

**Univerzita Palackého v Olomouci**

**Bakalářská práce**

**Olomouc 2024**

**Lenka Doležalová**

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Fytochromový chromofor a jeho úloha v reakcích  
rostlin ke kyselině abscisové (ABA)**

**Bakalářská práce**

**Lenka Doležalová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

**Olomouc 2024**

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



# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta  
Akademický rok: 2021/2022

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE (projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Lenka DOLEŽALOVÁ  
Osobní číslo: R20696  
Studijní program: B1501 Biologie  
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie  
Téma práce: Fytochromový chromofor a jeho úloha v reakcích rostlin ke kyselině abscisové (ABA)  
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

### Zásady pro vypracování

- Seznámení se s tématem bakalářské práce**  
Studentka se důkladně seznámí s náplní projektu bakalářské práce tak, aby byla schopna definovat základní cíle bakalářské práce, přístupy a metody, které bude při práci používat.
- Shromáždění nejnovějších literárních zdrojů vztahujících se k tématu bakalářské práce a jejich zpracování**  
Zásadním zdrojem literatury, které si studentka musí prostudovat, jsou odborné články, a to především literatura týkající se problematiky růstu rostlin vlivem světla, fotomorfogenese, světelných signálních drah, a problematiky procesů klíčení a růstu regulovaných kyselinou abscisovou (ABA).
- Časová organizace a plán experimentů**  
Časová organizace experimentální práce vychází z plánu práce, který má studentka k dispozici od svého školitele.
- Mastní experimentální práce a dílčí analýzy výsledků**  
Studentka bude provádět experimenty podle plánu práce. Bude studovat růst rostlin fotomorfogenních mutantů (auW, yg-2) rajčete *Solanum lycopersicum* na zvolených koncentracích kyseliny abscisové a v závislosti na světelných podmínkách.
- Konečné zpracování výsledků**  
O každém experimentu bude studentka provádět záznamy do pracovního deníku a vypracuje protokol. Výsledky každého experimentu zpracuje do dílčích grafů a společně s vedoucím uční z výsledků závěry. Všechny výsledky pak studentka postupně zpracuje do konečné výstižné podoby, aby byly připraveny k založení do bakalářské práce.
- Kompletace bakalářské práce**  
Se zpracováním bakalářské práce začne studentka s dostatečným předstihem, tedy nejméně půl roku před plánovanou obhajobou bakalářské práce. Dílčí verze bakalářské práce bude diskutovat s vedoucím bakalářské práce.

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant Physiology*, 5th ed.  
Taiz L. et al. (2015) *Plant Physiology and Development*, 6th ed.  
Jones R. et al. (2013) *The Molecular Life of Plants*, 1st ed.  
Buchanan BB et al. (2015) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd ed.  
Buchanan BB et al. (2010) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 1st ed.

Odborné články v mezinárodních vědeckých časopisech týkající se problematiky bakalářské práce a podle doporučení vedoucího bakalářské práce.

Vedoucí bakalářské práce: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  
Laboratoř růstových regulátorů

Datum zadání bakalářské práce: 27. března 2022

Termín odevzdání bakalářské práce: 4. května 2024

LS.

---

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.  
děkan

---

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.  
vedoucí katedry

V Olomouci dne 12. února 2024

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Lenka Doležalová
Název práce	Fytochromový chromofor a jeho úloha v reakcích rostlin ke kyselině abscisové (ABA)
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby	2024
Klíčová slova	ABA, klíčení, mutant <i>au<sup>w</sup></i> , mutant <i>yg-2</i> , růst, <i>Solanum lycopersicum</i> , světlo
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## SOUHRN

Světlo a kyselina abscisová (ABA) ovlivňují růst a vývoj rostlin. Cílem této bakalářské práce bylo zaměřit se na studium interakce signálních drah světla a ABA v procesu klíčení semen rajčete a růstu hypokotylu a kořene. Ke studiu byl použit genetický přístup, který spočíval v analýze fotomorfogenních mutantů rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Konkrétně byla použita semena recesivních mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* deficientních ve fytochromovém chromoforu. Kultivace semen a semenáčků probíhala v podmínkách *in vitro* ve tmě, na modrém a červeném světle na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace ABA. Výsledky experimentů poukázaly, že světelné záření způsobuje inhibici klíčení semen rajčete a redukuje prodlužování hypokotylů. Naopak, světlo stimulovalo růst kořenů. Na základě genetického přístupu bylo zjištěno, že enzym P $\Phi$ B syntáza, zapojena v biosyntéze chromoforu, není pravděpodobně zapojena v citlivosti semen rajčete k aplikované ABA. Naopak, necitlivost semen *yg-2* k ABA naznačuje vliv fytochromů v reakcích semen rajčete k ABA. Dále bylo zjištěno, že fytochromy pravděpodobně zprostředkovávají vliv světla na citlivost hypokotylů i kořenů rajčete k ABA.

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Lenka Doležalová
Title of thesis	Phytochrome chromophore and its role in plant responses to abscisic acid (ABA)
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2024
Key words	ABA, germination, growth, light, mutant <i>au<sup>w</sup></i> , mutant <i>yg-2</i> , <i>Solanum lycopersicum</i>
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

## SUMMARY

Light and abscisic acid (ABA) affect plant growth and development. The aim of this bachelor thesis was to study the interaction of light and ABA signaling pathways during tomato seed germination and hypocotyl and root growth. For the study, a genetic approach was used consisting in the analysis of photomorphogenic mutants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Namely, seeds of recessive mutants *au<sup>w</sup>* and *yg-2* deficient in the phytochrome chromophore were used. Culture of seeds and seedlings was carried out in conditions *in vitro* in the dark, under blue and red light, and on the culture, medium containing ABA in selected concentrations. The experimental results showed that light irradiation caused inhibition of tomato seed germination and reduced hypocotyl elongation. In opposite, light stimulated root growth. Based on the genetic approach, it was found that the enzyme PΦB synthase, involved in chromophore biosynthesis, is not likely involved in the sensitivity of tomato seeds to applied ABA. On the contrary, the insensitivity of *yg-2* seeds to ABA suggests the influence of phytochromes in the responses of tomato seeds to ABA. Furthermore, it was found that phytochromes probably mediate the effect of light on the sensitivity of tomato hypocotyls and roots to ABA.

### **Prohlášení**

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

V Olomouci dne: .....

.....

Lenka Doležalová

## **Poděkování**

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

# Obsah

<b>1</b>	<b>Úvod a cíle práce .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>Literární přehled .....</b>	<b>2</b>
2.1	Klíčení .....	2
2.2	Růst rostlin.....	6
2.3	Světlo .....	7
2.3.1	Fotoreceptory modrého světla .....	10
2.3.1.1	Kryptochromy .....	10
2.3.1.2	Fototropiny .....	12
2.3.1.3	Rodina receptorů ZEITLUPE .....	13
2.3.2	Fotoreceptory červeného světla.....	14
2.4	Kyselina abscisová .....	20
2.4.1	Chemická struktura kyseliny abscisové .....	20
2.4.2	Biosyntéza kyseliny abscisové .....	21
2.4.3	Katabolismus kyseliny abscisové .....	23
2.4.4	Signální dráha kyseliny abscisové.....	25
2.5	Interakce kyseliny abscisové a světla .....	28
<b>3</b>	<b>Materiál a metody .....</b>	<b>32</b>
3.1	Rostlinný materiál.....	32
3.2	Použité chemikálie a roztoky .....	32
3.3	Použité přístroje .....	32
3.4	Pracovní postupy .....	33
3.4.1	Příprava kultivačního média.....	33
3.4.2	Studium klíčivosti semen .....	33
3.4.2.1	Povrchová sterilizace semen .....	33
3.4.2.2	Příprava kultivačního média se zvolenými koncentracemi ABA .....	34
3.4.2.3	Výsev semen .....	34
3.4.2.4	Vyhodnocení klíčivosti .....	35
3.4.3	Studium růstu rostlin .....	35
3.4.3.1	Výsev semen .....	35
3.4.3.2	Přenos semen na kultivační médium se zvolenými koncentracemi ABA ..	35
3.4.3.3	Vyhodnocení růstu .....	36
<b>4</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>37</b>

4.1	Citlivost klíčivosti semen mutantu <i>au<sup>w</sup></i> k ABA .....	38
4.2	Citlivost klíčivosti semen mutantu <i>yg-2</i> k ABA .....	40
4.3	Citlivost růstu hypokotylu mutantů <i>au<sup>w</sup></i> a <i>yg-2</i> k ABA .....	42
4.4	Citlivost růstu kořenů mutantů <i>au<sup>w</sup></i> a <i>yg-2</i> k ABA .....	46
<b>5</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>51</b>
5.1	Vliv ABA na klíčení .....	51
5.2	Vliv ABA na růst hypokotylu.....	53
5.3	Vliv ABA na růst kořene .....	55
<b>6</b>	<b>Závěr.....</b>	<b>57</b>
<b>7</b>	<b>Literatura.....</b>	<b>58</b>



## Seznam symbolů a zkratek

AAO	ABA-aldehyde oxidase (abscisic aldehyd oxidáza)
ABA	abscisic acid (kyselina abscisová)
ABA-GA	ABA- $\beta$ -glucosyl ester (ABA $\beta$ -glukosyl ester)
ABD1	acting-binding domain 1
ABFs	ABA-responsive element binding factors
ABI5	ABA-insensitive 5
bHLH	basic helix-loop-helix domain
BL	blue light (modré světlo)
bZIP	basic leucin ZIPper
CCE	C-terminal domain (C-terminální doména)
COP 1	COstitutively Photomorphogenic 1
CRY1-3	cryptochrome 1-3 (krytochrom 1-3)
CRY-DASH	CRY- <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> , <i>Homo</i>
D	dark (tma)
DPA	dihydrophaseic acid (kyselinu dihydrofaseová)
FAD	flavin adenine dinucleotide (flavin adenin dinukleotid)
FHL	FHY1-like
FHY1	far-red elongated hypokotyl 1
FMN	flavin mononukleotide (flavin mononukleotid)
FRL	far-red light (dlouhovlnné červené světlo)
GA	gibberellins (gibereliny)
GAF	cGMP fosfodiesteráza/adenylyl cykláza/FhlA
GGPP	geranylgeranyl diphosphate (geranylgeranyl difosfát)

GPCR	G-protein-coupled receptor
GTG1-2	GPCR-type G protein 1-2
HFR1	long hypocotyl in far-red 1
HIR	high-irradiance response (odezva k vysoké ozáření)
HKRD	histidinkinase's domain (histidin kinázová doména)
HYP 4-5	long hypokotyl 4-5
CHLH	magnesium-chelatase subunit
IPP	isopentenyl diphosphate (isopentenyldifosfát)
LAF1	long after far-red light 1
LeMYC2	<i>Lyopersicon esculentum</i> myelocytomatosis 2
LFR	low-fluence response (odezva k nízké ozáření)
LHCB	Light Harvesting Chlorophyll a/b Binding
LOV1-2	light – oxygen – voltage domain
MS	Murashige and Skoog médium
MYC2	transcription factor myelocytomatosis 2 (transkripční faktor myelocytomatosis 2)
NCED	9-cis-epoxykarotenoid dioxygenase (9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza)
NeoPA	neophaseic acid (kyselinu neofaseová)
NLS	nuclear localization signal (jaderná lokalizační sekvence)
NPR 1, 2	nonexpressor of pathogenesis-related 1, 2
PA	phaseic acid (kyselinu faseová)
PAS	period/arnt/single-minded
P <sub>FR</sub>	active form of phytochrome (aktivní forma fytochromu)
PHOT1-2	phototropin 1-2 (fototropin 1-2)

PHR	N-terminal photolyase domain (N-terminální fotolyázová doména)
PHY A-E	phytochrom A-E (fytochrom A-E)
PIF	phytochrome interacting factors (fytochromové interakční faktory)
PIL 5	PIF3-like 5
PIN	PIN-formed
PP2A	protein phosphatase A typu 2 (protein fosfatáza 2A)
PP2C	protein phosphatase C typu 2 (protein fosfatáza 2C)
P <sub>R</sub>	inactive form of phytochrome (neaktivní forma fytochromu)
PRD	PAS repeat Domain
PSII	photosystem II (fotosystém II)
PYL	PYR1 like
PYR1	pyrabactin resistance 1
PΦB	phytochromobilin (fytochromobilin)
RCAR	regulatory component of ABA receptors
RL	red light; červené světlo
SDR	short-chain dehydrogenase/reduktase
SnRK2	SNF1-related protein kinase 2 (serin/threoninová protein kináza)
START	steroidogenic acute regulatory protein-related lipid-transfer
UV	ultraviolet (ultrafialové záření)
UVR 8	UV response locus 8
VLFR	very low-fluence response (odezva k velmi nízké ozáření)
ZBF1/MYC2bHLH	Z-Box binding Factor 1/MyeloCytomatosis 2 Basic, HelixLoop-Helix
ZEP	zeaxanthin epoxidase (zeaxanthin epoxidáza)
ZTL/FKF1/LKP2	ZeiTLupee/Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1/Lov Kelch Protein 2

## Seznam obrázků

<b>Obrázek 1:</b> Fáze klíčení a procesy, ke kterým v nich dochází.....	3
<b>Obrázek 2:</b> Hormonální a molekulární reakce vedoucí ke klíčení semene .....	5
<b>Obrázek 3:</b> Rozdíl ve morfologii rostlin vyvíjejících se na světle (fotomorfogeneze) a ve tmě (skotomorfogeneze).....	8
<b>Obrázek 4:</b> Oblasti vlnových délek, které jsou absorbovány příslušnými fotoreceptory .....	9
<b>Obrázek 5:</b> Struktura kryptochromu (CRY) .....	11
<b>Obrázek 6:</b> Struktura fototropinu. Modrým světlem vyvolaná fosforylace fototropinu .....	13
<b>Obrázek 7:</b> Struktura fytochromu rostlin .....	15
<b>Obrázek 8:</b> Přeměna neaktivní formy fytochromu $P_R$ na aktivní formu $P_{FR}$ . Struktura $P_R$ a $P_{FR}$ formy chromoforu (fytochromobilin).....	16
<b>Obrázek 9:</b> Transport fytochromů do jádra je vyvolán přeměnou jejich formy $P_R$ na $P_{FR}$ .....	17
<b>Obrázek 10:</b> Regulace genové exprese pomocí fytochromů .....	18
<b>Obrázek 11:</b> Chemická struktura ( <i>S</i> )- <i>cis</i> -ABA .....	21
<b>Obrázek 12:</b> Chemická struktura ( <i>R</i> )- <i>cis</i> -ABA.....	21
<b>Obrázek 13:</b> Biosyntetická dráha kyseliny abscisové.....	23
<b>Obrázek 14:</b> Katabolická dráha kyseliny abscisové v rostlinách.....	25
<b>Obrázek 15:</b> Signální dráha kyseliny abscisové .....	27
<b>Obrázek 16:</b> COP1 se podílí na regulaci signální dráhy ABA během růstu semenáčků <i>Arabidopsis thaliana</i> ve tmě .....	31
<b>Obrázek 17:</b> Klíčivost semen cv. MM a mutanta <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) 7. den od výsevu.....	38
<b>Obrázek 18:</b> Klíčivost semen cv. MM a mutanta <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) 7. den od výsevu .....	39
<b>Obrázek 19:</b> Klíčivost semen cv. MM a mutanta <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) 7. den od výsevu.....	39
<b>Obrázek 20:</b> Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) 7. den od výsevu .....	40
<b>Obrázek 21:</b> Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) 7. den od výsevu .....	41
<b>Obrázek 22:</b> Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) 7. den od výsevu .....	41

<b>Obrázek 23:</b> Růst hypokotylu cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní .....	42
<b>Obrázek 24:</b> Růst hypokotylu cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní .....	43
<b>Obrázek 25:</b> Růst hypokotylu cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní .....	44
<b>Obrázek 26:</b> Růst hypokotylu cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní .....	44
<b>Obrázek 27:</b> Růst hypokotylu cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní .....	45
<b>Obrázek 28:</b> Růst hypokotylu cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní .....	46
<b>Obrázek 29:</b> Růst kořene cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní .....	46
<b>Obrázek 30:</b> Růst kořene cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní .....	47
<b>Obrázek 31:</b> Růst kořene cv. MM a mutantu <i>au<sup>w</sup></i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní .....	48
<b>Obrázek 32:</b> Růst kořene cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní .....	48
<b>Obrázek 33:</b> Růst kořene cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní .....	49
<b>Obrázek 34:</b> Růst kořene cv. Kokomo a mutantu <i>yg-2</i> v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní .....	50

# 1 Úvod a cíle práce

Klíčení je proces, během kterého dochází k přeměně semene v rostlinu (Procházka et al., 1998). Tento děj je ovlivňován vnějšími (exogenními) a vnitřními (endogenními) faktory (Oh et al., 2006). Mezi vnější faktory patří dostatečné množství vody, optimální teplota a světlo (Koornneef et al., 2002). Endogenní faktory zahrnují fytohormony, především kyselinu abscisovou (ABA) a gibereliny, které mají na klíčení antagonistický vliv (Oh et al., 2006). Po úspěšném vyklíčení semene následuje postupný růst a vývoj semenáčků (Taiz et al., 2015). Nejprve rostlina investuje energii do tvorby kořenového systému, a až když je kořenový systém dostatečně vyvinutý, začne investovat energii do růstu nadzemní části rostliny (Kupka, 2007). Kombinace těchto vnějších a vnitřních faktorů má zásadní vliv i na další růst a vývoj rostliny. Aby mohla rostlina přijímat dopadající sluneční záření, došlo u ní k vytvoření fotosenzitivních molekul, tzv. fotoreceptorů. Růst a vývoj rostlin je ovlivňován nejaktivnějšími oblastmi spektra, jako je červené záření o vlnové délce 620-700 nm, oblast 710-800 nm patřící dlouhovlnnému červenému záření a modré záření (350-500 nm) (Jones et al., 2013). ABA je rostlinný hormon, který hraje zásadní roli v mnoha aspektech fyziologie rostlin. Podílí se na regulaci pohybu průduchů, inhibuje klíčení semen a umožňuje rostlině vyrovnat se s potencionálním suchem, chladem a dalšími stresovými faktory (Li et al., 2017). Bylo zjištěno, že světelné záření a ABA neovlivňují vývoj rostlin odděleně, ale jejich signální dráhy se vzájemně ovlivňují (Lau and Deng, 2010).

Tato bakalářská práce si klade za cíl studovat vzájemnou interakci světla a aplikované ABA v procesu klíčení semen a růstu rostlin. Zároveň bylo zjišťováno, zda působení světla na citlivost rostlin k ABA může být zprostředkováno fytochromy. K vybraným experimentům byla použita semena rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. V praktické části byl použit genetický přístup, který spočíval v analýze dvou fotomorfogenních mutantů *au<sup>w</sup>* (*aurea*) a *yg-2* (*yellow-green 2*) s poruchou v biosyntéze fytochromového chromoforu (Koornneef et al., 1985; Terry and Kendrick, 1996; Terry, 1997).

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

## 2 Literární přehled

### 2.1 Klíčení

Růst a vývoj rostliny, její ontogenetický vývoj, sestává z několika fází. Jsou jimi konkrétně klíčení semen, růst, vegetativní fáze, generativní fáze a senescence. Klíčení představuje děj, během kterého dochází v průběhu různorodých procesů k přeměně semene v rostlinu. Klíčení tak představuje jednu z klíčových fází v životě rostliny, během které dochází k obnově metabolické aktivity semene. Semeno vzniká a následně dozrává v rostlině a po opuštění rostliny dochází k jeho přechodu z fáze aktivní do fáze latentní. Během latentní fáze dochází ke ztrátě vody ze semena a k utlumení všech v něm probíhajících procesů, čímž semeno maximalizuje šetření energie (Procházka et al., 1998). Hlavním důvodem změny stavu semene je, aby bylo semeno schopné přečkat nepříznivé vnější podmínky, a to až do okamžiku, kdy bude schopné klíčení. Toto období však může trvat i několik let (Taiz et al., 2015).

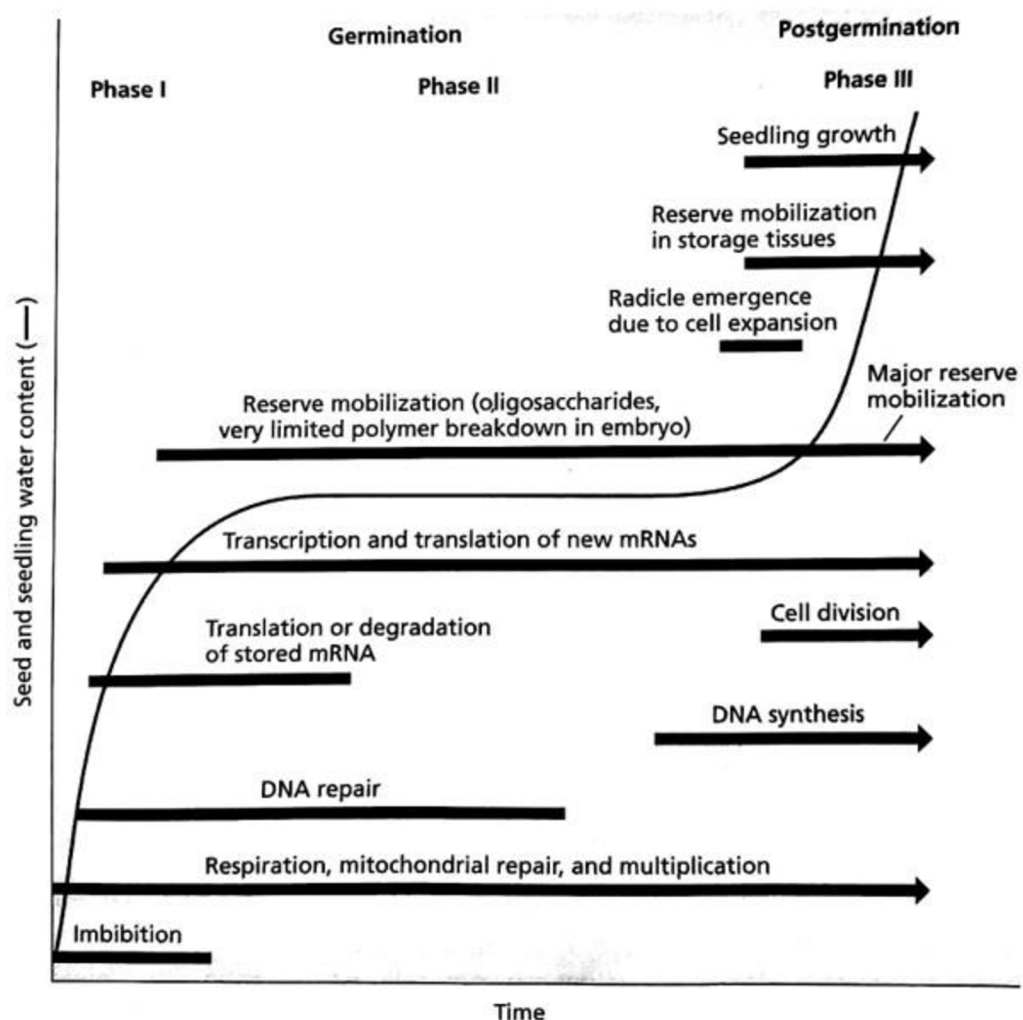
Tato klidová fáze semene se nazývá dormance, přičemž schopnost semene přežít v životaschopném stavu až do okamžiku, kdy jsou podmínky ideální a může být spuštěno klíčení, je druhově specifická. Kupříkladu semeno rajčete je schopné přežít v klidovém období až po dobu 8 let (Procházka et al., 1998).

K samotnému klíčení semene dochází v momentu, kdy semeno začne přijímat velké množství vody a začne tzv. bobtnat, zvyšovat svůj objem a velikost. Tomuto momentu musí předcházet dosažení ideálních vnějších podmínek, jako je ideální teplota, množství světelné energie nebo vlhkost (Koornneef et al., 2002). Proces bobtnání semene se nazývá imbibice, a dochází k němu jak u živých, tak i mrtvých semen (Bewley, 1997).

Embryo uvnitř semena rostliny je opatřeno několika ochrannými obaly, konkrétně endospermem a osemením. Právě zmíněné osemení představuje obal, prostřednictvím kterého je embryo schopné komunikovat se svým okolím, respektive je schopno skrze něj přijímat vodu, popřípadě realizovat výměnu plynů (Bewley, 1997). Osemení je totiž opatřeno otvorem, tzv. mikropyle, skrze které je embryo během klíčení schopné přijímat vodu a bobtnat (Jones et al., 2013).

Klíčení semen rostliny včetně příjmu vody se skládá ze tří fází (Obr. 1). První fáze, která se nazývá imbibice, je dána rychlým příjmem vody semenem a hydratací makromolekul, což vede k jeho bobtnání a restrukturalizaci kvůli narušení struktury buněčných membrán. Tato fáze je také provázena únikem metabolitů. Druhá fáze, tzv. plató nebo lag fáze, je období pomalejšího a stabilního příjmu vody, které je spjato s počátečním rozšiřováním embrya a oslabením jeho ochranných vrstev. Tuto fázi dále provází spuštění metabolických procesů, jako

jsou oprava mitochondrií a znovu zahájení jejich syntézy nebo syntéza proteinů z nově vzniklé mRNA. Jakmile dojde k proražení kořínku ochrannými obaly semene, tato fáze končí. V průběhu poslední třetí fáze, která probíhá až před samotným ukončením celého procesu klíčení, se příjem vody obnovuje díky uvolnění buněčné stěny a rozpadu buněk. Právě v této fázi vzniká primární kořínek rostliny, který při svém vývoji vyžaduje zvýšené množství vody. Dále probíhá buněčné dělení, syntéza DNA a současně i postupná elongace embryonální osy rostliny. Tuto fázi také provází mobilizace zásobních rezerv z endospermu do osy embrya, kdy dochází k rozkladu bílkovin na jednodušší aminokyseliny a štěpení škrobu na jednoduché cukry (Bewley, 1997, Taiz et al., 2015; Luján-Soto and Dinkova, 2021).



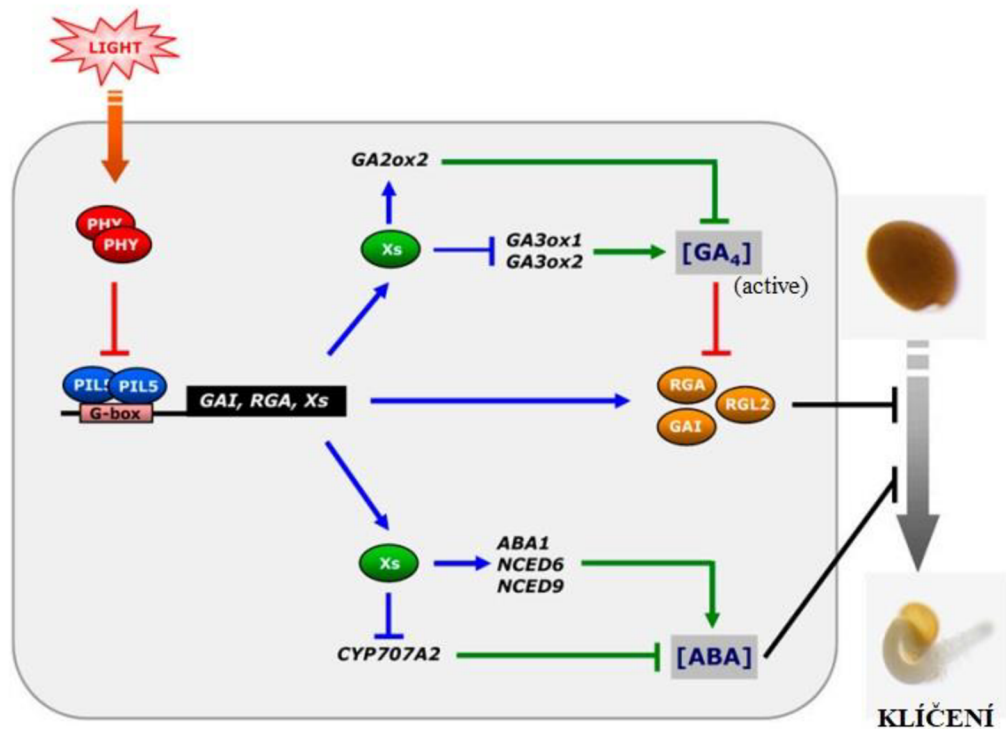
**Obrázek 1:** Fáze klíčení a procesy, ke kterým v nich dochází. Převzato z Taiz et al., 2015.



Samotný proces klíčení je, jak již bylo zmíněno, ovlivňován mnoha různými vnějšími (exogenními) a vnitřními (endogenními) faktory (Oh et al., 2006). Zmiňovány byly především vnější faktory, mezi které patří především přítomnost dostatečného množství vody nebo optimální teplota (Koornneef et al., 2002). Mezi významné endogenní faktory patří především fytohormony neboli rostlinné metabolity, které ovlivňují růst a vývoj rostliny. Mezi fytohormony, které se nejvíce podílejí na klíčení a růstu rostlin, patří zejména kyselina abscisová, gibereliny, auxiny a brasinosteroidy (Procházka et al., 1998, Debeaujon and Koornneef, 2000).

Fytohormony mohou klíčivost a růst rostlin stimulovat nebo naopak inhibovat. V tomto ohledu proti sobě stojí zejména hormony, a to kyselina abscisová (ABA), která udržuje semeno v latentní fázi a dormanci, a gibereliny (GA), které stojí za spuštěním klíčení semene. Tyto fytohormony jsou si tak sobě navzájem antagonisty a od jejich aktuální hladiny v rámci semene se odvíjí, zda bude semeno vyčkávat v dormanci nebo začne klíčit (Oh et al., 2006).

Hladiny zmíněných fytohormonů tak udávají počátek klíčení. Expresi genů, které stojí za biosyntézou giberelinů a kyseliny abscisové, je mimo jiné regulována proteinem PIL5 (PIF3-like 5), který je současně funkčně propojen s fytochromy (Oh et al., 2006) (Obr. 2). Poté, co fytochromy zachytí světelný signál, spouští inhibici proteinu PIL5, který reguluje expresi genů zapojených v biosyntéze či degradaci fytohormonů (GA, ABA). Regulace pak konkrétně probíhá tak, že na jedné straně dochází k utlumení exprese genů, které mají na svědomí tvorbu ABA, na druhé straně však současně dochází ke stimulaci exprese genů, které řídí biosyntézu GA. Tím dochází v semeni k převaze giberelinů nad kyselinou abscisovou a může tak dojít ke spuštění procesu klíčení (Oh et al., 2006; Feng et al., 2008) (Obr. 2).



**Obrázek 2:** Hormonální a molekulární reakce vedoucí ke klíčení semene. Červené linie zobrazují děje probíhající na úrovni proteinů, modré čáry děje probíhající na úrovni transkripce a zeleně jsou označeny procesy probíhající na základě enzymatických aktivit. Expresi genů *GAI*, *RGA* a neznámých faktorů (*Xs*) aktivuje ve tmě protein *PIL5*. Děje se tak na základě vazby *PIL5* na příslušné promotory prostřednictvím *G-box* elementů. Tím se zvýší hladiny proteinů *GAI*, *RGA* a faktorů *X*. Faktory *X* potlačují biosyntetické geny *GA* a katabolické geny *ABA*. Výsledkem je snížení hladin *GA* a zvýšení hladin *ABA*. V důsledku poklesu *GA* se stabilizují proteiny *DELLA*, což zvyšuje jejich hladinu a potlačuje odezvy na *GA*. Opačná situace nastává po ozáření světlem, kdy fytochromy indukují inhibici *PIL5*. Na základě inhibice je hladina proteinů *GAI* a *RGA* a *ABA* snížena. Úroveň *RGL2* je rovněž snížena (v důsledku zvýšeného množství bioaktivních *GA*) i přesto, že není přímo transkripčně regulována *PIL5*. Ve výsledku jsou spuštěny procesy (mobilizace zásobních rezerv, hydrolyza buněčné stěny) vedoucí k zahájení klíčení semene. Převzato z Oh et al., 2007.

## 2.2 Růst rostlin

Rostliny během svého života procházejí neustálým růstem a vývojem. Poté, co dojde k úspěšnému vyklíčení semene, vzniká primární kořínek, prostřednictvím kterého je rostlina uchycena v substrátu a přijímá vodu a živiny (Taiz et al., 2015). V této prvotní fázi růstu rostlina investuje maximální množství energie do tvorby a rozvoje svého kořenového systému. Poté, co je kořenový systém dostatečný, investuje rostlina energii do růstu své nadzemní části, respektive do tvorby stonku, listů a květů (Kupka, 2007). Růst rostliny je tedy výsledkem mnoha různých komplexních procesů a dějů, ke kterým v rámci rostliny dochází (Šetlík et al., 2015; Taiz et al., 2015).

Světlo představuje pro rostlinu životně nezbytný faktor, co se jejího růstu a vývoje týče. Růst rostlin může probíhat buď na světle nebo ve tmě. Obě cesty růstu jsou odlišné a mají na rostliny opačný vliv. Pokud se rostlina vyvíjí ve tmě, označujeme tento proces skotomorfogenezi – rostliny mají dlouhé stonky, vytvořený apikální háček a nemají dostatečně rozvinuté listy a kořenový systém. Naopak pokud je vývoj rostlin ovlivněn světlem, pak vznikají rostliny s krátkým stonkem, rozvinutými listy a také jejich apikální háček se rozvíjí (Procházka et al., 1998; Smith et al., 2010; Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).

Je to ale právě kombinace vnějších a vnitřních faktorů, která růst rostlin stejně jako klíčení zásadně ovlivňuje a společně synchronizuje vývoj rostliny vzhledem k vnějším podmínkám či případným změnám v rámci tohoto prostředí. Mezi exogenní faktory patří zejména teplota okolního prostředí, množství a kvalita dopadajícího slunečního záření, koncentrace oxidu uhličitého v prostředí obklopujícím rostlinu, popřípadě dostupnost vody a živin v půdě (Smith et al., 2010; Li et al., 2017).

Mezi významné endogenní faktory jsou počítány rostlinné hormony, tzv. fytohormony, které na buněčné a molekulární úrovni koordinují různé metabolické a vývojové procesy, ke kterým v rámci rostlinného organismu dochází (Jones et al., 2013; Li et al., 2017). Růst rostlin zásadně ovlivňují auxiny. Jejich účinky spočívají ve vývoji meristému, regulaci prodlužovacího růstu, růstu adventivních kořenů a regulaci apikální dominance. Mezi další fytohormony podílející se na růstu patří gibereliny a brasinosteroidy. Růst rostlin ale není vždy jen indukován. Například cytokininy, kyselina abscisová nebo ethylen růst spíše inhibují. Fytohormony v rámci rostlinného těla působí na molekulární úrovni a jejich působení je zajišťováno vazbou na buněčné receptory (Li et al., 2017).

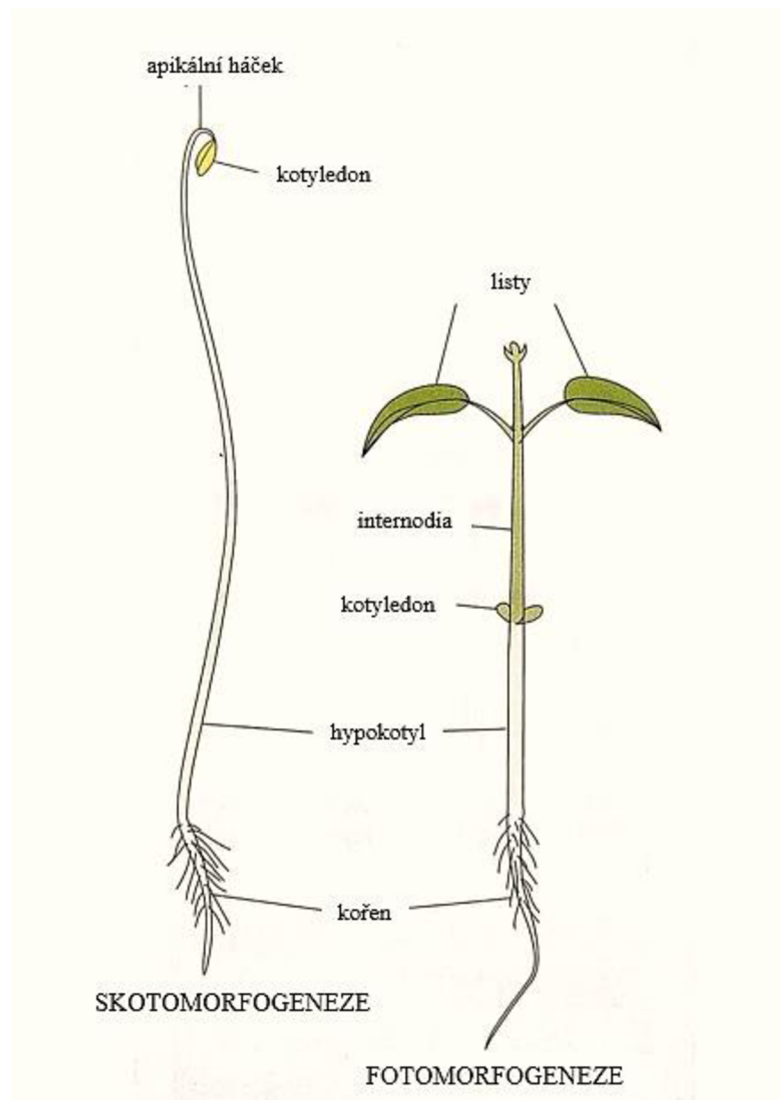
## 2.3 Světlo

Rostliny nejsou schopné pohybu, a tudíž jim není umožněno změnit svoji lokalitu, když vnější podmínky nejsou ideální nebo se mění. Aby se mohly rostliny lépe adaptovat na usedlý způsob života, došlo u nich k masivnímu přizpůsobení se vzhledem k neustále se měnícím podmínkám vnějšího prostředí. Pro rostlinu představuje nejvýznamnější exogenní faktor přísun slunečního záření. Světlo je tedy pro rostliny nezbytné (Pavlová and Fischer, 2011; Jones et al., 2013). Přítomnost světla ovšem není pro klíčení semen všech druhů vždy přímo vyžadována. Na základě toho jsou rostliny děleny do dvou rozdílných skupin. Konkrétně se jedná o rostliny, jejichž semena jsou pozitivně fotoblastická nebo negativně fotoblastická. Pozitivně fotoblastická jsou taková, u nichž dochází ke stimulaci klíčení vlivem světelné energie, a naopak ta u nichž světlo klíčení narušuje, se označují negativně fotoblastická (Procházka et al., 1998).

Všeobecně lze říct, že světlo představuje významný faktor pozitivně ovlivňující klíčení semen zejména u těch druhů rostlin, která disponují malými a početnými semeny (Seo et al., 2009). Při stimulaci klíčení semen světlem má však význam nejenom množství a intenzita dopadajícího záření, ale i jeho trvání nebo specifická délka vlnového spektra. Bez světelné energie by totiž nemohl probíhat proces zvaný fotosyntéza, díky které dochází k přeměně anorganických látek v látky organické, ze kterých rostlinné tělo sestává (Smith et al., 2010; Jones et al., 2013).

Celý proces, při kterém je světlo v roli signálu a mění vývoj rostliny tak, aby mohla při svém následném růstu využívat světlo coby zdroj energie, je nazýván fotomorfogenezí (Taiz et al., 2015; Tripathi et al., 2019). Rostliny vyvíjející se během temnostní fáze jsou etiolizované (proces skotomorfogeneze), zatímco světlo vyvolává de-etiolizaci (proces fotomorfogeneze) (Obr. 3). Během fotomorfogeneze si rostlina vytváří jak vnější morfologickou, tak vnitřní anatomickou podobu. Oba tyto děje přechází mezi sebou a tento přechod z temnostní do světelné fáze označujeme jako de-etiolizaci (Smith et al., 2010; Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).

V průběhu fotomorfogeneze pigmenty ve fotoreceptorech rostliny přijímají světelnou energii ve formě fotonů, což se nazývá absorpce světla. Poté dochází ke změně energie elektromagnetického signálu na biologický podnět, který se šíří celou rostlinou. Následně rostlina odpovídá na tento impuls z vnějšího prostředí pomocí hormonů a steroidních látek, které mohou pomoci přizpůsobit se stresovým faktorům (Jones et al., 2013).



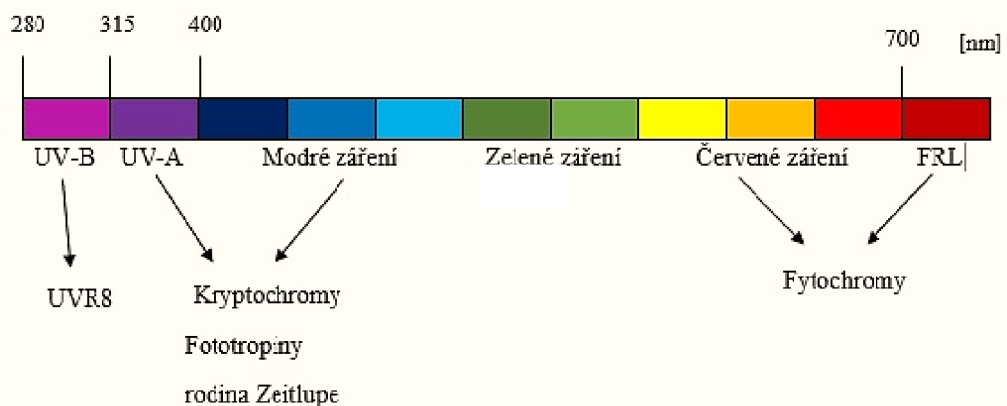
**Obrázek 3:** Rozdíl ve morfologii rostlin vyvíjejících se na světle (fotomorfogeneze) a ve tmě (skotomorfogeneze).  
Převzato a upraveno z Smith et al., 2010.

Samotný proces fotomorfogeneze je řízen transkripčními faktory, které aktivují geny způsobující změny v růstu a vývoji rostlin. Tyto transkripční faktory jsou však ve tmě nestabilní, protože jsou rozkládány pomocí ubiquitinace, kterou zprostředkovává protein COP1 (COnstitutively Photomorphogenic1). Protein COP1 se ve tmě nachází v jádru buňky, kde se váže na transkripční faktory a označuje je pro degradaci. Když se však rostlina dostane na světlo, protein COP1 se přesune z jádra do cytoplazmy, čímž se uvolní transkripční faktory a umožní expresi genů, které fotomorfogenezi podporují (Arsovski et al., 2012; Taiz et al., 2015).

Světlo lze definovat jako viditelné elektromagnetické záření o vlnové délce v rozmezí přibližně 380-760 nm (Obr. 4). Růst a vývoj rostlin je ovlivňován nejaktivnějšími oblastmi

spektra, jako je červené záření o vlnové délce 620-700 nm a dále oblast 710-800 nm patřící dlouhovlnnému červenému záření. Významný vliv na vývoj rostliny má také světlo o vlnové délce 350-500 nm, která charakterizuje modré záření. Oblast spektra 320-400 nm představuje ultrafialové záření typu A, 290-320 nm patří ultrafialovému záření typu B a záření 100-280 nm představuje ultrafialové záření typu C (Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).

Reakce rostlin ke světlu lze rozdělit podle jeho množství, které je potřebné k tomu, aby reakce proběhla. Rostliny bychom mohli přirovnat k malým světelným detektorům, které dokážou reagovat na různé druhy světla. Některé z nich potřebují jen malé množství světla, aby byly aktivovány, zatímco jiné potřebují nepřetržité osvětlení (Taiz et al., 2015). Například tzv. odezvy k velmi nízké ozáření (VLFR) nastávají již při  $100 \text{ pmol.m}^{-2}$ , což je množství světla, které lze získat z jedné malé žárovky. Odezvy k nízké ozáření (LFR) se vyskytují v rozmezí  $1-1000 \text{ } \mu\text{mol.m}^{-2}$ , což je množství světla podobné tomu, které představuje běžné denní světlo. Naopak odezvy k vysoké ozáření (HIR) vyžadují nepřetržité světlo s celkovým fotonovým proudem typicky přesahujícím  $10 \text{ mmol.m}^{-2}$ . Tomuto množství světla by odpovídal intenzivní sluneční svit. Tyto světelné odezvy jsou důležité a slouží pro charakterizaci různých typů reakcí, které jsou zprostředkovány fytochromy (Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).



**Obrázek 4:** Oblasti vlnových délek, které jsou absorbovány příslušnými fotoreceptory. Vytvořeno v Microsoft Office Word. Inspirováno Buchanan et al., 2015.

Aby mohla rostlina přijímat a dále pracovat s dopadajícím slunečním zářením, došlo u ní k vytvoření speciálních fotosenzitivních molekul, tzv. fotoreceptorů (Taiz et al., 2015). Receptory fungují na principu interakce s fotony příslušné vlnové délky, která vyvolá specifickou odezvu, a jsou charakteristické svým absorpčním spektrem. Fotoreceptorů existuje v rámci rostlin hned několik desítek druhů, kdy jednotlivé skupiny fotoreceptorů jsou schopné zachytit pouze záření o specifické vlnové délce (Christie et al., 2015) (Obr. 4). Rozlišujeme

celkem 5 skupin fotoreceptorů. Červené (RL) a dlouhovlnné červené světlo (FRL), ale částečně i modré (BL), je absorbováno fytochromy. Modré světlo a vlnové délky ultrafialového záření typu A (UV-A) jsou detekovány především kryptochromy, fototropiny a rodinou receptorů Zeitlupe. Posledním typem fotoreceptoru je receptor zvaný UV rezistence 8 (UVR8), který přijímá ultrafialové záření typu B (UV-B) (Smith et al., 2010; Christie et al., 2015; Taiz et al., 2015).

Fotoreceptory označujeme jako chromoproteiny, které jsou složené z apoproteinu a chromoforu. Apoprotein se váže na nejrůznější chromofory a na základě jejich chemických vlastností (apoproteinu a chromoforu) je zachyceno záření odpovídající příslušné vlnové délce (Buchanan et al., 2015).

### **2.3.1 Fotoreceptory modrého světla**

Modré světlo o vlnové délce mezi 350 a 500 nm ovlivňuje rostliny zejména během jejich vegetativního růstu, kdy se aktivně podílí na fototropismu, inhibici prodlužování hypokotylu, pohybu chloroplastů nebo otevírání průduchů. Mimo jiné má modré světlo zásadní roli při tvorbě chlorofylů a karotenoidů a podporuje průběh fotosyntézy. Na modré světlo jsou schopné reagovat všechny vyšší rostliny, řasy, kapradiny, houby i prokaryota (Taiz et al., 2015).

Rostlina musí disponovat receptory, které jsou schopné reagovat na světlo konkrétní vlnové délky. V případě modrého světla a ultrafialového záření typu A se jedná o kryptochromy, fototropiny a také o receptory proteinové rodiny Zeitlupe (Smith et al., 2010; Christie et al., 2015).

#### **2.3.1.1 Kryptochromy**

Rostlinné kryptochromy (CRY) představují specifické receptory, které jsou schopné vnímat a reagovat na modré a UV-A světelné spektrum. V případě, že je modré světlo těmito receptory skutečně zachyceno, může dojít k celé řadě reakcí. Odpovědí rostliny může být zastavení procesu prodlužování hypokotylu, depolarizace membrán, stimulace expanze kotyledonů, popřípadě může dojít k biosyntéze antokyanů a také ovlivnění cirkadiálních rytmů. Kryptochromy se vyskytují v jádře a nalezneme je nejen u rostlin, ale také u bakterií, hub a živočichů (Smith et al., 2010; Taiz et al., 2015).

Co se týká struktury kryptochromu, tvoří jej dvě domény (Obr. 5). První N-terminální fotolyázová doména (PHR) a druhá C-terminální doména (CCE). Doména PHR na sebe váže chromofory flavin adenin dinukleotid (FAD) a pterin (5, 10 – methyltetrahydrofolát). Doména

CCE zprostředkovává signalizaci, která je vyvolána, pokud absorbuje modré světlo, čímž dochází k její konformační změně. Kryptochromy jsou zároveň spojovány s DNA fotolyázami, a to z toho důvodu, že navzájem vykazují podobnost ve své struktuře. DNA fotolyázy jsou enzymy schopné nápravy poškození DNA vyvolané UV zářením. Kryptochrom i fotolyáza jsou tvořeny oběma chromofory, ale doména CCE u fotolyázy chybí. Pterin vyvolává aktivaci fotolyázy. Děje se tak na základě absorpce modrého světla, kdy je získaná excitační energie přenášena do FAD. Mohlo by se zdát, že kryptochromy vykazují fotolyázovou aktivitu, ale není tomu tak (Jones et al., 2013; Christie et al., 2015; Taiz et al., 2015; Ponnu and Hoecker, 2022).



**Obrázek 5:** Struktura kryptochromu (CRY). Vytvořeno v Microsoft Office Word. Inspirováno Yang et al., 2017.

Aktivita kryptochromů úzce souvisí s aktivitami dalších fotoreceptorů, jako jsou fototropiny a fytochromy. Spolu jsou pak tyto receptory zodpovědné za konkrétní odpovědi rostlin na vystavení modrému světlu (regulace růstu, otevírání průduchů, popřípadě i kvetení) (Taiz et al., 2015).

Kryptochromy byly poprvé objeveny u rostliny *Arabidopsis thaliana*, která disponovala třemi geny pro výskyt kryptochromů, konkrétně *CRY1*, *CRY2* a *CRY3* (Liu et al., 2011; Jones et al., 2013). Prvním identifikovaným genem byl *CRY1* dříve označený jako *HY4*, který kóduje kryptochrom 1 (Taiz et al., 2015). Proteiny *CRY1* a *CRY2* se nachází v jádře a mají zásadní funkce v rámci procesů de-etiolace nebo indukce kvetení. Zásadní rozdíl mezi proteinem *CRY1* a *CRY2* je v citlivosti k modrému světlu. Protein *CRY1* je mnohem stabilnější než *CRY2*, který podléhá na modrém světle degradaci a je tak fotolabilní. Další kryptochrom *CRY3* je zařazen do podskupiny CRY DASH fotolyáz/kryptochromů, která se vyznačuje fotolyázovou aktivitou. *CRY3* se vykytuje v chloroplastech a mitochondriích (Liu et al., 2011; Yang et al., 2017; Ponnu and Hoecker, 2022).

U rostliny *Solanum lycopersicum* L. byly identifikovány 4 typy kryptochromů. Jedná se o geny *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY3*. Funkcí *CRY1* je zvyšovat produkci antokyanů a karotenoidů. Zároveň má nepostradatelný vliv na fotomorfogenezi. Kromě *CRY1a* se všechny tyto kryptochromy účastní regulace cirkadiálních transkripčních rytmů (Fantini et al., 2019).

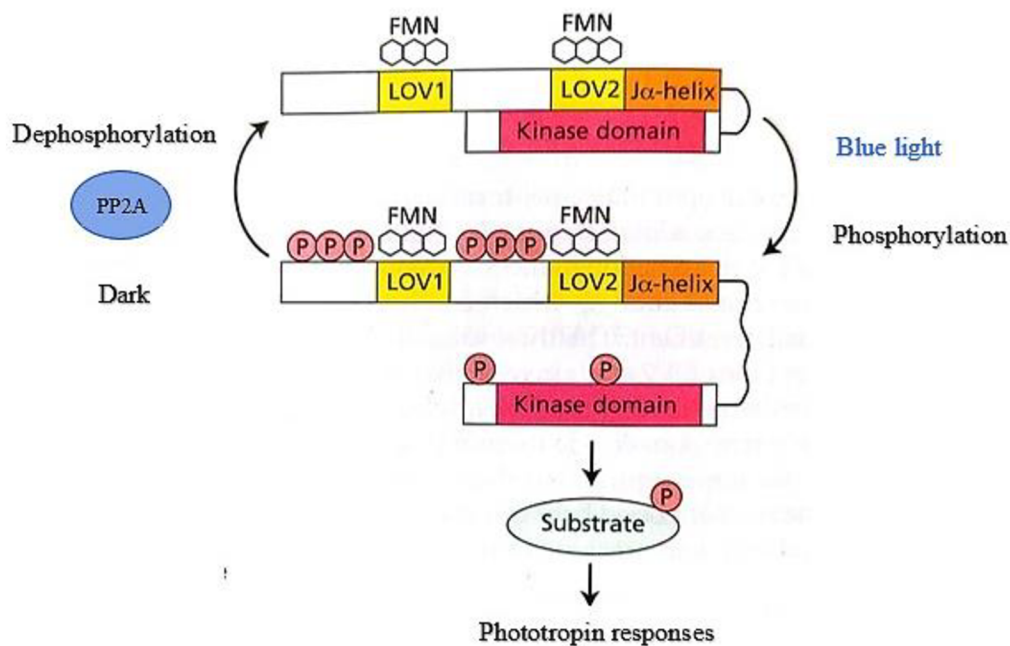


### 2.3.1.2 Fototropiny

Fototropiny jsou rodinou fotoreceptorových proteinů, které absorbují BL a UV-A. Jsou lokalizovány v cytoplasmě, kde jsou připojeny k cytoplasmatické membráně. Název těchto receptorů vychází z toho, že byly objeveny při výzkumu fototropismu, což je schopnost rostlin orientovat svůj růst směrem ke světelnému zdroji, nebo naopak od něj (v případě kořenů) (Christie et al., 2015; Taiz et al., 2015). Funkce fototropinů jsou mnohostranné a komplexní. Tyto proteiny detekují modré světlo prostřednictvím svých světlo-absorbujících domén a přenášejí signál do různých cílových procesů uvnitř rostlinné buňky. Mají klíčový vliv na procesy, jako je otevírání a zavírání průduchů nebo pohyby chloroplastů (Taiz et al., 2015).

První dva známé fototropiny PHOT1 a PHOT2 byly objeveny u *Arabidopsis thaliana*. PHOT1 zodpovídá za růst děloh a hypokotyly a oba druhy fototropinů (PHOT1 a PHOT2) pak mají vliv na fototropismus rostlin, transport chloroplastů nebo otevírání průduchů (Sullivan et al., 2008; Jones et al., 2013). Jejich funkce jsou tedy velmi obdobné, i když se překrývají, vykazují různou fotosenzitivitu. Na vyšší intenzitu světla jsou schopné reagovat oba fototropiny, ale pouze PHOT1 registruje nízkou intenzitu modrého světla (Aihara et al., 2008; Jones et al., 2013).

Struktura fototropinů je charakteristická svým složením z N-terminální a C-terminální domény (Obr. 6). Na N-terminálním konci se nachází dvě fotosenzorické domény LOV (Light – Oxygen – Voltage; LOV1 a LOV2), které jsou zodpovědné za absorpci modrého světla. Tyto domény obsahují flavin mononukleotid (FMN) jako chromofor, který absorbuje světlo a reaguje s cysteinovými zbytky proteinu (Aihara et al., 2008; Sullivan et al., 2008; Christie et al., 2015; Taiz et al., 2015). Vazba FMN a cysteinových zbytků je nekovalentní, ale po ozáření BL dojde k aktivaci fotoreceptoru na základě transformace vazby mezi cysteinovým zbytkem fototropinu a FMN na kovalentní. Tento krok způsobí fosforylaci fototropinu jako první krok signalizační dráhy. Následně dojde k redistribuci PIN proteinů, které řídí polární transport auxinů, což je nezbytné pro orientovaný růst rostlin. Tento proces také reguluje turgor průduchových buněk díky změně toku iontů v plazmatické membráně (Buchanan et al., 2015; Taiz et al., 2015). Doména LOV2 se významně podílí na regulaci fototropismu a kinázové aktivity fotoreceptorů, zatímco LOV1 nejspíš napomáhá fotodimerizaci. Druhou část molekuly tvoří C-terminální serin/threonin kinázová doména, která je aktivována po absorpci světla LOV doménami (Christie et al., 2015).



**Obrázek 6:** Struktura fototropinu. Modrým světlem vyvolaná fosforylace fototropinu. Převzato a upraveno z Taiz et al., 2015.

### 2.3.1.3 Rodina receptorů ZEITLUPE

Modré záření je přijímáno nejen kryptochromy a fototropiny, ale také fotoreceptory rodiny ZEITLUPE. Ty jsou řazeny ke skupině rostlinných proteinů, které hrají klíčovou roli v regulaci cirkadiálních rytmů a kvetení u rostlin (Christie et al., 2015). Jsou známé také pod pojmem F-box proteiny, protože obsahují specifickou F-box doménu, která je důležitá pro jejich funkci v rámci ubiquitin-proteasomového systému (Buchanan et al., 2015). Mezi receptory ZEITLUPE patří proteiny ZTL (ZeiTLuPe), FKF1 (Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1) a LKP2 (Lov Kelch Protein 2).

Všichni členové této skupiny fotoreceptorů sdílí podobnou strukturu, která zahrnuje několik důležitých domén. Receptory ZEITLUPE tvoří N-terminální LOV doména a C-terminální Kelch doména. LOV doména je propojena s F-boxem a funguje jako senzor modrého světla, a proto je důležitá pro fotorecepční funkce těchto proteinů. Hlavní úlohou ZTL a LKP2 proteinů je modulace periody a fáze cirkadiálního cyklu v závislosti na světelných podmínkách, zatímco na regulaci kvetení se podílí protein FKF1 (Ito et al., 2012; Suetsugu and Wada, 2013).

### 2.3.2 Fotoreceptory červeného světla

Stejně jako modré světlo je pro růst a vývoj rostliny nepostradatelné i světlo červeného vlnového spektra. Červené světlo má vlnovou délku od 620 do 700 nm, dokáže ovlivnit reverzibilitu fytochromu a také podporuje klíčení semen, rozvoj kořenů a může stimulovat kvetení. Představuje tak nejvýznamnější součást světelného spektra. Mimo to má červené světlo pozitivní vliv i na růst stonků, popřípadě syntézu chlorofylu.

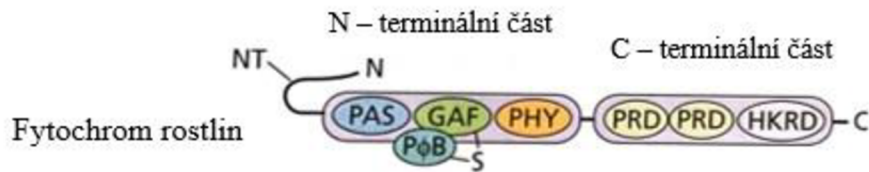
Vedle červeného světelného spektra se vyskytuje i tzv. dlouhovlnné červené světlo, které se pohybuje v rozmezí vlnových délek 710 až 800 nm. Tato složka světelného spektra ovlivňuje především fotoperiodické reakce rostlin a může regulovat přechod od vegetativního ke generativnímu vývoji.

Souhrnně lze říci, že červené a dlouhovlnné červené světlo mají významný vliv na růst a vývoj rostlin prostřednictvím interakcí s fytochromovými fotoreceptory (Smith et al., 2010; Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).

Fytochromy jsou důležitou skupinou fotoreceptorů v rostlinách, které hrají klíčovou úlohu v regulaci různých aspektů rostlinného vývoje a adaptace na světelné podmínky. Jedná se o pigment-proteinové komplexy, které absorbují především červené (660 nm) a dlouhovlnné červené (730 nm) světlo, což jim umožňuje fungovat jako přepínače, které signalizují rostlinám změny ve světelném prostředí. Stejně tak jsou však schopné přijímat i světlo modrého spektra. Fytochromy jsou zodpovědné za regulaci mnoha fyziologických procesů včetně klíčení semen, vývoje sazenic, tvorby květů, dozrávání plodů, pohybu průduchů, ale také zprostředkovávají odolnost rostlin k biotickým i abiotickým stresům (Smith et al., 2010; Jones et al., 2013; Buchanan et al., 2015; Taiz et al., 2015; Qui et al., 2023). Zároveň se fytochromy podílejí na adaptaci rostliny na stín, což umožňuje rostlinám měnit svůj růst a vývoj, aby maximalizovaly absorpci světla. Vyskytují se v široké škále fotosyntetizujících organismů včetně vyšších rostlin, sinic, řas, a dokonce i některých bakterií (Taiz et al., 2015; Smith et al., 2010).

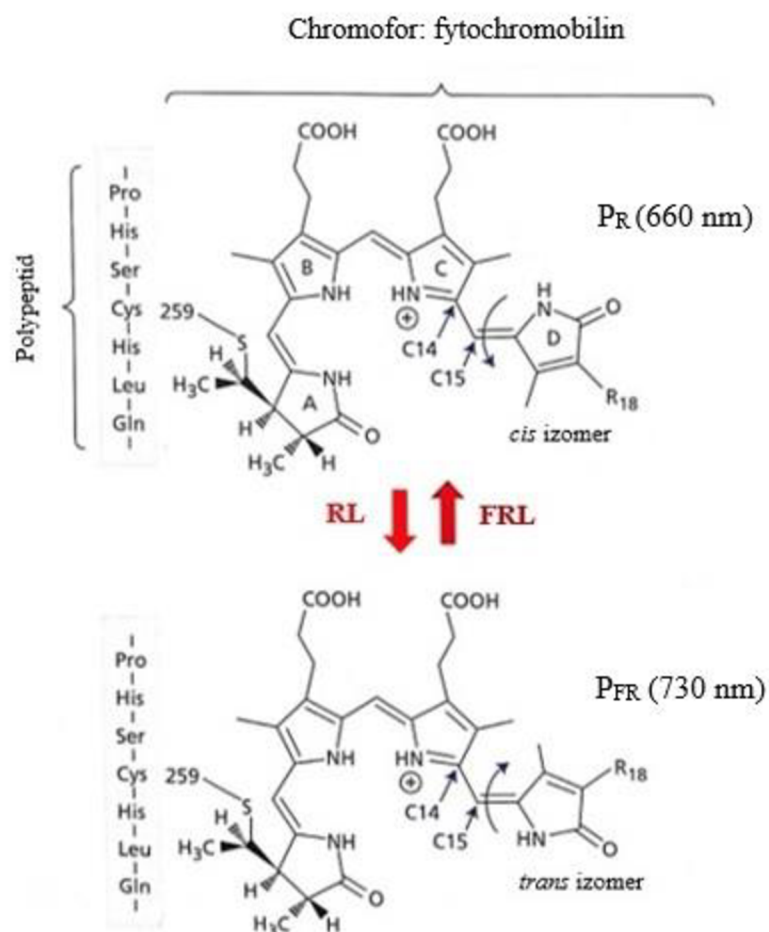
Fytochromy jsou chromoproteiny tvořené z proteinové a neproteinové světlo-absorbující části zvané chromofor. Jsou tedy složeny z apoproteinu a kovalentně vázaného chromoforu, kterým je lineární tetrapyrrolová molekula zvaná fytochromobilin (P<sub>FR</sub>) (Obr. 7). Chromofor absorbuje světlo a podléhá fotochemickým změnám, které vedou ke změně konformace proteinu, což způsobí růstovou reakci rostliny. Proteinová část fytochromu se skládá z N-terminální a C-terminální části. N-terminální část obsahuje doménu PAS (Period/Arnt/Single-minded), doménu GAF (cGMP fosfodiesteráza/Adenylyl cykláza/FhlA) a doménu PHY. Doména GAF je důležitá pro vazbu chromoforu a doména PHY je nezbytná pro správnou funkci fytochromu včetně stabilizaci jeho P<sub>FR</sub> formy. Druhou stranu apoproteinu tvoří

C-terminální doména, která se skládá z domény PRD (PAS Repeat Domain) a histidin kinázové domény (HKRD). Obě poloviny fytochromu jsou spojeny pantovou oblastí, která je zásadní při přeměně  $P_R$  formy na  $P_{FR}$  (Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015; Qui et al., 2023).



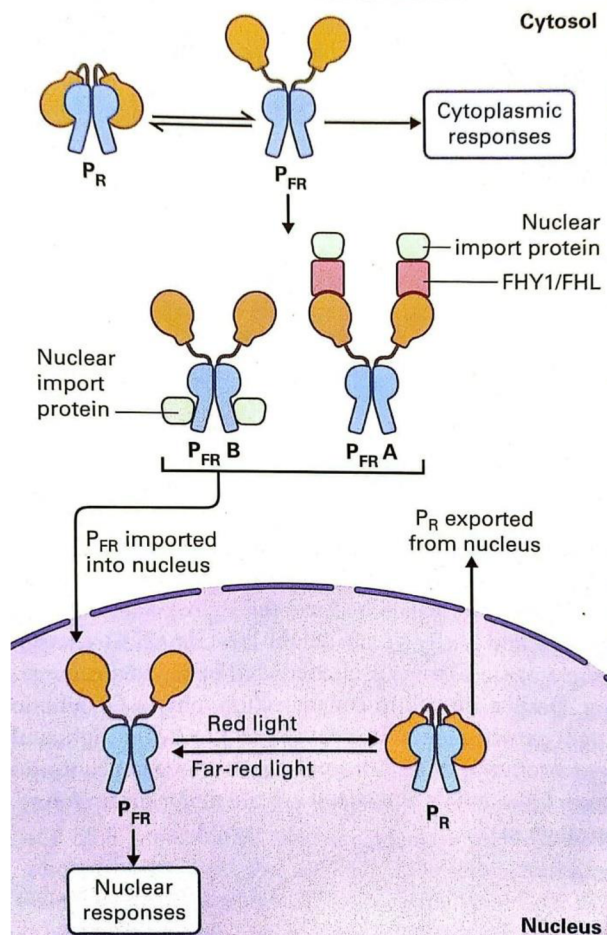
**Obrázek 7:** Struktura fytochromu rostlin. Převzato a upraveno z Taiz et al., 2015.

Fotoreceptor fytochrom existuje ve dvou základních formách, které se liší svým absorpčním maximem. Neaktivní forma  $P_R$  se nachází v cytosolu a absorbuje červené světlo ( $\lambda_{max}=660$  nm), zatímco aktivní forma  $P_{FR}$  absorbuje dlouhovlnné červené světlo ( $\lambda_{max}=730$  nm) a je lokalizována především v jádře. Tyto formy se vzájemně přeměňují pomocí světelných signálů a tato přeměna je zásadní pro fytochromovou signalizaci. Pokud forma  $P_R$  absorbuje foton červeného světla (660 nm), dochází k přeměně na formu  $P_{FR}$ . Tento přechod je reverzibilní, což znamená, že absorpce dlouhovlnného záření (730 nm) formou  $P_{FR}$  vede k její transformaci na  $P_R$ . Přeměna z  $P_R$  (konfigurace *cis*) na  $P_{FR}$  (konfigurace *trans*) formu je spojena s konformační změnou proteinové části fytochromu (Obr. 8), která ovlivňuje jeho interakci s dalšími molekulami a přenos signálu (Taiz et al., 2015; Tripathi et al., 2019; Qui et al., 2023).



**Obrázek 8:** Přeměna neaktivní formy fytochromu  $P_R$  na aktivní formu  $P_{FR}$ . Struktura  $P_R$  a  $P_{FR}$  formy chromoforu (fytochromobilin). Převzato a upraveno z Taiz et al., 2015.

Světlo prostřednictvím fytochromů vyvolává fotomorfogenezi na základě změn v genové expresi. Pokud má fytochrom ovlivnit expresi genů, musí se uskutečnit mnoho reakcí. Nejprve dochází k přeměně neaktivní formy fytochromu na aktivní, která se následně přesouvá do jádra (Obr. 9). Tento pohyb z cytosolu do jádra je vyvolán vystavením světlu a probíhá pomocí aktivního transportu přes jadernou membránu. Mechanismus přesunu se u PHYA a PHYB liší. PHYB obsahuje jadernou lokalizační sekvenci (NLS). Předpokládá se, že NLS se odkrývá na základě konformační změny při transformaci  $P_{RB}$  na  $P_{FRB}$  a tím je umožněna vazba jaderných importních proteinů a přenos PHYB do jádra (probíhá několik hodin). Na druhé straně stojí PHYA, kterému NLS chybí a jeho transport je závislý na proteinech FHY1 a FHL. FHY1 a FHL (tvoří s  $P_{FRA}$  komplexy) disponují vlastními NLS díky nimž  $P_{FRA}$  importují do jádra (přenos je velmi rychlý) (Obr. 9) (Buchanan et al., 2015).



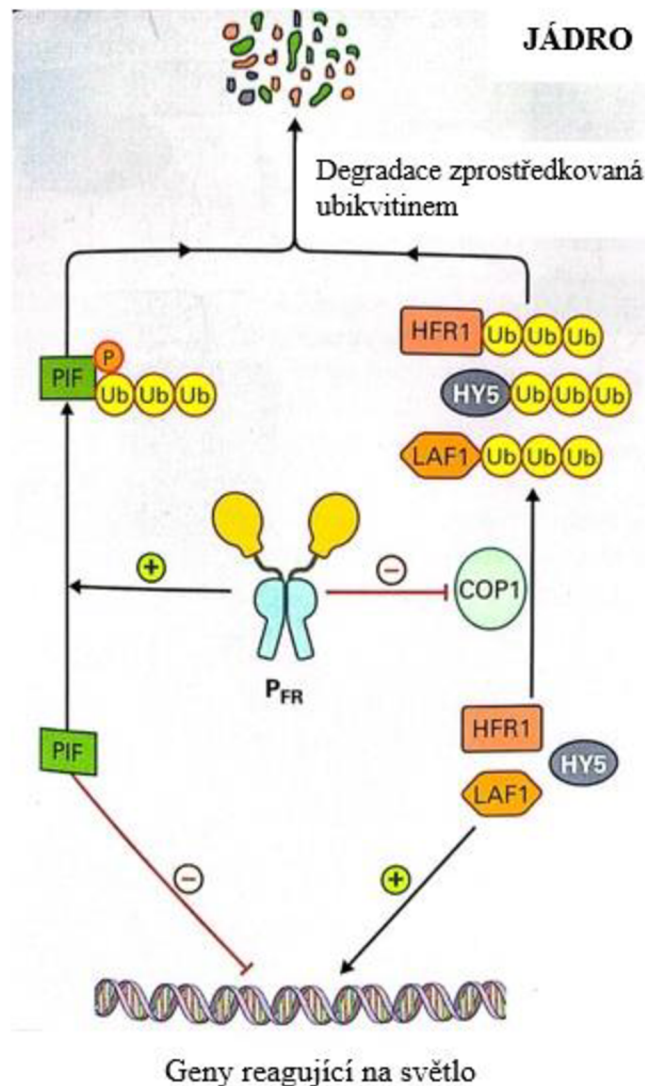
**Obrázek 9:** Transport fytochromů do jádra je vyvolán přeměnou jejich formy  $P_R$  na  $P_{FR}$ . Import PHYB do jádra je zprostředkován jadernými importními proteiny, které se vážou na NLS. Naopak PHYA nemá NLS a potřebuje pro svůj import do jádra proteiny FHY1 a FHL. Fytochrom se přesouvá zpět z jádra do cytoplasmy přeměnou formy  $P_{FR}$  na  $P_R$ . Převzato z Buchanan et al., 2015.

V jádře pak fytochromy ve formě  $P_{FR}$  ovlivňují transkripci příslušných genů prostřednictvím interakcí s celou řadou transkripčních faktorů, čímž je uskutečněna světelná reakce (Obr. 10). Fytochromy ve formě  $P_{FR}$  interagují s velmi podstatnými tzv. fytochromovými interakčními faktory (PIF), které podporují transkripci skotomorfogenních genů a působí jako supresory fotomorfogeneze. PIF existuje celá řada a je známo že interakce  $P_{FR}$  a PIF3 vyvolá fosforylaci PIF3 a jeho následnou degradaci v ubikvitin proteazomovém systému. Výsledkem je inhibice funkce PIF a obnovení transkripce genů za účelem fotomorfogeneze (Smith et al., 2010).

Kromě PIF existují i další molekuly, které interagují s fytochromy. Například FHY1 (Far-red elongated Hypocotyl 1) a FHL (FHY1-like) nebo COP1 (Obr. 10). COP1 významně



potlačuje fotomorfogenezi, protože způsobuje degradaci transkripčních faktorů HY5, HFR1, LAF1 stimulujících expresi fotoresponzivních genů. Ve tmě je COP1 lokalizován v jádře a vlivem světla se přesouvá do cytosolu. Vazba fytochromu ke COP1 inhibuje jeho funkci tím, že jej přesune z jádra, čímž v jádře následně dochází k hromadění HY5, HFR1 a LAF1 a probíhá indukce genů reagujících na světlo (Smith et al., 2010; Buchanan et al., 2015).



**Obrázek 10:** Regulace genové exprese pomocí fytochromů. V jádře je stabilita transkripčních faktorů regulována fytochromy. Forma fytochromu  $P_{FR}$  vyvolává změnu PIF (inhibují fotomorfogenezi) pomocí fosforylace a degradace v proteazomu vlivem ubikvitinace.  $P_{FR}$  také eliminuje aktivitu COP1, který se podílí na degradaci transkripčních faktorů HFR1, HY5 a LAF1. Upraveno z Buchanan et al., 2015.

Bylo zjištěno, že u *Arabidopsis thaliana* jsou fytochromy kódovány rodinou genů, která má celkem 5 členů. Jedná se o strukturně podobné geny označované *PHYA* – *PHYE* (Smith et

al., 2010; Taiz et al., 2015). U *Solanum lycopersicum* byl identifikován stejný počet genů *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF*, které rovněž kódují fytochromy (Gupta et al., 2014a). Dle fotostability se fytochromy dále rozdělují na typ I (fotolabilní) a typ II (fotostabilní) (Buchanan et al., 2015). *PHYA* je stabilní v temnotě a degraduje se po expozici světlem, je tedy na světle labilní. Do druhé skupiny fytochromů se pak řadí *PHYB* – *PHYE*, které jsou na světle stabilní. *PHYA* se nachází v etiolizovaných pletivech a je zodpovědný za detekci dlouhovlnného červeného záření. Je pak zvláště důležitý pro jeho schopnost detekovat a reagovat na světlo v nízkých intenzitách (VLFR), což je klíčové pro rostliny v raných fázích jejich životního cyklu, jako je klíčení semen. *PHYB* je lokalizován v zelených pletivech a je citlivý na červené světlo (Lin, 2000; Smith et al., 2010; Tripathi et al., 2019). *PHYA* a *PHYB* jsou si často navzájem antagonisty, což znamená, že působí proti sobě při regulaci různých fyziologických procesů. Například, zatímco *PHYA* podporuje kvetení v reakci na dlouhovlnné červené záření, *PHYB* působí proti této odpovědi a inhibuje kvetení v přítomnosti červeného světla (Lin, 2000). Fytochromy C, D a E společně s *PHYB* zprostředkovávají odezvy o nízké ozářenosti (LFR). Jsou méně prozkoumané, ale i tak se předpokládá, že hrají důležitou roli v regulaci procesů kvetení a prodlužování internodií (Taiz et al., 2015; Tripathi et al., 2019).



## 2.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová je přirozeně se vyskytující rostlinný hormon, který hraje zásadní roli v mnoha aspektech fyziologie rostlin. Je možné ji nalézt v rostlinných druzích cévnatých a necévnatých (např. mechorostech), ale kupříkladu i v některých fytopatogenních houbách (Taiz et al., 2015). Její objev a výzkum sahá do 60. letech 20. století, kdy byl tento hormon poprvé popsán. Původně byla ABA získána z opadlých plodů bavlníku (abscisin) a poté z opadaných listů platanu (dormin).

Až později bylo potvrzeno, že se v obou případech jedná o totožnou látku, která byla nazvána kyselinou abscisovou. Tento název vychází z domněnky, že vyvolává abscisi, ale později bylo zjištěno, že tento proces navozuje a reguluje spíše ethylen. I přesto, že se vědci domnívali, že je právě tato látka odpovědná za opadávání listů a plodů rostlin, později bylo objasněno, že se kyselina abscisová účastní spíše procesů, které předchází samotnému spadu listů a plodů (Buchanan et al., 2015; Li et al., 2017).

V současné době je již objasněno, že má ABA vliv i na klíčení semen a růst a vývoj rostlin. Na tuto skutečnost poukazují ABA-deficientní nebo ABA-necitlivé mutantní rostliny, u nichž lze pozorovat předčasné klíčení označované jako viviparie, kdy semena klíčí již na mateřské rostlině (Taiz et al., 2015). Konkrétně kyselina abscisová pomáhá regulovat pohyb průduchů, syntetizovat zásobní bílkoviny a tuky, umožňuje rostlině vyrovnat se s potencionálním suchem, chladem a dalšími stresovými okolnostmi, které mohou rostlinu potkat, popřípadě i navozovat dormanci (Li et al., 2017).

### 2.4.1 Chemická struktura kyseliny abscisové

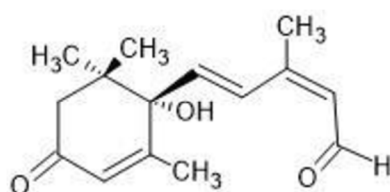
Kyselina abscisová se chemicky řadí do skupiny seskviterpenů a je odvozena od karotenoidů. Její chemickou strukturu tvoří řada patnácti uhlíků, které jsou uspořádané do cyklohexanového kruhu a uhlovodíkového postranního řetězce. Sumární vzorec ABA je  $C_{15}H_{20}O_4$ . Biologická aktivita ABA je určena a ovlivňována vlastnostmi její chemické struktury. Změny ve struktuře ABA mohou způsobit až ztrátu její aktivity (Ng et al., 2014).

Cyklohexanový kruh je tvořen monomethylovou, dimethylovou, ketonovou a hydroxylovou skupinou. Kompletní chemická struktura vzniká připojením uhlovodíkového postranního řetězce na cyklickou část přes karboxylovou skupinu.

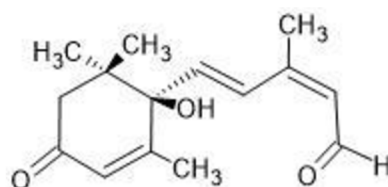
ABA se vyskytuje ve formě několika izomerů. Lze ji tedy označit jako látku opticky aktivní, která stáčí rovinu polarizovaného světla buď doprava nebo doleva. Tato optická aktivita

je dána přítomností asymetrického (chirálního) uhlíku na pozici 1' cyklického řetězce, který určuje, zda se jedná o S (+) nebo R (-) enantiomer. Aktivní formou ABA je S enantiomer (Obr. 11), který se vyskytuje přirozeně. Jestliže dojde k obrácení cyklohexanového kruhu kolem chirálního uhlíku, vzniká R enantiomer (inaktivní forma) (Obr. 12). Kyselinu abscisovou lze získat také komerčně. Syntetická ABA je tvořena S i R formou v přibližně stejném zastoupení.

Postranní řetězec ABA obsahuje dvě dvojné vazby, a to na pozici 2 a 4. Karboxylová skupina je navázána na pozici 2 postranního řetězce a její orientace určuje *cis* a *trans* izomery ABA. Pokud je ABA aktivní, postranní řetězec má konformaci *2-cis-4-trans*. Ozáření je schopné způsobit izomerizaci této konformace na neaktivní formu *2-trans-4-trans*-ABA (Ng et al., 2014; Buchanan et al., 2015; Li et al., 2017).



**Obrázek 11:** Chemická struktura (*S*)-*cis*-ABA. Vytvořeno pomocí aplikace ChemSketch



**Obrázek 12:** Chemická struktura (*R*)-*cis*-ABA. Vytvořeno pomocí aplikace ChemSketch

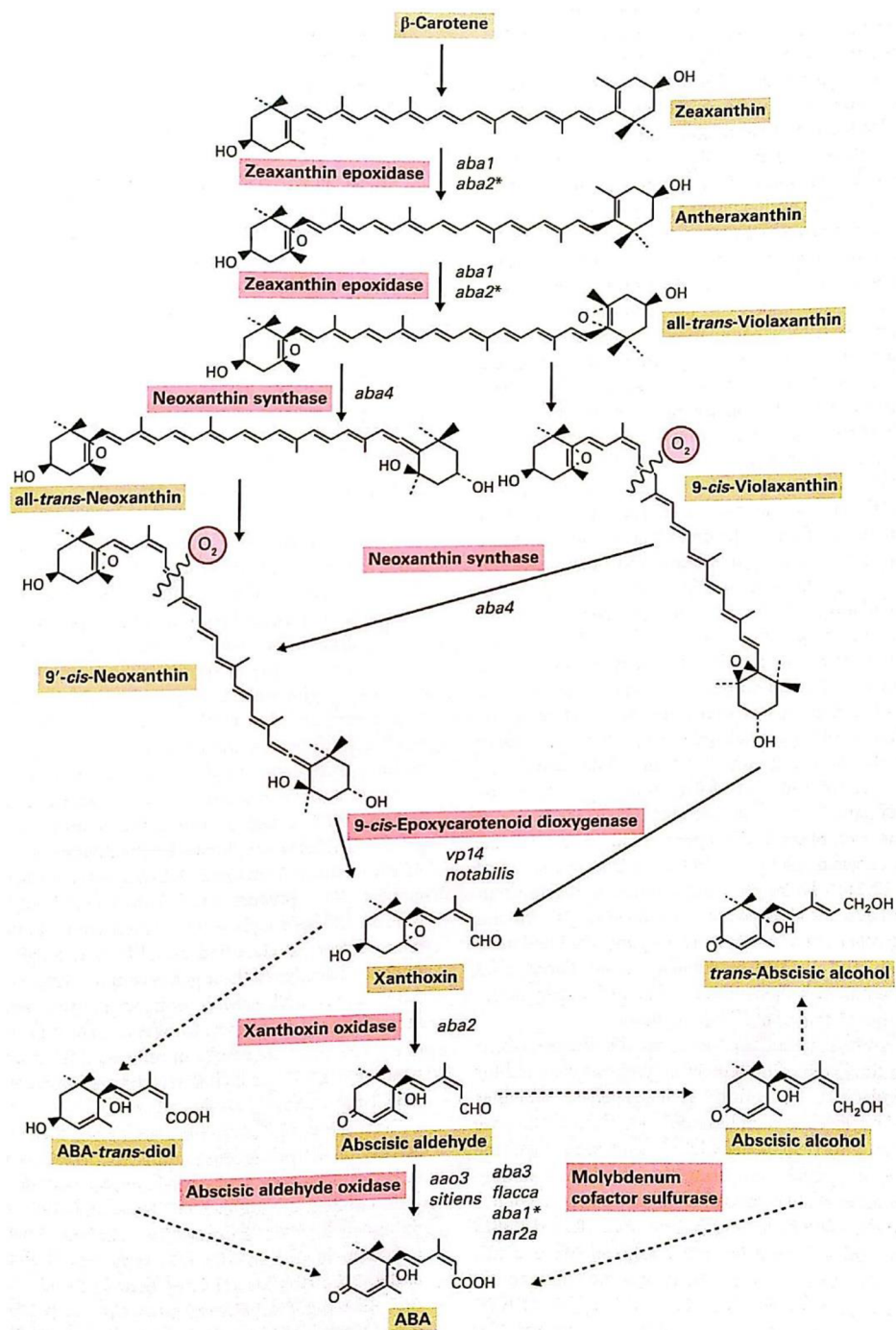
#### 2.4.2 Biosyntéza kyseliny abscisové

ABA je produkována všemi buňkami, ve kterých jsou přítomny chloroplasty, popřípadě amyloplasty (Taiz et al., 2015). Biosyntetická dráha ABA (Obr. 13) je v rámci rostlinných buněk úzce propojena s produkcí dalších fytohormonů, konkrétně giberelinů, cytokininů a brasinosteroidů. V případě kyseliny ABA a GA se totiž do značné míry jedná o chemicky totožné látky, které se začínají odlišovat v řetězci syntézy až na pozici prekurzoru C<sub>20</sub>.

Biosyntéza ABA probíhá v rámci rostliny v několika krocích a celý proces její produkce je zahájen tím, že na rostlinu působí stresový signál. Jednotlivé kroky její biosyntézy jsou řízeny enzymově (Ng et al., 2014).

Ke spuštění celé biosyntézy ABA dochází v plastidech rostlinných buněk. Zde dochází k produkci isopentenylidifosfátu (IPP), který představuje základ pro produkci kyseliny abscisové. IPP je syntetizován z glyceraldehyd-3-fosfátu a pyruvátu. Vytvářené základní kameny v podobě IPP (uhlíků C<sub>5</sub>) jsou posléze propojovány za současného vzniku molekul C<sub>10</sub> (tzv. geranyl), C<sub>15</sub> (tzv. fernezyl) a C<sub>20</sub> (tzv. geranylgeranyl difosfát). Geranylgeranyl difosfát (GGPP) vzniká připojením tří molekul IPP k dimethylallyldifosfátu.

Poté, co jsou tyto molekuly vytvořeny, dojde vzájemnou kondenzací dvou molekul GGPP (reakce je katalyzována fytoensyntázou) ke vzniku fytoenu, který představuje prekurzor rostlinných karotenoidů. Z fytoenu posléze vzniká lykopen, ze kterého je vytvořen β-karoten. β-karoten prochází následně hydroxylací, výsledkem, které je převeden na zeaxanthin, který sestává ze 40 uhlíků. Činností enzymu zeaxanthin epoxidázy (ZEP) je zeaxanthin přeměněn přes meziprodukt antheraxanthin na *trans*-violaxanthin (C<sub>40</sub>). Následně je *trans*-violaxanthin transformován na 9-*cis*-violaxanthin, popřípadě *trans*-neoxanthin, které jsou prostřednictvím procesu izomerizace přeměněny na 9'-*cis*-neoxantin. Tato látka je činností specifického enzymu 9-*cis*-epoxykarotenoid dioxygenázy (NCED) štěpena na xanthoxin (C<sub>15</sub>). Toto xantofylové štěpení je nejdůležitější krok tvorby ABA. Xanthoxin, který byl syntetizován v plastidech, se následně přesouvá do cytosolu buňky, kde je působením enzymu SDR transformován v ABA-aldehyd. Biologicky funkční ABA posléze vzniká přeměnou aldehydu prostřednictvím abscisic aldehyd oxidázy (AAO) (Ng et al., 2014; Li et al., 2017).



Obrázek 13: Biosyntetická dráha kyseliny abscisové. Upraveno z Buchanan et al., 2015.

### 2.4.3 Katabolismus kyseliny abscisové

Katabolické neboli rozkladné procesy (Obr. 14) představují významný nástroj, prostřednictvím kterého může být hladina ABA regulována a udržována na optimální hladině (Li et al., 2017). Celý proces biosyntézy ABA je pozastaven, popřípadě utlumen v okamžiku, kdy na rostlinu přestanou působit zcela nebo částečně stresové faktory, díky kterým byla samotná biosyntéza

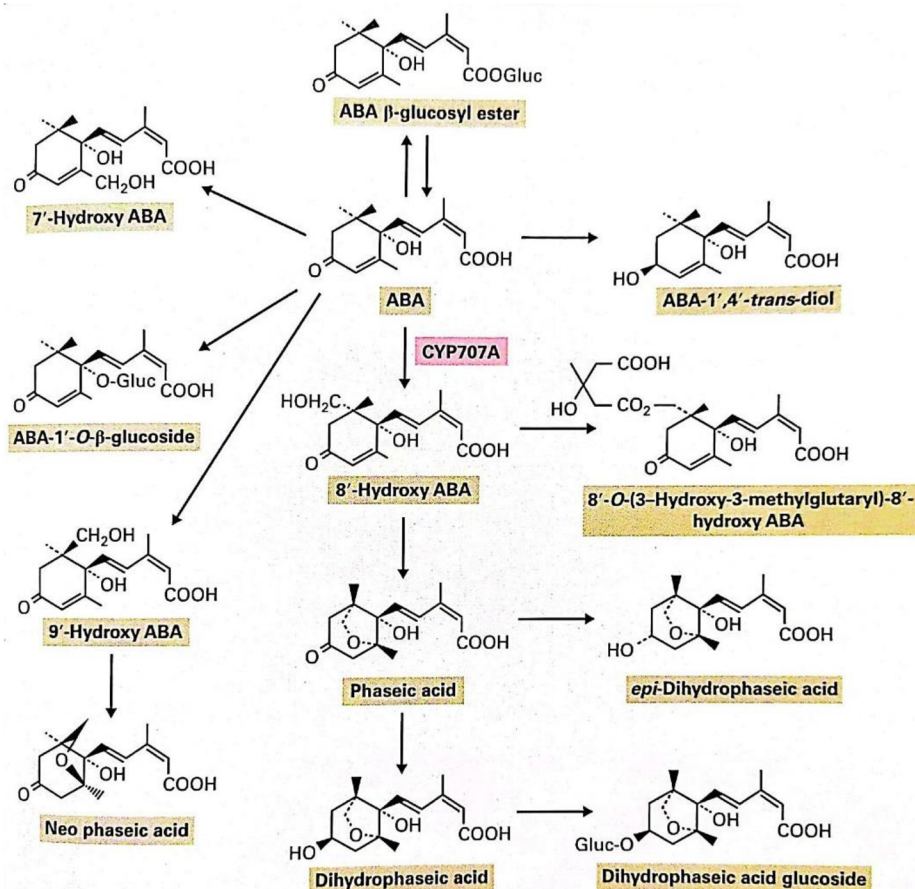
vůbec spuštěna. Konkrétně dojde k pozastavení procesů, za současné přeměny již vyprodukované kyseliny abscisové na neaktivní metabolity (Ng et al., 2014).

Rozkladné reakce, které se týkají kyseliny abscisové, probíhají zejména prostřednictvím procesu zvaného hydroxylace, která se týká konkrétně jedné ze tří methylových skupin navázaných v rámci cyklické části její molekuly (C-7', C-8', C-9'). Nejvýznamnější katabolický proces představuje hydroxylace methylové skupiny na pozici 8', která je zde uskutečňována činností ABA 8'-hydroxylázy. ABA 8'-hydroxyláza je monooxygenáza typu CYP450, která je kódována genetickou skupinou CYP707A (Li et al., 2017).

V důsledku této aktivity dochází ke vzniku metabolického produktu nestabilní povahy, 8'-hydroxy ABA, který je následně přeměněn na kyselinu faseovou (PA). I samotná kyselina faseová je následně transformována v biologicky neaktivní kyselinu dihydrofaseovou (DPA), která se na 4' pozici spojuje s glukózou, díky čemuž dochází k tvorbě glukosidu kyseliny dihydrofaseové. Metabolity PA a DPA se řadí mezi nejpočetnější a díky jejich vzniku klesá biologická aktivita ABA (Ng et al., 2014; Li et al., 2017).

Na kruhové struktuře ABA může dojít také k hydroxylaci dalších dvou methylových skupin (C-7' a C-9'). 7'-hydroxylační dráha vede k přeměně na 7'-hydroxy ABA. Další hydroxylační cestou dochází také ke konverzi na 9'-hydroxy ABA, která je cyklicky přeměněna na kyselinu neofaseovou (Neo PA) (Buchanan et al., 2015).

Ke snižování aktivity kyseliny abscisové může docházet i ve chvíli, kdy ABA splyne s jinou molekulou. Touto molekulou pak nejčastěji bývá již zmíněná glukóza, kdy dojde ke vzniku neaktivního ABA  $\beta$ -glukosyl esteru (ABA-GE). Tento proces je však vratný a není stabilní, může tak dojít k následnému opětovnému rozvolnění vzniklé molekuly (Li et al., 2017). Vzniklý ABA  $\beta$ -glukosylester je koncentrován ve vakuolách a apoplastu společně s konjugátem ABA-1'-O-glukosidem, který je rovněž inaktivní. V okamžiku, kdy na rostlinu opětovně působí určitý stresový faktor, je ester transportován z vakuol či apoplastu do endoplazmatického retikula, kde je za účasti  $\beta$ -glukosidasy hydrolyzován a opětovně vzniká ABA, která může reagovat na stresové faktory (Ng et al., 2014).



**Obrázek 14:** Katabolická dráha kyseliny abscisové v rostlinách. Upraveno z Buchanan et al., 2015.

#### 2.4.4 Signální dráha kyseliny abscisové

Kyselina abscisová je mnohostranně účelnou látkou, která se přímo účastní mnoha různých procesů, ke kterým v rámci rostlinných buněk dochází. Může se na jedné straně jednat o krátkodobé fyziologické procesy (pohyb průduchů), ale na druhé straně i dlouhodobé procesy, které se týkají růstu a vývoje rostliny, kupříkladu klíčení semen. Buňka je schopná na přítomnost ABA reagovat prostřednictvím specifických receptorů, které jsou schopné na sebe připoutat molekulu hormonu, a umožnit tak přenos signálu. Receptory se přitom v rámci buňky mohou vyskytovat na odlišných místech (Taiz et al., 2015).

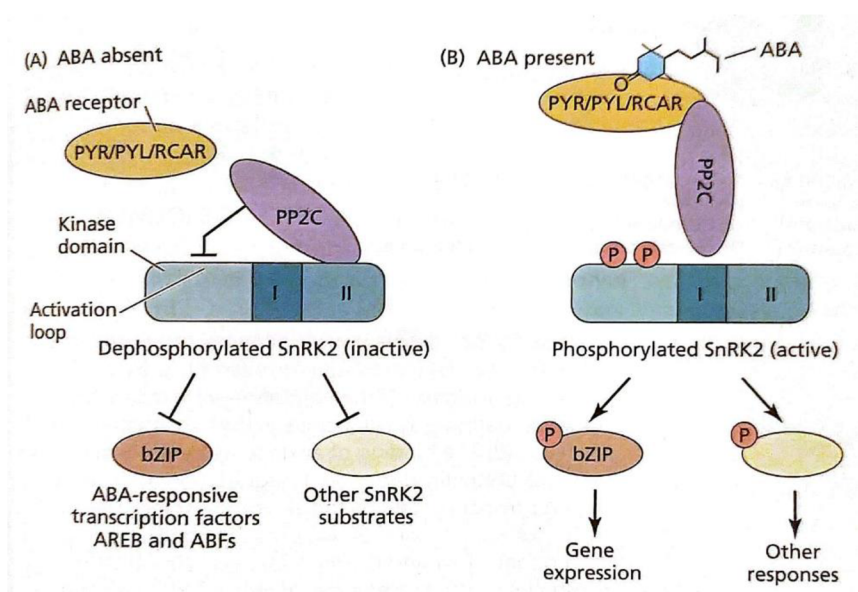
Rozlišujeme celkem 3 skupiny ABA receptorů. První z nich je podjednotka  $Mg^{2+}$  chelatázy (CHLH) na membráně buněčných plastidů. Dále se jedná o receptory GPCR (G-Protein Coupled Receptor), konkrétně GTG1 a GTG2 (GPCR-Type G protein) proteiny. Tyto receptory se nachází na plazmatické membráně buňky a jsou spřaženy s G proteiny (regulují pohyb průduchů). Poslední skupinou v rámci buněčné cytoplazmy nebo přímo v jádru buňky

jsou proteinové receptory PYR/PYL/RCAR (Cutler et al., 2010; Weiner et al., 2010; Jones et al., 2013; Taiz et al., 2015).

Receptorem, který se nejvýznamněji účastní signalizační dráhy kyseliny abscisové, je zmíněná skupina rozpustných proteinů PYR/PYL/RCAR (PYrabactin Resistance/PYR1 Like/Regulatory Components of ABA Receptors), která se řadí do rodiny receptorů START (Steroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid-Transfer). Nezávisle na sobě dvě výzkumné skupiny zjistily, že rodina receptorů START má v rámci *Arabidopsis thaliana* 14 členů. Zásadní zlom byl v objevení genu *PYR1* (*PYrabactin Resistant 1*) kódující rezistenci na pyrabactin. Po objevení genu *PYR* následovalo zjištění existence dalších 13 příbuzných členů (*PYL1 – PYL13*). Všechny příbuzné geny se označují zkratkou *PYL* (*PYR1 Like*). ABA receptor disponuje také regulační složkou označovanou zkratkou RCAR (Taiz et al., 2015; Li et al., 2017).

Receptor PYR/PYL/RCAR disponuje vodou odpuzující kapsou, na kterou se naváže ligand ABA, a tím je zahájena její signalizační dráha (Obr. 15) (Taiz et al., 2015). Tím, že dojde k navázání ABA na protein, dochází ke konformační změně receptoru, což vede k lepší komunikaci a spolupráci s proteinem zvaným fosfatáza 2C (PP2C), jehož úkolem je odstraňovat z proteinů fosfátové skupiny. PP2C působí jako negativní regulátor signalizační dráhy. Vzájemná interakce receptoru ABA a PP2C znemožňuje defosforylaci serin/threoninové protein kinázy (SnRK2). Fosforylovaná a aktivovaná SnRK2 je schopná fosforylace s (ABA-responsive element Binding Factors), aktivace transkripčních faktorů bZIP (basic leucine ZIPper) a dalších molekul, které se podílejí na vzniku ABA odpovědi. SnRK2 má v rámci signalizační dráhy pozitivně regulační funkci. Jiná situace nastává, pokud ABA není přítomna a na receptor se neváže. V takovém případě receptory PYR/PYL/RCAR neinteragují s PP2C, která defosforyluje SnRK2 a ABA odpověď nevzniká (Cutler et al., 2010; Weiner et al., 2010; Taiz et al., 2015).





**Obrázek 15:** Signální dráha kyseliny abscisové. Převzato z Taiz et al., 2015.



## 2.5 Interakce kyseliny abscisové a světla

Světlo a ABA jsou dva klíčové faktory, které hrají důležitou úlohu ve fyziologii rostlin. Světlo je základním prvkem, který řídí mnohé aspekty rostlinného vývoje a metabolismu, zatímco rostlinné hormony se podílí na regulaci růstu, vývoje a adaptace na stresové podmínky. Zajímavé je, že tyto dvě složky (světlo a hormony) neoperují izolovaně ale jejich signální dráhy jsou propojeny. Vzájemná kooperace těchto dvou faktorů probíhá na molekulární úrovni a její přesný průběh nebyl doposud zcela vysvětlen (Lau and Deng, 2010).

Proces klíčení semen je, jak již bylo zmiňováno v kapitole o klíčení, ovlivněn komplexním působením několika fytohormonů, mezi něž patří především ABA a GA. Tyto dva hormony působí v rostlinách často antagonisticky, protože ABA klíčení inhibuje a GA klíčení indukují (Oh et al., 2006). Dalším významným a nepostradatelným faktorem, který se zasazuje o regulaci klíčivosti semen, jsou fytochromy, které jsou schopné regulovat nejen endogenní hladiny ABA a GA, ale také jejich poměr, který má zásadní vliv na aktuální klíčící aktivity semene (Seo et al., 2006). Z toho vyplývá, že hladiny ABA a GA jsou silně ovlivněny světelnými podmínkami, především působením červeného (RL), dlouhovlnného červeného (FRL) a modrého světla (BL). Bylo pozorováno, že kombinace efektů RL s BL vede k poklesu hladiny ABA. Tento jev naznačuje, že interakce BL a RL či FRL ovlivňuje koncentraci endogenní ABA v rostlinných buňkách tím, že reguluje expresi genů zapojených do jejího metabolismu (Fellner and Sawhney, 2002).

Vliv světla na aktivitu enzymů zapojených do metabolismu ABA byl pozorován u rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Lactuca sativa*. Jednalo se o enzym NCED a 8'-hydroxylázu, která je kódována prostřednictvím genů *CYP707A*. Oby tyto enzymy jsou zapojeny do metabolické dráhy ABA. Konkrétně bylo zjištěno, že fytochromy (především PHYB) se aktivně účastní regulace jejich genové exprese. Pokud je sluneční záření červeného spektra zachyceno rostlinnými fotoreceptory PHYA a PHYB, dojde k jejich aktivaci, což vede ke snížení hladiny ABA. Snížené množství ABA způsobí aktivaci biosyntetické dráhy GA, čímž se aktivuje klíčení. Za sníženou hladinou ABA v tomto procesu stojí zvýšená produkce genů, které kódují enzym 8'-hydroxylázu a zároveň snížená exprese genů kódují enzym NCED. Zvýšení produkce enzymu 8'-hydroxylázu vede ke zvýšení hladiny neaktivní metabolické formy ABA již zmiňované kyseliny faseové (Sawada et al., 2008; Sano and Marion-Poll, 2021).

Při dalších výzkumech bylo zjištěno, že GA disponují podobnou funkcí jako vliv červeného světla na klíčení semen. Oba tyto aspekty mají vliv na klíčení semen, které podporují

za současného snižování hladiny ABA. Biosyntéza a následná metabolická dráha GA je řízena stejně jako v případě ABA právě fytochromy, avšak v antagonistickém směru oproti ABA (Seo et al., 2006; Sawada et al., 2008).

Světlo a ABA jsou dva faktory, které ovlivňují expresi genů kódující LHCB proteiny. LHCB (Light Harvesting Chlorophyll a/b Binding) proteiny jsou součástí světlosběrného komplexu II, který je základním stavebním prvkem fotosystému II (PSII) v rostlinách. Tyto proteiny hrají klíčovou roli v procesu fotosyntézy, neboť zprostředkovávají sběr světelné energie a její přenos k PSII. Světlo přímo ovlivňuje jejich expresi prostřednictvím fotoreceptorů a cirkadiálních rytmů, zatímco ABA hraje roli při modulaci této exprese, zejména v reakci na stresové podmínky. Experimenty s aplikací exogenní ABA ve zvýšených koncentracích odhalily rychlou inhibici genové exprese *LHCB*, zatímco použití ABA v koncentracích fyziologicky relevantních vedlo k opačnému efektu, a to ke zvýšení exprese těchto genů. Molekulární mechanismus, kterým ABA ovlivňuje expresi genů *LHCB*, je řízen přes transkripční faktor WRKY40, který funguje jako supresor exprese *LHCB* genů. ABA tedy působí jako negativní regulátor exprese LHCB proteinů (Liu et., 2013).

Při výzkumu *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že transkripční faktor HY5 (elongated HYpocotyl 5) je funkčně propojen s ABA a ovlivňuje její účinky během klíčení semen, raného růstu semenáčků a vývoje kořenů. Bylo prokázáno, že reguluje expresi různých genů zapojených do odpovědi na světlo jako je např. *ABI5*. HY5 vykazuje vysokou afinitu k promotoru genu *ABI5*, což naznačuje přímou úlohu v regulaci jeho transkripce a společně s genem *ABI5* kóduje transkripční faktor bZIP (basic leucin zipper). Pokud se k *ABI5* naváže HY5, pak aktivovaná forma *ABI5* (s navázaným HY5) spouští signální dráhu ABA. Pokud je v prostředí buňky přítomná ABA, pak je vazba HY5 na *ABI5* promotor zvýšena (Chen et al., 2008; Bhagat et al., 2021).

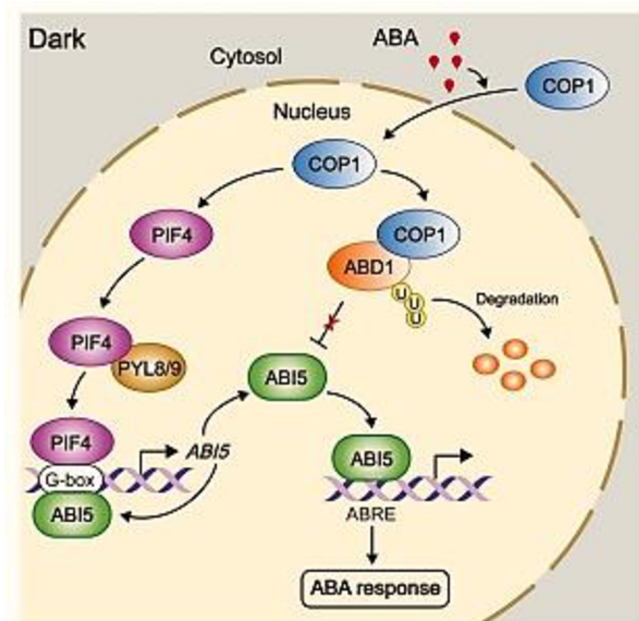
ZBF1/MYC2bHLH je transkripční faktor, který hraje klíčovou roli v propojení světelných signálů se signálními drahami ABA a kyseliny jasmonové. Tento faktor se vyskytuje u rostliny *Arabidopsis thaliana*, kde je podobný faktor LeMYC2 studovaným u *Solanum lycopersicum*. MYC2 má pozitivní vliv na vývoj laterálních kořenů a času kvetení. LeMYC2 ovlivňuje různé aspekty růstu a vývoje rostlin. Například bylo zjištěno, že LeMYC2 podporuje růst a vývoj rostlin rajčete, má vliv na vývoj kořenů (především jeho zvýšená exprese zapříčiňuje větší četnost laterálních kořenů) a reguluje odpověď rostlin na fytohormony ABA a kyselinu jasmonovou. Byl identifikován jako negativní regulátor růstu semenáčků pod vlivem

modrého světla. Exprese LeMYC2 je pozitivně stimulována prostřednictvím ABA (Gupta et al., 2014b).

Vzájemná interakce dopadajícího světelného záření a ABA byla také pozorována na regulaci genů *NPR1* a *NPR2* u rostlinného druhu *Lemna gibba*. Geny *NPR1* a *NPR2* (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related 1, 2*) dokážou zajistit systémovou rezistenci rostlin proti různým patogenům a škůdcům. Zde bylo prokázáno, že ABA dokáže aktivovat tyto geny a zvýšit jejich produkci, ale naopak jejich expresi negativně regulují fytochromy (vyvolávají snížení hladiny ABA) (Williams et al., 1994). U rostlin, které byly během svého růstu přesunuty do prostředí tmavého, bez slunečního záření, docházelo ke zvýšené produkci genů *NPR1* a *NPR2*, spolu se zvýšenou hladinou endogenní ABA (Weatherwax et al., 1996).

ABA signalizace je dále ovlivněna PIF proteiny, které jsou regulovány světlem a hrají klíčovou roli v růstu a vývoji rostlin. Faktory PIF (Phytochrome Interacting Factors) spadají do skupiny transkripčních faktorů bHLH (basic Helix-Loop-Helix) a jsou schopny ovlivnit signalizaci ABA několika způsoby. Například mohou zasáhnout do exprese genů zapojených v jejím metabolismu, biosyntéze nebo degradaci. Obecně faktory PIF ve tmě tlumí fotomorfogenezi (jedná se o negativní regulátory) a udržují v rostlinách skotomorfogenní stav. V kapitole klíčení byl již zmiňován faktor PIL5 (někdy označován PIF1), který se podílí jako negativní regulátor na klíčení. Po vystavení světlu, ale aktivované fytochromy s PIF interagují a inhibují jejich funkci (na základě fosforylace, ubiquitinace a degradace v proteazomu) (Liang et al., 2020).

Další způsob, jakým je ABA signalizace ovlivněna souvisí s genem *COP1* (*COnstitutively Photomorphogenic1*). COP1 je E3 ubiquitin ligáza, která je známá pro svůj inhibiční účinek na fotomorfogenezi (negativní regulátor fotomorfogeneze) a podílí se na celé řadě procesů včetně reakce rostlin ke stimulům, jako je kvetení, pohyb průduchů nebo reakce na stresové faktory. Bylo zjištěno, že COP1 působí během růstu semen *Arabidopsis thaliana* v temnotě jako pozitivní regulátor ABA signalizace. COP1 umožňuje prostřednictvím ABA akumulaci transkripčního faktoru ABI5 (ovlivňuje exprese genů regulovaných ABA), který je pro signalizaci ABA nepostradatelný (Obr. 16). Prokázalo se, že COP1 interaguje s ABD1, který inhibuje účinek ABI5. Stabilita ABI5 je tedy zvyšována vlivem COP1, který ve tmě degraduje ABD1 v reakci na ABA (Peng et al., 2022).



**Obrázek 16:** COP1 se podílí na regulaci signální dráhy ABA během růstu semenáčků *Arabidopsis thaliana* ve tmě. Ve tmě podporuje COP1 stabilitu ABI5 degradací ABD1 ve 26S proteasomu. Mimo vliv na ABI5 protein COP1 také napomáhá stabilitě proteinů PIF ve tmě. Protože jak PIF, tak ABI5 mohou aktivovat transkripci ABI5 přímým vázáním na G-box motivy v ABI5 promotoru, slouží COP1 jako mediátor ABA-indukované transkripce ABI5 ve tmě. Signalizace ABA navozuje jadernou akumulaci COP1 ve tmě, čímž se zvyšuje jeho aktivita při šíření ABA signálu. Převzato z Peng et al., 2022.

### 3 Materiál a metody

#### 3.1 Rostlinný materiál

K vybraným experimentům byla použita semena rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. Experimentální část práce spočívala v analýze mutantů. Tato strategie se nazývá genetický přístup. Konkrétně byla použita semena recesivních mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* deficientních ve fytochromovém chromoforu. U těchto mutantů je narušena syntéza fytochromového chromoforu (3Z-fytochromobilinu) ve dvou krocích. Semena použitých mutantů byla laskavě poskytnuta C. M. Rickem, TGC (Tomato Genetics Cooperative, University of Florida, Gainesville, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>).

Mutant *au<sup>w</sup>* (*aurea*) je recesivní mutant s poruchou biosyntézy fytochromového chromoforu odvozený od kultivaru Money Maker (cv. MM). Tento mutant je charakteristický poruchou enzymu PΦB syntázy. Pokud je narušena aktivita PΦB syntázy, nemůže dojít k redukci biliverdinu IXα (BV IXα) na 3E-fytochromobilin (3E-PΦB) a následné přeměně na 3Z-fytochromobilin (3Z-PΦB) (Koornneef et al., 1985; Terry, 1997).

Mutant *yg-2* (*yellow-green 2*) je recesivní mutant odvozený od kultivaru Kokomo. U tohoto mutantu je biosyntéza chromoforu přerušena v místě působení enzymu hem oxygenázy. Není tedy schopen oxidace hemu na biliverdin IXa (Terry and Kendrick, 1996).

#### 3.2 Použité chemikálie a roztoky

V experimentech byly použity tyto chemikálie a roztoky: sacharosa, pufr MES (Morpholinoethane sulfonic acid), Murashige a Skoog médium (MS médium; Prod. no. MO221.0100, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), 1 M roztok hydroxidu sodného (KOH), Phytoagar (Prod. no. P1001.1000, Duchefa Biochemie, Nizozemsko), zásobní roztok kyseliny abscisové (ABA) o koncentraci  $10^{-2}$  mol/l, sterilní destilovaná voda, 70% ethanol, 96% ethanol, NaClO (SAVO) obsahující 2,8 % aktivního chloru.

#### 3.3 Použité přístroje

V rámci jednotlivých experimentů bylo použito toto přístrojové vybavení: předvážky, pH metr, analytické váhy, magnetická míchačka, mikrovlnná trouba, parní autokláv, lednice, laminární flowbox (Holten Horizontál Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific), automatická růstová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) se zdrojem modrého

světla: 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, automatická růstová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) se zdrojem červeného světla: 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.

### **3.4 Pracovní postupy**

#### **3.4.1 Příprava kultivačního média**

Pro kultivaci rostlin a semen *Solanum lycopersicum* L. bylo připraveno pevné kultivační médium Murashige a Skoog (MS; Murashige a Skoog, 1962). Byly připraveny 2 l tohoto kultivačního média. Odměrným válcem byl nalit 1 l destilované vody do 3 l Erlenmayerovy baňky a vloženo magnetické míchátko. Erlenmayerova baňka byla přenesena na magnetickou míchačku a za stálého míchání bylo do baňky postupně přidáno 20 g sacharosy, 8,6 g Murashige a Skoog média a 390,4 mg pufru MES. Jakmile se chemikálie dostatečně rozpustily, míchání bylo zastaveno a objem Erlenmayerovy baňky byl doplněn na 2 l destilovanou vodou. Poté byla magnetická míchačka opět zapnuta a za použití pH metru bylo postupným přidáváním 1M KOH Pasteurovou pipetou upraveno pH až na hodnotu 6,1.

Takto připravené médium bylo po 500 ml odměrným válcem přelito do celkem čtyř 500ml skleněných lahví. Předtím bylo ještě do jednotlivých skleněných lahví naváženo vždy 3,5 g Phytoagaru. Víčka lahví byla obalena hliníkovou fólií a přelepena sterilizační páskou. Láhve byly popsány datem a jménem. Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa a následně uchováváno v lednici.

#### **3.4.2 Studium klíčivosti semen**

##### **3.4.2.1 Povrchová sterilizace semen**

Pro každý experiment bylo napočítáno 450 semen mutanta rajčete a 450 semen příslušného kontrolního genotypu. Semena byla napočítána na čistém listu formátu A4 a přemístěna do dvou plastových nesterilních 50 ml zkumavek typu Falcon (každý genotyp do jedné zkumavky). Do zkumavky se semeny bylo nalito cca 40 ml roztoku NaClO (chlornan sodný), obsahujícího 2,8 % aktivního chloru, který byl připraven smícháním komerčního roztoku 0,6 l SAVO a 0,4 l destilované H<sub>2</sub>O. Povrchová sterilizace semen byla prováděna za občasného protřepání 20 až 25 min a další práce se semeny pokračovala ve flowboxu. Po uplynutí daného času byla semena

promyta sterilní destilovanou vodou. Nejprve bylo 10ml automatickou pipetou se sterilní špičkou odsáto SAVO užitá pro sterilizaci a poté nahrazeno stejným objemem sterilní destilované vody. Celý proces byl opakován šestkrát. Po posledním propláchnutí byla semena zalita 5 ml sterilní destilované vody, aby nevyschla.

### **3.4.2.2 Příprava kultivačního média se zvolenými koncentracemi ABA**

Příprava média se zvolenými koncentracemi ABA byla provedena v laminárním flowboxu. Celkem bylo připraveno 30 kulatých plastových sterilních Petriho misek (průměr 90 mm), které byly popsány genotypem, datem, příslušnou světelnou podmínkou a zvolenou koncentrací ABA. V mikrovlnné troubě bylo rozeřáno 600 ml MS média. Objem 120 ml rozeřátého čirého média bylo přelito pomocí 50 ml sterilní zkumavky typu Falcon do sterilní 300 ml Erlenmeyerovy baňky. Do média bylo postupně pipetováno příslušné množství ABA ze zásobního roztoku o koncentraci  $10^{-2}$  mol/l. Automatickou pipetou byly napipetovány objemy 0, 12, 36, 60 a 84  $\mu$ l, které odpovídají výsledným koncentracím ABA 0, 1, 3, 5 a 7  $\mu$ mol/l. Celkem bylo použito 192  $\mu$ l zásobního roztoku ABA. Připravená média o dané koncentraci byla po 20 ml pomocí sterilní 50 ml zkumavky typu Falcon rozlita celkem do 30 Petriho misek (vždy 6 misek pro jednu koncentraci ABA) a ponechána ztuhnout.

### **3.4.2.3 Výsev semen**

Výsev semen byl proveden ve sterilním prostředí laminárního flowboxu. Před prací byla pracovní plocha flowboxu vytřena 70% ethanolem. Povrchově sterilní semena byla vysévána pomocí dlouhé pinzety na povrch ztuhlého média, vždy 30-32 semen na jednu misku. Pinzetu bylo nutné před užitím a vždy mezi novým výsevem vysterilizovat oplachem v 96% ethanolu a vyžiháním nad plamenem lihového kahanu. Sterilní pinzeta byla při práci odkládána na otevřenou sterilní Petriho misku. Petriho misky byly po nanesení semen přelepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Batist, Softpore, ČR) a popsány jménem genotypu. Následně byly připravené Petriho misky se semeny umístěny ve vertikální poloze do stojanů a přeneseny do automatické růstové komory s kontinuálním modrým světlem nebo s kontinuálním červeným světlem. Misky se semeny určenými pro kultivaci ve tmě byly zabaleny do alobalu a umístěny do stejné kultivační komory s modrým či červeným světlem. Kultivace semen probíhala po dobu 7 dnů při teplotě 23 °C.

#### **3.4.2.4 Vyhodnocení klíčivosti**

Kultivace semen v růstové komoře probíhala 7 dní. Od 3. nebo 4. dne od výsevu byl každý den počítán počet vyklíčených semen. Takto byla semena počítána až do 7. dne kultivace. Výsledné hodnoty byly použity pro výpočet procentuální klíčivosti u každé misky. Celkem byly provedeny 4 experimenty pro každého mutanta s kontrolním genotypem. Hodnoty ze 7. dne od výsevu byly použity pro sestavení grafů maximální klíčivosti a vypočítané inhibice klíčení.

#### **3.4.3 Studium růstu rostlin**

V případě růstových experimentů bylo pro každý experiment napočítáno 300 semen mutanta rajčete a 300 semen kontrolního genotypu. Poté byla semena povrchově sterilizována stejným postupem, jak již bylo uvedeno v kapitole 3.4.2.1. Misky s vybranými koncentracemi ABA byly připraveny stejným způsobem, jak je uvedeno v kapitole 3.4.2.2.

##### **3.4.3.1 Výsev semen**

Vysterilizovaná semena byla přenášena na ztuhlé kultivační médium pomocí pinzety vysterilizované v 96% ethanolu a vyžíhané nad plamenem lihového kahanu. Na každou Petriho misku bylo takto umístěno 50 semen kontrolního genotypu nebo odpovídajícího mutanta. Po výsevu semen na Petriho misky byly misky popsány datem a informací, zda se jedná o mutanta nebo kontrolní genotyp. Všechny Petriho misky byly po ukončeném výsevu přelepeny dvěma vrstvami fixační pásky z netkané textilie (Batist, Softpore, ČR) a misky byly zabaleny ve vertikální poloze do alobalu tak, aby k semenům nepronikalo světlo. Zabalené misky byly umístěny do spodní části automatické kultivační komory. Semena byla následně kultivována 3 až 4 dny při teplotě 23 °C.

##### **3.4.3.2 Přenos semen na kultivační médium se zvolenými koncentracemi ABA**

Po 3 nebo 4 dnech od výsevu semen na MS médium byl proveden přenos vyklíčených semen na médium obsahující ABA ve zvolených koncentracích. Semena byla přenášena na Petriho misky s koncentracemi ABA 0, 1, 2, 5 nebo 9  $\mu\text{mol/l}$ . Na střed každé Petriho misky o vybrané koncentraci ABA bylo umístěno 7 vyklíčených semen (kořenem dolů). Semena byla přenášena pomocí měkké krátké pinzety vysterilizované v 96% ethanolu a vyžíhané nad plamenem lihového kahanu. Po provedeném přenosu byly Petriho misky popsány příslušným genotypem,



datem a světelnou podmínkou. Následně byly zalepeny dvěma vrstvami fixační pásky z netkané textilie (Batist, Softpore, ČR) a ve vertikální poloze umístěny do plastových stojanů. Petriho misky byly umístěny do kultivační komory s kontinuálním modrým světlem a stejný počet Petriho misek byl také umístěn do kultivační komory s kontinuálním červeným světlem. Poslední třetina Petriho misek byla obalena alobalem a ve vertikální poloze umístěna do stejné kultivační komory s modrým či červeným světlem. Kultivace rostlin probíhala po dobu 7 dní při teplotě 23 °C.

### 3.4.3.3 Vyhodnocení růstu

Pro vyhodnocení růstu rostlin bylo užito pravítka, pomocí něhož byla s přesností na 1 mm změřena délka hypokotylů a kořenů. Současně byl sledován celkový fenotyp rostlin. Měření rostlin bylo provedeno vždy po 7denní kultivaci přenesených vyklíčených semen. Pokaždé byly provedeny minimálně 3 nezávislé experimenty. Následně byla z jednotlivých naměřených hodnot vypočtena průměrná délka hypokotylu a kořene a procentuální inhibice růstu těchto dvou orgánů. Získané hodnoty byly vyneseny do grafů.

Inhibice růstu (v procentech) byla vypočtena dle následujícího vzorce:

$$\% \text{ Inhibice} = \frac{A - B}{A} \cdot 100 (\%)$$

A ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při koncentraci ABA 0 mol/l

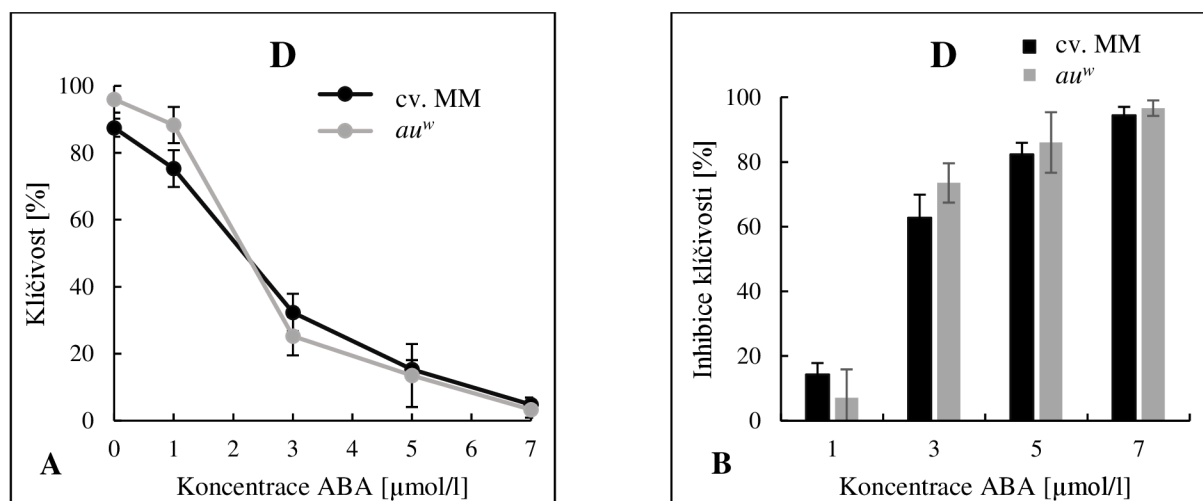
B ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při zvolené koncentraci ABA

## 4 Výsledky

V experimentální části předložené bakalářské práce bylo cílem studovat vliv světla a kyseliny abscisové (ABA) na klíčení semen a růst rostlin. Vzájemné působení těchto dvou faktorů bylo zkoumáno na rostlině rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Současně bylo zjišťováno, zda působení světla na citlivost rostlin k ABA může být zprostředkováno fytochromy. Proto byl použit tzv. genetický přístup, který spočíval v analýze dvou fotomorfogenních mutantů *au*<sup>w</sup> (*aurea*<sup>w</sup>) a *yg-2* (*yellow-green 2*) s poruchou v biosyntéze fytochromového chromoforu. Provedené experimenty byly dvojího druhu. Bylo studováno klíčení semen a dále pak růst rostlin. V rámci studia klíčení semen byla sledována klíčivost semen v závislosti na vybraných koncentracích ABA a zvolených světelných podmínkách. Z provedených růstových experimentů byla získána data o délce hypokotylů a kořenů a následně vypočítáno procento inhibice růstu vlivem vzájemného působení ABA a světla. Klíčení a růst rostlin byly pozorovány v podmínkách *in vitro* ve tmě a na kontinuálním modrém a červeném světle při působení ABA o zvolených koncentracích 0, 1, 3, 5 a 7  $\mu\text{mol/l}$  (pro klíčení) a 0, 1, 2, 5 a 9  $\mu\text{mol/l}$  (pro růstové experimenty). Všechny experimenty byly provedeny dle postupů uvedených v metodice.

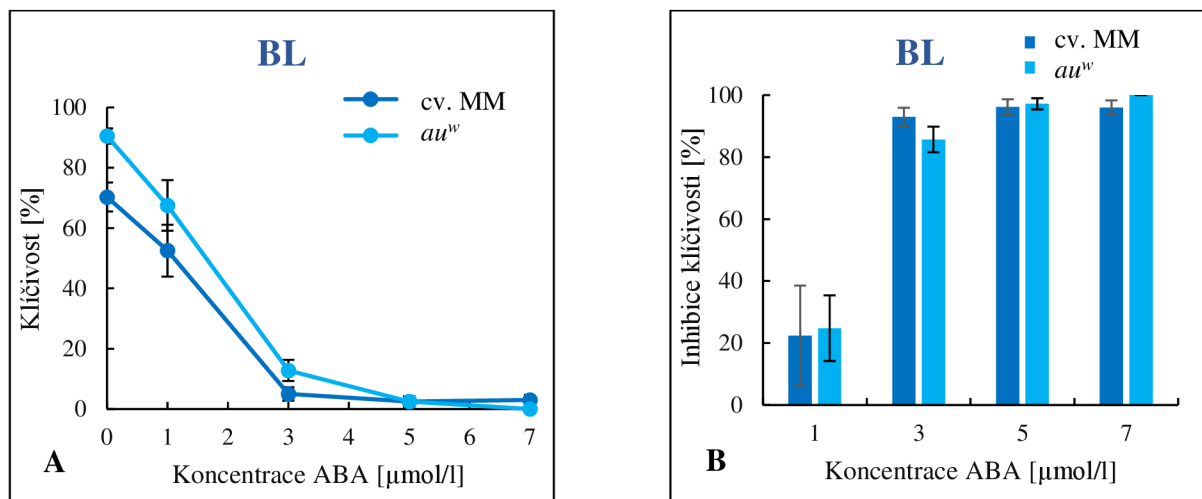
#### 4.1 Citlivost klíčivosti semen mutanta *au<sup>w</sup>* k ABA

Na obrázku 17A je zobrazen graf, který znázorňuje hodnoty klíčivosti (v %) cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>*. Oba genotypy byly kultivovány po dobu 7 dní ve tmě (D). Hodnoty klíčivosti semen obou genotypů byly při vzájemném srovnání více či méně vyrovnané a se zvyšující se koncentrací ABA úměrně klesaly. Inhibiční účinek ABA na klíčivost semen ve tmě se tedy s rostoucí koncentrací aplikované ABA zvyšoval, ale byl u obou genotypů podobný (Obrázek 17B).



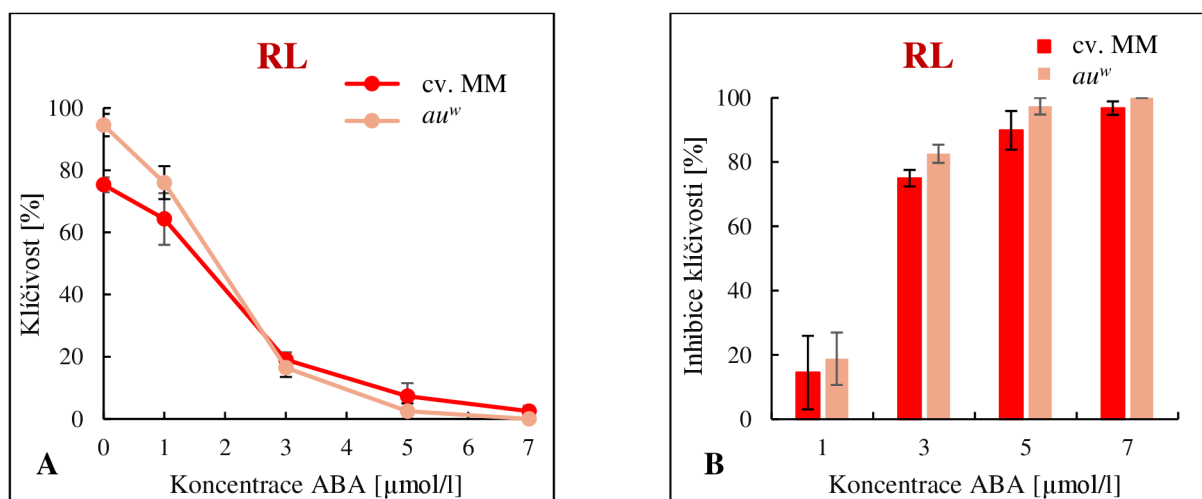
**Obrázek 17:** Klíčivost semen cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Na obrázku 18A je zobrazena klíčivost semen cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* na modrém světle a obrázek 18B znázorňuje vypočítané inhibice klíčivosti zmíněných genotypů během sedmidenní kultivace. Oproti kultivaci ve tmě bylo zjištěno, že modré světlo mírně redukuje klíčivost semen cv. MM v porovnání s mutantním genotypem, kdy klíčivost světlem ovlivněna nebyla. Z obrázku 18A i 18B je dále zřejmé, že ABA ve všech použitých koncentracích inhibovala klíčivost semen, přičemž od koncentrace 5  $\mu\text{mol/l}$  byla inhibice klíčivosti semen obou genotypů téměř 100 %. Mezi relativní inhibicí klíčivosti testovaných genotypů však nebyla pozorována výrazná odlišnost.



**Obrázek 18:** Klíčivost semen cv. MM a mutanta  $au^w$  v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

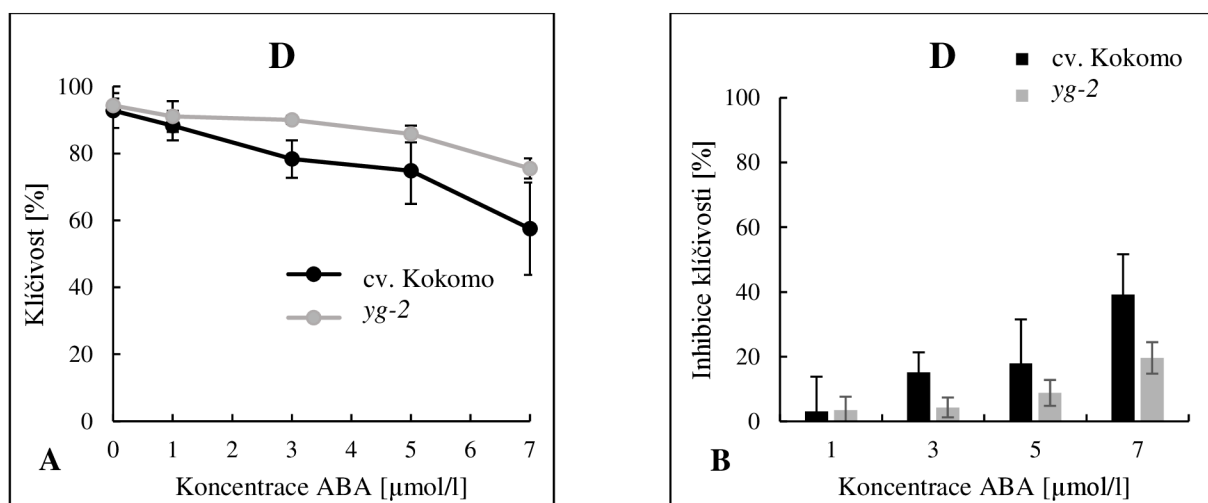
Bylo zjištěno, že červené světlo obdobně jako modré světlo mírně redukuje klíčivost semen cv. MM. U mutanta  $au^w$  však červené světlo na klíčivost vliv nemělo. Na obrázku 19A je vidět, že hodnoty klíčivosti semen s rostoucí koncentrací ABA úměrně klesaly a mezi genotypy se navzájem nijak výrazně nelišily. Z obrázku 19B je tedy zřejmé, že inhibiční účinek ABA byl u obou genotypů podobný.



**Obrázek 19:** Klíčivost semen cv. MM a mutanta  $au^w$  v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

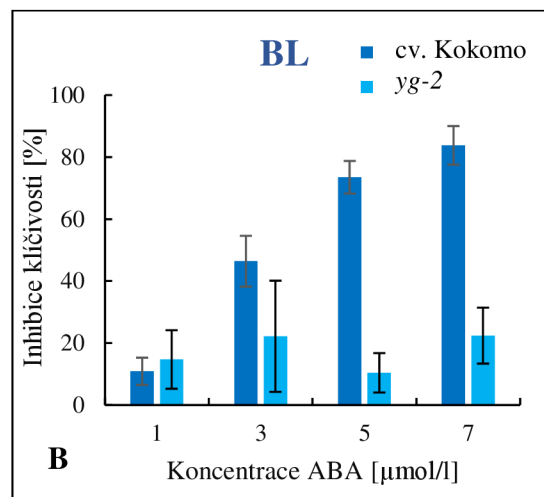
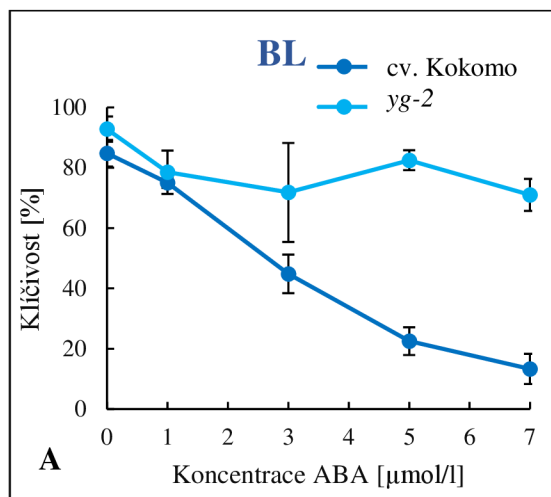
## 4.2 Citlivost klíčivosti semen mutanta *yg-2* k ABA

Graf na obrázku 20A zobrazuje získané hodnoty maximální klíčivosti při kultivaci semen cv. Kokomo a mutanta *yg-2*. Při kultivace semen ve tmě (D) bylo pozorováno, že mutant *yg-2* dosahoval mírně vyšší klíčivosti na všech testovaných koncentracích exogenní ABA. Z hodnot klíčivosti byla spočtena procentuální inhibice klíčivosti zmiňovaných genotypů. Koncentrace ABA 1  $\mu\text{mol/l}$  neměla výrazný inhibiční efekt na klíčení semen ani u jednoho genotypu, ale u ostatních použitých koncentrací ABA byl inhibiční účinek pozorován. Při srovnání cv. Kokomo s mutantem *yg-2* ovšem nebyly v inhibici klíčivosti semen, vzhledem k vyšší variabilitě, zaznamenány příliš velké rozdíly (Obr. 20B).



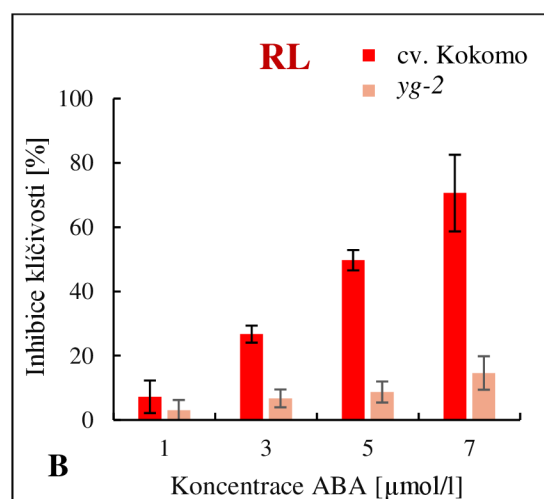
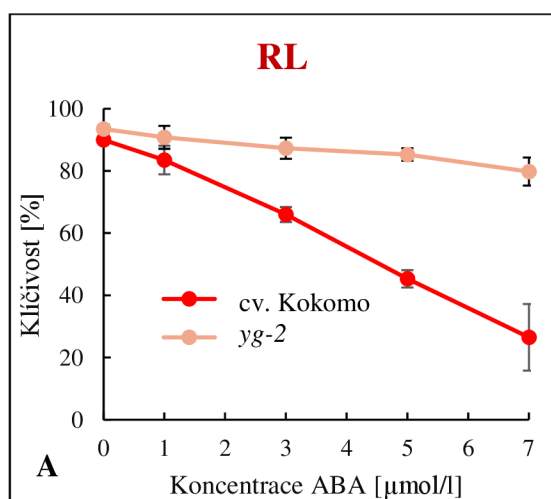
**Obrázek 20:** Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Na obrázku 21A je zobrazena klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta *yg-2* během kultivace na modrém světle (BL). Při absenci ABA klíčila semena cv. Kokomo i mutanta *yg-2* na modrém světle podobně jako ve tmě. Zatímco ABA v koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  měla u obou genotypů pouze mírný inhibiční účinek, ABA o vyšších koncentracích 3, 5 a 7  $\mu\text{mol/l}$  způsobila u cv. Kokomo výraznou inhibici klíčivosti semen, kdežto semena *yg-2* byla vůči inhibičnímu účinku ABA výrazně tolerantní (Obr. 21B).



**Obrázek 21:** Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

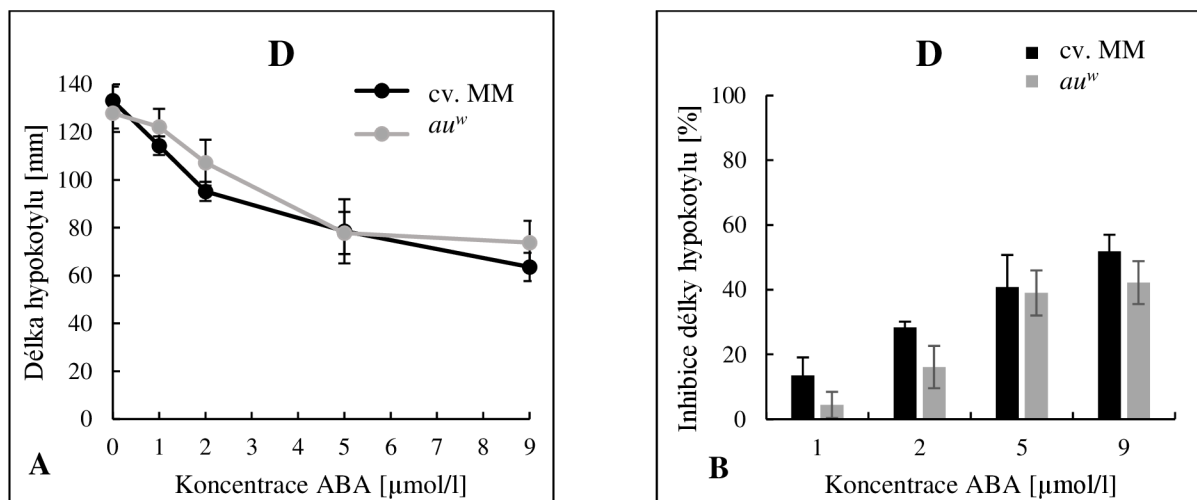
Obrázek 22A a B zachycuje výsledky klíčivosti cv. Kokomo a mutanta *yg-2* na červeném světle (RL). Mutant *yg-2* dosahoval značně vyšších hodnot klíčivosti v přítomnosti ABA o koncentracích 3, 5 a 7  $\mu\text{mol/l}$ , než dosahoval cv. Kokomo, kde byl inhibiční účinek na klíčivost semen velice výrazný (Obr. 22A). Je to patrné i z obrázku 22B, který ukazuje, že mutant *yg-2* je k aplikované ABA tolerantní. Bylo tomu tak na všech testovaných koncentracích ABA. Zjištěné výsledky také ukázaly, že klíčivost semen obou testovaných genotypů nebyla samotným červeným světlem ovlivněna.



**Obrázek 22:** Klíčivost semen cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) 7. den od výsevu. Grafy zobrazují průměrnou klíčivost semen  $\pm$  SE (A) a průměrnou inhibici klíčivosti semen  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

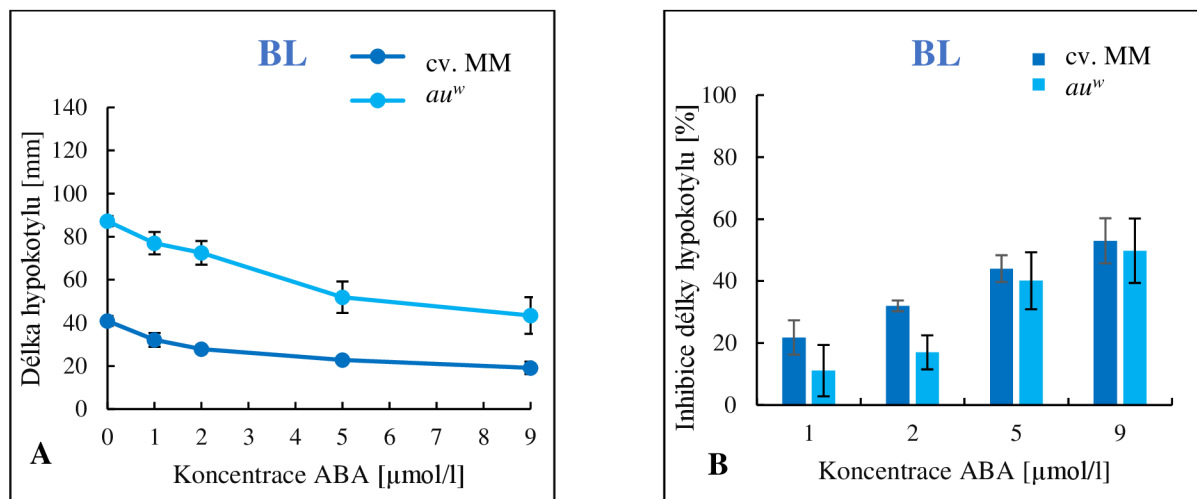
### 4.3 Citlivost růstu hypokotylu mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* k ABA

Růst hypokotylu cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* ve tmě (D) je zobrazen na obrázku 23A. Délka etiolovaných hypokotylů u obou genotypů se zvyšující se koncentrací ABA úměrně klesala, přičemž pokles byl u obou genotypů podobný. Při výpočtu inhibice růstu bylo zjištěno, že ABA o koncentraci 1  $\mu\text{mol/l}$  měla mírný inhibiční efekt u cv. MM, ale u mutantu *au<sup>w</sup>* inhibice vlivem ABA pozorována nebyla. Další rozdíl v inhibičním účinku ABA byl u koncentrace 2  $\mu\text{mol/l}$ , kdy mírně vyšší inhibice dosahoval kontrolní genotyp. U ostatních testovaných koncentrací ABA se výsledné inhibice růstu u cv. MM a *au<sup>w</sup>* nijak výrazně neodlišovaly (Obr. 23B).



**Obrázek 23:** Růst hypokotylu cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotylu  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotylu  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

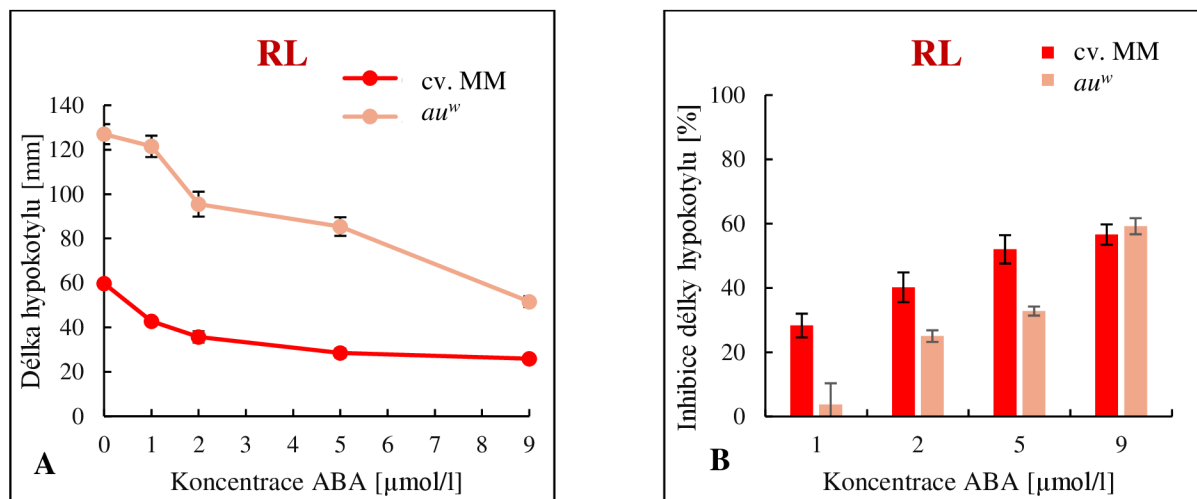
Kultivací rostlin cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* na modrém světle (BL) bylo pozorováno, že BL inhibuje růst hypokotylu obou testovaných genotypů (výrazněji u cv. MM). Z obrázku 24A je patrné, že hypokotyl mutantu *au<sup>w</sup>* byl na základním médiu výrazně delší oproti cv. MM. Se zvyšující se koncentrací exogenní ABA délka hypokotylů u obou genotypů postupně klesala. Výpočet inhibice růstu ukázal, že při koncentraci ABA 2  $\mu\text{mol/l}$  byl inhibiční účinek ABA u cv. MM mírně vyšší než u mutantu *au<sup>w</sup>*. U ostatních testovaných koncentrací ABA nebyly v inhibici růstu hypokotylů testovaných genotypů pozorovány výrazné rozdíly (Obr. 24B).



**Obrázek 24:** Růst hypokotylu cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotylu ± SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotylu ± SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

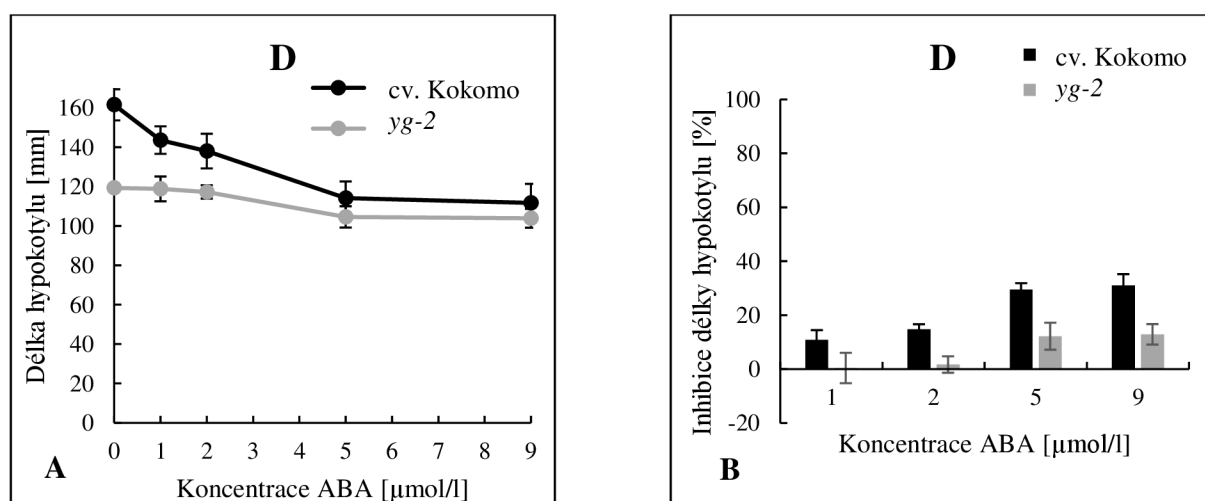
Na obrázku 25A lze vidět, jak je růst hypokotylu cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* ovlivněn prostřednictvím ABA během kultivace na červeném světle (RL). Délka hypokotylu mutantu *au<sup>w</sup>* byla podstatně větší než u cv. MM, a to při absenci ABA v médiu i na všech testovaných koncentracích ABA. Bylo zjištěno, že při absenci ABA RL inhibuje růst hypokotylu u cv. MM nikoliv však u mutantu *au<sup>w</sup>* (srovnej Obr. 23A a 25A). Z obrázku 25A i B je patrné, že ABA ve všech použitých koncentracích inhibovala růst hypokotylu u obou genotypů. ABA ve všech aplikovaných koncentracích měla výrazný inhibiční efekt u cv. MM, přičemž mutant *au<sup>w</sup>* byl k inhibičnímu účinku ABA méně citlivý, s výjimkou koncentrace 9 μmol/l.





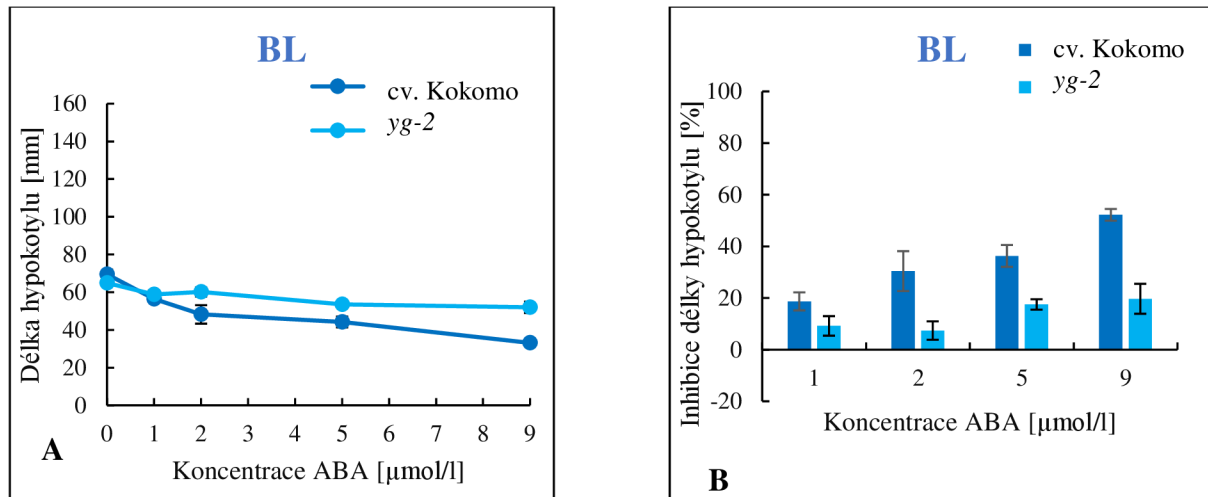
**Obrázek 25:** Růst hypokotyly cv. MM a mutantu  $au^w$  v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotyly  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotyly  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Na obrázku 26A je zobrazen růst hypokotyly cv. Kokomo a mutantu  $yg-2$  ve tmě (D). Hypokotyl cv. Kokomo byl ve tmě při absenci ABA výrazně delší než hypokotyl mutantu  $yg-2$ . Obrázek 26A rovněž ukazuje, že ABA v testovaných koncentracích inhibovalo růst hypokotylů, přičemž inhibiční účinek byl výraznější u cv. Kokomo. To bylo potvrzeno i výpočtem procentuální inhibice růstu. Obr. 26B ukazuje, že mutantní genotyp byl na rozdíl od kontrolního genotypu vůči inhibičnímu účinku ABA méně citlivý.



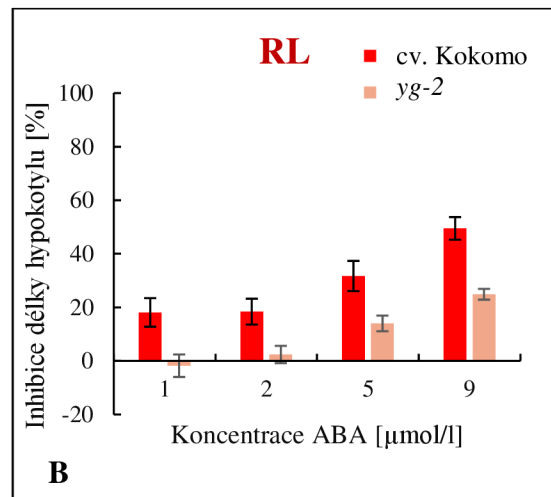
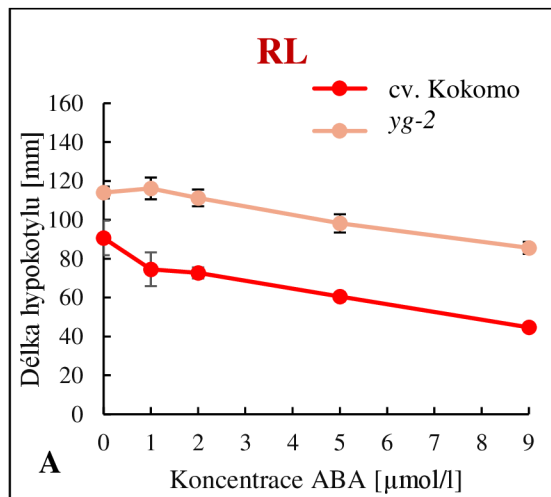
**Obrázek 26:** Růst hypokotyly cv. Kokomo a mutantu  $yg-2$  v závislosti koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotyly  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotyly  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Z obrázku 27A je patrné, že na modrém světle (BL) byly délky hypokotylu cv. Kokomo a mutanta *yg-2* na nulové koncentraci ABA podobné. ABA na BL inhibovala růst hypokotylů, ale i z obr. 27A je zřejmé, že inhibice růstu byla nižší u mutanta *yg-2*. Výpočet inhibice růstu to pak potvrdil. Obrázek 27B ukazuje značně vyšší inhibiční účinek ABA u cv. Kokomo při všech testovaných koncentracích exogenní ABA oproti mutantnímu genotypu.



**Obrázek 27:** Růst hypokotylu cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotylu  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotylu  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

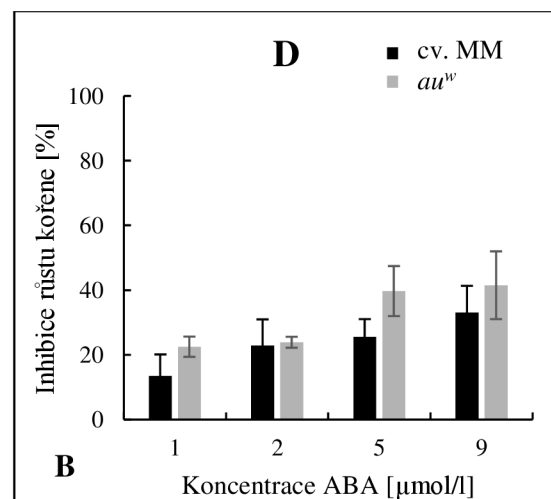
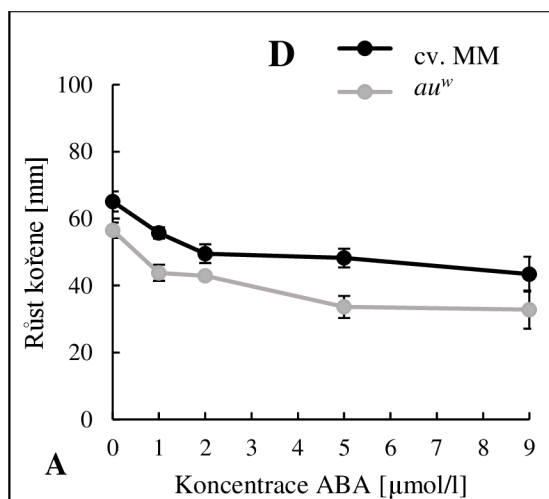
Kultivací rostlin na červeném světle (RL) bylo zjištěno, že na základním médiu měl mutant *yg-2* delší hypokotyl než cv. Kokomo (Obr. 28A). Při srovnání s Obr. 26A je rovněž evidentní, že červené světlo redukovalo růst hypokotylu cv. Kokomo, kdežto u mutanta *yg-2* nebyl inhibiční účinek červeného světla pozorován. Obrázek 28A dále ukazuje, že se zvyšující se koncentrací ABA v médiu se hypokotyl obou genotypů postupně zkracoval. Z obrázku 28B je pak patrné, že mutant *yg-2* byl k inhibičnímu efektu ABA méně citlivý než cv. Kokomo, kde byl růst prostřednictvím ABA výrazně inhibován.



**Obrázek 28:** Růst hypokotyly cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky hypokotyly  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu hypokotyly  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

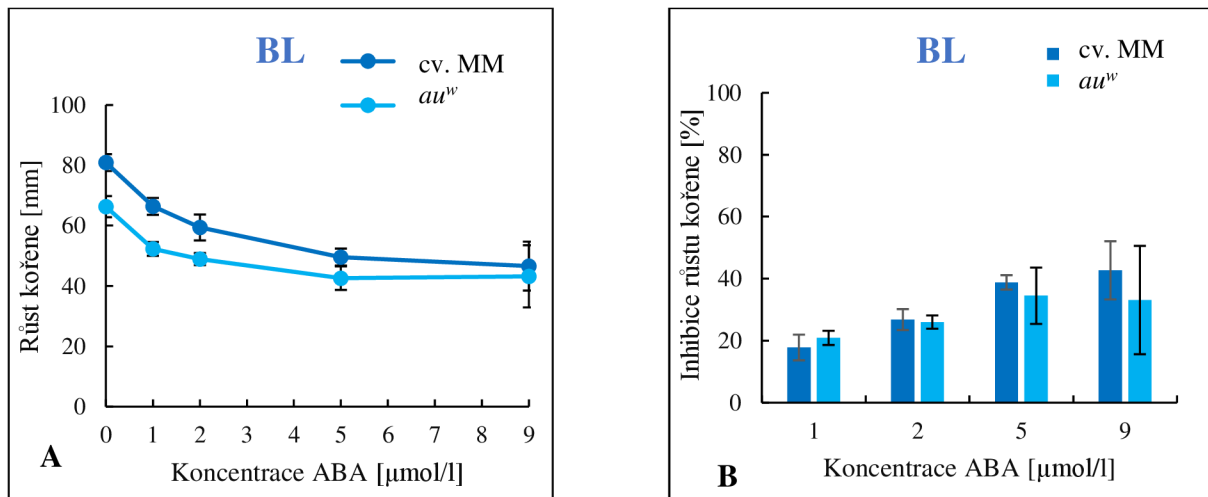
#### 4.4 Citlivost růstu kořenů mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* k ABA

Kultivací rostlin cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* ve tmě (D) bylo zjištěno, že kořen cv. MM svou délkou mírně převyšuje kořen mutanta *au<sup>w</sup>* (Obr. 29A). Při výpočtu inhibice růstu vlivem ABA bylo pozorováno, že mezi oběma genotypy byl mírný rozdíl při testované koncentraci ABA 5  $\mu\text{mol/l}$ , kdy vyšší inhibice dosahoval mutantní genotyp. ABA v dalších testovaných koncentracích měla na růst kořene cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* podobný inhibiční účinek (Obr. 29B).



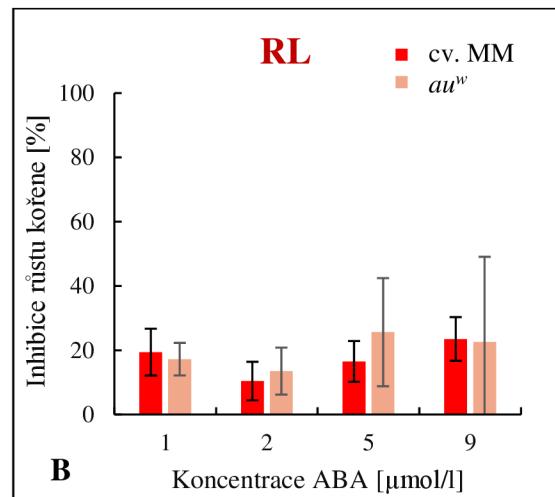
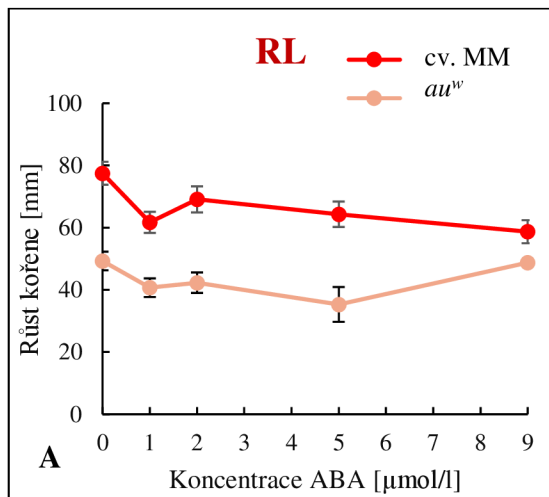
**Obrázek 29:** Růst kořene cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Kultivací rostlin na modrém světle (BL) bylo zjištěno, že kořeny cv. MM i mutanta *au<sup>w</sup>* byly mírně delší než ve tmě (srovnej Obr. 29A s 30A). Podobně jako ve tmě, ABA redukovala růst kořene u obou genotypů (Obr. 30A). Na základě výpočtů procentuální inhibice růstu (Obr. 30B) však bylo zjištěno, že inhibiční účinek ABA na růst kořenů cv. MM a *au<sup>w</sup>* byl na modrém světle podobný.



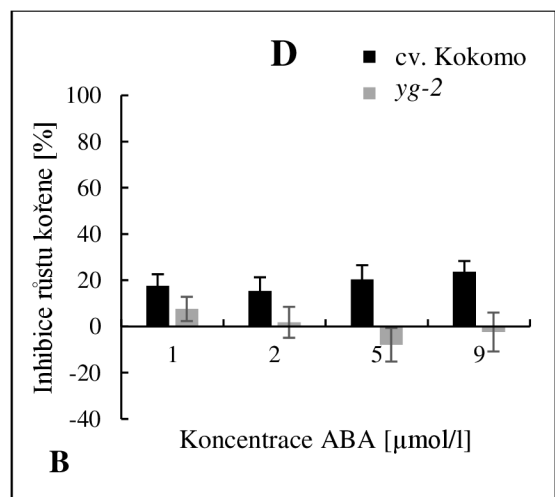
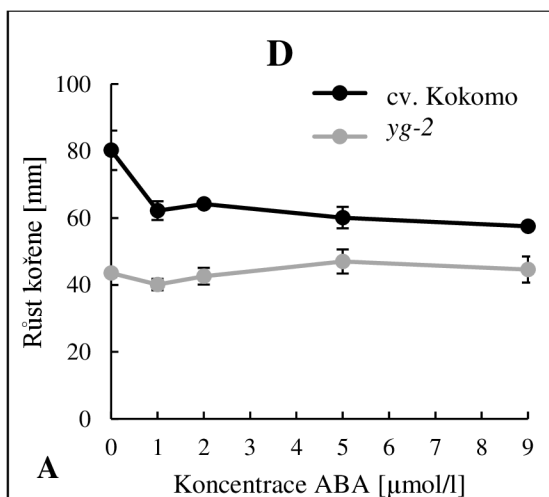
**Obrázek 30:** Růst kořene cv. MM a mutanta *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene ± SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene ± SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Bylo zjištěno, že u mutanta *au<sup>w</sup>* mělo červené světlo (RL) na růst kořenů mírný inhibiční vliv. Naopak u cv. MM červené světlo růst kořene stimulovalo. Na obrázku 31A lze pozorovat, že větších délek kořenů dosahoval na všech testovaných koncentracích ABA cv. MM. Z obrázku je rovněž zřejmé, že inhibiční účinek ABA na růst kořenů byl relativně nízký při všech testovaných koncentracích. Při výpočtu inhibice růstu bylo pak zjištěno, že relativní inhibice růstu kořene vlivem ABA byla u obou genotypů podobná a velice variabilní (Obr. 31B).



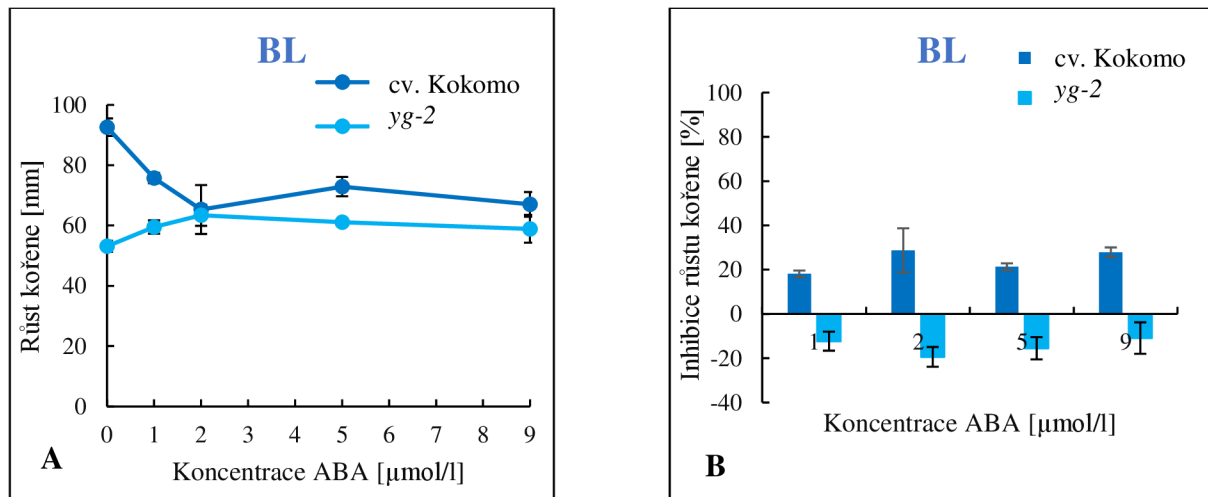
**Obrázek 31:** Růst kořene cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Na obrázku 32A a B jsou zaznamenány délky kořene rostlin cv. Kokomo a *yg-2* pěstovaných ve tmě (D). Při absenci ABA i při všech použitých koncentracích ABA byla zjištěna větší délka kořene u cv. Kokomo, přičemž největší rozdíl mezi kořeny cv. Kokomo a *yg-2* byl pozorován na základním médiu (Obr. 32A). Výpočty procentuální inhibice růstu pak ukázaly, že ABA ve všech testovaných koncentracích inhibovala růst kořene o něco výrazněji u cv. Kokomo, než u mutantu *yg-2* (Obr. 32B).



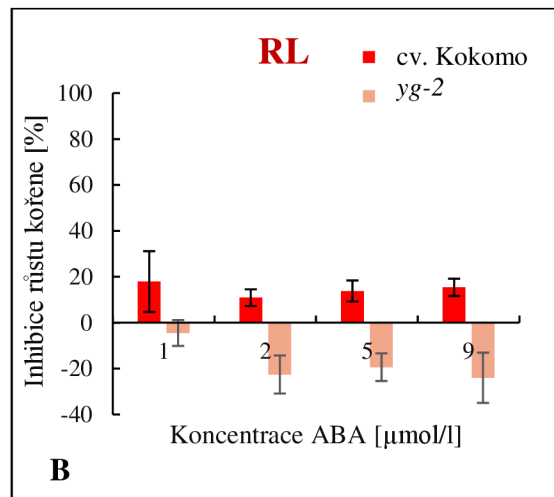
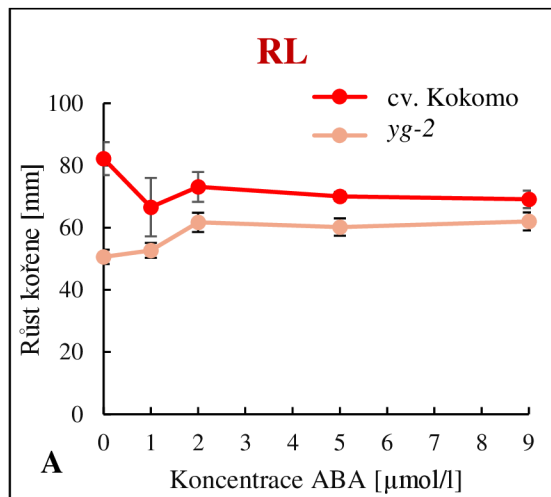
**Obrázek 32:** Růst kořene cv. Kokomo a mutantu *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace ve tmě (D) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Z obrázku 33A je zřejmé, že kultivace rostlin na modrém světle (BL) na základním médiu vedla u obou genotypů k mírné stimulaci růstu kořene. Po aplikaci ABA došlo u cv. Kokomo k inhibici růstu kořene, zatímco u mutantu *yg-2* byla pozorována spíše stimulace prodlužování. Na obrázku 33B, který zaznamenává vypočítanou inhibici růstu v % je pak vidět, že ABA ve všech aplikovaných koncentracích inhibovala růst kořene u cv. Kokomo, kdežto u mutantu *yg-2* byl potvrzen mírný stimulační účinek ABA.



**Obrázek 33:** Růst kořene cv. Kokomo a mutantu *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na modrém světle (BL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene ± SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene ± SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

Kultivací rostlin na červeném světle (RL) bylo zjištěno, že RL způsobilo u cv. Kokomo mírnou inhibici růstu kořene, ale u mutantního genotypu růst světlem ovlivněn nebyl. Z obrázku 34A je také patrné, že délka kořene cv. Kokomo byla na základním médiu značně vyšší oproti mutantu *yg-2*. Po aplikaci ABA byla u cv. Kokomo pozorována pouze mírná redukce růstu kořene, kdežto u mutantu *yg-2* měla ABA spíše stimulační efekt. To je zřejmé i na obrázku 34B, který tento trend potvrzuje.



**Obrázek 34:** Růst kořene cv. Kokomo a mutanta *yg-2* v závislosti na koncentraci ABA během kultivace na červeném světle (RL) po dobu 7 dní. Grafy zobrazují průměrné délky kořene  $\pm$  SE (A) a průměrné inhibice růstu kořene  $\pm$  SE (B) získané ze 4 nezávislých experimentů.

## 5 Diskuze

Světlo a kyselina abscisová (ABA) jsou nezastupitelnými faktory, které ovlivňují klíčení, růst a celkový vývoj rostlin. ABA se podílí především na regulaci pohybu průduchů, dormanci, zrání semen a reakci na stresové faktory. Za stresových podmínek se ABA v rostlinách hromadí a tím dokáže ovlivnit klíčení semen a růst semenáčků. Zajímavé je, že světelné záření a ABA nepůsobí na rostlinný vývoj odděleně, ale jejich signální dráhy vzájemně interagují (Lau and Deng, 2010; Li et al., 2017).

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, jak světlo ovlivňuje reakce rostlin k exogenně aplikované ABA. V experimentální části byly tedy studovány klíčivost semen a růstové reakce rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) za přítomnosti exogenně aplikované ABA v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Konkrétně, byla použita semena dvou fotomorfogenních mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* deficientních ve fytochromovém chromoforu. Defekt syntézy fytochromového chromoforu vede k narušení fytochromové signalizace a způsobuje celkové snížení aktivity fytochromů. Mutant *au<sup>w</sup>* je charakteristický poruchou enzymu PΦB syntázy, zatímco u mutantu *yg-2* je biosyntéza chromoforu přerušena v místě působení enzymu hem oxygenázy. Porovnáním citlivosti k ABA mezi mutanty s poruchou v syntéze chromoforu a kontrolními genotypy můžeme zjistit, zda působení světla na citlivost rostlin k ABA může být zprostředkováno fytochromy.

### 5.1 Vliv ABA na klíčení

V rámci studia klíčení semen byly nejdříve porovnány hodnoty klíčivosti kultivarů a od nich odvozených mutantů na základním médiu (bez přídavku ABA) ve zvolených světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo). Semena rajčete nepotřebují pro zahájení klíčení světelné záření (Appenroth et al., 2006). Hodnoty jejich klíčivosti by tak měly být nejvyšší ve tmě. Tato skutečnost byla potvrzena pouze u cv. MM, kdy klíčivost semen byla světlem mírně inhibována (více na BL). Tím se zároveň prokázala skutečnost, že BL způsobuje u semen rajčat inhibici klíčení (Piterkova et al., 2012). U mutantu *au<sup>w</sup>*, ale tento inhibiční účinek světla zachycen nebyl. Výsledky tedy naznačují, že PΦB syntáza a následně fytochromový chromofor se účastní redukce klíčivosti semen vlivem BL i RL. U cv. Kokomo ani u mutantu *yg-2*, ale klíčivost semen světlem inhibována nebyla. I mezi kultivary tak existují odlišnosti v citlivosti ke světlu. Zde lze předpokládat, že hem oxygenáza přímo neovlivňuje klíčivost semen obou těchto genotypů.



Je známo, že klíčivost semen je inhibována prostřednictvím fytohormonu ABA (Jones et al., 2013). Z provedených experimentů bylo zjištěno, že u všech testovaných genotypů rajčete měla ABA na klíčení semen inhibiční účinek, a to za všech světelných podmínek.

Z výsledků získaných testováním mutantu *au<sup>w</sup>* (odvozený od cv. MM) bylo zjištěno, že inhibice klíčivosti cv. MM i mutantu *au<sup>w</sup>* byla vlivem ABA více či méně vyšší na BL i RL ve srovnání s účinkem ABA ve tmě. Lze tedy říci, že na citlivosti semen k ABA se světlo opravdu podílí. Rozdíly v citlivosti semen k ABA mezi cv. MM a mutantem *au<sup>w</sup>*, ale pozorovány nebyly. Je tedy pravděpodobné, že vliv světla na citlivost semen *au<sup>w</sup>* k ABA nejspíše fytochromy zprostředkován není.

Dalším testovaným mutantem byl mutant *yg-2* (odvozený od cv. Kokomo). Výsledky ukázaly, že inhibice klíčivosti semen (vlivem ABA) byla u cv. Kokomo výrazně vyšší na BL a RL. U mutantu *yg-2*, však testované světelné podmínky citlivost semen k ABA neovlivňovaly. Ve srovnání s kontrolním genotypem byla semena *yg-2* vůči inhibičnímu účinku ABA výrazně tolerantní, a to za všech světelných podmínek, včetně tmy. Výsledky tedy ukazují, že deficiencie v hem oxygenáze a tedy ve fytochromu způsobila necitlivost semen *yg-2* k ABA obecně bez ohledu na světelné podmínky. To však nevylučuje, že světlo zvyšuje citlivost semen k inhibičním účinkům exogenní ABA prostřednictvím fytochromů.

Jedním z možných důvodů, proč světlo inhibovalo klíčení semen cv. MM je pravděpodobně ovlivnění endogenní ABA v semenech. Inhibiční efekt světla může být způsoben relativně vysokou hladinou endogenní ABA, za kterou může stát buď pozitivní vliv světla na její syntézu, nebo negativní vliv na její degradaci. Klíčení semen je regulováno zejména působením ABA a GA jejichž endogenní hladinu světlo dokáže ovlivnit (Seo et al., 2006). U *Arabidopsis thaliana* bylo zjištěno, že RL díky fytochromům stimuluje klíčení semen zvýšením hladiny GA a snížením endogenní úrovně ABA (Ge et al., 2020). Je však třeba zdůraznit, že semena *Arabidopsis* jsou, na rozdíl od rajčete, fotoblastická a tedy vyžadují ke klíčení světlo. U kontrolního genotypu MM a mutantního genotypu *au<sup>w</sup>* porucha v enzymu PΦB syntázy nemá pravděpodobně vliv na endogenní hladinu ABA ani GA. To by se dalo zjistit analýzou endogenních hormonů v semenech obou genotypů za jednotlivých světelných podmínek.

V rámci provedených experimentů bylo dále zjištěno, že citlivost semen cv. MM i cv. Kokomo k inhibičnímu účinku aplikované ABA byla působením BL i RL zvýšena. U mutantu *au<sup>w</sup>* i *yg-2* výrazné zvýšení citlivosti semen pozorováno nebylo. Z těchto výsledků tedy plyne,

že BL i RL může zvyšovat hladinu endogenní ABA, nebo zpomalovat degradaci ABA, či zvyšovat citlivost receptorů k ABA (obecně zvýšení signalizace ABA). Je zřejmé, že u mutantních genotypů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* k těmto událostem dochází mnohem méně z důvodu poruchy v syntéze chromoforu. Vlivem mutace mohou obsahovat semena obou mutantů méně endogenní ABA a/nebo více giberelinů. Tato skutečnost by se rovněž dala ověřit analýzou endogenních hormonů v semenech obou genotypů.

## 5.2 Vliv ABA na růst hypokotylu

V rámci další části experimentální práce byl sledován vliv světla a ABA na růstové reakce hypokotylů a kořenů zmíněných chromoforových mutantů.

Na základním médiu bez přítomnosti ABA bylo pozorováno, že světelné záření (BL i RL) redukuje růst hypokotylu u cv. MM. V případě kontrolního genotypu se tak potvrdil fakt, že růst hypokotylu je světlem inhibován a že docházelo k fotomorfogenním reakcím (Nemhauser and Chory, 2002). U mutantního genotypu *au<sup>w</sup>* se tato skutečnost nepotvrdila, protože délka hypokotylů rostlin pěstovaných na RL byla u genotypu *au<sup>w</sup>* srovnatelná s délkou hypokotylu etiolizovaných rostlin. Na BL byla inhibice růstu mutantního hypokotylu pozorována, ale relativně v mnohem menší míře než u cv. MM. Na základě této skutečnosti bylo potvrzeno, že mutant *au<sup>w</sup>* je opravdu fotomorfogenní mutant s poruchou v příjmu červeného, a i modrého světla. Mutantní rostlina *au<sup>w</sup>* pěstovaná na RL vypadala podobně jako rostliny pěstované ve tmě. Vypovídala fenotypové znaky jako dlouhý a tenký hypokotyl a světlá až bledá barva dána nedostatkem chlorofylu (Terry, 1997).

Jakmile byla do základního média přidána ABA došlo u obou genotypů k redukci růstu hypokotylů. Tento inhibiční účinek ABA byl pozorován za všech světelných podmínek a se zvyšující se koncentrací ABA se úměrně zvyšoval. Bylo zjištěno, že citlivost hypokotylů obou genotypů k ABA byla světlem mírně zvýšena především pak působením RL, přičemž u mutantu *au<sup>w</sup>* bylo toto zvýšení citlivosti menší. U mutantního genotypu byla tedy na BL a RL pozorována nižší citlivost hypokotylů k exogenní ABA ve srovnání s cv. MM. Výsledky experimentů tedy naznačují, že fytochromy zprostředkovávají vliv světla na citlivost hypokotylů rajčete k inhibičnímu účinku ABA.

Dále byla porovnána délka hypokotylů cv. Kokomo a mutantu *yg-2* kultivovaných v příslušných světelných podmínkách bez přítomnosti ABA. Světelné záření mělo na růst hypokotylů u těchto genotypů podobný účinek jako u cv. MM a mutantu *au<sup>w</sup>*. Experimenty

ukázaly, že ve tmě měl cv. Kokomo hypokotyl výrazně delší než mutant *yg-2*. Z toho plyne, že enzym hem oxygenáza, je pozitivně zapojen v prodlužování hypokotylů etiolovaných rostlin. Srovnáním délek hypokotylů zmíněných genotypů na BL bylo pozorováno, že cv. Kokomo má téměř stejnou délku hypokotylů jako mutantní genotyp *yg-2*. U rostlin pěstovaných na RL pak byly hypokotyly cv. Kokomo asi o 70 % kratší než ve tmě. Naproti tomu u mutantu *yg-2* dosahovala průměrná délka hypokotylu na RL podobné délky jako hypokotyl rostlin rostoucích ve tmě. Na základě těchto zjištěných skutečností lze říci, že u cv. Kokomo probíhala fotomorfogeneze indukovaná BL i RL. Naproti tomu, u mutantního genotypu došlo k fotomorfogenezi jen na BL, a to pouze částečně, kdežto na RL fotomorfogeneze neprobíhala vůbec. Mutant *yg-2* vykazoval stejné fenotypové znaky hypokotylu jako mutant *au<sup>w</sup>*. Fenotyp byl obdobný jako u rostlin pěstovaných ve tmě (protáhlý hypokotyl a světlé zbarvení) (Terry and Kendrick, 1996). V rámci těchto experimentů se tedy rovněž potvrdilo (jako u mutantu *au<sup>w</sup>*), že mutant *yg-2* je defektní v příjmu červeného i částečně modrého světla.

Zároveň bylo pozorováno, že hypokotyly cv. Kokomo jsou více citlivé k ABA na BL a nepatrně (při vyšších koncentracích ABA) i na RL než hypokotyly etiolizovaných rostlin. U mutantu *yg-2* ovšem nebyl vliv BL ani RL na citlivost hypokotylů k ABA pozorován. Délka hypokotylů mutantního genotypu *yg-2* na BL i RL vypovídala o výrazně snížené citlivosti tohoto genotypu k inhibičnímu účinku ABA. Je však třeba zmínit, že snížená citlivost hypokotylů *yg-2* k inhibičním účinkům ABA byla pozorována i ve tmě. Z těchto výsledků vyplývá, že porucha v hem oxygenáze (u mutantu *yg-2*) vede obecně k narušení citlivosti růstu hypokotylu k ABA. Jinými slovy, výsledky vedou k závěru, že i neaktivované fytochromy zesilují citlivost hypokotylu rajčete k inhibičním účinkům exogenní ABA. Výsledky experimentů současně naznačují, že zvýšení citlivosti hypokotylů rajčete k ABA vlivem BL i RL může být zprostředkováno fytochromy.

Inhibice prodlužování hypokotylů vlivem světla je zprostředkováno mnoha mechanismy, např. zapojením hormonů, včetně ABA. Můžeme tedy předpokládat, že světlo ovlivňuje hladinu endogenní ABA, kdy světlo ovlivňuje metabolismus kyseliny abscisové a vede tak ke zvýšení její endogenní hladiny. Jak již bylo zmíněno, RL prostřednictvím fytochromů snižuje endogenní hladinu ABA (Sawada et al., 2008), a to nejen v semenech, ale také v semenáčcích čímž napomáhá jejich vývoji. I v rámci růstu hypokotylů bylo zjištěno, že RL zvyšuje jejich citlivost k exogenní ABA, a tak je prodlužování hypokotylů naopak redukováno. Většina literárních zdrojů uvádí, že ABA vede k inhibici růstu hypokotylů. Publikace Humplík et al., (2015) uvádí, že nedostatek ABA snižuje u rostlin rajčete růst etiolizovaných hypokotylů a

ABA tedy může růst stimulovat (u rostlin rostoucích ve tmě) nebo se podílet na udržení jeho růstu. Bylo zjištěno, že mechanismy, kterými ABA stimuluje růst, jsou podpora endoreduplikace DNA a mobilizace rezerv, což jsou procesy podporující expanzi buněk během růstu ve tmě rostoucích rostlin (Humplík et al., 2017). Je ale také důležité zmínit, že účinek kyseliny abscisové (stimulační nebo inhibiční) je dán jednak jejím množstvím a také citlivostí rostliny k tomuto fytohormonu.

### 5.3 Vliv ABA na růst kořene

Z provedených růstových experimentů byla získána data o délce kořenů a následně vypočítáno procento inhibice růstu vlivem vzájemného působení ABA a světla.

Na základním médiu (bez přítomnosti exogenní ABA) světelné záření mírně stimulovalo růstu kořene cv. MM. Potvrdilo se tak, že růst kořene bývá vlivem světla často stimulován (Nemhauser and Chory, 2002). U mutantu *au<sup>w</sup>*, ale na červeném světle k prodlužování kořene nedocházelo. Na modrém světle byl stimulační efekt růstu pozorován. U cv. MM byla stimulace růstu kořene vlivem BL asi 21 %, u *au<sup>w</sup>* asi 14 %. Tato zjištění naznačují, že stimulační účinek BL i RL na růst kořene je pravděpodobně zprostředkován fytochromy.

Aplikovaná ABA inhibovala růst kořenů u obou genotypů cv. MM i *au<sup>w</sup>*. Ve tmě a na BL byla citlivost kořenů k ABA srovnatelná. Dále bylo pozorováno, že RL jak u kontrolního, tak mutantního genotypu mírně snižovalo citlivost k inhibičnímu účinku ABA. Zjištění, že kořeny mutantu *au<sup>w</sup>* a cv. MM reagovaly při všech světelných podmínkách k ABA podobně, naznačuje, že účinek světla na citlivost kořenů cv. MM a *au<sup>w</sup>* k ABA není pravděpodobně fytochromy zprostředkován.

Kořeny rostlin pěstovaných na základním médiu ve tmě byly u mutantu *yg-2* téměř o polovinu kratší než kořeny cv. Kokomo. Enzym hem oxygenáza, v němž má mutant *yg-2* defekt, je tak nejspíše zapojen v procesu prodlužování kořenů. Na BL došlo jak u kontrolního, tak mutantního genotypu k mírné stimulaci růstu kořene. U cv. Kokomo to bylo asi 15 %, u *yg-2* asi 20 %. Vliv BL na prodlužování kořene byl tedy u obou genotypů podobný. Z toho plyne závěr, že aktivované fytochromy pravděpodobně nezprostředkovávají stimulační účinek modrého světla na prodlužování kořenů rajčete.

Zároveň bylo pozorováno, že na rozdíl od BL, růst kořene cv. Kokomo i mutantu *yg-2* nebyl RL výrazně stimulován. Z výsledků je tedy zřejmé, že hem oxygenáza je pozitivně zapojena v růstu kořenů rajčete, ovšem nezávisle a světelných podmínkách.

Po aplikaci exogenní ABA byla zjištěna následující fakta. ABA inhibovala růst kořenů cv. Kokomo, a to za všech světelných podmínek. Současně bylo zřejmé, že RL, nikoliv BL, inhibiční účinek ABA na růst kořenů mírně snižovalo. Naopak, u mutantu *yg-2* bylo pozorováno, že ve tmě neměla ABA na růst kořenů žádný efekt. Naproti tomu na červeném a modrém světle byl růst kořene *yg-2* vlivem ABA stimulován. Bylo tedy zřejmé, že za všech testovaných světelných podmínek byly kořeny mutantu *yg-2* méně citlivé k inhibičnímu účinku ABA. Je tak patrné, že funkční hem oxygenáza zvyšuje nezávisle na světelných podmínkách citlivost kořenů k inhibičním účinkům ABA. Hem oxygenáza se pravděpodobně pozitivně podílí na zvýšení citlivosti kořenů k ABA anebo na zvýšení biosyntézy ABA.

V našich experimentech bylo zjištěno, že světlo inhibovalo klíčení semen a prodlužování hypokotylů rajčete. Růst kořene byl působením světla naopak stimulován. Hladina endogenní ABA v kořenech se mohla vlivem její snížené syntézy nebo zvýšené degradace snižovat. Růst kořenů je stimulován především prostřednictvím signálů z nadzemní části rostliny, které reagují na světelné podněty. Osvětlení nadzemní části rostliny může vést k aktivaci fytochromů a dalších světelných receptorů, což následně stimuluje růst primárního kořene (Stafen et al., 2022).

Světelné záření přispívá k prodlužování kořene také skrze auxinovou signální dráhu, kdy osvětlení nadzemní části rostliny aktivuje syntézu auxinů v mladých listech, které jsou následně transportovány do kořenů, kde podporují vývoj primárního a postranního kořene (Stafen et al., 2022; Yun et al., 2023).

## 6 Závěr

Tato bakalářská práce se zabývá interakcí mezi světlem a kyselinou abscisovou (ABA). Experimentálním cílem předložené práce bylo zkoumání vlivu různých světelných podmínek na klíčení semen a růst semenáčků k exogenně aplikované ABA. Všechny experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro*. Jednotlivé experimenty byly provedeny na mutantech rajčete *Solanum lycopersicum* L. s poruchou v biosyntéze fytochromového chromoforu a k nim odpovídajícím kultivarům. Konkrétně byl zvolen mutant *aurea* (odvozen od cv. Money Maker) a mutant *yellow-green 2* (odvozen od cv. Kokomo).

Experimenty bylo zjištěno, že světlo má na klíčení semen rajčete inhibiční vliv pouze u cv. MM. P $\Phi$ B syntáza a následně fytochromový chromofor se tak pravděpodobně účastní redukce klíčivosti semen na rozdíl od hem oxygenázy, která klíčivost semen neovlivnila. Inhibiční účinek mělo světlo také na růstu hypokotylů, kde se potvrdilo, že redukce prodlužování hypokotylů je fytochromy zprostředkována. Na růst kořenů rajčete mělo světelné záření naopak stimulační vliv, který byl rovněž zprostředkován fytochromy. Současně bylo pozorováno, že světlo v interakci s aplikovanou ABA ovlivňuje růstové reakce semen a semenáčků. Analýzou mutantů *au<sup>w</sup>* a *yg-2* bylo zjištěno, že vliv světla na citlivost klíčících semen *au<sup>w</sup>* k aplikované ABA patrně P $\Phi$ B syntázou zprostředkován není. Naopak necitlivost semen *yg-2* k ABA byla způsobena deficiencí v hem oxygenáze, a to bez ohledu na světelné podmínky. Dále bylo zjištěno, že fytochromy zprostředkovávají vliv světla na citlivost hypokotylů rajčete k ABA a že zvýšení této citlivosti k inhibičním účinkům ABA vlivem světla je dáno fytochromy. Dále bylo pozorováno, že enzym hem oxygenáza se pravděpodobně pozitivně podílí na zvyšování citlivosti kořenů k ABA anebo na zvýšení biosyntézy ABA. U mutantu *au<sup>w</sup>* a cv. MM nebyl pozorován rozdíl v citlivosti růstu kořene k exogenní ABA. Lze tak předpokládat, že enzym P $\Phi$ B syntáza a následný fytochromový chromofor by nemusel zprostředkovávat účinek světla na citlivost kořenů k ABA.

Získané výsledky tak naznačují, že světlo může ovlivňovat signalizaci ABA nebo její biosyntézu. Tato domněnka by se dala rovněž prokázat studiem hladiny endogenní ABA nebo zkoumáním exprese genů receptorů ABA. Z celkového studia dané problematiky je patrné, že interakce mezi světlem a kyselinou abscisovou jsou velmi složité a k jejich pochopení jsou potřeba další studie a experimenty.

## 7 Literatura

- Aihara Y, Tabata R, Suzuki T, Shimazaki K, Nagatani A.** (2008) Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology* 56 (3): 364–75.
- Appenroth KJ, Lenk G, Goldau L, Sharma R.** (2006) Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant, Cell and Environment* 29 (4): 701-709.
- Arsovski AA, Galstyan A, Guseman JM, Nemhauser JL.** (2012) Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 10: e0147.
- Bewley JD.** (1997) Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9 (7): 1055–1066.
- Bhagat PK, Verma D, Sharma D, Sinha AK.** (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 BB, Gruissem W, Jones RL.** (2015) *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd ed. John Wiley & Sons. ISBN 9780470714218
- Chen, H, Zhang, J, Neff, MM, Hong, SW, Zhang, H.** (2008) Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (11): 4495–5000.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S.** (2015) Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, 56 (3): 401–413.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR.** (2010) Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61: 651–679.
- Debeaujon I, Koornneef M.** (2000) Gibberellin requirement for Arabidopsis thaliana seed germination is determined both by testa characteristics and embryonic ABA. *Plant Physiology*, 122 (2): 415–424.
- Fantini E, Sulli M, Zhang L, Aprea G, Jiménez-Gómez JM, 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 VK.** (2002) The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*, 214 (5): 675–682.

- Feng S, Martinez C, Gusmaroli G, Wang Y, Zhou J, Wang F, Chen L, Yu L, Iglesias-Pedraz JM, Kircher S, Schäfer E, Fu X, Fan LM, Deng XW.** (2008) Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature*, 451 (7177): 475–479.
- Fischer L, Pavlová L.** (2011) *Růst a vývoj rostlin*. Praha: Karolinum. (1.vydání) ISBN 9788024619132
- Ge W, Bu H, Wang X, Xia Y, Martinez SA, Wang X, Qi W, Liu K, Du G.** (2020) Changes in endogenous hormone contents during seed germination of *Anemone rivularis* var. *floreminore*. *Global Ecology and Conservation* 24: e01200.
- Gupta N, Prasad VB, Chattopadhyay S.** (2014b) 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.
- Gupta SK, Sharma S, Santisree P, Kilambi HV, Appenroth K, Sreelakshmi Y, Sharma R.** (2014a) Complex and shifting interactions of phytochromes regulate fruit development in tomato. *Plant, Cell and Environment*, 37 (7): 1688–1702.
- Humplík JF, Bergougnoux V, Jandová M, Šimura J, Pěňčík A, Tomanec O, Rolčík J, Novák O, Fellner M.** (2015) Endogenous abscisic acid promotes hypocotyl growth and affects endoreduplication during dark-induced growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS One*, 10 (2): e0117793.
- Humplík JF, Bergougnoux V, Van Volkenburgh E.** (2017) To stimulate or inhibit? That is the question for the function of abscisic acid. *Trends in Plant Science*, 22 (10): 830–841.
- Ito S, Song YH, Imaizumi T.** (2012) LOV domain-containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in *Arabidopsis*. *Molecular Plant*, 5 (3): 573–582.
- Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S.** (2013) *The Molecular Life of Plants*. West Sussex, UK: John Wiley & Sons, Ltd. ISBN 9780470870112
- Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H.** (2002) Seed dormancy and germination. *Current Opinion in Plant Biology*, 5 (1): 33–36.
- Koornneef M, Kerckhoffs L. H. J, Van Tuinen A, Koornn M.** (1985) Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant, Cell and Environment*, 20: 746–751.



- Kupka I.** (2007) The root-plant ratio changes in the first growing periods of wild cherry (*Prunus avium* L.) plantations. *Journal of Forest Science*, 53 (3): 113–118.
- Lau OS, Deng XW.** (2010) Plant hormone signaling lightens up: integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (5): 571–577.
- 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: 9780128115626
- Liang S, Gao X, Wang Y, Zhang H, Yin K, Chen S, Zhang M, Zhao R.** (2020) Phytochrome-interacting factors regulate seedling growth through ABA signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 526 (4): 1100–1105.
- Lin C.** (2000) Photoreceptors and regulation of flowering time. *Plant Physiology*, 123 (1): 39–50.
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C.** (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16 (12): 684–691.
- Liu R, Xu YH, Jiang SC, Lu K, Lu YF, Feng XJ, Wu Z, Liang S, Yu YT, Wang XF, Zhang DP.** (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.
- Luján-Soto E, Dinkova TD.** (2021) Time to wake up: epigenetic and small-RNA-mediated regulation during seed germination. *Plants*, 10: 236.
- Nemhauser J, Chory J.** (2002) Photomorphogenesis. *The Arabidopsis book* 1: e0054.
- Ng LM, Melcher K, Teh BT, Xu HE.** (2014) Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35 (5): 567–584.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun TP, Kamiya Y, Choi G.** (2007) PIL5, a phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the GAI and RGA promoters in Arabidopsis seeds. *Plant Cell*, 19 (4): 1192–1208.
- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G.** (2006) Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 47 (1): 124–139.

- Peng J, Wang M, Wang X, Qi L, Guo C, Li H, Li C, Yan Y, Zhou Y, Terzaghi W, Li Z, Song CP, 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.
- Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turecková V, Nová O, Petrivalsky M, Fellner M** (2012) Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* 110 (4): 767-776.
- Ponnu J, Hoecker U.** (2022) Signaling mechanisms by Arabidopsis cryptochromes. *Frontiers in Plant Science*, 13: 844714.
- Procházka S, Macháčková I, Krehule J, Šebánek J. a kolektiv.** (1998) *Fyziologie rostlin*. Praha: Academia. ISBN 8020005862
- Qiu X, Sun G, Liu F, Hu W.** (2023) Functions of plant phytochrome signaling pathways in adaptation to diverse stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 24 (17): 13201.
- Sano N, Marion-Poll A.** (2021) ABA Metabolism and homeostasis in seed dormancy and germination. *International Journal of Molecular Sciences*, 22 (10): 5069.
- 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.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, MarionPoll A, Sun TP, Koshiha T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E.** (2006) Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*, 48 (3): 354–366.
- Seo M, Nambara E, Choi G, Yamaguchi S.** (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* 69 (4): 463–472.
- Šetlík I, Seidlová F, Šantrůček J.** (2015) *Fyziologie rostlin* [online] [navštíveno 20.11.2023]. Dostupné z: <http://web.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html>
- Smith AM, Coupland G, Dolan L, Harberd N, Jones J, Martin C, Sablowski R, Amey A.** (2010) *Plant Biology*. New York, N.Y.: Garland Science. ISBN 9780815340256
- Stafen CF, Kleine-Vehn J, Maraschin FDS.** (2022) Signaling events for photomorphogenic root development. *Trends in Plant Science*, 27 (12): 1266–1282.

- 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.
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM.** (2008) In vivo phosphorylation site mapping and functional characterization of Arabidopsis phototropin 1. *Molecular Plant*, 1 (1): 178–194.
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A.** (2015) *Plant Physiology and Development*, 6th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates. ISBN 9781605352558
- Terry MJ, Kendrick RE.** (1996) The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271 (35): 21681–21686.
- Terry MJ.** (1997) Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant, Cell and Environment*, 20 (6): 740–745.
- Tripathi S, Hoang QTN, Han YJ, Kim JI.** (2019) Regulation of photomorphogenic development by plant phytochromes. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (24): 6165.
- Weatherwax SC, Ong MS, Degenhardt J, Bray EA, Tobin EM.** (1996) The interaction of light in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology*, 111 (2): 363–370.
- Weiner JJ, Peterson FC, Volkman BF, Cutler SR.** (2010) Structural and functional insights into core ABA signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 13 (5): 495–502.
- Williams SA, Weatherwax SC, Bray EA, Tobin EM.** (1994) NPR genes, which are negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* L. G-3, can also be positively regulated by abscisic acid. *Plant Physiology*, 105 (3): 949–954.
- Yang Z, Liu B, Su J, Liao J, Lin C, Oka Y.** (2017) Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 93 (1): 112–127.
- Yun F, Liu H, Deng Y, Hou X, Liao W.** (2023) The role of light-regulated auxin signaling in root development. *International Journal of Molecular Sciences* 24 (6): 5253.