta *fri1*. Za přítomnosti ABA se délka kořenů mezi oběma genotypy výrazně nelišila. Výrazně vyšší inhibiční účinek ABA byl však pozorován u cv. MM, s výjimkou koncentrace ABA 1 $\mu\text{mol/l}$, kdy byl rozdíl inhibice růstu kořene mezi oběma genotypy zanedbatelný (Obrázek 31 B).



Obrázek 31: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na modrém světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítána ze 3-5 nezávislých experimentů.

Překryv hodnot délky kořene mezi oběma genotypy byl pozorován i při kultivaci na červeném světle. Jediný rozdíl byl pozorován při koncentraci ABA 9 $\mu\text{mol/l}$, kdy kořeny mutanta *fri1* byly mírně delší než kořeny cv. MM (Obrázek 32 A). Zmíněným výsledkům odpovídaly i hodnoty ukázány na Obrázku 32 B, kde se inhibiční účinek ABA na růst kořene mezi oběma genotypy zásadně nelišil.



Obrázek 32: Růst kořene (A) a inhibice růstu kořene (B) cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na různých koncentracích ABA při kultivaci na červeném světle po dobu 7 dní. Hodnoty vynesené v grafech představují průměrnou délku kořene \pm SE, která byla vypočítána ze 3-5 nezávislých experimentů.

5 DISKUZE

Životní cyklus rostlin je regulován primárně fytohormony a světelným zářením. Fytohormon ABA se v přítomnosti stresových faktorů v rostlině akumuluje, což vede k inhibici klíčení semen či potlačení růstu semenáčků. Světlo je pro rostliny nejenom zdrojem energie, ale i hlavním enviromentálním faktorem ovlivňující fyziologii a vývoj rostlin (Ng et al., 2014; Galvão and Fankhauser, 2015). Studiemi bylo potvrzeno, že mezi signálními dráhami světla a ABA dochází ke vzájemným interakcím (De Wit et al., 2016).

Cílem experimentální části této bakalářské práce bylo studovat vliv různých světelných podmínek na klíčivost semen a růst rostlin rajčete za působení exogenně aplikované ABA. Ke studiu těchto vlivů byly využity rostliny rajčete *Solanum lycopersicum* L., konkrétně mutant *tri1* s defektem ve PhyB1 a odvozený od kultivaru cv. GT, a mutant *fri1* s defektem ve PhyA odvozený od kultivaru cv. MM (cv. Money Maker).

5.1 Klíčení semen

Nejprve byl na základním médiu bez přídavku ABA sledován vliv různých světelných podmínek (tma/modré/červené světlo) na klíčení semen. Semena rajčete pro aktivaci klíčení nepotřebují světlo a nejvyšších hodnot klíčivosti by tedy měly dosahovat ve tmě (Appenroth et al., 2006), což bylo potvrzeno u kultivarů cv. GT a cv. MM, kdy klíčivost semen obou genotypů byla výrazně snížena vlivem především modrého světla. Tento inhibiční účinek světla však nebyl pozorován u mutantu *tri1* ani mutantu *fri1*. Výsledky tedy naznačují, že redukce klíčivosti semen rajčete vlivem modrého (i červeného světla) je zprostředkována PHYB1 a PHYA.

Dále byl sledován vliv ABA na klíčivost semen. Fakt, že klíčivost i rychlost klíčení semen jsou působením ABA inhibovány (Smith et al., 2010), byl experimenty provedenými *in vitro* potvrzen za všech světelných podmínek, a to u všech testovaných genotypů.

Prvním testovaným mutantem byl mutant *tri1* (odvozený od kultivaru cv. GT) obsahující defekt ve PHYB1 zapříčiňující dočasnou necitlivost k RL při transferu ze tmy. Výsledky experimentů ukázaly, že inhibice klíčivosti semen cv. GT i mutantu *tri1* vlivem ABA byla výrazně vyšší na BL i RL. To potvrzuje, že světlo ovlivňuje

reakci semen k ABA. Současně však semena mutanta *tril* ukazovala výrazně nižší citlivost k ABA na BL a RL, kdežto ve tmě byla citlivost semen cv. GT a *tri l* k ABA podobná. Tyto výsledky naznačují, že zmíněný vliv světla na citlivost semen k ABA je zprostředkován fotoreceptorem PHYB1.

Podobné účinky BL a RL byly pozorovány u kultivaru cv. MM a mutanta *friI*. Modré světlo (a méně RL) u obou genotypů zvyšovalo inhibiční účinek ABA na klíčivost semen, přičemž tento efekt byl mnohem slabší u mutanta *friI*, což se projevilo v jeho zvýšené toleranci k ABA. Výsledky tedy naznačují, že vliv BL na citlivost semen k inhibičním účinkům exogenní ABA je zprostředkován rovněž fotoreceptorem PHYA. Ten je spolu s PHYA a CRY1 zapojen ve vnímání BL (Weller et al., 2001).

U těchto genotypů byla pozorována také kinetika klíčení semen. Při absenci ABA byla rychlost klíčení semen kultivarů cv. GT a cv. MM vždy vyšší ve tmě než na BL či RL, kdežto u mutanta *tril*, ale výrazněji pak u mutanta *friI*, byla kinetika klíčení semen na světle zvýšená. Tyto výsledky ukazují, že světlo klíčení semen rajčete zpomaluje a že se tak děje prostřednictvím fotoreceptorů PHYB1 i PHYA. Rychlost klíčení semen se po aplikaci ABA snižovala, což potvrdilo inhibiční efekt ABA. Především na RL ukazovala semena mutantů *tril* a *friI* vyšší rychlost klíčení za přítomnosti ABA než semena odpovídajících kultivarů cv. GT a cv. MM. To potvrzuje předchozí závěr, že světlo zvyšuje reakci semen rajčete k inhibičním účinkům ABA.

5.2 Růst rostlin

Kromě klíčení semen rajčete byl, u již výše zmíněných kultivarů a mutantů, studován také růst hypokotyly a kořene. Na základním médiu byl pozorován vliv světla na prodlužování hypokotyly. Skutečnost, že světelné záření inhibuje růst hypokotyly (Van Gelderen et al., 2018), byla u cv. GT potvrzena. Avšak u testovaného mutanta *tril* nebyl za účasti kontinuálního RL tento inhibiční efekt pozorován. Tento výsledek potvrzuje, že námi použitý mutant je opravdu mutantem s defektem ve PHYB1. Po aplikaci ABA do základního média byl u těchto genotypů pozorován inhibiční účinek ABA na růst hypokotylů. Současně bylo pozorováno, že u obou genotypů BL i RL inhibiční účinek ABA zvyšovalo. Fakt, že hypokotyly mutanta *tril* a cv. GT reagovaly při všech světelných podmínkách k inhibičním účinkům ABA podobně, ukazuje, že

účinek světla na citlivost hypokotylů k ABA není pravděpodobně zprostředkován fotoreceptorem PHYB1.

Délka kořene na základním médiu se u obou genotypů cv. GT a *tril* vlivem BL i RL zvyšovala a výsledky tedy potvrzují údaje z literatury, že světelné záření stimuluje růst kořene (Van Gelderen et al., 2018). Současně jsme pozorovali, že nárůst délky kořene vlivem světla byl u obou genotypů podobný. To naznačuje, že prodlužování kořene rajčete vlivem BL a RL není zprostředkováno PHYB1. Výsledky rovněž ukazují na odlišné mechanismy působení světla na růst hypokotylu a kořene. Aplikací exogenní ABA došlo ke zkracování kořene, přičemž citlivost mutantních kořenů k ABA a kořenů cv. GT byla podobná. Červené světlo mírně zesilovalo inhibiční účinek ABA na růst kořene, přičemž tyto účinky byly u obou genotypů podobné. Z těchto výsledků lze, stejně jako u hypokotylu, usoudit, že defekt ve PHYB1 neměl vliv na citlivost kořenů k aplikované ABA. Pro potvrzení této hypotézy by bylo vhodné experimenty s těmito genotypy zopakovat s vyšší koncentrací exogenní ABA.

Dále byl testován mutant *fri1* se standardním kultivarem cv. MM. Na základním médiu byl u obou genotypů potvrzen inhibiční efekt BL i RL na prodlužování hypokotylu, přičemž však u mutantu *fri1* byl tento účinek mnohem slabší než u odpovídajícího kultivaru MM. Výsledky potvrzují, že námi použitý mutant *fri1* je výrazně defektní ve vnímání RL i BL. Rovněž jsme pozorovali, že citlivost hypokotylů obou genotypů k ABA byla zvýšena především vlivem RL. U mutantu *fri1* byl však tento nárůst citlivosti menší než u cv. MM, výsledkem čehož byla výrazně snížená citlivost hypokotylů mutantu *fri1* k inhibičnímu účinku ABA. Výsledky těchto experimentů tedy naznačují účast PHYA ve zprostředkování citlivosti hypokotylu k ABA na kontinuálním RL.

Na základním médiu (bez přítomnosti exogenní ABA) BL i RL mírně stimulovalo růstu kořene cv. MM, přičemž u mutantu *fri1* BL na délku kořene vliv nemělo. Tento fakt naznačuje, že stimulační účinek BL na růst kořene rajčete je zprostředkován PHYA. Aplikovaná ABA inhibovala růst kořenů cv. MM, a to podobně při všech světelných podmínkách. U mutantu *fri1* však byla na BL pozorována snížená citlivost kořenů k inhibičnímu účinku ABA ve srovnání s cv. MM.

Výsledky tedy ukazují, že BL zesiluje citlivost kořenů k inhibičním účinkům ABA prostřednictvím PHYA.

Možným vysvětlením inhibičního efektu světla na klíčení semen a prodlužování hypokotylu může být jeho buď pozitivní vliv na syntézu ABA a/nebo negativní vliv na degradaci ABA, čímž dochází v obou případech ke zvýšení hladiny endogenní ABA. Stimulační efekt světla na prodlužování kořene by mohl být vysvětlen opačným vlivem na syntézu a degradaci ABA, což vede ke snížení endogenní hladiny ABA. Dalším možným vysvětlením by mohlo být to, že světlo poskytuje kořenu sacharidy a podporuje syntézu auxinu v mladém kořeni (Van Gelderen et al., 2018). Světlo může ovlivňovat také citlivost semen a semenáčků k aplikované ABA, a to změnou exprese jejich receptorů. Tento princip je však stále neznámý (Barrero et al., 2014). Dle literárních zdrojů RL snižuje endogenní hladinu ABA v semenech i semenáčcích prostřednictvím fytochromů (Sawada et al., 2008), čímž je podporováno klíčení semen a vývoj semenáčků. U testovaných genotypů bylo naopak zaznamenáno, že působením RL se citlivost semen a semenáčků k aplikované ABA zvýšila, čímž bylo klíčení semen i prodlužování hypokotylu inhibováno. Klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. může být také stimulováno jediným pulzem RL o nižší intenzitě, který aktivuje fytochromový protein PHYB2, čímž je zprostředkována degradace faktoru PIF1 a je podpořeno klíčení. Při kontinuálním RL a vyšší intenzitě tohoto záření je však klíčení semen inhibováno (Appenroth et al., 2006). Testované genotypy byly vystaveny kontinuálnímu červenému světlu o intenzitě $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Při této intenzitě záření by mohl být očekáván stimulační efekt, avšak testovaná semena rajčete byla vystavena RL dlouhodobě a došlo tedy k potvrzení inhibičního efektu.

Výsledky této bakalářské práce ukazují na složitost interakcí mezi fytohormonem ABA a světelným zářením při klíčení semen a vývoji semenáčků. Výsledky práce odpověděly sice na některé otázky, ale současně vedou k mnoha dalším. Pochopení mechanismů interakcí mezi rostlinným hormonem ABA a světelnými signalizacemi v průběhu klíčení semen a růstu rostlin tedy vyžaduje další experimenty.

6 ZÁVĚR

Cílem předložené bakalářské práce bylo studium vlivu různých světelných podmínek na klíčení semen a růst semenáčků za působení aplikované ABA. Studium těchto vlivů bylo prováděno na semenech a semenáčcích rajčete *Solanum lycopersicum* L., konkrétně na fotomorfogenních mutantech *tri1* a *fri1* a jim odpovídajících standardních genotypech cv. GT a cv. MM. Pro posouzení těchto vlivů byla hodnocena klíčivost semen, citlivost semen k aplikované ABA a kinetika klíčení semen. Dále byl hodnocen prodlužovací růst hypokotylu a kořene vlivem vybraných koncentrací ABA a vybraných světelných podmínek. Všechny provedené experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro*.

V této bakalářské práci bylo potvrzeno, že světlo má na klíčení semen a prodlužování hypokotylu rajčete inhibiční účinek, kdežto na kořen rajčete má efekt stimulační. Zároveň bylo zjištěno, že interakce světla s exogenní ABA vyvolává vyšší citlivost semen a semenáčků k aplikovanému fytohormonu. Tento mechanismus však zatím nebyl zcela objasněn. Pomocí genetického přístupu, tedy analýzou mutantů *tri1* a *fri1*, bylo dokázáno, že citlivost klíčících semen k exogenní ABA je za BL zprostředkovávána PHYA a za RL PHYB1. Dále bylo prokázáno, že PHYA zprostředkovává vliv BL i RL na citlivost hypokotylu k ABA, a také citlivost kořenu k ABA za působení BL. Mezi semenáčky mutantů *tri1* a cv. GT nebyl pozorován rozdíl v citlivosti hypokotylu ani kořene k exogenní ABA. To vede k domněnce, že PHYB1 by nemusel zprostředkovávat vliv světla na citlivost semenáčků k ABA. Pro potvrzení této hypotézy by bylo vhodné tyto experimenty zopakovat s vyšší koncentrací aplikované ABA.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Appenroth, K. J., Lenk, G., Goldau, L., & Sharma, R.** (2006). Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant, Cell & Environment*, 29 (4), 701–709.
- Bareke T.** (2018). Biology of seed development and germination physiology. *Advances in Plants & Agriculture Research*, 8 (4), 336-346.
- Barrero, J. M., Downie, A. B., Xu, Q., & Gubler, F.** (2014). A role for barley CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination. *The Plant Cell*, 26 (3), 1094-1104.
- Bewley J. D.;** (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*. 9 (7): 1055-1066
- Bhagat, P. K., Verma, D., Sharma, D., & Sinha, A. K.** (2021). HY5 and ABI5 transcription factors physically interact to fine tune light and ABA signaling in Arabidopsis. *Plant Molecular Biology*, 107 (1–2), 117–127.
- Buchanan B.B., Gruissem W., & Jones R.L.;** (2015). Biochemistry & Molecular Biology of Plants. 2nd ed. John Wiley & Sons. ISBN 9780470714218
- Capel, J., Jarillo, J. A., Madueño, F., Jorquera, M. J., Martínez-Zapater, J. M., & Salinas, J.** (1998). Low temperature regulates Arabidopsis Lhcb gene expression in a light-independent manner. *Plant Journal*, 13 (3), 411–418.
- Cutler, A. J., & Krochko, J. E.** (1999). Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4 (12), 472–478.
- Cutler, S. R., Rodriguez, P. L., Finkelstein, R. R., & Abrams, S. R.** (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 651–679.
- de Wit, M., Galvão, V. C., & Fankhauser, C.** (2016). Light-Mediated Hormonal Regulation of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Biology*, 67, 513–537.
- Fantini, E., Sulli, M., Zhang, L., Aprea, G., Jiménez-Gómez, J. M., Bendahmane, A., Perrotta, G., Giuliano, G., & Facella, P.** (2019). Pivotal roles of cryptochromes 1a and 2 in tomato development and physiology. *Plant Physiology*, 179 (2), 732-748.
- Fellner, M., & Sawhney, V. K.** (2002). The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*, 214 (5), 675–682.

- Fuciman, M., Enriquez, M. M., Polívka, T., Dallosto, L., Bassi, R., & Frank, H. A.** (2012). Role of xanthophylls in light harvesting in green plants: A Spectroscopic investigation of mutant LHCII and Lhcb pigment-protein complexes. *Journal of Physical Chemistry B*, *116* (12), 3834–3849.
- Galvão, V. C., & Fankhauser, C.** (2015). Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*, *34*, 46–53.
- Gendreau, E., Traas, J., Desnos, T., Grandjean, O., Caboche, M., & Höfte, H.** (1997). Cellular basis of hypocotyl growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, *114* (1), 295–305.
- Gupta, N., Prasad, V. B. R., & Chattopadhyay, S.** (2014). LeMYC2 acts as a negative regulator of blue light mediated photomorphogenic growth and promotes the growth of adult tomato plants. *BMC Plant Biology*, *14* (1), 38.
- Hughes, J.** (2013). Phytochrome cytoplasmic signaling. *Annual Review of Plant Biology*, *5*, 64, 377–402.
- Chen, Q. bin, Wang, W. J., Zhang, Y., Zhan, Q. di, Liu, K., Botella, J. R., Bai, L., & Song, C. P.** (2022). Abscisic acid-induced cytoplasmic translocation of constitutive photomorphogenic 1 enhances reactive oxygen species accumulation through the HY5-ABI5 pathway to modulate seed germination. *Plant, Cell & Environment*, *45* (5), 1474.
- Cheng, M. C., Kathare, P. K., Paik, I., & Huq, E.** (2021). Phytochrome Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*, *72*, 217–244.
- Christie, J. M.** (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 21–45.
- Kerckhoffs et al.** (1997). Growth analysis of wild-type and photomorphogenic-mutant tomato plants. *Physiologia Plantarum*, *99* (2), 309–315.
- Kimura, M., & Kagawa, T.** (2006). Phototropin and light-signaling in phototropism. In *Current Opinion in Plant Biology*, *9* (5), 503–508.
- Kircher, S., Terecskei, K., Wolf, I., Sipos, M., & Adam, E.** (2011). Phytochrome A-specific signaling in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Signaling & Behavior*, *6* (11), 1714–1719.
- Legris, M., & Boccaccini, A.** (2020). Stem phototropism toward blue and ultraviolet light. *Physiologia Plantarum*, *169* (3), 357–368.

- Li, J., Wu, Y., Xie, Q., & Gong, Z.** (2017). *Hormone Metabolism and Signaling in Plants*, London, United Kingdom: Academic Press, an imprint of Elsevier. (pp. 161-202) ISBN: 978-0-12-811562-6
- Li, Q.-H., & Yang, H.-Q.** (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 83 (1), 94–101.
- Liao, J., Deng, B., Yang, Q., Li, Y., Zhang, Y., Cong, J., Wang, X., Kohnen, M. v., Liu, Z.-J., Lu, M.-Z., Lin, D., Gu, L., & Liu, B.** (2023). Insights into cryptochrome modulation of ABA signaling to mediate dormancy regulation in *Marchantia polymorpha*. *New Phytologist*, 238 (4), 1479-1497.
- Lin, C., & Shalitin, D.** (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 469–496.
- Liu, R., Xu, Y. H., Jiang, S. C., Lu, K., Lu, Y. F., Feng, X. J., Wu, Z., Liang, S., Yu, Y. T., Wang, X. F., & Zhang, D. P.** (2013). 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*, 64 (18), 5443-5456.
- Mao, K., Jiang, L., Bo, W., Xu, F., & Wu, R.** (2014). Cloning of the cryptochrome-encoding PeCRY1 gene from *Populus euphratica* and functional analysis in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*, 9 (12).
- Murashige T, Skoog F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15 (3): 473-497
- Nambara, E., & Marion-Poll, A.** (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56, 165–185.
- Ng, L. M., Melcher, K., Teh, B. T., & Xu, H. E.** (2014). Abscisic acid perception and signaling: Structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35 (5), 567–584.
- Oh, E., Kim, J., Park, E., Kim, J. il, Kang, C., & Choi, G.** (2004). PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16 (11), 3045-3058.
- Pałubicki, W., Kokosza, A., & Burian, A.** (2019). Formal description of plant morphogenesis. *Journal of Experimental Botany*, 70 (14), 3601–3613.
- Penfield, S.** (2017). Seed dormancy and germination. *Current Biology*, 27 (17), PR874–R878.

- Peng, J., Wang, M., Wang, X., Qi, L., Guo, C., Li, H., Li, C., Yan, Y., Zhou, Y., Terzaghi, W., Li, Z., Song, C. P., Qin, F., Gong, Z., & Li, J.** (2022). COP1 positively regulates ABA signaling during Arabidopsis seedling growth in darkness by mediating ABA-induced ABI5 accumulation. *The Plant Cell*, *34* (6), 2286-2308.
- Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E.** (2018). Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology*, *176* (2), 1025-1038.
- Raghavendra, A. S., Gonugunta, V. K., Christmann, A., & Grill, E.** (2010). ABA perception and signalling. *Trends in Plant Science*, *15* (7), 395–401.
- Rosado, D., Gramegna, G., Cruz, A., Lira, B. S., Freschi, L., de Setta, N., & Rossi, M.** (2016). Phytochrome interacting factors (PIFs) in *Solanum lycopersicum*: diversity, evolutionary history and expression profiling during different developmental processes. *PLoS ONE*, *11* (11).
- Sawada, Y., Aoki, M., Nakaminami, K., Mitsuhashi, W., Tatematsu, K., Kushiro, T., Koshiha, T., Kamiya, Y., Inoue, Y., Nambara, E., & Toyomasu, T.** (2008). Phytochrome and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*, *146* (3), 1386-1396.
- Shu, K., Liu, X. D., Xie, Q., & He, Z. H.** (2016). Two faces of one seed: hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, *9* (1), 34–45.
- Smith, A. M., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R., & Amey, A.** (2010). *Plant Biology*, New York, N.Y.: Garland Science. ISBN: 978-0-8153-4025-6
- Suetsugu, N., & Wada, M.** (2013). Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant and Cell Physiology*, *54* (1), 8–23.
- Taiz, L., & Zeiger, E.** (2010). *Plant Physiology* 5th ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. ISBN: 978-0-87893-866-7
- van Gelderen, K., Kang, C., & Pierik, R.** (2018). Light signaling, root development, and plasticity. *Plant Physiology*, *176* (2), 1049-1060.
- van 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 Physiology*, *108* (3), 939-947.
- Wang, Q., & Lin, C.** (2020). Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 103–129.

- Wang, Y., Fan, Y., Fan, D., Zhou, X., Jiao, Y., Deng, X. W., & Zhu, D.** (2023). The noncoding RNA HIDDEN TREASURE 1 promotes phytochrome B-dependent seed germination by repressing abscisic acid biosynthesis. *The Plant Cell*, *35* (2), 700–716.
- Wang, Y., Li, J., Deng, X.-W., & Zhu, D.** (2017). Arabidopsis noncoding RNA modulates seedling greening during deetiolation. *Science China Life Sciences*, *61* (2), 199–203.
- Weiner, J. J., Peterson, F. C., Volkman, B. F., & Cutler, S. R.** (2010). Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, *13* (5), 495-502.
- Weller, J. L., Perrotta, G., Schreuder, M. E. L., van Tuinen, A., Koornneef, M., Giuliano, G., & Kendrick, R. E.** (2001). Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *The Plant Journal*, *25* (4), 427–440.
- Xu, D., Li, J., Gangappa, S. N., Hettiarachchi, C., Lin, F., Andersson, M. X., Jiang, Y., Deng, X. W., & Holm, M.** (2014). Convergence of light and ABA signaling on the ABI5 promoter. *PLoS Genetics*, *10* (2), 1004197.
- Zhou, R., Cutler, A. J., Ambrose, S. J., Galka, M. M., Nelson, K. M., Squires, T. M., Loewen, M. K., Jadhav, A. S., Ross, A. R. S., Taylor, D. C., & Abrams, S. R.** (2004). A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant Physiology*, *134* (1), 361-369.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

AAO3	ABA-aldehyde oxidase 3; ABA-aldehyd oxidáza 3
ABA	abscisic acid; kyselina abscisová
ABA-GE	ABA- β -glucosyl ester; ABA- β -glukosylester
ABFs	ABA-responsive element binding factors
ABI1-5	ABA-insensitive 1-5
AMPK	AMP-activated protein kinase
bHLH	basic helix-loop-helix domain
BL	blue light; modré světlo
bZIP	basic leucine zipper
CCE	C-terminal domain; C-terminální doména
COP1	constitutively photomorphogenic 1
CRY1-3	krytochrom 1-3
CRY-DASH	CRY- <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Homo</i>
D	dark; tma
DPA	4'-dihydrophaseic acid; kyselina 4'-dihydrofaseová
FAD	flavin adenine dinucleotide; flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononucleotide; flavin mononukleotid
FRL	far-red light; dlouhovlnné červené světlo
GA	gibberellins; gibereliny
GAF	cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA
GGPP	geranylgeranyl diphosphate
GPCR	G-protein-coupled receptor
GTG1	GPCR-type G protein
HAB1	hypersensitive to ABA 1

HID1	hidden treasure 1
HIR	high-irradiance response
HKRD	histidinkinase's domain
HY4-5	long hypokotyl 4-5
ChlH	Mg ²⁺ chelatase
IPP	isopentenyl diphosphate
LeMYC2	<i>Lyopersicon esculentum</i> myelocytomatosis 2
LFR	low-fluence response; odpověď o nízké fluenci
LHCB	light-harvesting chlorophyl a/b binding
LOV1-2	light-oxygen-voltage domain
MpCRY	kryptochrom <i>Marchantia polymorpha</i>
MYC2	transcription factor myelocytomatosis 2
NCED	9- <i>cis</i> -epoxykarotenoid dioxygenase
Neo PA	neophaseic acid; kyselina neofaseová
NPR	non expresser of patogenesis related
PA	phaseic acid; kyselina faseová
PAS	period/arnt/single-minded
P _{FR}	active form of phytochrome; aktivní forma fytochromu
PHOT1-2	phototropin 1-2; fototropin 1-2
PHR	N-terminal photolyase domain
PHYA-E	phytochrom A-E; fytochrom A-E
PIF	phytochrome interacting factors
PIL5	PIF3-like 5
PP2C	protein phosphatase C typu 2

P _R	inactive form of phytochrome; neaktivní forma fytochromu
PRD	pas-repeat domain
PSII	photosystem II; fotosystém II
PYL1-13	PYR-like 1-13
PYR1	pyrabactin resistance 1
PφB	fytochromobilin
RCAR	regulatory component of ABA receptors
RL	red light; červené světlo
ROS	reactive oxygen species; reaktivní formy kyslíku
SDR	short-chain dehydrogenase/reduktase
SNF1	sucrose nonfermenting 1
SnRK1-3	SNF1-related protein kinase 1-3
SPA	supressor PHYA-105
START	steroidogenic acute regulatory protein-related lipid-transfer
UV	ultraviolet; ultra-fialové záření
VLFR	very low-fluence response; odpověď o velmi nízké fluenci
ZBF1/MYC2bHLH	Z-Box binding Factor 1/MyeloCytomatosis 2 Basic, Helix-Loop-Helix
ZEP	zeaxanthin epoxidase
ZTL/FKF1/LKP2	ZeiTLupe/Flavin-binding, Kelch repeat, F-box/Lov Kelch Protein 2