

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2017

Monika Hladíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Receptory modrého světla a jejich úloha v citlivosti rostlin k zasolení

Bakalářská práce

Monika Hladíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2017

Vedoucí práce: Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne

.....
Monika Hladíková

Souhrn

Předkládaná bakalářská práce je věnovaná studiu reakcí klíčení semen Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) k zasolení chloridem sodným (NaCl), v závislosti na různé kvalitě světla. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou receptory modrého světla, CRY1, CRY2 a ZTL-1 zapojeny v regulaci reakcí rostlin k zasolení.

Teoretická část je zaměřena na zpracování literární rešerše související s daným tématem. Jednotlivé kapitoly jsou věnované následující problematice: klíčení, fotomorfogeneze a fotoreceptory, vliv abiotického stresu na rostlinu a vliv světla na abiotický stres.

Ke zjištění zapojení receptorů modrého světla v reakci rostlin k zasolení v podmínkách *in vitro* byl využit genetický přístup, jehož základem byla analýza mutantů s defekty ve fotoreceptorech: *cry1-1*, *cry2-1* a *ztl-1*, ve srovnání s příslušnými ekotypy rostliny *Arabidopsis thaliana*, ze kterých byli mutanti odvozeni, *Ler*, *Col* a *C-24*. Experimentální klíčení semen proběhlo za různých světelných podmínek (tma, modré a červené světlo) a při různých koncentracích NaCl obsažené v médiu.

Experimenty bylo zjištěno, že na světle (především modrém) ztráta funkce genů pro fotoreceptory CRY1, CRY2 a Zeitlupe způsobila nižší toleranci semen *Arabidopsis* k zasolení. Je tedy pravděpodobné, že funkční a aktivované fotoreceptory CRY1, CRY2 a ZTL1 tedy zvyšují toleranci semen *Arabidopsis* k zasolení. Na základě získaných výsledků byly navrženy mechanismy, jakými světlo prostřednictvím fotoreceptorů CRY1 a CRY2 mohou ovlivnit schopnost rostlin tolerovat zasolení:

1. Aktivované receptory mohou blokovat COP1 protein, a tím uvolnit expresi transkripčních faktorů, např. i těch, které regulují expresi genů pro protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.
2. Aktivovaný fotoreceptor CRY2 v jádře může iniciovat či pozitivně regulovat expresi genů kódujících protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.
3. Aktivovaný fotoreceptor CRY1 v cytoplazmě může aktivovat (prostřednictvím jiných proteinů) protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.

Výsledky bakalářské práce potvrdily existenci interakce mezi signálními drahami světla a abiotických stresů a poskytují odrazový můstek pro experimenty na molekulární úrovni.

Summary

Submitted bachelor thesis is dedicated to the study of responses of germination of *Arabidopsis thaliana* seeds to salinity caused by sodium chloride (NaCl) as functions of various light conditions. The aim of the bachelor thesis was to find out, whether blue-light receptors CRY1, CRY2 and ZTL1 are involved in regulation of plant responses to salinity stress.

The theoretical part is devoted to the writing of literature review related to the given topic. The individual chapters are devoted to the following problems: germination, photomorphogenesis and photoreceptors, the effect of abiotic stress on plants and the effect of light on abiotic stress.

To find out the connection between blue-light receptors and plant responses to salinity stress, the genetic approach was applied which was based on the analysis of mutants with defects in photoreceptors: *cry1-1*, *cry2-1* and *ztl-1*, compared to appropriate ecotypes *Ler*, *Col* and *C-24*, from which the mutants were derived. Experimental seed germination took place under different light conditions (dark, blue light and red light) and under different concentrations of NaCl supplemented to the medium.

The experiments revealed that on light (especially blue) loss of function of genes coding photoreceptors CRY1, CRY2 and Zeitelupe caused lower tolerance of *Arabidopsis* seeds to salt stress. Therefore, it is possible that functional and activated photoreceptors CRY1, CRY2 and ZTL-1 increase tolerance of *Arabidopsis* seeds to salinity stress. From the acquired results, mechanisms by which light through photoreceptors CRY1 and CRY2 can influence the ability of plant to tolerate salinity were proposed:

1. Activated receptors can block COP1 protein, and thus to release expression of transcription factors, for example those regulating expression of genes coding proton pump and Na⁺/H⁺ antiporters.
2. Activated photoreceptor CRY2 located in nucleus can initiate or positively regulate expression of genes coding proton pump and Na⁺/H⁺ antiporters.
3. Activated photoreceptor CRY1 located in cytoplasm can activate (via other proteins) proton pump and Na⁺/H⁺ antiporters.

Results obtained in the bachelor thesis confirmed the existence of cross-talk between light and abiotic stress signalling and provide a basis for experiment on a molecular level.

Děkuji prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, čas, trpělivost a ochotu, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce věnoval.

Obsah

1. Úvod.....	8
2. Současný stav řešené problematiky	9
2.1. Klíčení.....	9
2.2. Fotomorfogeneze a fotoreceptory	11
2.2.1. Fytochromy.....	12
2.2.2. Receptory modrého světla	13
2.2.3. Vliv světla na klíčení	15
2.3. Vliv abiotického stresu na rostliny	16
2.3.1. Vliv zasolení na rostliny	16
2.4. Vliv světla na stres	18
3. Cíl práce	19
4. Materiál a metodika	20
5. Výsledky	23
5.1. Klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotypu <i>Ler</i> a mutanta <i>cry1-1</i> na médiu s různou koncentrací NaCl a za různých světelných podmínek	23
5.2. Klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotypu <i>Col</i> a mutanta <i>cry2-1</i> na médiu s různou koncentrací NaCl a za různých světelných podmínek	27
5.3. Klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i> ekotypu <i>C-24</i> a mutanta <i>ztl-1</i> na médiu	30
6. Diskuze	34
7. Závěr.....	37
8. Literatura.....	38
9. Seznam použitých zkratk.....	44

1. Úvod

Rostliny jsou nenahraditelnou součástí biosystému, tvoří důležitou složku potravy a jsou to organismy vytvářející kyslík. Proto je potřeba je studovat a neustále objevovat nové věci související s jejich existencí. Jedním z nejvýznamnějších faktorů rostlinného života je světlo. Nejen že zprostředkovává fotosyntézu, ale hraje i důležitou roli informační tým, že analyzuje prostředí pomocí různé kvality dopadajícího světla, jeho intenzity a také interakcí s dalšími faktory prostředí. Rostlina vnímá světlo pomocí speciálních receptorů, fotoreceptorů. Mezi základní rostlinné fotoreceptory fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Jedná se o receptory červeného a modrého světla, protože tyto části spektra patří k jedněm z nejdůležitějších, které rostlina využívá. Dalším důležitým nástrojem rostliny pro přežití je účinná reakce na stres, jelikož se s ním setkávají denně. Mezi stresové faktory patří nepřítomnost kyslíku, zasolení, příliš vysoká či nízká teplota, sucho atd. Stresové faktory se mohou vzájemně ovlivňovat, byl např. potvrzen i vliv modrého světla na zasolení ad.

Předmětem této bakalářské práce bylo zjistit, jak jsou zapojeny fotoreceptory modrého světla, CRY-1, CRY-2 a ZTL-1, v regulaci reakcí rostlin k zasolení. K tomu byl použit genetický přístup, jehož podstatou byla analýza mutantů s defekty ve fotoreceptorech světla: *cry1-1*, *cry2-1* a *ztl-1*. Ke srovnání s těmito mutanty byly použity odpovídající ekotypy, *Ler*, *Col* a *C-24*. Bylo pozorováno klíčení mutovaných a nemutovaných semen rostliny *Arabidopsis thaliana*, které bylo ovlivněno kvalitou světla a různými koncentracemi NaCl v médiu v podmínkách *in vitro*.

Bakalářská práce byla vypracovaná v Laboratoři růstových regulátorů v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky, konkrétně ve Skupině molekulární fyziologie.

2. Současný stav řešené problematiky

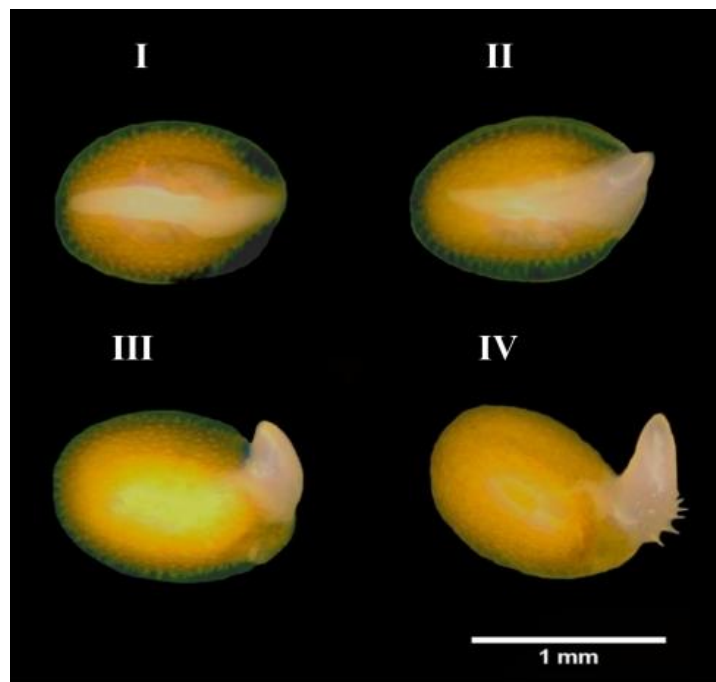
2.1. Klíčení

Klíčení semen je jednou z nejdůležitějších fází vývoje rostliny. Semena jsou mnohobuněčné útvary, které vznikají na mateřské rostlině zpravidla po oplození vajíčka. Zpočátku se semeno vyvíjí v hydratovaném stavu, ale postupně ztrácí vodu během zrání. V suchém stavu je semeno schopno přežít delší dobu, obvykle celé roky, aby se bránilo momentálním nepříznivým podmínkám. Pokud se podmínky zlepší, semeno přijme vodu a vyklíčí. Je nutné, aby klíčení semene proběhlo co nejrychleji za potřebných podmínek, aby se klíčící rostlinky bránily nadbytečnému stresu. Mezi nejčastější stresové faktory rostlin patří nedostatek vody nebo kyslíku, napadení patogeny nebo vystavení se vysokému obsahu solí.

Klíčení je zahájeno příjmem vody suchými semeny. Tento proces je znám jako imbibice. Jedná se o fyzikální proces, který probíhá u živých i mrtvých semen. Některá semena přechází do klidového stavu, tzv. dormance. Dormantní semena jsou taková semena, která jsou životaschopná, avšak nejsou schopna vyklíčit ani za příhodných podmínek. Tato semena vyžadují dodatečné podněty pro zahájení a udržení následujícího růstu. Příjem vody semenem se uskutečňuje ve třech fázích (Bewley, 1997). V 1. fázi nastává rychlý počáteční příjem vody, který může způsobit dočasné strukturální přestavby zejména na membránách. 2. fáze je známa jako stabilizující fáze. Poslední fáze probíhá po dokončení klíčení, kdy dochází opět ke zrychlenému příjmu vody. Prvním viditelným znakem, že klíčení je úplné, je průnik kořínku (radikuly) obalujícími strukturami, testou a endospermem (Obr. 1). Tento proces je následován mobilizací zásobních látek na podporu růstu sazenic a jejich dalšího vývoje (Hepher and Roberts, 1985; Petruzzelli, 2003).

Klíčení je souhrnný proces, který je usměrňován jak endogenními podněty, tak i exogenními. Mezi endogenní podněty patří vliv fytohormonů, hlavně kyseliny abscisové (ABA) a giberelinů (GA). Tyto rostlinné hormony působí jako antagonisté a hrají roli v regulaci dormance. Bylo prokázáno, že účinkem ABA jsou semena udržována ve stavu dormance. Naopak účinkem GA dochází k přerušování dormance a následné stimulaci klíčení (Bewley, 1997; Leubner-Metzger, 1995; Petruzzelli, 2003; Peng and Harberd, 2002).

Jedním z nejvýznamnějších exogenních faktorů klíčení je světlo. Světlo určité vlnové délky, intenzity nebo doby trvání může působit jako účinný stimul pro klíčení, např. krátké pulsy červeného nebo modrého světla mohou spouštět klíčení, stejně jako dlouhé periody světla a další. Semena se v závislosti na světle dělí na fotoblastická a nefotoblastická. Fotoblastická semena jsou taková, která vyžadují světlo a patří mezi ně např. *Arabidopsis thaliana*. Nefotoblastická semena se vyznačují tím, že jsou schopné vyklíčit po rehydrataci i ve tmě, což umožňuje P_{FR} forma fytochromů, které se nachází v semenech. Mezi nefotoblastické rostliny patří např. *Solanum lycopersicum* L. (Georghiou and Kendrick, 1991).

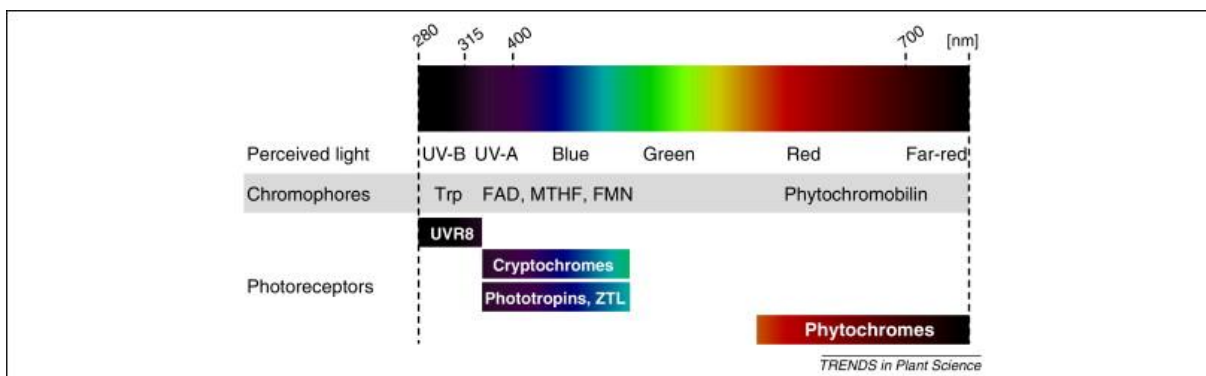


Obr. 1. Semen rostliny *Arabidopsis thaliana* v různých vývojových stádiích (převzato z Maia et al., 2011).

2.2. Fotomorfogeneze a fotoreceptory

Světlo je základním zdrojem energie pro většinu života na Zemi. Rostliny a další fotoautotrofní organismy zachycují světelnou energii v procesu fotosyntézy. Světlo má však mnohem více úloh v rostlinném životě. Světlo mj. informuje rostlinu o stavu okolního prostředí skrz svoji kvalitu (bilance fotonů různých vlnových délek), intenzitu a interakci s okolními faktory. Rostliny jsou citlivé na sezónní, denní i krátkodobé kolísání světelného záření. Světlo má až dramatický efekt na růst a vývoj rostliny. Pokud probíhá růst rostliny ve tmě, tyto rostliny se nazývají etiolované a proces růstu se označuje jako skotomorfogeneze. Pro etiolované rostliny je typický bledý, neobvykle dlouhý vzhled (Taiz and Zieger, 2015). Pokud probíhá růst rostliny na světle, jedná se o fotomorfogenezi. Jedná se tedy o vývojovou odezvu organismu na světelnou informaci, což může být jeho kvantita, kvalita, směr nebo relativní délka dne a noci (fotoperioda). Různé organismy jsou schopné reagovat na světlo různých vlnových délek. Pro rostliny je nejvýznamnější část elektromagnetického spektra ta, která je v rozsahu od 380 nm (fialové světlo) do 760 nm (FR). Tento rozsah vlnových délek je znám jako viditelné světlo (Galvão and Fankhauser, 2015). V současné době však známe i některé receptory pro UV-B záření (290-320 nm), pro které byl identifikován receptor UVR8, jehož funkce je stále předmětem výzkumu (Carvalho, 2011).

Aby organismy reagovaly na světlo, musí mít fotoreceptory. Jedná se o molekuly, které absorbují světlo a spustí kaskádu dějů vedoucích k biologické odpovědi. Každý fotoreceptor má charakteristické absorpční spektrum. Z různých pigmentů, které mohou vyvolat odezvy, jsou nejdůležitější ty, které absorbují modré a červené světlo (Obr. 2). Tyto receptory se řadí do 3 fotosenzorických rodin: fototropiny, kryptochromy a fytochromy. Výzkumy naznačují, že fytochromy působí transkripčně tím, že zaměřují světelné signály přímo na fotoresponzivní promotory prostřednictvím vazby na transkripční regulátor. Naproti tomu se zdá, že kryptochromy působí post-translačně, a to narušením degradace klíčového transkripčního aktivátoru, která je zprostředkována proteasomem, přímou vazbou na E3 ubiquitin ligázu, čímž se zvýší hladina aktivátoru, z čehož plyne vyšší exprese cílového genu (Quail, 2002).



Obr. 2. Základní typy fotoreceptorů, oblast vlnových délek, které absorbují a chromofory, které obsahují. Převzato z Heijde and Ulm, 2012.

2.2.1. Fytochromy

Fytochromy jsou fotoreceptory, které mají absorpční maximum v červené oblasti světla (600-750 nm). Fytochromy existují ve dvou fotoreversibilních formách. Forma P_R absorbuje červené světlo (vlnová délka kolem 660 nm) a je převáděna na formu P_{FR} , která se vrací zpět do formy P_R po působení FR (okolo 730 nm). Fytochromy mají fotoreaktivní prostetickou skupinu (fytochromobilin), která přechází mezi dvěma molekulárními formami v reakci na RL nebo FR. Aktivní fytochromy jsou dimery. Fotokonverze na P_{FR} formu učiní protein přístupný fytochrom-interagujícím faktorům, fosforylaci a proteolytickým enzymům, a zahájí proces fotomorfogeneze. Důsledkem rozdílné proteinové konformace fytochromů, je poločas rozpadu P_R formy okolo týdne a P_{FR} formy 1 – 2 hodiny (Clough and Viestra, 1997; Chen and Chory, 2011).

Navzdory tomu, že fytochromy jsou receptory absorbující v oblasti červeného světla, jsou také schopny absorbovat v oblasti světla modrého (400-500 nm). Této absorpce jsou schopné obě formy fytochromů. Absorbce modrého světla zapříčiňuje přechody fytochromů mezi jejich fotoreverzibilními formami obdobně jako při absorpci červeného světla. K vnímání modrého světla přispívají dva z pěti fytochromů: PhyA a PhyB (Taiz and Zieger, 2015, Neff and Chory, 1998; Poppe et al. 1998).

Fytochromy absorbující RL/FR hrají zásadní roli ve fotopercepci světelného prostředí a následné adaptaci rostlinného růstu a vývoje. Vyšší rostliny mají více druhů fytochromů, jejichž apoproteiny jsou produktem rodiny divergentních (*PHY*) genů. Fotoblastická *Arabidopsis thaliana* má pět *PHY* genů kódujících apoproteiny fytochromů A-E, z nichž nejčastěji se vyskytuje *PHYB*. U nefotoblastické *Solanum lycopersicum* L. bylo zatím poznáno také pět genů kódujících apoproteiny fytochromů: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* (Pratt, 1995; Pratt, 1997; Whitelam and Devlin, 1997).

2.2.2. Receptory modrého světla

Modré světlo (320-500 nm) způsobuje širokou škálu fotomorfogenních reakcí, mezi něž patří založení fototropismus, regulace cirkadiálních hodin, regulace genové exprese, inhibici růstu nebo např. stimulaci růstu listů a regulaci kvetení. Několik různých tříd fotoreceptorů na bázi flavinu, které zprostředkovávají účinky modrého světla, bylo identifikováno v genetickém modelu *Arabidopsis thaliana*. Jedná se o kryptochromy, fototropiny a členy rodiny Zeitlupe (Christie et al., 2015; Jones et al., 2013; Lin, 2002).

2.2.2.1. Kryptochromy

Kryptochromy jsou receptory modrého světla, které zprostředkovávají různé odezvy na světlo. Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje tři geny kódující kryptochromy, které jsou označovány jako *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*, který patří do třídy CRY-DASH superrodiny fotolyáza/kryptochrom. Geny *CRY1* a *CRY2* jsou navzájem homologní a jsou zodpovědné za regulaci různých reakcí modrého světla včetně růstu hypokotylu, řízení cirkadiálních hodin či doby kvetení. O funkci genu *CRY3* se toho dodnes příliš neví. Geny *CRY* kódují proteiny o velikosti 70 – 80 kDa, které ve své aktivní formě tvoří dimery (Facella et al., 2006; Lin, 2000).

Kryptochromy obsahují dva chromoforní kofaktory: flavinadenindinukleotid (FAD) a methenyltetrahydrofolát (MTHF, pterin). Molekula kryptochromu obsahuje dvě domény. Jedná se o N-koncovou PHR (photolyase-related) doménu a C-koncovou doménu DAS (*DQXVP-acidic-STAES*). PHR doména je tak nazývána kvůli své strukturní podobnosti s bakteriálním opravným enzymem DNA-fotolyázou. PHR doména také zprostředkovává dimerizaci, což je nezbytné pro funkci fotoreceptoru. Očekává se, že kryptochromy jsou schopné přenosu elektronů z vlastního flavinu na signální molekuly, nacházející se v jeho blízkosti, nebo na jiné části proteinové molekuly kryptochromu. Takové přenosy elektronů mohou vést ke konformačním změnám molekuly receptoru a dalším biochemickým změnám. Takové změny mohou být modifikace interakce mezi molekulou kryptochromu a signální molekulou nebo fosforylace molekuly kryptochromu, která byla již prokázána u *Arabidopsis thaliana* v závislosti na modrém světle (Liu et al., 2011; Kleine, 2003; Malhotra, 1995; Lin, 2002).

Kryptochromy *CRY1* i *CRY2* se nachází v jádře, ovšem *CRY1* se po ozáření přemísťuje do cytoplazmy, přičemž *CRY2* zůstává v jádře. Velký rozdíl mezi kryptochromy *CRY1* a *CRY2* je ten, že *CRY2* je rychle degradován na světle, zatímco *CRY1* je na světle stabilní (Yang et al., 2001; Taiz and Zieger, 2002).

Interakce kryptochromů s COP1

Díky umístění obou kryptochromů je možná interakce s proteinem COP1, který působí jako negativní regulátor fotomorfogeneze, a tím je ovlivněna ubiquitinace substrátových proteinů. COP1 (COnstitutively Photomorphogenic 1) tedy působí jako represor fotomorfogeneze, nejspíš ovládním degradace transkripčních faktorů a exprese jejich cílového genu. Bylo zjištěno, že většina světlem řízené genomové exprese souvisí s negativní regulací aktivity COP1. Semena transgenních rostlin *Arabidopsis* rostoucích ve tmě, které exprimují C-koncové domény kryptochromu, vykazují rysy, které jsou spojovány pouze se semeny pěstovanými na světle, což naznačuje, že signalizační mechanismus CRY je zprostředkován pomocí C-koncové domény. Vlastnosti zprostředkované touto doménou jsou pozoruhodně podobné constitutive photomorphogenic (*cop1*) mutantům. Bylo tedy potvrzeno, že kryptochrom CRY1 a jeho C-koncová doména silně interagují s proteinem COP1. Byla pozorována také interakce mezi fytochromem B a COP1 (Yang et al., 2001; Ma et al., 2002).

2.2.2.2. Fototropiny

Jak jméno naznačuje, fototropiny byly objeveny prostřednictvím studia fototropismů. Fototropiny jsou fotoreceptory modrého světla, které řídí pohyb chloroplastů, fotoperiodu, otvírání průduchů atd. U *Arabidopsis thaliana* se vyskytují dva členy rodiny fototropinů, a to Phot1 a Phot2, které obdobně jako kryptochromy CRY1 a CRY 2 si jsou sekvenčně podobné. Fototropiny mají také domény: jednu STK (serin/threonin kinázovou) doménu, která se nachází na C-koncové oblasti a dvě LOV (*Light/Oxygen/Voltage*) domény, která se nachází na N-koncové oblasti a následně je na ni vázán chromofor flavinmononukleotid (FMN). Fototropiny jsou umístěny v cytoplazmatické membráně a po ozáření BL se přesouvají do cytoplazmy (Christie, 2007; Briggs and Christie, 2002; Christie et al., 1999; Kong et al., 2006; Sakamoto and Briggs, 2002).

2.2.2.3. Fotoreceptory rodiny Zeitlupe

Fotoreceptory rodiny Zeitlupe jsou skupina receptorů modrého světla. Jsou příbuzné fototropinům, ale v určitých věcech se odlišují. Jako u fototropinů i Zeitlupe proteiny mají fotoaktivní LOV doménu, na kterou se váže FMN. Nicméně, obsahují navíc F-box, což je strukturální motiv zhruba 50 aminokyselin, které usnadňují protein-proteinovou interakci. Proteiny F-boxu jsou komponenty některých E3 ubiquitin ligáz. E3 ligázy s F-boxem mají spojitost s určitým spektrem buněčných funkcí např. signální transdukce, hormonální účinky a regulace buněčného cyklu. Fyziologická funkce receptorů rodiny Zeitlupe zahrnuje cílenou

proteolýzu komponent, spojovanými s kontrolou doby kvetení, a činnost cirkadiálních hodin. U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány tři geny typu zeitlupe: *ZTL*, *FKF1* a *LKP2*. Mutanti *ztl* vykazovali poruchu v úloze cirkadiálních hodin (Jones et al., 2013; Taiz and Zieger, 2015).

2.2.3. Vliv světla na klíčení

Klíčení semen se řídí několika faktory okolí, jako je dostatečné množství kyslíku, vlhkost, teplota, živiny a především světlo, které je kritickým faktorem klíčení hlavně u malých semenných rostlin, např. *Arabidopsis thaliana* či *Lactuca sativa L.* Fytochromy hrají hlavní roli ve vnímání světla u semen, protože ta jsou díky nim schopna přijímat informace o okolním prostředí, mj. v jaké hloubce se nachází apod. Fyziologické studie již delší dobu zabývaly účastí GA a ABA v klíčivosti zprostředkované fytochromy. Klíčení může být ovlivněno také modrým světlem. To může způsobovat inhibici klíčení např. u *Solanum lycopersicum L* (Piterková et al., 2012). A může nastat i situace, při které se na modrém světle zvýší inhibice klíčení v závislosti na osmotickém stresu. Světlo ovlivňuje klíčení nejen svou kvalitou, ale také různou intenzitou. (Seo et al., 2009; Zhou et al., 2009; Georghiou and Kendrick, 1991; Fellner and Sawhney, 2002).

2.3. Vliv abiotického stresu na rostliny

Setkání se s abiotickým stresem je pro rostliny běžné a jedná o zásadní způsob, pomocí něhož jsou zjišťovány informace o stavu okolního prostředí. Biologické odezvy závisí na náročnosti a době působení stresu, stádiu vývoje, typu tkání a na interakci mezi ostatními druhy stresu. Vystavení se stresu typicky podněcuje změny v genové expresi a metabolismu. Reakce vedou k lokálním nebo systematickým modifikacím ve fyziologické stavbě, vývoji nebo buněčném cyklu (Jones et al, 2013).

2.3.1. Vliv zasolení na rostliny

Je přirozené, že vyšší rostliny se s vyššími koncentracemi solí setkávají v blízkosti pobřeží a v ústí řek, kde se mísí mořská voda se sladkou. Dál ve vnitrozemí, přirozené prosakování solí může způsobit to, že se rostliny poté stanou nepoužitelné pro zemědělství. Nicméně, daleko rozsáhlejší problém který v zemědělství nastává, je akumulace solí ze zavlažovacích vod. Pomocí vypařování a transpirace se vylučuje čistá voda z půdy a tato ztráta vody podněcuje koncentrování rozpuštěných látek v půdě. Pokud voda obsahuje vyšší koncentrace rozpuštěných látek a nemá možnost vyloučit nashromážděné soli, tak soli mohou rychle dosáhnout takové koncentrace, která bude pro rostlinu škodlivá.

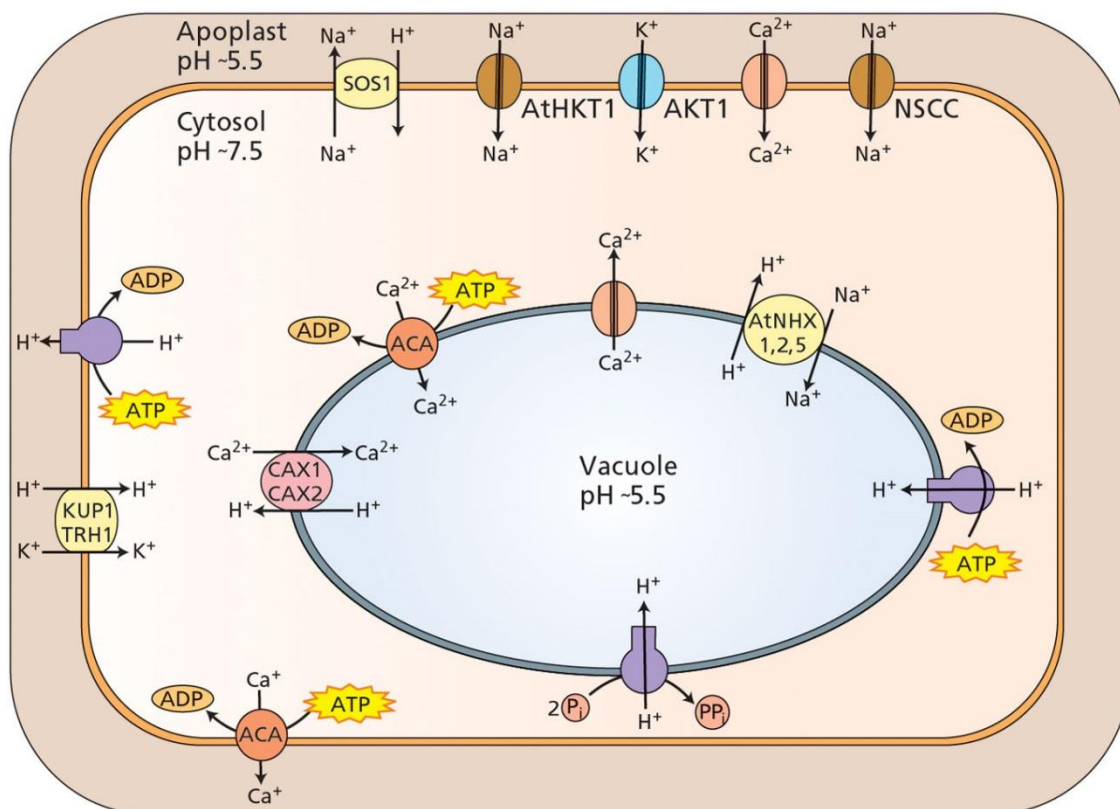
Zvláštní je fakt, že většina rostlin může provést úpravy osmózy, pokud vyrůstají na solné půdě. Takové úpravy zahrnují ztrátu turgoru, což zpomaluje buněčný růst, přičemž je vytvářen nižší vodní potenciál. Při reakcích rostlin na nízký vodní potenciál také dochází k toxickým efektům určitých iontů, pokud je škodlivá koncentrace iontů, především Na^+ , Cl^- a SO_4^{2-} , nashromážděna v buňce. Abnormálně vysoký poměr Na^+ ku K^+ a vysoká koncentrace celkových solí inaktivuje enzymy a inhibuje syntézu proteinů. Při vysoké koncentraci, Na^+ je schopen přesunout Ca^{2+} z plazmatické membrány do kořenových vlásků, což způsobí změnu permeability plazmatické membrány, která je detekována jako únik K^+ z buněk (Taiz and Zieger, 2002; Bressan et al., 1990; Cramer et al., 1985).

NaCl je nejhojnější sůl, která způsobuje stres ze zasolení. Transportní systémy, které usnadňují kompartmentaci Na^+ do vakuoly, jsou rozhodující. Ca^{2+} i K^+ působí na intracelulární koncentraci Na^+ . Při vysoké koncentraci Na^+ , příjem K^+ vysokoafinitním K^+ - Na^+ transportérem, HKT1, je inhibován a transportér funguje jako Na^+ přijímací systém. Na druhé straně Ca^{2+} vylepšuje K^+/Na^+ selektivitu, čímž zvyšuje toleranci k zasolení (Zhong and Lauchli, 1994; Liu and Zhu, 1997).

Pumpy v plazmatické membráně a tonoplastu poskytují hnací sílu (H^+ elektrochemický potenciál) sekundárnímu transportu iontů. Enzymy ATPázy jsou primárně

zodpovědné za vyšší rozdíl pH a gradient membránového potenciálu plasmatické membrány. Vakuolární H^+ -ATPáza vytváří rozdíl pH a membránového potenciálu tonoplastu. Aktivita těchto pump je potřebná pro sekundární transport přebytečných iontů, spojených s odezvou na stres ze zasolení. Bylo prokázáno, že aktivita těchto H^+ pump se zvýšila v závislosti na zasolení a následně indukovaná genová exprese mohla být odpovědná za tuto up-regulaci. (Hasegawa et al., 2000, Taiz and Zieger, 2002)

Energeticky závislý transport Na^+ z cytosolu buňky přes plasmatickou membránu je zprostředkován produktem genu *SOS1* (salt overly sensitive 1), jež funguje jako Na^+ - H^+ antiporter. *SOS1* antiporter je regulován genovými produkty alespoň dalších dvou genů, *SOS2* a *SOS3*. *SOS2* je serin/threonin kináza, která se aktivuje pomocí Ca^{2+} a funkcí SO_3 , což je vápníkem regulovaná proteinfosfatáza. Vakuolární kompartmentace Na^+ vychází částečně z aktivity skupiny Na^+ - H^+ antiporterů, jako např. *AtNHX1* (*Na⁺/H⁺ exchanger 1*) u *Arabidopsis* (Obr. 3). Transgenní rostliny *Arabidopsis* s over-expresí genu kódujícího *AtNHX1* vykazují zvýšenou toleranci ke stresu ze zasolení (Apse et al., 1999; Quintero et al., 2000).



PLANT PHYSIOLOGY, Third Edition, Figure 25.15 © 2002 Sinauer Associates, Inc.

Obr. 3. Membránový transport proteinů zprostředkovaný Na^+ , K^+ a Ca^{2+} transportem během stresu ze zasolení. Převzato z Taiz and Zieger, 2002.

2.4. Vliv světla na stres

Rostliny jsou ovlivněny mnoha vlivy okolního prostředí. Denně jsou vystaveny různým stresovým faktorům. Zajímavé je to, že různé stresové faktory spolu souvisí a navzájem se ovlivňují. Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů vývoje rostliny. A proto je v kombinaci s dalšími různými druhy stresu předmětem vědeckých studií. Dalším důvodem je také to, že rostlina je vystavena právě kombinovanému stresu. Různá kvalita světla (D, BL, RL, FR, WL atd.) se kombinuje se stresem ze zasolení, teplotním stresem, s různými koncentracemi fytohormonů a dalšími, případně vznikají i násobné kombinace.

Pro světlou signalizaci jsou nutné fotoreceptory, které tedy mohou vykazovat citlivost k různým druhům stresu. Kryptochromy (CRYs), což jsou receptory modrého světla, zprostředkovávají odezvy na toto světlo, a to po celý život rostliny. Funkce CRY ve fotomorfogenezi jsou již dobře prostudovány u *Arabidopsis*. Bylo však zjištěno, že CRYs mají určitou neshodu v subcelulární lokalizaci u různých druhů. Bylo pozorováno, že TaCRY1a u *Triticum aestivum* L. vykazuje v závislosti na světle nukleocytoplazmatickou křivku podobnou jako CRY1 u *Arabidopsis*. Obdobně jako u AtCRY1 a AtCRY1 se TaCRY1a ve tmě nachází v jádře. Ovšem od AtCRY1 se liší tím, že obsahuje jadernou lokalizační doménu na obou N-koncích i C-koncích a sekvenci pro nukleární transport ve své N-koncové doméně. Bylo prokázáno, že TaCRY1a i TaCRY2 jsou transkripčně regulovány osmotickým stresem (Xu and Ma, 2009; Xu et al., 2009).

Analýzou inhibice růstu hypokotylu a akumulace antokyanu u rostlin *Brassica napus* na modrém světle byla zjištěna over-exprese BnCRY1, což je důsledek regulace závislosti fotomorfogeneze na intenzitě světla. Tato studie zdůrazňuje, že fotoaktivované CRY1 působí prostřednictvím koordinované indukce a potlačením specifických *downstream* genů, podílejících se na modifikaci buněčné stěny během de-etiolizace semenáčků *Brassica* (Sharma et al., 2014).

Modré světlo v závislosti na osmotickém stresu bylo zkoumáno i u *Solanum lycopersicum* L. Bylo zjištěno, že inhibice klíčení u těchto rostlin byla zvýšena. Existují však i mutanti s různou tolerancí vůči určitému stresu rezistentní, např. pylově sterilní mutant *7B-1* právě u *Solanum lycopersicum* L. U *Zea Mays* byl objeven PIF3 (*Phytochrome-interacting factor 3*), jehož exprese v závislosti na světle byla odezvou na stres způsobený NaCl (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner and Sawhney, 2002; Gao et al. 2015).

3. Cíl práce

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda fotoreceptory modrého světla, CRY1, CRY2 a ZTL1, mohou být zapojeny v regulaci reakcí rostlin *Arabidopsis thaliana* k zasolení.

V teoretické části práce měly být nashromážděny literární zdroje, které se vztahují k tématu bakalářské práce, a také seznámení se s výzkumným projektem, z něhož se v této práci vychází. Na základě těchto podkladů byla vypracována literární rešerše k danému tématu.

V experimentální části práce byly provedeny experimenty klíčení semen rostlin *Arabidopsis* v podmínkách *in vitro*. Byl použit genetický přístup spočívající v analýze reakcí mutantů *cry1*, *cry2* a *ztl1* k zasolení (NaCl), a to v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo).

4. Materiál a metodika

Rostlinný materiál: *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.

Mutant *cry1-1* odvozený od ekotypu (*Ler*) Landsberg *erecta* (recesivní mutace v genu pro fotoreceptor CRY1 generovaná pomocí urychlených neutronů; Ahmad and Cashmore 1993, mutace pomocí urychlených neutronů); mutant *cry2-1* odvozený od ekotypu (*Col*) Columbia (recesivní mutace v genu pro fotoreceptor CRY2 generovaná pomocí urychlených neutronů; Lin et al., 1996); mutant *ztl1* odvozený od ekotypu C-24 (kodominantní mutace v genu pro fotoreceptor ZEITLUPE, mutace generovaná pomocí EMS; Somers et al., 2000). Semena mutovaných rostlin *cry1-1* a *cry2-1* a odpovídajících ekotypů *Ler* a *Col* byla poskytnuta ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center, Ohio State University, USA). Semena mutované rostliny *ztl1* byla laskavě poskytnuta S. Kay (The Scripps Research Institute, La Jolla, California, USA).

Chemikálie:

- Murashige-Skoog médium (Cat. no. M5524, Caisson, USA; Murashige and Skoog, 1962)
- Phyto agar, Cat. no. P1003, Duchefa Biochemie
- Sacharosa p.a., Cat. no. 40135-AP0, Lachner
- Morpholinoethane sulfonic acid (MES) analytical grade, Cat. no. 29834.04, Serva
- Sterilní destilovaná voda
- 1M KOH
- 1,4% NaClO (SAVO)
- 96% ethanol
- 70% ethanol
- 5M NaCl

Pomůcky: Erlenmayerova baňka (3 l), 5 skleněných termoláhví (500 ml), odměrný válec (1 l) váženky, plastová Pasteurova pipeta, lžička, špachtle, magnetické míchadlo, vytahovač magnetického míchadla, alobal, nesterilní mikrozkuhavky, automatické pipety (2-20 μ l, 20-200 μ l, 100-1000 μ l), sterilní plastové špičky, stojánek na mikrozkuhavky, 25 kulatých plastových sterilních Petriho misek (průměr 90 mm), nesterilní kádinky, lihový kahan, zápalky, skalpel, sterilní plastová 50ml zkuhavka, sterilní 250ml Erlenmayerova baňka, lepicí páska Softpore z netkané textilie

Přístroje: magnetická míchačka, pH metr, předvážky, analytické váhy, parní autokláv, chladnička s mrazákem, mikrovlnná trouba, laminární flowbox (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific), růstové komory (Snijders Scientific, Nizozemsko)

Příprava MS média

Do 3l Erlenmayerovy baňky byl nalit 1 l destilované vody a bylo do ní vloženo magnetické míchadlo. Poté byla položena na magnetickou míchačku a bylo spuštěno míchání. Na předvážkách bylo naváženo 20 g sacharosu, která byla vsypána do Erlenmayerovy baňky na míchačce. Poté bylo naváženo na předvážkách 8,66 g média, které bylo také přidáno do Erlenmayerovy baňky. Následně bylo naváženo na analytických vahách 390,4 mg pufru MES, který byl přisypán do Erlenmayerovy baňky. Po rozpuštění všech látek bylo míchání zastaveno a objem daného roztoku byl doplněn destilovanou vodou na 2 l.

Do takto připraveného média byla vložena elektroda pH metru a bylo změřeno pH. Po ustálení hodnoty pH bylo upraveno roztokem 1M KOH, který byl pomalu a opatrně přikapáván do média, dokud nebylo pH ustáleno na hodnotě 6,1. Tato hodnota se po autoklávování sníží na hodnotu 5,7. Následně byl vytažen magnet z Erlenmayerovy baňky.

Bylo přichystáno 5 prázdných skleněných termolahví o objemu 500 ml. Na předvážkách bylo naváženo 2,8 g agaru na každou láhev. Agar byl poté nasypán do jednotlivých lahví. V litrovém odměrném válci bylo odměřeno 400 ml média na každou láhev, které bylo následně přelito do jednotlivých lahví. Poté byly láhve pořádně promíchány a uzavřeny víčkem. Víčko bylo pokryto alobalem, na který byla nalepena autoklávovací páska. Na láhev byla nalepena barevná páska, která byla popsána potřebnými údaji (datum, jméno). Poté bylo médium vysterilizováno v parním autoklávu.

Stratifikace a povrchová sterilizace semen

Na analytických vahách bylo naváženo 8 mg semen *Arabidopsis thaliana* potřebného genotypu do 1,5 ml mikrozkuřavky, která byla řádně popsána. Toto množství odpovídalo zhruba 400 semenům. K semenům byl napipetován 1 ml destilované vody. Mikrozkuřavky byly vloženy do stojánku, který byl dán do lednice. Semena se nechala alespoň 3 dny v chladničce ve tmě stratifikovat.

Od stratifikovaných semen byla odpipetována voda a nahrazena 1 ml NaClO (zředěný roztok SAVO), ve kterém byla semena *Arabidopsis* povrchově sterilizována po dobu 30 minut. Po uplynutí doby sterilizace byla semena v laminárním boxu zbavena NaClO a propláchnuta 1 ml sterilní destilované vody. Tento postup byl opakován ještě 4x.

Výsev semen

Během sterilizace se nechalo v mikrovlnné troubě rozehrát médium a bylo připraveno 24 plastových misek, které byly řádně popsány. Poté bylo do objemu 120 ml (množství média určené pro 6 misek) napipetováno dané množství 5M NaCl (viz Tabulka 1), aby vzniklo médium s potřebnou koncentrací NaCl. Poté bylo 20 ml média přelito do misky a postupně bylo naplněno všech 6 misek médiem, dokud neztuhlo. Takto byly připraveny misky se všemi použitými koncentracemi NaCl. Po ukončení sterilizace byl nad kahanem ožehnut skalpel, který byl chvíli předtím ponechán v 96% ethanolu. Na pipetu (o objemu 2-20 μ l) byla nasazena sterilní špička a sterilním skalpelem byla seříznuta tak, aby otvorem prošlo semínko. Následně se začalo pipetou na povrch média sázet semínka tak, aby jich bylo 30-40 na misce. Poté byly misky oblepeny dvakrát páskou z netkané textilie a byly přeneseny do růstové komory s červeným a modrým světlem. Zdrojem modrého světla s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 440 nm byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue, zdrojem červeného světla s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 660 nm byla zářivka Philips TLD36W/15-Red. Misky se semínky určenými pro kultivaci ve tmě, byly obaleny alobalem a byly umístěny taktéž do růstové komory.

Tabulka 1. Objemová množství 5M NaCl ve 120 ml MS média.

Výsledná koncentrace NaCl v médiu [mmol/l]	Objem zásobního roztoku NaCl [ml]
0	0
100	2,4
150	3,6
200	4,8

Vyhodnocení klíčivosti semen

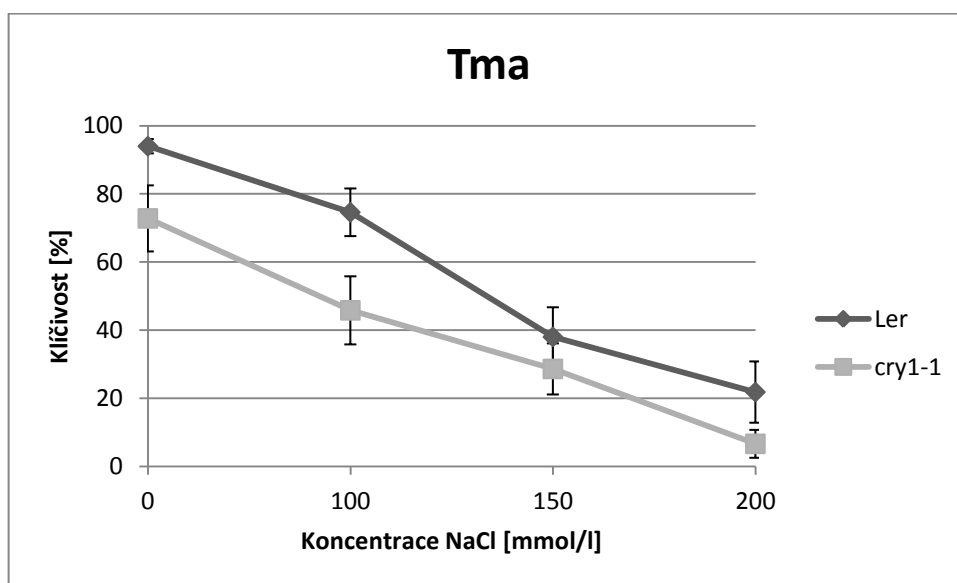
Klíčivost semen byla vyhodnocována od 4. do 8. dne od vysazení semen, kdy bylo spočítáno, kolik semen z celkově vyšetých, vyklíčilo. Všechny hodnoty uvedené v kapitole Výsledky vychází z 8. dne po výsevu semen. Z tohoto údaje bylo vypočítáno procento klíčivosti, popř. procento inhibice klíčení, a to podle vzorce: $\% \text{ inhibice} = (a - b / a) * 100\%$, kde a = průměrné procento klíčení při koncentraci 0 mmol/l NaCl, b = průměrné procento klíčení při zvolené koncentraci NaCl, u které chceme vypočítat inhibici klíčení.. Každý experiment bylo nutné opakovat 3x – 5x, z čehož bylo možné vypočítat průměrné hodnoty, se kterými se setkáme v kapitole Výsledky. Z průměrných hodnot byly vypracovány grafy závislosti klíčivosti na koncentraci NaCl a na testovaných světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Veškeré grafy byly zpracovány v programu Microsoft Excell.

5. Výsledky

Ke zjištění úlohy fotoreceptorů v reakci na zasolení bylo použito genetického přístupu, který spočíval v analýze mutantů s defekty ve fotoreceptorech modrého světla: *cry1-1*, *cry2-1* a *ztl1*. V experimentech byla sledována klíčivost semen mutantů a odpovídajících ekotypů na médiu s obsahem NaCl o koncentracích 0, 100, 150 a 200 mmol/l v podmínkách *in vitro*. Klíčení probíhalo ve tmě, na modrém a červeném světle.

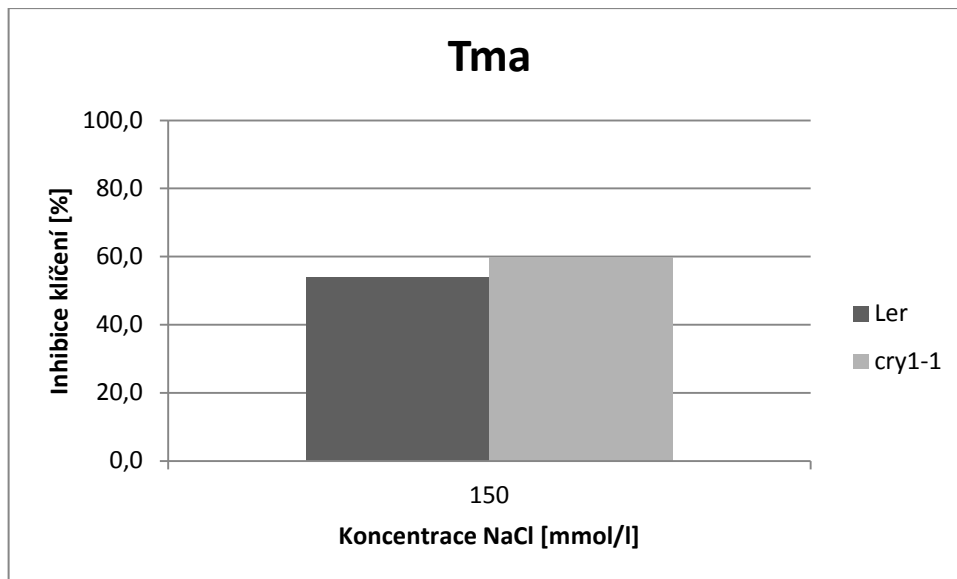
5.1. Klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutantu *cry1-1* na médiu s různou koncentrací NaCl a za různých světelných podmínek

Z Obr. 4 vyplývá, že klíčivost semen ekotypu *Ler* byla ve tmě na médiu bez NaCl vyšší než klíčivost semen mutantu *cry1-1*. Dále je vidět, že NaCl inhibovalo klíčení semen, a to postupně se zvyšující se koncentrací NaCl. Ve tmě bylo při nejvyšší testované koncentraci NaCl inhibováno klíčení semen až na 10 až 20%, u *Ler*, respektive u *cry1-1*.



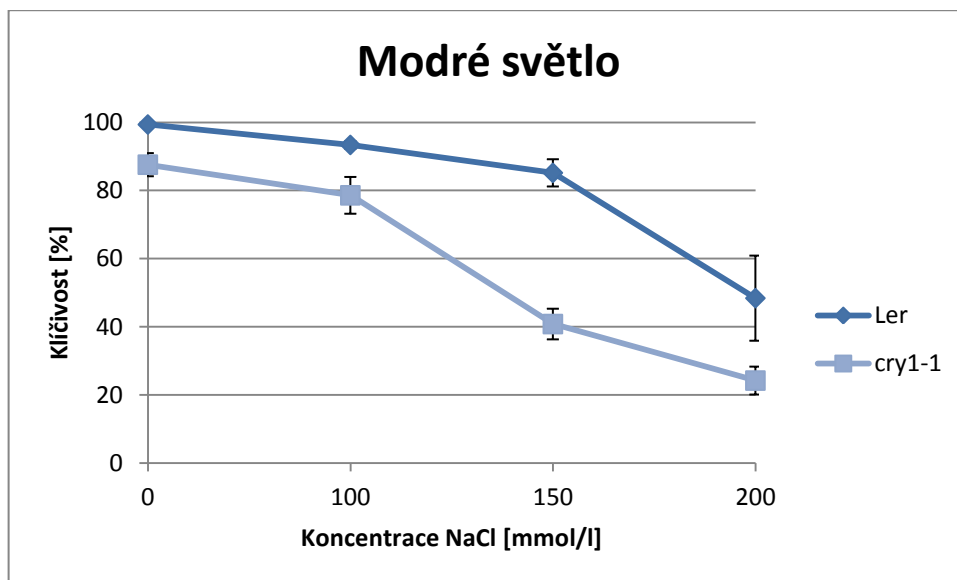
Obr. 4. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutantu *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu ve tmě 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, vypočítané z hodnot klíčení v pěti nezávislých experimentech

Srovnání inhibice klíčení semen u obou mutantů lze vidět na Obr. 5. Z tohoto obrázku je patrné, že inhibice klíčení semen ve tmě při koncentraci NaCl 150 mmol/l byla u mutantu *cry1-1* a ekotypu *Ler* podobná. Podobně tomu bylo i při ostatní testovaných koncentracích NaCl.



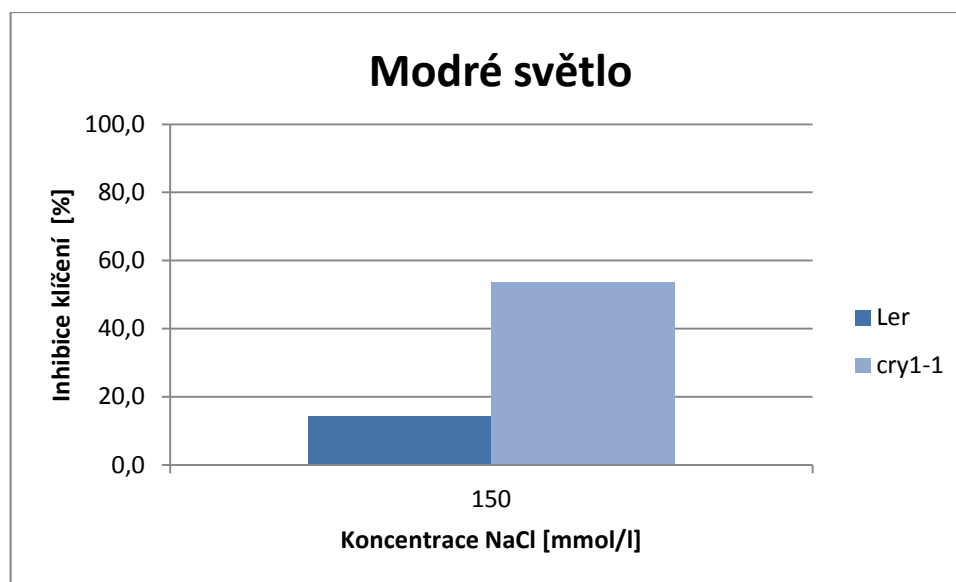
Obr. 5. Srovnání inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutanta *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mmol/l NaCl ve tmě 8. den po výsevu.

Obr. 6 ukazuje klíčení semen mutanta *cry1-1* a *Ler* při zasolení na modrém světle. Lze vidět, že klíčivost semen je vyšší u ekotypu *Ler* než u mutanta *cry1-1*, a to při všech koncentracích NaCl v médiu. Na modrém světle bylo zaznamenáno snížení klíčivosti o cca 50 % u ekotypu *Ler* až při koncentraci NaCl 200 mmol/l, kdežto u mutanta *cry1-1* bylo zaznamenáno snížení klíčivosti zhruba na 50 % již při koncentraci NaCl přibližně 150 mmol/l.



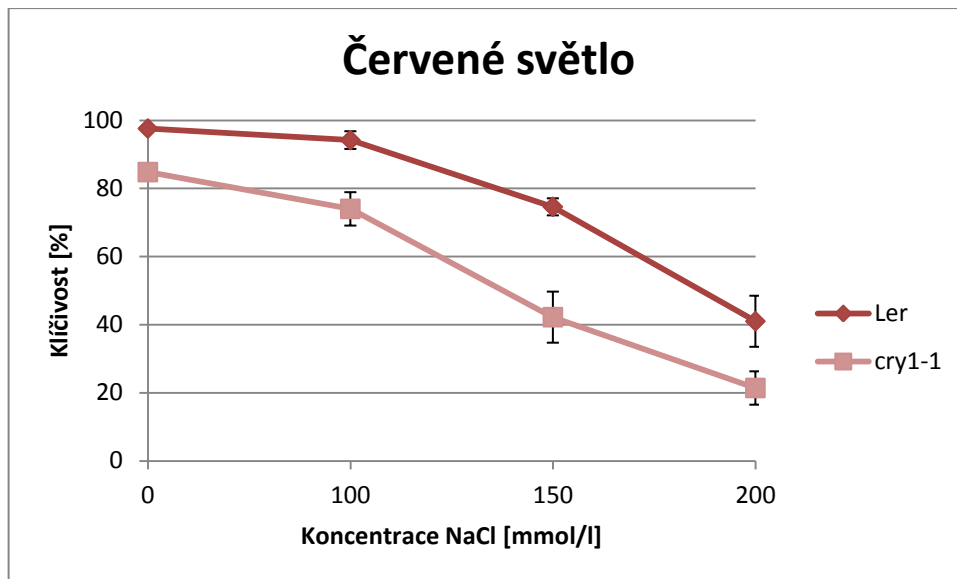
Obr. 6. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutanta *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na modrém světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení v pěti nezávislých experimentech.

Zvýšenou citlivost mutanta *cry1-1* k zasolení dokumentuje především Obr. 7, kde je znázorněno, srovnání inhibice klíčení semen obou genotypů při koncentraci NaCl 150 mmol/l. Je vidět, že hodnota inhibice klíčení semen na modrém světle při této koncentraci je mnohem vyšší u mutanta *cry1-1* než u ekotypu *Ler*. Podobný rozdíl byl zjištěn i při koncentraci 200 mmol/l.



Obr. 7. Srovnání inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutanta *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mmol/l NaCl na modrém světle 8. den po výsevu.

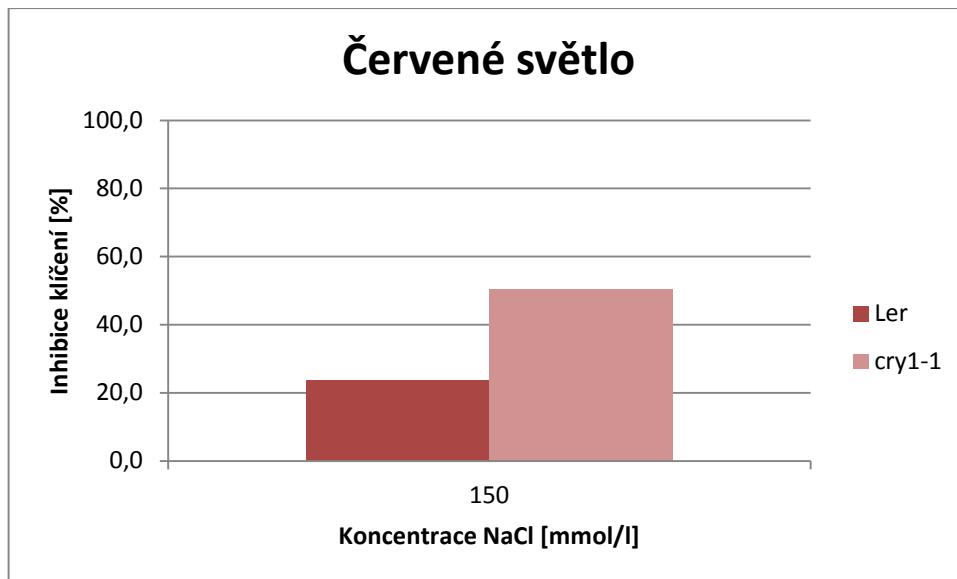
Procenta klíčivosti semen v přítomnosti NaCl na červeném světle dokumentuje Obr. 8. Lze vidět, že klíčivost semen je opět vyšší u ekotypu *Ler* než u mutanta *cry1-1*, což opět platí pro všechny koncentrace NaCl. Snížení klíčení semen na červeném světle o cca 50 % u ekotypu *Ler* nastalo až při koncentraci mírně nižší než 200 mmol/l NaCl, kdežto u mutanta *cry1-1* nastalo snížení na cca 50 % obdobně jako u modrého světla při koncentraci mírně nižší než 150 mmol/l.



Obr. 8. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutantu *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na červeném světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení v pěti nezávislých experimentech.

Rozdíly v úrovni inhibice klíčení semen obou genotypů na červeném světle při koncentraci NaCl 150 mM jsou zaznamenány na Obr. 9. Klíčení semen mutantu *cry1-1* bylo inhibováno zhruba dvakrát silněji než klíčení semen ekotypu *Ler*. Podobný rozdíl byl pozorován i při koncentraci 200 mmol/l NaCl.

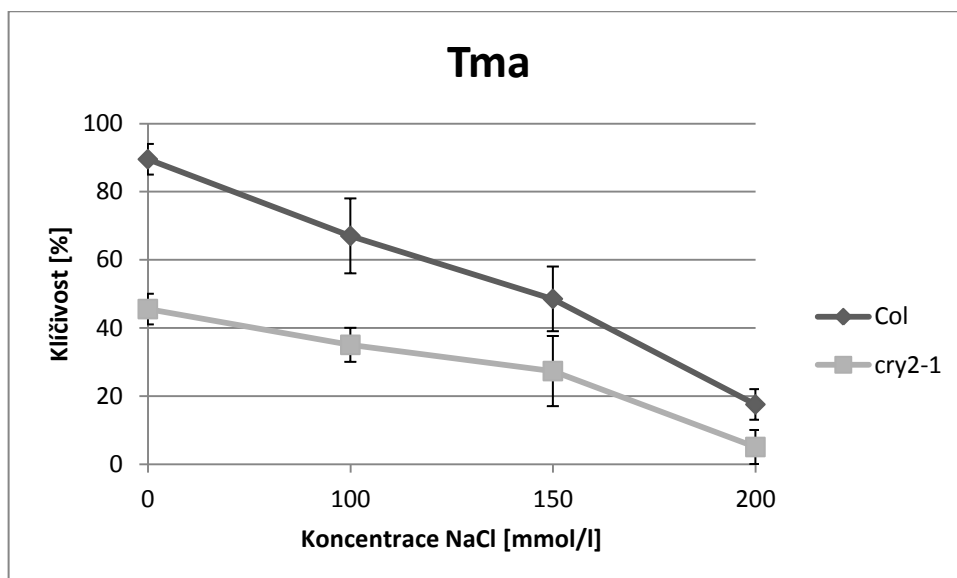
Pokud srovnáme inhibici klíčení semen ekotypu *Ler* při zasolení 150 mmol/l ve tmě, na modrém a červeném světle (Obr. 5, 7 a 9), je zřejmé, že nejsilnější účinek měla NaCl ve tmě, kdežto na modrém a červeném světle byla citlivost semen k NaCl mnohem nižší. U mutantu s defektem ve fotoreceptoru CRY1 byl trend podobný, ale rozdíly v inhibici klíčení semen ve tmě a na světle byly relativně malé.



Obr. 9. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a mutantu *cry1-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mmol/l NaCl na červeném světle 8. den po výsevu.

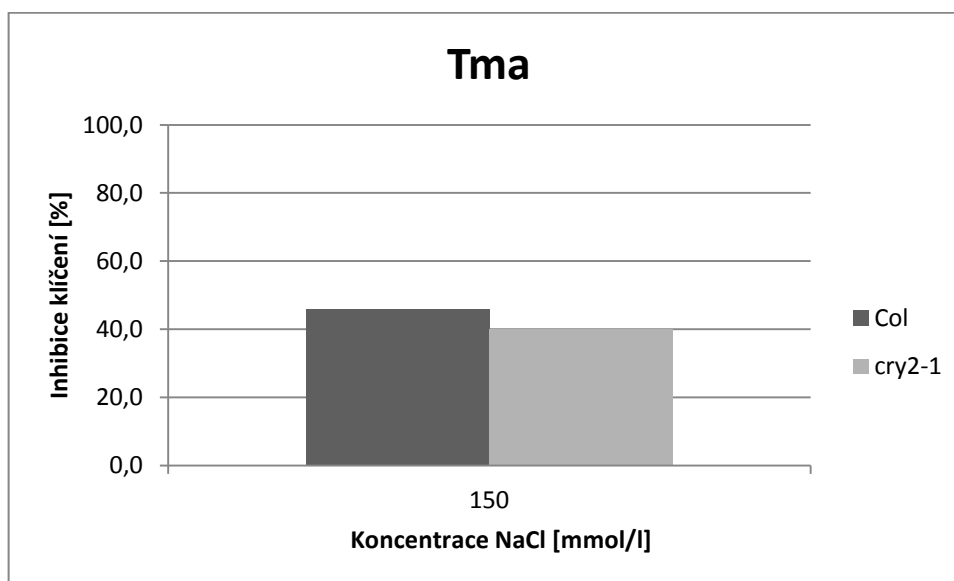
5.2. Klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Col* a mutantu *cry2-1* na médiu s různou koncentrací NaCl a za různých světelných podmínek

Obr. 10 ukazuje, že ve tmě a při absenci NaCl bylo klíčení semen mutantu *cry2-1* téměř poloviční ve srovnání s klíčením semen kontrolního ekotypu *Col*. Dále je vidět, že klíčení semen obou genotypů bylo silně redukováno zvyšující se koncentrací NaCl. Při nejvyšší testované koncentraci NaCl dosahovalo klíčení pouhých max. 20%.



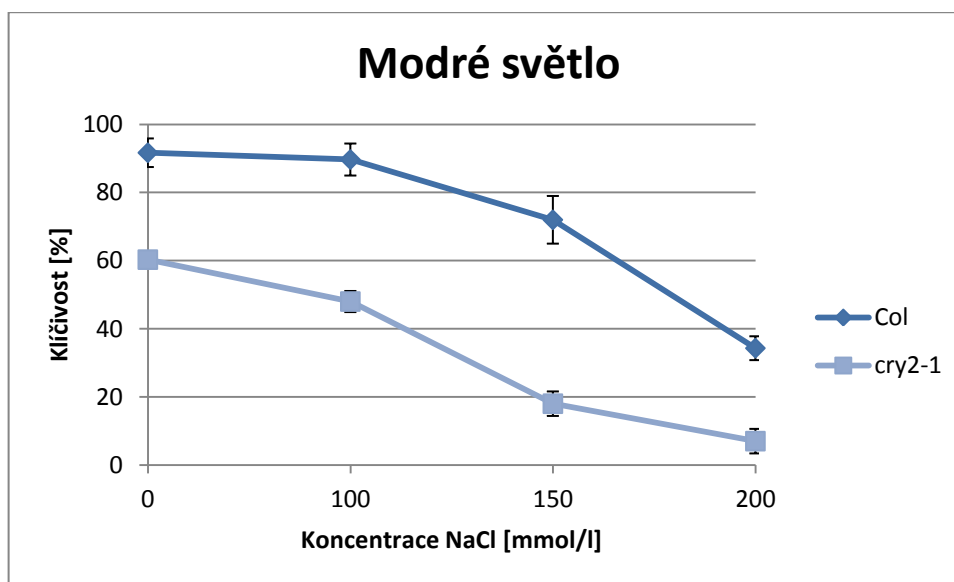
Obr. 10. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Col* a mutantu *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu ve tmě 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

Jak je vidět na Obr. 11, ve tmě byla relativní inhibice klíčení semen Col a *cry2-1* při koncentraci NaCl 150 mmol/l podobná u obou genotypů. Stejně tomu bylo i při koncentraci 200 mmol/l NaCl.



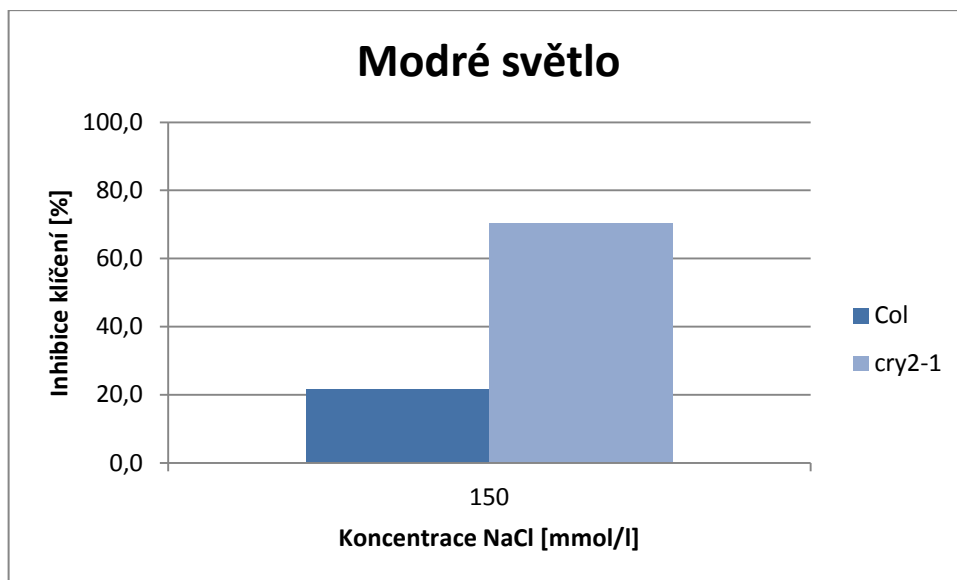
Obr. 11. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col a mutanta *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mM NaCl ve tmě 8. den po výsevu.

Na modrém světle byla klíčivost semen opět vyšší u ekotypu Col než u mutanta *cry2-1* a opět to platilo pro všechny koncentrace NaCl (Obr. 12).



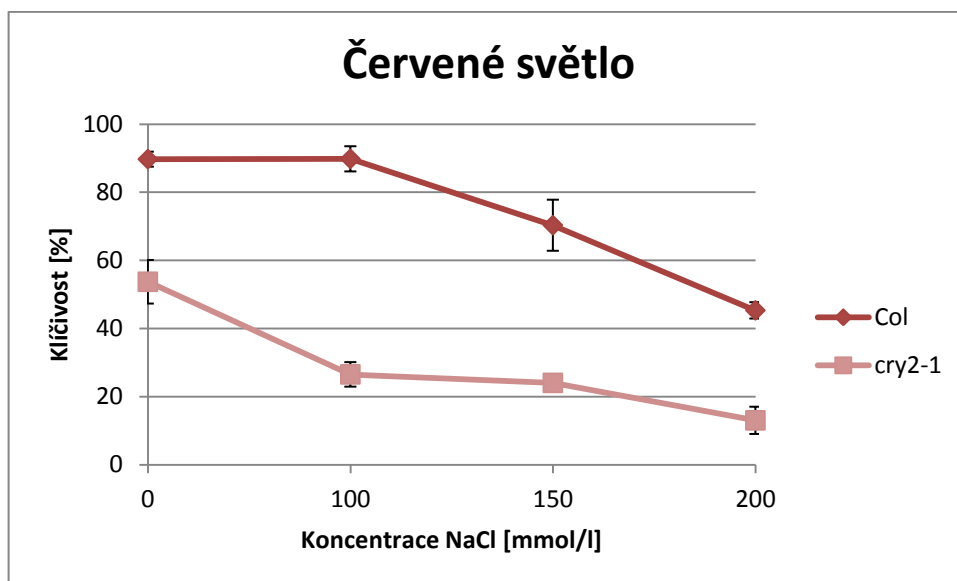
Obr. 12. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col a mutanta *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na modrém světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

Jak je však ukázáno na Obr. 13, inhibice klíčení semen mutanta *cry2-1* při koncentraci 150 mmol/l byla mnohem vyšší než u semen ekotypu Col. Podobný trend byl pozorován i u koncentrace 200 mmol/l NaCl. Srovnáním Obr. 8 a 10 zjistíme, že inhibice semen Col vlivem NaCl je ve tmě mnohem vyšší než na modrém světle. Zajímavé však je, že u mutanta *cry2-1* je tomu právě naopak.



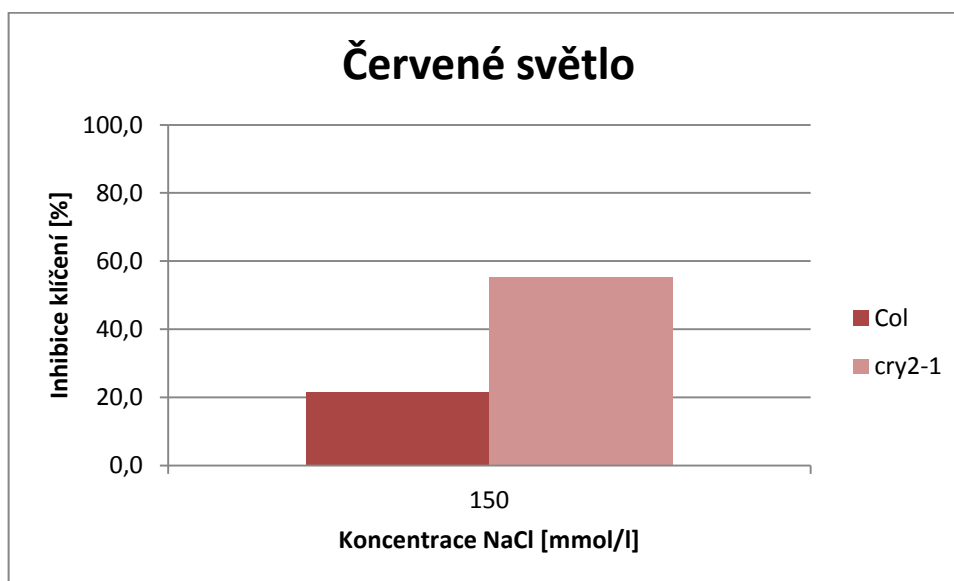
Obr. 13. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col a mutanta *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mM NaCl na modrém světle 8. den po výsevu.

Klíčivost semen na červeném světle je možno vidět na Obr 14., přičemž situace je podobná, jako na modrém světle.



Obr. 14. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col a mutanta *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na červeném světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

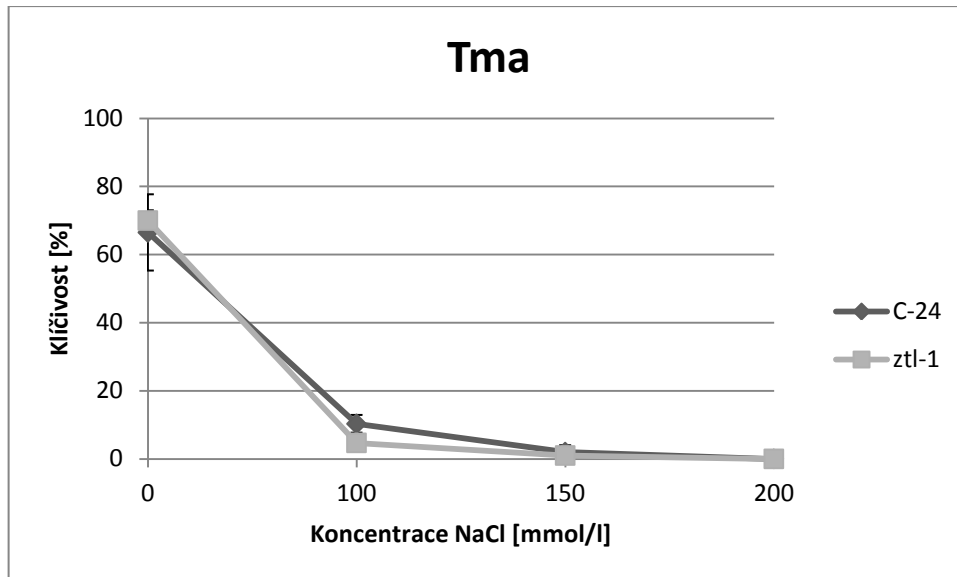
Podobně jako na modrém světle, mutant *cry2-1* ukazoval mnohem větší citlivost k NaCl než Col na červeném světle (Obr. 15). Obrázek opět ukazuje téměř dvojnásobnou inhibici klíčení semen *cry2-1* ve srovnání s ekotypem Col při koncentraci 150 mmol/l NaCl.



Obr. 15. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu Col a mutantu *cry2-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mM NaCl na červeném světle 8. den po výsevu.

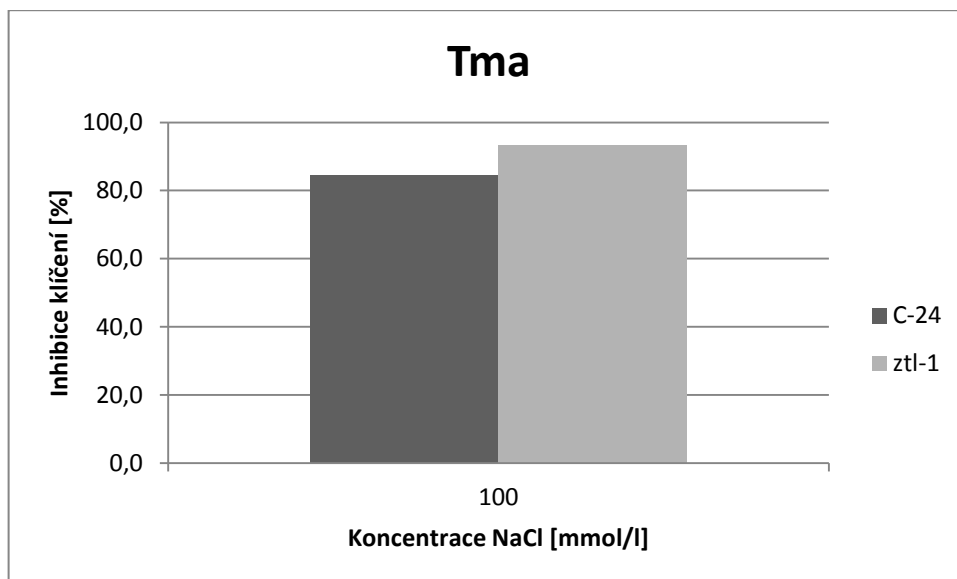
5.3. Klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutantu *ztl-1* na médiu s různou koncentrací NaCl a za různých světelných podmínek

Porovnáním procent klíčivosti semen ve tmě je možné si všimnout, že klíčivost semen ekotypu C-24 je velmi podobná klíčivosti semen mutantu *ztl-1*, a to jak při absenci, tak i přítomnosti NaCl v médiu (viz Obr. 16). Je rovněž vidět, že oba genotypy byly ke stresu zasolením velmi citlivé, protože již při koncentraci 100 mmol/l dosahovala klíčivost pouhých zhruba 10%.



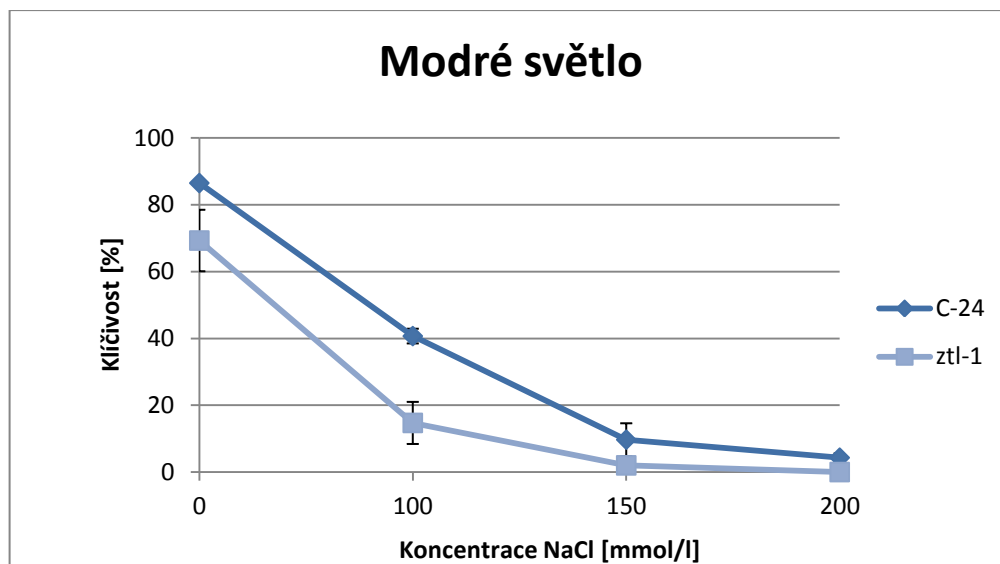
Obr. 16. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu ve tmě 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

Z Obr. 17 je tedy zřejmé, že inhibice klíčení semen ve tmě při koncentraci NaCl 100 mmol/l byla u mutanta *ztl-1* a ekotypu C-24 velmi podobná.



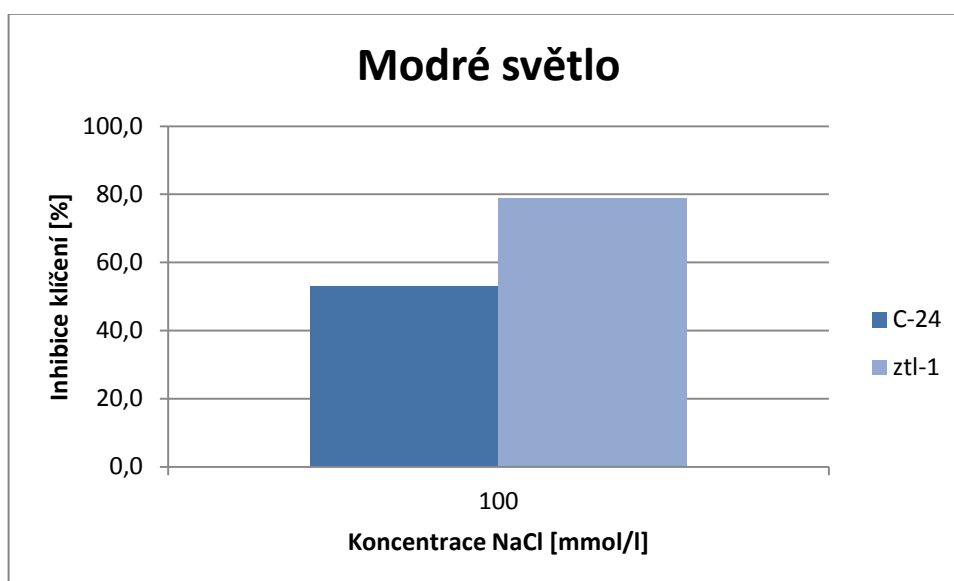
Obr. 17. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 100 mM NaCl ve tmě 8. den po výsevu.

Na Obr. 18 je možné si všimnout, že hodnoty klíčivosti semen na modrém světle byly na základním médiu při absenci NaCl o něco vyšší u ekotypu C-24 než u mutanta *ztl-1*. Přítomnost NaCl v médiu vedla opět k silné inhibici klíčení semen u obou genotypů.



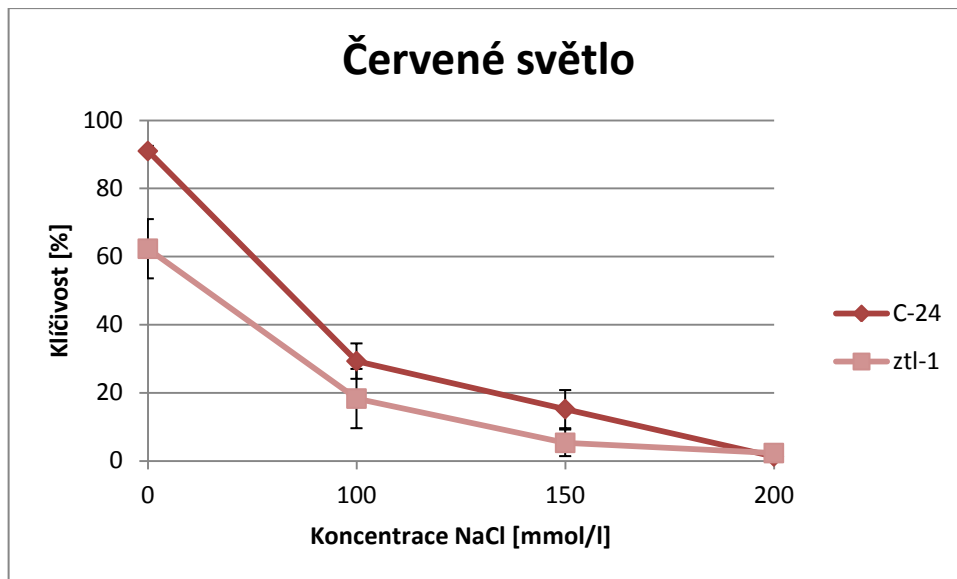
Obr. 18. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na modrém světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení \pm SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

Při nejnižší testované koncentraci NaCl 100 mmol/l semena mutanta *ztl1* vykazovala ve srovnání s C-24 zvýšenou citlivost k inhibičnímu účinku NaCl (Obr. 19).



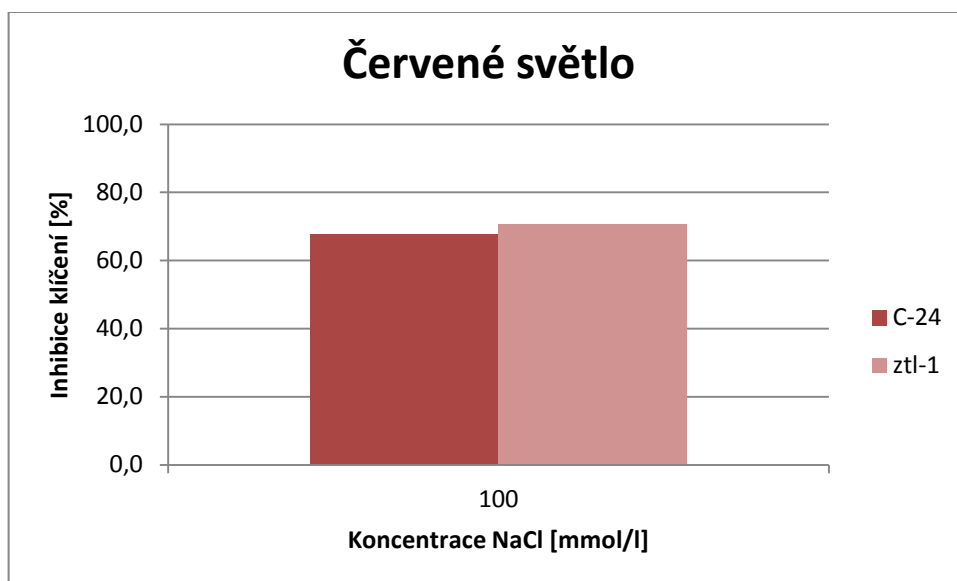
Obr. 19. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mM NaCl na modrém světle 8. den po výsevu.

Pokud byla semena *ztl1* a C-24 kultivována na červeném světle a při absenci NaCl, bylo procento klíčivosti semen u ekotypu C-24 vyšší než u mutanta *ztl-1* (Obr. 20). Aplikace NaCl vedla k silné inhibici klíčení semen obou genotypů.



Obr. 20. Procento klíčivosti semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* ovlivněné zvyšující se koncentrací NaCl v médiu na červeném světle 8. den po výsevu. Výsledky reprezentují průměrné hodnoty klíčení ± SE, získané z hodnot klíčení ve třech nezávislých experimentech.

Inhibice klíčení při 100 mmol/l koncentraci NaCl byla u semen *ztl1* a C-24 dosti podobná (Obr. 21).



Obr. 21. Srovnání procent inhibice klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ekotypu C-24 a mutanta *ztl-1* odvozeného od tohoto ekotypu v podmínkách *in vitro* při koncentraci 150 mM NaCl na červeném světle 8. den po výsevu.

6. Diskuze

Vývoj rostlin podléhá neustále se měnícím podmínkám prostředí. Klíčení představuje jednu z nejdůležitějších fází tohoto vývoje. Semena jsou citlivější k impulzům, které klíčení stimulují za určitých podmínek. Jedním z těchto impulzů je světlo, které patří mezi nejvýznamnější faktory při klíčení. Dalším faktorem je reakce na stresové podmínky, vzhledem k tomu, že stres u klíčícího semena ovlivňuje všemožné aspekty budoucí rostliny. V případě této práce se jedná o reakci na abiotický stres, konkrétně na zasolení vlivem NaCl.

Předmětem experimentální části bakalářské práce bylo studium zapojení fotoreceptorů modrého světla, CRY-1, CRY-2 a ZTL-1, v regulaci reakcí rostlin k zasolení. K tomuto účelu byla využita semena mutantů *cry1-1*, *cry2-1* a *ztl-1* a také příslušná nemutovaná semena, tedy *Ler*, *Col* a *C-24*, která sloužila ke srovnání. Klíčení těchto semen bylo ovlivněno různými světelnými podmínkami (tma, modré a červené světlo) a NaCl, který byl přidán do kultivačního média, na kterém klíčení semen probíhalo.

Provedenými experimenty *in vitro* podmínkách jsme potvrdili, že klíčení bylo inhibováno tím více, čím vyšší byla koncentrace NaCl v médiu.

Minimální rozdíly v inhibici klíčení srovnávacího ekotypu *Ler* a jeho mutantu *cry1-1* ve tmě vedou k závěru, že neaktivní fotoreceptor CRY1 schopnost semen tolerovat zasolení neovlivňuje. Vysoká inhibice klíčení semen *cry1-1* vlivem NaCl na modrém světle znamená, že defekt v CRY1 zvyšuje citlivost semen *Arabidopsis* k zasolení. Z toho lze tedy usoudit, že funkční fotoreceptor CRY1 po aktivaci modrým světlem zvyšuje schopnost semen *Arabidopsis* tolerovat zasolení. Podobný závěr lze vyvodit i z výsledků provedených na červeném světle.

Jako u genu *CRY-1* defekt v genu *CRY-2* se ve tmě na reakci semen k zasolení neprojevil, jelikož inhibice klíčení ekotypu *Col* byla velmi podobná inhibici u mutantu *cry2-1*. Na modrém světle nepřítomnost genu *CRY-2* ovšem citlivost k zasolení ovlivnila, a to tak, že ji zvýšila. Na červeném světle tomu bylo obdobně – mutace v *CRY2* také zvyšovala citlivost k zasolení. Z těchto výsledků je tedy možné udělat závěr, že podobně jako CRY1, funkční a aktivovaný fotoreceptor CRY2 pozitivně ovlivňuje schopnost semen *Arabidopsis* tolerovat zasolení.

Výsledky experimentů s mutantem *ztl1* ukázaly, že nefunkčnost genu *ZTL-1* se ve tmě a na červeném světle na schopnosti semen tolerovat zasolení neprojevila. Na modrém světle se nepřítomnost genu projevila zvýšením citlivosti k zasolení. Je tedy zřejmé, že stejně jako v případě CRY1 a CRY2 funkční receptor ZTL1 zvyšuje schopnost semen *Arabidopsis* tolerovat zasolení. Protože však ekotyp *C-24* i jeho mutant *ztl-1* ukazovaly příliš vysokou

citlivost i k nejnižším testovaným koncentracím NaCl, bylo by potřeba experiment provést znovu, a to při nižších koncentracích NaCl. Výsledky proto nebudou předmětem této diskuze.

Reakce modrého světla na zasolení byly v malé míře studovány již dříve. Předmětem experimentů bylo např. zjistit, jak reaguje rajče jedlé *Lycopersicon esculentum* Mill (nyní *Solanum lycopersicum* L.) na osmotický stres a zasolení za různých světelných podmínek. Bylo zjištěno, že semena rajčete na modrém světle vykazují vyšší citlivost k zasolení než ve tmě, což znamená, že reagují opačně než semena *Arabidopsis thaliana* (Fellner and Sawhney, 2002). Může to být způsobeno tím, že *Arabidopsis thaliana* patří mezi fotoblastické rostliny, kdežto *Solanum lycopersicum* L. patří mezi nefotoblastické rostliny. U pšenice *Triticum aestivum* bylo prokázáno, že TaCRY1a i TaCRY2 jsou na modrém transkripčně regulované osmotickým stresem a zasolením. Over-exprese těchto kryptochromů vedla k vyšší citlivosti na zasolení a osmotický stres (Xu and Ma, 2002; Xu et al., 2009). Pšenice tedy reaguje obdobně jako *Arabidopsis*. U řepky *Brassica napus* byla zjištěna inhibice růstu hypokotylu na modrém světle v závislosti na zasolení (Sharma et al., 2014).

Pokud je rostlina ovlivněna přímým zasolením NaCl, začne působit toxický efekt iontů, které se v důsledku toho akumulují v buňce, konkrétně Na^+ a Cl^- . Transportní systém umožňuje kompartmentaci Na^+ do vakuoly pomocí transportéru NHX. Při vysoké koncentraci Na^+ je příjem K^+ transportérem HKT1 inhibován, začíná být upřednostňován Na^+ před K^+ a tímto transportérem je následně pouštěn pouze Na^+ , který se shromažďuje v cytoplazmě, což má za následek onen toxický efekt. Buňka se brání tomuto stresu několika mechanismy. Jedním z nich je, že Na^+ může být pomocí Na^+/H^+ antiporteru NHX transportován do vakuoly nebo pomocí podobného antiporteru SOS1 transportován do apoplastu (Obr. 22). Toto je však umožněno tím, že je předtím aktivovaná vakuolární nebo plazmamembránová protonová pumpa. H^+ -ATPáza iniciuje rozdíl pH a membránový potenciál přes plazma membránu a tonoplast. Zajišťuje tak sílu (H^+ elektrochemický potenciál) pro sekundární transport iontů.

Na základě výsledků této bakalářské práce je možno navrhnout několik mechanismů, jak aktivace fotoreceptorů CRY1 a CRY2 může zvyšovat toleranci semen k NaCl.

Fotoreceptory CRY-1 i CRY-2 se nachází v jádře buňky, přičemž CRY-2 po ozáření modrým světlem v jádře zůstává, ale část CRY-1 může přecházet do cytoplazmy. Tyto fotoreceptory dále interagují s proteinovým komplexem COP1, který slouží k degradaci proteinů ve tmě. Tato degradace probíhá tak, že COP1 blokuje expresi transkripčních faktorů, které spouští expresi především fotomorfogenních genů, ale je možné, že i jiných genů, např. těch které ovlivňují citlivost k zasolení. Kryptochromy CRY-1 i CRY-2 na světle inhibují COP1, který tím pádem nemůže nadále blokovat expresi transkripčních faktorů a tak se

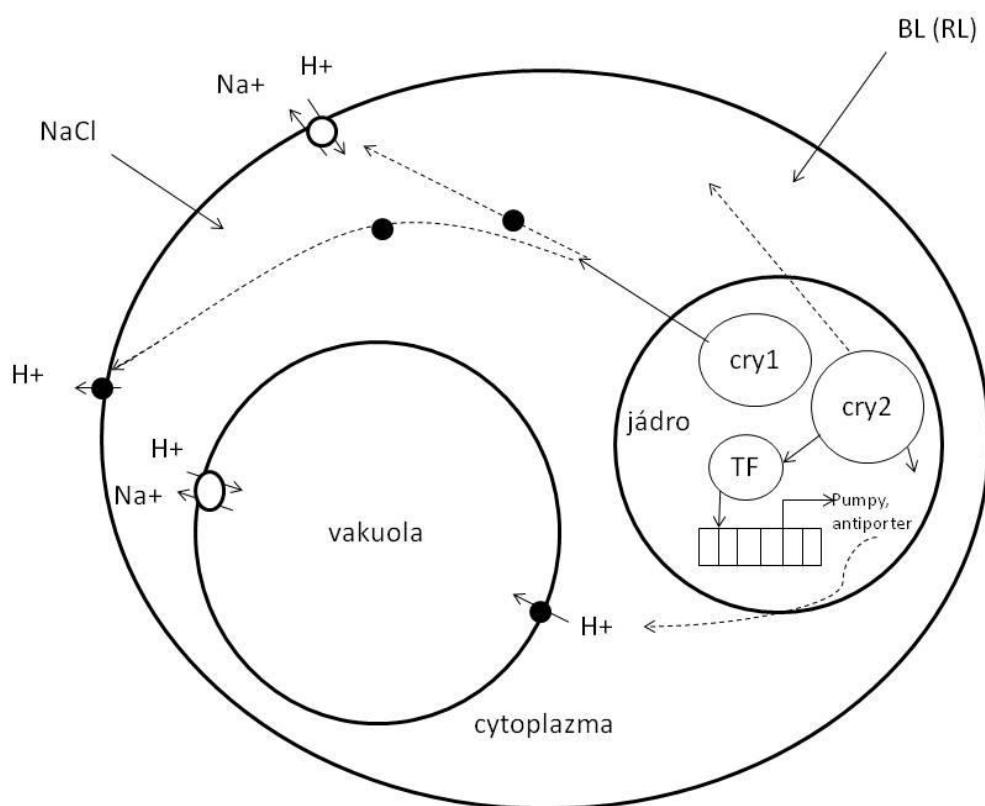
uvolňuje exprese potřebných genů. Mohou to být např. geny, které kódují protonovou pumpu, nebo geny kódující Na^+/H^+ antiportery, SOS1 na plazmatické membráně či NHX na tonoplastu.

Druhou možností je, že CRY2, který po aktivaci světlem zůstává v jádře, může aktivovat transkripční faktory, které spouští expresi genů kódujících protonovou pumpu plazmatické membrány nebo tonoplastu, nebo geny kódující výše zmíněné antiportery Na^+/H^+ (AtNHX, SOS1). Kryptochrom CRY1, který je transportován do cytoplazmy může nějakým způsobem aktivovat (např. přes jiné proteiny) jak protonové pumpy, tak antiportery.

Těmito mechanismy mohou buňky na modrém světle získávat větší schopnost tolerovat vyšší koncentrace NaCl.

Fotoreceptory modrého světla CRY-1 a CRY-2 také spolupracují s fotoreceptory červeného světla, fytochromy (PhyA, PhyB), které jsou schopné se přemisťovat z cytoplazmy do jádra (Takagi et al., 2003). Což vysvětluje, proč je exprese genů *CRY-1* a *CRY-2* ovlivněna nejen modrým, ale i červeným světlem.

Pro další podrobnější studie této problematiky by bylo potřeba pokračovat v experimentech na biochemické a molekulární úrovni.



Obr. 22 - Schéma mechanismu interakce kryptochromů CRY1, CRY2 s protonovými pumpami a Na^+/H^+ antiporterem v reakci na zvýšenou přítomnost Na^+ v buňce jako důsledek zasolení NaCl.

7. Závěr

Úkolem bakalářské práce bylo studium zapojení fotoreceptorů modrého světla, CRY-1, CRY-2 a ZTL-1, v regulaci reakcí rostlin k zasolení. Byl tedy použit genetický přístup, který spočíval v analýze mutantů s defekty ve fotoreceptorech modrého světla: *cry1-1*, *cry2-1* a *ztl-1*. Bylo pozorováno klíčení semen mutantů a odpovídajících ekotypů (tj. *Ler*, *Col*, *C-24*), které bylo ovlivněno jednak různou kvalitou světla (tma, modré světlo, červené světlo) a také obsahem NaCl (0, 100, 150 a 200 mmol/l) v médiu v podmínkách *in vitro*.

Bylo zjištěno, že klíčení semen bylo nejvíce inhibováno ve tmě. Pokud klíčení semen probíhalo na modrém světle, byla u mutantů *cry1-1*, *cry2-1* i *ztl-1* zjištěna větší citlivost k zasolení oproti srovnávacím ekotypům *Ler*, *Col* a *C-24*. Z těchto výsledků vyplývá, že funkční aktivované fotoreceptory CRY1, CRY2 a ZTL1 zvyšují na světle (především modrém) schopnost semen *Arabidopsis* tolerovat zasolení vyvolané aplikací NaCl. Na základě těchto výsledků byly navrženy mechanismy, kterými modré světlo prostřednictvím zmíněných fotoreceptorů může zvyšovat toleranci semen k zasolení. Jsou to mechanismy, které spočívají v tom, že modré světlo může zvyšovat schopnost buněk odstraňovat Na⁺ z cytoplazmy:

- 1) Aktivované fotoreceptory blokuji COP1 proteiny, které ve tmě degradují transkripční faktory různých genů, jimiž mohou být i geny pro protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.
- 2) Aktivovaný fotoreceptor CRY2 lokalizovaný v jádře může iniciovat expresi genů kódujících protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.
- 3) Aktivovaný fotoreceptor CRY1 lokalizovaný v cytoplazmě může aktivovat (prostřednictvím jiných proteinů) protonovou pumpu a Na⁺/H⁺ antiportery.

Výsledky předkládané bakalářské práce mohou být odrazovým můstkem pro další experimenty, které by navrhované mechanismy tolerance semen *Arabidopsis* k zasolení na modrém světle mohly podpořit či potvrdit.

8. Literatura

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

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. 1999. Salt tolerance conferred by over expression of vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in Arabidopsis. *Science* 285: 1256-1258.

Bewley JD. 1997. Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-1066.

Bressan RA, Nelson DE, Ikari NM, LaRosa PC, Singh NK, Hasegawa PM, Carpita NC. 1990. Reduced cell expansion and changes in cell wall of plant cells adapted to NaCl. environmental injury to plants, F. Katterman, ed., Academic Press, New York: 137-171.

Carvalho RF, Takaki M, Azevedo RA. 2011. Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum* 33: 241-248.

Clough RC, Vierstra RD. 1997. Phytochrome degradation. *Plant, Cell & Environment* 20, 713–721.

Cramer GR, Lauchli A, Polito VS. 1985. Displacement of Ca²⁺ by Na⁺ from plasmalemma of root cells. A primary response to salt stress? *Plant Physiology* 79: 207-211.

Facella P, Lopez L, Chiappetta A, Bitonti MB, Giuliano G, Perrotta G. 2006. *CRY-DASH* gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Letters* 580, 4618–4624.

Fellner M, Sawhney VK. 2001. Seed germination in tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stress. *Theoretical and Applied Genetics* 102: 2015-221.

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.

Gao Y, Jiang W, Dai Y, Xiao N, Zhang C, Li H, Lu Y, Wu M, Tao X, Deng D, Chen J. 2015. A maize phytochrome-interacting factor 3 improves drought and salt stress tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* 85: 413-428.

Galvão VC, Fankhauser C. 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*. 34: 46-53.

Georghiou K, Kendrick RE. 1991. The germination characteristics of phytochrome-deficient aurea mutant tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 82: 127-133.

Hasegawa PM, Bressan RA, Zhu JK, Bohnert HJ. 2000. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Plant Molecular Biology* 51: 463-499.

Heijde M, Ulm R. 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends in Plant Science* 17: 230-237.

Hepher A, Roberts JA. 1985. The control of seed germination in *Trollius ledebouri*: the breaking of dormancy. *Planta* 166: 314-320.

Chen M, Chory J. 2011. Phytochrome signalling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology* 21, 664–671.

Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. 2015. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* 56: 401-413.

Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S. 2013. *The molecular life of plants*. Wiley-Blackwell.

Leubner-Metzger G, Frundt C, Vogeli-Lange R, Meins Jr F. 1995. Class I beta-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiology* 109: 751-759.

Lin C. 2002. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell* 14: 207-225.

Lin C. 2000. Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* 5, 337–342.

Lin C, Ahmad M, Chan J, Cashmore AR. 1995. *CRY2*, a second member of the *Arabidopsis* cryptochrome gene family. *Plant Physiology* 110: 1047.

Liu JP, Zhu JK. 1997. An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 94: 14960-14964.

Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C. 2011. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* 16: 684-691.

Kleine T, Lockhart P, Batschauer A. 2003. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal* 35, 93–103.

Kong SG, Suzuki T, Tamura K, Mochizuki N, Hara-Nishimura I, Nagatani A. 2006. Blue light induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *The Plant Journal* 45: 994–1005.

Ma L, Gao Y, Qu L, Chen Z, Li J, Zhao H, Deng XW. 2002. Genomic evidence for COP1 as a repressor of light-regulated gene expression and development in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 14: 2383–2398.

Maia J, Dekkers BJW, Provart NJ, Ligterink W, Hilhorst HWM. 2011. The re-establishment of desiccation tolerance in germinated *Arabidopsis thaliana* seeds and its associated transcriptome. *PLoS ONE* 6(12): e29123.

Malhotra K, Kim ST, Batschauer A, Dawut L, Sancar A. 1995. Putative blue-light receptors from *Arabidopsis* and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyases cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34: 6892–6899.

Murashige T, Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.

- Neff MM, Chory J.** 1998. Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiology* 118: 27-36.
- Peng J, Harberd NP.** 2002. The role of GA-mediated signaling in the control of seed germination. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 376-381.
- Petruzzelli L, Muller K, Hermann K, Leubner-Metzger G.** 2003. Distinct expression patterns of beta-1,3-glucanases and chitinases during the germination of Solanaceous seeds. *Seed Science Research* 13: 139-153.
- Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M.** 2012. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* 110, 767–776.
- Poppe C, Sweere U, Drumm-Herrel H, Schafer E.** 1998. The blue-light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 465-471.
- Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Hauser B, Caboche M.** 1995. Tomato contains two differentially expressed genes encoding B-type phytochromes, neither of which can be considered an ortholog of *Arabidopsis* phytochrome B. *Planta* **197**, 203–206.
- Pratt LH, Cordonnier-Pratt MM, Kelmenson PM, Lazarova GI, Kubota T, Alba RM.** 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell & Environment* 20, 672–677.
- Quail PH.** 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology* 14: 180-188.
- Quintero FJ, Blatt MR, Pardo JM.** 2000. Functional conservation between yeast and plant endosomal Na⁺/H⁺ antiporters. *FEBS Letters* 471: 224-228.
- Sakamoto K, Briggs WR.** 2002. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723–1735.

- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshiba T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E.** 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *Plant Journal* 48, 354–366.
- Sharma P, Chatterjee M, Burman N, Khurana JP.** 2014. Cryptochrome 1 regulates growth and development in Brassica through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant, Cell & Environment* 37: 961-977.
- Somers DE, Schultz TF, Milnamow M, Kay SA.** 2000. ZEITLUPE encodes a novel clock-associated PAS protein from *Arabidopsis*. *Cell* 101: 319-329.
- Taiz L, Zeiger E.** 2002. *Plant Physiology*, 3rd ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A.** 2015. *Plant Physiology and Development*, 6th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Takagi S, Kong SG, Mineyuki Y, Furuya M.** 2003. Regulation of actin-dependent cytoplasmic motility by type II phytochrome occurs within seconds in *Vallisneria gigantea* epidermal cells. *Plant Cell* 15: 331-345.
- Whitelam GC, Devlin PF.** 1997. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant, Cell & Environment* 20, 752–758.
- Xu P, Ma Z.** 2009. Plant cryptochromes employ complicated mechanisms for subcellular localization and are involved in pathways apart from photomorphogenesis. *Plant Signalling and Behavior* 4:3, 200-201.
- Xu P, Xiang Y, Zhu H, Xu H, Zhang Z, Zhang C, Zhang L, Ma Z.** 2009. Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses. *Plant Physiology* 149: 760-774.
- Yang HQ, Tang RH, Cashmore AR.** 2001. The signalling mechanism of *Arabidopsis* CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell* 13, 2573–2587.

Zhong H, Lauchli A. 1994. Spacial distribution of solutes, K, Na, Ca and their deposition rates in the growthzone of primary cotton roots: Effects of NaCl and CaCl₂. *Planta* 194: 34-41.

Zhou YH, Zhang YY, Zhao X, Yu HJ, Shi K, Yu JQ. 2009. Impact of light variation on development of photoprotection, antioxidants, and nutritional value in *Lactuca sativa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57: 5494–5500.

9. Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
BL	<i>blue light</i> , modré světlo
COP1	<i>Constitutively photomorfogenic 1</i>
CRY	krytochrom
D	tma
FR	<i>far red</i> , dlouhovlnné červené světlo
GA	gibereliny
MS médium	bazální médium podle Murashige a Skoog
P _{FR}	aktivní forma fytochromu
P _R	neaktivní forma fytochromu
PHOT	fototropin
PHY	fytochrom
RL	<i>red light</i> , červené světlo
STK	serine/threonin kináza
WL	<i>white light</i> , bílé světlo
ZTL	ZEITLUPE