

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přirodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Zapojení světelných signálních drah v toleranci rostlin
k suchu**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|--|
| Autor: | Natálie Holoušková |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2022 |

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Natálie Holoušková |
| Název práce | Zapojení světelných signálních drah v toleranci rostlin k suchu |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2022 |
| Abstrakt | <p>Předkládaná bakalářská práce se zabývá vlivem světelných signálních drah na toleranci rostlin k suchu. V teoretické části této práce je shrnuta problematika růstu rostlin vlivem světla, světelných signálních drah a odpovědi rostlin na abiotické stresy. Cílem experimentální části bylo zjistit, zda kvalita světla ovlivňuje schopnost rostlin tolerovat stres vyvolaný suchem. K tomu byly na rostlinách <i>Solanum lycopersicum</i> testovány v podmínkách <i>in vitro</i> různé koncentrace polyethylenglykolu (PEG) a byl studován jejich růst v závislosti na světelných podmínkách. Z výsledků lze vyvodit závěr, že světlo ovlivňuje schopnosti rostlin tolerovat stres suchem, a to pravděpodobně prostřednictvím fotoreceptorů PhyB1 a CRY1.</p> |
| Klíčová slova | abiotický stres, fotomorfogeneze, fytochromy, kryptochromy, <i>Solanum lycopersicum</i> , sucho |
| Počet stran | 56 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Natálie Holoušková |
| Title of thesis | Involvement of light signaling pathways in plant tolerance to drought |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| The year of presentation | 2022 |
| Abstract | <p>This bachelor thesis studies influence of light signaling pathways on tolerance of plants to drought. The theoretical part of this thesis summarizes the problematics about effect of light to plant growth, light signaling pathways and plant responses to abiotic stresses. The experimental part aims to detect if quality of light can affect ability of plants to tolerate drought stress. For this, different concentrations of polyethylenglycol were tested in conditions <i>in vitro</i> on growth of <i>Solanum lycopersicum</i> plants as a function of light conditions. The results of this thesis led to the conclusion that light can affect plants response to drought stress, likely mediated by photoreceptors PhyB1 and CRY1.</p> |
| Keywords | abiotic stress, cryptochromes, drought, photomorphogenesis, phytochromes, <i>Solanum lycopersicum</i> , |
| Number of pages | 56 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

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

.....
V Olomouci dne

.....
Natálie Holoušková

Poděkování

Tímto bych chtěla poděkovat svému vedoucímu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za mnoho cenných rad, konzultací, trpělivost a čas, který se mnou strávil při vypracovávání mé bakalářské práce. Velké díky patří také celé pracovní skupině molekulární fyziologie za jejich rady při práci a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE | 10 |
| 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY | 11 |
| 2.1 Klíčení a růst rostliny | 11 |
| 2.2 Fotomorfogeneze | 12 |
| 2.3 Fotoreceptory | 13 |
| 2.3.1 Fytochromy | 14 |
| 2.3.2 Kryptochromy | 16 |
| 2.3.3 Fototropiny | 18 |
| 2.3.4 Další fotoreceptory vnímající modré světlo | 20 |
| 2.4 Rostliny a stres | 20 |
| 2.4.1 Abiotický stres | 21 |
| 2.4.2 Světelné signální dráhy a abiotický stres způsobený suchem | 22 |
| 3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 25 |
| 3.1 Rostlinný materiál | 25 |
| 3.2 Materiál a metodika | 25 |
| 3.2.1 Seznam použitých chemikálií | 25 |
| 3.2.1 Seznam použitých přístrojů | 26 |
| 3.2.3 Příprava média | 26 |
| 3.2.4 Výsev semen | 27 |
| 3.2.5 Přenos vyklíčených semen | 27 |
| 3.2.6 Měření rostlin a hodnocení experimentů | 27 |
| 4 VÝSLEDKY | 29 |
| 4.1 Vliv polyethylenglykolu na růstové reakce kořene | 29 |
| 4.1.1 Mutant <i>7B-1</i> | 29 |
| 4.1.2 Mutant <i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i> | 30 |

| | |
|---|----|
| 4.1.3 Mutant <i>hp-1</i> | 32 |
| 4.1.4 Mutant <i>tri1</i> | 34 |
| 4.2 Vliv polyethylenglykolu na růstové reakce hypokotylu..... | 36 |
| 4.2.1 Mutant <i>7B-1</i> | 36 |
| 4.2.2 Mutant <i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i> | 37 |
| 4.2.3 Mutant <i>hp-1</i> | 39 |
| 4.2.4 Mutant <i>tri1</i> | 41 |
| 5 DISKUZE..... | 43 |
| 6 ZÁVĚR | 48 |
| 7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY | 50 |

Seznam zkratek

| | |
|-------------------|---|
| ABA | <i>abscisic acid</i> (kyselina abscisová) |
| BL | <i>blue light</i> (modré světlo) |
| BLUS1 | <i>blue light signaling 1</i> |
| CCE | <i>cryptochrome C-terminal extension</i> doména |
| COP1 | <i>CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENETIC 1</i> |
| CRY | <i>cryptochrome</i> (krytochrom) |
| D | <i>dark</i> (tma) |
| DDB1 | <i>UV-damaged DNA binding protein 1</i> |
| FAD | <i>flavin adenine dinucleotide</i> (flavinadenindinukleotid) |
| FADH• | <i>flavin semiquinone</i> (flavosemichinon) |
| FAD _{ox} | FAD v oxidovaném stavu |
| FKF1 | <i>flavin-binding kelch repeat F box protein</i> |
| FRL | <i>far-red light</i> (dlouhovlnné červené světlo) |
| GA | <i>gibberellic acid</i> (kyselina giberelová) |
| GL | <i>green light</i> (zelené světlo) |
| HIR | <i>high-irradiance response</i> (reakce k vysokému ozáření) |
| LFR | <i>low fluence response</i> (reakce k nízkému ozáření) |
| LKP2 | <i>LOV kelch protein 2</i> |
| LOV | <i>light, oxygen and voltage</i> (doména regulována světlem, kyslíkem nebo napětím) |
| MS médium | Murashige a Skoog médium |
| MTHF | <i>methenyltetrahydrofolate</i> (methenyltetrahydrofolát) |
| PHR | <i>photolyase-related</i> |

| | |
|------|---|
| PHY | <i>phytochrome</i> (fytochrom) |
| phyA | <i>phytochrome A</i> (fytochrom A) |
| phyB | <i>phytochrome B</i> (fytochrom B) |
| phyC | <i>phytochrome C</i> (fytochrom C) |
| phyD | <i>phytochrome D</i> (fytochrom D) |
| phyE | <i>phytochrome E</i> (fytochrom E) |
| PP1 | <i>protein phosphatase 1</i> (protein fosfatáza 1) |
| RL | <i>red light</i> (červené světlo) |
| ROS | <i>reactive oxygen species</i> (reaktivní formy kyslíku) |
| UV-A | <i>ultraviolet A light</i> (ultrafialové A záření) |
| VLFR | <i>very-low fluence response</i> (reakce k velmi nízkému ozáření) |
| WT | <i>wild type</i> (divoký typ) |
| ZTL | zeitlupe |

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Klíčovou roli v životě rostliny zastává světlo. Rostliny světlo využívají jako primární zdroj energie a také jako zdroj světelných signálů řídících metabolické pochody. Pro příjem světelného záření jsou rostliny vybaveny speciálními receptory – fotoreceptory. Fytochromy jsou používány pro vnímání červeného světla. Modré světlo vnímají fotoreceptory zvané kryptochromy, fototropiny a zeitlupe receptory.

Rostliny jsou přisedlé organismy neschopné pohybu z místa na místo, a proto na ně působí velké množství stresových faktorů z vnějšího prostředí, před kterými nemůžou uniknout. Stres rostlin dělíme na abiotický a biotický. Abiotický stres je způsoben fyzikálními nebo chemickými faktory. Jedná se o nadměrné nebo nedostatečné záření, nadbytek nebo naopak nedostatek vody, extrémní teploty, zasolení půdy a také mechanické poranění. Biotický stres je způsoben jiným živým organismem. Rostliny si musely postupem času vyvinout různé ochranné mechanismy, aby si zajistily přežití v podmínkách, ve kterých rostou.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky růstu rostlin vlivem světla, světelných signálních drah a odpovědi rostlin na abiotické stresy. V experimentální části bylo cílem této bakalářské práce zjistit, zda kvalita světla ovlivňuje schopnost rostlin tolerovat stres suchem a jestli ano, tak jakým způsobem. Toto bylo analyzováno pomocí fotomorfogenních mutantů rajčete *Solanum lycopersicum* L. *7B-1*, *cry1-1*, *cry1-2*, *hp-1* a *tri1*, které mají defekty ve fotoreceptorech nebo přenosu světelného signálu. V podmínkách *in vitro* byl studován růst rostlin na kultivačním médiu obsahujícím zvolené koncentrace polyethylenglykolu (PEG), a to v závislosti na vybraných světelných podmínkách (tma, modré světlo a červené světlo).

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 Klíčení a růst rostliny

Pro vznik nové rostliny a nové generace potomků je potřebné semeno. To zastává během svého života několik důležitých funkcí. Nejprve má funkci ochrannou, poté musí správně odhadnout čas, kdy má začít klíčit. Během vývoje semene jsou postupně shromažďovány všechny druhy živin potřebných pro výživu při jeho klíčení a následně vyrostlých semenáčků. Jedná se o proteiny, lipidy (hlavně oleje) a také škrob. Semeno také ztrácí téměř veškerý obsah vody a pozastavuje metabolické pochody (Han a Yang, 2015).

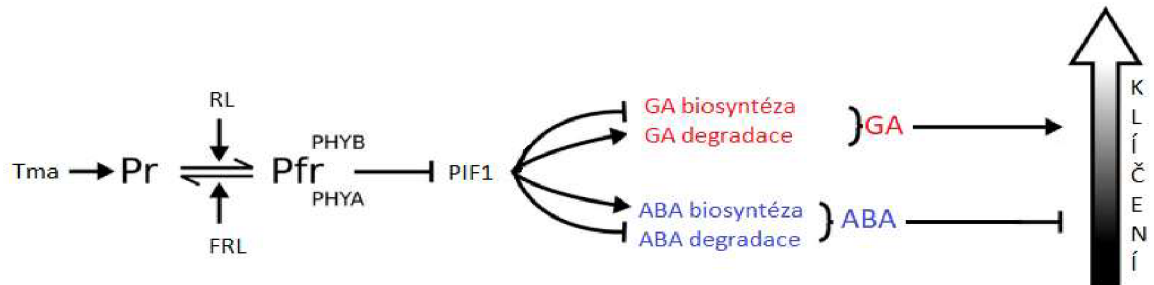
Klíčení je definováno jako obnovení metabolické aktivity semen, kdy dochází k prodlužování buněk radikuly (kořínku) a hypokotylu embrya (Procházka a kol., 1998). Nejzásadnějším faktorem pro úspěšné klíčení je výběr vyhovujících podmínek v prostředí, kde se semeno nachází. Klíčení je velmi striktně řízeno fytohormony, jako je především kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA), ale rovněž ethylen anebo brassinosteroidy, auxiny a cytokininy. Mezi faktory z prostředí ovlivňující klíčivost semen se řadí úloha světla, teploty a také obsah vody v půdě (Han a Yang, 2015).

Světlo je velmi důležitým spouštěcím faktorem klíčení semen. Záleží na jeho vlnové délce, intenzitě i době trvání. Bylo zjištěno, že krátké impulsy červeného světla (RL) a modrého světla (BL) můžou klíčení spustit stejně tak jako dlouhé impulsy světla (imitace krátkých či dlouhých dní během celého roku). Záření o vlnové délce 660 nm, které spadá do spektra RL je schopno zastavit dormanci semen salátu (*Lactuca sativa*), jakožto fotodormantní rostliny. Tento experiment vedl k objevení fotoreverzibilního pigmentu – fytochromu (Borthwick a kol., 1952; Jones a kol., 2013).

ABA a GA jsou klíčovými faktory podílejícími se velkou částí na procesu klíčení. V tomto případě tyto hormony účinkují proti sobě. GA regulují klíčení pozitivně, jsou to induktory. Kdežto negativní, inhibiční, regulaci má za úkol ABA. V *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh bylo zjištěno při osvětlení semen RL se skrze fytochromy aktivuje exprese genů kódující gibereliny a tím je zvýšená indukce klíčení (Obr. 1). V případě brassinosteroidů a auxinů se jedná také o induktory klíčení, dohromady podporují syntézu ethylenu. Nově syntetizovaný ethylen společně s GA a brassinosteroidy narušují semenné obaly a tím klíčení usnadňují (Han a Yang, 2015).

Prvním krokem klíčení je příjem vody suchým semenem a tento krok je nazýván imbibicí. Klíčení se dělí na tři samostatné fáze. V první fázi dochází k příjmu dostatku

vody semenem. Ve fázi druhé, kde zůstává semeno ve stabilní formě a vodu nepřijímá, nastává aktivace metabolických drah a začíná probíhat respirace. V poslední fázi dochází k opětovnému příjmu většího množství vody a postupnému růstu radikuly skrze semenné obaly (Jones a kol., 2013).



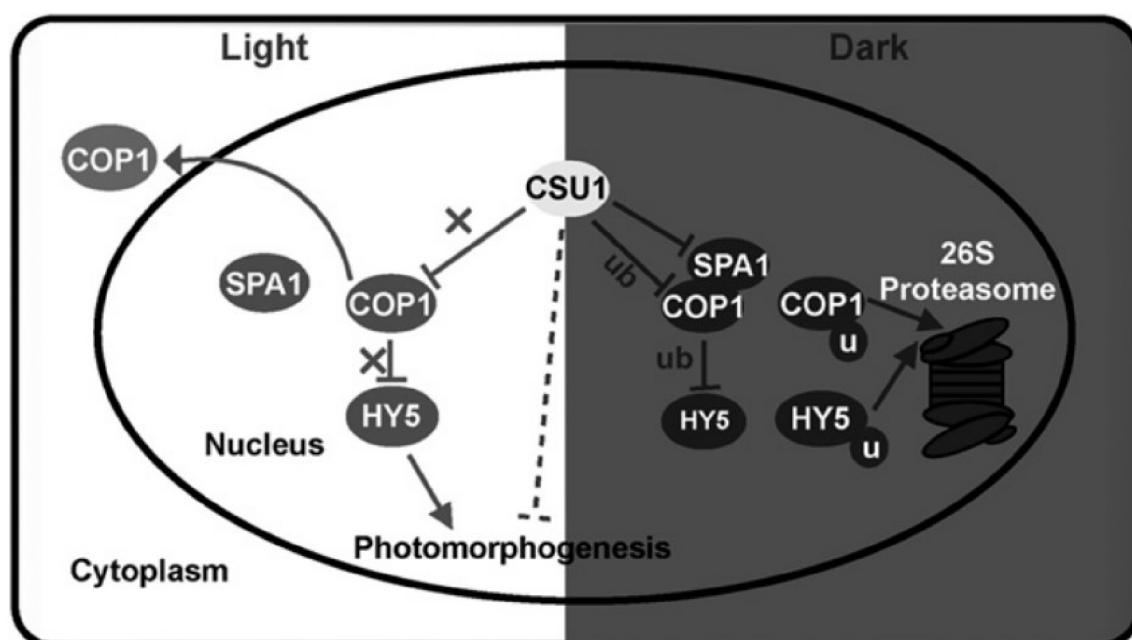
Obr. 1: Schéma regulace klíčení pomocí fytohormonů ABA a GA (upraveno podle Demotes-Mainard a kol., 2016).

2.2 Fotomorfogeneze

Světlo je stěžejním faktorem pro fotosyntetizující rostliny. Funguje nejen jako zdroj energie, ale také jako signál, který ovlivňuje velké množství růstových a vývojových procesů (Han a kol., 2020). Rostliny jsou přisedlé organismy, které se nedokážou aktivně pohybovat z míst, kde se nachází pro ně stresové podmínky, ani do míst, kde se nachází optimální množství živin a světla. Jsou schopny si vyvinout vývojovou odpověď na určité podmínky, aby se zvýšila šance na jejich přežití a rozmnožování. Tato odpověď se nazývá fotomorfogeneze (McNellis a Deng, 1995).

Vývojová odpověď organismu rostliny na světelnou informaci se označuje jako fotomorfogeneze. Rostlina vyvíjející se na světle má charakteristicky krátký hypokotyl, tlustý stonek a rozvinuté zelené děložní listy, které jsou fotosynteticky aktivní. V porovnání s rostlinami rostoucími ve tmě – skotomorfogeneze. Ty mají typicky světlý a tenký hypokotyl, jejich děložní lístky nejsou rozvinuté a z důvodu absence funkčních chloroplastů jsou bílé až světle zelené (Jones a kol., 2013). Fotomorfogeneze a skotomorfogeneze se v průběhu růstu rostliny prolínají. Semena nejprve klíčí pod zemí čili v prostředí tmy. Růst hypokotyly je v této fázi velmi rychlý. Vzrostlý vrchol rostliny s děložními lístky jako první prorůstají do prostředí se světlem, aby mohly postupně zajišťovat tvorbu energie fotosyntézou pro další růst (Nemhauser a Chory, 2002).

Fotomorfogeneze je negativně regulována represorem COP1 (CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENETIC 1). COP1 je protein, který při absenci světla zabraňuje průběhu fotomorfogeneze, proto mutace COP1 způsobuje fotomorfogetický fenotyp rostlin při růstu ve tmě (McNellis a kol., 1994; Stoop-Myer a kol., 1999; Han a kol., 2020). COP1 je složen ze tří funkčních domén, a to z N-konce obsahující RING-finger (Really Interesting New Gene Finger) doménu, coiled-coil domény složené z několika α -helixů stočených okolo sebe a WD40 domény na C-konci (Deng a Quail, 1992; Stoop-Myer a kol., 1999; Holm a kol., 2001; Han a kol., 2020). V rostlinách zastává funkci E3 ubikvitin ligázy, jež degraduje transkripční faktory ve 26S proteazomu a tím ovlivňuje genovou expresi (Obr. 2).

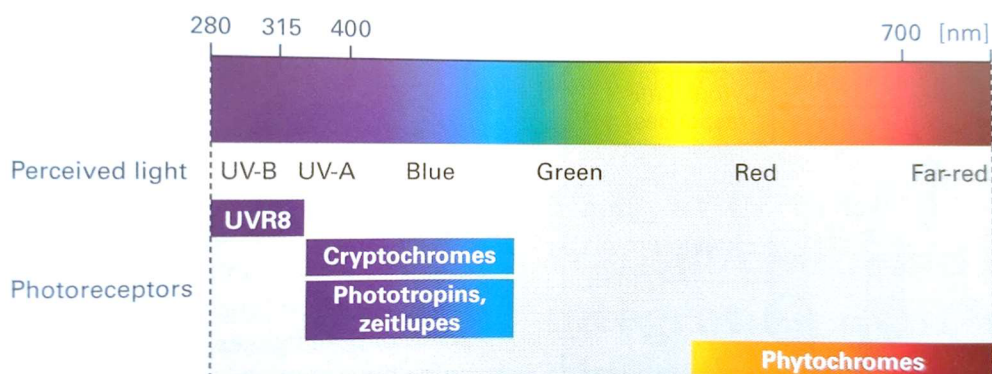


Obr. 2: Schéma regulace genové exprese pomocí COP1 (převzato z Xu a kol., 2014).

2.3 Fotoreceptory

Pro vnímání světla jako signálu potřebuje rostlina speciální receptory – fotoreceptory. V rostlinách se celkově nachází několik druhů fotoreceptorů. Ty jsou kategorizovány do tří skupin podle vlnových délek, které vnímají (Obr. 3). Fotoreceptory vnímající dlouhovlnné červené světlo (FRL) o vlnové délce 710-750 nm a červené světlo (RL) o vlnové délce 620-700 nm se nazývají fytochromy (PHY) (Bae a Choi, 2008). Kryptochromy (CRY), fototropiny (PHOT) a zeitlupe (ZTL) přijímají signál modrého

světla (BL) o vlnové délce 350–500 nm a ultrafialové A záření (UV-A) o vlnové délce 315-400 nm (Lin, 2002).

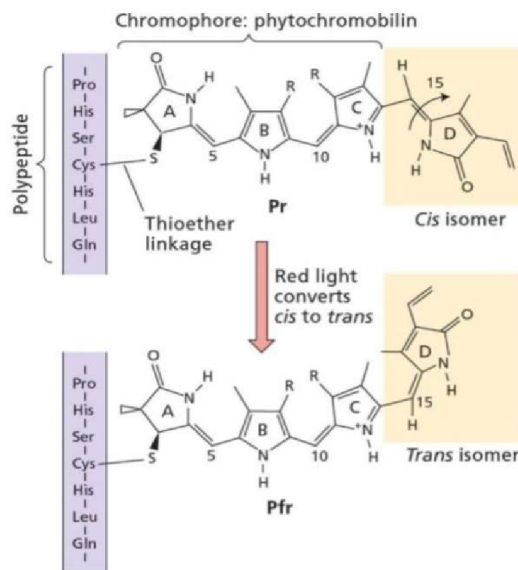


Obr. 3: Rozdělení fotoreceptorů podle vlnových délek (převzato z Buchanan a kol., 2015).

2.3.1 Fytochromy

Fytochromy byly poprvé objeveny v roce 1959 Butlerem a kol., a to jako fotoreceptory zprostředkovávající vývojovou odpověď organismu na přijaté světelné signály z oblasti viditelného světla RL a FRL. Jsou to biliproteiny o velikosti 240 kDa a tvoří dimery (jsou složeny ze dvou podjednotek), kde každá podjednotka dimeru má velikost 120 kDa. Fytochrom je složen z fotoreaktivní prostetické skupiny fytochromobilinu (chromoforu), složeného z lineárního tetrapyrrolu připojeného pomocí thioesterové kovalentní vazby k cysteinovému zbytku apoproteinu (polypeptidu) (Jones a kol., 2013).

Fytochromy (PHY) existují ve dvou možných formách, absorbují RL a jsou fotolabilní (Pr) anebo FRL a jsou fotostabilní (Pfr) (Quail, 1997; Quail, 2002). Tetrapyrrol absorbuje světlo a umožní reverzibilní konformační změnu mezi formou Pr a Pfr. V rostlinách rostoucích ve tmě je přítomna neaktivní forma Pr a po ozáření RL se konvertuje do Pfr formy, která je biologicky aktivní. Po osvětlení FRL se forma Pfr zpátky změní na neaktivní formu Pr (Obr. 4). Pr a Pfr mají možnost fotoreverzibilní inaktivace jako jediné z fotoreceptorů a jsou nazývány „fotopřepínači“ (Ulijasz a Vierstra, 2011).



Obr. 4: Přechod mezi aktivní a neaktivní formou fytochromu (převzato z Taiz a Zeiger, 2010).

Po aktivaci je Pfr translokován z cytoplazmy do jádra, získává schopnost autofosforylace a kinázovou aktivitu. Svoji kinázovou aktivitou způsobují fosforylaci faktorů interagujícími s fytochromy (PIF; Phytochrome Interacting Factors) (Leivar a Quail, 2011). Tyto faktory negativně regulují stabilitu transkripčních faktorů. Po fosforylaci jsou následně PIF degradovány za účasti ubikvitinu v proteazomu. (Ni a kol., 1998).

Modelový organismus *Arabidopsis thaliana* obsahuje pět genů, které kódují fytochromy – PhyA, PhyB, PhyC, PhyD a PhyE. PhyA je v rostlinách přítomen hlavně ve tmě ve formě Pr, a je fotolabilní. V rostlině *Solanum lycopersicum* bylo roku 1995 Hauserem a kol. objeveno pět genů kódujících apoproteiny fytochromů, a následně byly klasifikovány jako PhyA, PhyB1, PhyB2, PhyE a PhyF. Hlavní účast fytochromů je v rostlinách při klíčení, de-etiolizaci, inhibici růstu stonku a prodlužování řapíku, růstu listů, vývoji chloroplastů, biosyntéze chlorofylu, větvení, kvetení a senescenci.

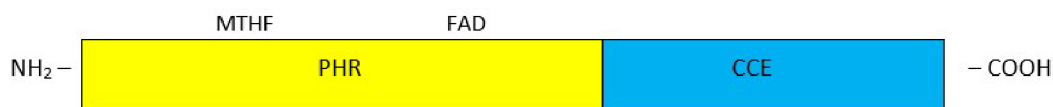
Fytochrom A (phyA) je rychle degradován na RL za působení COP1 E3 ubikvitin ligázy. V mutantní rostlině *cop1* je degradace phyA pouze snížena, a nikoliv celkově blokována. To dokazuje, že degradace phyA není zprostředkována pouze pomocí drah závislých na COP1. Fytochrom B (phyB) je ve tmě v neaktivní formě a po ozáření RL je aktivován a přenesen do jádra, kde dále předává světelnou signální informaci. Jeho degradace reguluje ukončení přenosu informace a je zprostředkována navázáním COP1 na N-konec molekuly phyB a zapojením 26S proteazomu (Smirnova a kol., 2012).

Fytochromy mohou zprostředkovávat tři různé odpovědi na přijímané světlo. Řadí se zde very-low fluence response (reakce k velmi nízkému ozáření; VLFR), low fluence response (reakce k nízkému ozáření; LFR) a high-irradiance response (reakce k vysokému ozáření; HIR) (Casal a kol., 1998). První z nich se nazývá VLFR, a nastává v klíčících semenech s extrémní citlivostí na světlo a je zprostředkována phyA a také fytochromem E (phyE) a fytochromem D (phyD). VLFR se udává poměrem přítomných Pfr/Pfr+Pr s menší hodnotou, než je 0,1 % což může být také způsobeno impulsem FRL. Tato reakce se často objevuje v semenech, která jsou po delší dobu v půdě. Druhá možná reakce na světlo je nazývána LFR a má poměr Pfr/Pfr+Pr vyšší než VLFR. Jsou zde zahrnuty téměř veškeré fotoreversibilní odpovědi na RL a FRL. V této odpovědi je zapojen receptor phyB. Poslední možnou reakcí je HIR, stejně jako VLFR, je vedena prostřednictvím phyA. HIR však není fotoreversibilní, ale stejně tak jako předešlé fáze je závislá na intenzitě světla (Arana a kol., 2007).

2.3.2 Kryptochromy

Receptory BL a UV-A se nazývají kryptochromy (CRY). Jsou to flavoproteiny o velikosti 70 až 80 kDa mající podobnou strukturu chromofor vázající domény jako DNA enzymy fotolyázy. Odlišují se však chybějící fotolyázovou aktivitou. Poprvé byl gen *CRY-1* izolován z *Arabidopsis thaliana* v roce 1993 a následně byl objeven ve všech mnohobuněčných eukaryotických organismech (Ahmad a Cashmore, 1993).

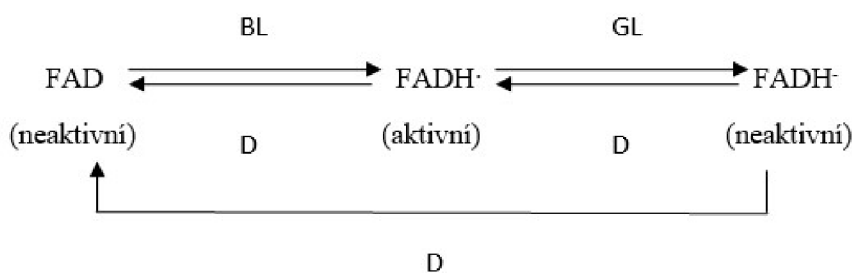
Kryptochromy jsou složeny ze dvou domén, a to z C-koncové a N-koncové domény. C-koncová doména je zapojena do interakce s jinými proteiny a translokace mezi cytosolem a jádrem, na jejím konci se nachází CCE (cryptochrome C-terminal extension). N-koncová doména je pojmenována jako PHR (photolyase-related), má totiž podobnost s DNA fotolyázou a je zodpovědná za navázání chromoforu ke kryptochromu (Obr. 5). PHR doména zprostředkovává dimerizaci kryptochromu, která je klíčová pro funkci fotoreceptoru. Geny CRY1, CRY2 a CRY3 obsahují ještě konzervativní motiv DAS. V případě CRY1 a CRY2 se nachází mezi PHR a C-koncovou doménou, u CRY3 je mezi N-koncovou a PHR doménou. Protein CRY1 je fotostabilní a CRY2 je fotolabilní. (Yu a kol., 2010). Protein CRY3 je také nazýván CRY-DASH a je detekován, na rozdíl od CRY1 a CRY2, které se nachází v jádře, v mitochondriích a chloroplastech (Kleine a kol., 2003).



Obr. 5: Struktura kryptochromu. Na N-koncové doméně je navázána PHR doména, do které se vážou MTHF (methenyltetrahydrofolát) a FAD (flavinadenindinukleotid) a na C-koncovou doménu se váže CCE doména (upraveno podle Cashmore a kol., 1999).

Vedení signálu pomocí kryptochromů je v některých ohledech podobné jako u fytochromů. Je zde podobnost mezi CRY2 a PhyA, kdy jsou oba fotolabilní a aktivní pouze v jádře. Fosforylace CRY1 a CRY2 je způsobena aktivitou buněčných kináz vázajících se na C-koncovou doménu. Je důležitá pro konformační změnu proteinu, odhaluje tak místa pro vazbu s jinými signálními faktory jako je například COP1. Kryptochromy jsou schopny vázat se s fytochromy a ty mají možnost fosforylovat je (Liu a kol., 2011).

Kryptochromy obsahují dva kofaktory chromoforu: flavin adenin dinukleotid (FAD) a pterin (methenyltetrahydrofolát; MTHF). MTHF se po absorpci BL excituje a předává elektrony na ve tmě neaktivní molekulu FAD_{ox} (FAD v oxidovaném stavu). FAD_{ox} se ozářením BL částečně redukuje na $FADH\cdot$ (flavosemichinon). Fotocyklus kryptochromů je ovlivněn nejen BL a tmou (D), ale také zeleným světlem (GL) (Obr. 6) (Jones a kol., 2013).



Obr. 6: Fotocyklus kryptochromu – aktivace pomocí BL a D, inaktivace pomocí GL a D (upraveno podle Jones a kol., 2013).

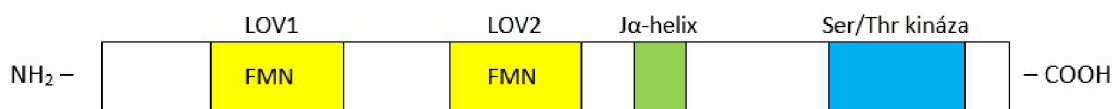
V *Arabidopsis thaliana* se vyskytují kryptochromy jako jaderné proteiny regulující prodlužování stonku a kořene, rozvinutí listů, fotoperiodicitu kvetení, otevírání průduchů, apoptózu a cirkadiánní hodiny (Lin a Shalitin, 2003). U *Solanum lycopersicum* jsou kódovány čtyři kryptochromy: *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY3*. *CRY1a* a *CRY2* mají

možnost odpovědi LFR a HIR, aktivně se podílejí na fotomorfogenezi. Kdežto u genu *CRY1b* stále není známo, zda kóduje funkční fotoreceptory (D'Amico-Damião a kol., 2021).

2.3.3 Fototropiny

Fototropiny jsou dalším druhem receptorů BL a UV-A. Jejich název je odvozen ze studie fototropismu u epikotylů hrachu, u kterého byly poprvé objeveny. Stejně jako u kryptochromů se jedná o flavoproteiny. Mají velikost okolo 120 kDa. Jsou to proteiny spojené s plazmatickou membránou, které se po absorpci BL podrobí autofosforylaci. (Jones a kol., 2013).

Fototropiny jsou složeny ze N-koncové fotosenzorické domény, C-koncové serin/threonin kinázové domény a ze dvou LOV domén (light, oxygen and voltage) přijímajících světelné signály z kofaktoru FMN (flavinmononukleotid) – LOV1 a LOV2 (Obr. 7). N-koncová a C-koncová doména jsou ve tmě spojeny a kináza na C-konci je neaktivní. Když FMN absorbuje BL, tak se kovalentně naváže na cysteinový zbytek LOV domény. Touto vazbou se změní celková konformace molekuly fototropinu, konkrétně části zvané $J\alpha$ -helix, následně se uvolní místo pro navázání ATP na serin/threoninové kináze a nastává autofosforylace. Ta je důležitá pro translokaci fototropinu z plazmatické membrány dovnitř buňky a tím přenáší signál do jádra (Hart a Gardner, 2021).



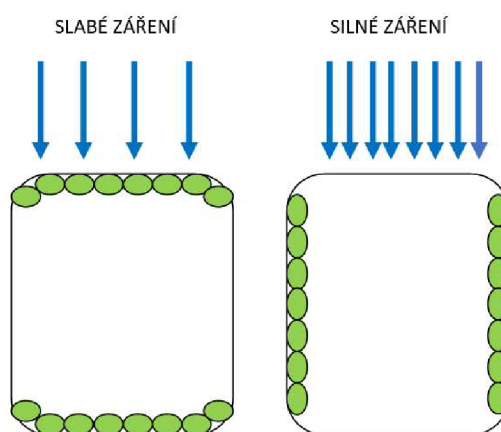
Obr. 7: Struktura fototropinu. Na N-konci se nachází LOV1 a LOV2 doména, do kterých se váže FMN (flavinmononukleotid), dále $J\alpha$ -helix doména a na C-konci je navázaná serin/threonin kináza (upraveno podle Inoue a kol., 2010).

Po objevení fototropinů v hrachu, byly následně objeveny v *Arabidopsis thaliana* geny kódující fototropiny, a to konkrétně *PHOT1* a *PHOT2*. Fotoreceptor *PHOT1* ovlivňuje růst kotyledonu a hypokotylu, *PHOT1* a *PHOT2* společně řídí fototropismus, pohyb chloroplastů, otevírání průduchů a iontový transport.

Fototropismem je nazýván pohyb rostlin, kdy dochází k ohybu jednotlivých částí rostlin působením světelného záření. Pokud se části rostliny ohýbají směrem ke světelnému zdroji, jedná se o pozitivní fototropismus, pokud ale dochází

k negativnímu fototropismu, tak se části rostlin od světelného zdroje odvracejí. Takto jsou rostliny schopny regulovat alespoň částečně příjem světelného záření pro své potřeby.

Jelikož PHOT1 a PHOT2 jsou schopny řídit pohyb chloroplastů, je zde patřičná zmínka o tomto mechanismu. Chloroplasty mohou migrovat v buňkách na základě intenzity osvětlení BL. Když jsou listy podrobeny pouze slabému záření BL, chloroplasty se staví v buňce paralelně s povrchem listu, aby mohly zachytit co nejvíce světla. Putují k horní a dolní stěně palisádového parenchymu. Pokud je však záření BL příliš silné, chloroplasty migrují do míst okolo buněčné stěny tak, aby byly rovnoběžné s dopadajícím světlem, absorbovaly co nejméně světla a tím se vyhnuly poškození fotosyntetického aparátu způsobenému nadměrným zářením (Obr. 8) (Kagawa a Wada, 1999).



Obr. 8: Přeskupení chloroplastů v rostlinné buňce na základě intenzity osvětlení (upraveno podle Suetsugu a Waga, 2007).

Otevírání průduchů (stomat) je stejně jako pohyb chloroplastů řízeno PHOT1 a PHOT2. Jedná se o odpověď rostliny na BL. Průduch se skládá ze dvou svěracích buněk, mezi kterými se nachází průduchová štěrbina. Svěrací buňky regulují velikost štěrbiny svým pohybem a tím i transpiraci a výměnu plynů. Mechanismus otevírání průduchů je založen na aktivitě H^+ -ATPázy, která se nachází na membránách svěracích buněk. H^+ -ATPáza se aktivuje díky fosforylaci serin/threoninových zbytků na C-koncové doméně přítomné v molekule fototropinu (Kinoshita a kol., 2001; Christie, 2007; Inoue a Kinoshita, 2017). Takto aktivovaný fototropin fosforyluje další kinázu, konkrétně BLUS1 (Blue Light Signaling 1), ta nepřímo přenáší signál na PP1 (protein fosfatázu 1) a další dosud neznámé protein kinázy. Ty fosforylují již výše zmíněnou H^+ -ATPázu, přesněji jejich C-konce. Po tomto kroku zde důležitou roli zastává regulační protein 14-3-3 vázající se na fosforylované místo na C-konci H^+ -ATPázy a mění jeho konformaci. Právě díky

změněné konformaci H^+ -ATPáza transportuje protony vodíků přes plazmatickou membránu ven z buňky a uvnitř buňky se zvyšuje koncentrace záporných iontů a dochází k hyperpolarizaci membrány. Otevřou se draselné kanály, které vpustí do cytosolu svěřacích buněk draselné ionty a dochází ke zvýšení turgoru buněk, ty pak nasávají vodu z okolí. Svěřací buňky z tohoto důvodu začnou měnit svůj tvar a průduch se začne postupně otevírat (Inoue a Kinoshita, 2017).

2.3.4 Další fotoreceptory vnímající modré světlo

V nedávné době byla identifikována ještě třetí skupina fotoreceptorů vnímající BL a UV-A. Její název je zeitlupe, v překladu z němčiny „zpomalený chod“. Svoji strukturou jsou podobné fototropinům. Skládají se z fotoaktivní LOV domény vázající FMN, navíc oproti fototropinům obsahují ještě F-box doménu. F-box proteiny jsou součástí E3 ubikvitin ligázy a jsou spojovány s velkým množstvím buněčných funkcí. Ovlivňují přenos signálu, hormonální aktivitu, a dokonce regulují i buněčný cyklus rostliny. (Jones a kol., 2013) Vedle F-boxu se nachází KELCH repetice. KELCH repetice jsou složeny ze šesti tandemových repetic a skládají se do β -helix struktury. V *Arabidopsis thaliana* byly objeveny tři typy genů kódující fotoreceptory zeitlupe, konkrétně *ZTL* (Zeitlupe), *FKF1* (flavin-binding kelch repeat F box protein) a *LKP2* (LOV kelch protein 2). Společně se podílí na regulaci proteolýzy komponentů, které regulují dobu kvetení a cirkadiální hodiny (Zoltowski a Imaizumi, 2014).

Jako další fotoreceptory podobné svou strukturou fototropinům jsou neochromy. Tyto fotoreceptory mají shodnou LOV doménu spojenou s fytochromovou fotosenzorickou doménou. Znamená to, že neochromy jsou fotoreceptory vnímající jak BL, tak RL (Jones a kol., 2013).

2.4 Rostliny a stres

Rostliny jsou každodenně vystavovány různým stresovým faktorům z okolí. Jsou to podmínky vnějšího prostředí mající dopad na jejich růst, vývoj a také produktivitu. Jelikož se rostliny nemůžou samy pohybovat a přesouvat z místa na místo, musely si vytvořit obranné mechanismy a odpovědi vůči stresům.

Stres působící na rostliny dělíme na stres abiotický a biotický. Mezi faktory způsobující biotický stres se řadí interakce s dalšími živými organismy. Může se jednat

o různé viry, bakterie, houby, hmyz anebo herbivory. Abiotický stres je způsoben nepříznivými chemickými a fyzikálními podmínkami. Jedná se o extrémně nízké a vysoké teploty, nadbytek či nedostatek vody nebo osvětlení, přílišné zasolení či okyselení půdy, mechanické faktory a také poranění, přítomnost toxických látek a spousta dalších faktorů (Jones a kol., 2013).

Rostliny na stres reagují na stres různými způsoby, od změn genové exprese a buněčného metabolismu po změny růstové. Reakce, kterou rostlina vůči stresu vyvine je závislá na jeho délce působení, závažnosti, intenzitě, množství, kombinaci více typů stresových faktorů a také na orgánu nebo pletivu, které jsou daným stresem ovlivněny (Ahmad a Prasad, 2012). Rostliny se můžou ve svém prostředí aklimatizovat, a to tak, že v průběhu života zvyšují toleranci vůči stresovému faktoru, kterému jsou postupně vystavovány a upravují svoji vnitřní homeostázu. Dále se rostliny můžou adaptovat na stresové faktory. Adaptací se rozumí geneticky determinovaná rezistence získaná procesem selekce probíhající v mnoha generacích. Adaptace je tedy dědičná vlastnost rostlin udávající možnost odolávat stresovým faktorům (Buchanan a kol., 2015).

2.4.1 Abiotický stres

Hlavními faktory způsobující abiotický stres je sucho, vysoká teplota, nízká teplota a nedostatek živin. Právě extrémní teploty, zasolení půdy a sucho ovlivňují růst rostlin nejvíce a mají velký vliv na pěstování potravin pro lidstvo. Rostliny málo odolné vůči stresům potřebují velké množství vody a hnojiv pro svůj růst. Těmto požadavkům je v některých částech planety téměř nemožné vyhovět. Právě proto je zásadní zjistit a pochopit mechanismy, kterými se rostliny brání vůči stresovým faktorům čili adaptace a aklimatizace a využít je pro vyšlechtění odolnějších rostlin (Zhu, 2016).

2.4.1.1 Stres vyvolaný suchem

Vodní deficit, sucho, rostliny rozpoznávají v kořenovém systému a následně tuto informaci přenáší do nadzemních částí rostlin. Tento signál je využit pro syntézu fytohormonu ABA v listech. Ta má za úkol regulovat veškeré odpovědi na stres vyvolané suchem. Mezi odpovědi se řadí uzavírání průduchů anebo genová exprese stresových proteinů. Dále také řídí růst kořenů do větší hloubky a inhibici růstu výhonů (Takahashi a kol., 2018).

Jen těžko lze hodnotit, jak velký stres suchem rostliny zažívají. Charakterizuje se proto hlavně stav vody v rostlinách, a to vodní potenciál buněk. Aby mohly rostliny

optimálně růst, je zapotřebí buňky udržovat v plně turgescenčním stavu. Ten je ale dosažitelný pouze v nočních hodinách. Přes den rostliny přijímají oxid uhličitý pro fotosyntézu otevřenými průduchy. Tímto způsobem však rostliny zároveň ztrácí vodu. Hodnota vodního potenciálu listů poukazující na mírný vodní stres je do -0,5 MPa, pokud tlak klesá na hodnoty -0,5 až -1,5 MPa hovoříme o středně velkém a při hodnotách pod -1,5 MPa o velmi silném vodním stresu. Listy rostlin začínají vadnout v případě překročení hranice vodního potenciálu -1,5 MPa. První odpovědí rostlin zasažených suchem je zastavení růstu, teprve poté se objevují další známky, a to je vadnutí listů, změny v metabolických procesech a případný úhyn rostliny (Procházka a kol., 1998). Z toho vyplývá, že stres z nedostatku vody je velmi úzce spjat s dalšími druhy abiotického stresu, jedná se například o stres osmotický nebo oxidativní (Kuromori a kol., 2022).

2.4.1.2 Oxidativní stres

Veškeré druhy abiotického a biotického stresu vedou k narušení metabolických procesů v rostlinách. V tomto případě vznikají v různých metabolických drahách vedlejší produkty, které se často vyznačují svou toxicitou. Jedním z hlavních takto vzniklých meziproductů jsou volné kyslíkové radikály (ROS; reactive oxygen species), ty jsou velice reaktivní a pro rostliny tím pádem velmi nebezpečné (Kuromori a kol., 2022).

ROS způsobují vážné poškození buněk a všech stavebních materiálů (proteinů a lipidů), RNA i DNA. Nejvíce zastoupenými ROS v buňkách je singletový kyslík (O_2), peroxid vodíku (H_2O_2), superoxidový anion ($O_2^{\cdot-}$), hydroxylový radikál (HO^{\cdot}), perhydroxylový radikál (HO_2^{\cdot}) a ozon (O_3). Na odstranění těchto volných kyslíkových radikálů se rostliny vyvinuly enzymatické i neenzymatické systémy (antioxidanty), které aktivují v podmínkách sucha. Antioxidanty neenzymové povahy jsou například karotenoidy, flavonoidy a polyamidy. Enzymy působící jako antioxidanty jsou superoxidodismutáza, kataláza anebo glutathionperoxidáza (Jones a kol., 2013; Buchanan a kol., 2015).

2.4.2 Světelné signální dráhy a abiotický stres způsobený suchem

Rostliny odpovídají na stres způsobený suchem různě, mezi hlavní odpovědi patří změny jak v morfologických, tak fyziologických i molekulárních ohledech (Hussain a kol., 2018; Junior a kol., 2021). První studie, který se zabývala zjišťováním interakce mezi světelnými signálními drahami a stresem z nedostatku vody, byla provedena Kraepielem

a kol. roku 1994 na mutantních rostlinách tabáku virginském a později na mutantech *phyB* rostliny *Arabidopsis thaliana*.

Světelné signální dráhy jsou zapojeny v odpovědi rostlin na abiotický stres. Klíčovými zprostředkovateli těchto odpovědí jsou fytochromy. Ty mohou modulovat stres způsobený suchem od klíčících semen až po kvetení. Fytochromy jsou velmi úzce spjaty s ABA a jsou schopny snižovat expresi genů potřebných pro její metabolismus (Sanchez a kol., 2002; Mollard a Insausti, 2009; Carvalho a kol., 2011). Mutantní rostliny mající defekt v signální dráze fytochromu si vyvinuly určité obranné mechanismy vůči stresu ze sucha, a to například dřívější kvetení u rýže (Du a kol., 2018). Mutant *phyB* rostliny *Arabidopsis thaliana* a mutanti *phyB1 phyB2* rostliny *Solanum lycopersicum* v prostředí s nedostatkem vody vykazovaly oproti WT nižší konduktanci průduchů. Tato reakce na stres je opět spojována s indukcí syntézy ABA (Boggs a kol., 2010; González a kol., 2012; Junior a kol., 2021).

Fytochromy skupiny B jsou po těchto studiích označovány za klíčové zprostředkovatele tolerance rostlin k suchu. Výše bylo zmíněno, že ovládají uzavírání průduchů a tím snižují ztráty vody rostlin. Tím se ale také snižuje fotosyntetická aktivita rostliny, protože uzavírání průduchů snižuje transpiraci a také příjem oxidu uhličitého (Boccalandro a kol., 2009). To vše souvisí s tvorbou ROS, které byly popsány výše.

Krytochromy jsou také důležitou součástí odpovědi rostlin na abiotický stres, konkrétně stres způsobený suchem. Původně byla úloha zapojení krytochromů do odpovědi na stres ze sucha objevena u rostliny *Arabidopsis thaliana*, kde dvojitý mutant *cry1cry2* vykazoval větší toleranci k suchu než WT. Na druhou stranu transgenní rostliny, které jsou charakteristické nadměrnou exprese proteinu CRY1, s názvem *CRY1-ovx* se vyjímaly právě zvýšenou ztrátou vody, neboť u nich bylo zavírání průduchů ovlivněno negativně. Díky tomuto bylo zjištěno, že krytochromy s největší pravděpodobností interagují s COP1, kdy tento protein funguje jako represor otevírání průduchů. Na regulaci odpovědi rostlin na sucho zprostředkovávané krytochromy má velký vliv interakce s dalšími fotoreceptory a fytohormony (zejména ABA). Nicméně, stále není plně objasněno, jakým způsobem funguje mechanismus tolerance k suchu takto zprostředkovanou (Kang a kol., 2009; D'Amico-Damião a kol., 2018).

U mutantní rostliny *Solanum lycopersicum 7B-1* bylo zjištěno, že je rezistentní vůči některým abiotickým stresům za podmínek BL. *7B-1* v porovnání s WT (wild type) vykazuje fotomorfogenezi hypokotylu indukovanou BL. Rezistenci vůči stresu

způsobené suchem může být ovlivněna také vyšším obsahem ABA, která reguluje zavírání průduchů (Fellner a Sawhney, 2001).

Mutantní rostlina *Solanum lycopersicum hp-1* (*high pigment-1*) vykazuje zvýšenou citlivost ke vnímání BL a RL. Obsahuje mutaci v genu *DDB1* ve fytochromové dráze a vykazuje zvýšené reakce zprostředkované fytochromy a také zesílenou fototropii. *hp-1* ve velkém množství produkuje pigmenty jako jsou karotenoidy, antokyany a flavonoidy. Jak již bylo zmíněno výše, přesně tyto látky působí jako antioxidanty a jsou účinné v boji proti oxidativnímu stresu. Tato mutace ve světelné signální dráze je pro rostliny prospěšná, protože zvyšuje produkci pigmentů (Levin a kol., 2006).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

Pro pokusy v experimentální části byla použita semena vybraných genotypů rajčete *Solanum lycopersicum* L., kultivar Rutgers (dále jen WT) a od něj odvozen mutant *7B-1*. Dále byla použita semena recesivních mutantů *cry1-1* a *cry1-2* odvozených od kultivaru Money Maker (cv. MM). Mutace byla generována γ -zářením, je přítomna v genu *CRY1* a vykazuje defekt ve vnímání modrého světla (Weller a kol., 2001). Další rostlina použita pro experimentální část, byl recesivní mutant *hp-1* odvozený od kultivaru Rutgers LA3004 (Kendrick a kol. 1994), který obsahuje mutace v genu *DDB1* (UV-damaged DNA binding protein 1; Li a kol., 2016) a vykazuje zesílené fytochromové reakce a zesílený fototropismus (Srinivas a kol., 2004). Jako poslední byla použita semena recesivního mutantu *tri1*, odvozeného od kultivaru GT a vykazujícího deficit ve fytochromu B1 (Van Tuinen a kol., 1995).

Semena mutantu *7B-1* byla laskavě poskytnuta V. K. Sawhney, University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada, semena mutantů *cry1-1* a *cry1-2* byla laskavě poskytnuta R. E. Kendrick, Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. Semena mutantů *tri1* a *hp-1* byla laskavě poskytnuta C. M. Rick, TGC: Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>.

3.2 Materiál a metodika

3.2.1 Seznam použitých chemikálií

- 70% a 96% ethanol (EtOH)
- Deionizovaná voda
- MES pufr (2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina, Serva, Německo, CAS-No: 29834.02)
- MS médium (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Prod. No: M0221.0100)
- Polyethylenglycol 4000 (PEG 4000, Sigma-Aldrich, Německo, CAS-No: 25322-68-3)
- Phytigel (Sigma-Aldrich, Čína, CAS-No: 71010-52-1)

- Roztok hydroxidu draselného (KOH) o koncentraci 1 mol/l
- Roztok SAVO (NaClO, 2,8 % aktivního chlóru)
- Sacharóza (Lach-Ner, Česká republika)

3.2.1 Seznam použitých přístrojů

- Analytické váhy
- Autokláv
- Kultivační komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s červeným světlem (zdroj červeného světla byla zářivka Philips TLD36W/15-Red s maximální intenzitou osvětlení 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 660 nm
- Kultivační komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s modrým světlem (zdroj modrého světla byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue s maximální intenzitou osvětlení 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 440 nm
- Laminární flowbox
- Lednice
- Magnetická míchačka
- pH metr
- Předvážky

3.2.3 Příprava média

Jednotlivé rostliny byly pěstovány na phytagelovém kultivačním médiu Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962). Pro přípravu 2 l MS média bylo použito 20 g sacharózy, 8,6 g MS média, 0,3904 g MES pufru. Jednotlivé složky MS média byly postupně přidávány a rozpuštěny v 3 l Erlenmeyerově baňce s obsahem 1 l deionizované vody (dH_2O) za stálého míchání na magnetické míchačce. Objem byl po rozpuštění všech látek doplněn destilovanou vodou na 2 l a s pomocí pH metru bylo upraveno pH na hodnotu 6,1 1M roztokem hydroxidu draselného.

Do 5 termolahví o objemu 0,5 l bylo naváženo 2,8 g phytagelu a do každé z lahví bylo nalito 0,4 l média. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu. Díky sterilizaci média v autoklávu kleslo pH z hodnoty 6,1 na hodnotu 5,7, která je optimální pro růst rostlin. Po sterilizaci bylo vychladnuté médium skladováno v lednici. Pro další použití byla potřeba médium rozehřát v mikrovlnné troubě, aby změnilo svůj tuhý stav na kapalný a bylo s ním možné manipulovat.

V případě přípravy MS média s obsahem polyethylenglykolu 4000 (PEG) byl v průběhu rozpouštění látek v destilované vodě přidán PEG do Erlenmeyerovy baňky. Pro přípravu 2 l MS média o koncentraci 5% PEG bylo naváženo 100 g PEG, při 10% PEG 200 g a 15% PEG 300 g. Do termolahví byly naváženy 4 g phytagelu, neboť 10 a 15% PEG s phytagelem reaguje a v menších koncentracích phytagelu médium neztuhne. Těsně po vytáhnutí médií s 10 a 15% PEG z autoklávu, byla média rozlita do sterilních kulatých Petriho misek (průměr 90 mm), které byly následně oblepeny parafilmem a skladovány v lednici, protože by po opakovaném zahřátí v mikrovlnné troubě již neztuhlo.

3.2.4 Výsev semen

Pro každý experiment bylo napočítáno 300 semen od každého genotypu. Následné kroky probíhaly v laminárním boxu za sterilních podmínek. Semena byla sterilizována v 50 ml plastové zkumavce s obsahem asi 40 ml zředěného roztoku SAVO po dobu asi 30 minut za občasného protřepání. Vysterilizovaná semena byla šestkrát promyta sterilní destilovanou vodou pomocí 10 ml automatické pipety. Takto vysterilizovaná semena byla vyseta pinzetou sterilizovanou ožehnutím nad plamenem na ztuhlém základní MS médium v Petriho miskách. Následně byly misky oblepeny dvakrát páskou z netkané textilie (SoftPore, Česká republika), zabaleny do alobalu a kultivovány ve vertikální poloze v kultivační místnosti ve tmě při konstantní teplotě 23 °C po dobu 3-4 dní.

3.2.5 Přenos vyklíčených semen

Vyklíčená semena byla za sterilních podmínek v laminárním boxu transferována pomocí sterilní pinzety do nových Petriho misek s MS médiem obsahujícím PEG o koncentracích 0, 5, 10 a 15%. Do každé misky bylo přeneseno maximálně 8 vyklíčených semen, která měla podobně dlouhé klíčky. Následně byly všechny misky oblepeny dvakrát páskou z netkané textilie a semena kultivována ve vertikální poloze v kultivační místnosti ve tmě, pod modrým a červeným světlem po dobu 7 dní.

3.2.6 Měření rostlin a hodnocení experimentů

Po 7 dnech kultivace byla u každé rostliny změřena délka hypokotylu a kořene s přesností na 1 mm. Naměřené hodnoty byly zaznamenány do tabulek, následně vypočítána průměrná délka hypokotylu a kořene v závislosti na světelných podmínkách pro každý

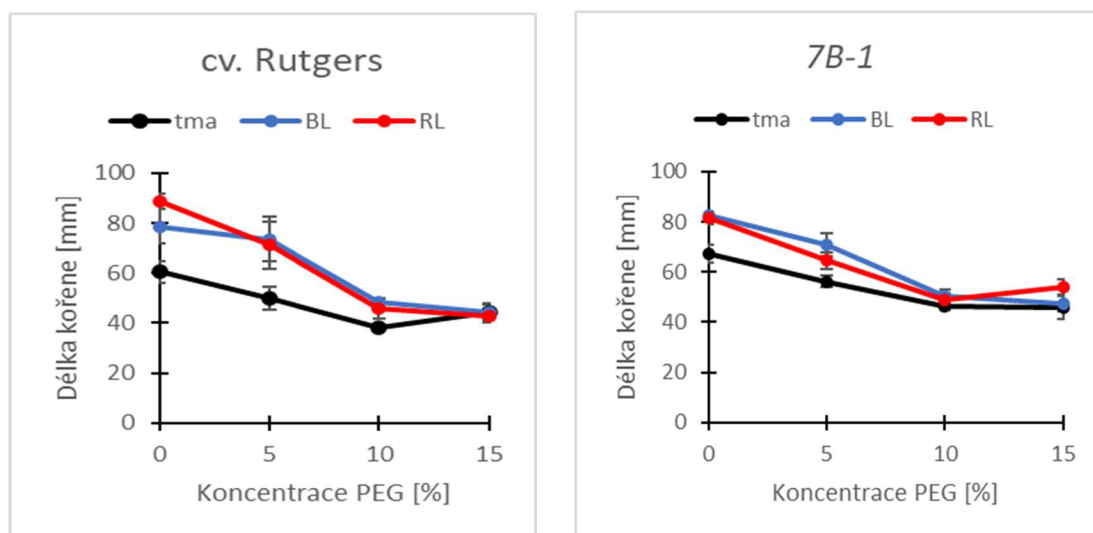
genotyp zvlášť. Z těchto hodnot byla vypočítána směrodatná odchylka a procentuální inhibice. Výsledky byly graficky zpracovány do výsledkové části bakalářské práce.

4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv polyethylenglykolu na růstové reakce kořene

4.1.1 Mutant *7B-1*

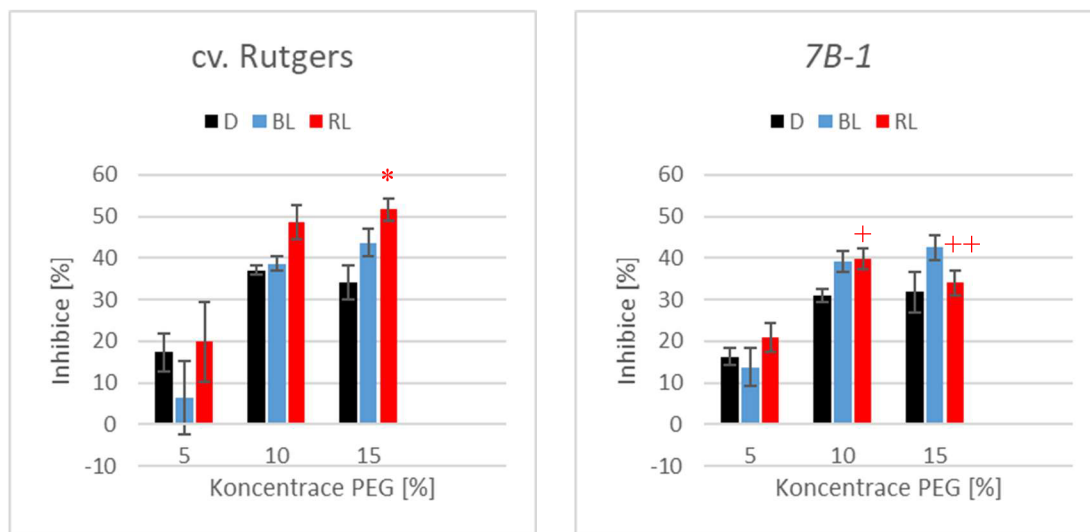
Na Obr. 9 lze v první řadě vidět stimulační účinek BL a RL na růstu kořene rajčete u genotypu cv. Rutgers (dále jen WT) při absenci PEG. Při růstu ve tmě bez přítomnosti PEG dosahovaly kořeny průměrné délky 60,4 mm, zatímco při růstu pod BL 78,7 mm a RL 88,8 mm. U mutantu *7B-1* lze z grafu vyčíst, že při absenci PEG byla délka kořene etiolovaných rostlin o něco větší než u WT a BL a RL stimulovalo růst kořene podobnou měrou. Za přítomnosti PEG v kultivačním médiu (5 až 15 %) byla délka kořene obou genotypů postupně redukována, a to ve tmě, na BL i RL.



Obr. 9: Grafy závislosti délky kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek kořene \pm SE získaných z 5 na sobě nezávislých experimentů.

Na Obr. 10 je pak vidět, že u cv. Rutgers (WT) PEG při koncentraci 5 % docházelo na BL k nižší inhibici růstu kořene (6,5 %) než v D (17,3 %) a RL (20 %). Se zvyšující se koncentrací PEG se ale zvyšovala inhibice růstu jak u BL, tak RL. Největší citlivost kořenů WT k PEG byla pozorována na RL, kdy inhibice prodloužení kořene dosahovala až 50 %, jak při koncentraci PEG 10 %, tak při koncentraci 15 %. U mutantu *7B-1* lze pozorovat podobný průběh inhibice jako u WT, s tím rozdílem, na BL PEG o koncentraci

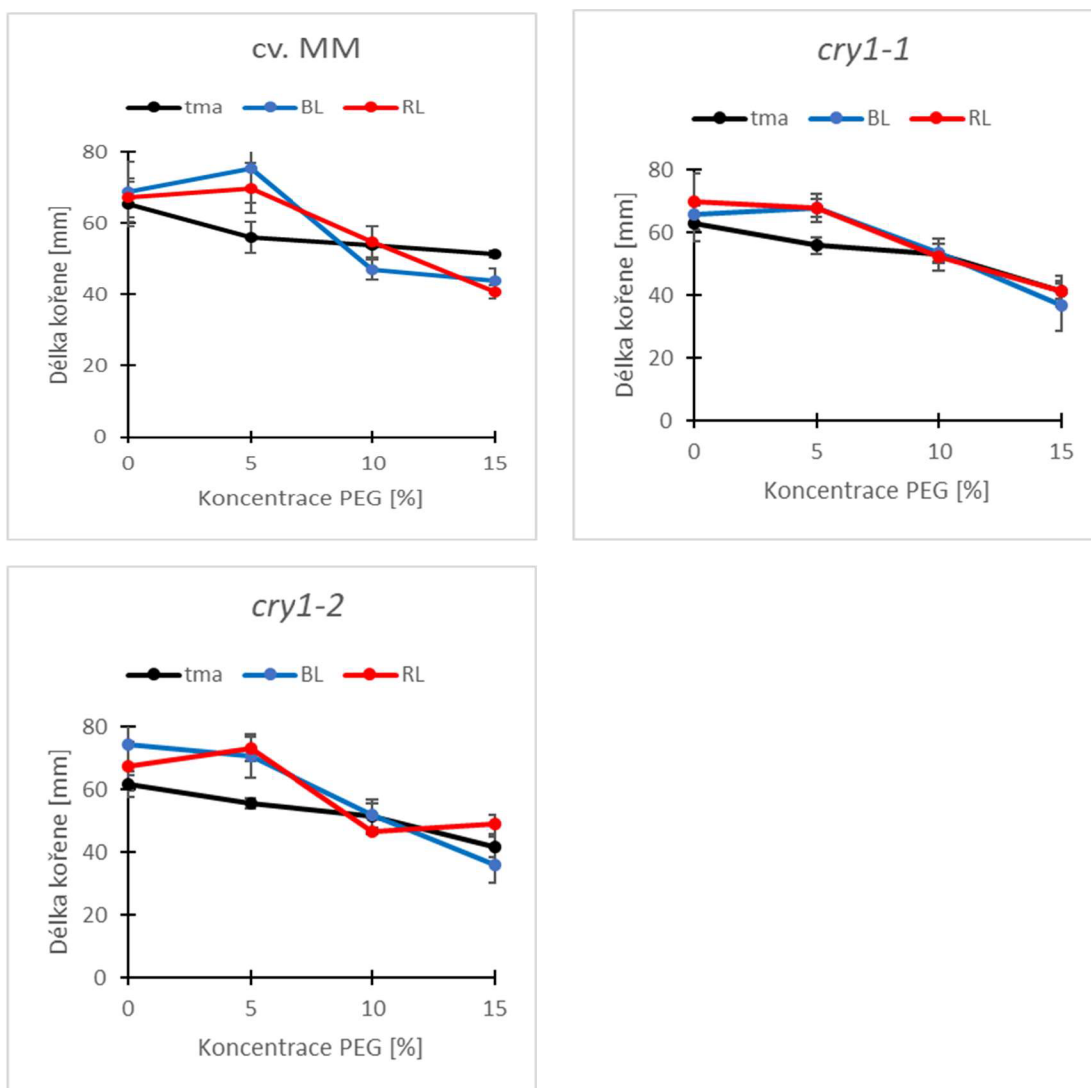
15 % inhiboval růst kořene o téměř 45 %, kdežto D a RL to bylo znatelně méně, konkrétně okolo 30 %.



Obr. 10: Grafy závislosti inhibice růstu kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu kořene ± SE získaných z 5 na sobě nezávislých experimentů; + signifikantní rozdíl (T-test, + P = 0,05; ++ P = 0,01) od kořenů cv. Rutgers rostoucích ve stejných podmínkách; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05) od kořenů cv. Rutgers rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

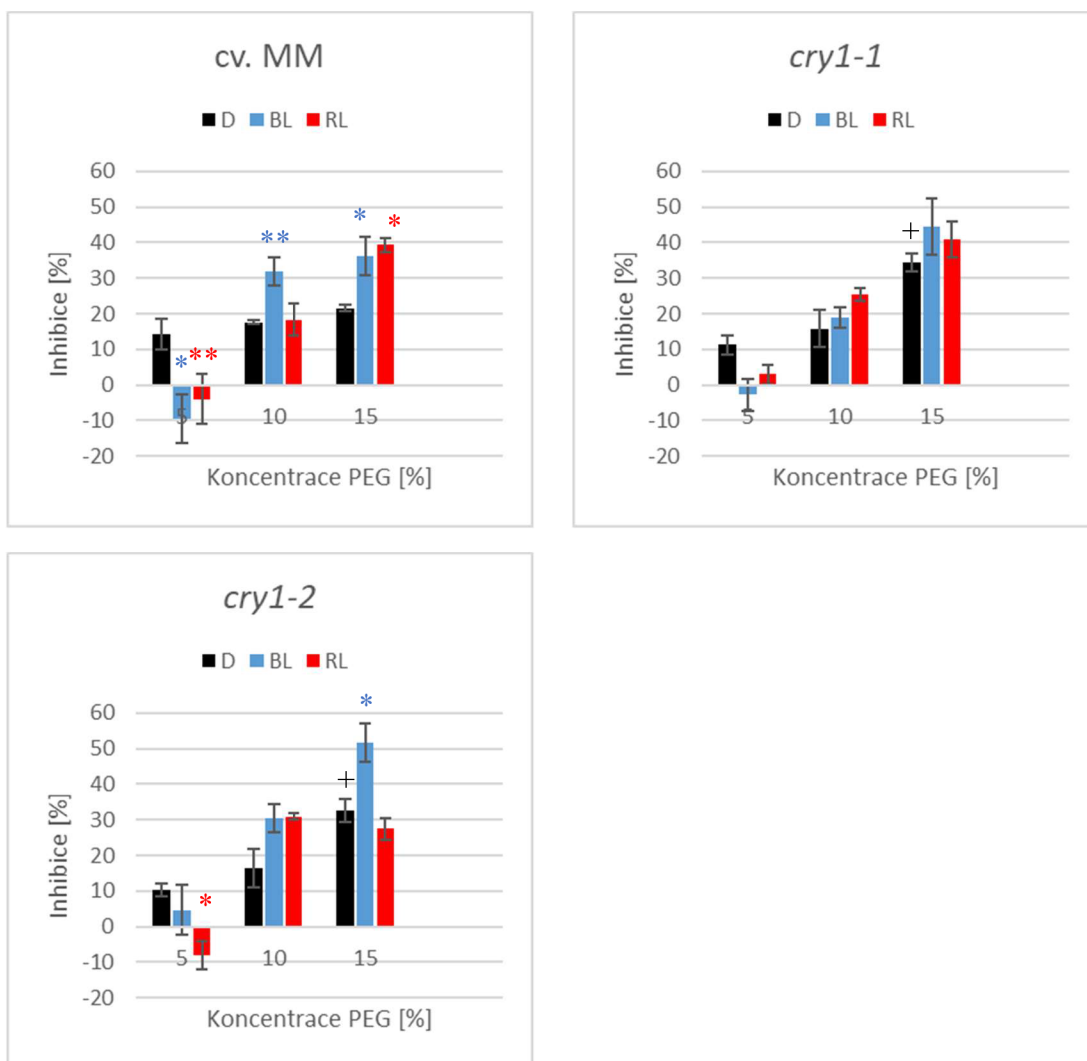
4.1.2 Mutant *cry1-1* a *cry1-2*

Graf na Obr. 11 ukazuje růst kořene u rostliny kultivaru Money Maker (cv. MM) a mutantů *cry1-1* a *cry1-2*. Na médiu bez přídavku PEG byl růst kořene cv. MM jen mírně stimulován BL i RL. Při nejnižší použité koncentraci 5 %, PEG mírně inhiboval růst etiolizovaného kořene, zatímco na BL a RL docházelo ke stimulaci růstu. Při koncentracích 10 a 15 % PEG byl růst kořene inhibován za všech použitých světelných podmínek. U mutantu *cry1-1* je patrné, že na základním médiu bylo prodlužování kořene rovněž mírně stimulováno vlivem BL i RL. Při aplikaci PEG byl růst kořene mutantu výrazně inhibován v D, BL a RL od koncentrace PEG 10 %. Mutant *cry1-2* vykazoval na médiu bez PEG výraznější stimulaci růstu kořene než cv. MM i *cry1-1*. Podobně jako u *cry1-1*, byl růst kořene výrazněji inhibován vlivem PEG až od koncentrace 10 %, a to za všech testovaných světelných podmínek.



Obr. 11: Grafy závislosti délky kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker (cv. MM) a od něj odvozeného mutanta *cry1-1* a *cry1-2* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek kořene \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

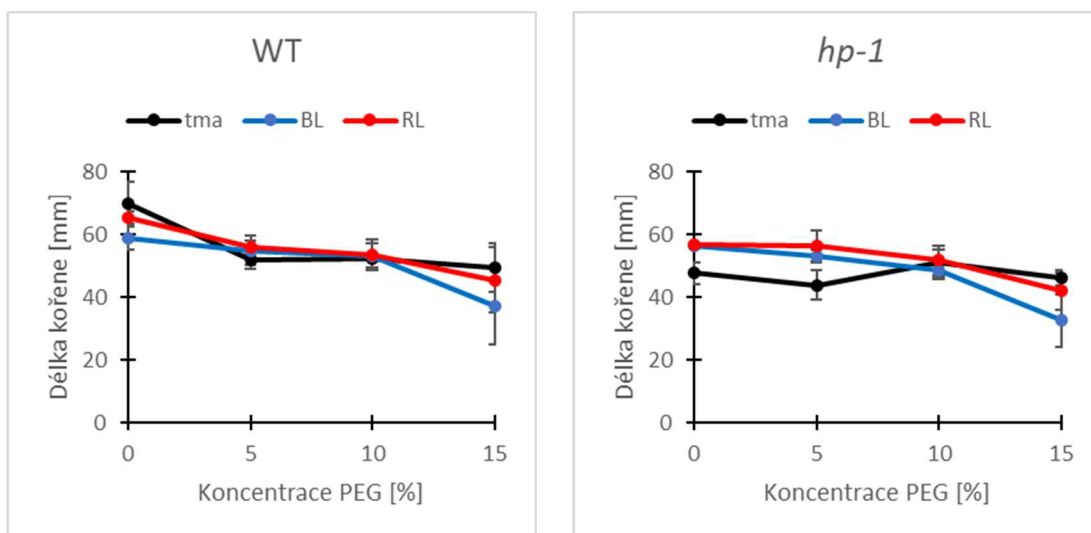
Z grafů na Obr. 12 lze vyčíst, že u rostliny cv. MM při 5 % koncentraci PEG růst kořene pod RL a BL oproti D mírně stimuloval. Graf dále ukazuje, že při koncentraci PEG 10 % byly kořeny cv. MM výrazně inhibovány ve svém růstu na BL a při koncentraci 15 % i na RL. U mutantní rostliny *cry1-1* lze vidět, že při 5% koncentraci PEG byl růst kořene podobný jako u cv. MM. Na rozdíl od cv. MM byla redukce růstu kořene mutanta *cry1-1* vlivem 10 % i 15 % PEG podobná za všech světelných podmínek. Růst kořene *cry1-2* byl při 5 % koncentraci PEG mírně inhibován (D, BL) či signifikantně stimulován (RL). Výrazné inhibiční účinky (52 %) můžeme vidět u genotypu *cry1-2* při růstu pod BL, zatímco ve D a RL dosahovala inhibice asi 30 %.



Obr. 12: Grafy závislosti inhibice růstu kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker (cv. MM) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* a *cry1-2* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu kořene \pm SE vypočítaných ve 3 na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, + P = 0,05; ++ P=0,01) od kořenů cv. MM rostoucích ve stejných podmínkách; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05; ** P=0,01) od kořenů cv. MM (nebo *cry1-2*) rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

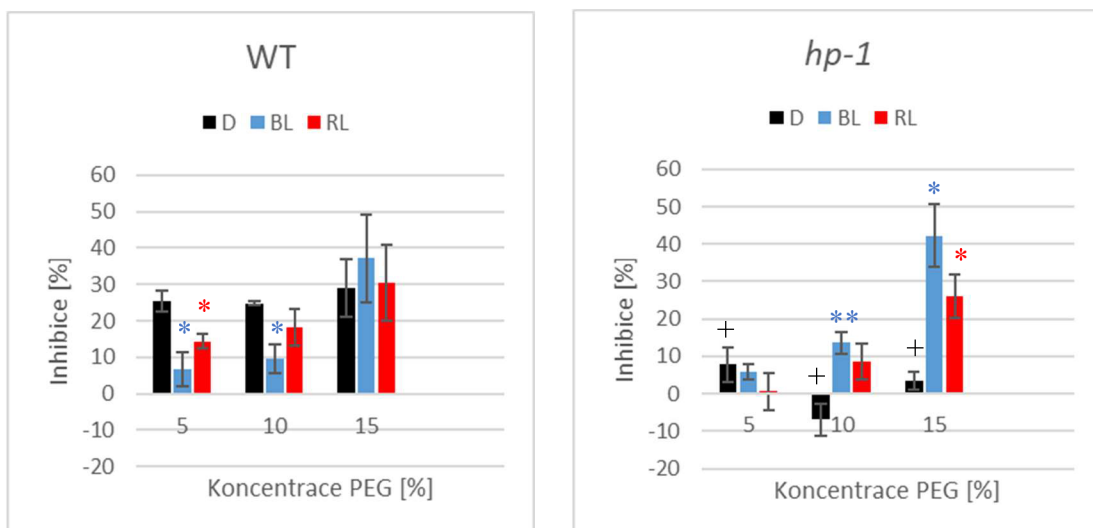
4.1.3 Mutant *hp-1*

Graf na Obr. 13 ukazuje, že růst kořenů WT (cv. Rutgers) je relativně slabě redukován vlivem PEG o koncentracích 5 a 10 %, a to při všech testovaných světelných podmínkách. Při koncentraci 15 % PEG byla zaznamenána vyšší inhibice délky kořene u BL (37 mm) a RL (45,5 mm). U mutantu *hp-1* byl vliv PEG na růst kořenů ve D a RL ještě slabší než u WT.



Obr. 13: Grafy závislosti délky kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers LA3004 (WT) a od něj odvozeného mutantu *hp-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek kořene \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

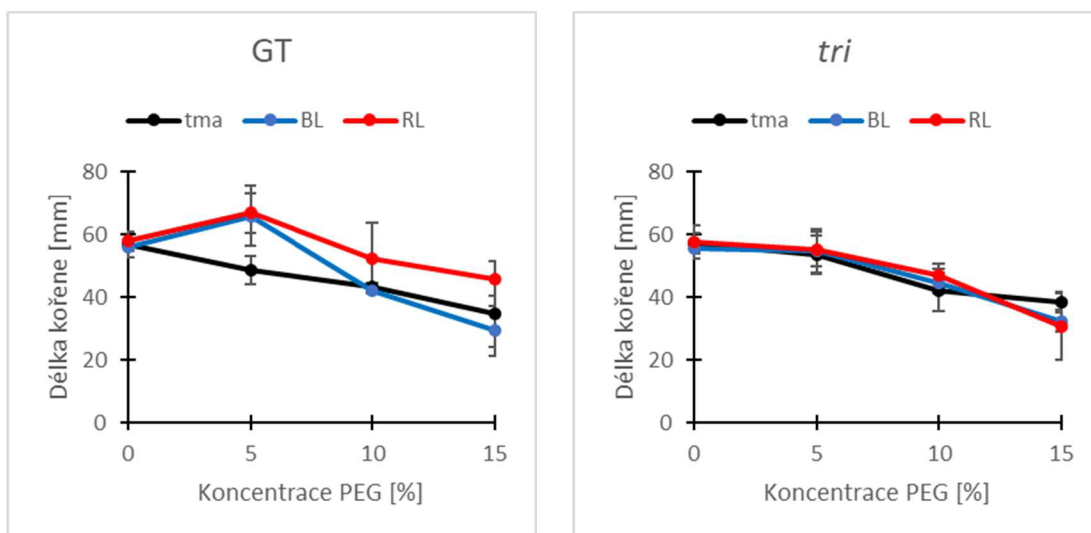
Obr. 14 zobrazuje velmi nízkou míru inhibice růstu kořene WT vlivem nižších koncentrací PEG na BL (6,7 a 9,5 %). Při 15 % PEG inhibice prodlužování kořene výrazně vzrostla na 37,1 %. Růst kořene WT v podmínkách D a RL byl inhibován 15 % PEG téměř stejnou měrou. Růst kořene mutantu *hp-1* byl vlivem 5 % PEG inhibován velice slabě. Oproti tomu, inhibice růstu kořene vlivem PEG 10 a 15 % se zvyšovala výrazně na BL a RL. Maximální inhibice růstu kořene na BL dosahovala při 15 % PEG na 42,3 %.



Obr. 14: Grafy závislosti inhibice růstu kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers LA3004 (WT) a od něj odvozeného mutantu *hp-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu kořene \pm SE vypočítaných ve 3 na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, + P = 0,05) od kořenů WT rostoucích ve stejných podmínkách; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05; ** P=0,01) od kořenů WT (nebo *hp-1*) rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

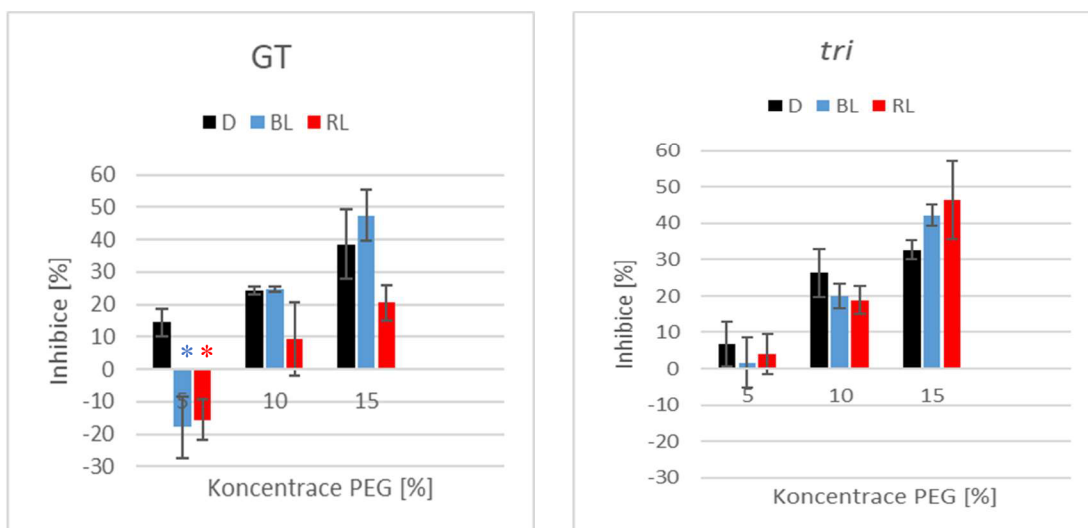
4.1.4 Mutant *tri1*

Graf na Obr. 15 ukazuje stimulační účinky růstu kořene vlivem 5% PEG pod BL a RL. Průměrné délky kořene byly 66 mm, kdežto u 0% koncentrace byly délky pouze 56 mm. S rostoucí koncentrací PEG byl však růst kořene inhibován. Oproti genotypu GT u mutantu *tri1* stimulace růstu kořene vlivem PEG nebyla pozorována a růst kořene byl inhibován podobně při všech testovaných světelných podmínkách.



Obr. 15: Grafy závislosti délky kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. GT a od něj odvozeného mutantu *tri1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek kořene \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

Jak lze vidět na grafu na Obr. 16, u cv. GT má 5 % PEG na BL a RL na růst kořene signifikantní stimulační účinek. Zjištěná stimulace byla na BL 17,9 % a RL 15,5 %. Při vzrůstající koncentraci má PEG již výrazné inhibiční účinky, a to především na BL. Na RL byla inhibice růstu kořene vlivem PEG podstatně nižší než na BL. U mutantu *tri1* je zřetelně vidět, že PEG měl při všech testovaných koncentracích podobné inhibiční účinky v D, BL i RL.

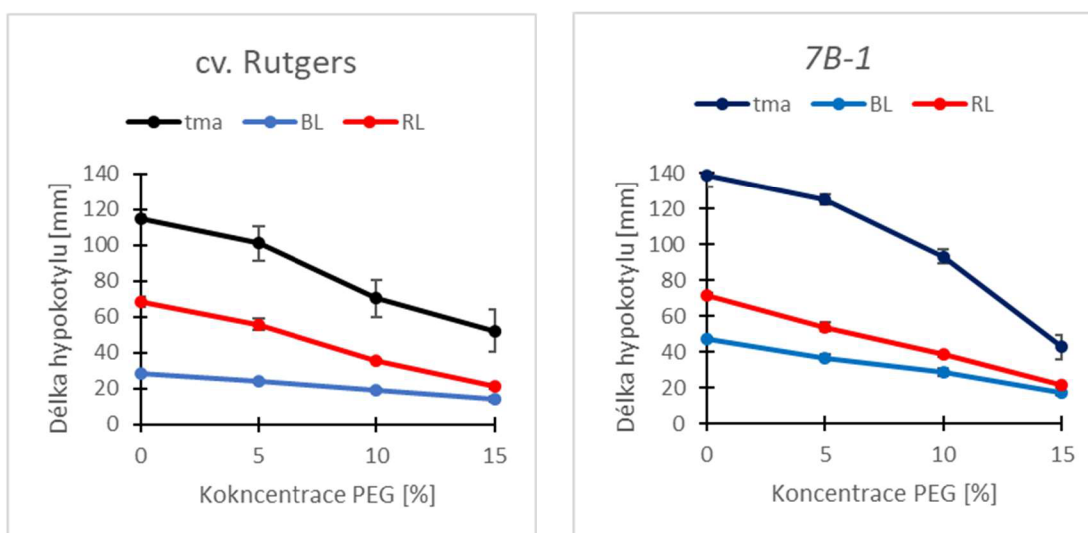


Obr. 16: Grafy závislosti inhibice růstu kořene rostlin *Solanum lycopersicum* cv. GT a od něj odvozeného mutantu *tri1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu kořene ± SE vypočítaných ve 3 na sobě nezávislých experimentech; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05) od kořenů GT rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

4.2 Vliv polyethylenglykolu na růstové reakce hypokotylu

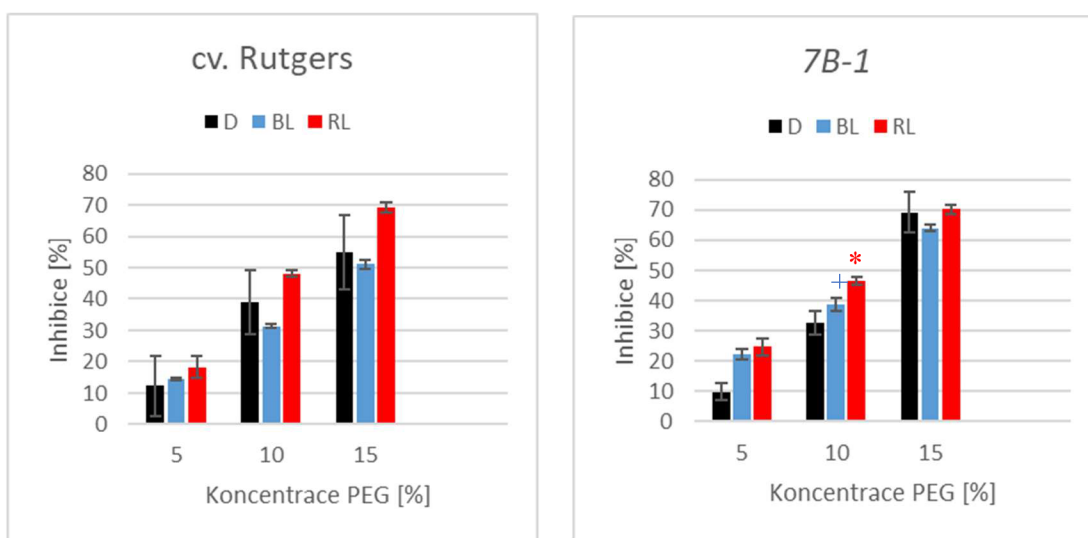
4.2.1 Mutant *7B-1*

Na Obr. 17 lze vidět, že při absenci PEG BL i RL výrazně inhibovaly růst hypokotylu genotypu cv. Rutgers (WT) i mutantu *7B-1*. Aplikace PEG následně vedla při všech testovaných světelných podmínkách u obou genotypů k výrazné redukci délky hypokotylu.



Obr. 17: Grafy závislosti délky hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek hypokotylu ± SE získaných z 5 na sobě nezávislých experimentů.

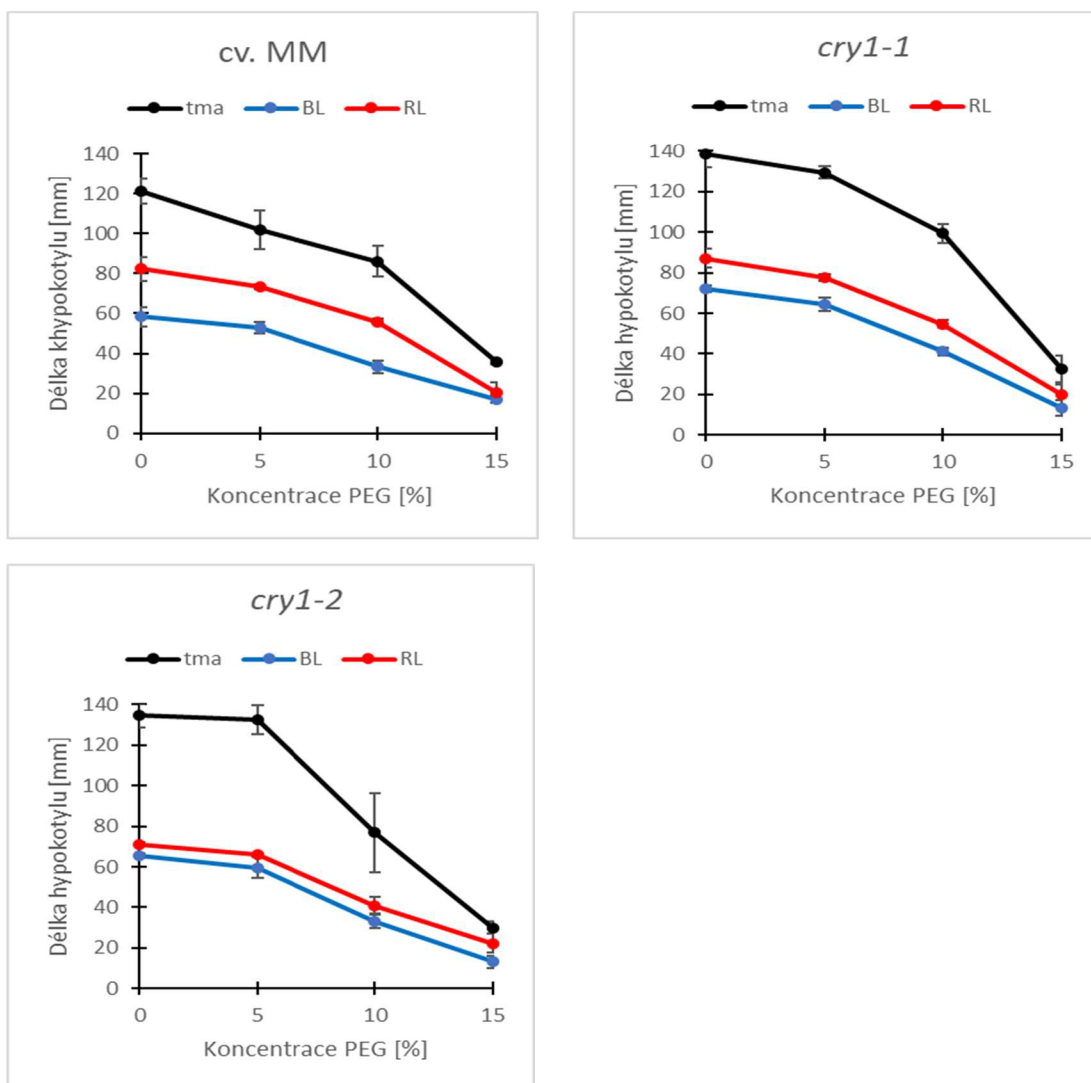
Z grafů na Obr. 18 lze následně vyčíst, že u cv. Rutgers PEG při všech testovaných koncentracích inhiboval růst hypokotyly výrazněji na RL. U mutantu *7B-1* byl růst hypokotyly inhibován vlivem 5 % PEG ztelně více na BL i RL, kdežto při koncentracích 10 a 15 % měl PEG na růst hypokotyly podobné inhibiční účinky v D, BL i RL. Výraznější rozdíly v úrovni inhibice růstu hypokotyly mezi cv. Rutgers a *7B-1* však nebyly pozorovány.



Obr. 18: Grafy závislosti inhibice růstu hypokotyly rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu hypokotyly \pm SE vypočítaných v 5 na sobě nezávislých experimentech; * signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05) od hypokotylů *7B-1* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

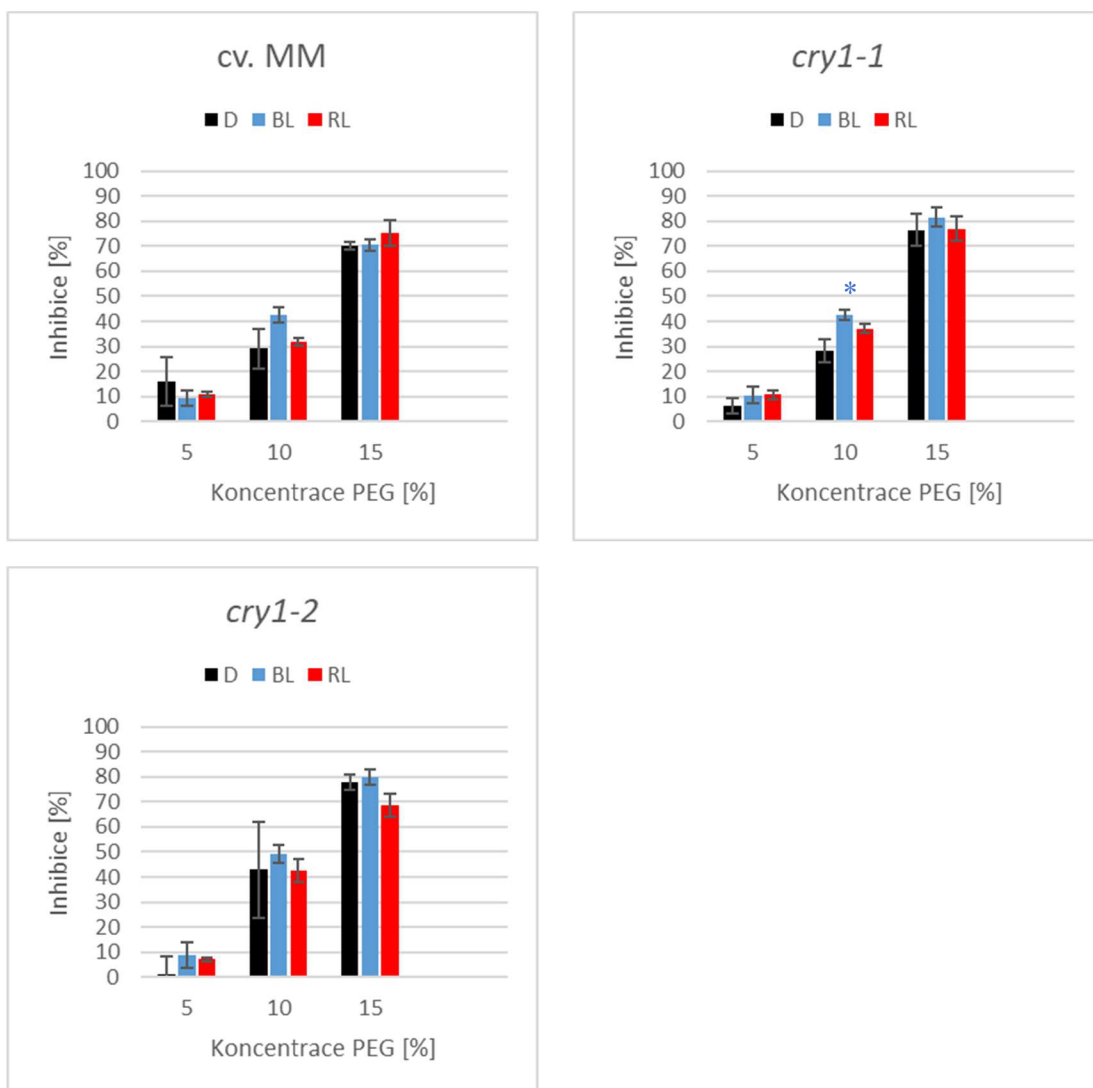
4.2.2 Mutant *cry1-1* a *cry1-2*

Na Obr. 19 jsou zobrazeny grafy ukazující růst hypokotyly cv. MM a mutantů *cry1-1* a *cry1-2* v závislosti na koncentraci PEG. V první řadě je vidět, že na médiu bez PEG byly etiolizované hypokotyly obou mutantů výrazně delší než hypokotyly cv. MM. Při 0% koncentraci PEG dosahovaly hypokotyly cv. MM délky 121,3 mm a *cry1-1* a *cry1-2* okolo 135 mm. Dále je vidět, že délka hypokotyly u všech genotypů se se zvyšující se koncentrací PEG snižovala, a to při všech testovaných světelných podmínkách.



Obr. 19: Grafy závislosti délky hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker (cv. MM) a od něj odvozeného mutanta *cry1-1* a *cry1-2* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek hypokotylu \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

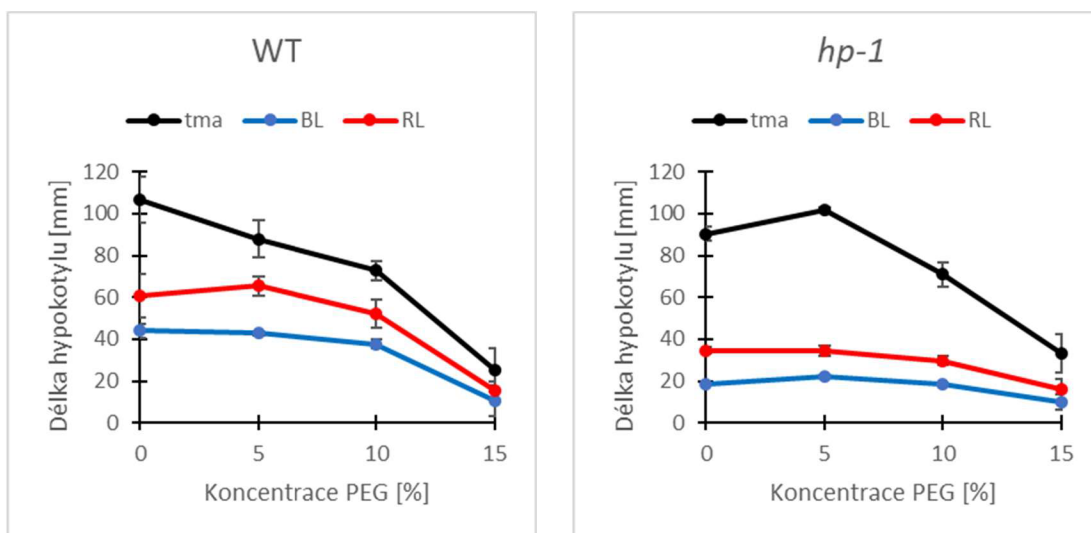
Z grafu na Obr. 20 lze následně vyčíst, že u cv. MM byla úroveň inhibice růstu hypokotylu podobná ve D, BL i RL, a to jak při koncentraci PEG 5 %, tak při 10 či 15 %. Při 15 % koncentraci PEG dosahovala inhibice prodloužování hypokotylu ve D, BL i RL průměrně 70 %. Podobný trend inhibice růstu hypokotylu by pozorován jak u mutanta *cry1-1*, tak *cry1-2*.



Obr. 20: Grafy závislosti inhibice růstu hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Money Maker (cv. MM) a od něj odvozeného mutantů *cry1-1* a *cry1-2* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu hypokotylu \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů; * signifikantní rozdíl (T-test, * $P = 0,05$) od hypokotylů *cry1-1* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

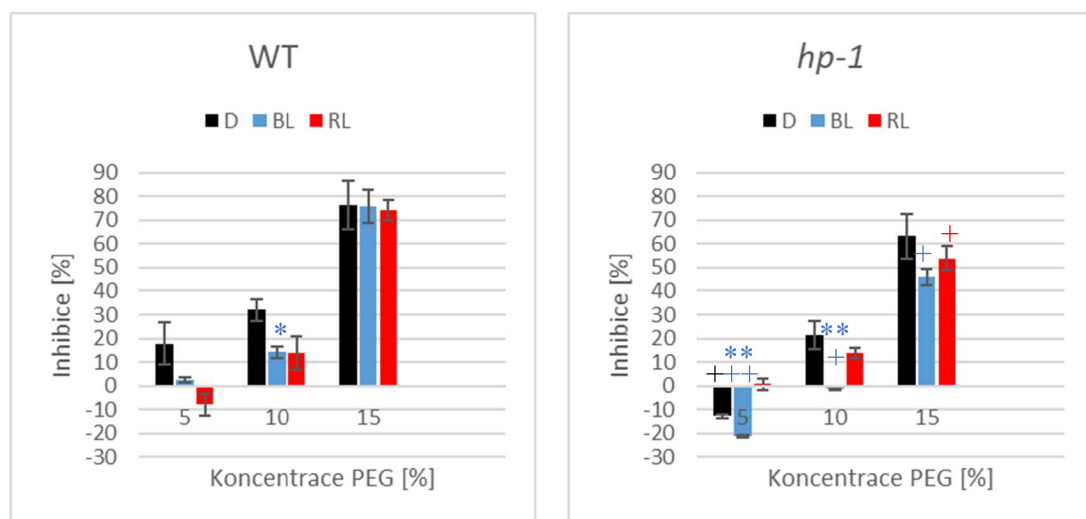
4.2.3 Mutant *hp-1*

Na Obr. 21 lze vidět grafy zobrazující inhibiční účinky PEG na růst hypokotylu WT a mutantu *hp-1* v D, BL a RL. V D měl WT průměrné hodnoty délek hypokotylů při jednotlivých koncentracích PEG (od 0 do 15 %) 107, 88, 73 a 25 mm. Mutant *hp-1* měl délky hypokotylů výrazně menší, a to 90, 102, 71 a 33 mm. Mutant *hp-1* měl zřejmě kratší hypokotyl než WT i při růstu na BL či RL. Na první pohled byl i inhibiční účinek PEG na růst hypokotylů v BL i RL nižší než u WT. To bylo zřetelné především u koncentrací PEG 10 a 15 %.



Obr. 21: Grafy závislosti délky hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* genotypu cv. Rutgers LA3004 (WT) a od něj odvozeného mutantu *hp-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek hypokotylu ± SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

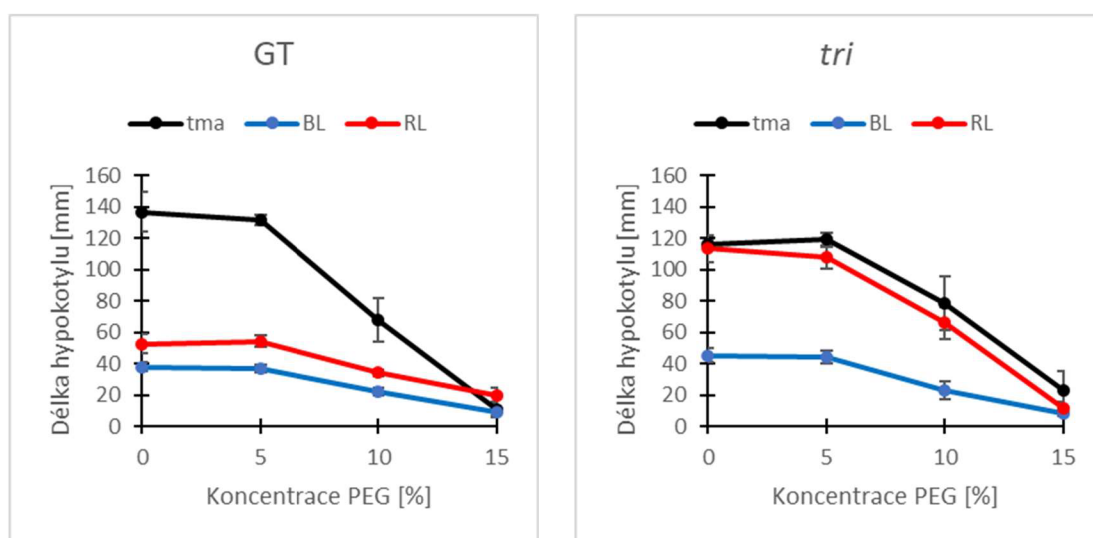
Jak ukazuje Obr. 22, inhibice růstu hypokotylu WT na 10 % koncentraci PEG byla v D a BL kolem 30 %, respektive 15 %, kdežto u *hp-1* inhibice hypokotylu dosahovala v D 20 %, zatímco na BL inhibice pozorována nebyla. Významné rozdíly mezi inhibicí růstu hypokotylu WT a *hp-1* byly pozorovány i u inhibičního účinku 15 % PEG, kdy hypokotyl *hp-1* byl výrazně méně inhibován než WT především v BL a RL.



Obr. 22: Grafy závislosti inhibice růstu hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers LA3004 (WT) a od něj odvozeného mutantu *hp-1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu hypokotylu ± SE vypočítané ve 3 na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, + P = 0,05; ++ P=0,01) od hypokotylů WT rostoucích ve stejných podmínkách; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05; ** P=0,01) od hypokotylů WT anebo *hp-1* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

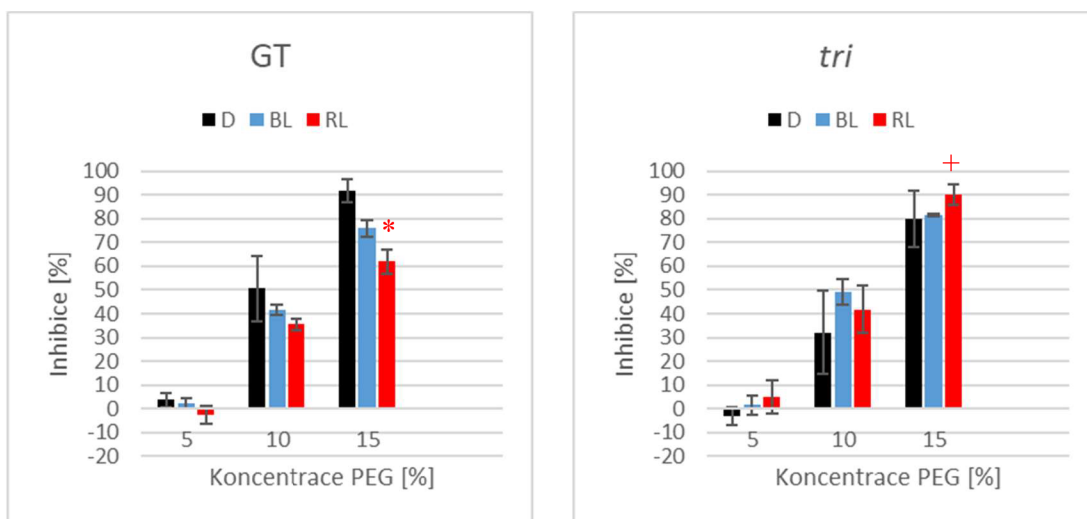
4.2.4 Mutant *tri1*

Graf na Obr. 23 v první řadě ukazuje, že mutant *tri1* měl na RL výrazně delší hypokotyl než kultivar GT. Dále jsou z grafu zřejmé silné inhibiční účinky vyšších koncentrací PEG na růst etiolovaného hypokotylu cv. GT i mutantu *tri1*. Průměrné hodnoty délek hypokotylů při růstu v D při koncentracích PEG 0, 5, 10 a 15 % byly u cv. GT 136,7, 131,6, 67,6 a 11,2 mm, mutantu *tri1* byly průměrné délky 116, 119,4, 78,7 a 23,3 mm. Podobné výrazné inhibiční účinky na růst hypokotylu obou genotypů měl PEG i na BL i RL



Obr. 23: Grafy závislosti délky hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. GT a od něj odvozeného mutantu *tri1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných délek hypokotylu \pm SE získaných ze 3 na sobě nezávislých experimentů.

Jak ukazuje Obr. 24, PEG při koncentraci 5 a 10 % inhiboval růst u obou genotypů podobně, a to jak v D, tak BL i RL. Průměrná hodnota inhibice na 10 % PEG byla u obou genotypů při všech světelných podmínkách kolem 40 %. Naproti tomu, rozdíly v prodlužování hypokotylu mezi cv. GT a mutantem *tri1* byly pozorovány při koncentraci 15 %, a to na RL. Zatímco u cv. GT dosahovala inhibice růstu hypokotylu asi 60 %, u *tri1* to bylo téměř 90 %.



Obr. 24: Grafy závislosti inhibice růstu hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* cv. GT a od něj odvozeného mutantu *tri1* na koncentraci polyethylenglykolu (PEG) pěstovaných v různých světelných podmínkách (D, BL a RL) po dobu 7 dní. V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu hypokotylu \pm SE vypočítaných ve 3 na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, + P = 0,05) od hypokotylů GT rostoucích ve stejných podmínkách; * = signifikantní rozdíl (T-test, * P = 0,05) od hypokotylů GT rostoucích ve tmě při stejné koncentraci PEG.

5 DISKUZE

V teoretické části této bakalářské práce bylo zmíněno, že fotoreceptory rostlin, konkrétně fytochromy, kryptochromy a fototropiny jsou zodpovědné za přenos světelného signálu a vyvolání mnoha vývojových a růstových odpovědí rostlin. Tyto fotoreceptory jsou ale také důležité v regulaci odpovědi rostlin na abiotický stres, v našem případě sucho. V experimentální části bylo hlavním cílem zjistit a alespoň z části vysvětlit, jakým způsobem fotoreceptory regulují toleranci rostlin *Solanum lycopersicum* k suchu. Experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro*, kde byl stres nedostatku vody vyvolán aplikací polyethylenglykolu PEG 4000.

Při pokusech s mutantní rostlinou *7B-1* a kontrolním genotypem cv. Rutgers (dále jen WT) byl zjištěn inhibiční účinek PEG na růst kořene. U kořenů WT se citlivost k vyšším koncentracím PEG zvyšovala na RL, zatímco u *7B-1* nebylo toto zvýšení patrné a citlivost kořenů *7B-1* k PEG byla v D, BL a RL podobná. Z těchto experimentů lze tedy udělat závěr, že RL zvyšuje citlivost kořenů rajčete k vyšším koncentracím PEG prostřednictvím funkčního (ale zatím neznámého) produktu genu *7B-1*. Mutace v genu *7B-1* vede ke snížené citlivosti rostlin ke světlu, v reakcích zprostředkovaných fototropiny, a k toleranci k abiotickým stresům (Fellner a Sawhney, 2002; Hlavinka a kol., 2013). Podle dostupných informací byla v případě působení sucha zjištěna v rostlinách zvýšená koncentrace ABA, která způsobuje vyšší toleranci k abiotickým stresům (Quarrie 1980; Chen a kol., 1983; Chandler a Robertson 1994; Fellner a Sawhney, 2001, 2002). Bylo rovněž zjištěno, že mutant *7B-1* produkuje více ABA než kontrolní genotyp cv. Rutgers. Účinek PEG byl testován již v roce 2001 na klíčení semen WT a od něj odvozeného mutantu *7B-1* Fellnerem a Sawhney. Zde bylo zjištěno, že čím vyšší koncentrace PEG byla použita, tím vyšší byla inhibice klíčení semen. Konkrétně při růstu *7B-1* v 15 % PEG na světle bylo klíčení silně inhibováno, stejně tak jako v našem případě byla pozorována největší inhibice při růstu kořene v 15 % PEG na BL a RL.

V případě hypokotylů byla u obou genotypů zaznamenána téměř stejně výrazná inhibice jejich růstu na světle jako u kořene. Na rozdíl od kořenů nebylo však pozorováno výrazné a konzistentní zvýšení citlivosti hypokotylů k PEG vlivem světla, a to ani u jednoho z genotypů. Je tedy zřejmé, že světlo zvyšuje citlivost k PEG specificky a prostřednictvím *7B-1* pouze u kořenů.

Ke studiu možné úlohy fotoreceptoru CRY1 v regulaci tolerance k suchu byly dále provedeny růstové pokusy s mutanty *cry1-1* a *cry1-2*. V našich experimentech jsme

zjistili, že citlivost kořenů kontrolního kultivaru cv. MM k nízké koncentraci PEG (5 %) byla signifikantně snížena na BL i RL. Tento jev byl pozorován v menší míře i u mutantů *cryI-1* a *cryI-2*. Naproti tomu, světlo citlivost kořenů cv. MM k vyšším koncentracím PEG zvyšovalo. U mutantu *cryI-1* však tento jev pozorován nebyl a u mutantu *cryI-2* byl pozorován pouze na BL. Zdá se tedy, že BL a RL snižuje citlivost kořenů rajčete k nízkým koncentracím PEG bez zapojení fotoreceptoru CRY1, zatímco CRY1 by mohl zprostředkovat vliv světla na zvyšování citlivosti kořenů k vyšším koncentracím PEG. Dále bylo pozorováno, že oba mutanti vykazovaly signifikantně vyšší citlivost etiolizovaných kořenů (sníženou toleranci) k vysoké koncentraci PEG. Je tedy pravděpodobné, že ve tmě (tedy v neaktivovaném stavu) fotoreceptor CRY1 redukuje citlivost kořenů k PEG. Z výsledků je tedy vidět, že vliv fotoreceptoru CRY1 na citlivost kořenů k PEG závisí na světelných podmínkách, tedy na jeho aktivaci – ve tmě CRY1 snižuje citlivost kořenů k PEG (zvyšuje toleranci), na světle zvyšuje citlivost kořenů k PEG (snižuje toleranci). Pro přesnější zjištění, zda je CRY1 opravdu zapojen v citlivosti kořene k PEG by bylo vhodné otestovat růst rostlin i při vyšších koncentracích PEG. Dále by bylo dobré otestovat na citlivost k PEG i mutanty s over-exprimovaným fotoreceptorem CRY1, kde bychom očekávali opačné reakce k PEG jako u mutantů *cryI-1* a *cryI-2*.

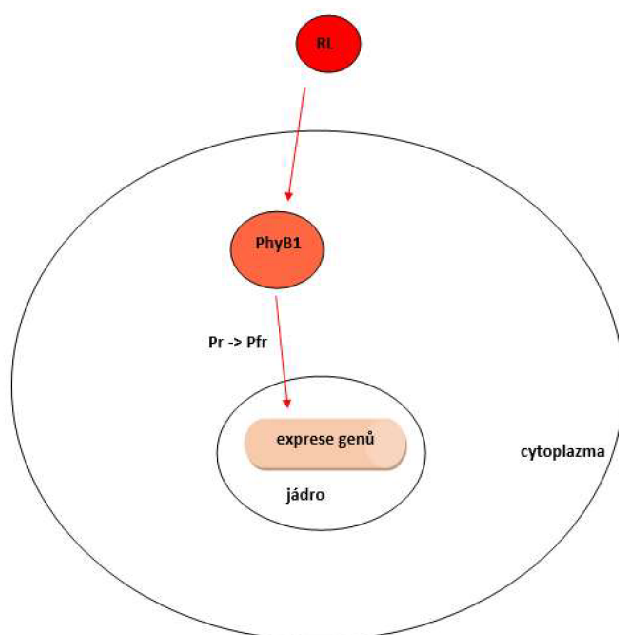
Na rozdíl od kořenů, u hypokotylů cv. MM a obou mutantů nebyl pozorován výrazný vliv testovaných světelných podmínek na toleranci rostlin k PEG. Hypokotyly obou mutantů vykazovaly rovněž podobný stupeň citlivosti k PEG jako odpovídající kultivar MM. Je tedy pravděpodobné, že fotoreceptor CRY1 reguluje citlivost rostlin rajčete k suchu pouze na úrovni kořenů. V jiném experimentálním systému však Liu a kol. (2018) zjistili, že při růstu na světle listy mutantní rostliny *cryI-1* obsahují větší množství, asi o 20 % více, kyseliny abscisové (ABA) než kontrolní rostlina cv. MM. Díky tomu byly v jejich experimentech s největší pravděpodobností rostliny *cryI-1* tolerantnější ke stresu způsobenému suchem, protože má nižší únik vody z těla rostliny (D'Amico-Damião a kol., 2015; Bertolino a kol., 2019; D'Amico-Damião a kol., 2021).

Experimenty s mutantem *hp-1* ukázaly na výraznější rozdíly v toleranci k PEG od kontrolního kultivaru cv. Rutgers LA3004 (WT). U WT bylo opět pozorováno, že BL a RL snižuje signifikantně citlivost kořenů k nižším koncentracím PEG. Tento jev nebyl ovšem pozorován u mutantu *hp-1*. Naopak, kořeny *hp-1* vykazovaly na BL a RL signifikantně vyšší citlivost k PEG než kořeny WT. Zajímavé je rovněž zjištění, že kořeny rostlin rostoucích ve tmě byly k PEG velice tolerantní ve srovnání s kořeny WT.

Z výsledků můžeme dedukovat, že funkční protein DDB1 na BL a RL snižuje citlivost kořenů rajčete k PEG, kdežto ve tmě naopak citlivost k PEG zvyšuje – tedy snižuje toleranci. Mutace proteinu DDB1 u mutant *hp-1* vede ke zvýšené expresi fytochromu B1 (PhyB1) a tudíž k výrazně vyšší citlivostí ke světlu (Shahzad a kol., 2020). Je tedy možné, že světlo zvyšuje citlivost kořenů k PEG prostřednictvím PhyB1.

Ve shodě s tím bylo v našich experimentech zjištěno, že délka hypokotylů mutantu *hp-1* při růstu na BL a RL byla výrazně menší než u WT. Tuto skutečnost potvrzuje i Azari a kol. (2010). Hypokotyly mutantu *hp-1* ve srovnání s WT vykazovaly na BL a RL výrazně sníženou citlivost k PEG, především k nejvyšší testované koncentraci 15 %. Z výsledků lze tedy usoudit, že na BL a RL funkční protein DDB1 zvyšuje citlivost hypokotylů k PEG. Vzhledem k tomu, že *hp-1* over-exprimuje PhyB1, lze dedukovat, že PhyB1 zprostředkuje snížení citlivosti hypokotylů k PEG.

Byl navržen mechanismus, který rostliny pravděpodobně používají ke zvýšení tolerance k suchu (Obr. 25). Neaktivní Pr forma PhyB1 je aktivována ozářením paprsky RL na Pfr formu. Takto aktivovaný fytochrom je translokován z cytoplasmy do jádra, kde ovlivní expresi genů potřebných právě pro snížení citlivosti rostliny k suchu, a tedy zvýšení tolerance k nedostatku vody. Další mechanismus, který pravděpodobně může být zapojen do zvýšení tolerance hypokotylů *hp-1* k suchu, je produkce velkého množství antokyanů, karotenoidů a flavonoidů, které účinně bojují proti dopadům abiotických stresů (Levin a kol., 2006).



Obr. 25: Schéma úlohy fytochromu B1 v toleranci rostlin k suchu. Neaktivní Pr forma PhyB1 je aktivována ozářením paprsky RL na Pfr formu. Ta je translokována z cytoplazmy do jádra, kde ovlivní expresi genů potřebných pro toleranci k suchu.

U kultivaru cv. GT, od kterého byl odvozen poslední studovaný mutant *tri1*, bylo pozorováno signifikantně významné snížení citlivost kořene k inhibičnímu účinku 5 % PEG vlivem BL i RL. Červené světlo pak ukazovalo tento účinek i u koncentrací 10 a 15 % PEG. Tento efekt však nebyl zjištěn u mutantu *tri1*. U mutantu *tri1* byla naopak na RL pozorována zřetelně silnější inhibice růstu kořene vlivem 15 % PEG, než u cv. GT. Z výsledků tedy můžeme usuzovat, že RL snižuje citlivost kořenů k PEG pravděpodobně prostřednictvím PhyB1. Tento závěr se však neshoduje se závěrem učiněným z výsledků získaných studiem růstu kořenů mutantu *hp-1*. Bude tedy nutné provést další (jiné) experimenty, které by tento rozpor mohly vysvětlit.

U hypokotylů bylo na první pohled zřejmé, že rozdíly délek hypokotylů GT a *tri1* kultivovaných ve tmě bez přítomnosti PEG nebyly téměř žádné, na což poukazuje van Tuinen a kol. (1995). Při růstu na BL byly průměrné délky hypokotylů obou genotypů více či méně podobné. Jak již celý název mutantní rostliny *tri1* (*temporarily red-light insensitive*) napovídá, největší rozdíly v růstu hypokotylů mezi GT a mutantem lze vidět při růstu na RL, toto potvrzuje i van Tuinen a kol. (1995). Hypokotyly *tri1* byly téměř necitlivé k RL, což potvrzuje výrazně omezenou funkčnost PhyB1.

U hypokotylů cv. GT pěstovaných na PEG byl pozorován podobný, ale slabší vliv BL a RL na citlivost k 10 a 15 % PEG, přičemž RL signifikantně snižovalo citlivost hypokotylu k PEG pouze u nejvyšší testované koncentrace 15 %. Při této koncentraci však hypokotyle mutanta *tri1* ukazovaly na RL signifikantně vyšší citlivost k PEG, než bylo pozorováno u cv. GT. Z výsledků lze tedy dedukovat, že podobně jako u kořenů, RL snižuje citlivost hypokotylů k vyšším koncentracím PEG prostřednictvím fytochromu PhyB1. Nefunkčnost (nebo omezená funkčnost) PhyB1 u mutanta *tri1* vede z tohoto důvodu k vysoké citlivosti k PEG, tedy snížené toleranci k suchu. Jelikož je PhyB1 nefunkční, nemůže fungovat navržený mechanismus (Obr. 25), který pozitivně ovlivňuje expresi genů potřebných ke zvýšení tolerance rostliny k suchu. Z tohoto vyplývá, že exprese těchto potřebných genů neprobíhá.

6 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda kvalita světla ovlivňuje schopnost rostlin tolerovat stres suchem a jestli ano, tak jakým způsobem. Pro splnění tohoto cíle byly použity rostliny fotomorfogenních mutantů rajčete *Solanum lycopersicum* L. *7B-1*, *cry1-1*, *cry1-2*, *hp-1* a *tri1*, které mají defekty ve fotoreceptorech nebo přenosu světelného signálu. Stres suchem byl indukován pomocí polyethylenglykolu PEG 4000 o koncentracích 0, 5, 10 a 15 %.

Při pokusech s mutantní rostlinou *7B-1* a kontrolní rostlinou cv. Rutgers bylo zjištěno, že mutace v genu *7B-1* snižuje citlivost rostlin ke světlu a toleranci k abiotickým stresům. Bylo to prokázáno tak, že rajčata rostoucí na RL vykazují zvýšenou citlivost kořenů k vyšším koncentracím PEG. To by mohlo být zprostředkováno funkčním, ale prozatím neznámým produktem genu *7B-1*.

Úloha CRY1 v toleranci rostlin k suchu byla zjištěna při testování na mutantních rostlinách *cry1-1* a *cry1-2*. Vliv CRY1 na citlivost kořenů k vyšším koncentracím PEG (větší suchu) byl závislý na světelných podmínkách. Na světle se citlivost těchto mutantů k suchu snižuje, což by mohlo znamenat, že fotoreceptor CRY1 zprostředkovává vliv světla na zvýšení citlivosti kořenů k vyšším koncentracím PEG. BL a RL citlivost kořenů k nízkým koncentracím PEG snižuje bez zapojení CRY1. Naopak ve tmě je citlivost mutantů k suchu zvýšena (tolerance je snížena).

U mutantní rostliny *hp-1* je funkční protein DDB1 na BL a RL pravděpodobně schopen snižovat citlivost kořenů rajčete k PEG, naopak ve tmě citlivost k PEG zvyšuje. Z výsledků bylo zjištěno, že světlo zvyšuje citlivost kořenů k PEG prostřednictvím PhyB1. Bylo prokázáno, že mutace proteinu DDB1 zvyšuje expresi PhyB1, a tím zvyšuje citlivost kořenů ke světlu a zároveň citlivost k PEG (suchu). U hypokotylů bylo zjištěno, že na BL a RL funkční protein DDB1 zvyšuje citlivost hypokotylů k PEG. Z toho vyplývá, že PhyB1 může zprostředkovat snížení citlivosti hypokotylů k PEG. Celkový mechanismus zvyšující toleranci rostlin k suchu je tedy závislý na světelných podmínkách.

Mutantní rostlina *tri1* disponovala opačnými výsledky než *hp-1*, a to konkrétně velmi omezenou funkcí PhyB1. RL snižovalo signifikantně citlivost jak kořene, tak hypokotylu rajčat k PEG (suchu). To vše je pravděpodobně zprostředkováno PhyB1.

V bakalářské práci bylo experimenty zjištěno, že kvalita světla ovlivňuje schopnost rostlin rajčete tolerovat stres suchem, a že se tak může dít např. prostřednictvím

fotoreceptorů PhyB1 či CRY1. K potvrzení těchto závěrů však bude nutné provést další experimenty, například dalších fotomorfogenních mutantů či pomocí komplementárních experimentů.

7 SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

Ahmad M a Cashmore AR. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366, 162-166.

Ahmad P a Prasad MNV (2012). Abiotic stress responses in plants. *Library of Congress Control Number*, 2011940823.

Arana MV, Burgin MJ, de Miguel LC a Sánchez RA (2007). The very-low-fluence and high-irradiance responses of the phytochromes have antagonistic effects on germination, mannan-degrading activities, and DfGA3ox transcript levels in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3997-4004.

Azari R, Reuveni M, Evenor D, Nahon S, Shlomo H, Chen L a Levin I (2010). Overexpression of *UV-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN1* links plant development and phytonutrient accumulation in *high pigment-1* tomato. *Journal of Experimental Biology*, 13, 3627-3637.

Bae G a Choi G (2008). Decoding of light signals by plant phytochromes and their interacting proteins. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 281-311.

Bertolino LT, Caine RS a Gray JE (2019). Impact of stomatal density and morphology on water-use efficiency in a changing world, *Plant Science*, 10, 225.

Boccalandro HE, Rugnone ML, Moreno JE, Ploschuk EL, Serna L, Yanovsky MJ a Casal JJ (2009). Phytochrome B enhances photosynthesis at the expense of water-use efficiency in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 150, 1083-1092.

Boggs JZ, Loewy K, Bibee K a Heschel MS (2010). Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation*, 60, 77–81.

Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH a Toole VK (1952). A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 662-666.

Buchanan BB, Gruissem W a Jones RL (2015). *Biochemistry & molecular biology of plants* (Second edition). Wiley Blackwell.

- Butler WL, Norris KH, Siegelman HW a Hendricks SB (1959). Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 45, 1703-1708.
- Carvalho RF, Campos ML a Azevedo RA (2011). The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology*, 53, 920-929.
- Casal JJ, Sanchez RA a Botto JF (1998). Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany*, 49, 127-138.
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ a Liu D (1999) Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284, 760-765.
- D'Amico-Damião V, Carvalho RF (2018). Cryptochrome-Related Abiotic Stress Responses in Plants. *Plant Science*, 9, 1897.
- D'Amico-Damião V, Cruz FJR, Gavassi MA, Santos DMM, Mello HC a Carvalho RF (2015). Photomorphogenic modulation of water stress in tomato (*Solanum lycopersicum* L.): the role of phytochromes A, B1, and B2. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 90, 25-30.
- D'Amico-Damião V, Dodd, IC, Oliveira R, Lúcio J, Rossatto DR a Carvalho RF (2021). Cryptochrome 1a of tomato mediates long-distance signaling of soil water deficit. *Plant Science*, 303, 110763.
- Demotes-Mainard S, Péron T, Corot A, Bertheloot J, Le Gourrierc J, Pelleschi-Travier S, Crespel L, Morel P, Huché-Thélier L, Boumaza R, Vian A, Guérin V, Leduc N a Sakr S (2016). Plant responses to red and far-red lights, applications in horticulture, *Environmental and Experimental Botany*, 21, 4-21.
- Deng XW a Quail PH (1992). Genetic and phenotypic characterization of cop1 mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 2, 83-95.
- Du H, Huang F, Wu N, Li XH, Hu HH a Xiong LH (2018). Integrative regulation of drought escape through ABA-dependent and -independent pathways in Rice. *Molecular Plant*, 11, 584–597.

- Fellner M a Sawhney V (2001). Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 215-221.
- Fellner M a Sawhney VK (2002). The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*, 214, 675-682.
- González CV, Ibarra SE, Piccoli PN, Botto JF a Boccalandro HE (2012). Phytochrome B increases drought tolerance by enhancing ABA sensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell and Environment*, 35, 1958-1968.
- Han C a Yang P (2015). Studies on the molecular mechanisms of seed germination. *Proteomics*, 15, 1671-1679.
- Han X, Huang X a Deng XW (2020). The photomorphogenic central repressor COP1: Conservation and functional diversification during evolution. *Plant Communication*, 1, 100044.
- Hart JE a Gardner KH (2021). Lighting the way: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 296, 100594.
- Hauser BA, Cordonnier-Pratt, MM, Daniel-Vedele, F a Pratt LH (1995). The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Molecular Biology*, 29, 1143-1155.
- Hlavinka J, Nauš J a Fellner M (2013). Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, 209, 75-80.
- Holm M., Hardtke CS, Caudet R a Deng XW (2001). Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1. *The EMBO Journal*, 20, 118-127.
- Hussain HA, Hussain S, Khaliq A, Ashraf U, Anjum SA, Men SN a Wang LC (2018). Chilling and drought stresses in crop plants: Implications, cross talk, and potential management opportunities. *Plant Science*, 9, 393.
- Chandler PM a Robertson M (1994). Gene expression regulated by abscisic acid and its relation to stress tolerance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 45, 113-141.

- Chen THH, Li PH a Brenner ML (1983). Involvement of abscisic acid in potato cold acclimatization. *Plant Physiology*, 71, 362-365.
- Christie JM (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 21-45.
- Inoue S, Takemiya A a Shimazaki K (2010). Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 587-93.
- Inoue SI a Kinoshita T (2017). Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, 174, 531-538.
- Jones R, Ougham H, Thomas H a Waaland S (2013). The molecular life of plants, Wiley-Blackwell.
- Junior CAS, D'Amico-Damião V a Carvalho RF (2021). Phytochrome type B family: the abiotic stress responses signaller in plants, *Annals of Applied Biology*, 178, 135–148.
- Kagawa T a Wada M (1999). Chloroplast-avoidance response induced by high-fluence blue light in prothallial cells of the fern *Adiantum capillus-veneris* as analyzed by microbeam irradiation. *Plant Physiology*. 119, 917-24.
- Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR a Yang HQ (2009). Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 2624-2641.
- Kendrick RE, Kerckhoffs LHJ, Pundsnes AS, van Tuinen A, Koornneef M, Nagatani A, Terry MJ, Tretyan A, Cordonnier-Pratt, MM, Hauser B a Pratt LH (1994). Photomorphogenic mutants of tomato. *Euphytica*, 79, 227-234.
- Kinoshita T, Doi M, Suetsugu N, Kagawa T, Wada M a Shimazaki K (2001). Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414, 656-660.
- Kleine T, Lockhart P a Batschauer A (2003). An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal*, 35, 93-103.
- Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M a Miginiac E (1994). Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. *Plant Journal*, 6, 665-672.

- Kuromori T, Fujita M, Takahashi F, Yamaguchi-Shinozaki K a Shinozaki K (2022). Inter-tissue and inter-organ signaling in drought stress response and phenotyping of drought tolerance. *Plant Journal*, 109, 342-358.
- Leivar P a Quail PH (2011). PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends in Plant Science*, 16, 19–28.
- Levin I, Ric de Vos CH, Tadmor Y, Bovy A, Lieberman M, Oren-Shamir M, Segev O, Kolotilin I, Keller M, Ovadia R, Meir A a Raoul J (2006). High pigment tomato mutants—more than just lycopene (a review), *Israel Journal of Plant Sciences*, 54, 179-190.
- Li Y, Deng H, Miao M, Li H, Huang S, Wang S, Liu Y (2016) Tomato MBD5, a methyl CpG binding domain protein, physically interacting with UV-damaged DNA binding protein-1, functions in multiple processes. *New Phytologist*, 210, 208–226.
- Lin C (2002). Phototropin blue light receptors and light-induced movement responses in plants. *Science Signaling*, 118.
- Lin C a Shalitin D (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 54, 469-496.
- Liu C, Ahammed GJ, Wang GT, Xu JC, Chen KS, Zhou YZ a Yu JZ (2018). Tomato CRY1a plays a critical role in the regulation of phytohormone homeostasis, plant development, and carotenoid metabolism in fruits, *Plant Cell Environment*, 41, 354-366.
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M a Lin C (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16, 684-691.
- McNellis TW a Deng XW (1995). Light control of seedling morphogenetic pattern. *Plant Cell*, 1749-1761.
- McNellis TW, von Arnim AG, Araki T, Komeda Y, Miséra S a Deng XW (1994). Genetic and molecular analysis of an allelic series of cop1 mutants suggests functional roles for the multiple protein domains. *Plant Cell*, 6, 487-500.
- Mollard FPO a Insausti P (2009). Soil moisture conditions affect the sensitivity of *Bromus catharticus* dormant seeds to light and the emergence pattern of seedlings. *Seed Science Research*, 19, 81-89.

- Murashige T a Skoog A (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- Nemhauser J a Chory J (2002). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 1, 54-67.
- Ni M, Tepperman JM a Quail PH (1998). PIF3, a phytochrome-interacting factor necessary for normal photoinduced signal transduction, is a novel basic helix-loop-helix protein. *Cell*, 95, 657-667.
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J a Šebánek J (1998). Fyziologie rostlin. Academia.
- Quail PH (1997). An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment*, 20, 657-665
- Quail PH (2002). Phytochrome photosensory signalling networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 3, 85-93.
- Quarrie SA (1980). Genotypic differences in leaf water potential, abscisic acid and proline concentrations in spring wheat during drought stress. *Annals of Botany*, 46, 383–394.
- Sanchez RA, de Miguel L, Lima C a de Lederkremer RM (2002). Effect of low water potential on phytochrome-induced germination, endosperm softening and cell-wall mannan degradation in *Datura ferox* seeds. *Seed Science Research*, 12, 155-163.
- Shahzad R, Ahmed F, Wang Z, Harlina PW, Nishawy E, Ayaad M, Manan A, Maher M a Ewas M (2020). Comparative analysis of two phytochrome mutants of tomato (Micro-Tom cv.) reveals specific physiological, biochemical, and molecular responses under chilling stress. *Journal, Genetic Engineering & Biotechnology*, 18, 77.
- Smirnova, OG, Stepanenko, IL, Shumny a VK (2012). Mechanism of action and activity regulation of COP1, a constitutive repressor of photomorphogenesis. *Russian Journal of Plant Physiology*, 59,155-166.
- Srinivas A, Behera RK, Kagawa T, Wada M a Sharma R (2004). High pigment1 mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. *Plant Physiology*, 134, 790–800.

- Stoop-Myer C, Torii KU, McNellis TW, Coleman JE a Deng XW (1999). Short communication: the N-terminal fragment of Arabidopsis photomorphogenic repressor COP1 maintains partial function and acts in a concentration-dependent manner. *Plant Journal*, 20, 713-717.
- Suetsugu N a Wada M (2007). Chloroplast photorelocation movement mediated by phototropin family proteins in green plants. *Biological Chemistry*. 388, 927-35.
- Taiz L a Zeiger E (c2010). *Plant physiology* (Fifth edition). Sinauer Associates.
- Takahashi F, Kuromori T, Sato H a Shinozaki K (2018). Regulatory gene networks in drought stress responses and resistance in plants. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1081, 189-210.
- Ulijasz AT a Vierstra RD (2011). Phytochrome structure and photochemistry: recent advances toward a complete molecular picture. *Current Opinion in Plant Biology*, 14, 498-506.
- Van Tuinen A, Kerckhoffs HJ, Nagatani A, Kendrick RE a Koornneef M (1995). A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. *Plant Physiology*, 108, 939-947.
- Weller JL, Perrotta G, Schreuder MEL, van Tuinen A, Koornneef M, Giuliano G a Kendrick RE (2001). Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant Journal* 25, 427-440.
- Xu D, Lin F, Jiang Y, Huang X, Li J, Ling J, Hettiarachchi C, Tellgren-Roth C, Holm M a Deng XW (2014). The RING-Finger E3 ubiquitin ligase COP1 SUPPRESSOR1 negatively regulates COP1 abundance in maintaining COP1 homeostasis in dark-grown Arabidopsis seedlings. *Plant Cell*, 26, 1981-1991.
- Yu X, Liu H, Klejnot J a Lin C (2010). The cryptochrome blue light receptors. *The Arabidopsis Book*, 8, e0135.
- Zhu JK (2016). Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167, 313-324.
- Zoltowski BD a Imaizumi T (2014). Structure and function of the ZTL/FKF1/LKP2 group proteins in Arabidopsis. *Enzymes*, 35, 213-239.