



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Zapojení světelné signalizace v odpovědích rostlin na
osmotický stres**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Daniela Jurečková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora: Daniela Jurečková
Název práce: Zapojení světelné signalizace v odpovědích rostlin na osmotický stres
Typ práce: Bakalářská
Pracoviště: Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce: Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce: 2022

Abstrakt:

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje toleranci rostlin k osmotickému stresu a pokud ano, zda se tak může dít prostřednictvím specifických receptorů pro modré světlo. Ke studiu byl použit genetický přístup, který spočíval ve fyziologické analýze fotomorfogenních mutantů rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum L.*). V experimentech byl použit mutant *7B-1* s defektem ve fototropinové světelné signalizaci a mutanti *cry1-1* a *cry1-2* s defekty ve fotoreceptoru kryptochromu 1. V podmínkách *in vitro* byly studovány růstové reakce těchto mutantů k osmotickému stresu, který byl indukován manitolem. Na základě svých výsledků mohu říct, že se mi podařilo prokázat, že během růstu rostliny dochází k interakcím mezi světlem a abiotickým stresem. Bylo zjištěno, že červené světlo zesiluje odpověď hypokotylů rajčete k osmotickému stresu a je možno se domnívat, že tento účinek červeného světla je zprostředkován funkčním produktem genu *7B-1*. U mutantu *cry1-1* se nepodařilo prokázat jasná tolerance na abiotický stres, jelikož naměřené inhibice se příliš nelišily od výsledků kultivaru Money Maker, od kterého byl *cry1-1* odvozen. V případě mutantu *cry1-2* výsledky naznačují možné zapojení genu *CRY1* v odpovědích hypokotylů rajčete na abiotický stres. Také bylo prokázáno, že kořeny všech genotypů vykazovaly k manitolu nižší citlivost než hypokotyly.

Klíčová slova: *7B-1*, *cry1-1*, *cry1-2*, hypokotyl, kořen, mannitol, růst, rajče, světlo
Počet stran: 73
Jazyk: Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Daniela Jurečková

Title of thesis: Involvement of light signaling in plant responses to osmotic stress

Type of thesis: Bachelor

Department: Laboratory of Growth Regulators

Supervisor: Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

The year of presentation: 2022

Abstract:

The aim of the bachelor's thesis was to find out whether light affects the tolerance of plants to osmotic stress and, if so, whether this can happen through specific receptors for blue light. A genetic approach was used for the study, which consisted in the physiological analysis of photomorphogenic mutants of edible tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The experiments used mutant *7B-1* with a defect in phototropin light signaling and mutants *cry1-1* and *cry1-2* with defects in the cryptochrome 1 photoreceptor. The growth responses of these mutants to osmotic stress induced by mannitol were studied in vitro. Based on my results, I can say that I have been able to demonstrate that there are interactions between light and abiotic stress during plant growth. Red light was found to enhance the response of tomato hypocotyls to osmotic stress, and it is hypothesized that this effect of red light is mediated by a functional product of the *7B-1* gene. The *cry1-1* mutant failed to demonstrate a clear tolerance to abiotic stress, as the measured inhibitions did not differ much from the results of the cultivar Money Maker, from which *cry1-1* was derived. In the case of the *cry1-2* mutant, the results suggest possible involvement of the *CRY1* gene in the responses of tomato hypocotyls to abiotic stress. It was also shown that roots of all genotypes showed lower sensitivity to mannitol than hypocotyls.

Keywords: *7B-1*, *cry1-1*, *cry1-2*, hypocotyl, light, mannitol, root, tomato, growth

Number of pages: 73

Language: Czech

Tímto prohlašuji, že jsem zde předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

.....

Chtěla bych tímto velmi poděkovat vedoucímu své bakalářské práce panu profesorovi Martinu Fellnerovi za jeho trpělivost, rady a čas, který mi věnoval. Také bych chtěla poděkovat jeho týmu molekulární fyziologie rostlin, za pomoc během experimentální části, rady a za přátelskou atmosféru.

Seznam zkratek a symbolů

ABA	abscisic acid (kyselina abscisová)
ABI3-5	abscisic acid intensivite 3-5
AHG1, AHG2	ABA-hypersensitive germination gene 1,2
ARF	auxin response factor
B	blue light (modré světlo)
bHLH	basic helix-loop-helix
CBF	C-repeat binding factor
CIBs	cry-Interacting BHLHs
CK1.3, CK1.4	casein kinase 1.3, casein kinase 1.4
COP-1	constitutive photomorphogenic 1
CPD	cyklobutenpyrimidinové dimery
cry1-3	kryptochrom 1-3
CYP707A2	cytochrome P450, family 707, subfamily A, polypeptide 2
CHUP1	Chloroplast Unusual Positioning
D	dark (tma)
DAG1	dystroglycan 1
DOG1	gen pro zpoždění klíčení
DXP	1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát
FAD	flavinadenindinukleotid
GA	gibberellic acid (kyselina gibberelová)
GA3ox1,2	giberelin-3-oxidáza 1,2
GGPP	geranylgeranylpyrofosfát
GH3	glycoside hydrolase 3
HFR1	transkripční faktor
HY5	elongated hypocotyl 5
IAA	indole-3 acetic acid (kyselina indol-3octová)
IPP	isopententylpyrofosfát
MES	2-ethansulfanová kyselina
MS médium	Murashige a Skoog médium
NADPH	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
NCED6	9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza 6
NPH3	non-phototropic hypocotyl 3

phyA-E	fytochromy A-E
PIF	fytochrom interagující faktor
phot1, phot2	fototropin 1, fototropiny 2
PKS	fytochromový kinázový substrát
PP2C	protein phosphatase 2C
P_R	fytochrom pro vnímání červeného světla (neaktivní)
P_{FR}	fytochrom pro vnímání dalekého červeného světla (aktivní)
PSII	fotosystém II
R/FR	red light, far red light (červené světlo, dlouhovlnné červené světlo)
ROS	reaktivní formy kyslíku
RPT2	root phototropism gene 2
RVE1	resolvin E1
SCaBP8	SOS3-like-calcium-binding protein 8
UVR8	UV resistance locus 8
W	white light (bílé světlo)

Obsah

Seznam zkratk a symbolů	5
1. Úvod a cíle práce	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1. Rostliny a světlo.....	9
2.2. Fytochromy	14
2.3. Kryptochromy	17
2.4. Fototropiny	20
2.5. Dormance a klíčení semen	22
2.6. Abiotický stres	28
2.7. Zapojení světla v reakci rostlin ke stresům	32
3. Experimentální část	35
3.1. Příprava MS média.....	35
3.2. Klíčení a kultivace semen	36
3.3. Přenos semen.....	37
3.4. Vyhodnocení experimentu	38
4. Výsledky	39
4.1. Vliv manitolu na růst mutanta <i>7B-1</i> a kultivaru Rutgers	39
4.2. Vliv manitolu na růst mutanta <i>cry1-1</i> a kultivaru Money Maker	44
4.3. Vliv manitolu na růst mutanta <i>cry1-2</i> a kultivaru Money Maker	50
5. Diskuse	55
6. Závěr	57
7. Seznam použité literatury	58

1. Úvod a cíle práce

Hlavními tématy, kterými jsem se v rámci teoretické části bakalářské práce zabývala, jsou reakce rostlin na světlo, fotoreceptory, klíčení a dormance semen a také abiotický stres.

V experimentální části této bakalářské práce byl použit genetický přístup, který spočívá v porovnávání odolnosti k osmotickému stresu u rostliny rajčete jedlého kultivaru Rutgers (dále WT), vůči mutantovi rajčete *7B-1*. U tohoto mutantu bylo zjištěno, že je oproti WT více tolerantní k osmotickému stresu, a navíc je méně citlivý ke světlem indukované inhibici růstu hypokotylu, má vyšší hladinu endogenní ABA a nižší hladinu GA (Fellner and Sawhney, 2001). Dále byl porovnáván kultivar Money Maker (dále cv. MM) s mutanty *cry1-1* a *cry 1-2*, u nichž byla potvrzena porucha v receptoru kryptochromu cry1 pro vnímání modrého světla. Rostliny proto vykazují typický fenotyp, tzn. rostliny jsou vytáhlé, bledé a křehčí.

Semena rajčete kultivarů Rutgers a Money Maker byla společně se semeny porovnávaných mutantů (*7B-1*, *cry1-1*, *cry1-2*) vyseta na médium, které obsahovalo mannitol o různých koncentracích (0-150 mM). Manitol je bílá, krystalická látka, která se po chemické stránce řadí mezi alkoholické cukry a používá se v potravinářství jako stabilizátor a ve zdravotnictví jako doplněk stravy pro diabetiky. Manitol způsobuje inhibici klíčení semen, tuto inhibici také podporuje modrá složka světla (B), na rozdíl od toho červené světlo (R) inhibiční účinky na semena během klíčení nemá.

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje toleranci rostlin k osmotickému stresu, a pokud ano, zda se tak může dít prostřednictvím specifického fotoreceptoru pro modré světlo kryptochromu cry1.

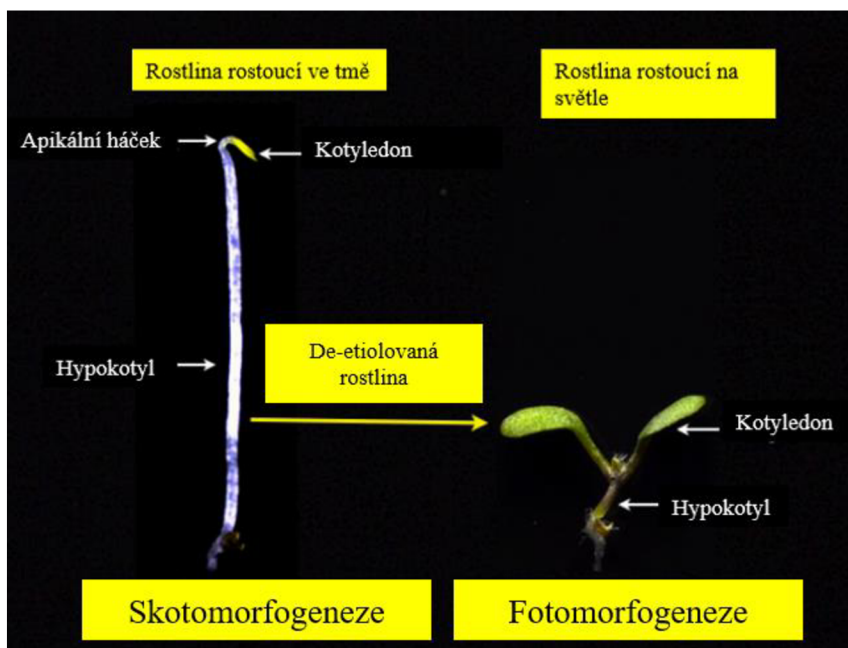
Experimenty byly prováděny v rámci pracovní skupiny molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů UP v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

2. Současný stav řešené problematiky

2.1. Rostliny a světlo

Jelikož rostliny řadíme mezi fotoautotrofní organismy, světlo hraje v jejich vývoji klíčovou úlohu. Pro rostliny je světlo zdrojem energie pro fotosyntézu a růst. Světelná energie neslouží pouze pro účely fotosyntézy, ale je spouštěčem celé řady signálních drah a informací pro morfogenezi, ontogenezi a fyziologii rostliny (Chen et al. 2004). Světlo tedy ovlivňuje děje jako klíčení semen, zrání plodů a spouští senescenci (Taiz et al. 2015). Souhrnně se tyto děje nazývají fotomorfogeneze (Kendrick and Kronenberg, 1994). Aby mohly rostliny dostatečně vnímat různé složky světla, vyvinuly se u nich specializované fotoreceptory, které slouží pro vnímání různých vlnových délek slunečního záření (Chen et al., 2004, Somers and Fujiwara, 2009). Fotoreceptory ovlivňují růst a vývoj rostliny během jejich celého životního cyklu.

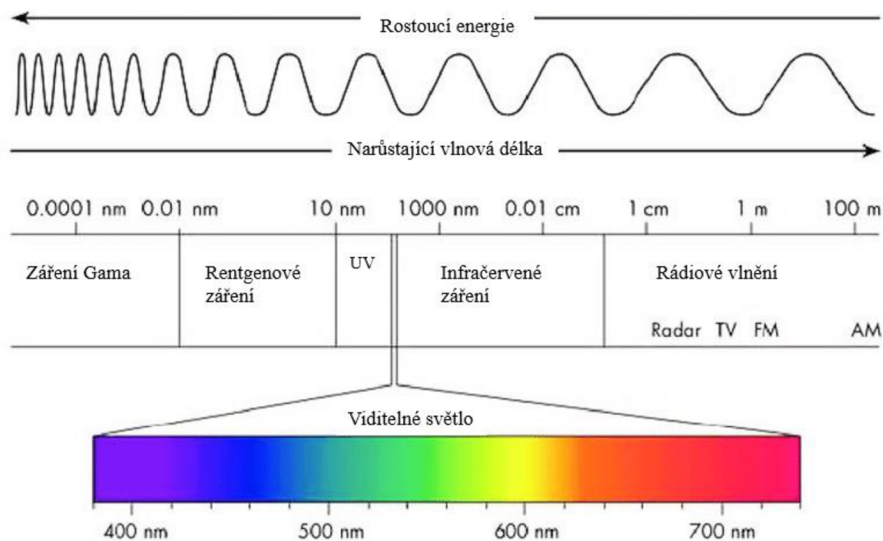
Rostliny si během svého života projdou dvěma vývojovými programy: skotomorfogenezí, která probíhá za nepřítomnosti světla a fotomorfogenezí, která probíhá na světle. V přírodě dochází k přechodu mezi etiolovaným a de-etiolovaným vývojem při proniknutí semenáčku, který byl pod zemí, na světlo (Frankhauser and Chory, 1997). Rostliny, které rostou ve tmě nazýváme etiolované. Tyto rostliny mají typický fenotyp, jako delší hypokotyl, apikální háčky, uzavřené a nažloutlé dělohy. Oproti tomu rostliny, které rostou na světle jsou charakteristické svými krátkými hypokotyly, otevřenými a zelenými děložními lístky (Obr. 1). Rostliny, které rostly ve tmě a pak byly přeneseny na světlo jsou, tzv. de-etiolované (Taiz et al., 2015).



Obrázek 1: Typický fenotyp, pro rostliny, jejichž vývoj probíhal ve tmě (vlevo) a na světle (vpravo) (převzato a upraveno podle Xu, 2014).

Průběh fotomorfofogenetické reakce můžeme popsat v následujících krocích. Nejprve rostlina přijme světelnou energii ve formě fotonů pomocí pigmentů, které jsou součástí fotoreceptorů (Jones et al., 2013). Poté dochází k transdukci signálu celou rostlinou a energie elektromagnetická se mění v biologický signál. Poté rostlina reaguje na přijatý signál z vnějšího okolí, a to velice často například pomocí hormonálních a steroidních látek, které mohou zajistit i adaptaci na případný stresor (chlad, vysoká teplota atd.).

Viditelné světlo se na první pohled jeví jako tzv. bílé světlo (W), to je ale složeno z celého barevného spektra, přičemž rostliny vykazují největší citlivost na světlo modré (B) o vlnové délce 430–500 nm a na červené světlo (R), jehož vlnová délka se pohybuje od 625 nm do 750 nm (Obr. 2). Rostliny tedy díky svým pigmentům absorbují světlo modré a červené a tím pádem dochází k odrazu zeleného světla, a proto se nám rostliny jeví jako zelené.



Obrázek 2: Elektromagnetické spektrum viditelného světla (převzato a upraveno podle Lumenistics, 2012, autor Szantoi Zoltan)

Znalosti a velký vývoj v oblasti osvětlení a LED technologií, umožnil využití světla o určitých vlnových délkách ke studiu konkrétních reakcí rostlin (Kozai et al. 2016), čehož jsem i já využila v rámci experimentální části bakalářské práce, kdy jsem klíčící semena uchovávala v kultivačních komorách, kde byly uměle nastaveny různé světelné podmínky.

Důležitým rostlinným modelem, u kterého jsou zkoumány reakce na světlo, je huseníček rolní *Arabidopsis thaliana* (Chen et al. 2004, Quail, 2002, Somers and Fujiwara, 2009). Rostliny vnímají světlo pomocí tzv. fotoreceptorů. Konkrétně u *Arabidopsis thaliana* byly objeveny 4 skupiny fotoreceptorů: fytochromy (phyA-phyE), kryptochromy (cry1, cry2), fototropiny (phot1, phot2) a fotoreceptory skupiny nazývané zeitlup (ZTL, FKF1, LKP2). U *Arabidopsis thaliana* se nachází i kryptochrom cry3 (také cry-DASH), jehož funkce není dosud zcela objasněna. Není jisté, zda se jedná o fotosenzorický receptor, jisté ale je, že se účastní při reparačních mechanismech DNA (Pokorny et al., 2008).

Fytochromy mají absorpční maximum v červené oblasti spektra (Franklin and Quail, 2010). Kryptochromy a fototropiny (v případě *Arabidopsis thaliana* i zeitlupy) vnímají modrou a UV-A oblast vlnového spektra (Christie, 2007, Demarsy and Frankhauser, 2009, Lin and Shalitin, 2003, Somers and Fujirawa, 2009). Receptorem pro vnímání UV-B záření je protein UVR8. Tento receptor obsahuje ve své struktuře tryptofanové zbytky, které působí jako vnitřní chromofory. Signální dráha receptoru UVR8 začíná takto: UVR8 zachytí světelné záření a disociuje ze své neaktivní homodimerní konfigurace (Rizzini et al., 2011).

Poté se začne hromadit v jádře a interaguje s COP1 (Cloix et al., 2012), proteinem WD40/RING, který v tmavých světelných podmínkách nebo v podmínkách, kde nedochází k UV záření cílí na HY5 pro degradaci, která je závislá na proteazomech (Groisman et al., 2003).

UV záření pro rostliny představuje velký stres, protože UV záření vyvolává těžké poškození DNA (Hideg et al., 2013). UV záření lze dále rozdělit podle vlnových délek: UV-A (315-400 nm), UV-B (280-315 nm) a UV-C (200-280 nm). Je známo, že nízké dávky UV-B způsobují neškodlivý stres, zatímco extrémní záření vede k apoptóze (Hideg et al., 2013). UV záření zasahuje především PSII a působí zde velké škody (Takahashi et al., 2010). UV záření dále způsobuje fotopoškození DNA, kdy dochází ke dvouřetězcovým zlomům a tvorbě kovalentních vazeb mezi sousedními pyrimidiny a tím vznikají cyklobutenpyrimidinové dimery (CPD), tento sled událostí vede k narušení průběhu a inhibici transkripce a replikace genetické informace (Britt, 2004). K opravě těchto dimerů slouží enzymy ze skupiny fotolyáz, které navracejí poškozenou DNA do její nativní formy (Britt, 2004). Exprese genů pro CPD fotolyázy je řízena modrým světlem, v závislosti na kryptochromech, dále je řízena světlem červeným v závislosti na fytochromu B (phyB), UV-A záření, které je závislé na fytochromu A (phyA) a UV-B v závislosti na UVR8. Dráha UVR8-COP1-HY5 je hlavní signální kaskádou, která je zapojená do tolerance vůči UV záření. Kryptochrom a UVR8 spolu interagují a tím regulují rostlinný růst pod UV světlem (Rai et al., 2020). Bylo dokázáno, že kryptochromy ovlivňují aktivitu fotoreceptorů UVR8 a tím způsobují, že rostliny jsou odolnější vůči působení UV záření (Tissot and Ulm, 2020). Rostliny se vypořádávají s poškozením vlivem UV, tak, že ve svých buňkách shromažďují chemické sloučeniny, které je před UV zářením chrání. Jedná se konkrétně o fenoly, které můžeme nalézt v epidermis listů (Emiliani et al., 2013). Jaké sekundární metabolity se začnou hromadit závisí na typu UV záření a rostlinném druhu. Jedná se především o flavonoidy, stilbeny, sinapolyestery a estrey cinnamátu. Biosyntéza flavonoidů je regulována produkcí flavonolových glykosidů rodiny transkripčních faktorů, které jsou spuštěny zářením UV-B (Brown and Jenkins, 2008). Jejich princip ochrany před UV zářením spočívá v jejich schopnosti zeslabit toto záření filtrací. Jejich antioxidační vlastnosti umožňují také zachycovat volné radikály a tím zabraňovat tvorbě ROS.

Dalším obranným mechanismem, který se spouští, je-li rostlina vystavena UV záření, je exprese genů, které jsou zapojeny do ochrany před oxidativním stresem. Cílem je snížit hladinu ROS (Müller-Xing et al., 2014). Rostliny si v rámci evoluce vyvinuly několik mechanismů k obraně PSII (Takashi and Badger, 2011). Například, pokud jsou rostliny vystaveny přímému slunečnímu svítu, tak pohybují listy (heliotropismus), dochází také k seskupení chloroplastů na buněčných stěnách paralelně ve směru světla, tím rostlina zabrání nadměrné absorpci záření, při tomto ději hraje velkou roli PSII spolu s proteinem nazývaným Chloroplast Unusual Positioning (CHUP1) (Oikawa et al., 2003).

Fotoreceptory jsou po chemické stránce chromoproteiny složené z apoproteinu, který je vázán na různé chromofory (Rockwell et al., 2006). To, jaké vlnové délky bude fotoreceptor zachytávat, je dáno chemickými vlastnostmi chromoforu a apoproteinu. I když členové jedné rodiny fotoreceptorů mají podobné absorpční vlastnosti, jsou zde rozdíly pro vnímání nízkých a vysokých hladin záření. Tyto rozdíly, jsou dány biochemickými odlišnostmi ve stavbě molekul (Rockwell et al., 2006). Například phyA, cry2 a phot1 fungují při slabé intenzitě, ale phyB, cry1 a phot2 reagují lépe na vysoké intenzity záření (Sakai et al., 2001). V praxi tento jev můžeme pozorovat u etiolovaných sazenic, které obsahují vysoké hladiny phyA a phot1, díky čemuž dokážou vnímat jen velmi malé množství světla ve chvíli, kdy sazenice roste směrem horním vrstvám půdy (Rockwell et al., 2006).

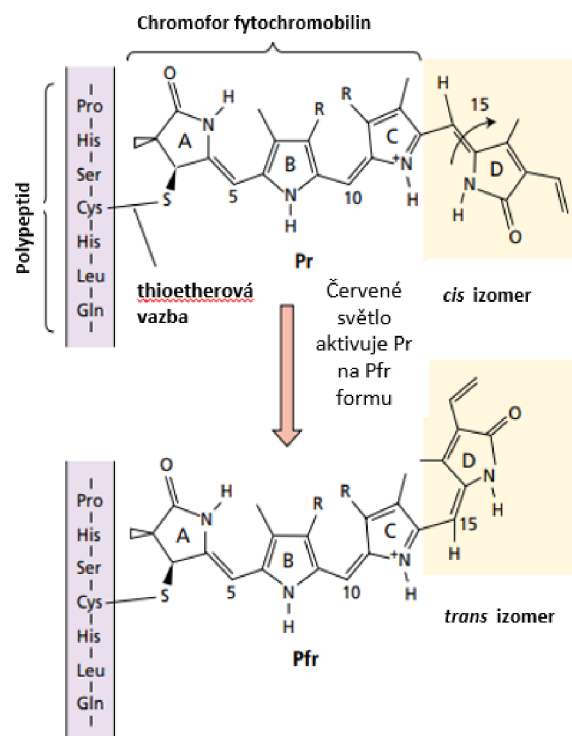
Světelné odezvy můžeme rozlišit dle závislosti potřebného světla a na tom, zda tato odezva potřebuje nepřetržité ozařování, případně, zda ji spouští světelné pulzy (Kendrick and Kronenberg, 1994). Tzv. odezvy nízké fluence (VLFR) jsou během rekce aktivovány již při 100 pmol.m^{-2} . Odezvy nízkého ozáření (LFR) se vyskytují v rozmezí $10\text{-}1000 \text{ }\mu\text{mol.m}^{-2}$. Na rozdíl od toho odezvy vysokého záření (HIR), vyžadují nepřetržité světlo s celkovým prouděním typicky přesahujícím 10 mmol.m^{-2} . Toto rozdělení bylo užitečné pro charakterizaci různých typů reakcí, které byly zprostředkovány fytochromem (Rockwell et al., 2006).

To, jak bude rostlina reagovat na světlo se liší podle světelného prostředí, ve kterém se rostlina nachází, genotypu, ročním období, pěstitelském postupu atd. (Kozai, 2016). Intenzita a kvalita světla se neustále v přírodě mění, a to díky povětrnostním podmínkám (Casal, 2013). Vnímání kvality a množství světla je pro přežití rostliny zcela zásadní. A to nejenom během nepříznivých povětrnostních podmínek, ale také aby dokázaly vhodně reagovat na biotické a abiotické stresory (Casal, 2013).

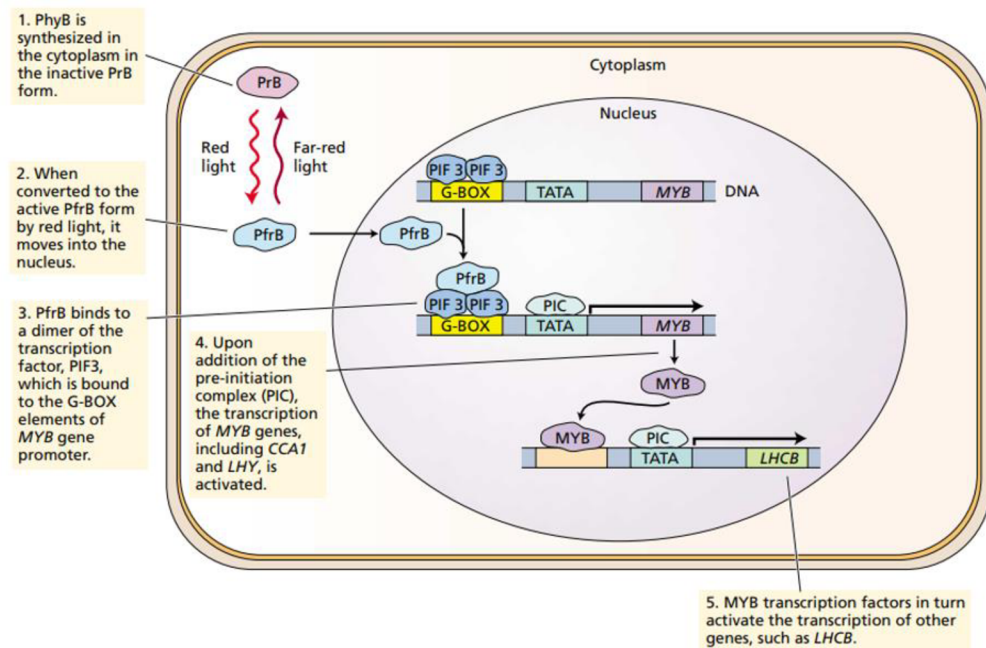
2.2. Fytochromy

Fotoreceptory, které jsou citlivé pro červené světlo, nazýváme fytochromy (phy) (Bae and Choi, 2008). Fytochromy jsou po chemické stránce chromoproteiny, kdy je apoprotein (120 kDa) připojen k chromoforu, který má otevřený řetězec tetrapyrrollu a společně tvoří holoprotein.

Když dojde k expozici červeným světlem, fytochromy mění alostericky konformaci z neaktivní formy Pr (konfigurace *trans*) na aktivní formu Pfr (konfigurace *cis*) (Obr. 3). Neaktivní formu Pr nalezneme v cytosolu, zatímco aktivní forma Pfr se u všech fytochromů nachází v jádře (Klose et al., 2020). Pfr v cytosolu reguluje translaci mRNA (Paik et al., 2019). V jádře však fytochromy ve formě Pfr interagují s více látkami, aby mohly modulovat transkripci následných cílových genů (Obr. 4) a také, aby mohly zprostředkovávat světelné reakce (Quail, 2010).



Obrázek 3: aktivace fytochromu červeným světlem z neaktivní Pr formy (*cis* izomer) na formu aktivní (*trans* izomer) (převzato z a upraveno podle Taiz and Zeiger, 2002).



Obrázek 4: Přímá regulace genové exprese pomocí phyB (Quail, 2010). Fytochrom B (phyB) je syntetizován v cytoplasmě, jako neaktivní PrB forma. Ve chvíli, kdy dojde k jeho aktivaci červeným světlem, přesune se jako PfrB do jádra, kde se naváže na dimer PIF3 (transkripční faktor reagující s G-boxem) tak, že PIF3 reaguje s C-terminálním koncem phyB a díky tomu se vytvoří Pfr/PIF3 komplex. Poté PIC iniciuje transkripci MYB genů (CCA1, LHY), takto aktivovaný transkripční faktor MYB dále aktivuje transkripci LHCb genu (převzato z Taiz and Zeiger, 2002).

Jedním s klíčových partnerů, se kterými fytochromy ve formě Pfr interagují, jsou fytochromové interakční faktory (PIF), které jsou hlavním regulátorem pro přechod rostlin ze skotomorfogeneze k fotomorfogenezi (Leivar and Quail, 2011). PIF jsou kódovány podskupinou superrodiny základních helix-loop-helix (bHLH) transkripčních faktorů. Hlavní funkcí PIF je negativní ovlivnění světelných reakcí, kdy potlačují fotomorfogenezi a udržují skotomorfogenezi semenáčků (Leivar and Quail, 2011; Leivar and Monte, 2014). Jsou-li fytochromy vystaveny světlu, iniciují přeměnu PIF pomocí fosforylace a degradaci v proteozomu vlivem ubikvitinace. Tím dojde k inhibici funkce PIF, to vyvolá transkripční přeprogramování, což má za následek fotomorfogenezi.

Nadměrná exprese PIF vede k hyposenzitivním fenotypům rostlin v reakci na světlo (Quail, 2010). Kromě toho, že ovlivňují fotomorfogenezi a skotomorfogenezi, regulují PIF i další dráhy, například zprostředkovávají metabolické signály cirkadiálním hodinám a hrají roli také v hormonální signalizaci a dalších reakcích (Paik et al., 2017). Při všech těchto úkonech interagují s dalšími rostlinnými signálními molekulami. Některé PIF reagují

odlišně, aby mohly regulovat různé fyziologické procesy, někdy reaguje pouze jeden PIF, někdy reagují dva a více. Mezi funkce PIF1 patří: inhibice klíčení semen, které je závislé na světle (Oh et al., 2014), regulace biosyntézy chlorofylu a vývoj plastidů. PIF2 (PIL1) interaguje s COP1 a phyB *in vivo* (Luo et al., 2014), přičemž COP1 podporuje degradaci PIF2 ve tmě, zatímco phyB stabilizuje PIF2 při styku se světlem. Velký rozdíl mezi ostatními PIF a PIF2 je ten, že PIF2 pozitivně reguluje de-etiolizaci sazenic, při reakci na modré, červené a dalece červené světlo. Dále také PIF2 interaguje s PIF1, PIF3, PIF4 a PIF5 a zabraňuje expresi výsledného genu PIF. PIF2 heterodimerizuje s HFR1, se kterým sdílí podobné vlastnosti a funkce a tím jako aditivum podporuje společně s HFR1 fotomorfogenezi.

PIF3 funguje jako negativní regulátor de-etiolizace semenáčků spolu s dalšími PIF, a to tak, že reguluje množství phyB (Leivar et al., 2008). Mezi další funkce PIF3 patří interakce s TOC1, čímž se optimalizuje časová regulace prodlužování hypokotylu (Soy et al., 2016). Dále PIF3 potlačuje biosyntézu chlorofylu a fotosyntézu (Stephenson et al., 2009). Také reguluje ethylenem indukované prodlužování hypokotylu na světle, a také moduluje toleranci mrazu negativní regulací exprese genů CBF (C-repeat binding factor) (Jiang et al., 2017).

PIF4 reguluje prodloužení hypokotylu v reakci na světlo, stín, denní podmínky a teplotu (Kumar et al., 2012). Děje se tak vazbou na promotorové sekvence a následnou aktivací exprese cílových genů, včetně regulačních genů zapojených do biosyntézy auxinu. Pokud je aktivace PIF4 trvalá, může dojít k fyziologické nerovnováze, způsobené hyperelongací hypokotylů. Aby se těmto jevům předešlo, využívají rostliny více regulačních mechanismů, včetně inaktivace transkripční aktivity PIF4. PIF5 reguluje podobné dráhy jako PIF4. PIF5 stejně jako PIF4 způsobují senescenci listů tím, že degradují ve tmě chlorofyl (Zhang et al., 2015). PIF5 ve spolupráci s PIF4 a PIF7 funguje jako důležitý regulátor vyhýbání se stínu u *Arabidopsis thaliana* (Li et al., 2013). PIF6 se nachází ve dvou variantách, a to α a β , přičemž forma β reguluje dormanci semen (Penfield et al., 2010). PIF7 působí jako negativní regulátor de-etiolace semenáčků pod červeným světlem (Leivar et al., 2008). PIF7 spolu s PIF3 a PIF4 působí aditivně tak, že podporuje prodlužování hypokotylu pod nepřetržitým červeným světlem, přičemž jsou potlačeny hladiny phyB. Dále reguluje také reakce vyhýbání se stínu, přímou kontrolou biosyntetických genů auxinu (Li et al., 2013).

Fytochromy bychom našly u všech suchozemských rostlin a většinou zelených řas, kromě chlorofytů (Li et al., 2015). Fytochromy byly zkoumány z důvodu jejich fotochemického působení a transdukci světelného signálu v rostlinách (Rockwell et al.,

2006). V případě vyšších rostlin je molekulární mechanismus signalizačního spojení fytochrom-PIF dobře prostudován, v případě nižších suchozemských rostlin teprve výzkum probíhá. Například u *M. polymorpha* byl objeven jediný gen *PIF* (Inoue et al., 2016). V případě krytosemenných rostlin rozlišujeme dva typy fytochromů, a to na světle labilní typ I a na světle stabilní typ II (Li et al., 2015).

Mezi jednotlivými rostlinnými druhy se počet fytochromů liší, zde uvedu pár příkladů. Jak už jsem napsala výše, u *Arabidopsis thaliana* můžeme nalézt celkem 5 fytochromů, které se označují jako phyA, phyB, phyC, phyD a phyE. V případě jednoděložných rostlin nacházíme pouze tři fytochromy phyA, phyB a phyC (Mathews and Sharrock, 1997). V kukuřici (*Zea mays*) jsou geny fytochromu přítomny jako homologní páry pro každý ze tří genů, které jsou známé jako phyA1 a phyA2, phyB1 a phyB2, phyC1 a phyC2, děje se to díky genové duplikaci ze staré tetraploidizace v rodové linii kukuřice (Sheehan et al., 2004). To, že jednoděložným rostlinám chybí dvě třídy fytochromů (phyD a phyE), ukazuje na jedinečné role těchto tříd u rostlin dvouděložných a také na rozdíly v signálních drah rostlin jednoděložných a dvouděložných.

2.3. Kryptochromy

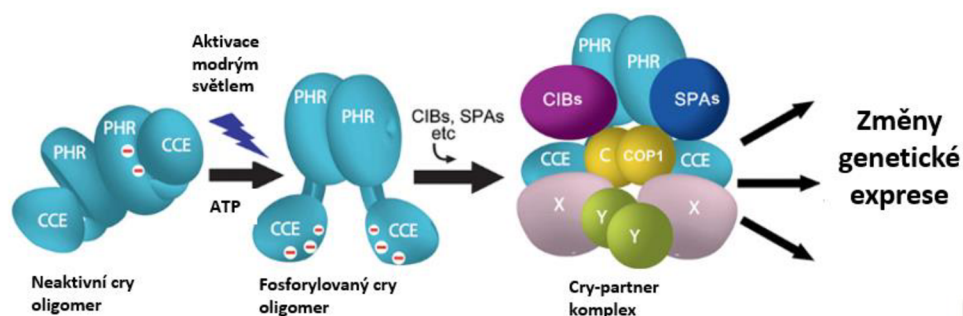
Kryptochromy (cry) jsou fotoreceptory, které jsou citlivé pro oblast modrého světla. Po chemické stránce se jedná o flavoproteiny, které ve své struktuře mají pro ně typickou PHR doménu, kdy se tato doména může vázat na FAD a chromofor. Kryptochromy jsou obecně odvozené od fotolyáz, což jsou bakteriální enzymy, které jsou citlivé na světlo a opravují DNA, která byla poškozena UV zářením, kdy vznikaly pyrimidinové dimery (Lin and Shalitin 2003). Nejprve došlo k objevu kryptochromů cry1 a cry2, později byl objeven i kryptochrom cry3.

V případě živočišných buněk se kryptochromy podílejí na cirkadiánním cyklu (Chaves et al., 2011) a také slouží jako magnetoreceptory (Ritz et al., 2010). V rostlinných buňkách mají funkci fotoreceptorů, které se uplatňují v řízení rostlinného růstu, prodlužování hypokotylu, nebo indukují kvetení. Kryptochromy jsou jediné ze všech fotoreceptorů, které můžeme nalézt ve všech hlavních evolučních liniích rostlin (Lin and Todo, 2005). Kryptochromy také vykazují velkou reparační aktivitu DNA. Kryptochromy

silně ovlivňují cirkadiánní děje v rostlinách, senescenci listů (Meng et al., 2013), přemísťování průduchů, v reakci na měnící se podmínky, dále pak otevírání a zavírání průduchů (Wang et al., 2010) nebo fototropismus, dále se také uplatňují v odpovědích rostlin na patogeny (Jeong et al., 2010). Studie naznačují, že nadměrná exprese genů *CRY* souvisí s rezistencí rostlin k osmotickým stresům a kyselině absicové (Xu et al., 2008). Sharma a tým, (2014) tuto studii potvrdili a prokázali, že světelná signalizace zprostředkovaná *cry1* má rozsáhlé účinky nejen na geny podílející se na syntéze fytohormonů a signálních dráhách, ale také na geny spojené s abiotickou a biotickou odpovědí na stres (Sharma et al., 2014).

Krytochrom 1 a krytochrom 2 se v rostlinných buňkách vyskytují ve formě dimerů (Rosenfeldt et al., 2008). Skládají se ze dvou hlavních domén: N-terminální fotolyázové homologní oblasti (PHR) a divergované domény *cry* C-terminal extension (CCE). Doména PHR je vysoce stabilní a je složena z 500 aminokyselin. Aby mohl krytochrom absorbovat modré záření, musí se FAD (flavinadenindinukleotid) nekovalentně navázat na α subdoménu domény PHR (Banerjee et al., 2007). PHR doména způsobuje dimerizaci CRY (Rosenfeldt et al., 2008). CCE domény *cry1* a *cry2* mají délku 180 a 110 aminokyselinových zbytků. CCE domény se v rámci krytochromů liší svou délkou a jsou nejasně strukturované (Partch et al., 2005). Je však možné, že v rámci celkové struktury krytochromu mají i přesto řídicí funkci (Yu et al., 2007). Ohledně stability, stabilní je *cry1*, zatímco *cry2* podléhá ubikvitinaci a je okamžitě degradován proteazomem 26S, tento děj se musí odehrávat v podmínkách modrého světla (Weidler et al., 2012). *cry2* se nachází výhradně v buněčném jádře (Yu et al., 2007), zatímco *cry1* můžeme nalézt jak v jádře, tak i v cytoplazmě (Wu and Spalding, 2007). Většinu reakcí krytochromů řídí *cry1* a *cry2* umístěné v jádře, s výjimkou expanze kotyledonu zprostředkované *cry1* a prodlužováním kořene (Wu and Spalding, 2007). Z toho můžeme vyvodit, že většina příjmu signálu se odehrává právě v jádře, a ne v cytosolu.

Když je *cry2* ozářen, dostane se do excitovaného stavu a reaguje s transkripčními faktory typu bHLH nazývanými CIBs (CRY-Interacting BHLHs), a tím přímo ovlivňuje transkripci genů u *Arabidopsis*. Dále pak reaguje se SPA1 (supresor fytochromu A) a s COP1, a tím změní požadovanou stabilitu transkripce při fotomorfogenezi, která je závislá na světle (Meng et al., 2013) (Obr. 5).



Obrázek 5: Aktivace a následná signální transdukce kryptochromů. Neaktivní cry oligomer je fotoexcitován modrým světlem, dojde k jeho fosforylaci (negativní náboje) a změně konformace. Poté reaguje s transkripčními faktory CIBs, SPAs a COP1 a dalšími proteiny, které nebyly doposud identifikovány (X, Y), čímž dochází k ovlivnění transkripce (převzato z a upraveno podle Liu et.al, 2011).

Kryptochromy řadíme mezi fosfoproteiny, a tedy můžeme říct, že fosforylace kryptochromů má velmi důležitou funkci pro regulační schopnosti kryptochromů v rostlinách i zvířatech (Shalitin et al., 2003). V případě *Arabidopsis* jsou kryptochromy fosforylovány ve více zbytcích domény CCE (Yu et al., 2007), přičemž fosforylace CCE domény kryptochromu přímo souvisí s jeho funkcí. Kryptochrom 2 je fosforylován dvěma způsoby. První typ fosforylace způsobuje posun mobility nahoru, zatímco druhý typ toto nezpůsobuje. Bylo zjištěno, že kasein kináza 1 CK1.3 a CK1.4 fosforyluje cry2 na serinu 587 a threoninu 603, a tím přímo ovlivňuje funkci a regulaci cry2 (Tan et al., 2013). Díky tomuto objevu se potvrdilo, že fosforylace, která je indukována modrým světlem ovlivňuje přímo funkci a regulaci cry2 (Shalitin et al., 2002). V případě kryptochromu cry1, bylo v podmínkách *in vitro* objasněno, že proteiny cry1, které byly odebrány z hmyzích buněk, které byly infikovány bakulovirem, byly fosforylovány fytochromem A (phyA), přičemž u tohoto fytochromu byla prokázána kinázová aktivita (Yeh and Lagarias, 1998). Také bylo prokázáno, že kryptochrom cry1, který se nachází v rostlinách, je schopný se stechiometricky navázat na ATP *in vitro* (Ozgun and Sancar, 2006). Tento výsledek vede k domněnce, že rostlinný cry1 má schopnost alespoň částečné autofosforylace, která je přímo závislá na fotoexcitaci. Kromě autofosforylace se na fosforylaci cry1 může podílet jedna nebo více kináz, které ještě nebyly identifikovány. Na rozdíl od cry1 nebyla u cry2 prokázána schopnost autofosforylace (Ozgun and Sancar, 2006).

Rozlišujeme celkem tři skupiny kryptochromů (cry1, cry2 a cry3). Kryptochrom cry1 byl nalezen u *Arabidopsis thaliana*, kde bylo prokázáno, že inhibuje růst hypokotylu na modrém světle (Ahmad, 2016). Kryptochrom cry2 hraje velkou roli v regulaci doby kvetení

(Guo et al., 1998), dále pak reguluje hypokotylovou odpověď přednostně pod tlumeným modrým světlem (Lin et al., 1998). Kryptochrom *cry3* není ještě dobře molekulárně popsán, ale připisuje se mu souvislost s ději v chloroplastech a mitochondriích.

V rámci experimentální části bakalářské práce jsem se zabývala jednoduchými mutanty *cry1* a *cry2*. Tito mutantí mají poruchu pro vnímání modrého světla. V experimentech, které provedli Exner et al. (2010) a Gu et al. (2012), autoři zjistili, že mutované alely *cry1* se získáním funkce vykazovaly fenotypy časného kvetení, v podmínkách dlouhého dne. Přičemž dvojitý mutant *cry1cry2* vykvetl oproti rostlinám divokého typu později, zatímco mutantí *cry1* a *cry2* se od divokých typů v tomto fenotypu nelišily. Z tohoto výsledku lze odvodit, že *cry1* působí za těchto podmínek nadbytečně a kvetení podporuje *cry2* (Liu et al., 2008). Proto se funkce *cry1* a *cry2* pro regulaci elongace hypokotylu překrývají.

2.4. Fototropiny

Fototropiny jsou fotoreceptory, které zachytávají modré světlo. Rozlišujeme celkem dva druhy fototropinů, a to *phot1* a *phot2*. Tyto fotoreceptory mají celou řadu funkcí a podílí se tak na celkovém fitness rostliny (Crepy and Casal, 2015). Mezi jejich funkce patří: fototropismus, akumulace a vyhýbání se chloroplastů, otevírání průduchů, orientace listů a expanze listů (Liscum et al., 2014).

Z chemického hlediska se jedná o serin-threoninové kinázy, které jsou spojeny s membránou. Obsahují dvě domény, které jim umožňují vnímat modré a UV-A světlo (Legris and Boccacini, 2020). Relativně dobře je prozkoumána jejich funkce během fototropismu. Fototropismus je definován jako celkových ohyb rostliny nebo její části ke světlu, jedná se tedy o pohybovou reakci rostliny na vnější podnět. Rozlišujeme fototropismus pozitivní, kdy se rostlina natačí za světlem a fototropismus negativní (skototropismus), kdy se rostlina od světla naopak odklání. Tímto způsobem je rostlina schopna si regulovat míru osvětlení a vypořádat se tak s abiotickým stresem, které jí světlo může způsobit, tento jev pozorujeme například na listech, ve kterých je vysoký obsah chloroplastů a tím pádem, rostliny natačí své listy směrem k záření, aby měly dostatek energie pro fotosyntézu. Díky fototropismu rostlina vyrovnává růst osvětlené a neosvětlené strany hypokotylu (Whippo and Hangarter, 2003). Jak už bylo zmíněno výše, rozeznáváme

fototropiny dvojího typu phot1 a phot2, tyto fototropiny spouští fototropismus v reakci na modré světlo (Briggs, 2014).

Během fototropismu se vytváří světelný podnět, který ve stonku vytváří světelný gradient a tím se aktivují fototropiny. Fototropiny mají schopnost autofosforylace, tím pádem se fotoexcitují, dojde k autofosforylaci a takto aktivované, začnou interagovat se členy rodiny NPH3/ RPT2. NPH3 a RPT2 během fototropismu, zajišťují fototropismus stonku a kontrolují zploštění listů (de Carbonnel et al., 2010).

Jedním z počátečních kroků signální dráhy je NPH3 fosforylován phot1 (Sullivan et al., 2021). Dále phot1 fosforyluje PKS4 (fytochromový kinázový substrát) (Demarsy et al., 2012). Přičemž proteiny PKS1 a PKS4 se podílejí na fototropismu stonku a protein PKS2 se podílí na zploštění listů (de Carbonnel et al., 2010).

Jakmile fototropiny přijmou světelný signál, uvolní se jejich proteinkinázové domény inhibicí N-terminálních fotosenzorických částí, tím se generuje gradient auxinu mezi osvětlenou a neosvětlenou stranou hypokotylu, což způsobí zakřivení hypokotylu a jeho následnou růstovou asymetrii (Briggs, 2014). Aby mohlo dojít k zakřivení hypokotylu, fungují zde auxinové transportéry z rodiny Pin-formed (PIN) (Willige et al., 2013). Například v reakci na unilaterální modré světlo se PIN3 přemísťuje v endodermis na vnější cytoplazmatickou membránu a tím je umožněn transport auxinu z vaskulárního systému do epidermis a dojde tak ke kontrole růstu rostliny (Ding et al., 2011). Hypokotylový fototropismus dále ovlivňuje fosforylace auxinového transportéru ABCB19. Tato reakce je zprostředkována pomocí phot1 (Christie et al., 2011).

V případě, že se auxin nachází v rostlině ve vyšší koncentraci na zastíněné straně stonku, dochází k expanzi buněk, kdežto na straně osvětlené je koncentrace auxinu nižší a dochází tedy k menší buněčné expanzi. Důsledkem toho se pak rostlina ohýbá směrem ke světlu (Legris and Boccaccini, 2020).

Cytoplazmatický Ca^{2+} může aktivovat Ca^{2+} dependentní proteinkinázu, která je schopna fosforylovat auxinový transportní komplex a tím pádem funguje jako druhý posel regulace lokalizace auxinových transportérů závislých na fototropinu (Pedmale et al., 2010). Tato nerovnoměrná distribuce auxinu spouští změny v genové expresi a stimuluje tak fototropismus. V případě řepky olejné (*Brassica oleracea*), byly nalezeny geny *EXPANSIN* a *GH3*. Funkcí GH3 proteinů je katalyzování konjugace aminokyselin na volnou kyselinu indol-3-octovou (IAA) (Esmon et al., 2006). Úloha expanzinů je především v tom, že narušují vodíkové vazby mezi celulórou a hemicelulórou v buněčných stěnách, čímž se sníží napětí stěn (Ivakov et al., 2017). Promotor GH3 obsahuje ve své struktuře prvek,

který reaguje na auxin, který váže transkripční aktivátory faktoru odezvy auxinu (ARF), přičemž dojde k potlačení reakce na auxin, snížením obsahu volného auxinu, čímž dochází k ovlivnění fototropního růstu (Esmon et al., 2006).

2.5. Dormance a klíčení semen

Dormance všeobecně znamená přechodné zastavení fyziologických procesů v organismech. V případě rostlin se dormance uplatňuje především, pokud se rostlina nachází v nepříznivých podmínkách (chlad, zkrácený sluneční svit, nízké srážky atd.), v podstatě je dormance řízena biologickými hodinami rostlin. Na tyto nepříznivé podmínky rostlina reaguje zpomalením klíčením. V případě určitých typů dormance semen se jedná o málo pochopený jev, jelikož se blokuje dokončení klíčení životaschopného semene za příznivých podmínek (Bewley, 1997). Všeobecně se o definici dormance vedou spory, jelikož dormanci lze měřit pouze za nepřítomnosti klíčení. Proto byla vyslovena další definice dormance, kdy se úplně odpustí od absence klíčení a dormance je tedy definována jako charakteristika semene, která určuje podmínky potřebné pro klíčení (Fenner and Thompson, 2005). Baskin a Baskin (2004) navrhli více experimentálně použitelnou definici dormance: spící semeno nemá schopnost klíčit ve stanoveném časovém období za jakékoli kombinace normálních fyzikálních faktorů prostředí, které jsou jinak příznivé pro jeho klíčení, tj. poté, co se semeno stane nespícím.

Klíčení a dormance sdílí společné faktory, ačkoli jednotlivé fyzikální faktory mohou působit na klíčení odlišně, než na dormanci a naopak. Například společným regulátorem pro klíčení je teplota prostředí. Je však diskutabilní, zda je světlo regulátorem dormance (Baskin and Baskin, 2004; Kucera et al., 2005). Světlo je považováno za pozitivní stimul klíčení (Vleeshouwers et al., 1995), zatímco dormanci ukončuje (Batlla et al., 2004).

Důležitým pozitivním regulátorem dormance je kyselina abscisová (ABA). Bylo dokázáno, že nedostatek ABA během vývoje semen zapříčiňuje absenci primární dormance, zatímco nadměrná exprese genů pro biosyntézu ABA zvýší dormanci v semenech, nebo dojde k zpomalení klíčení (Kushiro et al., 2004). Pokud je ABA během vývoje semene produkována samotným semenem, může vyvolat trvalou dormanci, je-li ovšem semeno vystaveno ABA externě, k trvalé dormanci nedojde (Kucera et al., 2005).

Dalším regulátorem dormance semen je např. gen *DOG1*. Tento gen určuje hloubku dormance na konci zralosti semene (Bentsink et al., 2006). Stejně jako ABA, *DOG1* také vyvolává dormanci semen, což by mohlo vést k názoru, že se jejich signální dráhy sbíhají v zcela zásadním pozdějším signálním kroku (Graeber et al., 2014). *DOG1* potlačuje aktivitu PP2C fosfatáz AHG1 a AHG3, aby tak navodil nebo udržel dormanci semen (Nishimura et al., 2018).

Rozlišujeme několik typů dormancí. Fyziologická dormance je nejvíce zastoupenou formou a nachází se v semenech jak nahosemenných, tak krytosemenných rostlin. Jedná se o nejrozšířenější formu dormance v mírném podnebném pásmu. Fyziologická dormance bývá také zastoupena u experimentálních rostlinných modelů a lze ji dále rozdělit na hlubokou, střední a nehlubokou (Baskin and Baskin, 2004).

Dalším typem dormance je dormance morfologická, kterou můžeme pozorovat u semen s embryi, která jsou velikostně nedostatečně vyvinutá, ale jsou diferenciována. Tato embrya potřebují více času, aby byla schopna vyklíčit (Jacobsen and Pressman, 1979).

Třetím typem je dormance morfofyziologická, kterou stejně jako u dormance morfologické, můžeme nalézt u semen, která nemají dostatečně vyvinutá embrya, ale ještě navíc splňují podmínky pro dormanci fyziologickou (Baskin and Baskin, 2004). Proto tato semena vyžadují ošetření narušující dormanci například kombinaci teplé a studené stratifikace, případně se mohou aplikovat gibereliny (Finch-Savage and Clay, 1997).

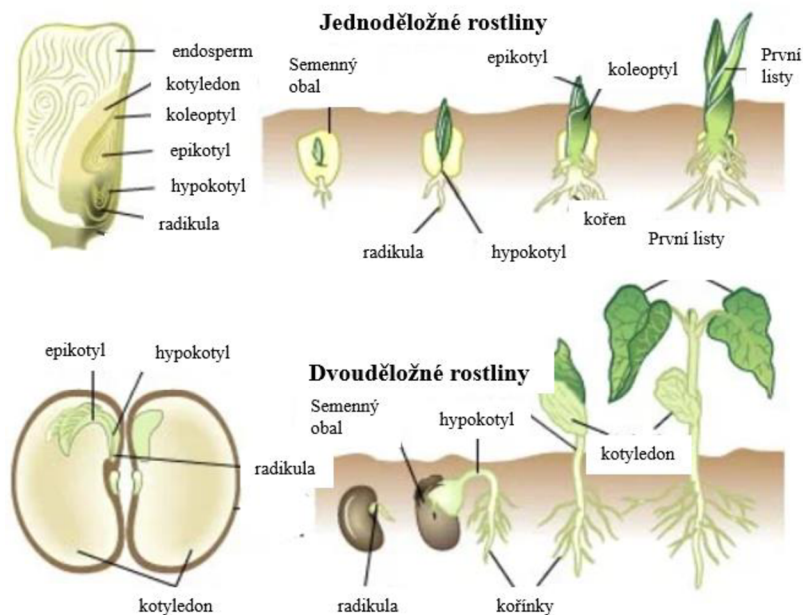
Čtvrtým typem je fyzická dormance, která je způsobena pro vodu nepropustnými vrstvami palisádových buněk v obalu semen, případně i plodu. Tuto dormanci může narušit mechanický nebo chemický zásah (Baskin and Baskin, 2003).

Tvorba semen u krytosemenných rostlin začíná dvojitým oplodněním, poté následuje fáze morfogeneze a zrání. Během morfogeneze dochází k významné buněčné proliferaci a dochází také k diferenciaci embrya a endospermu. Během samotného zrání semen dochází k nashromáždění zásob v embryích. Během této fáze nastává fyziologická dormance. Jakmile semena dozrají, postupně dojde ke snižování účinků dormance a semena jsou schopná klíčení (Angelovici et al., 2010).

Semeno je schopno klíčení pouze za příznivých podmínek, které jsou pro daný genotyp možné (Baskin and Baskin 2004). Zcela zásadní je pro klíčící semeno voda, kyslík a vhodná teplota. Mezi další faktory, které ovlivňují klíčení můžeme zařadit světlo, obsah dusičnanů a minerálů v půdě. Dalšími velice důležitými faktory pro začátek klíčení je přítomnost fytohormonů, a to zejména kyseliny abscisové (ABA), kyseliny giberelové (GA), ethylenu a auxinu. Během studia klíčení se ukázalo, že ABA a GA jsou pro klíčení zcela

zásadní a v průběhu klíčení mají antagonistické role (Holdsworth et al., 2008). Mezi klíčové enzymy pro biosyntézu ABA patří: 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza 6 (NCED6), NCED9 a CYP707A2. Transkripčními faktory, které pozitivně ovlivňují a regulují ABA signalizaci, jsou proteiny nazývané Abscisic acid Insensitive 3 (ABI3), ABI4 a ABI5. Mutace genů, které kódují tyto transkripční faktory, vede ke zvýšené klíčivosti semen (Shu et al., 2013). Zvýšené hladiny GA jsou klíčové pro rupturu testy a endospermu. Biosyntézu GA podporují giberelin 3-oxidáza1 (GA3ox1) a GA3ox2, oproti tomu giberelin 2-oxidáza 2 (GA2ox2) produkuje neaktivní formu GA (de Wit et al., 2016). Zároveň s GA fungují i proteiny DELLA. Jedná se o represory uvolnění dormance semen a klíčení. Jelikož jim ve struktuře chybí doména, díky které by se mohly navázat na DNA, musí DELLA proteiny interagovat s různými transkripčními faktory, aby mohly řídit expresi následných genů. To probíhá takto: RGA-LIKE2 (RGL2) interaguje s NF-YC proto, aby se zvýšila exprese ABI5, důsledkem čehož nastává inhibice dormance semen (Liu et al., 2016). Proteiny DELLA působí také transkripční represory, jelikož sekvestrují transkripční faktory a jejich cílové geny. Konkrétně RGL2 inhibuje expresi genu *EXPANSIN2*, zapojeného do gibereliny indukované expanze endospermových buněk během klíčení tím, že interaguje s transkripčními faktory typu NAC, NAC25 a NAC1-LIKE (Sanchez-Montesino et al., 2019).

Samotné klíčení začíná tím, že suché semeno nasaje vodu, po tomto kroku dochází k expanzi embrya. Příjem vody probíhá ve třech fázích. Nejprve je voda rychle nasávána (fáze 1), následuje fáze plato, kdy se rychlost nasávání vody ustálí (fáze 2), pak dojde k dalšímu zvýšenému příjmu vody (fáze 3). Ke třetí fázi dojde ve chvíli, když se osa embrya prodlužuje a postupně si proráží cestu krycími vrstvami, až vyklíčí úplně (Manz et al., 2005). U semen krytosemenných rostlin je diploidní embryo obklopeno dvěma krycími vrstvami: triploidním endospermem (u většiny druhů), který obsahuje živé buňky a vyživuje embryo, dále pak diploidní testou. Diploidní testa je obalem semene, jedná se o mateřskou tkáň, která obsahuje mrtvé buňky. Endosperm představuje pro klíčící semena mechanickou bariéru. Ztenčení této bariéry je předpokladem pro vyčnívání kořene během klíčení semen (Kucera et al., 2005). Oslabení endospermu může být podporováno GA a inhibováno ABA. U některých druhů chybí endosperm a živiny pro semeno zajišťují zásobní děložní listy. Během klíčení dochází také k prodlužování buněk, což je nezbytné pro dokončení proražení kořene, což můžeme pozorovat okem (tzv. viditelné klíčení) (Kucera et al., 2005) (Obr. 6).



Obrázek 6: Klíčení jednoděložných a dvouděložných rostlin (převzato z a upraveno Heslop-Harrison J, 2021).

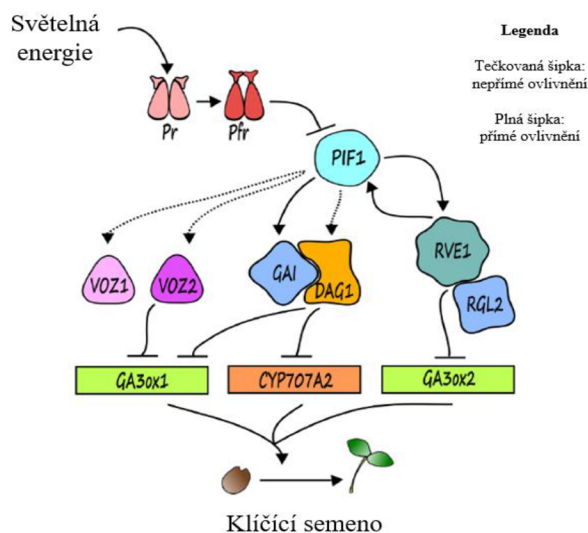
K přerušení dormance a podpoře klíčení dochází během dozrávání semen (kdy jsou suchá semena uskladněna několik měsíců při pokojové teplotě, kdy do sebe semena začnou nasávat vodu. Kyselina abscisová (ABA) inhibuje rupturu endospermu naopak světlo, gibbereliny, ethylen a brassinosteroidy rupturu endospermu podporují a působí proti inhibici klíčení, kterou způsobuje ABA. ABA-inhibované geny β -1,3-glukanázy třídy I (β Glu I) jsou v mikropylárním endospermu indukovány těsně před rupturou endospermu (Leubner-Metzger, 2003). Tato indukce je lokalizována v mikropylárním endospermu v místě, kde vzniká zárodek.

Během klíčení je velice důležitá role světla. Světelnou energii ve formě fotonů zachytávají rostliny pomocí fotoreceptorů, kterým jsem se podrobněji věnovala v předešlých kapitolách. Nyní se budu věnovat problematice úlohy světla během klíčení.

Nejprve byla u rostlin popsána úloha fytochromů, což jsou receptory červeného světla, během klíčení semen salátu (*Lactuca sativa*). Červené světlo podporovalo klíčení semen salátu, zatímco daleko červené světlo klíčení inhibovalo (Borthwick et al., 1952). Tento jev byl také o necelých 40 let později popsán u *Arabidopsis thaliana* (Shinomura et al., 1994). Aktivní forma fytochromu Pfr se přemísťuje z cytosolu do jádra a zde řídí transkripci genů zapojených v biosyntéze/degradaci GA a ABA. Všeobecně jsou fytochromy pro klíčení nezbytné, phyB startuje klíčení semen reverzibilně červeným R a dlouhovlnným červeným světlem FR, phyA vykazuje na tento typ záření velmi slabé reakce

(Shinomura et al., 1994). Indukce klíčení pomocí phyA a phyB je prostorově oddělena v endospermu a embryu. Dále se v procesu klíčení uplatňuje i phyE, který je nezbytný při ozáření nepřetržitým FR (Hennig et al., 2002). phyE a phyD společně stimulují klíčení při velmi nízkém poměru R/FR, zatímco phyC antagonizuje podporu klíčení světlem (Arana et al., 2014). phyA a phyB se podílejí na biosyntéze GA a ABA, phyC, phyD a phyE se podílejí na biosyntéze GA (Hennig et al., 2002, Arana et al., 2014). Nadměrná exprese phyB vede ke snížení dormance semen (Jiang et al., 2016).

Dalším důležitým faktorem v průběhu klíčení je protein PIF1. PIF1 interaguje s phyA a phyB a tím potlačuje klíčení semen vyvolaného fytochromy (Oh et al., 2004). Je-li phyB fotoexcitován červeným světlem, podporuje degradaci PIF1 pomocí proteazomu 26S (Oh et al., 2006; de Wit et al., 2016). Je-li nastaven nízký poměr R/FR, tak dochází k tomu, že se PIF hromadí v jádře a tím aktivuje transkripci DAG1, což inhibuje expresi enzymu GA3ox1, čímž se zablokuje biosyntéza GA a je potlačeno klíčení semen. Podobným způsobem indukuje PIF1 transkripci katabolického genu *GA2ox2a* a genů zodpovědných za biosyntézu ABA (*ABA1*, *NCED6*, *NCED9*) (Née et al., 2017). Nezávisle na PIF1 jsou během regulace dormance semen uplatněny RVE1 a RVE2 (Jiang et al. 2016). Během zrání semen dochází ke zvyšování hladin mRNA RVE1 a RVE2. RVE1 inhibuje transkripci *GA3ox2* a tím stabilizuje aktivitu proteinu RGL2, důsledkem čehož je udržení semen v klidu (Jiang et al., 2016) (Obr. 7).



Obrázek 7: Schéma molekulární dráhy klíčení za působení světla. Dojde k fotoaktivaci Pr na aktivní formu Pfr. Tím se spustí kaskáda, kdy PIF1 přímo aktivuje genetickou expresi GAI a RVE1, RVE1 následně přímo indukuje PIF1. Dochází k interakci RVE1 s DELLA proteinem RGL2, čímž dojde k potlačení GA3ox2. Mezitím GAI reaguje s DAG1, čímž dochází k inhibici GA3ox1. Funkci GA3ox1 také potlačují transkripční faktory VOZ1 a VOZ2 (převzato z a upraveno podle Longo et al., 2021)

Klíčení se vedle fytochromů účastní i kryptochromy. Jejich strukturu jsem popsala detailně v předešlých kapitolách. Kryptochromy jsou tedy fotoreceptory, které reagují na modré světlo. Několik studií prokázalo, že změna sekvencí nebo exprese genů *CRY1* a *CRY2* může mít velký vliv na zemědělsky používané plodiny. Jedná se o vliv na klíčení, kvetení, metabolického složení ovoce a reakce rostlin na abiotické a biotické stresory (Mawphlang and Kharshiing, 2017). Z tohoto důvodu se kryptochromy staly středem vědeckého zájmu, protože mohou představovat řešení pro zlepšení celkového fitness rostlin a zvýšení kvality a produktivity plodin důležitých pro zemědělství.

Bylo zjištěno, že modré světlo hraje roli v inhibici klíčení dormantních semen u pšenice (*Triticum aestivum*) a ječmene (*Hordeum vulgare*) (Barrero et al., 2014). U ječmene se zdá, že je za inhibici zodpovědný fotoreceptor *cry1* (Barrero et al., 2014). Tato teorie byla potvrzena pomocí experimentu, kdy se ukázala specifická role *cry1*, kdy downregulace produktů *cry1a* a *cry1b* prostřednictvím iRNA, vedla ke snížené inhibici klíčení zrn, zatímco když byl proveden knockout *cry2* mRNA, tak se žádný účinek neprojevil. Tudiž byla potvrzeno, že dormance semen je podporována prostřednictvím *cry1*. Dalším modelovým organismem je řepka olejná (*Brassica napus*), u které nadměrná exprese *cry1* způsobuje zkrácení délky internodia a zvětšení velikosti listů. Fenotypově tak získáváme rostliny malého vzrůstu s robustnějším tělem, které jsou odolnější vůči povětrnostním podmínkám a polehávání ve vodě (Sharma et al. 2014). Podobný fenotyp bychom našli u rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum*), kdy docházelo k nadměrné expresi *CRY1* a *CRY2* (Liu et al., 2018). Tyto transgenní linie rajčete jedlého se fenotypicky projeví jako rostliny se zkrácenými internodii, zvýšeným růstem axilárních pupenů. Celkově byly rostliny vzrůstově kratší a robustnější a měly taktéž zmenšenou plochu listů.

Kryptochromy se také podílejí na regulaci primárního vývoje kořenů. V případě *Arabidopsis* fotoreceptor *cry1* podporuje prodlužování kořenů, ovšem *cry2* vývoj kořene brzdí. U rajčete bylo pozorováno, že mutanti *cry1* a *cry2* vykazují kratší kořeny za různých světelných podmínek (W, B, R), v porovnání s kontrolními rostlinami (Fantini et al., 2020).

2.6. Abiotický stres

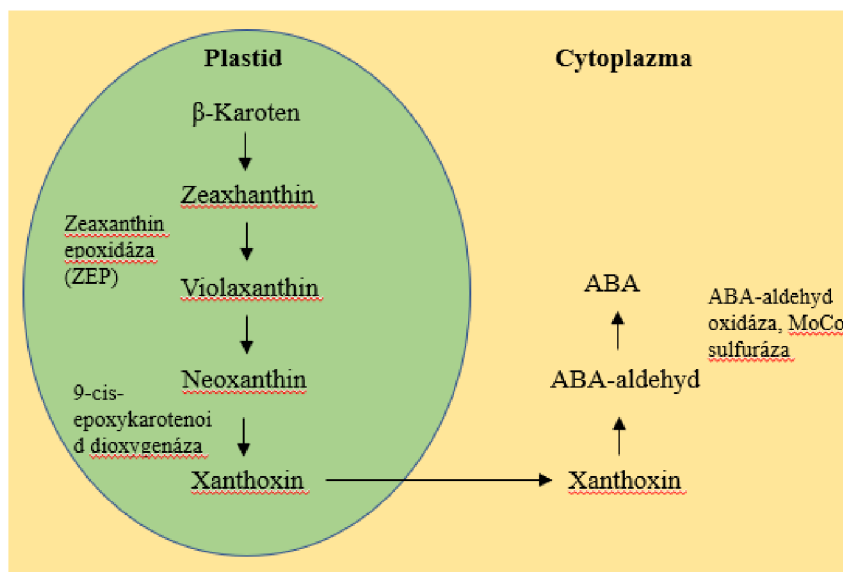
Rostliny, které nejsou pěstovány v laboratorních podmínkách, se během svého životního cyklu musí potýkat s mnoha pro ně nekomfortními situacemi, které je zpomalují ve vývoji a růstu, případně mohou vést až k uhynutí rostliny. Tyto pro rostliny nepříjemné, či život ohrožující podmínky, nazýváme obecně stresy. V posledních letech, kdy dochází ke zhoršování klimatické situace, jsou rostliny vystaveny více stresovým podmínkám než dříve (extrémní výkyvy počasí, globální oteplování, sucho, kyselé deště, znečištění životního prostředí apod.), což způsobuje velké problémy zejména v případě základních zemědělských rostlin, jako jsou rýže, pšenice, kukuřice, rajče nebo proso. Zhoršující se ekologická situace vede ke zvýšené frekvenci extrémního počasí (záplavy, extrémní horka, tornáda apod.) (Le Fedoroff et al., 2010). Můžeme tedy říct, že stres rostlin, není pouze problémem rostlin samotných, ale týká se celého ekosystému. Zvýšení odolnosti rostlin na stresové faktory, je zcela zásadní pro zemědělství, jelikož stresy zásadně ovlivňují zemědělský výnos rostlin (Qin et al., 2011). Nedostatek základních zemědělských plodin může být v dnešní době, kdy dochází k neustálému navyšování počtu populace, velice kritický, zejména v rámci rozvojových zemí, kde mohou vypuknout hladomory. Proto se v dnešní době vynakládá velké úsilí v oblasti šlechtitelství a molekulární fyziologie rostlin, kdy se vědci snaží přijít na to, jak rostliny na stresy reagují a jakým způsobem jim odolávají, případně se snaží nalézt mutanty, kteří by byly vůči stresům odolnější než jejich divoké formy.

Stresové faktory, které působí na rostliny můžeme rozdělit na abiotické a biotické, přičemž v této kapitole se budu věnovat stresům abiotickým. Abiotický stres nesouvisí s rostlinou přímo, ale zahrnuje v sobě podmínky okolního prostředí (Wang et al., 2003). Mezi hlavní abiotické stresory můžeme zařadit nadbytek či nedostatek světla, teplo, chlad, sucho, znečištění životního prostředí, deficit, nebo přebytek minerálů a dusičnanů v půdě, přítomnost těžkých kovů v substrátu, mechanické poškození rostlin, přirozené nebo umělé zasolení zeminy, obsah toxických látek v půdě (herbicidy, insekticidy apod.). Biotický stres je vyvolaný jinými živými organismy a řadíme sem fytopatogeny, či napadení rostliny parazitem nebo býložravcem. V rámci této bakalářské práce se budu nejvíce zabývat stresem osmotickým, který se řadí pod stres abiotický. Mezi osmotický stres řadíme všeobecně faktory, které způsobují snížený tlak turgoru a ztrátu vody v rostlinné buňce (Boudsocq and Lauriere, 2005). Konkrétně se jedná se o přirozené nebo umělé zasolení substrátu, nedostatek vody, či sucho.

Je-li rostlina vystavena osmotickému stresu, dochází k masivní produkci ABA, která se účastní adaptivní fyziologické odpovědi na stres a způsobuje změnu v genové expresi, čímž zahájí obranné pochody v rostlině (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Dochází také k produkci dalších fytohormonů jako jsou auxiny, gibbereliny (GA), cytokininy, brassinosteroidy a strigolaktony.

ABA řadíme z chemického hlediska mezi izoprenoidy (Nambara and Marion-Poll, 2005). Tuto kyselinu můžeme nalézt ve všech organismech, kromě Archea (Hauser et al., 2011). ABA má kromě reakcí na stres v rostlinách spoustu dalších důležitých funkcí. ABA je jedním z nejdůležitějších fytohormonů, kdy se podílí na růstu a vývoji rostliny, taktéž se uplatňuje při kontrole tvorby laterálních kořenů a růstu semenáčků. V případě, že se ABA nachází v rostlině ve vysokých koncentracích, reguluje syntézu zásobních proteinů v semenech, které podporují toleranci k vysychání semen a způsobují dormanci, čímž dochází k inhibici samotného klíčení semen (Finkelstein et al., 2008). Dále snižuje transpiraci vody tím, že podporuje uzavírání průduchů.

Biosyntéza této kyseliny je závislá právě na přítomnosti/nepřítomnosti stresu, přičemž v přítomnosti stresové situace její koncentrace v rostlině stoupá (Cutler and Krochko, 1999). ABA může vznikat dvěma způsoby, buď může vznikat přeměnou xanthoxinu (C15 prekurzor ABA), případně se může syntetizovat *de novo* v plastidech (Seo and Koshiba, 2002). Její biosyntéza v plastidech probíhá následovně: nejprve z pyruvátu a glycerinaldehyd-3-fosfátu vznikne 1-deoxy-D-xylulosa-5-fosfát (DXP) následně dojde ke vzniku C5 ABA prekurzoru isopentenylpyrofosfátu (IPP) (Cutler and Krochko, 1999). Vznik IPP vede k produkci farnesylpyrofosfátu, geranylgeranylpyrofosfátu (GGPP), fytoenu, ζ -karotenu, lykopenu a β -karotenu. Následně dochází k přeměně β -karotenu na xantofyl a zeaxantin (Seo and Koshiba, 2002). Poté se syntetizují cis-izomery xantinu, viololaxantin a neoxantin, které se štěpí a vznikne xanthoxin (C15 prekurzor ABA). Toto štěpení je katalyzováno pomocí enzymu 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenázy (NCED) (Tan et al., 1997). Vzniklý xanthoxin se přeskupuje z plastidu do cytosolu (Nambara and Marion-Poll, 2005), kde dochází k jeho přeměně na ABA třemi možnými způsoby. Buď přes abscisový aldehyd, abscisový alkohol nebo xanthoxovou kyselinu (Seo and Koshiba, 2002) (Obr. 8).



Obrázek 8: Schéma biosyntézy kyseliny abscisové (převzato z a upraveno podle Sharma K and Nayyar H, 2016).

Pokud je biosyntéza ABA vyvolaná stresem, musí dojít k přemístění ABA z plastidů, pomocí mezibuněčného transportu do vzdálených ochranných buněk a sousedních pletiv (Kuromori et al., 2010). Mezibuněčný transport ABA je umožněn díky nízkoafinitním transportérům dusičnanů a dvěma transportérům ATP-binding cassette (ABC), které se nachází v plazmatické membráně buněk (Kuromori et al., 2014). ABC transportéry řadíme mezi integrální membránové proteiny, které pro své fungování potřebují ATP, jedná se tedy o aktivní transport, který kromě ABA slouží také k transportu lipidů, těžkých kovů, léků a auxinu (Rea, 2007).

V zemědělství se s osmotickým stresem setkáváme v případě zasolování půdy, což se jeví jako závažný ekologický problém, kdy studie dokazují, že se s tímto problémem potýká až 20 % zemědělsky užívané půdy (Qadir et al., 2014). Proto jsou pro zemědělce klíčové rostliny, které jsou vůči zasolení půdy tolerantnější. V přírodě se setkáváme se dvěma typy rostlin, které různě reagují na salinitu substrátu: halofyty a glykofyty. Halofyty jsou rostliny, které tolerují a pro svůj vývoj potřebují vysokou salinitu, přičemž svou fyziologii a morfologii přizpůsobily tomuto prostředí. Naopak glykofyty jsou typem rostlin, které jsou na přesolení vysoce citlivé a v takovém prostředí neprosperují, jejich vývoj stagnuje a mohou uhynout (Horie and Karahara, 2012).

Vliv osmotického stresu na rostliny je veliký, například inhibuje klíčení semen, navozuje dormanci, brzdí rostliny ve vývoji, růstu, kvetení a způsobuje sterilitu (Quan et al., 2007). Ve slané půdě se nachází vysoké koncentrace iontů sodíku, které způsobují omezený přísun vody rostlinou, což způsobí narušení homeostázy v rostlině. To spustí primární stresy

(osmotický, iontový), tyto primární stresy dávají vznik oxidačnímu stresu, kdy začnou vznikat ROS, což způsobí vyvolání sekundárních stresových situací (Zhu, 2002). Při osmotickém stresu jsou ROS produkovány chloroplasty, mitochondriemi, peroxizomy a apoplasty. Buňky se na kumulaci ROS snaží rychle reagovat, aby předešly závažným poškozením. ROS tak fungují jako základní signální molekuly solného a osmotického stresu na nízkých úrovních. Bylo prokázáno, že aktivity enzymů, které odbourávají ROS jsou spuštěny solným stresem (Choudhury et al., 2017).

Stres způsobený zasolením narušuje tvorbu světlosběrného komplexu v rámci fotosyntézy (Chen et al., 2015) a narušuje aktivitu a stabilitu enzymu RuBisCO (ribuloza-1,5-bisfosfátkarboxyláza), dále je ovlivněn metabolismus sacharidů a mění se hladiny cukrů v rostlině (Shumilina et al., 2019).

Jak už bylo zmíněno, solný stres způsobuje vysoké hladiny iontů Na^+ a deficit K^+ , což může být pro rostliny až toxické (Horie et al., 2012). Rostliny jsou tedy nuceny v rámci udržení nízké hladiny sodíkových iontů, dostávat nadbytečné sodíkové ionty pryč z cytoplazmy. To se děje pomocí Na^+/H^+ antiporterů, které jsou lokalizované v cytoplazmatické membráně (transportují Na^+ do apoplastu), nebo vakuole (udržují rovnoměrné rozložení Na^+ ve vakuolách). Jejich hlavní funkcí je transport Na^+ výměnou za H^+ (Zhu et al., 2002). Aby došlo ke zmírnění solného stresu uplatňuje se tzv. SOS dráha, která se podílí na udržení homeostázy Na^+ a přemísťuje přebytek Na^+ z cytoplazmy do apoplastu. SOS dráha se skládá z Na^+/H^+ antiporteru SOS1, proteinkinázy SOS2 a dvou kalciových senzorů, SOS3 a SCaBP8 (SOS3-like-calcium-binding protein 8) (Quan et al., 2007). SOS dráha je aktivovaná cytoplazmatickým Ca^{2+} , poté SOS3/SCaBP8 zachytí zvýšený kalciový signál a převede ho následně na serin/threonin proteinkinázu SOS2, čímž ji aktivuje. SOS2 pak fosforyluje SOS1, což vede ke zvýšení tolerance k soli tím, že se mnohonásobně zvýší aktivita Na^+/H^+ antiporterů (Van Zelm et al., 2020). Odtok Na^+ z cytoplazmy do apoplastu je dán protonovým gradientem, který je generován z plazmatické membrány H^+ -ATPázy. SOS3/SCaBP8-SOS2 slouží jako regulátor aktivity dalších přenašečů, jejichž úkolem je udržení iontové homeostázy. Během solného stresu dochází také k závažnému deficitu K^+ , tím pádem jsou rostliny nuceny udržovat vysoký poměr K^+/Na^+ iontů (Van Zelm et al., 2020).

Solný stres způsobuje kvůli nerovnováze iontů a nedostatku vody rostlině stres osmotický. Tento stres způsobuje v rostlině četné fyziologické změny např. snížení tlaku buněčného turgoru, smrštění cytoplazmatické membrány a určité fyzikální změny v buněčné stěně (Kim et al., 2016). V případě, že se rostlina nachází pod vlivem osmotického stresu,

začínají se zapojovat obranné a regulační mechanismy jako je biosyntéza osmolytů (prolin, polyoly a sacharidy), nebo systémy pro transport vody (Yang and Guo, 2018). Osmolyty snižují osmotický potenciál v cytosolu a fungují jako signální molekuly pro biosyntézu a ukládání ABA. Regulují také růst rostliny při solném stresu a podílí se na expresi genů, které s osmotickým stresem souvisejí (Marusig et al., 2020). Při signalizaci solného stresu se také uplatňují proteinkinázy, které dávají signály pro osmoregulaci (Chen et al., 2021). Dále se při regulaci a signalizaci osmotického stresu uplatňují mRNA histidinkinázy MAPKKK, MAPKK a MAPK, jejichž hladina je během osmotického stresu zvýšena a tím je aktivována biosyntéza a akumulace osmolytů (Zhou et al., 2018).

Jelikož osmotický stres působí na rostliny velmi destruktivně, vyvinuly si rostliny různé obranné mechanismy a signální dráhy, aby se s tímto zatížením mohly vypořádat. Ve chvíli, kdy rostlina přijme signál o tom, že je vystavena solnému stresu, spustí se v jejím těle široké spektrum transdukčních drah. Mezi hlavní signály proto, aby rostlina začala reagovat řadíme: vysokou koncentraci Na^+ , změnu intracelulárních hladin Ca^{2+} a hromadění ROS. Solný stres vyvolává iontový a osmotický stres, což vyvolá zvýšení obsahu Ca^{2+} v cytosolu. Ionty Ca^{2+} fungují jako sekundární poslové, protože se váží a následně aktivují Ca^{2+} kanály, v důsledku čehož, dojde k vyvolání specifické kaskády vápníkových signálů. Kalciový propustný kanál OSCA1 je tzv. osmosenzor a je nezbytný pro signalizaci Ca^{2+} , kterou vyvolal osmotický stres (Yuang et al., 2014). Mezi další osmosenzory můžeme zařadit plastidové antiportery K^+ KEA1/2 a KEA3, které se také podílí na zvýšení hladiny iontů Ca^{2+} (Stephan et al., 2016).

2.7. Zapojení světla v reakci rostlin ke stresům

Jelikož světlo je pro rostliny klíčové, co se týká jejich růstu a vývoje, dá se předpokládat, že se bude účastnit i v odpovědích rostlin vůči abiotickým stresům. Ovšem interakce světla v odpovědích rostlin na abiotické stresy nebyly zatím dostatečně prozkoumány.

Bylo zjištěno, že v toleranci rostlin k abiotickým stresům mohou hrát důležitou úlohu kryptochromy. Zapojení kryptochromů na stresovou situaci je spojováno především s ROS. ROS jsou primárně kumulovány v chloroplastech, peroxisomech a mitochondriích, kde se nachází jako vedlejší produkt fotosyntézy, buněčného dýchání a dalšími metabolickými drahami. ROS jsou dále indukovány abiotickým stresem, a jedná se o signální molekuly pro zahájení obranné reakce (Müller and Ahmad, 2011). Charakteristické pro ROS, které jsou

generovány kryptochromy, je jejich nashromáždění se v jádře, kde se nachází v blízkosti negativních transkripčních faktorů, které ROS poškozují, což vede k aktivaci genů spojených se stresem (El-Esawi et al., 2017). Syntéza ROS, která je zprostředkována kryptochromy, je závislá na fotoredukci a reoxidaci flavinů. Dále pak syntéza ROS není ovlivněna mutacemi v doméně CCE, které obecně zhoršují průběh fotomorfogenní reakce (El-Esawi et al., 2017).

Byly navrženy dva způsoby, jak mohou kryptochromy ovlivnit stresové reakce: základní regulace transkripce *cry2* závislá na transkripčním faktoru bHLH (Liu et al, 2008) a proteolýza, která je závislá na SPA/COP1 (Liang et al., 2022). Obě dráhy jsou závislé na přímé interakci *cry* se všemi transkripčními prvky těchto kaskád, přičemž výsledkem je změna genové exprese, nebo změna stability proteinu (Liu et al., 2011), což můžeme pozorovat především u osmotických stresů. Na rozdíl od indukce ROS, je zde jejich účinek spjat se zvýšenou citlivostí. V praxi například u rostliny *Arabidopsis* vede nadměrná exprese homologního a heterologního kryptochromu ke snížení tolerance vůči stresu. Ovšem poškození samotného kryptochromu vytváří rostliny na osmotický stres tolerantnější (Zhou et al., 2018). Kryptochromy *cry1* a *cry2* se podílejí na řadě reakcí v rostlinách, mezi které patří například inhibice prodloužení hypokotylu (Ahmad and Cashmore, 1993), růst kořenů (Canamero et al., 2006) a podílí se také na regulaci cirkadiálních hodin (Devlin and Kay, 2000).

V rajčeti byly nalezeny a popsány čtyři geny *CRY* v rámci multigenové rodiny: *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY3*. Kryptochromové geny *CRY1a* a *CRY1b* byly lokalizovány na chromozomech 4 a 12, *phot1* a *phot2* na chromozomech 11 a 1 a *phyA*, *phyB* a *phyB1* na chromozomech 10, 5 a 1. Gen *CRY1a* vykazuje v porovnání s genem *CRY1b* 75% podobnost. Ovšem srovnáme-li podobnost mezi geny *CRY1a* a *CRY1b* a *CRY2*, zjistíme, že jsou identické pouze ze 47 % (Hirose et al., 2006). Gen *CRY1b* kóduje zkrácenou kopii *cry1a* (Tomato Genome Consortium, 2012). Funkce genu *CRY1b* není ještě zcela známá, není jasné, zda kóduje funkční protein (Weller et al., 2001).

Bylo také zjištěno, že mutant *cry1a* zvyšuje koncentraci ABA v listech rostlin rajčete, čímž dochází k ovlivnění otvírání průduchů a dojde k regulaci vodního stavu v rostlině, což může být chápáno, jako odpověď rostlin k osmotickému stresu (Liu et al., 2018). S ohledem na výzkumy u jiných rostlinných druhů bylo zjištěno, že gen *CRY1a* je zapojen do důležitých morfologicko-fyziologických procesů v rostlině rajčete.

U rostlin, které vykazovaly nadměrnou expresi genu *CRY2* byla potvrzena vyšší koncentrace anthokyanů a chlorofylu v listech. V případě rostlin rajčete se gen *CRY2* chová

jinak než u *Arabidopsis*. Zatímco u *Arabidopsis* *CRY2* pozitivně ovlivňuje kvetení, u rostlin rajčete reguluje dobu kvetení negativně (Hirose et al., 2006). Experimentálně bylo prokázáno zapojení genů *CRY1a* a *CRY2* v regulaci denních a cirkadiálních transkripčních rytmů (Facella et al., 2017).

Experimentálně byla také prokázána interakce mezi světlem a regulací hladiny fytohormonů během abiotického stresu, kdy byla prokázána vysoká koncentrace ABA u rostliny *Lactuca*, u které byla indukovaná inhibice hypokotylu, prostřednictvím modrého světla (Volmaro et al., 1998). Oproti tomu, pokud byla rostlina ozářena světlem červeným, koncentrace ABA se snížila (Baraldi et al., 1995). Tento experiment by mohl vést k myšlence, že modré a červené světlo se vzájemně podílí na metabolismu a regulaci ABA v rostlině.

V případě reakcí rostlin na osmotický stres je důležitý regulační systém zavírání a otevírání průduchů. To, že se kryptochromy podílejí na regulaci průduchů, bylo prokázáno v případě *cry1*. Ukázalo se, že se *cry1* společně s phot podílejí na otevírání průduchů, v reakci na modré světlo (Mao et al., 2005). Na reakci otevírání průduchů se podílejí také phy, a to způsobem závislým na COP1 nebo PIF3/PIF4. Interakce mezi světlem a regulačním mechanismem otevírání průduchů byla experimentálně prokázána u *Arabidopsis*, kdy mutanti *cry1* a *cry2* vykazovaly menší toleranci na osmotický stres než divoké rostliny, rostliny, u kterých byla prokázána nadměrná exprese *cry1* vykazovaly nadměrnou ztrátu vody (Mao et al., 2005). Experimentálně bylo dokázáno, že phyB zvyšuje hustotu průduchů, index průduchů a ovlivňuje přítomnost průduchů na obou stranách listů, v případě vysokého podílu R/FR (Gonzales et al., 2012). V případě rostliny rýže, mutant, který měl poruchu ve vnímání červeného světla vlivem phyB, vykazoval lepší toleranci vůči suchu, oproti divoké formě rostliny, což se fenotypově projevilo takto: mutant měl menší listy, což bylo způsobeno pravděpodobně inhibicí proliferace listových buněk a zároveň se také snížil počet průduchů (Liu et al., 2012).

V případě sucha a zkoumáním aktivity osmoprotektivních látek bylo prokázáno, že stinné podmínky pozitivně ovlivňují fitness rostlin (Asghar et al., 2020). Kvalita světla také ovlivňuje délku kořene. Delší kořeny se vyskytovaly u rostlin, na které působilo kromě červeného světla i světlo dlouhovlnné červené (Klem et al., 2019). Právě délka kořene může být pro rostliny, které rostou v extrémních podnebných podmínkách (sucho a vysoké teploty), klíčová.

3. Experimentální část

3.1. Příprava MS média

Chemikálie: 20 g sacharózy, 8,6 g kultivačního média MS (Murashige and Skoog 1962) MS basal medium (Duchefa Biochemie; M0221), 390,4 mg pufru MES 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, 1M roztok KOH, destilovaná voda (dH₂O), 14 g agaru (Duchefa Biochemie, Nizozemsko; kat. č. P1003.1000), manitol

Pracovní pomůcky: 3 l Erlenmayerova baňka, magnetické míchadlo, tyčinka na vyndání magnetického míchadla, váženka, lžička, kopistka, 1 l odměrný válec, Pasteurova plastová pipeta, 5 termolahví s uzávěrem, autoklávovací páska, barevné štítky, fixa, nůžky, hliníková fólie

Pracovní přístroje: magnetická míchačka, pH metr, technické a analytické váhy, parní autokláv, lednice

Pracovní postup pro přípravu 2 litrů MS média

Do 3 litrové Erlenmayerovy baňky bylo vloženo porcelánové míchadlo a následně byla baňka naplněna 1 litrem destilované vody. Baňka byla poté umístěna na magnetickou míchačku (otáčky na cca 350-390).

Na technické váze bylo naváženo 20 g sacharózy, která byla vsypána do Erlenmayerovy baňky. Mezitím, co se sacharóza rozpouštěla, bylo naváženo 8,6 g MS média, které bylo také vsypáno do Erlenmayerovy baňky. Na analytických vahách bylo naváženo 390,4 mg pufru MES, který byl poté přidán do Erlenmayerovy baňky.

Po rozpuštění všech látek byla magnetická míchačka zastavena a objem Erlenmayerovy baňky byl za použití odměrného válce doplněn destilovanou vodou na objem 2 litry. Magnetická míchačka byla opět zapnuta, tentokrát ovšem na nižší otáčky, a dovnitř byla vložena elektroda pH metru (hodnota pH se pohybovala kolem 5). Postupným přidáváním 1M roztoku KOH plastovou Pasteurovou pipetou byla hodnota pH roztoku upravena na pH 6,1.

Následně bylo připraveno 5 termolahví s uzávěrem. Do každé lahve bylo pomocí lžičky nasypáno 2,8 g agaru, který byl navážen na analytických vahách. Poté bylo do každé lahve nalito 400 ml z připraveného 2 litrového roztoku. Podobně byly připraveny roztoky, které obsahovaly určené koncentrace manitolu. Pro koncentraci 50 mmol/l bylo do 400 ml

roztoku MS média přidáno 3,64 g manitolu. Pro koncentraci 100 mmol/l bylo do 400 ml roztoku MS média přidáno 7,29 g manitolu. Pro koncentraci 150 mmol/l bylo do 400 ml roztoku MS média přidáno 10,93 g manitolu. Vršek lahví byl překryt kouskem hliníkové fólie a na něj byl nalepen kousek autoklávovací pásky, na níž světlé proužky po úspěšném procesu sterilizace v parním autoklávu zčernají. Připravené lahve poté pracovnice laboratoře vložila do parního autoklávu, kvůli sterilizaci. Roztok byl potom celou dobu používání uchováván v lednici.

3.2. Klíčení a kultivace semen

Rostlinný materiál: *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a od něj odvozený recesivní mutant *7B-1*

Solanum lycopersicum L. cv. Money Maker a od něj odvození recesivní mutanti *cry1-1* a *cry1-2*

Semena recesivního mutantu rajčete *7B-1* byla poskytnut V. K. Sawhney, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. Semena recesivních mutantů rajčete *cry1-1* a *cry1-2* byla poskytnuta R. E. Kendrick, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

Chemikálie: MS médium, sterilní destilovaná voda (dH₂O), 70% a 96% roztok ethanolu, komerční výrobek Savo- zředěný roztok chlornanu sodného (2,8 % aktivního chloru)

Pracovní pomůcky: stojan na zkumavky, 8 sterilních platových Petriho misek (průměr 90 mm), pinzeta, 4 50 ml zkumavky falkon (2 nesterilní a 2 sterilní), sklenička na ethanol (objem 100 ml), 10 ml automatická pipeta, sterilní špičky pro 10 ml automatickou pipetu, lihový kahan, zápalky, 500 ml kádinka, lepicí páska z netkané textilie Softpore (výrobce Batist medical, a.s.), lihový fix, hliníková fólie

Pracovní přístroje: lednice, mikrovlnná trouba, laminární flowbox, automatická růstová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko)

Pracovní postup

Nejdříve byl zapnut laminární flowbox, jehož pracovní deska byla kvůli sterilizaci setřena 70% roztokem ethanolu. V mikrovlnné troubě bylo rozehřáto MS médium v termolahvi. Mezitím byla napočítána semínka genotypů, jež se mezi sebou porovnávala. Přičemž se jednalo o 200 semínek od každého genotypu (např. 200 semínek genotypu cv. Rutgers a 200 semínek genotypu *7B-1*).

Následně byla semínka nasypána do označených nesterilních zkumavek falkon (1 zkumavka falkon = 1 genotyp). Do zkumavky falkon byly nality 4 ml komerčního roztoku Sava, jednalo se o zředěný roztok chlornanu sodného (2,8 % aktivního chloru). Savo působilo na semena po dobu 20 minut, aby došlo k dostatečné povrchové sterilizaci semen. V laminárním flowboxu bylo připraveno 8 sterilních, plastových Petriho misek. Do každé z nich, bylo nalito 20 ml MS média (odměřeno ve sterilní zkumavce falkon).

Po uplynutí doby 20 minut byla semínka 7x propláchnuta sterilní destilovanou vodou za pomoci 10 ml automatické pipety. Pro kultivaci semen jednotlivých genotypů byly použity sterilní plastové Petriho misky o průměru 90 mm. Do každé bylo pomocí pinzety, vysterylizované v roztoku ethanolu a ožehnuté nad plynovým kahanem, umístěno 50 semen, tedy pro každý genotyp byly použity čtyři Petriho misky. Misky byly poté oblepeny dvěma vrstvami lepící pásky z netkané textilie, umístěny do vertikální polohy a následně byly zabaleny hliníkovou folií. Poté probíhala samotná kultivace, ve tmě, v kultivační růstové komoře při teplotě 23°C po dobu 3-5 dní.

3.3. Přenos semen

Rostlinný materiál: viz výše

Zdroje světla: Zdroj modrého světla: trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips, USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při 440 nm

Zdroj červeného světla: trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při 660 nm

Chemikálie: MS médium, MS médium obsahující mannitol v koncentracích 50,100 a 150 mmol.l^{-1} , 70% a 96% roztok ethanolu

Pracovní pomůcky: 24 sterilních plastových Petriho misek, plastový stojan na zkumavky, 1 sterilní 50 ml plastová zkumavka falkon, sklenička na ethanol (objem 100 ml), lihový kahan, zápalky, lepící páska z netkané textilie Softpore (výrobce Batist medical, a.s.), lihový fix, hliníková folie

Pracovní přístroje: lednice, mikrovlnná trouba, laminární flowbox, kultivační růstová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko)

Pracovní postup

Nejdříve byl zapnut laminární flowbox, jehož pracovní deska byla kvůli sterilizaci setřena 70% roztokem ethanolu. V mikrovlnné troubě bylo postupně rozpuštěno MS médium bez mannitolu, dále pak MS média o koncentraci mannitolu 50, 100 a 150 mmol.l⁻¹.

Následně bylo v laminárním boxu připraveno 24 sterilních plastových Petriho misek, kdy na 12 z nich se byly přeneseny klíčící semena jednoho genotypu a do dalších 12 misek klíčící semena druhého genotypu. Roztoky s médiem byly rozděleny na Petriho misky následovně: 3 misky se základním médiem, 3 misky s médiem o c= 50 mmol.l⁻¹, 3 misky s médiem o c= 100 mmol.l⁻¹, 3 misky s médiem o c=150 mmol.l⁻¹. Z kultivační komory byla donesena již naklíčená semena, která byla podle velikosti klíčků umísťována sterilní pinzetou na jednotlivé Petriho misky. Do jedné řady se pokládalo zhruba 10 semen. Každá Petriho miska byla oblepena dvěma vrstvami lepící pásky z netkané textilie.

Misky, na kterých byla vyseta semena určená pro kultivaci na červeném a modrém světle, byly umístěny do kultivačních růstových komor, buď s červeným světlem, nebo se světlem modrým. Misky se semeny určenými pro kultivaci ve tmě byly pečlivě obaleny hliníkovou fólií. Semena byla kultivována ve vertikální poloze, v kultivační komoře, při teplotě 23 °C, po dobu 7 dnů.

3.4.Vyhodnocení experimentu

Po uplynutí 7 dnů, byly rostlinky vyjmuty z kultivačních komor. Výsledný fenotyp rostlin byl hodnocen na denním světle, v laboratorních podmínkách. Měřila se zvláště délka kořene a délka hypokotylu, a to na přesnost 1 mm. Také se přihlíželo ke vzhledu rostliny, kdy se daly pozorovat rozdíly, podle toho, v jakých světelných podmínkách rostlina rostla. Konkrétně se jednalo o délku rostliny, velikost a vzhled lístků. Délky kořene a hypokotylu jednotlivých rostlin byly zaznamenávány do připravených formulářů. Měření probíhalo pomocí pravítka a jednotlivé hodnoty byly zaznamenávány v milimetrech. Výsledky byly poté zaneseny do excelu, kde byla zpracována průměrná délka jednotlivých komponent, směrodatná odchylka, díky čemuž byly zjištěny rozdíly mezi jednotlivými genotypy.

4. Výsledky

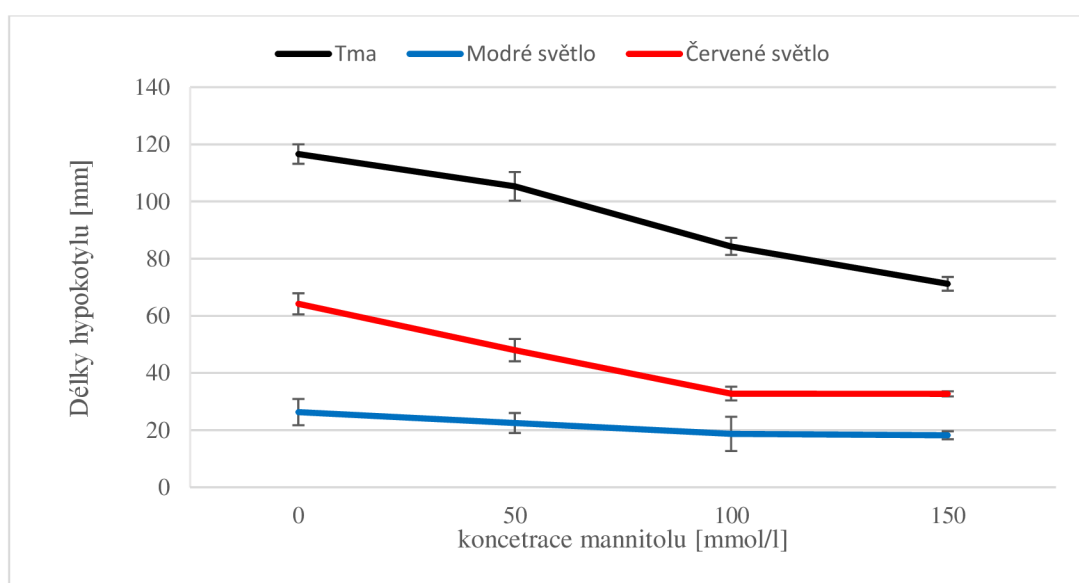
Jako modelový organismus pro experimenty byly použity rostliny rajčete jedlého (*Lycopersicon esculentum* L.) kultivaru Rutgers a od něj odvozeného mutanta *7B-1*, dále pak kultivaru Money Maker (cv. MM), se kterým byly porovnávány mutanti *cry1-1* a *cry1-2*. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje toleranci rostlin k osmotickému stresu, a pokud ano, zda se tak může dít prostřednictvím genového produktu *7B-1* (zatím neznámé funkce) a specifického fotoreceptoru pro modré světlo kryptochromu *cry1*. Sledovanými faktory v rámci experimentů byly: celkový fenotyp rostliny, délka hypokotylů a délka kořenů, dále pak procento inhibice hypokotylů a kořenů u jednotlivých genotypů. Semena experimentálních rostlin byla uchovávána v dormanci, poté bylo indukováno klíčení, které probíhalo v případě všech genotypů na MS médiu a semena byla uchovávána po tmě. Dále proběhl přenos vyklíčených semen na MS médium obohacené a manitol (c=0-150 mmol/l), který zde působil jako osmotický stresor, a rostlinky byly uchovávány v různých světelných podmínkách (D, B, R). Po týdnu proběhlo vyhodnocení experimentů, kdy byly změřeny délky kořenů a hypokotylů (viz. kapitola 3).

4.1. Vliv manitolu na růst mutanta *7B-1* a kultivaru Rutgers

V tomto experimentu byl porovnáván růst hypokotylů a kořenů rajčete kultivaru Rutgers (Obr. 9, 12) s růstem hypokotylů a kořenů mutanta *7B-1* (Obr. 10, 13) v závislosti na koncentraci manitolu. Z výsledků měření pak byla vypočítána inhibice růstu obou orgánů, kterou manitol způsoboval (Obr. 11, 14).

V případě kultivaru Rutgers, jakožto kontrolní nemutované rostliny, můžeme pozorovat vliv světelných podmínek a působení abiotického stresu na růst rostlin. Se zvyšující se koncentrací manitolu se snižovala délka hypokotylu u kultivaru Rutgers, což dokazuje jeho inhibiční účinky. V případě kultivace rostlin ve tmě došlo ke snížení délky hypokotylu z průměrných hodnot 116,6 mm při koncentraci 0 mmol/l na hodnotu 71,2 mm u koncentrace 150 mmol/l. V případě růstu rostliny na světle červeném došlo také ke snižování hypokotylů v závislosti na manitolu a to z počáteční hodnoty 64,2 mm na 32,7 mm. Nejmenší inhibiční účinky manitolu můžeme zřetelně pozorovat v případě modrého světla, kdy délky hypokotylů rostlin mají při všech koncentracích podobné průměrné hodnoty (26,3-18,2 mm). Projevila se zde inhibiční vlastnost modrého světla na růst rostlin,

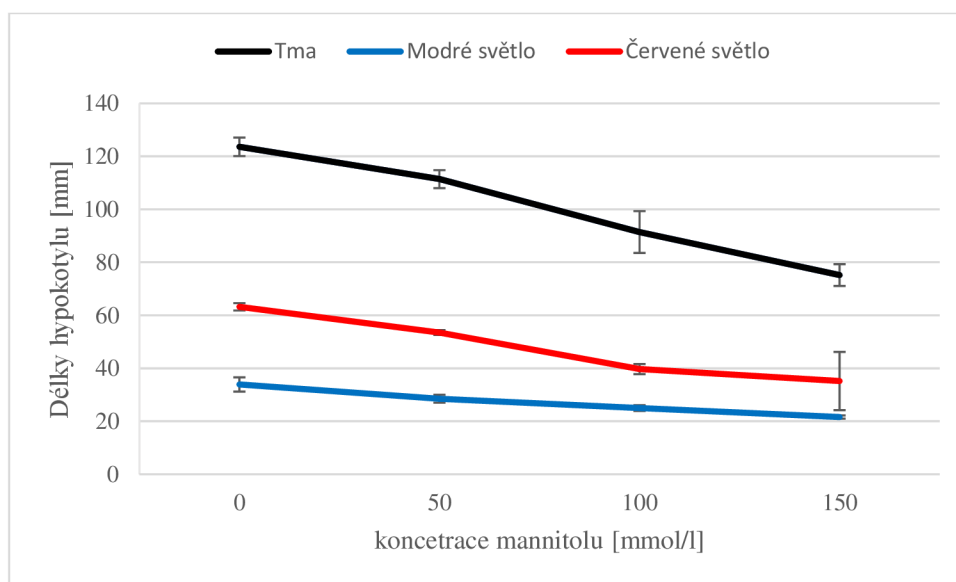
jelikož rostliny, které rostly na světle modrém, vykazovaly oproti jiným světelným podmínkám výrazně kratší hypokotyly (Obr. 9). Rostliny, které byly kultivovány ve tmě vykazovaly typicky etiolovaný fenotyp (dlouhé a křehké hypokotyly, žluté a zakrnělé lístky). Rostliny, které byly kultivovány na modrém světle byly drobné, a měly malou listovou plochu. Rostliny, které byly kultivovány na světle červeném, při koncentraci manitolu 0 mmol/l byly zelené, měly tlusté a pevné hypokotyly a měly rozvinuté zelené lístky. Se zvyšujícími se hodnotami koncentrací manitolu se zhoršoval celkový fitness rostlin. Rostliny byly zakrnělé, malé a celkově neprosplávaly.



Obrázek 9: Závislost délky hypokotyly kultivaru Rutgers na světelných podmínkách a koncentraci manitolu. Na grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotyľů (\pm SE), měření délky hypokotyľů bylo provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

Ze zjištěných výsledků u mutanta *7B-1* můžeme říct, že se vzrůstající koncentrací manitolu docházelo u tohoto mutanta ke snižování délky hypokotyly (Obr. 10). Inhibiční účinky manitolu na růst hypokotyly *7B-1* se projeví u všech koncentrací a za všech světelných podmínek. V případě modrého světla byly hypokotyly ze všech světelných podmínek nejkratší. V případě červeného světla začínala délka hypokotyly při koncentraci manitolu 0 mmol/l na 53,5 mm a u koncentrace 150 mmol/l byla délka hypokotyly pouze 35,2 mm. Co se týče fenotypu, rostliny, které byly kultivovány ve tmě, vykazovaly typický fenotyp etiolovaných rostlin, tzn., že měly světlý, tenký hypokotyl a žluté zakrnělé lístky. Rostliny, které byly kultivovány na modrém světle, byly oproti rostlinám, které rostly ve tmě

nebo na světle červeném nejmenší, měly drobné zelené hypokotyly a lístky. Rostliny, které byly kultivovány na médiu s obsahem manitolu 150 mmol/l byly zakrnělé, měly zdeformované lístky a byly znatelně menší než rostliny, které byly pěstovány na médiu s nižším obsahem manitolu (Obr. 10).

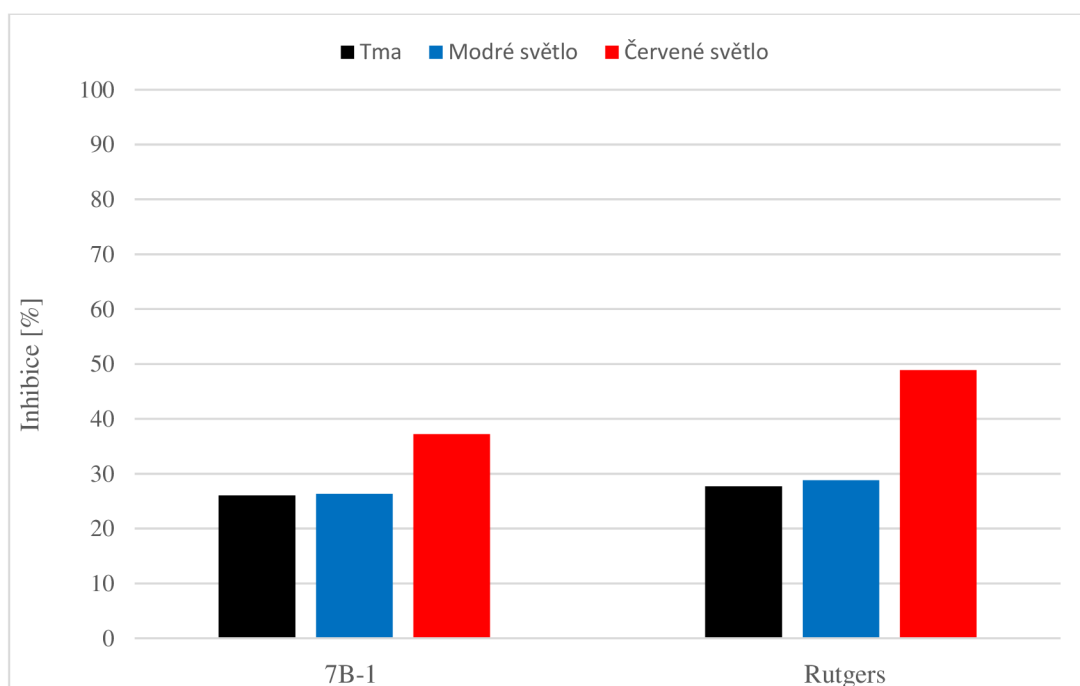


Obrázek 10: Závislost délky hypokotyly mutantu *7B-1* na světelných podmínkách a koncentraci manitolu. Na grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotylů (\pm SE), měření délky hypokotylů bylo provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

Z vypočtených inhibicí je patrné, že kontrolní genotyp Rutgers při kultivaci po tmě byl na manitol citlivý, jelikož při koncentraci 150 mmol/l byla hodnota inhibice 38,9 %. V případě kultivace na světle červeném byla inhibice hypokotylů k manitolu při koncentraci 100 mmol/l byla 48,9 %, zatímco při stejné koncentraci na světlé modrém byla naměřen inhibice pouze 28,8 % (Obr. 11). To znamená, že hypokotyly rostlin kultivovaných na modrém světle vykazovaly vůči manitolu nižší citlivost a tím pádem byly k jeho účinkům tolerantnější.

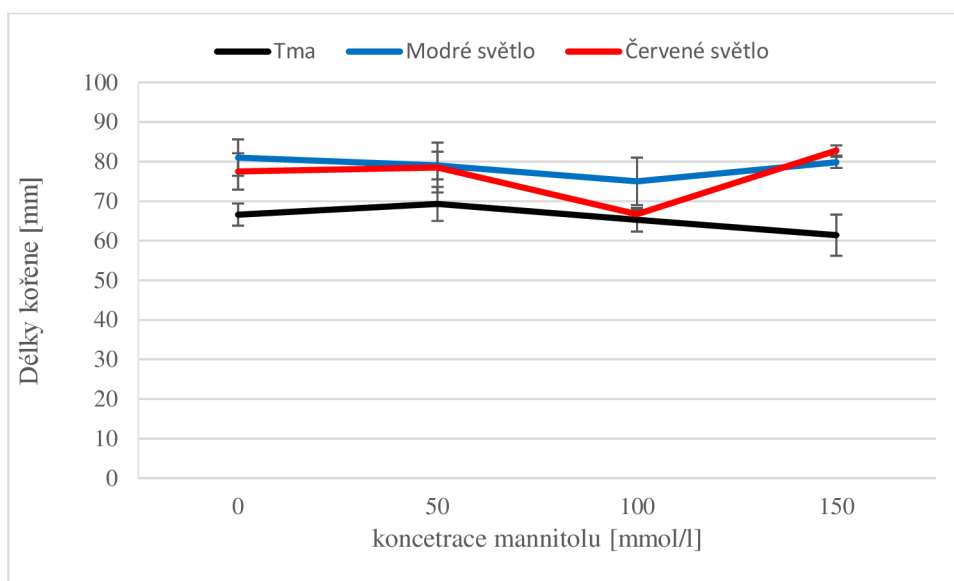
Rostliny mutantu *7B-1* vykazovaly citlivost k manitolu při kultivaci po tmě, kdy se hodnota inhibice při koncentraci 150 mmol/l pohybovala kolem 39,2 %. Podobnou citlivost vykazoval tento genotyp i v případě kultivace na světle modrém, kdy byla hodnota inhibice při koncentraci 150 mmol/l 36,3 %. V případě červeného světla se inhibice při koncentraci 150 mmol/l pohybovala okolo 44,2 %.

Co se týče srovnání obou genotypů, můžeme dle získaných výsledků konstatovat, že rostliny obou genotypů kultivované ve tmě vykazovaly podobnou citlivost k manitolu, jelikož naměřené hodnoty inhibice byly podobné, tj. asi 26 % při koncentraci 100 mmol/l (Obr.11). Podobně tomu bylo i na světle modrém, kde byl růst hypokotylů inhibován manitolem o koncentraci 100 mmol/l u obou genotypů podobně, a to asi z 27 % (Obr. 11). Rozdíl v citlivosti hypokotylů *7B-1* a cv. Rutgers k manitolu byl pozorován v případě červeného světla, kdy se vyšší tolerance k osmotickému stresu byla pozorována u mutantu *7B-1*. Při koncentraci manitolu 100 mmol/l byla u mutantu *7B-1* pozorována inhibice růstu hypokotylu 37,2 %, zatímco u kultivaru Rutgers to bylo téměř 49 % (Obr. 11).

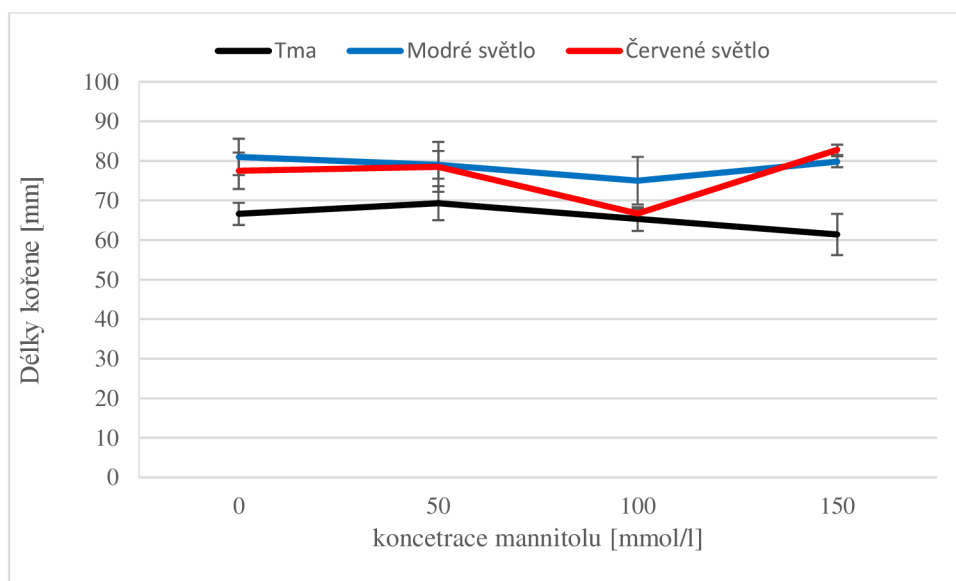


Obrázek 11: Inhibiční účinky manitolu ($c=100$ mmol/l) za různých světelných podmínek na hypokotylы genotypů *7B-1* a Rutgers. V grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na růst hypokotylů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 4 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách.

V případě růstu kořenů bylo zjištěno, že kořeny byly mnohem méně citlivé k inhibičním účinkům manitolu než hypokotylы. Jak je vidět na Obr. 12 a 13, ve tmě i na modrém a červeném světle neměl manitol ani u jednoho z obou genotypů výrazný inhibiční účinek na růst kořenů. Naměřené délky kořenů se při všech světelných podmínkách a koncentracích pohyboval ve stejných hodnotách.



Obrázek 12: Závislost délky kořene kultivaru Rutgers na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů bylo provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

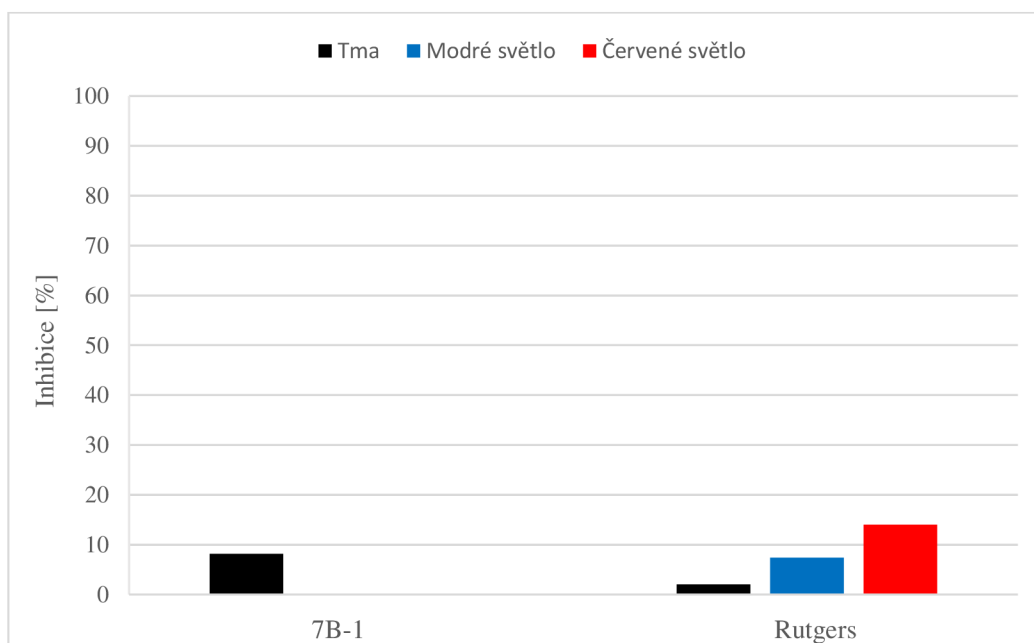


Obrázek 13: Závislost délky kořene mutanta 7B-1 na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů bylo provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

Kořeny kultivaru Rutgers vykazovaly všeobecně za všech světelných podmínek nízkou citlivost k manitolu, tudíž k němu byly prakticky tolerantní. Nejvyšší inhibice růstu kořene 14 % se projevila u koncentrace 100 mmol/l a jednalo se o světlo červené. Na světle

modrém byla při koncentraci 100 mmol/l pozorována inhibice kolem 7 %. Téměř nulový inhibiční účinek manitolu byl pozorován u etiolizovaných kořenů (Obr. 14).

U mutantu *7B-1* byla nejvyšší citlivost kořenů k inhibičnímu účinku manitolu vypočítána ve tmě (kolem 8 %), kdežto na modrém a červeném světle byl inhibiční efekt manitolu (100 mmol/l) na růst kořene *7B-1* v podstatě nulový (Obr. 14). Podobné výsledky byly pozorovány u všech testovaných koncentrací manitolu.



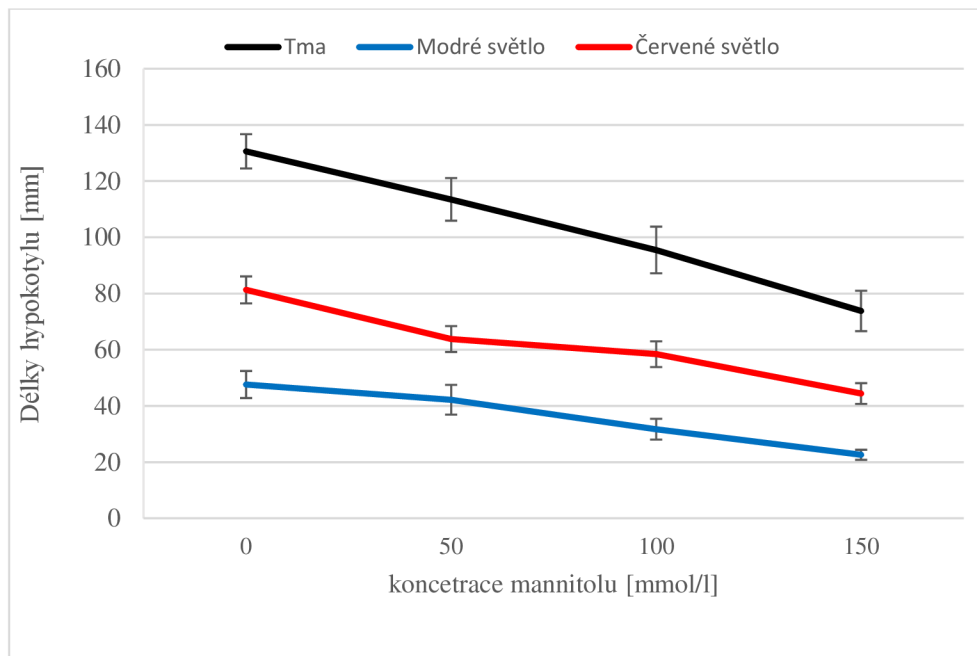
Obrázek 14: Inhibiční účinky manitolu ($c=100$ mmol/l) za různých světelných podmínek (D, B, R) na kořeny genotypů *7B-1* a Rutgers. Na grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na délky kořenů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 4 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách.

4.2. Vliv manitolu na růst mutantu *cry1-1* a kultivaru Money Maker

V tomto experimentu byl porovnáván růst hypokotylů a kořenů rajčete kultivaru Money Maker (Obr. 15, 18) s růstem hypokotylů a kořenů mutantu *cry1-1* (Obr. 16, 19). Byla vypočítána také inhibice růstu, kterou způsoboval manitol (Obr. 17, 20).

Co se týká kultivaru Money Maker, u všech světelných podmínek si můžeme všimnout, že se zvyšující se koncentrací manitolu, se délka hypokotylů snižuje. Při kultivaci

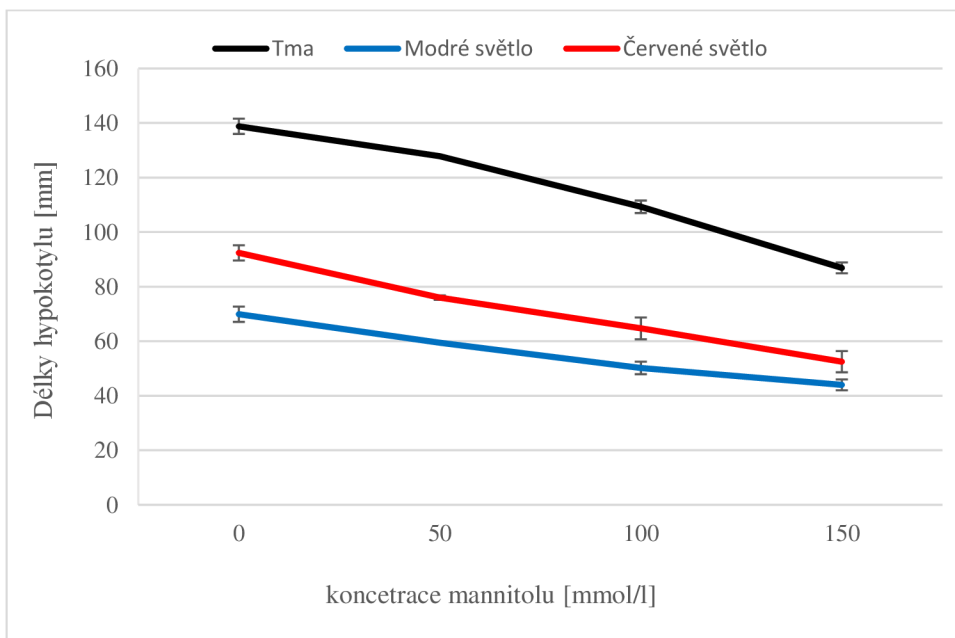
po tmě bez přítomnosti manitolu byla počáteční hodnota délky hypokotyly 130,6 mm a se zvyšující se koncentrací manitolu klesala na hodnotu 73,8 mm. V případě světla červeného byla počáteční délka hypokotyly 81,3 mm a konečná 44,4 mm. Rostliny na světle modrém měly ze všech světelných podmínek nejkratší hypokotyly, kdy délka hypokotyly při koncentraci 0 mmol/l byla 47,6 mm a při koncentraci 150 mmol/l hodnota klesla na 22,6 mm (Obr. 15). Rostliny, které byly kultivovány po tmě vykazovaly typický etiolovaný vzhled. Rostliny, které byly kultivovány na modrém světle byly malé a měly také malou listovou plochu. Rostliny, kultivované na světle červeném měly při koncentraci 0 mmol/l pevné a silné hypokotyly a rozvinuté zelené listy. Se zvyšující se koncentrací manitolu se fitness rostlin zhoršoval.



Obrázek 15: Závislost délky hypokotyly kultivaru Money Maker na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotylů (\pm SE), měření délky hypokotyly bylo provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

U mutanta *cry1-1* byly rovněž pozorovány inhibiční účinky manitolu na růst hypokotylů, neboť se vzrůstající koncentrací manitolu docházelo ke snižování průměrné délky hypokotylů rostlin za všech světelných podmínek. Tento sestupný trend byl pozorován za všech testovaných světelných podmínek. Při růstu ve tmě klesla délka hypokotyly ze 138,8 mm na 86,9 mm. Při růstu na světle červeném byla délka hypokotyly při koncentraci 0 mmol/l 92,4 mm a při koncentraci 150 mmol/l to bylo pouze 52,5 mm. Na světle modrém

byly délky hypokotylů v porovnání s předešlými světelnými podmínkami nejkratší. Délka hypokotylu při koncentraci 0 mmol/l byla 69,9 mm a při koncentraci 150 mmol/l se hodnota snížila na 44 mm (Obr.16). V případě růstu po tmě vykazovaly mutantní rostliny typický etiolovaný vzhled. Rostliny, které byly kultivovány na světle modrém, měly oproti rostlinám, které rostly ve tmě zhruba poloviční vzrůst a malé lístky. Se vzrůstající koncentrací manitolu byly rostliny více poškozené. Konkrétně u koncentrací 100-150 mmol/l byly rostliny malé, zakrnělé, měly slabé a tenké hypokotyly, jejich listy byly malé a stočené. Toto platilo u všech světelných podmínek, přičemž nejlepší fitness vykazovaly rostliny, které byly kultivovány při koncentraci 0 mmol/l.

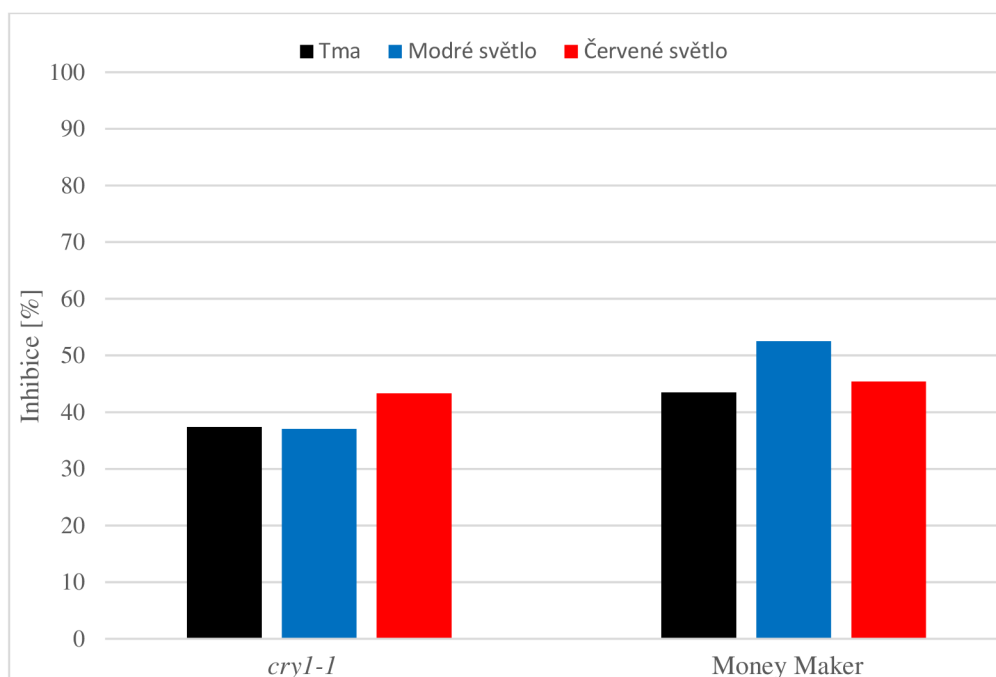


Obrázek 16: Závislost délky hypokotylu mutantu *cry1-1* na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. Na grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotylů (\pm SE), měření délky hypokotylu provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách (D, B, R). Průměrné hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů

Co se týká inhibičních účinků manitolu na růst hypokotylů kontrolní rostliny Money Maker, byly u všech světelných podmínek podobné, přičemž při koncentraci 150 mmol/l se naměřené hodnoty pohybovaly okolo 45 %.

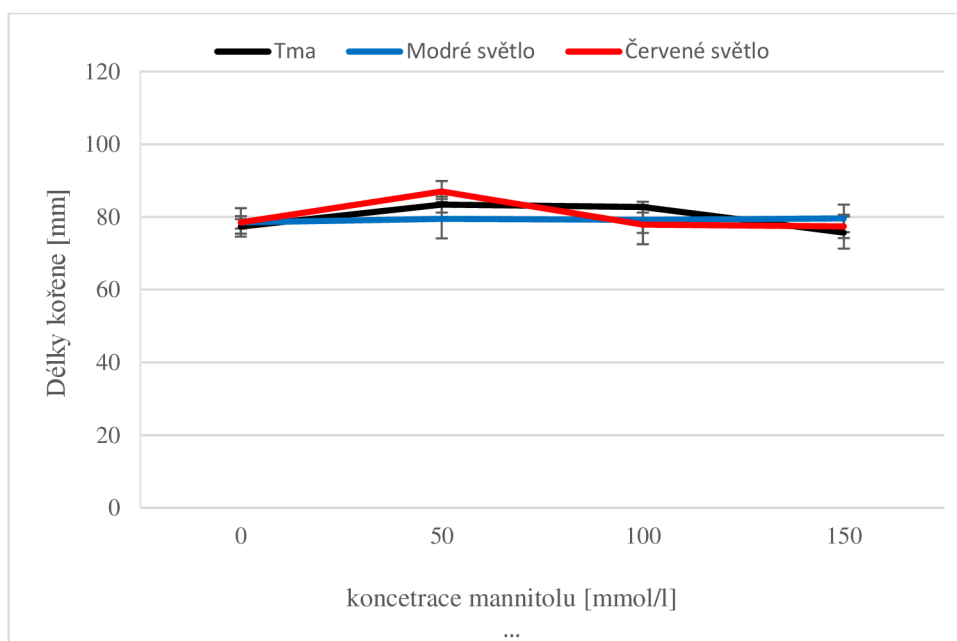
V případě mutantní rostliny *cry1-1* byla pozorována mírně zvýšená citlivost hypokotylů rostlin rostoucích na modrém světle, kdy byla hodnota inhibice 46,7 %.

Srovnáme-li oba genotypy, můžeme říct, že hypokotyly cv. MM i mutanta *cryI-1* ukazovaly podobnou citlivost k manitolu, a to při všech testovaných světelných podmínkách (Obr. 17).

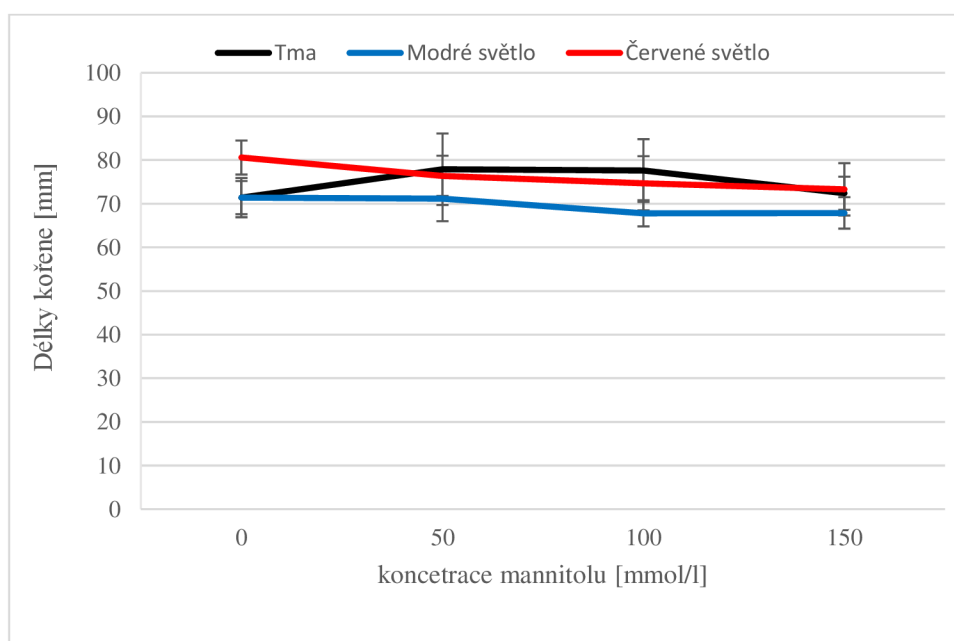


Obrázek 17: Inhibiční účinky manitolu ($c=150$ mmol/l) za různých světelných podmínek (D, B, R) na hypokotyly genotypů Money Maker a *cryI-1*. V grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na růst hypokotylů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 4 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách (D, B, R).

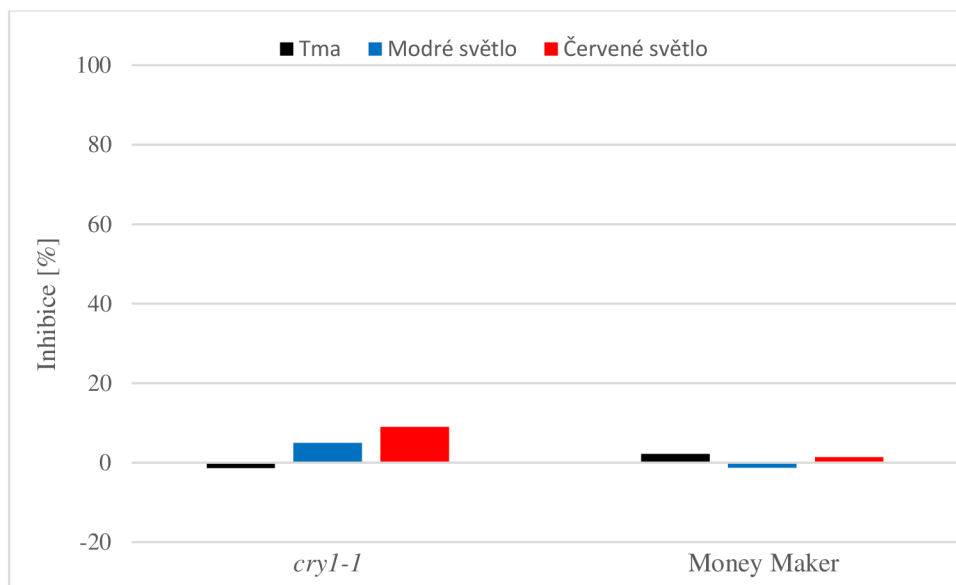
V případě studia růstu kořenů, můžeme pozorovat, že inhibiční účinky testovaných koncentrací manitolu na růst kořene byly v podstatě nulové (cv. MM, Obr. 18) nebo minimální (mutant *cryI-1*, Obr. 19), a to při všech testovaných světelných podmínkách, Srovnání inhibice růstu kořenů obou genotypů je pak znázorněno na Obr. 20),



Obrázek 18: Závislost délky kořene kultivaru Money Maker na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách (D, B, R). Naměřené hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.



Obrázek 19: Závislost délky kořene mutanta *cry1-1* na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách (D, B, R). Naměřené hodnoty byly získány ze 4 na sobě nezávislých experimentů.

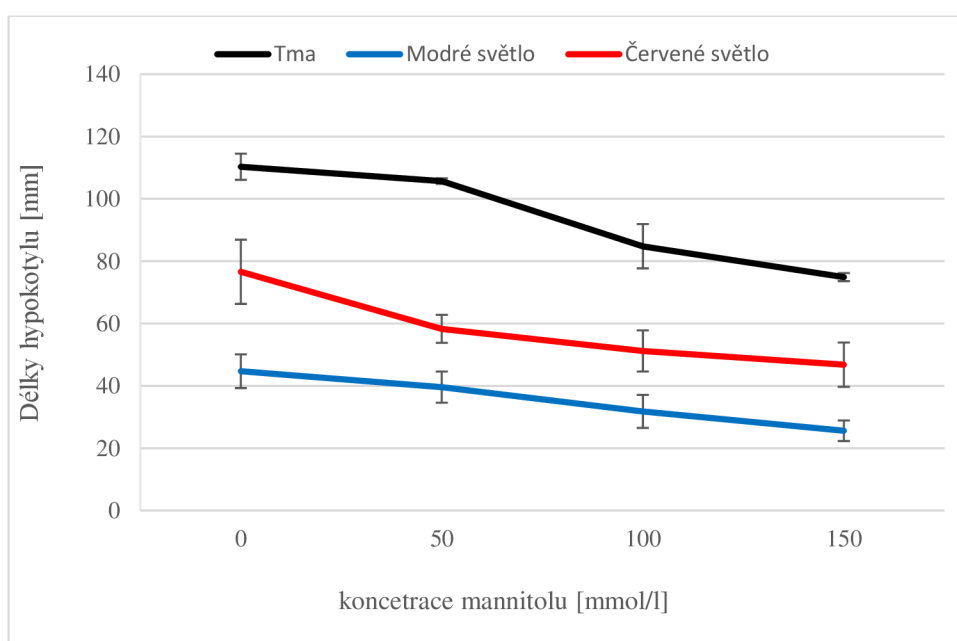


Obrázek 20: Inhibiční účinky manitolu (c=150 mmol/l) za různých světelných podmínek na kořeny genotypů Money Maker a *cry1-1*. Na grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na délky hypokotylů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 4 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách.

4.3. Vliv manitolu na růst mutantu *cry1-2* a kultivaru Money Maker

V tomto experimentu byl porovnáván růst hypokotylů a kořenů rajčete kultivaru Money Maker (Obr. 21, 24) s růstem hypokotylů a kořenů mutantu *cry1-2* (Obr. 22, 25) v závislosti na koncentraci manitolu. Byla vypočítána také inhibice růstu, kterou manitol způsoboval (Obr. 23, 26).

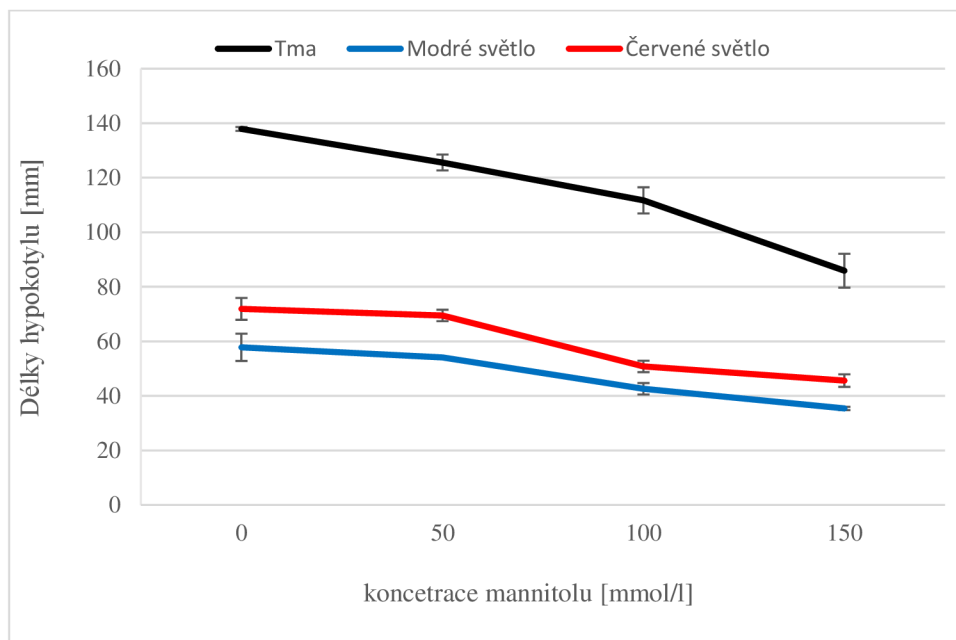
Růst hypokotylu cv. Money Maker vykazoval v podstatě stejný trend na všech testovaných světelných podmínkách (Obr. 21), jako v předešlém experimentu s mutantem *cry1-1* (viz. kapitola 4.2.).



Obrázek 21: Závislost délky hypokotylu kultivaru Money Maker na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotylů (\pm SE), měření délky hypokotylu provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Naměřené hodnoty byly získány ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

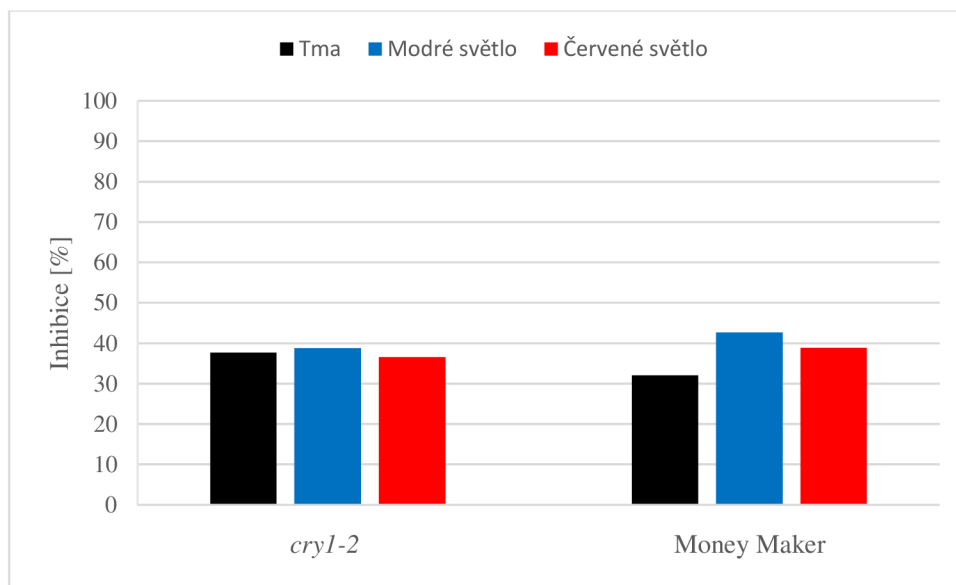
U mutantu *cry1-2* byly stejně jako u ostatních genotypů prokázány inhibiční účinky manitolu, protože s navyšující se koncentrací manitolu, klesaly délky hypokotylů (Obr. 22). V případě růstu ve tmě byly hypokotyly při koncentraci 0 mmol/l dlouhé 137,9 mm a při koncentraci 150 mmol/l se průměrné délky zkrátily na 86 mm. Rostliny kultivované ve tmě vykazovaly typický etiolovaný vzhled. Při růstu na modrém světle byly hypokotyly nejkratší. Při koncentraci 0 mmol/l byly průměrné hodnoty 57,9 mm a při koncentraci 150 mmol/l se délky hypokotylů zkrátily na 35,4 mm. Rostliny byly drobné, zelené a měly malou listovou plochu. Na červeném světle byla počáteční délka hypokotylů 71,8 mm a konečná délka při

koncentraci 150 mmol/l 45,6 mm. Rostliny byly zelené, měly silné hypokotyly a rozvinuté zelené lístky. Dále mutant *cry1-2* vykazoval delší hypokotyly než rostliny kultivaru Money Maker (Obr. 21, 22).



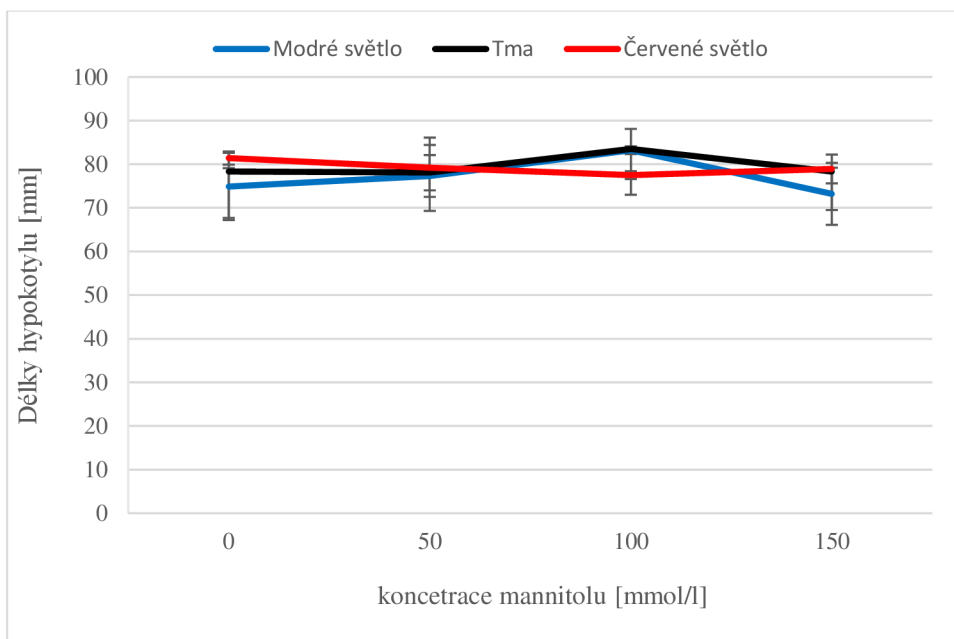
Obrázek 22: Závislost délky hypokotyly mutantu *cry1-2* na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky hypokotylů (\pm SE). Měření délky hypokotyly provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných. Naměřené hodnoty byly získány ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

Porovnáme-li mezi sebou oba genotypy, co se týče jejich citlivosti k manitolu o koncentraci 150 mmol/l, zjistíme že inhibiční účinky na růst hypokotylů byly velice podobné u cv. MM a mutantu *cry1-2*, a to za všech testovaných světelných podmínek (Obr. 23).

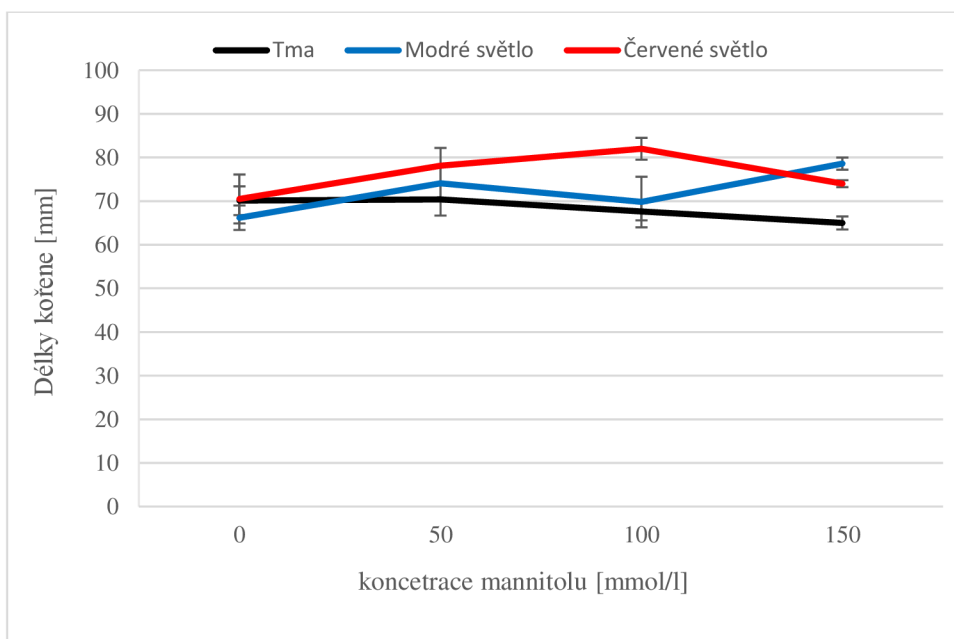


Obrázek 23: Inhibiční účinky manitolu ($c=150$ mmol/l) za různých světelných podmínek na hypocotylu genotypů Money Maker a *cry1-2*. Na grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na délky hypocotylů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách.

V případě kultivaru Money Maker jsou délky kořenů ze všech světelných podmínek a všech koncentrací manitolu podobné (Obr. 24). Nedošlo ani k výraznému poklesu délky s narůstající koncentrací manitolu, což znamená, že inhibiční účinky manitolu na kořeny byly minimální (Obr. 25 a 26). Co se týká délek kořenů u mutantu *cry1-2*, nebyly zde prokázány žádné inhibiční účinky, ani v případě vysokých koncentrací manitolu (Obr. 26). To znamená, že stejně jako u předešlých testovaných genotypů vykazují kořeny v porovnání s hypocotylu vyšší odolnost k abiotickému stresu .

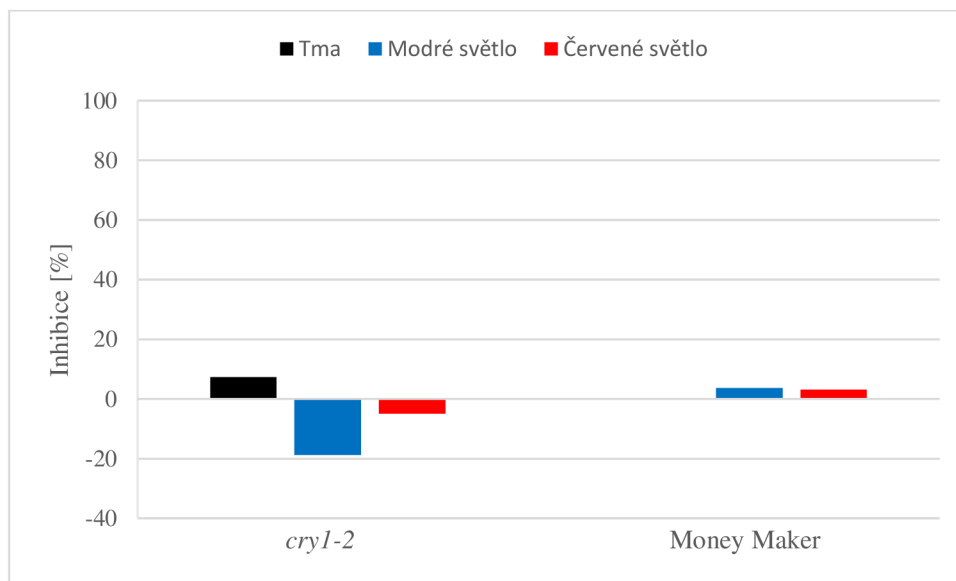


Obrázek 24: Závislost délky kořene kultivaru Money Maker na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Naměřené hodnoty byly získány ze 3 na sobě nezávislých experimentů.



Obrázek 25: Závislost délky kořene mutanta *cry1-2* na světelných podmínkách a vzrůstající koncentraci manitolu. V grafu jsou zaznamenány průměrné délky kořenů (\pm SE), měření délky kořenů provedeno 7 dní po kultivaci na různých světelných podmínkách. Naměřené hodnoty byly získány ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

Porovnáme-li oba genotypy, tak ze získaných výsledků zjistíme, že o něco vyšší toleranci k manitolu na růst kořene vykazuje mutant *cryI-2*, a to na modrém a červeném světle, zatímco při kultivaci po tmě byly hodnoty inhibice u obou genotypů podobné, tedy nulové či velmi nízké. Konkrétně na světle modrém se jedná o koncentraci 50 mmol/l, kdy je inhibice u cv. MM -1,8 %, kdežto u mutantu *cryI-2* byla pozorována zřetelná stimulace 11,9 %. Dále byl patrný rozdíl při koncentraci 150 mmol/l, kdy je inhibice u cv. MM 3,7 % a u mutantu *cryI-2* to byla stimulace 18,6 % (Obr. 26). V případě kultivace na červeném světle se vyšší citlivost u kultivaru Money Maker projevila také u dvou koncentrací, a to při koncentraci 50 mmol/l, kdy byla naměřená hodnota inhibice 2,8 % a u mutantu *cryI-2* -11,2 %. U koncentrace 100 mmol/l byla hodnota inhibice u cv. MM 4,8 % a u genotypu *cryI-2* se jednalo o hodnotu stimulace 16,4 %.



Obrázek 26: Inhibiční účinky manitolu ($c=150$ mmol/l) za různých světelných podmínek (D, B, R) na kořeny genotypů Money Maker a *cryI-2*. V grafu jsou zaznamenány % inhibice, kterou způsoboval manitol na délky kořenů. Výsledné hodnoty byly vypočítány z průměrných hodnot získaných ze 4 na sobě nezávislých experimentů. Měření rostlin proběhlo po 7 dnech kultivace na různých světelných podmínkách (D, B, R).

5. Diskuse

V této bakalářské práci byla zkoumána souvislost mezi světelnými podmínkami a abiotickým stresem. Tato skutečnost byla studována na rostlině rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), konkrétně na genotypch kultivaru Rutgers a od něj odvozeného mutanta *7B-1*, dále pak kultivaru Money Maker a od něj odvozených mutantů *cry1-1* a *cry1-2*. Ze získaných výsledků můžeme potvrdit, že se podařilo prokázat souvislost mezi světelnými podmínkami, ve kterých se rostlina nachází a abiotickým stresem. Manitol, jakožto osmotický stresor, vykazoval ve všech experimentech inhibiční účinky na růst rostlin. S přibývajícím koncentrací se fitness rostlin výrazně snižovalo a schopnosti růstu rostlin se snižovaly. Koncentrace 150 mmol/l způsobovala rostlinám obtížné růstové podmínky. Z tohoto poznatku můžeme říct, že vyšší koncentrace manitolu, by zjevně způsobily obrovskou zátěž na fyziologické pochody rostlin a možná by se dalo hovořit i o případném úhynu rostlin. Podařilo se také potvrdit rozdíly ve vnímání abiotického stresu za odlišných světelných podmínek v rámci zkoumaných genotypů. Tyto rozdíly mezi zkoumanými genotypy byly ovšem v mnoha případech menší, než bylo původně očekáváno. Vyšších rozdílů mezi jednotlivými genotypy by se dalo pravděpodobně dosáhnout navýšením koncentrace manitolu.

V případě kultivaru Rutgers získané výsledky ukázaly, že červené světlo zvyšovalo inhibiční účinek manitolu na růst hypokotylu (Obr. 11). U mutanta *7B-1* bylo tento efekt pozorován rovněž, ale v menší míře. Je tedy možné, že zvýšení citlivosti hypokotylů rajčete k manitolu vlivem červeného světla, může být zprostředkováno funkčním produktem genu *7B-1* (funkce genu však nebyla zatím identifikována). Podstata defektu u mutanta *7B-1* spočívá v signalizaci modrého světla, což způsobuje u tohoto mutanta specifickou rezistenci na abiotický, či biotický stres, pod vlivem modrého světla (Fellner and Sawhney, 2001, 2002). Molekulární podstata působení *7B-1* nebyla doposud poznána, je ovšem jisté, že se jedná o negativní ovlivnění fototropinových reakcí (Hlavinka et al., 2013; Fellner et al., nepublikované výsledky). Tento výsledek se shoduje s výsledkem studie, kterou v roce 2001 a 2002 provedli Fellner a Sawhney, kdy zjistili, že mutant *7B-1* je více tolerantní k osmotickému stresu (Fellner and Sawhney 2001, 2002), a navíc je méně citlivý ke světlem indukované inhibici růstu hypokotylu, má vyšší hladinu endogenní ABA a nižší hladinu GA (Fellner et al., 2001).

Na rozdíl od kultivaru cv. Rutgers, citlivost hypokotylů kultivaru cv. MM k manitolu byla světlem výrazně ovlivňována pouze při nejnižší testované koncentraci manitolu 50 mmol/l. Při vyšších koncentracích takový účinek červeného světla nebyl pozorován. Výsledky dále ukázaly, že u mutanta *cry1-2* k tomuto zvýšení citlivosti hypokotylu k manitolu nedocházelo. Tato mutace tedy vedla na červeném světle ke zvýšené toleranci hypokotylů k nízkým koncentracím manitolu. Z výsledků se lze tedy domnívat, že fotoreceptor *cry1* může zvyšovat citlivost (tedy snižovat toleranci) hypokotylů k nízkým hodnotám osmotického stresu.

Mutanti *cry1-1* a *cry1-2* jsou monogenní mutanti, kteří mají defekt v genu kódující fotoreceptor *cry1*, který je zapojen do fotomorfogenních reakcí rostlin. Oproti kultivaru Money Maker, má mutant *cry1-1* na modrém a červeném světle delší hypokotily. To potvrzuje, že se fotoreceptor *cry1* podílí na regulaci délky hypokotylu.

Z výsledků mezi kultivarem Money Maker a od něho odvozeným mutantem *cry1-2* můžeme říct, že se podařilo prokázat zapojení genu *CRY1* v odpovědích hypokotylů rajčete na abiotický stres.

Větší tolerance k manitolu byla prokázána i v případě kořenů. Růst kořenů cv. MM byl mírně nebo vůbec inhibován manitolem. U mutanta *cry1-2* však byla na modrém i červeném světle pozorována místo inhibice stimulace růstu kořenů aplikovaným manitolem, neboli kořeny mutanta *cry1-2* vykazovaly na modrém a červeném světle toleranci k manitolu. Na základě zjištěných výsledků může být tedy učiněn závěr, že funkční fotoreceptor *cry1* může, podobně jako u hypokotylů, zvyšovat citlivost (tedy snižovat toleranci) kořenů rajčete k osmotickému stresu.

6. Závěr

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje toleranci rostlin k osmotickému stresu a pokud ano, zda se tak může dít prostřednictvím specifických receptorů pro modré světlo. Experimenty byly prováděny v *in vitro* podmínkách a při studiu byl uplatněn genetický přístup, který spočíval ve fyziologické analýze fotomorfogenních mutantů rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), a to konkrétně monogenního mutantu *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2*. Jako osmotický stresor působil v roztoku MS média manitol.

Ze získaných výsledků se podařilo prokázat interakce mezi světlem a abiotickým stresem. Bylo také zjištěno, že červené světlo zesiluje odpověď hypokotylů rajčete k osmotickému stresu a je možno se domnívat, že tento účinek červeného světla je zprostředkován funkčním produktem genu *7B-1*. Z výsledků experimentů s kultivarem Money Maker a mutantem *cry1-2* lze dedukovat, že gen *CRY1* může být zapojen v odpovědích hypokotylů rajčete na abiotický stres, a to konkrétně tak, že *cry1* může zvyšovat citlivost (tedy snižovat toleranci) hypokotylů k nízkým hodnotám osmotického stresu.

Větší tolerance k manitolu byla prokázána i v případě kořenů. Růst kořenů kultivaru Money Maker byl mírně nebo vůbec inhibován manitolem. U mutantu *cry1-2* však byla na modrém i červeném světle pozorována místo inhibice stimulace růstu kořenů aplikovaným manitolem, neboli kořeny mutantu *cry1-2* vykazovaly na modrém a červeném světle toleranci k manitolu. Na základě zjištěných výsledků může být tedy učiněn závěr, že funkční fotoreceptor *cry1* může, podobně jako u hypokotylů, zvyšovat citlivost (tedy snižovat toleranci) kořenů rajčete k osmotickému stresu.

Domnívám se, že abychom získali jasnější výsledky o toleranci a citlivosti rostlin na abiotický stres, mohli bychom použít manitol, nebo nějakou jinou osmoaktivní látku, ale o vyšších koncentracích, než bylo použito v těchto experimentech. Pro další výzkum zapojení světla a fotoreceptorů v toleranci rostlin k abiotickým stresům, by bylo dobré použít mutanty s defekty v jiných fotoreceptorech a transgenní rostliny, které overexprimují studovaný fotoreceptor.

7. Seznam použité literatury

- Ahmad M**, Photocycle and signaling mechanisms of plant cryptochromes, *Current opinion in plant biology*, 2016, 33:108-115
- Ahmad M, Cashmore AR**, HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor, *Nature*, 1993, 366(6451):162-166
- Angelovici R, Galili G, Fernie AR, Fait A**, Seed desiccation: a bridge between maturation and germination, *Trends in plant science*, 2010, 15(4):211-218
- Arana M, Sánchez-Lamas M, Strasser B, Ibarra SE, Cerdan PD, Botto JF, Sanchez RA**, Functional diversity of phytochrome family in the control of light and gibberellin-mediated germination in *A. thaliana*. *Plant, cell & environment*, 2014, 37(9):2014-2023
- Asghar MA, Du J, Jiang H, Li Y, Sun X, Shang J, Yang W**, Shade pretreatment enhanced drought resistance of soybean, *Environmental and Experimental Botany*, 2020, (171):103952
- Baskin CC, Baskin JM**, When breaking seed dormancy is a problem try a move-along experiment, *Native Plants Journal*, 2003, 4(1):17-21
- Baskin CC, Baskin JM**, A classification system for seed dormancy, *Seed science research*, 2004, 14(1):1-16
- Bae G, Choi G**, Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual review of plant biology*, 2008, (59):281
- Banerjee R, Schleicher E, Meier S, Viana RM, Pokorny R, Ahmad M, Batschauer A**, The signaling state of *Arabidopsis* cryptochrome 2 contains flavin semiquinone, *Journal of biological chemistry*, 282(20):14916-14922
- Batlla D, Benech-Arnold RL**, A predictive model for dormancy loss in *Polygonum aviculare* L. seeds based on changes in population hydrotime parameters, *Seed Science Research*, 2004, 14(3):277-286.
- Baraldi R, Bertazza G, Predieri S**, Light effects on in vitro rooting of pear cultivars of different rhizogenic ability, *Plant cell, tissue and organ culture*, 1995, 41(2):139-143
- Barrero JM, Downie AB, Xu Q, Gubler F**, A role for barley CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination, *The Plant Cell*, 2014, 26(3):1094-1104
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M**, Cloning of DOG1, a quantitative trait locus controlling seed dormancy in *Arabidopsis*, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(45): 17042-17047

- Bewley JD**, Seed germination and dormancy, *The plant cell*, 1997, 9(7):1055
- Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK**, A reversible photoreaction controlling seed germination, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1952,38(8):662-666
- Boudsocq M, Lauriere C**, Osmotic signaling in plants. Multiple pathways mediated by emerging kinase families, *Plant physiology*,2005, 138(3):1185-1194
- Briggs WR**, Phototropism: some history, some puzzles, and a look ahead, *Plant physiology*, 2014,164(1):13-23
- Britt AB**, Repair of DNA damage induced by solar UV, *Photosynthesis Research*, 2004, 81(2):105-112
- Brown BA, Jenkins GI**, UV-B signaling pathways with different fluence-rate response profiles are distinguished in mature *Arabidopsis* leaf tissue by requirement for UVR8, HY5, and HYH. *Plant physiology*, 2008, 146(2): 576
- Canamero RC, Bakrim N, Bouly JP, Garay A, Dudkin EE, Habricot Y, Ahmad M**, Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 2006, 224(5):995-1003
- Casal JJ**, Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade. *Annual Review in Plant Biology*, 2013, 64(1):403-427
- Cloix C, Kaiserli E, Heilmann M, Baxter KJ, Brown BA, O'Hara A, Jenkins GI**, C-terminal region of the UV-B photoreceptor UVR8 initiates signaling through interaction with the COP1 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2012, 109(40):16366-16370.
- Crepy MA, Casal JJ**, Photoreceptor-mediated kin recognition in plants, *New Phytologist*, 2015, 205(1):329-338
- Cutler AJ, Krochko JE**, Formation and breakdown of ABA, *Trends in plant science*, 1999, 4(12):472-478
- de Carbonnel M, Davis P, Roelfsema MRG, Inoue SI, Schepens I, Lariguet P, Fankhauser C**, The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning, *Plant physiology*, 2010,152(3):1391-1405
- de Wit M, Galvao VC, Frankhauser C**, Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development, *Annual review of Plant Biology*, 2016, (67): 513-537

Demarsy E, Schepens I, Okajima K, Hersch M, Bergmann S, Christie JM, Fankhauser C, Phytochrome Kinase Substrate 4 is phosphorylated by the phototropin 1 photoreceptor, *The EMBO journal*, 2012, 31(16):3457-3467

Devlin PF, Kay SA, Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity, *The Plant Cell*, 2000, 12(12):2499-2509

Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demarsy E, Langowski L, Kleine-Vehn J, Fan Y, Friml J, Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*, *Nature cell biology*, 2011, 13(4):447-452

El-Esawi M, Arthaut LD, Jourdan N, d'Harlingue A, Link J, Martino CF, Ahmad M, Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of *Arabidopsis* cryptochrome, *Scientific Reports*, 2017, 7(1):1-9

Emiliani J, Grotewold E, Ferreyra MLF, Casati P, Flavonols protect *Arabidopsis* plants against UV-B deleterious effects. *Molecular Plant*, 2013, 6(4):1376-1379

Exner V, Alexandre C, Rosenfeldt G, Alfarano P, Nater M, Caflisch A, Hennig L, A gain-of-function mutation of *Arabidopsis* cryptochrome1 promotes flowering, *Plant physiology*, 2010, 154(4):1633-1645

Esmon CA, Tinsley AG, Ljung K, Sandberg G, Hearne LB, Liscum E, A gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2006, 103(1):236-241

Facella P, Carbone F, Placido A, Perrotta G, Cryptochrome 2 extensively regulates transcription of the chloroplast genome in tomato, *FEBS Open Bio*, 2017, 7(4):456-471

Fantini E, Facella P, Cryptochromes in the field: how blue light influences crop development, *Physiologia plantarum*, 2020, 169(3):336-346

Fedoroff NV, Battisti DS, Beachy RN, Cooper PJ, Fischhoff DA, Hodges CN, Knauf VC, Lobell D, Mazur BJ, Molden D, Reynolds MP, Ronald PC, Rosegrant MW, Sanchez PA, Vonshak A, Zhu JK, Radically rethinking agriculture for the 21st century, *Science*, 2010, 327(5967):833-834

Fellner M, Sawhney VK, Seed germination in a tomato male sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low temperature stresses, *Theoretical and Applied Genetics*, 2001, (102):215–221

Fellner M, Sawhney VK, The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid, 2002, *Planta*, 214(5):675-682

Fenner MK, Fenner M, Thompson K, *The ecology of seeds*, 2005, Cambridge University Press

- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C**, Molecular aspects of seed dormancy, 2008
- Finch-Savage WE, Clay HA**, The influence of embryo restraint during dormancy loss and germination of *Fraxinus excelsior* seeds, In Basic and applied aspects of seed biology, 1997, 245-253, Springer
- González CV, Ibarra SE, Piccoli PN, Botto JF, Boccalandro HE**, Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*, *Plant, cell & environment*, 2012, 35(11):1958-1968
- Graeber K, Linkies A, Steinbrecher T, Mummenhoff K, Tarkowská, D, Turečková V, Leubner-Metzger G**, DELAY OF GERMINATION 1 mediates a conserved coat-dormancy mechanism for the temperature-and gibberellin-dependent control of seed germination, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2014, 111(34):3571-3580
- Groisman R, Polanowska J, Kuraoka I, Sawada JI, Saijo M, Drapkin R, Nakatani Y**, The ubiquitin ligase activity in the DDB2 and CSA complexes is differentially regulated by the COP9 signalosome in response to DNA damage, *Cell*, 2003, 113(3): 357-367
- Guo H, Duong H, Ma N, Lin C**, The *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism, *The Plant Journal*, 1998, 19(3):279-287
- Fankhauser C, Chory J**, Light control of plant development. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 1997, (13):203-229
- Franklin KA, Quail PH**, Phytochrome functions in *Arabidopsis* development, *Journal of experimental botany*, 2010, 61(1):11-24
- Frąszczak B**, Effect of short-term exposure to red and blue light on dill plants growth, *Horticultural Science*, 2013, 40 (4): 177-185
- Gu NN, Zhang YC, Yang HQ**, Substitution of a conserved glycine in the PHR domain of *Arabidopsis* cryptochrome 1 confers a constitutive light response, *Molecular plant*, 2012, 5(1):85-97
- Hauser F, Waadt R, Schroeder JI**, Evolution of abscisic acid synthesis and signaling mechanisms, *Current Biology*, 2011, 21(9):346-355
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E**, Phytochrome E controls light-induced germination of *Arabidopsis*, *Plant physiology*, 2002, 128(1):94-200
- Hlavinka J, Nauš J, Fellner M**, Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening, *Plant Science*, 2013, (209):75-80
- Heslop-Harrison J**, Germination, *Encyclopedia Britannica*, 2021

Hideg É, Jansen MA, Strid Å, UV-B exposure, ROS, and stress: inseparable companions or loosely linked associates?, *Trends in plant science*, 2013, 18(2): 107-115

Hirose F, Shinomura T, Tanabata T, Shimada H, Takano M, Involvement of rice cryptochromes in de-etiolation responses and flowering, *Plant and cell physiology*, 2006, 47(7):915-925

Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ, Molecular networks regulating Arabidopsis seed maturation, after-ripening, dormancy and germination, *New Phytologist*, 2008, 179(1):33-54

Horie T, Karahara I, Katsuhara M, Salinity tolerance mechanisms in glycophytes: An overview with the central focus on rice plants, *Rice*, 2012 5(1):1-18

Chaves I, Pokorny R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Ahmad M, The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals, *Annual review of plant biology*, 2011, 62(1): 335-364

Chen G, Hu Q, Luo LE, Yang T, Zhang S, Hu Y, Xu G, Rice potassium transporter O s HAK 1 is essential for maintaining potassium-mediated growth and functions in salt tolerance over low and high potassium concentration ranges, *Plant, Cell & Environment*, 2015, 38(12):2747-2765

Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y, Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants, *Journal of integrative plant biology*, 2020, 62(1):25-54.

Chen M, Chory J, Fankhauser C, Light signal transduction in higher plants, *Annual review of genetics*, 2004, 38(1):87-117

Chen X, Chen G, Li J, Hao X, Tuerxun Z, Chang X, Huang Q, A maize calcineurin B-like interacting protein kinase ZmCIPK42 confers salt stress tolerance, *Physiologia plantarum*, 2021, 171(1):161-172

Choudhury FK, Rivero RM, Blumwald E, Mittler R, Reactive oxygen species, abiotic stress and stress combination, *Plant journal*, 2017, 90(5):856-867

Christie JM, Phototropin blue-light receptors, *Annual review of plant biology*, 2007, (58):21-45

Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin, J, Murphy AS, Phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism, *PLoS biology*, 2011

Inoue K, Nishihama R, Kataoka H, Hosaka M, Manabe R, Nomoto M, Kohchi T, Phytochrome signaling is mediated by PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR in the liverwort *Marchantia polymorpha*, *The Plant Cell*, 2016, 28(6): 1406-1421

- Ivakov A, Flis A, Apelt F, Fünfgeld M, Scherer U, Stitt M, Suslov D**, Cellulose synthesis and cell expansion are regulated by different mechanisms in growing Arabidopsis hypocotyls, *The Plant Cell*, 2017, 29(6):1305-1315
- Jacobsen JV, Pressman E**, A structural study of germination in celery (*Apium graveolens* L.) seed with emphasis on endosperm breakdown, *Planta*, 1979, 144(3):241-248
- Jeong RD, Chandra-Shekara AC, Barman SR, Navarre D, Klessig DF, Kachroo A, Kachroo, P**, Cryptochrome 2 and phototropin 2 regulate resistance protein-mediated viral defense by negatively regulating an E3 ubiquitin ligase, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(30):13538-13543
- Jiang B, Shi Y, Zhang X, Xin X, Qi L, Guo H, Yang S**, PIF3 is a negative regulator of the CBF pathway and freezing tolerance in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2017, 114(32):6695-6702
- Jiang Z, Xu G, Jing Y, Tang W, Lin R**, Phytochrome B and REVEILLE1/2-mediated signalling controls seed dormancy and germination in Arabidopsis, *Nature communications*, 2016, 7(1):1-10
- Jones HG**, Plants and microclimate: a quantitative approach to environmental plant physiology, e-book, Cambridge university press, 2013
- Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C**, Light-regulated plant growth and development, *Current topics of developmental biology*, 2010, (91): 29-66
- Kendrick, Richard E., and Gerd HM Kronenberg**, Photomorphogenesis in plants, Springer science & business media, 1994, 2012
- Kim WY, Park HJ, Yun DJ**, A new insight of salt stress signaling in plant, *Molecules and cells*, 2016, 39(6):447
- Klem K, Gargallo-Garriga A, Rattanapichai W, Oravec M, Holub P, Veselá B, Urban O**, Distinct morphological, physiological, and biochemical responses to light quality in barley leaves and roots, *Frontiers in Plant Science*, 2019, (10):1026
- Klose C, Nagy F, Schäfer E**, Thermal reversion of plant phytochromes, *Molecular plant*, 2020, 13(3):386-397
- Kozai, T**, Why LED lighting for urban agriculture? In *LED lighting for urban agriculture*, Springer, 2016, (1):3-18
- Kucera B, Cohn MA, Leubner-Metzger G**, Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination, *Seed science research*, 2005, 15(4):281-307

Kumar SV, Lucyshyn D, Jaeger KE, Alós E, Alvey, E., Harberd NP, Wigge PA, Transcription factor PIF4 controls the thermosensory activation of flowering, *Nature*, 2012, 484(7393):242-245

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Nambara E, The Arabidopsis cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism, *The EMBO journal*, 2004, 23(7):1647-1656

Kuromori T, Miyaji T, Yabuuchi H, Shimizu H, Sugimoto E, Kamiya A, Shinozaki K, ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2010, 107(5):2361-2366

Kuromori T, Sugimoto E, Shinozaki K, Intertissue signal transfer of abscisic acid from vascular cells to guard cells, *Plant physiology*, 2014, 164(4):1587-1592

Leivar P, Monte E, Oka Y, Liu T, Carle C, Castillon A, Quail PH, Multiple phytochrome-interacting bHLH transcription factors repress premature seedling photomorphogenesis in darkness, *Current Biology*, 2008, 18(23):1815-1823

Leivar P, Quail PH, PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub, *Trends in plant science*, 2011, 16(1):19-28

Leivar P, Monte E, PIFs: systems integrators in plant development, *The Plant Cell*, 2014, 26(1):56-78

Legris M, Boccaccini A, Stem phototropism toward blue and ultraviolet light, *Physiologia plantarum*, 2020, 169(3):357-368

Leubner-Metzger G, Functions and regulation of β -1, 3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening, *Seed Science Research*, 2003,13(1):17-34

Li FW, Melkoniam M, Rothfels CJ, Villarreal JC, Stevenson DW, Graham SW, Mathews S, Phytochrome diversity in green plants and the origin of canonical plant phytochromes, *Nature communications*, 2015, 6(1):1-12

Liang T, Li X, Liu H, How plants coordinate their development in response to light and temperature signals, *The Plant Cell*, 2022, 34(3):955-966

Li Y, Zhai Q, Li C, Sun J, Qi L, PIF4 and PIF5 transcription factors link blue light and auxin to regulate the phototropic response in Arabidopsis, *The Plant Cell*, 2013, 25(6):2102-2114

Lin C, Yang H, Guo, H., Mockler T, Chen J, Cashmore AR, Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(5):2686-2690

- Lin C, Shalitin D**, Cryptochrome structure and signal transduction, Annual review of plant biology, 2003, 54(1): 469-496.
- Lin C, Todo T**, The cryptochromes. Genome biology, 2005 6(5):1-9
- Liscum E, Askinosie SK, Leuchtman DL, Morrow J, Willenburg KT, Coats DR**, Phototropism: growing towards an understanding of plant movement, The Plant Cell, 2014, 26(1):38-55
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, Lisiero D, Lin C**, Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis, Science, 2008, 322(5907):1535-1539
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C**, The action mechanisms of plant cryptochromes, Trends in plant science, 2011, 16(12):684-691
- Liu J, Zhang F, Zhou J, Chen F, Wang B, Xie X**, Phytochrome B control of total leaf area and stomatal density affects drought tolerance in rice, Plant molecular biology, 2012, 78(3):289-300
- Liu X, Hu P, Huang M, Tang Y, Li Y, Li L, Hou X**, The NF-YC–RGL2 module integrates GA and ABA signalling to regulate seed germination in Arabidopsis, Nature Communications, 2016, 7(1):1-14
- Liu Z, Zhang Y, Wang J, Li P, Zhao C, Chen Y, Bi Y**, Phytochrome-interacting factors PIF4 and PIF5 negatively regulate anthocyanin biosynthesis under red light in Arabidopsis seedlings, Plant Science, 2015, (238):64-72
- Liu CC, Ahammed GJ, Wang GT, Xu CJ, Chen KS, Zhou YH, Yu JQ**, Tomato CRY1a plays a critical role in the regulation of phytohormone homeostasis, plant development, and carotenoid metabolism in fruits, Plant, Cell & Environment, 2018, (41): 354–366
- Longo C, Holness S, De Angelis V, Lepri A, Occhigrossi S, Ruta V, Vittorioso P**, From the Outside to the Inside: New insights on the main factors that guide seed dormancy and germination, Genes, 2021, 12(1):52
- Luo Q, Lian HL, He SB, Li L, Jia KP, Yang HQ**, COP1 and phyB physically interact with PIL1 to regulate its stability and photomorphogenic development in Arabidopsis, The Plant Cell, 2014, 26(6):2441-2456
- Manz B, Muller K, Kucera B, Volke F, Leubner-Metzger G**, Water uptake and distribution in germinating tobacco seeds investigated in vivo by nuclear magnetic resonance imaging, Plant physiology, 2005, 138(3):1538-1551

Meng Y, Li H, Wang Q, Liu B, Lin C, Blue light–dependent interaction between cryptochrome2 and CIB1 regulates transcription and leaf senescence in soybean, *The Plant Cell*, 2013, 25(11):4405-4420

Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH, Yang HQ, A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2005, 102(34):12270-12275

Mathews S, Sharrock, RA, Phytochrome gene diversity, *Plant, Cell & Environment*, 1997, 20(6):666-671

Marusig D, Tombesi S, Abscisic acid mediates drought and salt stress responses in *Vitis vinifera*—A review, *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(22):8648

Mawphlang OI, Kharshiing EV, Photoreceptor mediated plant growth responses: implications for photoreceptor engineering toward improved performance in crops, *Frontiers in plant science*, 2017, (8):1181

Murashige T, Skoog A, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures, *Physiologia plantarum*, 1962, (15): 473–497

Müller P, Ahmad M, Light-activated cryptochrome reacts with molecular oxygen to form a flavin–superoxide radical pair consistent with magnetoreception, *Journal of Biological Chemistry*, 2011, 286(24):21033-21040

Müller-Xing R, Xing Q, Goodrich J, Footprints of the sun: memory of UV and light stress in plants, *Frontiers in plant science*, 2014, (5):474

Nambara E, Marion-Poll A, Abscisic acid biosynthesis and catabolism, *Annual review of plant biology*, 2005, (56):65

Nishimura N, Tsuchiya W, Moresco JJ, Hayashi Y, Satoh K, Kaiwa N, Yamazaki T, Control of seed dormancy and germination by DOG1-AHG1 PP2C phosphatase complex via binding to heme, *Nature communications*, 2018, 9(1):1-14

Née G, Kramer K, Nakabayashi, K, Yuan B, Xiang Y, Miatton, E, Soppe WJ, Delay of germination1 requires PP2C phosphatases of the ABA signalling pathway to control seed dormancy, *Nature communications*, 2017, 8(1):1-9

Nozue K, Kanegae T, Imaizumi T, Fukuda S, Okamoto H, Yeh KC, Wada M, A phytochrome from the fern *Adiantum* with features of the putative photoreceptor NPH1, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1998, 95(26): 15826-15830

Oh E, Kim J, Kang C, Choi G, PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Cell*, 2004, (16): 3045-3058

- Oh E, Yamaguchi S, Kamiva Y, Bae G, Chung W, Choi G**, Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis, *Plant Journal*, 2006, (47): 124-139
- Oh S, Montgomery BL**, Phytochrome-dependent coordinate control of distinct aspects of nuclear and plastid gene expression during anterograde signaling and photomorphogenesis, *Frontiers in Plant Science*, 2014
- Oikawa K, Kasahara M, Kiyosue T, Kagawa T, Suetsugu N, Takahashi F, Kanegae T, Niwa Y, Kadota A, Wada M**, Chloroplast unusual positioning1 is essential for proper chloroplast positioning, *Plant Cell*, 2003, 15(12):2805-2815
- Özgür S, Sancar A**, Analysis of autophosphorylating kinase activities of Arabidopsis and human cryptochromes, *Biochemistry*, 2006, 45(44):13369-13374
- Paik I, Kathare PK, Kim JI, Hug E**, Expanding roles of PIFs in signal integration from multiple processes, *Molecular Plant*, 2017, 10(8)1035-1046
- Paik I, Huq E**, Plant photoreceptors: multi-functional sensory proteins and their signaling networks, *Seminars in cell & developmental biology*, 2019, (92):114-121
- Partch CL, Clarkson MW, Özgür S, Lee AL, Sancar A**, Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor, *Biochemistry*, 2005, 44(10):3795-3805
- Pedmale UV, Celaya RB, Liscum E**, Phototropism: mechanism and outcomes, *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 2010,8
- Penfield S, Josse EM, Halliday KJ**, A role for an alternative splice variant of PIF6 in the control of Arabidopsis primary seed dormancy, *Plant molecular biology*, 2010, 73(1):89-95
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO**, Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2008, 105(52): 21023-21027
- Qin F, Shinozaki Y, Yamaguchi-Shinozaki K**, Achievements and challenges in understanding plant abiotic stress responses and tolerance, *Plant and Cell Physiology*, 2011, 52(9):1569-1582
- Qadir M, Quillérou E, Nangia V, Murtaza G, Singh M, Thomas RJ, Noble AD**, Economics of salt-induced land degradation and restoration, *Natural resources forum*, 2014, 38(4):282-295
- Quail PH**, Phytochromes, *Current biology*, 2010, 20(12):504-507

Quan R, Lin H, Mendoza I, Zhang Y, Cao W, Yang Y, Shang M, Chen S, Pardo JM, Guo Y, SCABP8/CBL10, a putative calcium sensor, interacts with the protein kinase SOS2 to protect Arabidopsis shoots from salt stress, *Plant Cell*, 2007, (19):1415-1431

Rizzini L, Favory JJ, Cloix C, Faggionato D, O'Hara A, Kaiserli E, Ulm R, Perception of UV-B by the Arabidopsis UVR8 protein, *Science*, 2011, 332(6025):103-106

Rosenfeldt G, Viana RM, Mootz HD, von Arnim AG, Batschauer A, Chemically induced and light-independent cryptochrome photoreceptor activation, *Molecular plant*, 2008, 1(1):4-14

Rockwell NC, Su YS, Lagarias JC, Phytochrome structure and signaling mechanisms, *Annual review of plant biology*, 2006, (57):837

Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, Swartz TE, Christie JM, Briggs WR, Wada M, Okada K, Nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation in Arabidopsis, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, 98(12):6969-6974

Sánchez-Montesino R, Bouza-Morcillo L, Marquez J, Ghita M Duran-Nebreda S, Gómez L, Oñate-Sánchez L, A regulatory module controlling GA-mediated endosperm cell expansion is critical for seed germination in Arabidopsis, *Molecular plant*, 2019, 12(1):71-85

Seo M, Koshiba T, Complex regulation of ABA biosynthesis in plants, *Trends in plant science*, 2002, 7(1):41-48

Szantoi Z, Review of the use of remotely-sensed data for monitoring biodiversity change and tracking progress towards the aichi biodiversity targets, e-book, 2013

Shalitin D, Yang H, Mockler TC, Maymon M, Guo H, Whitelam GC, Lin C, Regulation of Arabidopsis cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation, *Nature*, 2002, 417(6890):763-767

Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T, Lin C, Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1, *The Plant Cell*, 2003, 15(10):2421-2429

Sharma P, Chatterjee M, Burman N, Khurana JP, Cryptochrome 1 regulates growth and development in Brassica through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling, 2014, *Plant, Cell & Environment*, 37(4):961-977

Sharma K, Nayyar H, Regulatory networks in pollen development under cold stress. *Frontiers in Plant Science*, 2016

Sheehan MJ, Farmer PR, Brutnell TP, Structure and expression of maize phytochrome family homeologs, *Genetics*, 2004, 167(3):1395-1405

Shinomura T, Nagatani A, Chory J, Furuya M, The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A, *Plant physiology*, 1994, 104(2):363-371

Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K, Gene networks involved in drought stress response and tolerance, *Journal of experimental botany*, 2007, 58(2):221-227

Shu K, Zhang H, Wang S, Chen M, Wu Y, Tang S, Xie, Q, ABI4 regulates primary seed dormancy by regulating the biogenesis of abscisic acid and gibberellins in *Arabidopsis*, *PLoS genetics*, 2013, 9(6):1003577

Somers, DE, Fujiwara S, Thinking outside the F-box: novel ligands for novel receptors. *Trends in plant science*, 2009, 14(4): 206-213

Soy J, Leivar P, González-Schain N, Martín G, Diaz C, Sentandreu M, Monte E, Molecular convergence of clock and photosensory pathways through PIF3–TOC1 interaction and co-occupancy of target promoters, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(17):4870-4875

Stephan AB, Kunz HH, Yang E, Schroeder JI, Rapid hyperosmotic-induced Ca²⁺ responses in *Arabidopsis thaliana* exhibit sensory potentiation and involvement of plastidial KEA transporters, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2016, 113(35):5242-5249

Stephenson PG, Fankhauser C, Terry MJ, PIF3 is a repressor of chloroplast development, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2009, 106(18):7654-7659

Sullivan S, Waksman T, Paliogianni D, Henderson L, Lütkemeyer M, Suetsugu N, Christie JM, Regulation of plant phototropic growth by NPH3/RPT2-like substrate phosphorylation and 14-3-3 binding, 2021, *Nature communications*, 12(1):1-13

Rai N, O'Hara A, Farkas D, Safronov O, Ratanasopa K Wang F, Morales LO, The photoreceptor UVR8 mediates the perception of both UV-B and UV-A wavelengths up to 350 nm of sunlight with responsivity moderated by cryptochromes, *Plant, Cell & Environment*, 2020, 43(6): 513-1527

Rea PA, Plant ATP-binding cassette transporters, *Annual review of plant biology*, 2007, 58(1):347-375

Ritz T, Yoshii T, Foerster C, Ahmad M, Cryptochrome: A photoreceptor with the properties of a magnetoreceptor?, *Communicative & integrative biology*, 2010, 3(1):24-27

Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A, Plant physiology and development, 6th edition., Sinauer associates, e-book, 2015

Taiz L, Zeiger E, Plant physiology, 3th edition, Sinauer associates, e-book, 2002

Takahashi JS, Bass J, Circadian integration of metabolism and energetics, Science, 2010, 330(6009): 1349-1354

Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JA, McCarty DR, Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize, Proceedings of the National Academy of Sciences, 1997, 94(22):12235-12240

Tan C, Ultrafast Dynamics of Flavin Cofactor in Photolyase/Cryptochrome Family, The Ohio State University, 2013

Tissot N, Ulm R, Cryptochrome-mediated blue-light signalling modulates UVR8 photoreceptor activity and contributes to UV-B tolerance in Arabidopsis, Nature communications, 2020, 11(1):1-10

Takahashi S, Badger MR, Photoprotection in plants: a new light on photosystem II damage, Trends in plant science, 2011, 6(1):53-60

Tomato Genome Consortium X, The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution, Nature, 2012, 485(7400):635

Van Zelm E, Zhang Y, Testerink C, Salt tolerance mechanisms of plants, Annual review of plant biology, 2020, (71):403-433

Vleeshouwers LM, Bouwmeester HJ, Karssen CM, Redefining seed dormancy: an attempt to integrate physiology and ecology, Journal of Ecology, 1995, 1031-1037

Volmaro C, Pontín M, Luna V, Baraldi R, Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca sativa* (L.) cv. Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA3 and abscisic acid, Plant growth regulation, 1998, 26(3):165-173

Wang Q, Lin C, Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants, Annual Review of Plant Biology, 2020, (71):103

Wang W, Vinocur B, Altman A, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, Planta, 2003, 218(1):1-14

Weidler G, zur Oven-Krockhaus S, Heunemann M, Orth C, Schleifenbaum F, Harter K, Batschauer A, Degradation of Arabidopsis CRY2 is regulated by SPA proteins and phytochrome A, The Plant Cell, 24(6), 2610-2623

Weller JL, Perrotta G, Schreuder MEL, Tuinen van A, Koornneef M, Giuliano G, Kendrick RE, Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2, *Plant journal*, 2001, (25): 427–440

Willige BC, Ahlers S, Zourelidou M, Barbosa IS, Demarsy E, Trevisan M, Schwechheimer C, D6PK AGCVIII kinases are required for auxin transport and phototropic hypocotyl bending in *Arabidopsis*, *The Plant Cell*, 2013, 25(5):1674-1688

Whippo CW, Hangarter RP, Second positive phototropism results from coordinated co-action of the phototropins and cryptochromes, *Plant Physiology*, 2003, 132(3):1499-1507

Wu G, Spalding EP, Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of *Arabidopsis* seedlings, *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(47):18813-18818

Xu, D, Light-regulated development in *arabidopsis*, dizertační práce, 2014

Xu ZY, Kim SY, Hyeon DY, Kim DH, Dong T, Park Y, Hwang I, The *Arabidopsis* NAC transcription factor ANAC096 cooperates with bZIP-type transcription factors in dehydration and osmotic stress responses, *The Plant Cell*, 2013, 25(11):4708-4724

Yang Y, Guo Y, Unraveling salt stress signaling in plants, *Journal of integrative plant biology*, 2018, 60(9):796-804

Yang YJ, Zuo ZC, Zhao XY, Li X, Klejnot, J, Li Y, Lin CT, Blue-light-independent activity of *Arabidopsis* cryptochromes in the regulation of steady-state levels of protein and mRNA expression, *Molecular Plant*, 2008, 1(1):167-177

Yuan F, Yang H, Xue Y, Kong D, Ye R, Li C, Pei ZM, OSCA1 mediates osmotic-stress-evoked Ca²⁺ increases vital for osmosensing in *Arabidopsis*, *Nature*, 2014, 514(7522):367-371

Yu X, Klejnot J, Zhao, X, Shalitin D, Maymon M, Yang H, Lin C, *Arabidopsis* cryptochrome 2 completes its posttranslational life cycle in the nukleus, *The Plant Cell*, 2007, 19(10):3146-3156

Zhou Y, Liu C, Tang D, Yan L, Wang D, Yang Y, Gui J, Zhao XY, Li L, Tang XD, Yu F, Li JL, Liu LL, Zhu Y, Lin J, Liu XM, The receptor-like cytoplasmic kinase STRK1 phosphorylates and activates CatC, thereby regulating H₂O₂ homeostasis and improving salt tolerance in rice, *Plant Cell*, 2018, (30):1100-1118

Zhou T, Meng L, Mai Y, Liu Q, Zhang Y, Yang Z, Bian M, Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in *Arabidopsis*, *Plant cell reports*, 2018, 37(2):251-264

Zhu JK, Salt and drought stress signal transduction in plants, Annual review of plant Biology, 2002, (53):247-273