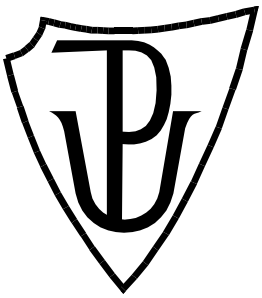


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

Vliv abiotických stresů na fototropické reakce rostlin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	**Martin Hřivňacký**
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	**prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.**
Termín odevzdání práce:	2020

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martin Hřivňacký
Název práce	Vliv abiotických stresů na fototropické reakce rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	Předkládaná bakalářská práce si klade za cíl zkoumání interakce mezi signalizací fototropinů a tolerancí k abiotickým stresům, konkrétně k zasolení a u modelové rostliny huseníček rolní (*Arabidopsis thaliiana* (L) Heynh.). Teoretická část shrnuje dosavadní znalosti o rostlinných fototropických reakcích a reakcích k zasolení a zároveň se také věnuje rostlinným hormonům auxinu a kyselině abscisové, které se na těchto dějích podílejí. Experimentální část se pak zabývá zkoumáním vlivu fototropinů na toleranci k zasolení a vlivu zasolení, společně s inhibicí syntézy kyseliny abscisové, na fototropické reakce hypokotylů *Arabidpsis* v podmínkách *in vitro*. Výsledky této práce vedou k závěrům, že stres ze zasolení inhibuje v hypokotylech *Arabidopsis* fototropickou reakci, a to alespoň z části nezávisle na inhibici elongace hypokotylu a rovněž částečně vlivem kyseliny abscisové, která může být negativním regulátorem fototropismu i při nestresových podmínkách. Výsledky také naznačují, že by se fototropiny mohly pozitivně podílet na toleranci hypokotylů *Arabidopsis* k zasolení.
Klíčová slova	abiotický stres, *Arabidopsis thaliana,* fototropin, fototropismus, kyselina abscisová, růst
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Martin Hřivňacký
Title of thesis	Influrence of abiotic stress on plant phototropic responses
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2020
Abstract	This bachelor thesis aims to investigate the interaction between phototropin signaling and plant abiotic stress tolerance specifically to salinity and in the model plant *Arabidopsis thaliana* (L) Heynh. The theoretical part summarizes existing knowledge about plant phototropic responses and responses to salinity, and simultaneously it is focused to plant hormones auxin and abscisic acid, involved in these processes. The experimental part examines the effect of phototropins on salt stress tolerance and the effect of salt stress along with inhibition of abscisic acid synthesis on phototropic reactions of *Arabidopsis* hypocotyls in *in vitro* conditions. The results of this thesis lead to conclusion that salt stress inhibits the phototropic reactions of *Arabidopsis* hypocotyls at least in part independently on inhibition of hypocotyl elongation and also partly due to abscisic acid, which may be a negative regulator of phototropism even under non-stress conditions. The results also suggests that phototropins may be positively involved in the tolerance of *Arabidopsis* hypocotyls to salt stress.
Keywords	abiotic stress, abscisic acid, *Arabidopsis thaliana,* growth, phototropin, phototropism
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

.....	.....
V Olomouci dne	Podpis

Poděkování

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěl poděkovat panu Pavlu Sedláčkovi za zkompletování použitého zdroje přímočarého modrého světla a prof. RNDr. Janu Naušovi, CSc., za změření spektra tohoto zdroje. V neposlední řadě bych chtěl poděkovat také Bc. Janě Glogarově a Mgr. Kristýně Schenkové za technickou pomoc při práci v laboratoři. Experimenty byly spolufinancovány z grantu IGA: IGA_PřF_2020_021.

Obsah

1 Úvod 8
2 Teoretická část 9
2.1 Fototropismus 9
2.1.1 Historie zkoumání fototropismu 9
2.1.2 Fototropiny 11
2.1.3 Proteiny interagující s fototropiny 14
2.1.4 Fototropický ohyb 16
2.2 Auxin 17
2.2.1 Syntéza a transport 17
2.2.2 Auxinové signální dráhy 19
2.3 Kyselina abscisová 21
2.3.1 Syntéza a transport 21
2.3.2 Signální dráhy ABA 22
2.4 Stres ze zasolení 23
2.4.1 Reakce rostlin na stres ze zasolení 24
2.4.2 Role ABA v reakci na zasolení 27
2.4.3 Role auxinu při zasolení 28
2.4.4 Působení zasolení na fototropismus 29
3 Experimentální část 30
3.1 Rostlinný materiál 30
3.2 Použité metody 30
3.2.1 Příprava média 30
3.2.2 Růstové experimenty 30
3.2.3 Experimenty s fototropismem při působení chloridu sodného 32
3.2.4 Experimenty s fototropismem při působení chloridu sodného a fluridonu 34
4 Výsledky 36
4.1 Růstové experimenty 36
4.1.1 *gl-1* 36

4.1.2 *phot1* 37
4.1.3 *phot2* 38
4.1.4 *phot1/phot2* 38
4.2 Fototropické experimenty 39
4.2.1 Experimenty s chloridem sodným 39
4.2.2 Experimenty s chloridem sodným a fluridonem 39
5 Diskuze 44
5.1 Růstové experimenty 44
5.2 Experimenty s fototropismem 46
6 Závěr 49
7 Citovaná literatura 50
8 Seznam použitých symbolů a zkratek 57

1 Úvod

Rostliny hrají v lidských životech nezastupitelnou roli. Vytváří životně důležitý kyslík, jsou základním zdrojem potravy a v neposlední řadě jsou také významnou surovinou pro mnohá odvětví hospodářství. Přes svou důležitost však byly velmi dlouhou dobu chápány pouze jako pasivní organismy bez schopnosti vnímat své okolí a jejich výzkum tak probíhal spíše okrajově. Ačkoliv se v posledních dvou stech letech tento názor podařilo překonat a dnes je již známo, že rostliny vnímají okolní svět a přizpůsobují se mu dokonce více než mnozí živočichové, stále o jejich fyziologii nebylo objeveno vše.

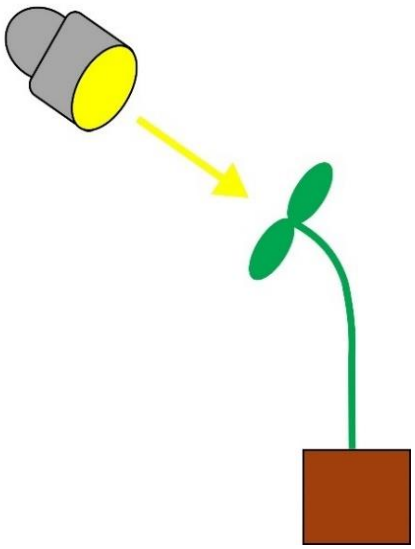
Jedním z těchto méně probádaných míst rostlinné fyziologie je fototropismus. Jedná se o usměrněný rostlinný růst ve směru příchozího světla, který rostlinám pomáhá optimalizovat příjem světelné energie. Ačkoliv se tomuto jevu věnovali vědci již od starověku, dodnes nejsou veškeré jeho aspekty osvětleny. Je známo, že pro fototropickou reakci je zásadní modrá část světelného spektra (λ = 380-500 nm), která je přijímána receptory fototropiny, které následně spouštějí signální kaskádu, na konci které vzniká gradient růstového hormonu auxinu mezi ozářenou a neozářenou stranou rostliny. Neozářená strana pak roste rychleji a vzniká ohyb. Co se ale zatím stále příliš neví, je způsob, jakým se fototropická signalizace vzájemně ovlivňuje s rostlinným vnímáním abiotických stresů. Abiotické stresy jsou souhrnné označení pro nepříznivé podmínky způsobené neživými vlivy okolí, které ve výsledku omezují rostlinnou klíčivost, růst i produkci a v krajních případech způsobují i jejich úhyn. Zasolení půd je jedním z nejpalčivějších abiotických stresů, které trápí dnešní rostlinnou produkci, a právě jemu se v souvislosti s fototropismem věnuje tato bakalářská práce.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit jak a skrze které transduktory a místa působení ovlivňuje zasolení (chloridem sodným) fototropické reakce rostlin huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh., dále jen *Arabidopsis*) k modrému světlu, a naopak jak ne/vnímání modrého světla skrze fototropiny ovlivňuje odolnost těchto rostlin ke stresu ze zasolení. Pro tyto účely se teoretická část práce snaží pokrýt maximum dosavadního vědění o rostlinných reakcích zapojených ve fototropismu a stresu ze zasolení. Dále pak shrnuje informace o rostlinných hormonech auxinu, jakožto nejdůležitějším hormonu fototropismu, a o kyselině abscisové, rostlinném stresovém hormonu. V experimentální části pak byla testována odolnost mutantů fototropinů *phot1, phot2 a phot1/phot2* a kontrolního genotypu *gl-1* k zasolení v závislosti na světelných podmínkách – modré světlo a tma. Dále pak byl zkoumán vliv zasolení na fototropickou reakci rostlin *gl-1* vůči jednostrannému modrému světlu za přítomnosti či absence fluridonu, inhibitoru biosyntézy kyseliny abscisové. Experimenty byly prováděny ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů UP Olomouc a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

2 Teoretická část

2.1 Fototropismus

Stejně jako ostatní typy tropismů u vyšších rostlin je i fototropismus charakterizován orientovaným růstem rostlinného těla závislým na směru příchozího stimulu, kdy v případě fototropismu je tímto stimulem světlo (Obr. 1). Hlavním fototropickým stimulem je pak světlo modré (λ = 380-500 nm), z části také UV-B (λ = 290-380 nm) a modulujícím stimulem světlo červené (λ = 620-700 nm) (Fankhauser and Christie, 2015). Zatímco nadzemní část rostliny roste v naprosté většině případů směrem ke zdroji světla a mluvíme o tzv. pozitivním fototropismu, tak kořeny obvykle rostou proti směru a jedná se o tzv. negativní fototropismus neboli skototropismus (Liscum *et al*., 2014). Rostlina si tak touto změnou postavení svých orgánů zajišťuje optimální příjem světelné energie v prýtu a stejně tak i vody a živin v kořenech. Takto usměrněný růst je způsoben rozdílnou distribucí růstového hormonu auxinu v závislosti na směru ozáření. Tato distribuce je regulována receptory modrého světla a primárními signálními elementy fototropismu fototropiny.



Obr. 1. Fototropismus.

2.1.1 Historie zkoumání fototropismu

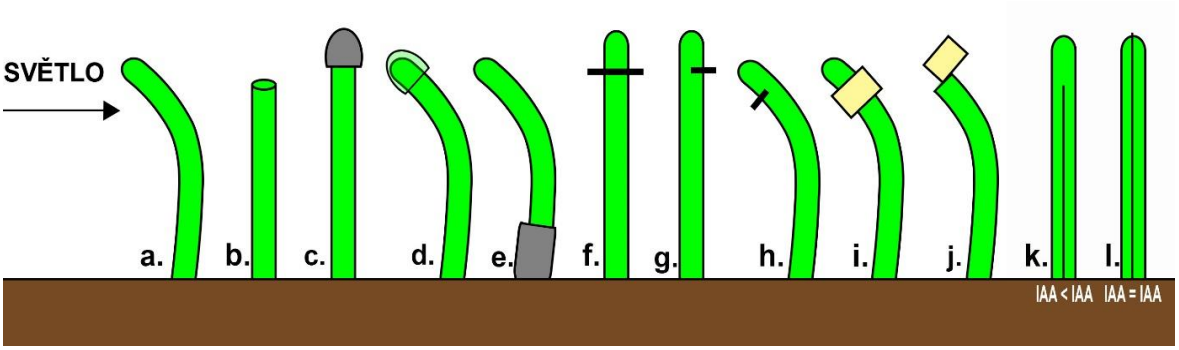
Schopnosti rostlin otáčet se za sluncem si lidé všímali již od starověku. Klasičtí řečtí filozofové jako Platon nebo Aristoteles na přelomu 5. a 4. století př. n. l. vnímali rostliny jako pasivní organismy bez schopnosti vnímat své okolí a v souladu s těmito názory vysvětloval „otec antické botaniky“ Theophrastus fototropické i heliotropické pohyby rostlin pouze jako mechanické přesouvání tekutiny v rostlinném těle směrem ke Slunci (Whippo and Hangarter, 2006).

Theophrastovo vysvětlení fototropických reakcí se udrželo až do 17. století, kdy byly prováděny první experimenty s fototropismem (Whippo and Hangarter, 2006). Thomas Browne v prvních pokusech, které prokazovaly schopnost rostlin měnit svůj růst směrem k oknu při pěstování v suterénu (1658), ještě vysvětloval tento růst jako rostlinnou potřebu „zdravého vzduchu“. Postupně se však během 18. a 19. století množily důkazy, že změna rostlinného růstu je stimulována slunečními paprsky, a to ne teplem jimi vytvářeným, ale samotným světlem. Na přelomu 19. a 20. století se začaly objevovat první teorie o tom, že

by fototropismus mohl mít induktivní charakter, což dokázal Julius von Wiesner v roce 1878, když zjistil, že rostliny diferenciovaně rostou ve směru zdroje světla i poté, kdy je již tento zdroj vypnutý.

Fototropismu se věnoval také Charles Darwin společně se svým synem Francisem. Ti ve své práci *The Power of Movement in Plants* (1880) popsali, že u jednoděložných je světelný signál fototropismu indukován na špičkách koleoptilí. Pokud byly špičky koleoptilí zakryty, tak rostlina nebyla fototropická, naopak pokud byla zakryta pouze spodní část koleoptilí, fototropismus se zachoval (Obr. 2) (Christe and Murphy, 2013). Na základě toho přišli autoři s tvrzením, že světelný signál je zachycen na špičce koleoptile a její střední část je místem, kde dochází k ohybu. Univerzalita tohoto tvrzení byla doložena ještě pokusy s dvouděložnými, kde je signál zachycen v dělohách. Na základě toho přišel Charles Darwin s myšlenkou neznámé substance, která světelný signál ze špiček koleoptilí/kotyledonů přenáší do místa ohybu.

Peter Boysen-Jensen pak v letech 1911 a 1913 při pokusech s vkládáním agarových a slídových bločků prokázal, že tento „Darwinův signál" prochází na neozářené straně koleoptile (Obr. 2) (Christie and Murphy, 2013). Na tento pokus navázal v letech 1926 a 1928 svými pokusy také Frits Went, který umisťoval agarové bločky s difundovanou signální molekulou nerovnoměrně na koleoptile s oddělenými špičkami, čímž u nich indukoval ohyb (Obr. 2). Na základě těchto pokusů s agarovými bločky pak mohl být v roce 1931 Fritzem Köglem a Arie Haagen-Smitem identifikován první rostlinný hormon auxin (z řeckého auxein – růst) (Whippo and Hangarter, 2006).



Obr. 2. Schéma základních historických experimentů na koleoptilích, které přispěly k objasnění fototropismu: experimenty Charlese a Francise Darwina (a-e), ve kterých prokázali, že signál fototropismu vzniká ve špičce koleoptilí, které po odstranění špičky nebo jejím zakrytí neprůsvitným materiálem nevykázaly fototropickou reakci, a naopak po jejím zakrytí průhledným materiálem stejně jako po zakrytí spodní části koleoptile neprůsvitným materiálem reakce proběhla; experimenty Petera Boysen-Jensena (f-i), ve kterých prokázal, že hledaná látka zodpovědná za fototropismus (auxin) je schopna procházet agarovým blokem na rozdíl od slídové destičky – částečným vkládáním slídové destičky pak prokázal, že daná látka prochází neozářenou stranou koleoptile; experiment Fritse Wenta (j), ve kterém prokázal, že agarový blok napuštěný auxinem posazený nerovnoměrně na místě odstraněné špičky koleoptile způsobuje ohyb; experiment Winslowa Briggse (k-l), ve kterém tenkým sklem rozděloval ozářenou a neozářenou stranu koleoptile a dokázal tak, že ozáření jednostranným světlem způsobuje laterální přesun auxinu na neozářenou stranu (nikoliv změny auxinové syntézy nebo degradace) – snižování bariéry v oblasti špičky koleoptile způsobovalo úměrné navýšení koncentrace auxinu na neozářené straně a snížení na straně ozářené (podle Christie and Murphy, 2013).

V době, kdy se Frits Went zabýval fototropickou reakcí, se nezávisle na něm Nikolai Cholodny (1928) zabýval gravitropismem. Went následně zahrnul výsledky Cholodnyho práce do své a vznikl tzv. Cholodny-Went model (Christie and Murphy, 2013). Ten říká, že asymetrické ozáření je přijímáno na špičce koleoptile/kotyledonu a způsobuje přesun auxinu do neozářené části, odkud se dále přesunuje do nižších částí koleoptile/hypokotylu, kde indukuje zvýšený růst na neozářené straně. Winslow Briggs *et al*. pak v roce 1957 prokázali, že vznik auxinového gradientu je dán jeho laterálním transportem, a ne zvýšenou biosyntézou/degradací (Obr. 2).

Hledání vlastních receptorů fototropismu započalo ještě před Darwinovými objevy, kdy již v roce 1864 Julius von Sachs určil, že pro fototropickou reakci je nejdůležitější světlo modré. Trvalo to ale dalších více než 130 let, než byly na přelomu milénia díky práci Winslowa Briggse, Johna Christieho a dalších identifikovány jako fototropiny (Christie and Murphy, 2013).

2.1.2 Fototropiny

Fototropiny jsou rostlinnými receptory modrého světla, které se přirozeně vyskytují na vnitřní straně plazmatické membrány (PM) a jsou primárně zodpovědné za fototropismus prýtu i kořene u všech vyšších rostlin (Christie, 2007). Kromě fototropismu jsou však zapojené i v mnoha dalších procesech regulujících fotosyntetickou kapacitu rostlin, jako je například otevírání průduchů, regulace rozšiřování, zplošťování a pozice listové čepele nebo přesuny chloroplastů v buňkách mezofylu (Liscum *et al.*, 2014). Fototropiny se taktéž zapojují do regulace cytosolických vápenatých iontů (Zhao *et al., 2013)* nebo do modulace kořenového systému v reakci na některé abiotické stresy (Galen *et al., 2007).*

Všechny vyšší rostliny obsahují dva druhy fototropinů: phot1 a phot2 (Fankhauser and Christie, 2015). V kořeni i hypokotylu je phot1 primárním fototropickým receptorem, avšak v hypokotylu pouze při nízkých intenzitách modrého světla (0,01 – 1 μmol m^{-2} s^{-1}). Při intenzitách vyšších (>1 μmol m^{-2} s^{-1}) se zde stává dokonce inhibitorem fototropismu a za fototropickou odpověď hypokotylu při vysokých intenzitách světla je pak zodpovědný pouze phot2 (Zhao *et al*., 2018).

Závislost ohýbání hypokotylu na intenzitě přijímaného světla má po začátku ozařování modrým světlem Gaussovské rozložení a této fázi se říká první pozitivní fototropismus (Haga *et al*., 2015). Snížení fototropického ohybu na konci této fáze je způsobeno nasycením fototropických transdukčních drah mezi ozářenou a neozářenou stranou rostliny (Christie and Murphy, 2013). Po asi 10 až 30 minutách ozařování dochází k adaptaci a rostliny obnovují fototropickou reakci, která se nazývá druhý pozitivní fototropismus. K těmto dějům dochází v rozmezí intenzit modrého světla do 1 μmol m^{-2} s^{-1}, při kterých

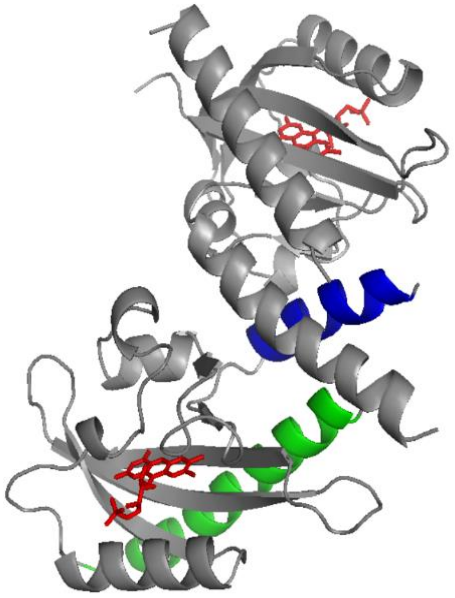
phot2 ještě nevytváří signál (Haga *et al*., 2015). Primární i sekundární pozitivní fototropismus je tak zprostředkován pouze pomocí phot1, který je ve tmě silně exprimován a zesiluje tak rostlinnou citlivost ke světlu. V případě náhlého silného ozáření je phot1 internalizován a degradován prostřednictvím CRL^{NPH3} ubiquitinačního komplexu (viz. níže). Po adaptaci je phot1 signalizace obnovena a při intenzitách světla vyšších než 1 μmol m^{-2} s^{-1} je již z velké části nahrazena phot2 signalizací (Haga *et al*., 2015).

2.1.2.1 Struktura fototropinů a percepce světla

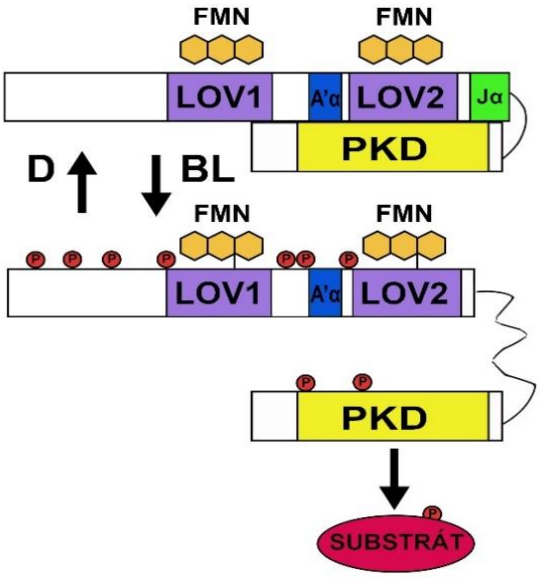
Oba fototropiny sdílejí podobnou primární sekvenci aminokyselin (AK) a doménovou organizaci (Liscum *et al*., 2014). Ačkoliv jejich krystalová struktura není zcela objasněna, je známo, že jsou složeny z přibližně 700 až 1000 AK a obsahují několik strukturních motivů. V C-terminální části se nachází proteinová Ser/Thr kinasa (PKD), která odesílá signál z fototropinu dále do buňky. Fotosensitivní region se nachází v N-terminální polovině a je složen ze dvou domén o přibližně 110 AK, které se nazývají LOV1 a LOV2 (Light, Oxygen, Voltage) (Obr. 3). Uvnitř LOV domén je pak navázán samotný chromofor – molekula flavin-mononukleotidu (FMN).

Ve tmě se FMN váže k LOV nekovalentně vodíkovým můstkem mezi glutaminem Gln575 na LOV a O4 kyslíkem na FMN a fototropin se tak nachází v tzv. D450 stavu s absorpčním maximem λ_{max} ~ 450 nm (Liscum *et al*., 2014) (Obr. 4). Absorpcí světelného kvanta pak vzniká kovalentní vazba mezi sírou na cysteinovém reziduu LOV a C4a uhlíkem na FMN. Fototropin tak přechází do S390 stavu s absorpčním maximem λ_{max} ~ 390 nm. Stav S390 se pak samovolně mění na D450 v řádu sekund až hodin v závislosti na podmínkách.

Zatímco LOV1 doména byla zatím prokázána pouze v procesech receptorové di/multimerizace (Nakasone *et al*., 2014) a pravděpodobně má jistý vliv také na fotoreaktivitu LOV2 (Okajima *et al*., 2014), tak je to právě LOV2 doména, která je zodpovědná za regulaci C-terminální PKD (Sullivan *et al.,* 2016). Při absenci modrého světla je PKD inhibována LOV2 a až při absorpci světelného kvanta a vzniku kovalentní vazby mezi LOV2 a FMN dochází ke strukturním změnám nutným pro vznik signálu (Liscum *et al*., 2014). Hlavní strukturní změny jsou rozvolnění C-terminální Jα helix struktury a N-terminální A'α helix struktury na LOV2, které změní konformaci celého fototropinu, čímž uvolní PKD a spustí řetězec autofosforylací serinu (Obr. 3 a Obr. 4). Tím vzniká aktivovaný fototropin, schopný dále fosforylovat další proteiny zapojené v signální dráze (Liscum *et al*., 2014).



Obr. 3. Krystalická struktura LOV1 a LOV2 domén phot1 s vyznačenými molekulami flavin-mononukleotidů (červeně), A'α helix (modře) a Jα helix (zeleně) (podle UniProtKB - O48963 (PHOT1_ARATH), 2002).



Obr. 4. Schématické znázornění fotoaktivace fototropinu modrým světlem (BL). Přijetím světleného kvanta vzniká vazba mezi molekulami flavin-mononukleotidu (FMN) a LOV doménami. To způsobí rozvolnění Aα a Jα helix struktury a změní konformaci celého fototropinu. Proteinová kinasa (PKD) se uvolňuje a fosforyluje samotný fototropin i okolní substrát, čímž vzniká signál fototropismu (podle Inoue *et al*., 2010).

2.1.2.2 Internalizace fototropinů

Část fototropinů se po ozáření uvolňuje z PM. Zatímco phot1 se uvolňují do cytosolu, tak phot2 se přesunují převážně do Golgiho aparátu. U phot1 byla prokázána schopnost vytvářet vazbu s těžkým řetězcem klathrinu, což značí, že je internalizace phot1 z PM závislá na klathrinu, potažmo na cytoskeletu (Sullivan *et al*., 2010). K internalizaci phot1 pak nedochází bez jeho autofosforylace (Liscum *et al*., 2014). Přesný význam těchto translokací však není stále zcela objasněn, i když u phot1 byla prokázána jistá spojitost s modulací fototropické reakce. Úplná inhibice phot1 internalizace však vznik fototropického signálu neovlivnila, a ten tedy pravděpodobně vzniká ještě na PM (Christie *et al*., 2015).

2.1.2.3 Fosforylační aktivita fototropinů

U *Arabidopsis* již bylo na phot1 identifikováno celkem 21 fosforylačních míst a na phot2 29 (Christie *et al.*, 2015). Pro vznik fototropického signálu se u *Arabidopsis* jeví jako nezbytná fosforylační místa na Ser849 a Ser851 na phot1 a Ser761 a Ser763 na phot2, která se nacházejí v aktivační smyčce PKD (T-smyčka). Ostatní fosforylační místa na obou fototropinech zatím nebyla dobře prostudována nebo se účastní jiných rostlinných pochodů než fototropismu.

2.1.3 Proteiny interagující s fototropiny

Ještě na PM interaguje phot1 s ranými signálními proteiny, které patří do dvou proteinových rodin. První skupinou jsou proteiny nazývané Non-Phototropic Hypocotyl3/Root Phototropism2-like (NRL) a druhou skupinou jsou proteiny zvané Phytochrome Kinase Substrate (PKS1, 2 a 4).

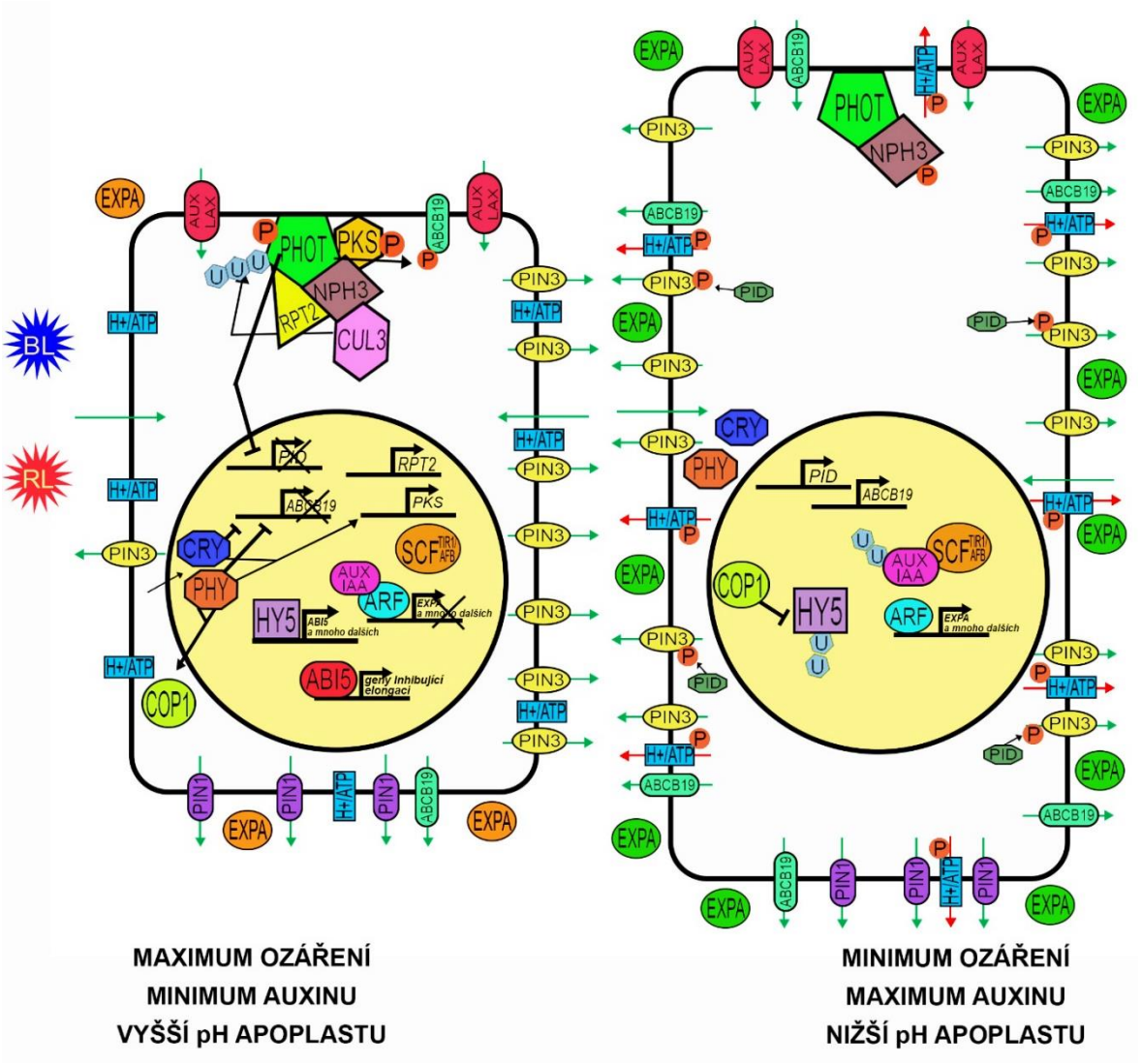
2.1.3.1 NRL

U *Arabidopsis* proteinová rodina NPH3/RPT2-like (NRL) zahrnuje minimálně 33 členů a všechny mají společnou prostřední, tzv. NPH3 doménu (Christie *et al*., 2018). Tyto proteiny fungují jako AGC kinasové moduly a regulují mnoho aspektů auxinového transportu a signalizace, a jako takové jsou tudíž velmi důležité pro správný průběh fototropických reakcí i dalších reakcí závislých na fototropinech (Christie *et al*., 2018). Několik NRL je pak navíc zapojeno do auxinem ovlivněné organogeneze a kořenového gravitropismu pomocí změn lokalizace auxinových exportérů PIN1 a PIN2, o kterých bude řeč níže (Liscum *et al*., 2014). Důležité pro fototropické reakce jsou pak konkrétně samotné proteiny NPH3 a RPT2.

2.1.3.1.1 NPH3

Protein NPH3 se pojí k PM skrze svou C-terminální doménu, a to nezávisle na ozáření (Obr. 5) (Liscum *et al*., 2014). Na jeho funkčnosti je závislá fototropická reakce na modré světlo o nízkých i vysokých intenzitách. Bylo popsáno, že k interakci s phot1 dochází mezi C-terminální coiled-coil doménou NPH3 a N-terminální částí phot1. Zatímco ve tmě se NPH3 vyskytuje na PM ve fosforylované formě ($NPH3^{DS}$), tak po ozáření modrým světlem je defosforylován na úkor phot1 a zaniká tím i phot1-NPH3 interakce (Liscum *et al*., 2014). V řádu minut po excitaci phot1 modrým světlem pak dochází k přesunu defosforylovaného NPH3 ($NPH3^{LS}$) do mikrodoménových agregátů, které se akumulují v cytosolu a jejichž funkce stále čeká na objasnění (Haga *et al*., 2015) Pro udržení phot1 signalizace, obzvlášť pod kontinuálním ozářením, je ovšem nutné $NPH3^{LS}$ převádět zpátky na $NPH3^{DS}$ a znovu vytvářet phot1-NPH3 interakci (Liscum *et al*., 2014).

Kromě výše zmíněného interaguje NPH3 také s Cullin3a (CUL3), který je součástí CUL3 Ring R3 Ubiquitin Ligase3 ubiquitinačního komplexu (CRL3) (Christie *et al*., 2018). Konkrétně CRL^{NPH3} váže ubiquitin na phot1 poté, co je excitován modrým světlem (Obr. 5). Zatímco při nízkých intenzitách modrého světla dochází pouze k monoubiquitinaci phot1, což se jeví jako proces nutný pro vznik fototropické reakce a stejně tak pro internalizaci phot1 z PM, tak při vysokých intenzitách modrého světla již dochází k polyubiquitinaci a phot1 je následně degradován ve 26S proteazomu.



Obr. 5. Schéma buněčných signalizací a pochodů, které vedou ke vzniku fototropického ohybu po absorpci usměrněného modrého (BL) a částečně i červeného (RL) světla a přidružené reakce. Vpravo je schéma neozářené buňky. Fototropin (PHOT) se nachází defosforylovaný a deaktivovaný v blízkosti plazmatické membrány a na něj je navázán fosforylovaný NPH3 protein. Kryptochromy (CRY) a fytochromy (PHY) se nacházejí v cytosolu v neaktivní formě. E3 ubiquitin ligasa COP1 se nachází v jádře, kde ubiquitinací (U) inhibuje transkripční faktor HY5. V jádře probíhá exprese genů pro ABCB19 auxinové transportéry a PID proteinové kinasy, které fosforylují a tím regulují PIN3 auxinové transportéry. Vysoké koncentrace auxinu (zelené šipky) aktivují $SCF^{TIR1/AFB}$ E3 ubiquitin ligasu, která ubiquitinací inhibuje AUX/IAA represory auxinem regulované exprese. Ta je spouštěna transkripčními regulátory ARF a jejími produkty jsou mimo jiné expansiny (EXPA), které se následně dostávají do apoplastu. Na plazmatické membráně se nacházejí volně rozprostřené aktivní H^+/ATPasy, které okyselují apoplast, což aktivuje enzymatickou aktivitu expansinů a způsobuje rozvolňování buněčné stěny. Tok protonů je vyznačen červenými šipkami. Na plazmatické membráně se pak nacházejí taktéž rovnoměrně rozmístěné auxinové transportéry ABCB19, na obou stranách pak aktivní transportéry PIN3, na horní straně přítokové kanály AUX/LAX a na spodní straně odtokové kanály PIN1. Auxin se pak do buňky dostává i difúzně. Vlevo se pak nachází schéma ozářené buňky. Fototropin (PHOT) je fotoaktivován a autofosforylován na úkor NPH3. Dále se ke komplexu váží ještě proteiny RPT2 a PKS. Protein NPH3 interaguje s CUL3 E3 ubiquitin ligasou a vzniklý komplex ubiquitinuje fototropin. Aktivovaný fototropin fosforyluje PKS, fosforylací inhibuje ABCB19 a zastavuje expresi genů *PID* a *ABCB19*. Neznámým mechanismem fototropin taktéž způsobuje přeskupení PIN3 transportérů na neozářenou stranu. Kryptochromy a fytochromy se po ozáření dostávají do jádra, kde inhibují funkci COP1, čímž uvolňují transkripci regulovanou HY5 faktorem, včetně transkripčních faktorů (ABI5) a genů pro zastavení buněčné elongace. Kryptochromy a fytochromy zároveň indukují expresi *PKS* a *RPT2*. Funkce plazmamembránových H^+/ATPas je inhibována a apoplast se tak stává zásaditějším. Snížení auxinové signalizace způsobuje AUX/IAA regulovanou inhibici ARF a zastavení auxinem regulované exprese. Snižuje se množství expansinů a jejich enzymatická aktivita je snížena vyšším pH v apoplastu a buněčná elongace se zpomaluje (podle Sakai and Haga, 2012).

2.1.3.1.2 RPT2

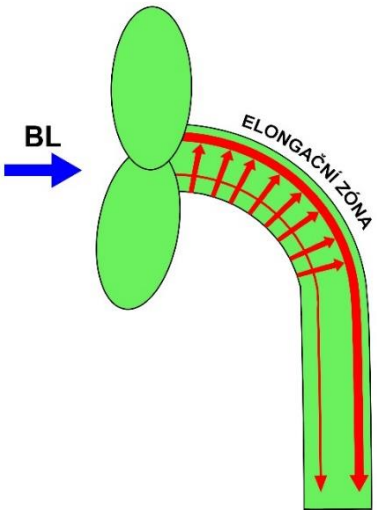
Protein RPT2 byl původně identifikován v mutantech *Arabidopsis* s nefunkčním fototropismem kořene, ale později byl prokázán také v interakcích s NPH3 (Liscum *et al.*, 2014). Bylo popsáno že *rpt2* mutant, který funkční RPT2 postrádá, vykazuje poškozený fototropismus hypokotylu při vyšších intenzitách světla a nedochází u něj ke zpětné lokalizaci NPH3 na PM (Haga *et al*., 2015). Tyto změny se týkají pouze tzv. primárního a sekundárního pozitivního fototropismu zprostředkovaného phot1, kdežto na fototropismus zprostředkovaný phot2 nemá pravděpodobně RPT2 zásadní vliv (Christie *et al*., 2018). Protein RPT2 tak zřejmě hraje roli v opětovném vytváření fotosenzitivního komplexu phot1-NPH3 a zároveň částečně brání zařazování NPH3 do cytosolických agregátů (Obr. 5) (Haga *et al*., 2015). Stejně jako u fototropinů nebo NPH3 se jedná o protein asociovaný s PM a u kvasinkových hybridů bylo prokázáno, že RPT2 interaguje s phot1 a je schopný vytvářet heterodimery s NPH3 (Liscum *et al*., 2014).

2.1.3.2 PKS

Dalšími proteiny interagujícími s fototropiny jsou PKS. Ačkoliv první z nich PKS1 byl původně objeven jako substrát kinasové aktivity fytochromu A, později se prokázala jejich úloha i ve fototropismu a dalších rostlinných reakcích závislých na fototropinech (Liscum *et al*., 2014). Tyto proteiny jsou taktéž lokalizovány na PM, kde interagují s phot1, phot2 i NPH3 (Obr. 5) (Fankhauser and Christie, 2015). Konkrétně pak PKS4 byl prokázán jako přímý fosforylační substrát phot1, a ačkoliv se pravděpodobně nejedná o protein nezbytný pro fototropickou reakci, může fungovat jako negativní regulátor fototropismu skrze působení phot1 při vysokých dávkách ozáření. Zároveň má pravděpodobně vliv také na změny auxinového transportu (Liscum *et al*., 2014).

2.1.4 Fototropický ohyb

Samotné ohnutí rostliny v reakci na fototropický stimul je, jak již bylo zmíněno, způsobeno rozdílnou elongací buněk na ozářené a neozářené straně rostliny (Obr. 6). To je nejlépe pozorovatelné na rostlinném hypokotylu. Ačkoliv se fototropiny nacházejí po celé délce rostliny, tak nejdůležitější pro vznik ohybu jsou ty v horní třetině hypokotylu (Sullivan *et al*., 2016). Samotná změna růstu je tedy způsobena rozdílnými koncentracemi růstového hormonu auxinu v buňkách (Obr. 5 a Obr. 6). Auxin



Obr. 6. Schéma fototropického ohybu hypokotylu. Modré světlo (BL) vlivem fototropinů způsobuje změny v proudění růstového hormonu auxinu (červené šipky), ten následně způsobuje zvýšenou elongaci buněk na neozářené straně (podle Liscum *et al*., 2014).

indukuje prodlužování rostlinné buňky tzv. kyselým růstem (Rayle and Cleland, 1977). Jedná se o acidifikaci buněčné stěny pomocí aktivace H^+/ATPas na plazmatické membráně, které přivádějí protony do apoplastu (Obr. 5). Okyselení apoplastu spouští sérii procesů, které vedou k procesu tzv. rozvolňování buněčné stěny. To je doprovázeno zvýšeným turgorem buňky, který roztahuje rozvolněnou buněčnou stěnu, a tak dochází k prodlužování buňky (Emenecker and Strader, 2020). Při fototropismu pak buňky na neozářené straně rostou rychleji a vzniká ohyb.

2.2 Auxin

Auxin neboli kyselina indol-3-octová (IAA; $C_{10}H_9NO_2$) je nízkomolekulární, od tryptofanu odvozený fytohormon ze skupiny auxinů, zapojený do téměř všech aspektů rostlinného života. Auxin je zodpovědný za rostlinný vývoj i schopnost reagovat na okolní prostředí a je tedy určujícím faktorem při získání konečného vzhledu rostliny (Armengot *et al*., 2016). Auxin je mimo jiné aktivně transportován přes buňky a tkáně pomocí specializovaných přenašečů, které svou aktivitou vytváří auxinový gradient s auxinovými minimy a maximy, které jsou zásadní pro zakládání orgánů a diferenciovaný růst během tropických reakcí včetně fototropismu.

2.2.1 Syntéza a transport

Auxinový transport v rostlinách je přirozeně polární. Syntéza auxinu probíhá v listových primordiích a vzrostných vrcholech nadzemní části a následně se auxin dostává do nižších částí rostliny, což se děje buďto společně s asimilačním tokem polárním auxinovým transportním tokek skrze buňky (Swarup and Bhosale, 2019). Buněčnou PM prochází v závislosti na pH. Apoplast má kyselé pH a část auxinů se tak dostává do buňky v protonované formě IAAH, která může volně difundovat přes PM, další část se pak do buňky dostává skrze přenašeče. V prostředí cytosolu je pH neutrální a auxin zde rychle disociuje do formy aniontu IAA^-, která prochází PM pouze pomocí přenašečů (Emenecker and Strader, 2020). Při fototropických stimulech dochází ke změnám lokalizací a funkcí těchto přenašečů, což ústí v tzv. laterální auxinový transport. Vzniklý auxinový gradient pak způsobuje výše popsaný asymetrický růst rostliny ve směru nebo proti směru působícího stimulu (Liscum *et al*., 2014).

Doposud byly objeveny tři rodiny auxinových transmembránových přenašečů (Fankhauser and Christie, 2015). První skupinou jsou PIN-FORMED (PIN) proteiny, které jsou auxinovými exportéry, další skupinou exportních proteinů jsou ATP-Binding Cassette subfamily B (ABCB) a poslední jsou AUX1/Like AUX1 (AUX1/LAX). Všechny tyto proteiny

většinou fungují nezávisle na sobě a rozdílnými mechanismy, ale v některých případech mohou interagovat a vytvářet komplexy.

2.2.1.1 Proteiny PIN

Auxinové exportéry PIN jsou rozděleny do skupin podle velikosti své intracelulární smyčky. Zatímco PIN5, 6 a 8 jí mají krátkou a vyskytují se hlavně na endoplazmatickém retikulu (ER), tak PIN1-4 a 7 mají intracelulární smyčku dlouhou a jsou lokalizovány na PM, kde se podílí také na fototropismu (Liscum *et al*., 2014). U plazmamembránových PIN byla objevena silně polární lokalizace v rámci buňky, a zatímco PIN1 a PIN2 jsou jakožto hlavní auxinové přenašeče exprimovány stabilně, tak PIN3,4 a 7 jsou exprimovány v závislosti na podmínkách (Obr. 5) (Christie and Murphy, 2013). V souvislosti s fototropickou reakcí hypokotylu pak bylo např. objeveno, že PIN3 je v endodermu silně exprimován ve tmě, ale po ozáření se jeho množství na ozářené straně rapidně snižuje a dochází k jeho translokaci (Ding *et al*., 2011). Mutantní rostliny *pin3* zároveň vykazují redukovaný fototropismus a analýza vícečetných mutantů plazmamembránových PIN prokázala u všech jistou spojitost s fototropismem (Liscum *et al*., 2014).

Přesný způsob, jakým jsou PIN ovlivňovány fototropickými stimuly, však stále není objasněn. Bylo již ovšem vyvráceno, že by PIN byly fosforylačními substráty fototropinů (Liscum *et al*., 2014). Na druhou stranu jsou PIN určitě regulovány fosforylací pomocí některých kinas. Fosforylace proteinem D6-Protein Kinase (D6PK) ze skupiny proteinů AGC1 se jeví jako nezávislá na fototropinové signalizaci, je ovšem nezbytná pro polární auxinový transport, který mají *d6pk* mutanti poškozený, stejně jako fototropismus. Kinasy PINOID (PID), WAG1 a WAG2 ze skupiny AGC3, do které patří i fototropiny, pak nefosforylují PIN přímo, ale kooperují při tom společně ARF-GEF a jejich mutanti mají taktéž poruchy v relokalizaci PIN3 a ve fototropismu.

2.2.1.2 Transportéry ABCB

Dalšími exportními transportéry auxinu jsou proteiny ABCB. U *Arabidopsis* byla popsána celá řada ABC transportérů, ale úloha v auxinovém transportu je však přisuzována pouze ABCB1, 4, 14, 15 a 19, kdy právě ABCB1 a 19 mohou být pro polární auxinový transport zásadní (Hellsberg *et al*., 2015). Tyto dva jmenované transportéry jsou totiž polárně exprimovány společně s PIN1 a 2 a synergicky se tak podílí na odtoku auxinu z buňky. Některé ABCB jsou také nepolárně exprimovány v místech, kde dochází k velké difúzi protonovaného auxinu a nezávisle na PIN se zde podílejí na udržování polárního transportu.

Christie *et al*. (2011) také prokázali spojitost transportéru ACB19 s fototropismem. Ten totiž může být na svém C-terminálním regionu fosforylován phot1, což způsobuje snížení polárního auxinového exportu. Následná kumulace auxinu v buňce může vyústit jeho laterální přesun směrem do neozářené strany rostliny, kde způsobí prodlužování buněk (Obr. 5).

2.2.1.3 AUX1/LAX

Hlavní roli v importu auxinu do buňky pak hrají proteiny z genové rodiny AUX1/LAX. V genomu *Arabidospis* byly identifikovány čtyři geny této skupiny genů (*AUX1, LAX1, LAX2, LAX3*), jejíchž expresí vznikají transmembránové permeasy podobné přenašečům aminokyselin, které spolu sdílejí 76 až 82% podobnost a jejich struktura je tak velmi podobná (Swarup and Bhosale, 2019). Nejvíce prozkoumaným je protein AUX1, který se na PM vyskytuje převážně na opačné straně buňky než PIN a ABCB proteiny (Obr. 5). Studie potvrdily, že také AUX1 skrze neznámý mechanismus funguje minimálně jako modulátor fototropismu (Stone *et al*., 2008).

2.2.2 Auxinové signální dráhy

V rostlinách byly doposud objeveny tři typy auxinových receptorů. Prvním z nich je Auxin Binding Protein1 (ABP1), který se nachází na ER a vnější straně PM. Dále pak jaderné S-Phase Kinase Associated Protein2A (SKP2A) a Transport Inhibitor Resistant1/Auxin binding F-Box (TIR1/AFB) (Zhu and Geisler, 2015). Jako další faktory reagující na auxin pak byly ještě popsány Small Auxin Up RNA (SAUR) a Indole-3-Butyric Acid Response5 (IBR5). Proteiny SKP2A se podílejí na auxinem regulovaném buněčném cyklu u rostlin a jejich role v buněčné elongaci či fototropismu nebyla doposud popsána (Strader and Zhao, 2016), a proto se jim nebudeme dále věnovat.

2.2.2.1 TIR1/AFB

Jako hlavní komponenty auxinem regulované genomické odpovědi byly popsány TIR1/AFB (Strader and Zhao, 2016). Objev těchto jaderných auxinových receptorů byl publikován současně nezávisle na sobě dvěma vědeckými týmy v roce 2005 (Kepinski and Layser, 2005, Dharmasiri *et al*., 2005). Receptory TIR1/AFB se podílí na vzniku komplexních Skp1-Cullin-F-box ($SCF^{TIR1/AFB}$) E3 ubiquitin ligas, které jsou nezbytné pro odblokování auxinem regulované transkripce (Obr. 5) (Powers and Strader, 2016). Ta se skládá ze šesti hlavních komponent, kterými jsou: cílová sekvence DNA neboli Auxin-Response Elements (AuxRE), DNA-vazebné transkripční regulátory Auxin-Response Factors (ARF), ARF-vazebné represory Auxin/Indole-3-Acetic Acid Inducible (AUX/IAA),

ko-receptory $SCF^{TIR1/AFB}$ a samotný auxin (Strader and Zhao, 2016). Při nízkých koncentracích auxinu jsou ARF navázány svou N-terminální částí na AuxRE a svou C-terminální částí vytváří heterodimery s AUX/IAA, ke kterým se mohou vázat ještě korepresory. Takto vzniká tzv. low-auxin komplex, který není transkripčně aktivní (Strader and Zhao, 2016). Zvýšení koncentrace auxinu je v jádře zachyceno TIR1/AFB receptory, v reakci na to se zvyšuje afinita SCF E3 ubiquitin ligasy k AUX/IAA, které jsou po jejich navázání ubiquitinovány a degradovány v 26S proteazomu (Powers and Strader, 2016). Následně uvolněné ARF konvertují do transkripčně aktivní formy (Obr. 5) (Zhu and Geisler, 2015).

Esmon *et al*. (2006) zjistili, že některé Tropic Stimulus-Induced (TSI) geny mohou patřit mezi geny pozitivně regulované auxinem. Tyto geny kódují například expansiny, konkrétně EXPA1 a EXPA8, které se podílejí na rozvolňování buněčné stěny při sníženém pH (kyselý růst) a transkripty těchto expansinů se v neozářených částech hypokotylu kumulují ještě před viditelným ohybem (Obr. 5) (Liscum *et al*., 2014).

2.2.2.2 SAUR proteiny

Auxinová regulace genové exprese skrze TIR1/AFB zahrnuje taktéž indukci raných genů odpovědi *SAUR*. Transkripty *SAUR* byly původně objeveny v elongační zóně hypokotylů sóji a následně byla prokázána spojitost SAUR proteinů s mnoha auxinem regulovanými aspekty rostlinného vývoje jako např. růst buněk a tropické reakce (Powers and Strader, 2016). Některé SAUR proteiny se například podílí na signalizaci vápenatými ionty v rostlinách, protože byla prokázána jejich schopnost vázat se na kalmodulin (CaM) (Powers and Strader, 2016). Jiné zase podporují fosforylaci plazmamembránových H^+/ATPas, čímž je aktivují a snižují pH apoplastu a podporují buněčnou elongaci (Emenecker and Strader, 2020).

2.2.2.3 IBR5

Mutantní rostliny *ibr5* byly původně izolovány pro svou rezistenci vůči auxinovému prekurzoru kyselině indol-3-máselné, následně však byla prokázána rezistence těchto mutantů vůči všem typům auxinů a inhibitorům auxinového transportu (Strader and Zhao, 2016). Gen *IBR5* kóduje proteinové fosfatasy s duální specificitou, které regulují rostlinné odpovědi k auxinu, jako je růst primárního kořene, vývoj vaskulárního systému nebo buněčná elongace (Jayaweera *et al*., 2014). Tyto fosfatasy zpomalují degradaci proteinů Aux/IAA a jedná se tak o negativní regulátory $SCF^{TIR1/AFB}$ transkripční dráhy (Strader and Zhao, 2016).

2.2.2.4 ABP1

Protein ABP1 byl dlouho považován za klíčový receptor auxinu se zásadním významem pro rostlinný růst a vývoj. Až nedávné práce s novým typem *abp1-5* null mutantů *Arabidopsis* ukázaly, že tyto rostliny nevykazují žádné defekty ve vývoji a růstu, a že problémy *abp1-1* mutantů, kteří byli od objevu ABP1 studováni, souvisí s postižením sousedního genu. Role ABP1, který je všudypřítomný a konzervovaný napříč rostlinným světem, se tak bude muset teprve objasnit (Strader and Zhao, 2016).

2.3 Kyselina abscisová

Dalším z rostlinných, nízkomolekulárních hormonů, o kterých bude v této práci řeč je kyselina abscisová (ABA). Jedná se o seskviterpenoid ($C_{15}H_{20}O_4$) odvozený od karotenoidů (Emenecker and Strader, 2020). ABA je všeobecně známá jako hormon stresu a jako taková hraje významnou roli v jeho rozpoznávání a obranných reakcích vůči němu. Společně s vývojovou fází rostliny a hladinami ostatních hormonů reguluje odpovědi vůči abiotickým i biotickým stresům, hlavně pak při ztrátách vody a osmotickém stresu (Park *et al*., 2016). Zároveň má však ABA také roli v rostlinném vývoji, kde se účastní embryonálního vývoje, klíčení, buněčného dělení a elongace nebo indukce kvetení (Finkelstein, 2013).

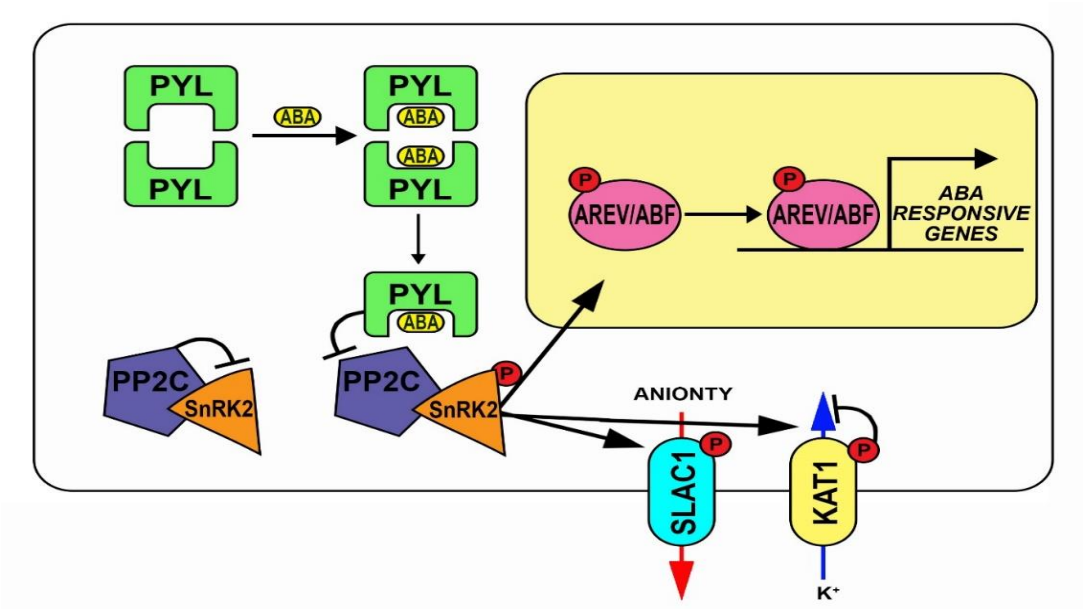
2.3.1 Syntéza a transport

Primárně je ABA syntetizována v buňkách vaskulárního systému a svěracích buňkách průduchů. Její zvýšená syntéza bývá indukována abiotickým stresem, hlavně pak suchem a zasolením, ale také výkyvy teplot (Emenecker and Strader, 2020). Za normálních okolností je však její koncentrace udržována na bazální úrovni (Chen *et al*., 2020). Z místa syntézy je ABA transportována do míst působení xylémem i floémem obousměrně ke kořeni i prýtu (Chérel and Gaillard, 2019). Jakožto slabá kyselina se ABA podobně jako auxin nachází v apoplastu z části v protonované formě ABAH, která může volně procházet přes PM, v cytoplasmě se však disociuje na ABA^-, a dále může být distribuována pouze skrze transportéry (Finkelstein, 2013). V *Arabidopsis* byly zatím objeveny tři ABA exportéry: *Arabidopsis* ATP-Binding Cassette subfamily G25 (AtABCG25), AtABCG31 a Detoxification Efflux Carrier50 (AtDTX50) a tři ABA importéry: AtABCG30, AtABCG40 a Nitrate Transporter (AtNRT) (Emenecker and Strader, 2020). Úloha ABA transportérů byla zatím prokázána v reakcích na stres u transpirace, kořenové morfologie nebo klíčení semen (Chen *et al*., 2020).

2.3.2 Signální dráhy ABA

2.3.2.1 Základní signalizace ABA

Základní signalizace ABA se skládá z pěti komponent: receptorů, negativních regulátorů, pozitivních regulátorů, transkripčních faktorů závislých na ABA a konkrétních na ABA závislých genů (Yang *et al*., 2017). Intracelulární percepce ABA je zprostředkována receptory z proteinové rodiny Pyrabactin Resistance/Pyrabactin1-Like/Regulatory Components of ABA Receptor (PYR/PYL/RCAR, dále PYL) (Emenecker and Strader, 2020). Objev těchto receptorů byl publikován současně dvěma na sobě nezávislými vědeckými týmy v roce 2009 (Ma *et al*., 2009; Park *et al.,* 2009). U *Arabidopsis* bylo zatím popsáno čtrnáct těchto receptorů, které jsou lokalizovány jak na PM, tak v cytoplazmě nebo v jádře. Vazba ABA k těmto receptorům způsobuje inhibici Protein Phosphatase2C (PP2C), negativních regulátorů ABA signalizace (Obr. 7). V nepřítomnosti ABA se totiž PP2C asociují k Sucrose Nonfermenting1-Related Protein Kinase2 (SnRK2) a defosforylují je, čímž je inhibují. Po navázání ABA k PYL dochází k interakci s PP2C a potlačení jejich fosforylační aktivity. Uvolněné SnRK2 jsou naopak znovu fosforylovány jinými kinasami nebo autofosforylovány do aktivní formy (Yang *et al*., 2017). Aktivované SnRK2 pak fosforylují a regulují mnoho dalších transkripčních faktorů nebo signalizačních proteinů a iontových kanálů (Emenecker and Strader, 2020). Mezi SnRK2 regulované komponenty ABA signalizace patří např. Basic Leucine Zipper (bZIP) transkripční faktory ABA-Responsive Element Binding Factor (AREV/ABF), K^+ kanál1 KAT1 nebo S-type Anion Channel1 (SLAC1) (Chen *et al*., 2020) (Obr. 7).



Obr. 7. Základní signalizace kyseliny abscisové (ABA). ABA je zachycena PYL receptory, které v reakci na to inhibují PP2C negativní regulátory a uvolňují signalizaci SnRK2 proteinové kinasy. Ty jsou (auto)fosforylovány a následně fosforylací regulují v jádře AREV/ABF transkripční faktory a ABA regulovanou expresi nebo např. regulují membránové kanály aniontů nebo draselného kationtu (K^+) (podle Hubbard *et al*., 2010).

2.3.2.2 Interakce ABA a světelné signalizace

Mezi nejzajímavější AREV/ABF patří transkripční faktor ABA-Insensitive5 (ABI5), který se podílí na ABA indukované inhibici rostlinného růstu (Xu *et al*., 2014). Jeho exprese je totiž zesilována dalším bZIP transkripčním faktorem Elongated Hypocotyl5 (HY5), který je zároveň jedním ze základních regulátorů ve světelné signalizaci především modrého světla (Yang *et al*., 2018). To dává smysl i v kontextu zjištění Fellner a Shawney (2001,2002), že osmotický stres inhibuje růst hypokotylu kombinací vlivů modrého světla a ABA. Kromě fotomorfogeneze řízené fytochromy, kryptochromy a UV-B fotoreceptory se tak HY5 podílí také na rostlinných reakcích k ABA a stresu ze zasolení během klíčení a rostlinného vývoje (Yang *et al*., 2018). K tomu přispívá taktéž stresem indukovaná translokace Constitutive Photomorphogenic1 (COP1) E3 ubiquitin ligasy z jádra do cytosolu, která v jádře za normálních podmínek podporuje degradaci HY5 (Kim *et al*., 2016). Whippo a Hangarter (2005), pak také prokázali úlohu HY5 při stabilizaci fototropické reakce při nízkých intenzitách modrého světla (0,05 μmol m^{-2} s^{-1}).

Zajímavým pojítkem mezi ABA a fototropismem je také výzkum Eckstein *et al*. (2016), ve kterém byla prokázána negativní regulace množství fototropinů v buňkách mesofylu exogenním podáním ABA. Zatímco exprese mRNA *PHOT1* ani *PHOT2* nebyla po aplikaci ABA zásadně ovlivněna, tak koncentrace proteinů PHOT1 a PHOT2 se po jejím podání výrazně snížila, zejména pak u PHOT1. Exprese fototropinů je tedy pravděpodobně posttranskripčně regulována ABA.

Dalším způsobem, jak se ABA může nepřímo podílet na fototropických reakcích je ABA-auxin interakce mezi ABA a auxinem v procesu prodlužování hypokotylu (Emenecker and Strader, 2020). Jak již bylo popsáno výše, auxin indukuje prodlužování buněk mimo jiné rozvolněním buněčné stěny pomocí jejího okyselení. K tomuto okyselení dochází díky aktivitě H^+/ATPas na PM, které jsou regulovány jak auxinem, tak ABA. Tyto H^+/ATPasy jsou inhibovány defosforylací fosfatasami ze skupiny PP2C.D. Funkce PP2C.D je inhibována SAUR proteiny, které jsou součástí auxinové signalizace. Oproti tomu ABA zatím neznámým mechanismem inhibuje fosforylaci plazmamembránových H^+/ATPas, čímž inhibuje i jejich funkci.

2.4 Stres ze zasolení

Změny klimatu společně s intenzifikací a chemizací zemědělství způsobily, že je v dnešní době přibližně 6 % zemského povrchu pokryto půdami s vysokými obsahy rozpuštěných solí, což se významně projevuje jak ve ztrátách zdejší zemědělské produkce, tak v místních ekosystémech či na kvalitě podzemních vod (Yang and Guo, 2017). Nejčastější ionty rozpuštěné v půdě jsou pak sodný kationt a chloridový aniont.

Odolnost rostlin k zasolení je napříč všemi druhy velmi rozdílná. Zatímco některé druhy rostlin jsou k růstu při vysokých koncentracích rozpuštěných solí přizpůsobené (halofyty), tak pro ostatní představuje zasolení problém. Takzvané glykofyty, mezi které patří většina rostlin včetně všech světově důležitých plodin, potřebují ke svému optimálnímu růstu sladkou vodu, bez vysokých obsahů rozpuštěných solí a jejich růst se zastavuje již při milimolárních koncentracích chloridu sodného (Yang and Guo, 2017). Při koncentraci této soli 100 mmol l^{-1}, již většina hospodářských plodin vykazuje inhibici růstu, přestává plodit či dokonce umírá (Park *et al*., 2016).

Stres ze zasolení postihuje téměř všechny fáze rostlinného vývoje a má tři roviny působení (Yang and Guo, 2017). První z nich je stres osmotický, kdy zvýšená koncentrace rozpuštěných solí v půdě snižuje schopnost kořene přijímat vodu z okolního prostředí, protože cytosol kořenových buněk se vůči okolí stává hypotonickým. Druhá rovina stresu ze zasolení je přímá toxicita rozpuštěných iontů. Ty se společně s vodou dostávají přes kořeny do rostliny a transpiračním proudem prochází do všech jejich částí, kde se mohou akumulovat. Vysoké koncentrace sodných iontů v cytosolu pak poškozují příjem jiných, metabolicky důležitých iontů. Společné působení těchto stresů pak způsobuje sekundární stresy z hromadění toxických metabolitů, oxidativní stres a mnoho dalších (Liang *et al*., 2018).

2.4.1 Reakce rostlin na stres ze zasolení

Osmotický stres v souvislosti se zasolením dopadá na rostlinu jako první. V reakci na něj a jím způsobeným vodním deficitem a snížením buněčného turgoru dochází prakticky okamžitě ke změnám ve složení PM tak, aby byla zachována její integrita (Park *et al*., 2016). Rychle se také zvyšuje cytosolická koncentrace vápenatých iontů a inositol-1,4,5-trisfosfátu (IP3), což jsou tzv. druzí poslové, kteří spouštějí řadu MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinase) kaskádových reakcí na konci kterých dochází ke specifické genové expresi. Zároveň vápenaté ionty slouží jako signál, spouštějící systém pro odstraňování sodných iontů z buňky.

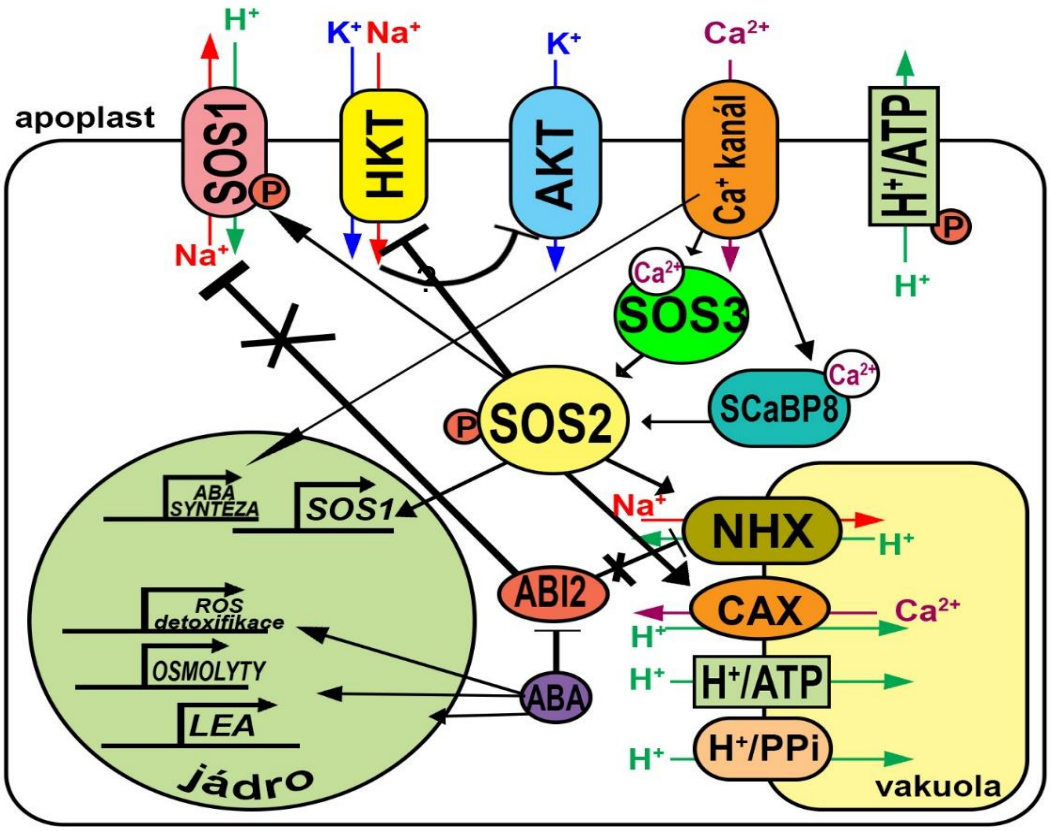
Dalším krokem rostlinné reakce na osmotický stres je zvýšená syntéza a zároveň snížená asimilace kompatibilních osmolytů (Liang *et al.,* 2017). Jedná se o nízkomolekulární látky, které udržují osmotický potenciál buněk a zabraňují tak ztrátám vody a turgoru. Zároveň mohou fungovat jako protekce proteinů, membrán a makromolekulárních agregátů před osmotickým stresem, také jako antioxidanty nebo signální molekuly (Park *et al*., 2016). Mezi nejdůležitější patří prolin, betainy, cukerné alkoholy, některé rozpustné sacharidy nebo ionty (hlavně draselný).

V reakci na nedostatek vody dochází v rostlinách také k uzavírání průduchů. To sebou ovšem přináší i mnohé komplikace: teplota stoupá, vlivem deficitu oxidu uhličitého se zastavuje fotosyntéza a zvyšuje se produkce cytotoxických reaktivních forem kyslíku (ROS) (Park *et al*., 2016). Aby nedošlo k fatálnímu poškození buněk, musí tak být ROS co nejdříve odstraněny, k čemuž slouží celá řada rostlinných antioxidantů a enzymů. Na druhou stranu ROS mají v rostlinných reakcích vůči zasolení také pozitivní úlohu a fungují jako signalizační molekuly stresu (Park *et al*., 2016) a zároveň zvyšují rostlinnou odolnost vůči zasolení, když v centrálním válci inhibují transport sodných iontů do nadzemní části rostliny (Dinneny, 2015).

Nedostatek vody na buněčné úrovni zase rostlina řeší změnami transkripce a aktivity aquaporinů, což jsou kanály na PM umožňující průchod molekulám vody přes hydrofobní PM (Vishwakarma *et al*., 2019).

Hlavní složkou iontového stresu u rostlin jsou sodné ionty. Ty se do rostlinných buněk dostávají skrze neselektivní kationtové kanály, draselné transportéry a zčásti také aquaporiny (Keisham *et al*., 2018). Koncentrace sodných iontů v cytosolu se pak zvyšuje na úkor draselných, které jsou pro buňku esenciální při udržení správného turgoru, membránového potenciálu a integrity a stejně tak pro správnou funkci mnoha enzymů (Yang and Guo, 2017). Rostlinné buňky se tak snaží udržet co možná nejoptimálnější poměr sodných a draselných iontů, čehož dosahují omezeným příjmem iontů sodných, jejich zvýšeným výdejem a ukládáním do vakuol.

Export sodných iontů z buňky a udržení iontové homeostázy má na starost tzv. SOS systém (Salt Overlay Sensitive) (Ji *et al*., 2013) (Obr. 8). Součástí SOS systému jsou SOS1 plazmamembránový Na^+/H^+ antiporter, SOS2 Ser/Thr proteinová kinasa a SOS3 Ca^{2+}-vazebný protein s hlavní úlohou v kořenech a oproti tomu v prýtu dominující SOS3-like Calcium Binding Protein8 (SCaBP8). Jak bylo uvedeno výše, v reakci na zvýšené hladiny sodných iontů se v buňce zvyšuje také koncentrace signálních iontů vápenatých. Ty se vážou na SOS3 nebo SCaBP8, které v reakci na to vytváří komplex se SOS2 (Park *et al*., 2016). Vzniklý komplex následně fosforyluje a tím i aktivuje SOS1 a zároveň stimuluje transkripční aktivitu *SOS1* (Park *et al*., 2016). Aktivita SOS1 je poháněna protonovým gradientem na PM, ten je vytvářen membránovými H^+/ATPasami (Yang and Guo, 2017). U SCaBP8 byla také prokázána schopnost inhibovat některé nízkoafinitní draselné kanály, kterými se do buněk mohou dostávat také sodné ionty (Yang and Guo, 2017) (Obr. 8).



Obr. 8. Schéma regulace iontové homeostázy a přidružených signálních drah v reakci na zasolení. Toxické sodné ionty (Na^+, červená šipka) se dostávají do buňky například skrze draselné transportéry jako HKT nebo AKT (nezobrazeno). V reakci na stres se do buňky skrze kanály dostávají signální vápenaté ionty (Ca^{2+}, fialová šipka). Ty se vážou na SOS3 nebo SCaBP8 Ca^{2+} vazebné proteiny, které následně aktivují SOS2 proteinovou kinasu. Ta fosforyluje a tím aktivuje SOS1 plazmamembránový Na^+/H^+ antiporter a zároveň v jádře indukuje expresi *SOS1* genu. SOS1 transportuje sodné ionty mimo buňku. SOS2 také aktivuje tonoplastické NHX Na^+/H^+ antiporter a CAX Ca^{2+}/H^+ antiporter, čímž se část sodných iontů dostává do vakuoly. Zasolení taktéž indukuje funkci plazmamembránových, a tonoplastických H^+/ATPas a pyrofosfatas (H^+/PPi), jejichž funkce podporuje SOS1 a NHX (tok protonů znázorňuje zelená šipka). Signalizace vápenatých iontů pak společně s dalšími signály stresu indukuje v jádře syntézu kyseliny abscisové (ABA). ABA se pak podílí na celé řadě pochodů a mimo jiné indukuje expresi genů tolerance k zasolení jako jsou *LEA* geny, geny biosyntézy osmolytů nebo ROS detoxifikace. Samotná ABA pak skrze svou základní signalizaci inhibuje funkci ABI2 PP2C proteinu, který v nepřítomnosti ABA inhibuje funkci SOS1 a NHX (podle Chinnusamy *et al.*, 2005 a Bonilla and Gonzáles-Fontes, 2011).

Vedle klasické SOS funguje také signalizace skrze kyselinu fosfatidovou (PA), která je syntetizována fosfolipasou D (PLD) v reakci na stres. Ta aktivuje MAPK6, která je taktéž schopná fosforylovat a aktivovat SOS1 (Ji *et al.*, 2013). Díky těmto funkčním obranným systémům dokáže rostlina udržet toxické sodné ionty v apoplastu či vaskulárním systému a část jich dokonce vyloučit zpět do půdy.

Dalším mechanismem snížení toxického vlivu sodných iontů je také jejich kompartmentace do vakuol. Ta je řízena pomocí Na^+/H^+ antiporterů (NHX) v tonoplastu (Keisham *et al.*, 2018) (Obr. 8). Ty jsou řízeny jak skrze SOS systém (Yang and Guo, 2017), tak pomocí ABA (Keisham *et al.*, 2018) a podobně jako při exportu sodných iontů přes PM jsou závislé na protonovém gradientu vytvářeném tonoplastickými H^+/ATPasami a H^+-pyrofosfatasami.

Na stres ze zasolení reaguje taktéž cytoskelet, tvořený vlákny mikrotubulů (MT) a aktinovými mikrofilamenty (MF). Zatímco MF se vlivem zasolení přeskupují do svazků a až vlivem dlouhodobého působení rozpuštěného chloridu sodného se depolymerizují, tak MT se v reakci na zasolení ihned depolymerizují a následně se zpětně polymerizují do odlišných struktur (Wang *et al*., 2011). Tyto změny cytoskeletu jsou důležité pro správnou funkci SOS systému a rostlinnou toleranci vůči zasolení. Při pokusech na sazenicích *Arabidopsis* byla zjevná souvislost mezi podáním látky de/stabilizující MT nebo MF a změnou odolnosti vůči zasolení (Ji *et al*., 2013) a stejně tak schopnost *sos1 a sos2* mutantů přežít zasolení se měnila s přidáním těchto látek (Wang *et al*., 2011). S cytoskeletem je mimo jiné asociovaná taktéž PLD, která aktivuje reorganizaci MT, a která se produkcí PA přímo podílí na reakcích vůči zasolení (Ji *et al*., 2013). A depolymerací MT se taktéž zvyšuje hladina cytosolického vápníku, který obratem reguluje MT zpětnou polymeraci (Wang *et al*., 2011).

2.4.2 Role ABA v reakci na zasolení

Stejně jako u ostatních typů stresu je ABA pro rostlinnou toleranci k zasolení zásadní. Její signalizační kaskády společně s fází rostlinného vývoje a koncentracemi ostatních hormonů (brassinosteroidy, gibereliny, jasmonát, auxin, etylen) regulují rostlinnou obranu vůči zasolení jak molekulární, tak genetickou cestou.

Během vegetativního růstu se v reakci na vodní deficit a příbuzné stresy zvýšeně syntetizuje v listech i kořenech, odkud je následně transportována do ostatních orgánů (Kuromori *et al.,* 2018). K transportu dochází primárně skrze vaskulární systém, ve kterém je při déletrvajícím stresovém působení taktéž syntetizována (Roychoudhury and Paul, 2012). Je to právě ABA, která je zodpovědná za inhibici raného rostlinného růstu při zasolení, čehož dosahuje několika faktory, jako je zastavení buněčného cyklu a metabolismu pomocí ABI5 a modulací plazmamembránových draselných kanálů nebo H^+/ATPas (Planes *et al*., 2015) (Obr. 7 a Obr. 8). Způsobuje také např. změny v iontovém složení svěracích buněk průduchů, což indukuje jejich uzavření a zpomalení ztrát vody v transpiračním proudu (Vishwakarma *et al*., 2019). A je to také ABA, jejíž signalizace v kořenech zvyšuje hydraulickou konduktivitu PM, elasticitu buněčné stěny a koncentraci osmolytů, což zvyšuje rostlinný příjem vody (Roychoudhury and Paul, 2012). Inhibicí ABI2 PP2C proteinu pak ABA reguluje SOS1 i NHX1 a je tak zodpovědná i za udržování iontové homeostázy při zasolení. Zároveň působení ABA spouští celou řadu druhých poslů jako jsou ROS, PA, NO (oxid dusnatý), IP3 nebo vápenaté ionty, které následně aktivují další množství obranných reakcí (Roychoudhury and Paul, 2012).

Na genetické úrovni pak ABA indukuje expresi mnoha genů spojených s rostlinnou reakcí na zasolení. U *Arabidopsis* je například celých 133 z 245 (53 %) genů řízených ABA zapojeno do reakcí na vodní deficit či zasolení (Sah *et al*., 2016). Tyto geny kódují např. Late Embryogenesis Abundant (LEA) proteiny, které se podílejí na obraně buňky proti vodnímu deficitu a iontové toxicitě, dále pak různé enzymy zapojené např. v biosyntéze osmolytů či antioxidantů, různé transportéry, kanály nebo aquaporiny a různé regulační molekuly jako transkripční faktory, proteinové kinasy a fosfatasy (Roychoudhury and Paul, 2012) (Obr. 8).

2.4.3 Role auxinu při zasolení

Jak již bylo napsáno výše, auxin je jeden z nejzákladnějších rostlinných hormonů a není tudíž překvapivé, že se do jisté míry podílí i na rostlinných reakcích k zasolení nebo je zasolením modulován. Naser a Shani (2016) uvádějí, že při náhlém vystavení zasolení je v rostlinách redukována koncentrace auxinu. To je zčásti způsobeno dočasným snížením exprese většiny genů auxinové biosyntézy *YUC* (Naser and Shani, 2016), částečně to může být také způsobeno zvýšenou syntézou serotoninu v reakci na zasolení, protože ten sdílí s auxinem stejný prekurzor (Mukherjee *et al*., 2014). Snížení koncentrace auxinu vede mimo jiné k nižší aktivitě membránových H^+/ATPas, které jsou při zasolení navíc inhibovány ABA, což částečně zastavuje rostlinný růst. Po několika hodinách od vystavení stresu se však již exprese některých *YUC* zvyšuje (Naser and Shani, 2016) a auxin se tak může podílet na obraně vůči zasolení.

Rostliny se při reakci se zasolenou půdou snaží dostat svůj kořenový systém co nejdále od zdroje zasolení. Tomuto jevu se říká halotropismus a jedná se o druh negativního tropismu, kdy rostlinný kořen vykazuje diferenciovaný růst směrem od vyšší koncentrace soli. Tento diferenciovaný růst je opět poháněn laterálním auxinovým transportem, který je narozdíl od fototropismu řízen internalizací PIN2 a nikoliv PIN3 (Verma *et al*., 2016). Na těchto změnách rostlinného růstu se v reakci na zasolení podílí kromě ABA i auxin, současně ještě s etylénem nebo kyselinou salicylovou, a kromě PIN2 se mění taktéž pozice nebo míra exprese ještě u AUX1, PIN1, 3 a 7, TIR1/AFB nebo některých ABCB (Van Den Berg *et al.,* 2016)

Auxin se pak také podílí na reakcích k zasolení, svým vlivem na signalizaci vápenatých iontů (Galon *et al*., 2010), která je důležitá pro iontovou homeostázu. Samotný auxin indukuje expresi Ca^{2+}/ATPas, kódovaných *LCA1* geny, čímž zvyšuje přítok vápenatých iontů do cytosolu a výsledný signál je pak taktéž zesilován auxinem, například aktivací CaM vazbou proteinů SAUR (Powers and Strader, 2016) nebo regulací genu *Calmodulin Binding Transcription Activator1 (CAMTA1)* (Galon *et al*., 2010).

2.4.4 Působení zasolení na fototropismus

Ze všech poznatků popsaných výše je více než zřejmé, že rostlinný stres indukovaný zasolením chloridem sodným a fototropické reakce se budou vzájemně ovlivňovat. Ať už pouhou inhibicí buněčné elongace, změnami v laterálním auxinovém transportu či represí některého z prvků fototropické signalizace nebo kombinací těchto a mnoha dalších činitelů vlivem osmotických a iontových stresů. Nebo naopak zesilováním rostlinné odpovědi na tyto stresy vlivem modrého světla zachyceného fototropiny. To a jakým způsobem se na těchto procesech podílí signalizace ABA, se pokouší nalézt odpovědi následující kapitoly.

3 Experimentální část

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část této práce byly použity vybrané genotypy huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh.). Jako kontrolní rostliny (wild type; WT) posloužily rostliny genotypu *glabra-1* (*gl-1* odvozené od ekotypu Col-0). Dále pak byly použity tři mutantní genotypy odvozené od *gl-1*, a to recesivní mutanti *phot1*, *phot2* a dvojitý mutant *phot1/phot2.* Tyto mutantní rostliny mají defektní fotoreceptory modrého světla phot1 a phot2. Semena všech uvedených genotypů byla poskytnuta prof. Winslow Briggsem (Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, USA).

3.2 Použité metody

3.2.1 Příprava média

Experimenty probíhaly *in vitro* a rostliny byly pěstovány na kultivačním MS médiu (Murashige and Skoog, 1962). To bylo připravováno po dvou litrech ve velké Erlenmeyerově baňce ze základního MS média (4,33 g l^{-1}; Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. M0221.0050), sacharózy (10 g l^{-1}), pufru MES (190,5 mg l^{-1}; 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina, Serva, Německo, Cat. No. 29834,02) a destilované vody (dH_2O). Výsledná hodnota pH připraveného média byla upravena 1M KOH na 6,1. Takto připravené médium bylo poté po 400 ml přeneseno do lahví a ztuženo fytoagarem (7 g l^{-1}) a následně sterilováno v parním autoklávu. Procesem sterilizace v autoklávu se výsledná hodnota pH snižuje na pro rostliny optimální hodnotu 5,7.

3.2.2 Růstové experimenty

3.2.2.1 Výsev semen

Pro účely růstových experimentů bylo naváženo od každého genotypu 4 až 8 mg semen (2 mg = cca 100 semen) do mikrozkumavek a zalito po 1,5 ml dH_2O. Takto byla semena v mikrozkumavkách přenesena do lednice a při 5 °C ponechána 3 dny stratifikovat.

Po stratifikaci byl (již v laminárním boxu) povrch semen vysterilizován. Z mikrozkumavky byla automatickou pipetou odstraněna voda a byl přidán ředěný roztok Sava (chlornan sodný obsahující 1,5 % aktivního chloru), který byl ponechán 25 minut působit. Poté byl roztok Sava odebrán a semena byla 5 až 6krát promyta sterilní dH_2O.

Samotný výsev probíhal taktéž v laminárním boxu. Pomocí automatické pipety se sterilními špičkami, které měly sterilním skalpelem upravený průměr výtokového otvoru,

byla semena všech 4 genotypů vysazována do samostatných kulatých plastových a sterilních Petriho misek (průměr 90 mm) na tuhé kultivační MS médium (cca 100 semen/miska). Misky byly následně dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie (Softpore, ČR) a popsány. Semena byla takto ponechána klíčit v automatizované růstové komoře (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) ve tmě při teplotě 23 °C po dobu 3 až 4 dnů. Petriho misky se semeny byly zabaleny do alobalu a umístěny ve vertikální poloze do růstové komory

3.2.2.2 Transfer vyklíčených rostlin

Před samotným transferem byly v laminárním boxu připraveny Petriho misky s MS médiem s obsahem chloridu sodného o daných koncentracích (0, 50, 100, 150 mmol l^{-1}). Předem připravené MS médium, rozehřáté v mikrovlnné troubě, bylo v Erlenmeyerově baňce mícháno se zásobním roztokem chloridu sodného o koncentraci 5 mol l^{-1} do 160 ml (Tab. 1) a poté rozléváno do Petriho misek po 20 ml (jedna koncentrace NaCl pro 4 genotypy krát 2 světelné podmínky = 160 ml).

Tab. 1. Objem zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol l^{-1} obsažený ve 160 ml média pro požadovanou koncentraci.

požadovaná koncentrace NaCl [mmol l^{-1}]	objem zásobního roztoku NaCl [ml]
50	1,6
100	3,2
150	4,8

Taktéž v laminárním boxu pak byly pomocí sterilní pinzety transferovány vyklíčené rostliny tak, aby každá miska obsahovala stejný počet přibližně stejně velkých rostlin. Rostliny byly na misky kladeny do jedné řady po 3 až 10 (podle množství vyklíčených semen v daném experimentu) tak, aby jejich hranice kořene a hypokotylu spočívala v jedné přímce, a aby byly jednotlivé hypokotyly vůči sobě rovnoběžně nataženy. Petriho misky byly následně dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie (Softpore, ČR), řádně popsány a přerozděleny do skupin podle příslušné světelné podmínky. Misky určené pro modré světlo byly usazeny do stojanů a misky určené pro tmu byly vertikálně zabaleny do alobalu a následně byly všechny přeneseny do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). Zde byly rostliny ponechány 7 dnů kultivovat při 23 °C. Zdrojem modrého světla s maximální intenzitou osvětlení 10 µmol m^{-2} s^{-1} byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue.

3.2.2.3 Měření rostlin a zpracování výsledků

Po 7 dnech kultivace byly u každé rostliny pomocí pravítka změřeny s přesností na 1 mm délky kořene a hypokotylu a výsledky byly zaznamenány do tabulek. Z daných hodnot byly následně v programu Microsoft Excel vypočítány průměrné délky kořene a hypokotylu. Experiment byl takto opakován celkem 9krát. Pomocí stejného programu pak byly v jednom souboru průměrné výsledky jednotlivých experimentů celkově zprůměrovány, vypočtena směrodatná odchylka, standardní chyba a procentuální inhibice. Výsledné hodnoty pak byly převedeny ještě do grafické podoby.

3.2.3 Experimenty s fototropismem při působení chloridu sodného

3.2.3.1 Výsev semen

Pro fototropické experimenty byla vysévána pouze semena genotypu *gl-1* (WT). Vždy bylo naváženo cca 400 semen, která nebyla stratifikována, ale byla rovnou sterilizována (viz, 3.2.2.1) a vysévána v laminárním boxu do Petriho misek s kultivačním MS médiem (cca 100 semen/miska). Petriho misky s vysetými semeny byly následně zalepeny páskou z netkané textilie (Softpore, ČR), řádně popsány a umístěny vertikálně ve stojanech do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). Zde byly rostliny ponechány klíčit 2 až 3 dny při 23 °C. Zdrojem modrého světla s maximální intenzitou osvětlení 10 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ při vlnové délce 440 nm byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue.

Po 2 až 3 dnech na modrém světle byly Petriho misky s vyklíčenými semeny přesunuty do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) s červeným osvětlením. Zdrojem červeného světla s maximální intenzitou osvětlení při 10 $\mu mol\ m^{-2}\ s^{-1}$ při vlnové délce 660 nm byla zářivka Philips TLD36W/15-Red. Zde byly rostliny pěstovány 4 až 5 dnů při 23 °C.

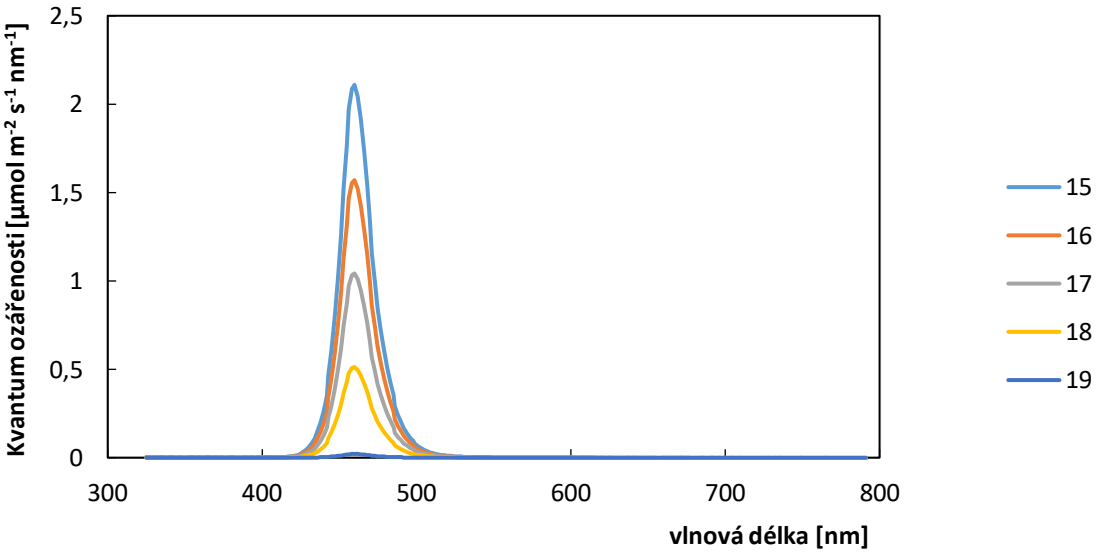
3.2.3.2 Transfer vyklíčených rostlin

Před samotným transferem byly v laminárním boxu připraveny velké, čtvercové Petriho misky (100 x 100 mm) s MS médiem s obsahem chloridu sodného o daných koncentracích (0 a 50 nebo 0 a 100 $mmol\ l^{-1}$). Předem připravené MS médium, rozehřáté v mikrovlnné troubě, bylo v Erlenmeyerově baňce mícháno se zásobním roztokem soli o koncentraci 5 $mol\ l^{-1}$ do 180 ml (Tab. 2) a poté rozléváno do Petriho misek po 60 ml (jedna koncentrace soli pro 3 misky = 180 ml).

Tab. 2. Objem zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol l^{-1} obsažený ve 180 ml média pro požadovanou koncentraci.

požadovaná koncentrace NaCl [mmol l^{-1}]	objem zásobního roztoku NaCl [ml]
50	1,8
100	3,6

Následně byly v laminárním boxu sterilní pinzetou přeneseny vyklíčené rostliny na médium v Petriho miskách tak, aby každá miska obsahovala stejný počet (6 až 8) přibližně stejně velkých rostlin. Ty byly na médium pokládány do úhlopříčky od levého spodního k pravému hornímu rohu tak, aby si vzájemně nezastiňovaly oblast kotyledonů a horní třetiny hypokotylu při ozáření z levé strany. Zároveň si byly hypokotyly vzájemně rovnoběžné. Petriho misky byly následně zalepeny na levé straně parafilmem (P-lab, ČR) pro jednodušší průchod světla a páskou z netkané textilie (Softpore, ČR) na zbylých třech stranách a řádně popsány. Následně byly Petriho misky vertikálně umístěny do stojanu a v temné místnosti byly vystaveny přímočarému modrému světlu po dobu 24 h při 20 °C. Zdrojem modrého světla byl pás modrých LED diod. Světelné spektrum LED diod bylo měřeno v oblasti vlnových délek 326 až 790 nm prof. RNDr. Janem Naušem, CSc., z Katedry biofyziky PřF UPOL. Maximální kvantum ozářenosti bylo zjištěno při 460 nm a vypočítaná celková ozářenost byla 0,55 µmol m^{-2} s^{-1} (Obr. 9).



Obr. 9. Kvantové spektrum použitých LED diod. Kvantum ozářenosti bylo měřeno v oblasti vlnových délek 326 až 790 nm. Maximální kvantum ozářenosti bylo naměřeno při 460 nm. V experimentu bylo použito minimální nastavení LED diod při nejnižším kvantu ozářenosti (spektrum 19), při kterém byla celková ozářenost vypočtena jako 0,55 µmol m^{-2} s^{-1}. Ostatní spektra podle snižujícího se nastavení LED diod: spektrum 15: 57,3 µmol m^{-2} s^{-1}, spektrum 16: 42,2 µmol m^{-2} s^{-1}, spektrum 17: 28,0 µmol m^{-2} s^{-1}, spektrum 18: 13,7 µmol m^{-2} s^{-1} (obrázek poskytnul prof. RNDr Jan Nauš CSc., z Katedry biofyziky PřF UPOL).

3.2.3.3 Zpracování výsledků

Po 24 h byly jednotlivé rostliny očíslovány a byly pořízeny fotografie fototropických ohybů. Z fotografií byl pak v počítačovém programu MB-Ruler změřen úhel ohnutí hypokotylu s přesností na 1°. Zároveň byla u každé rostliny změřena délka hypokotylu s přesností na 1 mm. Výsledky byly zaznamenány do tabulek a v programu Microsoft Excel z nich byly vypočteny průměrné hodnoty. Experiment se opakoval 3krát pro 0 a 50 mmol l^{-1} i pro 0 a 100 mmol l^{-1}. Průměrné výsledky jednotlivých experimentů byly následně opět zprůměrovány a byla určena jejich směrodatná odchylka, standardní chyba a procentuální inhibice růstu. Výsledné hodnoty pak byly ještě převedeny do grafické podoby.

3.2.4 Experimenty s fototropismem při působení chloridu sodného a fluridonu

3.2.4.1 Výsev semen

Výsev semen a jejich následná kultivace na modrém světle probíhala stejně jako v předchozím případě (viz. 3.2.3.1)

3.2.4.2 Transfer vyklíčených rostlin

Před samotným transferem byly v laminárním boxu připraveny velké, čtvercové Petriho misky (100 x 100 mm) s MS médiem s obsahem chloridu sodného a/nebo inhibitoru ABA fluridonu o koncentracích (0, 100 mmol l^{-1} chloridu sodného a/nebo 10, 20 nebo 30 µmol l^{-1} fluridonu). Předem připravené MS médium rozehřáté v mikrovlnné troubě bylo v Erlenmeyerově baňce mícháno se zásobním roztokem soli o koncentraci 5 mol l^{1} a/nebo zásobním roztokem fluridonu o koncentraci 0,1 mol l^{-1} do 120 ml (Tab. 3) a poté rozléváno do Petriho misek po 60 ml (jedna koncentrace NaCl a/nebo fluridonu pro 2 misky = 120 ml).

Tab. 3. Objem zásobního roztoku chloridu sodného o koncentraci 5 mol l^{-1} a/nebo zásobního roztoku fluridonu o koncentraci 0,1 mol l^{-1} obsažený ve 120 ml média pro požadovanou koncentraci 100 mmol l^{-1} NaCl a/nebo 10 µmol l^{-1}, 20 µmol l^{-1} nebo 30 µmol l^{-1} fluridon.

médium s obsahem NaCl a/nebo fluridonu	**objem zásobního roztoku NaCl [ml]**	**objem zásobního roztoku fluridonu [µl]**
NaCl (100 mmol l^{-1})	2,4	X
fluridon (10 µmol l^{-1})	X	12
NaCl (100 mmol l^{-1}) + fluridon (10 µmol l^{-1})	2,4	12
fluridon (20 µmol l^{-1})	X	24
NaCl (100 mmol l^{-1}) + fluridon (20 µmol l^{-1})	2,4	24
fluridon (30 µmol l^{-1})	X	36
NaCl (100 mmol l^{-1}) + fluridon (30 µmol l^{-1})	2,4	36

Následně probíhal samotný transfer vyklíčených rostlin v laminárním boxu podobně jako v předchozím případě (viz. 3.2.3.2.). Pro každou podmínku (0, NaCl, fluridon, NaCl + fluridon) byly připraveny 2 misky, na které byly rozloženy rostliny do úhlopříčky, rovnoběžně svými hypokotyly tak, aby byly vystaveny přímočarému modrému světlu z levé strany. Na rozdíl od předchozích experimentů zde byly při transferu jednotlivé rostliny očíslovány a byly jim změřeny hypokotyly s přesností na 1 mm a tyto údaje byly zaznamenány do tabulek.

3.2.4.3 Zpracování výsledků

Po 24 h byly pořízeny fotografie fototropického ohybu každé rostliny. Z fotografií byl pak v počítačovém programu MB-Ruler určen úhel ohnutí hypokotylu s přesností na 1°. Současně byly u rostlin opět změřeny délky hypokotylů s přesností na 1 mm, z čehož byl následně v programu Microsoft Excel vypočítán přírůstek hypokotylu u každé z rostlin. Následně byly vypočteny průměrné ohyby hypokotylu a přírůstky hypokotylu v závislosti na podmínkách. Experiment se opakoval 2krát pro každou koncentraci fluridonu a výsledky byly převedeny také do grafické podoby.

4 Výsledky

Úloha jednotlivých fototropinů v reakci na zasolení chloridem sodným byla hodnocena na základě analýzy mutantů *phot1, phot2* a *phot1/phot2* defektních genech kódujících tyto fotoreceptory. Byla měřena míra inhibice růstu hypokotylu i kořene v závislosti na koncentraci zasolení, kdy část rostlin byla vystavena modrému světlu a část byla ponechána ve tmě. Hodnotila se rozdílná inhibice hypokotylu i kořene různých mutantů vůči kontrolnímu genotypu *gl-1* na modrém světle a zároveň se u rostlin rostoucích ve tmě hodnotil vliv zasolení bez zapojení aktivovaných fototropinů. Výsledkem růstových experimentů tak bylo určení funkce jednotlivých fototropinů v rostlinných reakcí k zasolení chloridem sodným.

Možný vliv zasolení na fototropickou reakci, respektive funkci signalizace fotoreceptoru phot1 a úloha ABA v tomto procesu, pak byly testovány ve fototropických pokusech. Rostliny WT byly původně vystavovány zasolení chloridem sodným a následně byl určen rozdíl mezi fototropickým ohybem při stresových a normálních podmínkách. V další části fototropických pokusů byly rostliny vystavovány kromě soli také inhibitoru biosyntézy ABA fluridonu, čímž byla určena možná role ABA v inhibici fototropické reakce při zasolení. Měření délky hypokotylů zde sloužilo k objasnění, zdali je inhibice fototropické reakce vlivem zasolení chloridem sodným způsobena pouhou inhibicí rostlinného růstu, nebo jestli je zasolením nějakým způsobem ovlivněna samotná signalizace phot1 a na ní navázané kroky. Vzhledem k použité intenzitě modrého světla 0,5 μmol m^{-2} s^{-1} byla v těchto procesech studována pouze úloha fotoreceptoru phot1.

4.1 Růstové experimenty

4.1.1 *gl-1*

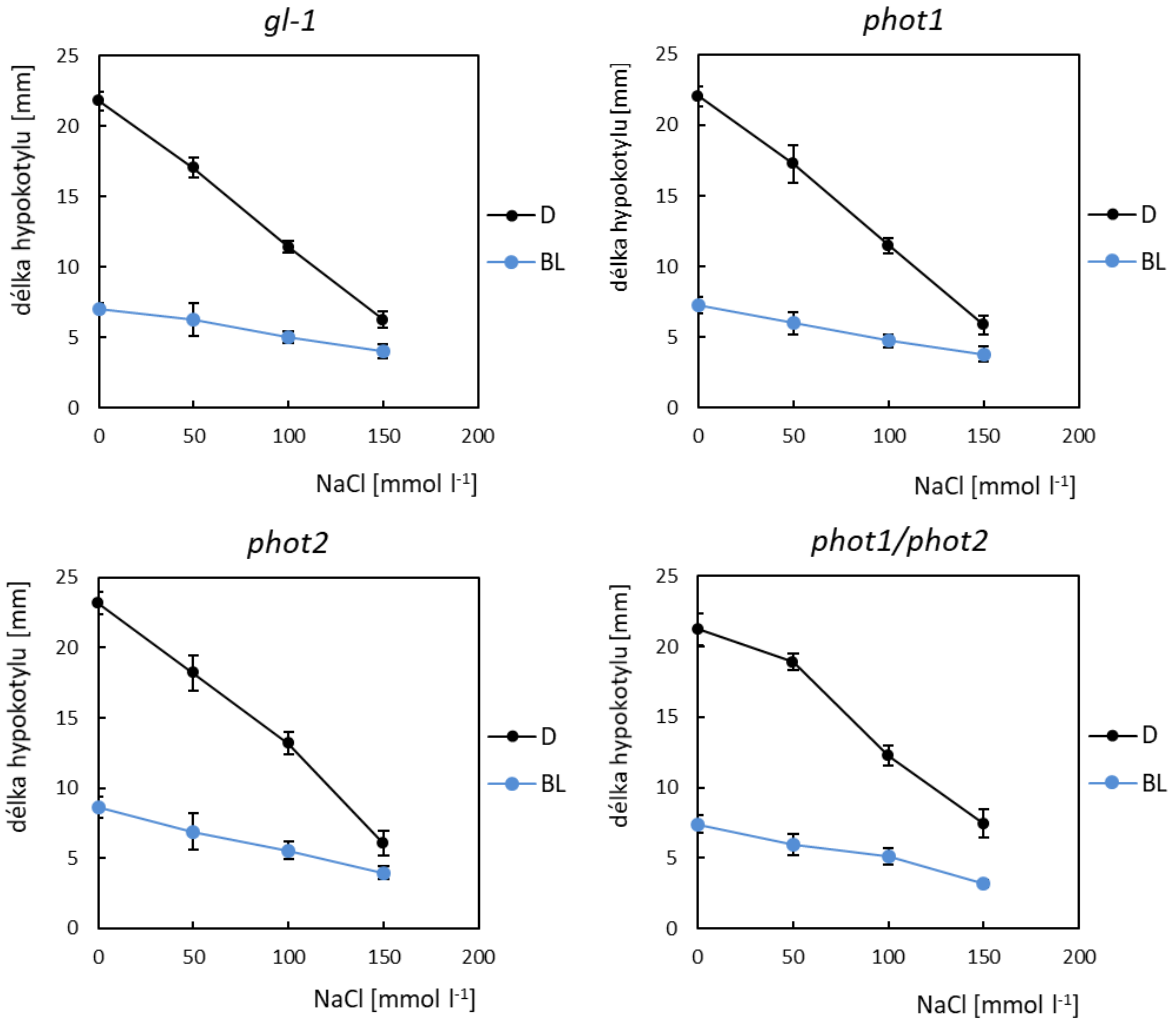
Kontrolní genotyp *gl-1* vykazoval postupné zkracování hypokotylů v reakci na zvyšující se zasolení chloridem sodným. Rostliny kultivované ve tmě měly celkově delší hypokotyly než rostliny pěstované na modrém světle, a to při všech koncentracích zasolení. V reakci k zasolení se však délka jejich hypokotylu snižovala rapidněji (Obr. 10).

Procentuální inhibice růstu hypokotylu byla u rostlin kultivovaných ve tmě výrazně vyšší než u rostlin rostoucích na modrém světle, a to na všech koncentracích chloridu sodného. Takže zatímco u rostlin kultivovaných na modrém světle dosahovala inhibice hypokotylu na nejvyšší koncentraci chloridu sodného (150 mmol l^{-1}) přibližně 40 %, tak u rostlin rostoucích ve tmě na stejné koncentraci přesáhla inhibice hodnotu 70 % (Obr. 11).

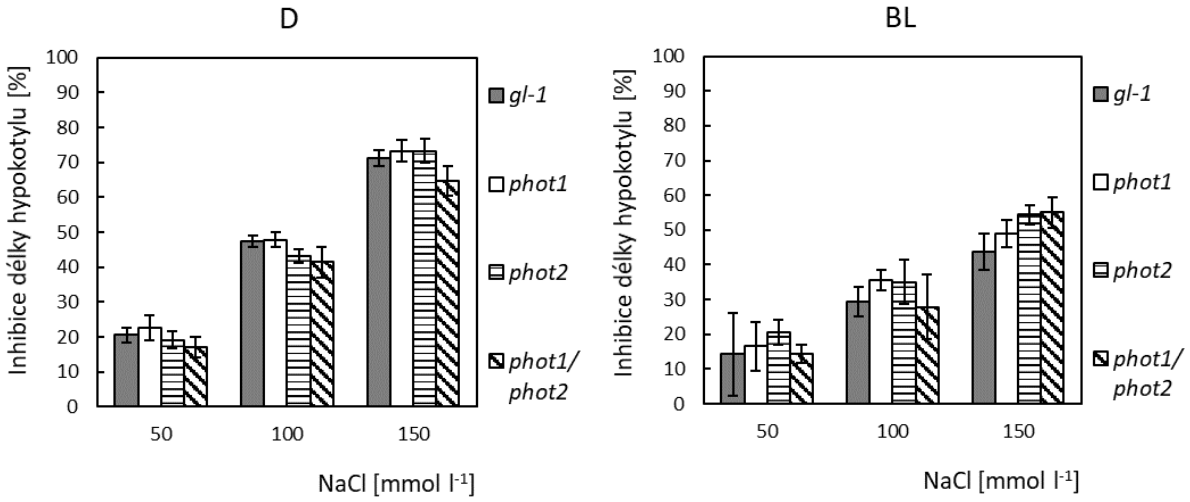
4.1.2 *phot1*

Ve srovnání s kontrolním genotypem *gl-1* vykazovaly mutantní rostliny *phot1* s nefunkčními fotoreceptory phot1 velmi podobné výsledky. Rostliny kultivované ve tmě i na modrém světle na žádné z testovaných koncentrací chloridu sodného nevykazovaly zásadní odlišnosti v délkách svých hypokotylů oproti kontrolnímu genotypu (Obr. 10).

Vzhledem k podobným výsledkům délek hypokotylů byla i procentuální inhibice jejich růstu v reakci k zasolení podobná. Zatímco ale u rostlin kultivovaných ve tmě byla míra inhibice hypokotylu téměř totožná s kontrolním genotypem, tak u rostlin kultivovaných na modrém světle bylo možné pozorovat lehké, i když statisticky neprůkazné zvýšení inhibice na všech koncentracích chloridu sodného (Obr. 11).



Obr. 10. Délky hypokotylů [mm] genotypů *gl-1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* po sedmi dnech kultivace ve tmě (D) nebo na modrém světle (BL) na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentraci 0, 50, 100 a 150 mmol l^{-1}. Výsledky představují průměrné hodnoty délek hypokotylů ± SE vypočítaných z 8 (D) nebo 9 (BL) nezávislých experimentů.



Obr. 11. Inhibice délky hypokotylu [%] po 7 dnech kultivace ve tmě (D) nebo na modrém světle (BL) na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentracích 50, 100 a 150 mmol l^{-1} u kontrolního genotypu *gl-1* a mutantních genotypů *phot1, phot2* a *phot1/phot2*. Výsledky představují průměrnou procentuální inhibici růstu hypokotylů ± SE oproti kontrole na nulovém zasolení vypočítanou z 8 (D) nebo 9 (BL) nezávislých experimentů.

4.1.3 *phot2*

Mutantní rostliny *phot2*, které mají defekt ve fotoreceptorech phot2, vykazovaly oproti *gl-1* ve tmě i na modrém světle vyšší nárůst hypokotylů při koncentracích chloridu sodného 0, 50 i 100 mmol l^{-1}. Poměrně výrazný byl však tento nárůst pouze u koncentrace 100 mmol l^{-1} na modrém světle a u nulové koncentrace na obou světelných podmínkách (Obr. 10).

Růst hypokotylu byl u *phot2* oproti kontrolnímu genotypu méně inhibován u zasolení o koncentraci 100 mmol l^{-1} ve tmě. Oproti tomu na modrém světle byla inhibice hypokotylu *phot2* vyšší než inhibice hypokotylu *gl-1* při zasolení 50 a 150 mmol l^{-1}. Opět však statisticky neprůkazně (Obr. 11).

4.1.4 *phot1/phot2*

Dvojitý mutant *phot1/phot2*, který nemá funkční ani jeden z fototropinů, vykazoval mírně zvýšený růst hypokotylů ve tmě v podmínkách zasolení, poměrně výrazné bylo toto zvýšení naměřeno pouze u koncentrace chloridu sodného 50 mmol l^{-1}. Oproti tomu na modrém světle dosahovaly hypokotyly *phot1/phot2* podobných velikostí jako *gl-1*, kromě nejvyšší koncentrace zasolení (150 mmol l^{-1}), kdy byly mutantní hypokotyly dokonce kratší (Obr. 10)

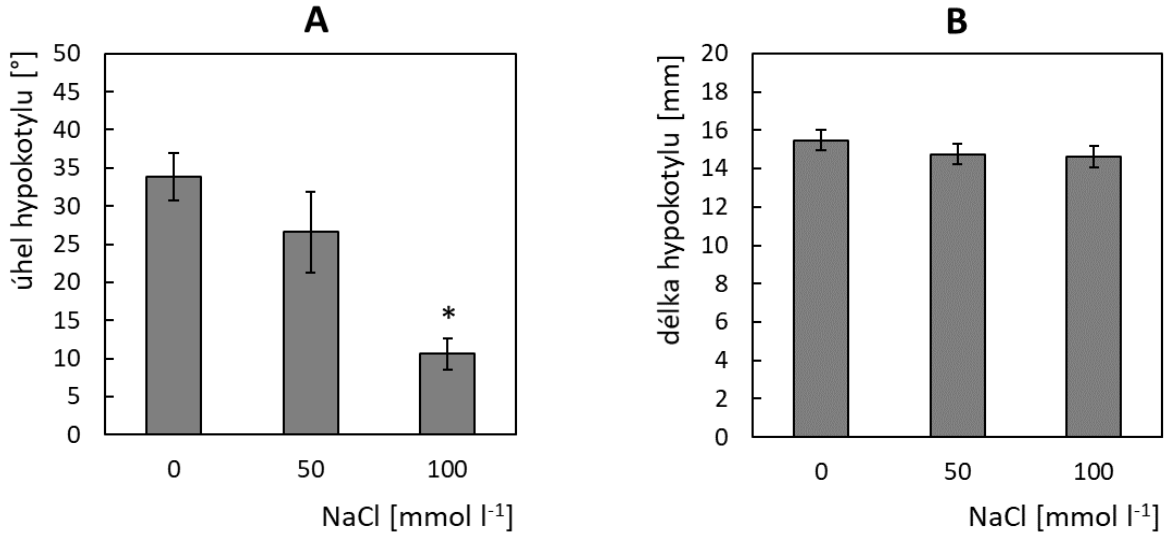
Procentuální inhibice růstu etiolovaných hypokotylu pak byla u *phot1/phot2* nižší než inhibice hypokotylu *gl-1* na všech koncentracích chloridu sodného. Oproti tomu na modrém světle byla tato inhibice růstu hypokotylu vyšší na testované koncentraci 150 mmol l^{-1}. I zde však výsledky nebyly statisticky průkazné (Obr. 10).

4.2 Fototropické experimenty

4.2.1 Experimenty s chloridem sodným

V první části fototropických experimentů byl prokázán negativní vliv zasolení na vznik fototropické reakce u rostlin genotypu *gl-1.* Rostliny na kontrolní nulové koncentraci soli vykazovaly po 24h působení horizontálního ozařování modrým světlem průměrný fototropický ohyb přesahující 30°. Při zasolení 50 mmol l^{-1} již bylo pozorováno jisté snížení fototropického ohybu a průměrná inhibice zde přesáhla 20 %. Celkově však snížení fototropické reakce při této koncentraci NaCl nebylo statisticky průkazné. Oproti tomu pokusy s koncentrací 100 mmol l^{-1} již statisticky průkazné byly a fototropický ohyb se zde snížil o téměř 69 % na průměrnou hodnotu 10,58° (± 2,06) (Obr. 12A).

Měření délek hypokotylů nepřineslo žádné směrodatné výsledky. Ačkoliv se celková délka hypokotylu se zvyšující koncentrací soli mírně snižovala, výsledné inhibice byly pouze v jednotkách procent a výsledky tak nebyly statisticky průkazné (Obr. 12B).



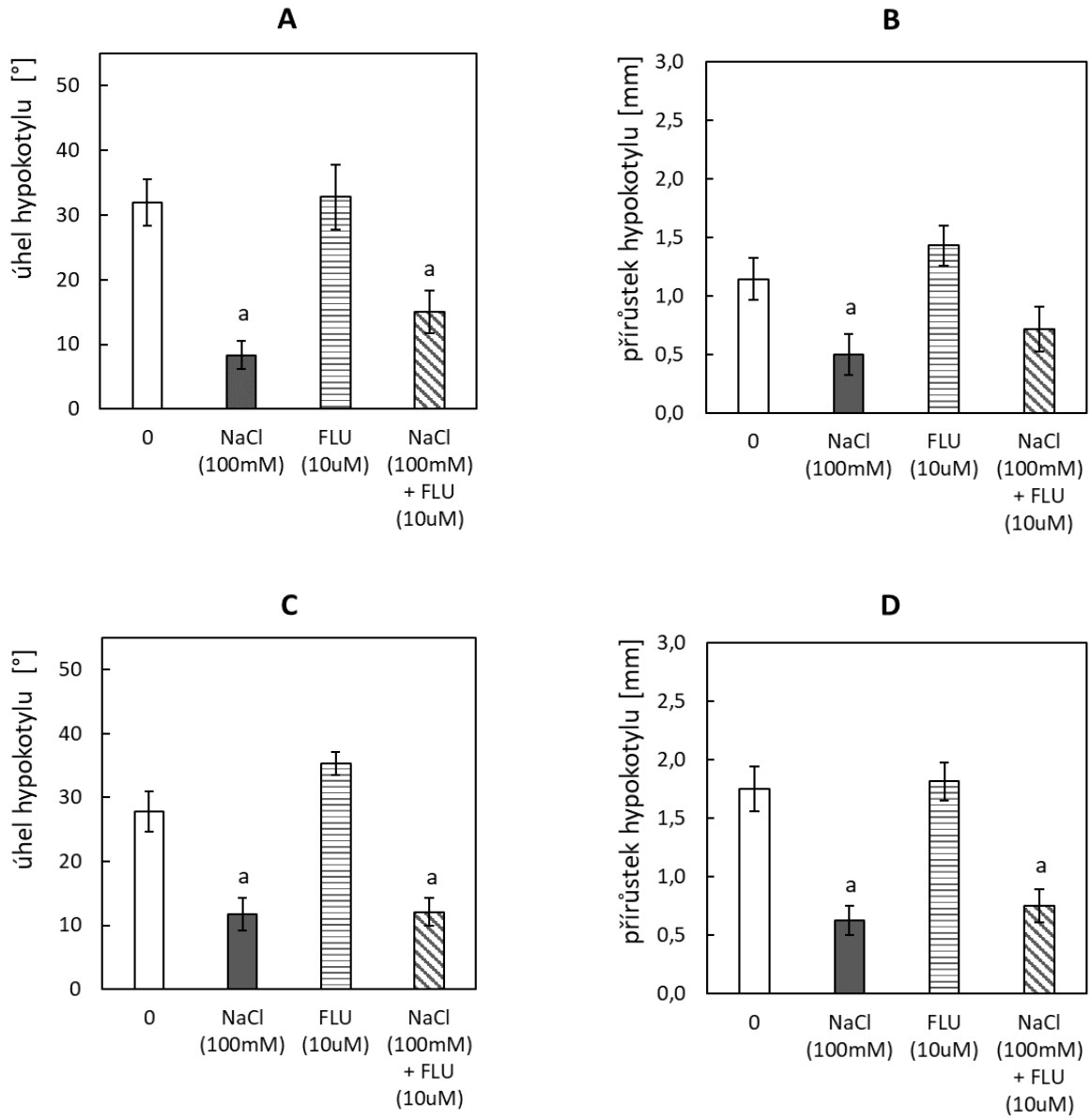
Obr. 12. Průměrný úhel [°] (A) a délka hypokotylu [mm] (B) genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na horizontálním modrém světle na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentracích 0, 50 a 100 mmol l^{-1}. Výsledky představují průměrné hodnoty úhlů a délek hypokotylů ± SE získaných ze 7 (0) nebo 3 (50 a 100 mmol l^{-1}) nezávislých experimentů; * = signifikantně odlišné od kontroly 0 (studentův t test: $p \leq 0,05$).

4.2.2 Experimenty s chloridem sodným a fluridonem

V druhé části fototropických experimentů byl prokázán negativní vliv zasolení na vznik fototropické reakce, a to do jisté míry nezávislý na inhibici růstu hypokotylu. Zároveň byl také prokázán pozitivní vliv inhibitoru syntézy ABA fluridonu na fototropickou reakci jak při zasolení, tak při kontrolních podmínkách s nulovou koncentrací chloridu sodného. Oproti předchozím experimentům zde nebyla měřena celková délka hypokotylu, ale pouze jeho přírůstek za 24 h působení horizontálního modrého světla a zasolení chloridem sodným a/nebo ovlivnění fluridonem.

V prvních dvou experimentech, kdy byla použita nejnižší koncentrace fluridonu 10 µmol l^{-1}, nebyl zaznamenán statisticky průkazný rozdíl mezi rostlinami ovlivněnými a neovlivněnými fluridonem. Průměrný úhel fototropického ohybu se u kontrolních rostlin a stejně tak u rostlin ovlivněných pouze fluridonem pohyboval okolo 30°. Oproti tomu u rostlin ovlivněných zasolením (100 mmol l^{-1}) byla fototropická reakce silně inhibovaná, bez ohledu na přítomnost fluridonu (Obr. 13A a 13C).

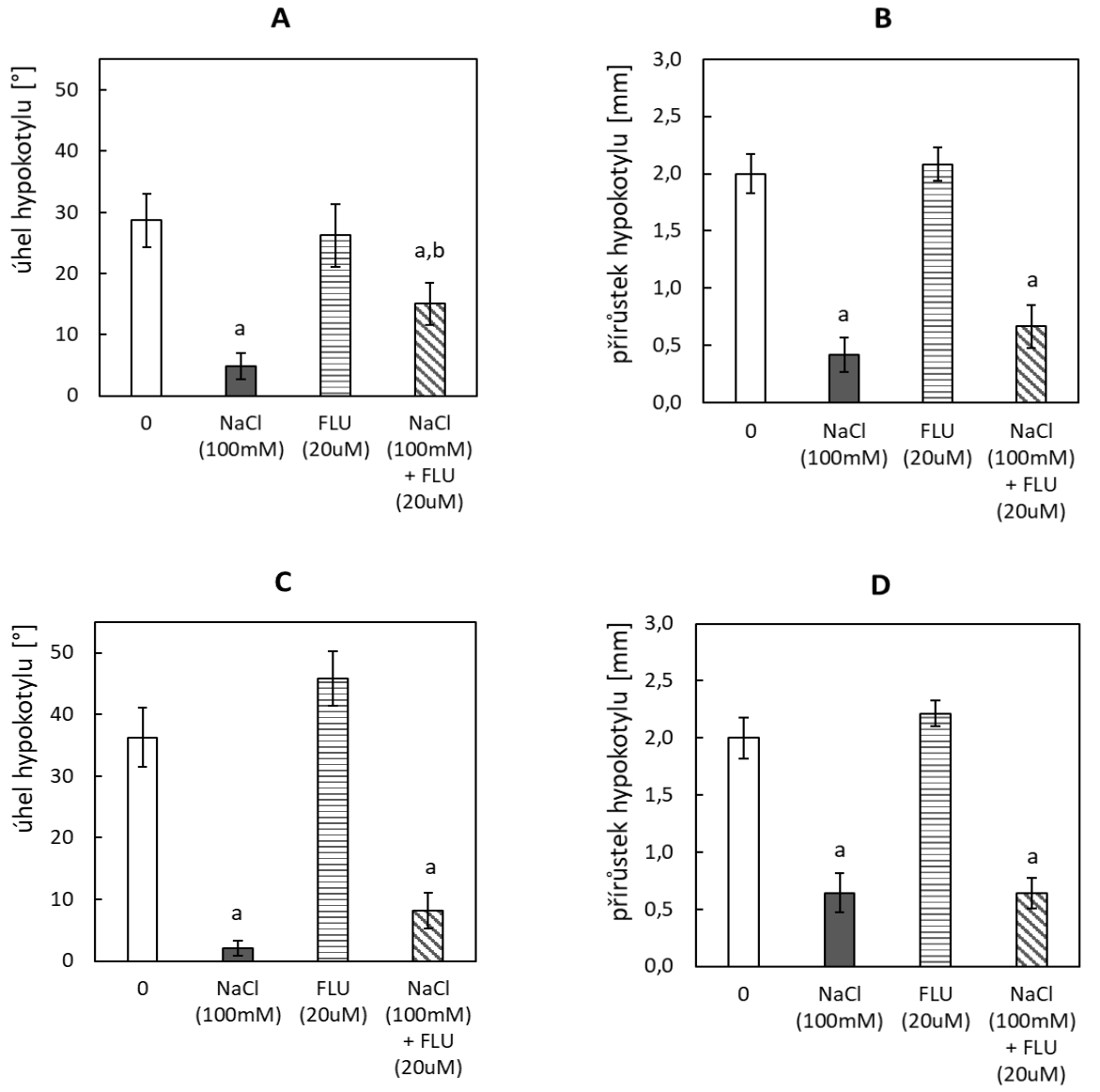
Přírůstek hypokotylu se podobně jako jeho ohyb vlivem zasolení výrazně snížil, a to bez výrazného rozdílu mezi rostlinami ovlivněnými a neovlivněnými fluridonem (Obr. 13B a Obr. 13D).



Obr. 13. Úhel [°] (A, Exp. 1; C, Exp. 2) a přírůstek hypokotylu [mm] (B, Exp. 1; D, Exp. 2) *gl-1* po 24 hodinách kultivace na horizontálním modrém světle na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentraci 100 mmol l^{-1} a/nebo fluridonem o koncentraci 10 µmol l^{-1}. Hodnoty představují průměrné výsledky dvou jednotlivých experimentů ± SE; a = signifikantně odlišné od kontroly 0 (studentův t test: $p \leq 0,05$).

V následujících dvou experimentech byl pozorován vliv fluridonu o koncentraci 20 μmol l^{-1} na fototropickou reakci při zasolení. V obou experimentech sice měly rostliny ovlivněné zasolením (100 mmol l^{-1}) silně inhibovanou fototropickou reakci oproti kontrole, ovšem rostliny, které byly zároveň ovlivněny fluridonem měly větší fototropický ohyb než ty, které byly ovlivněny pouze solí (Obr. 14A a Obr. 14C). Ovšem pouze v jednom z těchto experimentů byl tento rozdíl statisticky průkazný (Obr. 14A)

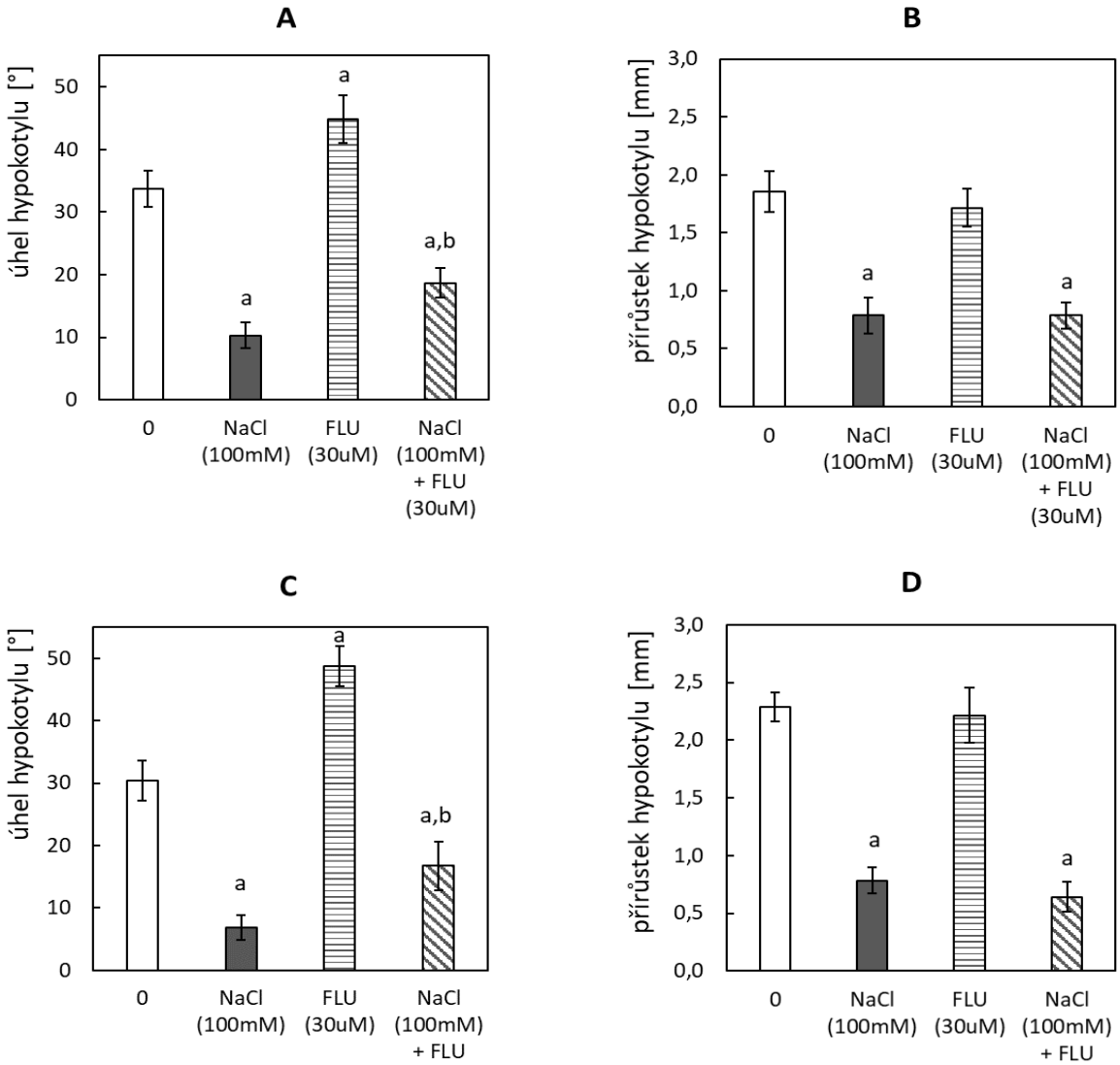
Na rozdíl od fototropické reakce, na inhibici přírůstku hypokotylu vlivem zasolení neměla vyšší použitá koncentrace fluridonu vliv. Stejně jako u koncentrace fluridonu 10 mmol l^{1}, tak i v tomto experimentu nebyl naměřen statisticky průkazný rozdíl mezi rostlinami ovlivněnými a neovlivněnými fluridonem (Obr. 14B a Obr. 14D)



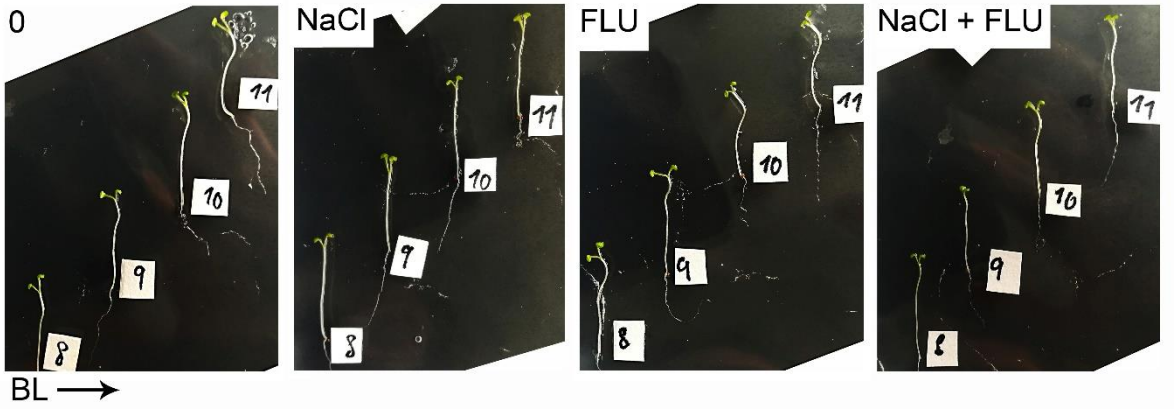
Obr. 14. Úhel [°] (A, Exp. 1; C, Exp. 2) a přírůstek hypokotylu [mm] (B, Exp. 1; D, Exp. 2) *gl-1* po 24 hodinách kultivace na horizontálním modrém světle na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentraci 100 mmol l^{-1} a/nebo fluridonem o koncentraci 20 μmol l^{-1}. Hodnoty představují průměrné výsledky dvou jednotlivých experimentů ± SE; a = signifikantně odlišné od kontroly 0, b = signifikantně odlišné od zasolení NaCl (100 mmol l^{-1}) (studentův t test: $p \leq 0,05$).

Vliv zablokované ABA syntézy na fototropickou reakci byl finálně prokázán v poslední dvojici experimentů, tentokrát s koncentrací fluridonu 30 μmol l^{-1}. Oba tyto experimenty vykázaly velmi podobné výsledky a v obou došlo ke zmírnění inhibičního efektu zasolení (100 mmol l^{-1}) na fototropickou reakci. Rostliny, které byly ovlivněny chloridem sodným i fluridonem, zde vykazovaly statisticky průkazné zvětšení fototropického ohybu oproti rostlinám ovlivněných pouze chloridem sodným (Obr. 15A, Obr. 15C a Obr. 16). Zároveň v obou experimentech došlo ke statisticky průkaznému zvětšení fototropického ohybu oproti kontrolním rostlinám u rostlin ovlivněných pouze fluridonem, a to o několik desítek procent.

Stejně jako u předchozích dvou použitých koncentrací, i v tomto experimentu nebyl naměřen statisticky průkazný rozdíl přírůstku hypokotylu mezi rostlinami ovlivněnými a neovlivněnými fluridonem, a to bez ohledu na zasolení (Obr. 15B a 15D).



Obr. 15. Úhel [°] (A, Exp. 1; C, Exp. 2) a přírůstek hypokotylu [mm] (B, Exp. 1; D, Exp. 2) *gl-1* po 24 hodinách kultivace na horizontálním modrém světle na MS médiu obsahujícím chlorid sodný o koncentraci 100 mmol l^{-1} a/nebo fluridonem o koncentraci 30 μmol l^{-1}. Hodnoty představují průměrné výsledky dvou jednotlivých experimentů ± SE; a = signifikantně odlišné od kontroly 0, b = signifikantně odlišné od zasolení NaCl (100 mmol l^{-1}) (studentův t test: $p \leq 0,05$).



Obr. 16. Fototropická reakce 7 dnů starých rostlin *Arabidopsis* genotypu *gl-1* po 24 h vystavení horizontálnímu modrému světlu (BL) a zasolení chloridem sodným (100 mmol l^{-1}) a/nebo fluridonu (30 µmol l^{-1}).

5 Diskuze

Jak již bylo zmíněno v teoretické části této bakalářské práce, fototropiny jsou fotoreceptory modrého světla, které jsou primárně zodpovědné za fototropické reakce rostlin. V tomto procesu je na jejich signalizaci navázaná celá řada signálních komponent a stejně tak je jejich signál ovlivňován řadou dalších modulátorů skrze signalizaci jiných fotoreceptorů nebo fytohormonů. Současně jsou fototropiny kromě fototropismu zainteresované také do otevírání průduchů, přesunů chloroplastů a rané fotomorfogeneze. Tato práce si kladla za cíl vysvětlit, jestli a jakým způsobem se u *Arabidopsis* fototropiny podílejí na toleranci hypokotylu k abiotickému stresu, konkrétně k zasolení chloridem sodným, a naopak jakým způsobem bude samotná fototropická reakce hypokotylu ovlivněna zasolením a jakou roli zde může hrát rostlinný „hormon stresu“ ABA.

5.1 Růstové experimenty

Při růstových pokusech s mutantními genotypy *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* a kontrolním genotypem *gl-1* (WT) byl potvrzen inhibiční efekt zasolení na prodlužování hypokotylu. Ten se s každým navýšením koncentrace chloridu sodného zvyšoval u rostlin kultivovaných ve tmě i na modrém světle. Rostliny kultivované ve tmě vykazovaly celkově větší vzrůst hypokotylů než rostliny kultivované na modrém světle – to je způsobeno etiolovaným růstem, při kterém rostlina syntetizuje zvýšené množství růstového hormonu auxinu. Podle předpokladu u etiolovaných semenáčků přenesených na modré světlo docházelo k inhibici růstu hypokotylu. Inhibice růstu modrým světlem nastává v prvních sekundách až zhruba 30 minutách prostřednictvím fotoreceptoru phot1 (Parks *et al*., 1998; Folta and Spalding, 2001), kdežto inhibici růstu v následujícím čase přebírají další fotoreceptory modrého světla – kryptochromy (Gangappa a Botto, 2016). Kryptochromy se nacházejí v jádře a po ozáření modrým světlem spouští kaskádu dějů, které ústí v inhibici COP1 E3 ubiquitin ligasy a následnou zvýšenou aktivitu transkripčního faktoru HY5, který řídí expresi genů nutných pro fotomorfogenezi. Redukce prodlužování hypokotylu vlivem HY5 je zprostředkována celou řadou dějů, jako je přímá represe syntézy giberelinů, potlačení syntézy auxinu skrze zvýšení aktivity DELLA proteinů, zvýšená exprese inhibitorů auxinu nebo snížená exprese expansinů a mnoho dalších (Gangappa and Botto, 2016). Samotná tato skutečnost vysvětluje, proč na kontrolní nulové koncentraci chloridu sodného dosahovaly rostliny kultivované ve tmě výrazně delších hypokotylů než rostliny kultivované na modrém světle. V našich experimentech byly hypokotyly etiolovaných rostlin inhibovány chloridem sodným relativně méně než rostliny rostoucí na modrém světle. To může být vysvětleno tím, že výrazný růst hypokotylu je již inhibován samotným modrým světlem a následné zasolení již nesnižuje délku hypokotylu tolik jako u rostlin etiolovaných.

Samotné zasolení může inhibovat růst hypokotylu minimálně z části stejným mechanismem jako de-etiolizace skrze kryptochromy. Velká část výše popsaných dějů totiž probíhá skrze aktivaci exprese jiného transkripčního faktoru ABI5. Ten je aktivován jak pomocí HY5, tak vlivem SnRK2 řízených ABA, která je syntetizována v reakci na stres. Samotná ABA pak v hypokotylech může přispívat k inhibici prodlužování ještě inhibicí membránových H^+/ATPas (Emenecker and Strader, 2020).

O fototropinech je známo, že jsou schopné aktivovat některé membránové H^+/ATPasy (Kinoshita and Hayashi, 2011), taktéž zvyšují cytosolickou koncentraci vápenatých iontů, otevírají průduchy nebo také mohou modulací kořenového růstu zvyšovat odolnost rostlin k suchu (Galen *et al.,* 2007*)*. Při pokusech s recesivním mutantem *phot1*, který má defekt ve fotoreceptoru phot1, však nebyl naměřen statisticky průkazný rozdíl v účinku chloridu sodného na prodlužování hypokotylů mezi mutantem *phot1* a kontrolním genotypem *gl-1.* Z tohoto důvodu nelze mírné zvýšení inhibice růstu hypokotylu *phot1* vlivem zasolení na modrém světle považovat za směrodatné. Z těchto výsledků lze tedy vyvodit závěr, že fotoreceptor phot1 není významně zapojen v reakci hypokotylů *Arabidopsis* k zasolení.

Mutantní rostliny *phot2* i *phot1/phot2* vykazovaly vyšší inhibici růstu hypokotylu ve srovnání s inhibicí u kontrolního genotypu *gl-1*, především při koncentracích 50 a 150 mmol l^{-1}. Z těchto výsledků by bylo možné vyvodit závěr, že modré světlo skrze phot2 zvyšuje u *Arabidopsis* toleranci hypokotylu k zasolení. Avšak statistické výpočty (t-test) ukázaly, že rozdíl mezi průměrnou inhibicí růstu hypokotylu *gl-1* a mutanty *phot2* a *phot1/2* není statisticky průkazný, i když se rozdíly pohybovaly na hranici průkaznosti při $p = 0{,}05$. Vzhledem k tomu, že bylo provedeno relativně málo experimentů (4 až 9, v závislosti na genotypu a koncentraci chloridu sodného), budou muset být tyto výsledky v budoucnu ověřeny dalšími experimenty.

Role phot1 v těchto procesech zůstává neobjasněná. Ačkoliv výsledky od Bordáčová (2019) naznačují, že by signalizace phot1 mohla mít úlohu v toleranci hypokotylu k zasolení podobně jako signalizace phot2, tak výsledky této práce se přiklání spíše na stranu toho, že se phot1 na tomto procesu nepodílí. Způsob, jakým phot2 a potažmo i phot1 ovlivňují reakce hypokotylů ke stresu, však zůstává neznámý.

Mezi možné mechanismy by bylo možné zařadit schopnost fototropinů aktivovat některé typy membránových H^+/ATPas (Kinoshita and Hayashi, 2011). Jejich funkce je totiž potřebná nejen pro elongaci buněk hypokotylu, ale také pro funkci SOS systému, který odstraňuje toxické sodné ionty z buňky. Zároveň jsou H^+/ATPasy konkrétně v hypokotylech prokazatelně inhibovány ABA. Vliv fototropinů na membránové H^+/ATPasy v buňkách elongační zóny hypokotylu však doposud nebyl prostudován.

Dalším možnou variantou vlivu fototropinů na rostlinnou reakci k zasolení je jejich interakce s COP1. Mao *et al.* (2005) nebo Jeong *et al.* (2010) uvádí, že fototropiny jsou stejně jako kryptochromy negativními regulátory COP1. Potlačením COP1 se tak tyto fotoreceptory podílejí na fotomorfogenezi nebo světlem indukovaném otevírání průduchů. Kromě toho se COP1 v jádře účastní taktéž interakce se SUMO E3 ligasou SIZ1 (SAP and mIZ-finger domain1). Ve tmě sice SIZ1 sumolyzuje COP1 a zvyšuje tím jeho ubiquitinační aktivitu, při delším ozáření však COP1 naopak ubiquitinuje SIZ1 a ten je následně degradován ve 26S proteazomu (Lin *et al.,* 2016). Miura a Nozawa (2014) pak prokázali, že SIZ1 zvyšuje toleranci *Arabidopsis* k zasolení, a to včetně hypokotylu. Je tedy možné, že signalizace modrého světla skrze fototropiny a kryptochromy zvyšuje aktivitu SIZ1 na úkor COP1 a tím zvyšuje toleranci hypokotylů *Arabidopsis* k zasolení.

Mezi dalšími možnými místy působení fototropinů v rostlinných reakcích na stres ze zasolení stojí za zmínku ještě fototropiny indukované otevírání průduchů. Ty se vlivem osmotického stresu zavírají, aby zabránily ztrátám vody. V rostlině však následně dochází k zastavení fotosyntézy a toxické kumulaci ROS. Ačkoliv se vlivem zvýšené koncentrace sodných iontů v apoplastu průduchy opět otevírají (Yu and Assmann, 2016), omezená či zcela inhibovaná schopnost světlem indukovaného otevírání průduchů by mohla mít vliv na toleranci hypokotylu *Arabidopsis* k zasolení.

Důvod, proč se jistý rozdíl v toleranci hypokotylu k zasolení projevil pouze u *phot2* a *phot1/phot2*, může souviset s použitou intenzitou modrého světla – 10 μmol m^{-2} s^{-1}, při které se signalizace fototropinů stává více závislou na phot2. Zároveň se může jednat o vliv specifického přesunu phot2 do Golgiho aparátu vlivem ozáření. Na druhou stranu slabé (a neprůkazné) zvýšení inhibice růstu hypokotylu u *phot1* mutantů, společně s výsledky Bordáčové (2019) může znamenat, že se phot1 na procesu tolerance hypokotylu *Arabidopsis* k zasolení částečně taktéž podílí a pouze použitá metodika to nebyla schopna dostatečně prokázat. V budoucích experimentech proto navrhuji měřit délku hypokotylů před a po transferu na zasolené médium, a kromě inhibice celkového růstu tak získat i informace o inhibici přírůstku hypokotylu od vystavení stresovým podmínkám. Zároveň bude potřeba experimenty provádět ve více opakováních.

5.2 Experimenty s fototropismem

V experimentech s fototropismem byl prokázán inhibiční účinek zasolení na vznik fototropické reakce hypokotylu u *Arabidopsis*. Při koncentraci chloridu sodného 50 mmol l^{-1} nebylo snížení ohybu hypokotylu ještě dostatečně průkazné, ale při 100 mmol l^{-1} již byla inhibice ohybu statisticky signifikantní.

Měření celkové délky hypokotylu nepřineslo výrazné rozdíly mezi jednotlivými zasoleními, ačkoliv byla pozorovatelná jistá míra narůstající inhibice vlivem zvyšující se koncentrace zasolení. Na rozdíl od růstových experimentů byly ve fototropických experimentech rostliny vystaveny různým mírám zasolení pouze po dobu 24 h, během kterých rostliny nevyrostly o dostatečně velké přírůstky tak, aby byl rozdíl celkových délek hypokotylů směrodatný. V následující části experimentů s fototropismem tak byly rostliny měřeny před i po transferu na zasolené médium a nebyla měřena celková délka hypokotylu, ale pouze jeho přírůstek. Z těchto výsledků bylo možné lépe určit míru inhibice růstu hypokotylu a do jaké míry je tato inhibice růstu zodpovědná za inhibici fototropické reakce, která je zprostředkována právě růstem.

Na základě zjištění Eckstein *et al.* (2016), že ABA v některých pletivech posttranskripčně snižuje množství fototropinů, byly v dalších experimentech rostliny *gl-1* vystavovány kromě zasolení také vlivu inhibitoru syntézy ABA fluridonu. Při nejnižší koncentraci fluridonu (10 µmol l^{-1}) ještě nebyl naměřen signifikantní rozdíl mezi rostlinami ovlivněnými a rostlinami neovlivněnými fluridonem. Při 20 µmol l^{-1} však již bylo u obou experimentů (pouze u jednoho však statisticky průkazně) zaznamenáno zvýšení fototropického ohybu u rostlin, které byly ovlivněny chloridem sodným a fluridonem oproti rostlinám ovlivněných pouze chloridem sodným. A při nejvyšší koncentraci fluridonu (30 µmol l^{-1}) byl již signifikantní rozdíl zaznamenán u obou pokusů, a navíc byl naměřeno i signifikantní navýšení fototropického ohybu u rostlin, které byly ovlivněny pouze fluridonem oproti kontrolním rostlinám. O to překvapivější pak byly výsledky měření přírůstku hypokotylu. Ten se podle očekávání vlivem zasolení výrazně snížil, ale ovlivnění fluridonem o žádné z použitých koncentrací na něj nemělo vliv. Z těchto výsledků je tedy možno formulovat tvrzení, že vlivem stresu ze zasolení dochází u *Arabidopis* k inhibici fototropického ohybu hypokotylu, která je alespoň z části nezávislá na inhibici elongace hypokotylu, a na které se podílí ABA signalizace. Samotná inhibice přírůstku hypokotylu v prvních 24 h od vystavení stresu pak zase funguje alespoň z části nezávisle na ABA. Vzhledem k zesílení fototropické reakce u rostlin ovlivněných pouze fluridonem o nejsilnější použité koncentraci se také můžeme domnívat, že při nestresových podmínkách může být ABA negativním regulátorem fototropické reakce hypokotylu u *Arabidopsis*.

Inhibice fototropického ohybu hypokotylu vlivem zasolení bude tedy pravděpodobně způsobena kombinací několika faktorů. Kromě samotné inhibice buněčné elongace, která byla popsána výše, a na které je závislá každá tropická reakce, je vlivem zasolení pravděpodobně inhibována i samotná signalizace fototropismu. Jednou z možných příčin tohoto jevu by mohla být snížená exprese fototropinů v rostlinách stresovaných zasolením. Tento předpoklad podporují výše zmíněné výsledky Eckstein *et al.* (2016), ve kterých působení exogenní ABA, která je při zasolení zvýšeně syntetizována, posttranskripčně

snížilo množství fototropinů u *Arabidopsis*. A stejně tak nedávné výsledky Jarošové (2019) a Glogarové, Schenkové, Parada a Fellnera (2020, nepublikované výsledky), odhalily že zasolení chloridem sodným (50 a 70 mmol l^{-1}) silně inhibovalo expresi *PHOT1* a *PHOT2* v semenech rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), což by také mohlo být způsobeno zvýšenou koncentrací ABA v reakci na stres.

Dalším možným vysvětlením tohoto jevu může být vliv ABA na expresi auxinových transportérů PIN. Ten byl zatím prokázán pouze u kořenů, ve kterých ovlivnění ABA nebo chloridem sodným způsobilo změnu lokalizace a snížení exprese některých PIN transportérů, ústící ve změny auxinového transportu a s ním spojenou inhibicí/modulací růstu a tropických reakcí kořene (Lu *et al.,*2019; Rowe *et al.,* 2016). Jakým způsobem jsou PIN, ale i ostatní auxinové transportéry ovlivňovány ABA v hypokotylu *Arabidopsis* však zatím není známo. Vliv ABA na základní proteiny signalizační kaskády fototropinů však doposud taktéž nebyl prozkoumán a není tedy vyloučeno, že by i zde ABA mohla působit jako negativní regulátor.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit jestli, a pokud ano, tak jakým způsobem se receptory modrého světla fototropiny podílí u *Arabidopsis* na toleranci hypokotylu k abiotickému stresu, konkrétně k zasolení chloridem sodným. Zároveň pak byl zkoumán vliv zasolení na fototropickou reakci hypokotylu a úloha kyseliny abscisové v tomto procesu.

Získané výsledky růstových pokusů ukazují, že fototropiny, a to minimálně phot2, by v toleranci hypokotylu k zasolení mohli plnit funkci pozitivních modulátorů. Mutantní rostliny *phot2, phot1/phot2* a částečně i *phot1* totiž vykazovaly vyšší procentuální inhibici délky hypokotylu v důsledku zasolení specificky na modrém světle. Výsledky se však pohybovaly těsně na hraně statistické průkaznosti a nelze je tak brát za směrodatné. Vzhledem k pozorovatelnému trendu ve výsledcích této i některých předchozích prací pak byly navrženy možné mechanismy zapojení fototropinů do rostlinné tolerance k zasolení i návrhy budoucího vylepšení experimentální metodiky.

Pomocí fototropických pokusů pak byl prokázán očekáváný inhibiční účinek stresu při zasolení na vznik fototropické reakce hypokotylu. Poněkud zajímavějších výsledků však bylo dosaženo při testování úlohy kyseliny abscisové v tomto procesu. Z výsledků získaných po aplikaci fluridonu, inhibitoru syntézy kyseliny abscisové totiž vyplývá, že se kyselina abscisová chová jako negativní regulátor fototropické reakce hypokotylu jak při stresových, tak při nestresových podmínkách, a to alespoň částečně nezávisle na inhibici elongace hypokotylu. Míra inhibice hypokotylové elongace se totiž po ovlivnění fluridonem neměnila na rozdíl od fototropického ohybu, který se inhibicí syntézy kyseliny abscisové zvyšoval. V diskuzi byly nastíněny možné vysvětlení těchto výsledků, ale pro potvrzení a úplné pochopení těchto jevů však bude potřeba ještě dalších experimentů.

Výsledky předkládané práce tak svým dílem přispívají k objasnění vzájemně propojených procesů rostlinné signalizace modrého světla a abiotických stresů. Zároveň však pokládají i mnohé nové otázky a mohou tak posloužit jako odrazový můstek mnohých dalších experimentů, které ještě bude nutné provést pro úplné pochopení magického světa rostlinné fyziologie.

7 Citovaná literatura

Armengot L, Marques-Bueno M, Jaillais Y (2016). Regulation of polar auxin transport by protein and lipid kinases. *Journal of Experimental Botany* **67**, 4015-4037. DOI: 10.1093/jxb/erw216.

Bonilla I, Gonzáles-Fontes A (2011). Salt stress in vascular plants and its interaction with boron toxicity. Vasanthaiah H, Kambiranda D (Ed.), *Plants and Environment* **1**, 227-240. InTech. ISBN 978-953-307-779-6.

Bordáčová N (2019). Úloha fototropínov v rastových reakciách rastlín k zasoleniu. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta, UP v Olomouci

Briggs W, Tocher RD, Wilson JF (1957). Phototropic auxin redistribution in corn coleoptiles. *Science* **126**, 210-212. DOI: 10.1126/science.126.3266.210.

Dharmasiri N, Dharmasiri S, Estelle M (2005). The F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 441-445. DOI: 10.1038/nature03543.

Ding Z, Galván-Ampudia CS, Demersy E, Langowski L, Kleine-Vehn J, Fan Y *et al.* (2011). Light-mediated polarization of the PIN3 auxin transporter for the phototropic response in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology* **13**, 447-452. DOI: 10.1038/ncb2208.

Dinneny JR (2015). Traversing organizational scales in plant salt-stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* **23**, 70-75. DOI: 10.1016/j.pbi.2014.10.009.

Eckstein A, Krzeszowieck W, Banas AK, Janowiak F (2016). Abscisic acid and blue light signaling pathways in chloroplast movements in *Arabidopsis* mesophyll. *Acta Biochimica Polonica* **63**, 449-458. DOI: 0.18388/abp.2016_1382.

Emenecker RJ, Strader LC (2020). Auxin-abscisic acid interactions in plant growth and development. *Biomolecules* **10**, 281. DOI: 10.3390/biom10020281.

Esmon CA, Tinsley AG, Ljung K, Sandberg G, Hearne LB, Liscum E (2006). A Gradient of auxin and auxin-dependent transcription precedes tropic growth responses. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 236-241. DOI: 10.1073/pnas.0507127103.

Fankhauser C, Christie JM (2015) Plant phototropic growth. *Current Biology* **25**, 384-389. DOI: 10.1016/j.cub.2015.03.020

Fellner M Sawhney VK (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. DOI: 10.1007/s001220051638.

Fellner M Sawhney VK (2002). The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* **214**, 675-682. DOI: 10.1007/s004250100671.

Finkelstein R (2013). Abscisic acid synthesis and response. *Arabidopsis Book* **11**, e0166. DOI: 10.1199/tab.0166.

Folta KM, Spalding EP (2001). Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *Plant Journal* **26**, 471-478. DOI: 10.1046/j.1365-313x.2001.01038.x.

Galen C, Rabenold JJ, Liscum E (2007). Functional ecology of a blue light photoreceptor: Effects of phototropin-1 on root growth enhance drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **173**, 91-99. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2006.01893.x.

Galon Y, Aloni R, Nachimias D, Snir O, Feldemesser E, Scase-Field S *et al.* (2010). Calmodulin-binding transcription activator 1 mediates auxin signaling and responds to stresses in *Arabidopsis*. *Planta* **232**, 165-178. DOI: 10.1007/s00425-010-1153-6.

Gangappa S, Botto JF (2016). The Multifaceted roles of HY5 in plant growth and development. *Plant Growth and Development* **9**, 1353-1365. DOI: 10.1016/j.molp.2016.07.002.

Haga K, Tsuchida-Mayama T, Yamada M, Sakai T (2015). *Arabidopsis* ROOT PHOTOTROPISM2 contributes to the adaptation to high-intensity light in phototropic responses. *Plant Cell* **27**, 1098-1112. DOI: 10.1105/tpc.15.00178.

Hellsberg E, Montanari F, Ecker GF (2015). The ABC of phytohormone translocation. *Planta Medica* **81**, 474-487. DOI: 10.1055/s-0035-1545880.

Hubbard K, Nishimura N, Hitomi K, Getzoff E, Schroeder J (2010). Early abscisic acid signal transduction mechanisms: Newly discovered components and newly emerging questions. *Genes & Development* **24**, 1695-1708. DOI: 10.1101/gad.1953910.

Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y (2020). Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology* **62**, 25-54. DOI: 10.1111/jipb.12899.

Chérel I, Gaillard I (2019). The Complex fine-tuning of K^+ fluxes in plants in relation to osmotic and ionic abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 715. DOI: 10.3390/ijms20030715.

Chinnusamy V, Jagendorf A, Zhu J (2005). Understanding and improving salt tolerance in plants. *Crop Science* **45**, 437-448. DOI: 10.2135/cropsci2005.0437.

Christie JM (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45. DOI: 10.1146/annurev.arplant.58.032806.103951.

Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & Cell Physiology* **56**, 401-413. DOI: 10.1093/pcp/pcu196.

Christie JM, Murphy AS (2013). Shoot phototropism in higher hlants: New light through old concepts. *American Journal of Botany* **100**, 35-46. DOI: 10.3732/ajb.1200340.

Christie JM, Suetsugu N, Sullivan S, Walda M (2018). Shining light on the function of NPH3/RPT2-like proteins in phototropin signaling. *Plant Physiology* **176**, 1015-1024. DOI: 10.1104/pp.17.00835.

Christie JM, Yang H, Richter GL, Sullivan S, Thomson CE, Lin J *et al.* (2011). Phot1 inhibition of ABCB19 primes lateral auxin fluxes in the shoot apex required for phototropism. *PLoS Biology* **9**, e1001076. DOI: 10.1371/journal.pbio.1001076.

Inoue SI, Takemiya A, Shimazaki KI (2010). Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Current Opinion in Plant Biology* **13**, 587-593. DOI: 10.1016/j.pbi.2010.09.002.

Jarošová K (2019). Regulace exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech rajčete vlivem světla a abiotických stresů. Diplomová práce, Přírodovědecká fakulta, UP v Olomouci

Jayaweera T, Siriwardana C, Dharmasiri S, Quint M, Gray W, Dharmasiri N (2014). (2014). *PLoS One* **9**, e102301. DOI: 10.1371/journal.pone.0102301.

Jeong RD, Chandra-Shekara AC, Roy Barman S, Navarre D, Kleissig DF, Kachroo A *et al*. (2010). Cryptochrome 2 and phototropin 2 regulate resistance protein-mediated viral defense by negatively regulating an E3 ubiquitin ligase. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 13538-13543. DOI: 10.1073/pnas.1004529107.

Ji H, Pardo JM, Batelli G, Van Oosten MJ, Bressan RA, Li X, (2013). The Salt overly sensitive (SOS) pathway: Established and emerging roles. *Molecular Plant* **6**, 275-286. DOI: 10.1093/mp/sst017.

Keisham M, Mukherjee S, Bhatla SC (2018). Mechanism of sodium transport in plants: Progresses and challenges. *International Journal of Molecular Sciences* **19**, 647. DOI: 10.3390/ijms19030647.

Kepinski S, Leyser O (2005). The *Arabidopsis* F-box protein TIR1 is an auxin receptor. *Nature* **435**, 446-451. DOI: 10.1038/nature03542.

Kim JY, Jang IC, Seo HS (2016). COP1 controls abiotic stress responses by modulating AtSIZ1 function through its E3 ubiquitin ligase activity. *Frontiers in Plant Science* **7**, 1182. DOI: 10.3389/fpls.2016.01182.

Kinoshita T, Hayashi Y (2011). New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane H^+-ATPase. *International Review of Cell and Molecular Biology* **289**, 89-115. DOI: 10.1016/B978-0-12-386039-2.00003-1.

Kuromori T, Seo M, Shinozaki K (2018). ABA transport and plant water stress responses. *Trends in Plant Science* **23**, 513-522. DOI: 10.1016/j.tplants.2018.04.001.

Liang W, Ma X, Wan P, Liu L (2018). Plant salt-tolerance mechanism: A Review. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **495**, 286-291. DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.11.043.

Lin XL, Niu D, Hu ZL, Kim DH, Jin YH, Cai B *et al.* (2016). An *Arabidopsis* SUMO E3 ligase, SIZ1, negatively regulates photomorphogenesis by promoting COP1 activity. *PLoS Genetics* **12**, e1006016. DOI: 10.1371/journal.pgen.1006016.

Liscum E, Askinosie SK, Leuchtman DL, Morrow J, Willenburg KT, Coats DR (2014) Phototropism: Growing towards an understanding of plant movement. *Plant Cell* **26**, 38-55. DOI: 10.1105/tpc.113.119727.

Lu C, Chen MX, Liu R, Zhang L, Hou X, Liu S *et al.* (2019). Abscisic acid regulates auxin distribution to mediate maize lateral root development under salt stress. *Frontiers in Plant Science* **10**, 716. DOI: 10.3389/fpls.2019.00716.

Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E (2009). Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science* **324**, 1064-1068. DOI: 10.1126/science.1172408.

Mao J, Zhang YC, Sang Y, Li QH, Yang HQ (2005). From the cover: A Role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 12270-12275. DOI: 10.1073/pnas.0501011102.

Miura K, Nozawa R (2014). Overexpression of SIZ1 enhances tolerance to cold and salt stresses and attenuates response to abscisic acid in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* **31**, 167-172. DOI: 10.5511/plantbiotechnology.14.0109a.

Mukherjee S, David A, Yadav S, Baluška F, Bhatla SC (2014). Salt stress-induced seedling growth Inhibition coincides with differential distribution of serotonin and melatonin in sunflower seedling roots and cotyledons. *Physiologia Plantarum* **152**, 714-728. DOI: 10.1111/ppl.12218.

Murashige T, Skoog F (1962). A Revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473-497. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x.

Nakasone Y, Kawaguchi Y, Kong SG, Wada M, Terazima M (2014). Photoinduced oligomerization of *Arabidopsis thaliana* phototropin 2 LOV1. *Journal of Physical Chemistry* **118**, 14314-14325. DOI: 10.1021/jp509448b.

Naser V, Shani E (2016). Auxin response under osmotic stress. *Plant Molecular Biology* **91**, 661-672. DOI: 10.1007/s11103-016-0476-5.

Okajima K, Aihara Y, Takayama Y, Nakajima M, Kahojiya S, Hikima T *et al.* (2014). Light-induced conformational changes of LOV1 (light oxygen voltage-sensing domain 1) and LOV2 relative to the kinase domain and regulation of kinase activity in *Chlamydomonas* phototropin. *Journal of Biological Chemistry* **289**, 413-422. DOI: 10.1074/jbc.M113.515403.

Park HJ, Kim WY, Yun DJ (2016). A New insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and Cells* **39**, 447-459. DOI: 10.14348/molcells.2016.0083.

Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen D, Fujii H, Zhao Y *et al.* (2009). Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science* **324**, 1068-1071. DOI: 10.1126/science.1173041.

Parks BM, Cho MH, Spalding EP (1998). Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology* **118**, 609-615. DOI: 10.1104/pp.118.2.609

Planes MD, Niňoles R, Rubio L, Bissoli G, Bueso E, García-Sanchez MJ *et al.* (2015). A mechanism of growth inhibition by abscisic acid in germinating seeds of *Arabidopsis thaliana* based on inhibition of plasma membrane H^+-ATPase and decreased cytosolic pH, K^+, and anions. *Journal of Experimental Botany* **66**, 813-825. DOI: 10.1093/jxb/eru442.

Powers SK, Strader LC (2016). Up in the air: Untethered factors of auxin response. *F1000Research* **5**, F1000. DOI: 10.12688/f1000research.7492.1.

Rayle DL, Cleland R (1977). Control of plant cell enlargement by hydrogen ions. *Current Topics in Developmental Biology* **11**, 187-214. DOI: 10.1016/s0070-2153(08)60746-2.

Rowe JH, Topping JF, Liu J, Lindsey K (2016). Abscisic acid regulates root growth under osmotic stress conditions via an interacting hormonal network with cytokinin, ethylene and auxin. *New Phytologist* **211**, 225-239. DOI: 10.1111/nph.13882.

Roychoudhury A, Paul A (2012). Abscisic acid-inducible genes during salinity and drought stress. Berhardt LV (Ed.), *Advances in Medicine and Biology* **52**, 1-78. Nova Science Publishers. ISBN 978-1-62081-314-0.

Sah SK, Reddy KR, Li J (2016). Abscisic acid and abiotic stress tolerance in crop plants. *Frontiers in Plant Science* **7**, 571. DOI: 10.3389/fpls.2016.00571.

Sakai T, Haga K (2012). Molecular genetic analysis of phototropism in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **53**, 1517-1534. DOI: 10.1093/pcp/pcs111.

Stone BB, Stowe-Evans EL, Harper RM, Celaya B, Ljung K, Liscum E *et al.* (2008). Disruptions in AUX1-dependent auxin influx alter hypocotyl phototropism in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* **1**, 129-144. DOI: 10.1093/mp/ssm013.

Strader LC, Zhao Y (2016). Auxin perception and downstream events. *Current Opinion in Plant Biology* **33**, 8-14. DOI: 10.1016/j.pbi.2016.04.004.

Sullivan S, Takemiya A, Kharshing E, Cloix C, Shimazaki KI, Christie JM (2016). Functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1 in the hypocotyl apex. *Plant Journal* **88**, 907-920. DOI: 10.1111/tpj.13313.

Sullivan, S, Kaiserli E, Tseng TS, Christie JM (2010). Subcellular localization and turnover of *Arabidopsis* phototropin 1. *Plant Signaling & Behavior* **5**, 184-186. DOI: 10.4161/psb.5.2.11082.

Swarup R, Bhosale R (2019). Developmental roles of AUX1/LAX auxin influx carriers in plants. *Frontiers in Plant Science* **10**, 1306. DOI: 10.3389/fpls.2019.01306.

UniProtKB - O48963 (PHOT1_ARATH) (vydáno 15. 11. 2002). *UniProt* [online]. The UniProt Consortium, 2002 [cit. 2020-04-14]. https://www.uniprot.org/uniprot/O48963

Van Den Berg T, Korver R, Testerink C, Ten Tusscher KHWJ (2016). Modeling halotropism: A Key role for root tip architecture and reflux loop remodeling in redistributing auxin. *Development* **143**, 3350-3362. DOI: 10.1242/dev.135111.

Verma V, Ravindran P, Kumar PP (2016). Plant hormone-mediated regulation of stress responses. *BMC Plant Biology* **16**, 86. DOI: 10.1186/s12870-016-0771-y.

Vishwakarma K, Mishra M, Patil G, Mulkey S, Ramawat N, Singh VP *et al.* (2019). Avenues of the membrane transport system in adaptation of plants to abiotic stresses. *Critical Reviews in Biotechnology* **39**, 861-883. DOI: 10.1080/07388551.2019.1616669.

Wang C, Zhang LJ, Huang RD (2011). Cytoskeleton and plant salt stress tolerance. Plant Signaling & Behavior **6**, 29-31. DOI: 10.4161/psb.6.1.14202.

Whippo CW, Hangarter RP (2005). A Brassinosteroid-hypersensitive mutant of BAK1 indicates that a convergence of photomorphogenic and hormonal signaling modulates phototropism. *Plant Physiology* **139**, 448-457. DOI: 10.1104/pp.105.064444.

Whippo CW, Hangarter RP (2006). Phototropism: Bending towards enlightenment. *Plant Cell*. **18**, 1110-1119. DOI: 10.1105/tpc.105.039669.

Xu D, Li J, Gangappa S, Hettiarachi C, Lin F, Andersson MX *et al*. (2014). Convergence of light and ABA signaling on the *ABI5* promoter. *PLoS Genetics* **10**, e1004197. DOI: 10.1371/journal.pgen.1004197.

Yang B, Song Z, Li C, Jiang J, Zhou Y, Wang R *et al.* (2018). RSM1, an *Arabidopsis* MYB protein, interacts with HY5/HYH to modulate seed germination and seedling development in response to abscisic acid and salinity. *PLoS Genetics* **14**, e1007839. DOI: 10.1371/journal.pgen.1007839.

Yang W, Zhang W, Wang X (2017). Post-translational control of ABA signalling: The Roles of protein phosphorylation and ubiquitination. *Plant Biotechnology Journal* **15**, 4-14. DOI: 10.1111/pbi.12652.

Yang Y, Guo Y (2018). Elucidating the molecular mechanism mediating plant salt-stress responses. *New Phytologist* **217**, 523-539. DOI: 10.1111/nph.14920.

Yu Y, Assmann SM (2016). The effect of NaCl on stomatal opening in *Arabidopsis* wild type and *agb1* heterotrimeric G-protein mutant plants. *Plant Signaling & Behavior* **11**, e1085275. DOI: 10.1080/15592324.2015.1085275.

Zhao X, Wang YL, Qiao XR, Wang J, Wang LD, Xu CS *et al.* (2013). Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiology* **162**, 1539-1551. DOI: 10.1104/pp.113.216556.

Zhao X, Zhao Q, Xu Ch, Wang J, Zhu J, Shang B, Zhang X (2018). Phot2-regulated relocation of NPH3 mediates phototropic response to high-intensity blue light in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Integrative Plant Biology* **60**, 562-577. DOI: 10.1111/jipb.12639.

Zhu J, Geisler M (2015). Keeping it all together: Auxin–actin crosstalk in plant development. *Journal of Experimental Botany* **66**, 4983-4998. DOI: 10.1093/jxb/erv308.

8 Seznam použitých symbolů a zkratek

ABA	kyselina abscisová
ABCB	*ATP-Binding Cassete subfamily B*
ABCG	*ATP-Binding Cassete subfamily G*
ABI	*ABA-Insensitive*
ABP1	*Auxin Binding Protein1*
AK	aminokyselina
AKT	draselný kanál ATK
AREV/ABF	*ABA-Reponsive Element Binding Factor*
ARF	*Auxin-Response Factors*
ARF-GEF	*ADP Ribosylation Factor - Guanine-nucleotide Exchange Factor*
AUX/IAA	*Auxin/Indole-3-Acetic* acid *Inducible*
AUX1/LAX	*AUX1/LIKE AUX*
AUxRE	*Auxin-Reponse Elements*
BL	*blue light* – modré světlo
bZIP	*Basic Leucine Zipper (bZIP)*
CaM	kalmodulin
CAMTA1	*Calmodulin Binding Transcription Activator1*
CAX	tonoplastický Ca^{2+}/H^{+} antiporter
COP1	*Constitutive Photomorphogenic1*
CRL3	*CUL3 Ring R3 ubiquitin ligase3*
CRY	kryptochrom
CUL3	*Cullin3a*
D	*dark* - tma
D6PK	*D6-Protein Kinase*
DTX50	*Detoxification Efflux Carrier50)*
ER	endoplazmatické retikulum
EXPA	Expansiny
FLU	fluridon
FMN	flavinmononukleotid
HKT	*Hight Affinity Potassium Transporter*
HY5	*Elongated Hypocotyl5*
IBR5	*Indole-3-Butyric* acid *Response5*
IP3	Inositol-1,4,5-trifosfát
KAT1	draselný kanál KAT1
LEA	*Late Embryogenesis Abundant*
LOV	*light oxygen voltage*
MAPK	*Mitogen Activated Protein Kinase*
MF	mikrofilamenta
MS médium	*Murashige a Skoog médium*
MT	mikrotubuly
NHX	tonoplastický Na^{+}/H^{+} antiporter
NPH3	*non-phototropic hypocotyl3*
NRL	*non-phototropic hypocotyl3/root phototropism2-like*
NRT	*Nitrate Tranporter*
P	fosfát
PA	fosfatidová kyselina

phot	fototropin
PHY	fytochrom
PID	*PINOID kinasa*
PIN	*PIN-formed*
PKD	proteinová ser/thr kinasa fototropinu
PKS	*phytochrome kinase substrate*
PLD	fosfolipasa D
PM	plazmatická membrána
PP2C	*Protein Phosphatase2C*
PYL	*PYR/PYL/RCAR = Pyrabactin Reistance/Pyrabactin1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor*
RL	*red light* - červené světlo
ROS	*Reactive Oxygen Species*
RPT2	*root phototropism2*
SAUR	*Small Auxin Up RNA*
SCaBP8	*SOS3-like Calcium Binding Protein8*
SCF	*Skp1-Cullin-F-box*
SIZ1	*SAP and mIZ-finger domain1*
SKP2A	*S-Phae Kinae Associated Protein2A*
SLAC1	*S-type Anion Channel1*
SnRK2	*Sucrose Nonfermenting1-Related Protein Kinase2*
SOS	*Salt Overlay Sensitive*
TIR1/AFB	*Transport Inhibitor Resistant1/Auxin binding F-Box*
TSI	*Tropic Stimulus-Induced geny*
U	ubiquitin
WT	*wild type* – kontrolní genotyp
YUC	YUCCA geny biosyntézy auxinu