

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Bakalářská práce

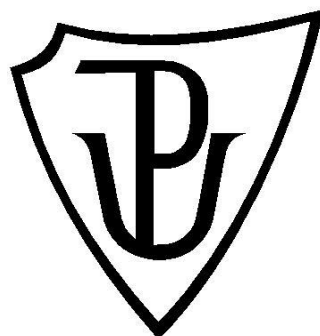
OLMOUC 2015

Kateřina Kolářová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Fyziologická analýza dvojitého mutanta *7B-1cry1-1* rajčete
Solanum lycopersicum L.**

Bakalářská práce

Kateřina Kolářová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

OLOMOUC 2015

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

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci „Fyziologická analýza dvojitého mutantu *7B-Icry1-1* rajčete *Solanum lycopersicum* L.“ vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph. D. na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci s použitím uvedené literatury v závěru práce.

V Olomouci, dne

.....

Souhrn

Cílem bakalářské práce bylo pomocí molekulárních a fyziologických metod studovat zapojení genů *7B-1* a *CRY1* v růstu rostlin na modrém světle a v odolnosti klíčení semen vůči abiotickým stresům ovlivňované modrým světlem. Dvojitý mutant byl použit ke studiu proto, abychom zjistili, zda a jak geny *7B-1* a *CRY1* v těchto reakcích spolu funkčně interagují. Teoretická část se věnuje klíčení a růstu rostlin, stresovým faktorům a mutacemi *7B-1*, *cry1-1* a *7B-1cry1-1*. Experimentální část je věnována studiu klíčení semen pěti genotypů ve tmě a na modrém světle a vlivu osmotického stresu a zasolení na klíčení semen. Na základě výsledků našich experimentů bylo potvrzeno, že funkční gen *7B-1* zprostředkovává inhibiční vliv modrého světla na klíčení semen rajčete a rovněž zprostředkuje vliv modrého světla na zvyšování citlivosti semen k inhibičnímu účinku osmotického stresu a zasolení. Naše výsledky vedou dále k závěru, že receptor modrého světla *CRY1* není zapojen v regulaci klíčení modrým světlem a ani neovlivňuje citlivost semen k osmotickému stresu a zasolení. Pokud tedy není *7B-1* přímo receptorem modrého světla, tak regulace klíčení modrým světlem musí být zprostředkována jinými specifickými fotoreceptory modrého světla, např. fototropiny.

Summary

The aim of this bachelor thesis was to study by molecular and physiological methods involvement of genes *7B-1* and *CRY1* in plant growth in blue light and tolerance of seed germination to abiotic stresses influenced by blue light. The double mutant was used in order to determine whether and how the genes *7B-1* and *CRY1* can functionally interact each to other in these responses. The theoretical part of the thesis deals with germination and plant growth, stress factors and mutations *7B-1*, *cry1-1* and *7B-1cry1-1*. The experimental part is devoted to study of seed germination in five genotypes in the dark and in blue light conditions and effect of osmotic stress and salinity on seed germination. Based on the results of our experiments it was confirmed that functional gene *7B-1* mediates the inhibitory effect of blue light on seed germination, and more that it mediates the influence of blue light on increasing of seed sensitivity to the inhibitory effect of osmotic stress and salinity. Also, our results led to conclusion that blue light receptor CRY1 is not involved in regulation of seed germination by blue light and it neither affects seed sensitivity to osmotic stress and salinity. So, if *7B-1* does not code for a blue light receptor, then the regulation of germination by blue light has to be mediated by other blue light-specific fotoreceptors, such as phototropins.

V této části bych chtěla poděkovat členům Skupiny molekulární fyziologie Mgr. Renátě Plotzové a Mgr. Janě Balarynové za pomoc při práci v laboratoři a také za jejich cenné rady.

Velké poděkování patří především doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za trpělivost, podporu, cenné rady a také čas strávený pro konečné zpracování bakalářské práce.

Obsah

1	Úvod a cíl práce.....	7
2	Problematika řešená v současnosti.....	9
2.1	Klíčení a růst rostlin.....	9
2.2	Stresové faktory.....	10
2.2.1	Osmotický stres.....	10
2.2.2	Vliv světla na růst rostlin.....	11
2.3	Mutant rajčete <i>7B-1</i>	16
2.3.1	Původ mutantu <i>7B-1</i>	16
2.3.2	Reakce mutantu <i>7B-1</i> na modré světlo.....	16
2.4	Mutant rajčete <i>cry1-1</i>	17
2.5	Dvojitý mutant rajčete <i>7B-1cry1-1</i>	18
3	Materiál a metodika.....	19
3.1	Rostlinný materiál.....	19
3.2	Pracovní postupy.....	19
3.2.1	Příprava MS média.....	19
3.2.2	Příprava MS média s manitolem.....	20
3.2.3	Sterilizace a výsev semen.....	21
3.2.4	Stanovení klíčivosti a výpočty.....	21
3.3	Použité přístroje a chemikálie.....	22
3.3.1	Přístroje a pomůcky.....	22
3.3.2	Chemikálie a roztoky.....	22
4	Výsledky.....	23
4.1	Vliv mutace <i>7B-1</i> a <i>cry1-1</i> na klíčení semen rajčete na modrém světle.....	23
4.2	Klíčení semen rajčete v přítomnosti manitolu na modrém světle a ve tmě.....	24
4.3	Vliv mutace <i>7B-1</i> a <i>cry1-1</i> na citlivost semen k NaCl na modrém světle a ve tmě.....	28
5	Diskuze.....	33
6	Závěr.....	35
7	Seznam zkratk.....	36
8	Seznam použité literatury.....	38

1 Úvod a cíl práce

Důležitým faktorem prostředí působícím na rostlinu je světlo. Je to zdroj energie pro rostliny (fotosyntéza), ovlivňuje pohyby a fototropismus, a kontroluje růst, vývoj a diferenciaci rostlin (fotomorfogeneze) (Schäfer and Nagy, 2006). Světlo, sloužící jako signál a spouštějící fotomorfogenezi, je zachycováno fotoreceptory, z nichž jsou velice významné fytochromy, které absorbují především červené světlo a dále pak kryptochromy a fototropiny, které zachycují specificky modré světlo a UV-A.

Na rozdíl od červeného světla, které stimuluje klíčení fotoblastických rostlin, malá pozornost je věnována schopnosti semen vnímat kratší vlnové délky a vlivu modrého světla na klíčení semen, i když existují důkazy, že semena jsou schopna modré světlo vnímat (Goggin *et* Steadman, 2012). V závislosti na druhu rostliny modré světlo může stimulovat (např. u *Acacia catechu*) nebo inhibovat (např. u *Amaranthus caudatus*) klíčení semen (Agrawal *et* Prakash, 1978; Nowak *et al.*, 1978). Bylo zjištěno, že modré světlo inhibuje klíčení semen rajčete a *Arabidopsis* a také může zvyšovat inhibiční účinek osmotického stresu na klíčení těchto rostlin (Fellner *et* Sawhney, 2002).

Recesivní mutant rajčete *7B-1*, který byl izolován pro svou samčí sterilitu projevující se pouze při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy (Sawhney, 1997), je odolnější vůči biotickému a abiotickému stresu díky nadprodukci kyseliny abscisové (Fellner *et* Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2009). Má vyšší toleranci ke stresu, jež je specificky zvýrazněna na modrém světle (Fellner *et* Sawhney, 2002). Hladiny rostlinných hormonů jako jsou etylen, kyselina indolyl-3-octová, gibereliny či isopentenyladenin, jsou účinkem mutace *7B-1* sníženy (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et al.*, 2005; Bergougnoux *et al.*, 2009). Funkce defektního genu *7B-1* však není dosud objasněna. Z předchozích experimentů je známo, že by se mohlo jednat o mutaci v elementu signální dráhy modrého světla zprostředkované fototropiny (Hlavinka *et al.*, 2013). Za účelem studia toho, zda by neznámý gen *7B-1* mohl být totožný s genem pro fotoreceptor modrého světla *CRY1*, bylo v minulosti provedeno reciproční křížení mutantu *7B-1* s mutantem *cry1-1* (Fellner, 2009, nepublikované výsledky) a později vyselektován dvojitý mutant *7B-1cry1-1*. Další analýzy dvojitého mutantu za účelem studia funkční interakce genů *7B-1* a *CRY1* však již nebyly prováděny.

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce s názvem „Fyziologická analýza dvojitého mutantu *7B-1cry1-1* rajčete *Solanum lycopersicum* L.“ bylo pomocí

fyziologických metod studovat zapojení genů *7B-1* a *CRY1* v růstu rostlin na modrém světle a v odolnosti klíčení semen vůči abiotickým stresům ovlivňované modrým světlem. Dvojitý mutant byl použit ke studiu proto, abychom zjistili, zda a jak geny *7B-1* a *CRY1* v těchto reakcích spolu funkčně interagují.

Má bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí pracoviště Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky. Experimenty byly prováděny za finanční podpory Laboratoře růstových regulátorů a pomocí finančních prostředků z projektu OPVK „Podpora vytváření excelentních výzkumných týmů a intersektorální mobility na Univerzitě Palackého v Olomouci“ (č. projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0004).

2 Problematika řešená v současnosti

2.1 Klíčení a růst rostlin

Vegetativní fáze vývoje rostlin začíná v embryogenezi, ale vývoj jako takový probíhá po celý život rostlin. Klíčení začíná příjmem vody suchým semenem a je dokončeno proražením osemení prodlužujícím se kořínkem. Embryo spouští svůj vlastní růst a také poskytuje signály endospermu, které vedou k oslabení fyzikálního omezení vyvolaného jeho působením na embryo (Tatematsu *et al.*, 2008).

Nejprve semeno přijímá vodu, tím se tedy zvětšuje a často je to doprovázeno prasknutím osemení. Tento proces je rozdělen do tří fází – první fáze (fáze I) je charakteristická příjmem vody, druhá fáze (fáze II) se nazývá plató a ve třetí fázi (fáze III), kde nastává prodlužování embryonální osy, dochází opět ke zvýšenému příjmu vody (Schopfer *et Plachy*, 1984; Bewley, 1997; Manz *et al.*, 2005).

U semen bez endospermu nebo semen *Arabidopsis*, kde je v semeni jen jedna vrstva buněk endospermu, je embryo kryto pouze osemením, které může (v případě *Arabidopsis*) či nemusí (například v případě hrachu) představovat omezení pro růst radikuly. Semena s endospermem mají další omezující strukturu, a tím je právě zmiňovaný endosperm. Prasknutí endospermu je hlavní proces pro úspěšné klíčení například u semen *Asteraceae* (u salátu), *Solanaceae* (u rajčete) a *Rubiceae*. Narušení endospermu probíhá enzymatickou hydrolýzou (Tatematsu *et al.*, 2008).

Na regulaci klíčení se podílí řada rostlinných hormonů, např. kyselina abscisová (ABA), auxiny, brasinosteroidy (BRs), gibereliny (GAs), a další. V první fázi klíčení u všech semen převažuje anaerobní dýchání, o čemž svědčí vysoká aktivita alkoholdehydrogenázy (Procházka *et al.*, 1998). V další fázi, takzvané růstové fázi, dochází k dlouhivému růstu v embryu prudkým zvýšením rychlosti respirace a mobilizace zásobních látek, kterých se účastní gibereliny. Tyto hormony indukují syntézu enzymů, které hydrolyzují a mobilizují zásobní látky v endospermu nebo v dělohách. Zásobní látky pro vyvíjející se embryo jsou produkty hydrolýzy a slouží jako živiny. Vyklíčené semeno je to, u kterého radikula prorazila testu, což závisí na růstu embrya řízeným příjmem vody (Kucera *et al.*, 2005). Proražení testy je velmi důležité a dochází k němu v místě mikropyle (Pavlová, 2005).

2.2 Stresové faktory

Existuje mnoho faktorů ovlivňujících klíčení a růst a ne všechny působí v optimální hladině. Stresové faktory lze rozdělit na biotické, které zahrnují působení jiných organismů a abiotické, do nichž patří například nízká či vysoká teplota, nedostatek či nadbytek vody, zasolení či osmotický stres. Abiotické stresy významně snižují výnos hospodářských plodin, a proto je nutné poznat mechanismy, jakými abiotické stresy na rostliny fungují a jakým způsobem je rostliny dokáží do určité míry tolerovat.

2.2.1 Osmotický stres

Osmotický stres je vyvolán koncentrací osmoticky aktivních iontů v půdě. Zakládá se na principu osmózy, kdy nedochází k rozptylu látek v prostoru, ale rozpouštědlo (voda) přechází do míst s vyšší koncentrací osmoticky aktivních látek. Tento děj probíhá přes semipermeabilní membránu a tímto způsobem se rostlina snaží vyrovnat osmotický tlak vnějšího prostředí. Při vysokém osmotickém tlaku vnějšího prostředí (hypertonické prostředí) dochází k omezení růstu či záhybu rostliny. V tomto prostředí dochází k výdeji vody z rostliny a protoplast se smršťuje a odděluje od buněčné stěny (plazmolýza). Osmoticky aktivní ionty jsou rozpuštěny ve vodě nacházející se v půdě a obecně lze říci, že v přirozených podmínkách je osmotický stres způsoben zasolením půdy.

Osmotické prostředí, vůči buňce, může být dále hypotonické a isotonické. Hypotonické prostředí je takové, kde vnější prostředí obsahuje nižší množství osmoticky aktivních iontů než je v rostlině. V tomto prostředí rostlina přijímá vodu, nastává „zředování“ buněčných roztoků a zvýšení nitrobuněčného tlaku (turgoru), přičemž může dojít až k plazmoptýze (prasknutí buňky). Izotonické prostředí je prostředí se stejným obsahem osmoticky aktivních látek.

2.2.2 Vliv světla na růst rostlin

Světlo patří mezi jeden z nejdůležitějších faktorů, které působí na rostlinu. Světlo je viditelné elektromagnetické záření, o vlnových délkách 380-740 nm (Pavlová, 2005). Pro rostliny je to zdroj energie, důležitý pro fotosyntézu. Světlo však působí i jako signál. V tomto případě kontroluje růst, vývoj a diferenciaci rostlin (fotomorfogeneze) (Schäfer *et Nagy*, 2006).

Oblasti spektra s nejvýznamnějším vlivem na růst a vývoj rostlin je oblast modrého světla (BL), jehož vlnové délky se pohybují v rozmezí 400-500 nm, dále oblast červeného světla (R) s vlnovou délkou (650-680nm) a nakonec oblast dlouhovlnného červeného světla (FR) s vlnovou délkou v rozmezí 710-740 nm (Russell *et al.*, 2013). Červená krátkovlnná a dlouhovlnná světla jsou zachycována fotoreceptory zvanými fytochromy a tyto fytochromy jsou schopny absorbovat i světlo modré. Základními specifickými receptory pro modré světlo jsou pak kryptochromy, fototropiny a zeaxantin. Modré světlo způsobuje u rostlin rychlé reakce, např. změny v membránovém potenciálu, nebo více či méně pomalejší reakce, jako jsou inhibice v prodlužování hypokotylu, fototropismus, otevírání průduchů, pohyb chloroplastů, produkci antokyanů a další (Russell *et al.*, 2013). Dále pak existují světla ultrafialová a jsou rozdělena na UV-A s vlnovou délkou 400-320 nm, UV-B s vlnovou délkou 320-280 nm a UV-C s vlnovou délkou 280-100 nm.

Na rozdíl od červeného světla, které stimuluje klíčení fotoblastických rostlin, malá pozornost je věnována schopnosti semen vnímat kratší vlnové délky a vlivu modrého světla na klíčení semen. Existují důkazy o tom, že semena jsou schopna modré světlo vnímat (Goggin *et Steadman*, 2012). V závislosti na druhu rostliny modré světlo může stimulovat (např. u *Acacia catechu*) nebo inhibovat (např. u *Amaranthus caudatus*) klíčení semen (Agrawal *et Prakash*, 1978; Nowak *et al.*, 1978). Bylo zjištěno, že modré světlo inhibuje klíčení semen rajčete (Fellner, nepublikované výsledky). V některých případech jsou reakce semen k modrému světlu pravděpodobně zprostředkovány fytochromem A. Bylo ukázáno, že CRY1 je zapojen v reakci klíčení semen *Arabidopsis* k silnému modrému světlu (Poppe *et al.*, 1998). V čerstvě dozrálých zrnech ječmene vede aktivace specifických receptorů modrého světla ke zvýšení exprese klíčového enzymu v syntéze ABA (HvNCED1), což vede ke zvýšení koncentrace ABA v zrnech a tak k inhibici klíčení (Gubler *et al.*, 2008). Bylo rovněž publikováno, že modré světlo má schopnost zvyšovat inhibiční účinek osmotického stresu na klíčení semen rajčete (Fellner *et Sawhney*, 2002).

Pokud semena klíčí v půdě nebo ve tmě, rostliny, které se vyvíjí, se označují jako tzv. etiolované a mají charakteristický prodloužený stonek, složené dělohy a neobsahují chlorofyl (Taiz *et* Zeiger, 2006). Tento růst ve tmě se nazývá skotomorfogeneze. Když rostlina pronikne na povrch půdy a začne na ni působit světlo, tak nastává rychlá změna formy rostliny. Tento proces se nazývá fotomorfogeneze. V tuto chvíli se zpomalí prodlužování hypokotylu, zvětšují se dělohy, vyvíjí se chloroplasty a zvětšují se listy. Ke spuštění fotomorfogeneze je velice důležité, aby klíčící rostlina měla vyvinuty potřebné fotoreceptory a mohla změnit expresi genů ve prospěch genů spojených s fotomorfogenezí. V regulaci růstu rostlin jsou zapojeny tyto receptory:

- 1) fytochromy absorbující R a FR
- 2) fototropiny a kryptochromy absorbující modré světlo a UV-A (Russell *et al.*, 2013).

2.2.2.1 Fytochromy

Fytochromy jsou modré proteinové pigmenty, které vytvářejí dimery. V elektronovém mikroskopu se jeví, jako písmeno Y. Existují fytochromy A, B, C, D a E. Fytochrom je biliprotein, který obsahuje 120 kDa velký apoprotein a fotoreaktivní prostetickou skupinu zvanou chromofor. Chromofor je lineární tetrapyrrol, fytochromobilin, který detekuje barvu, intenzitu, směr a periodicitu světla. Fytochromobilin je strukturálně příbuzný, ať už biosyntézou nebo cyklickými tetrapyroly, hemu a chlorofylu a je syntetizován v plastidech. Z plastidů putuje do cytoplazmy, kde se spojí s apoproteinem. Na fytochromobilin se naváže cysteinový zbytek apoproteinu. Toto je charakteristické pro fytochromy všech vyšších rostlin. Monomery fytochromů vzniklé v cytoplazmě dimenzují v P_R formu, ta je inaktivní a po absorpci světla dochází k izomerizaci molekul fytochromu na fyziologicky aktivní formu P_{FR} . Dále dochází k přesunu molekul fytochromů z cytoplazmy do jádra, kde regulují genovou expresi. Jen malá část zůstává v cytoplazmě a ty se uplatňují při regulaci membránového potenciálu. P_R a P_{FR} absorbují také modré světlo a podílejí se na zprostředkování reakcí k modrému světlu. Zda jsou zapojeny fytochromy v reakci na modré světlo lze snadno určit díky schopnosti FR zvrátit vyvolanou reakci, protože reakce indukované fytochromy je možné zvrátit účinkem FR (Russell *et al.*, 2013).

U rostliny *Arabidopsis thaliana* byly detekovány geny kódující pět členů genové rodiny fytochromu. Jsou to *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYE* a *PHYE*. Například rýže má

pouze tři tyto geny, a to *PHYA* – *PHYC*. Fytochromy existují dvojího typu: 1) fytochromy typu I, které jsou fotolabilní a na světle rychle degradují. Jsou typické pro etiolovaná pletiva. 2) fytochromy typu II, které jsou fotostabilní. Jsou typická pro zelená pletiva. Do této skupiny se řadí fytochromy kódující geny *PHYB* – *PHYE*. Mezi fytochromy typu I se řadí fotolabilní fytochrom phyA kódovaný genem *PHYA*. Je to homodimer oproti ostatním, které jsou heterodimery. Fytochromy jsou odpovědné za řadu odpovědí, které jsou na základě intenzity světla a vlnové délky potřebné k aktivaci odpovědí rozděleny na reakce k vysoké ozáření (HIR), reakce k nízké ozáření (LFR) a reakce k velmi malé ozáření (VLFR) (Franklin *et Quail*, 2010). HIR vyžaduje účast i jiných receptorů než fytochromů a intenzita potřebná pro maximální HIR je 100 x vyšší než u LFR. HIR se dále dělí na odpovědi k blízkému a k dalekému červenému světlu. Tato odpověď se účastní elongace hypokotylu a kvetení. LFR jsou primárně regulovány phyB a VLFR jsou regulovány phyA. LFR jsou typické velkou fotoreverzibilitou R/FR a podílí se na klíčení a také pohybu listů. VLRF nevykazují typickou fotoreverzibilitu R/FR a podílí se na regulaci klíčení semen (Taiz *et Zeiger*, 2006; Franklin *et al.*, 2005).

Signální dráhy regulované fytochromy začínají v cytoplazmě, kde světlem aktivované P_{FR} formy putují do jádra a tam se naváží na proteiny jako například transkripční faktory zvané fytochrom-interagující faktor 3 (PIF3), které kontrolují expresi řady genů zapojené ve skotomorfogenezi a fotomorfogenezi (Franklin *et Quail*, 2010). PIFs interagují s P_{FR} formou fytochromu a zprostředkovává přenos fytochromu do jádra. Jeden z hlavních regulátorů procesu fotomorfogeneze je protein COP1 (Constitutive Photomorphogenesis 1), který také interaguje s fytochromy i kryptochromy. Potlačuje fotomorfogenezi degradací (ubikvitinací) proteinů, transkripčních faktorů, které regulují expresi fotomorfogenních genů (Franklin *et al.*, 2005).

2.2.2.2 Kryptochromy

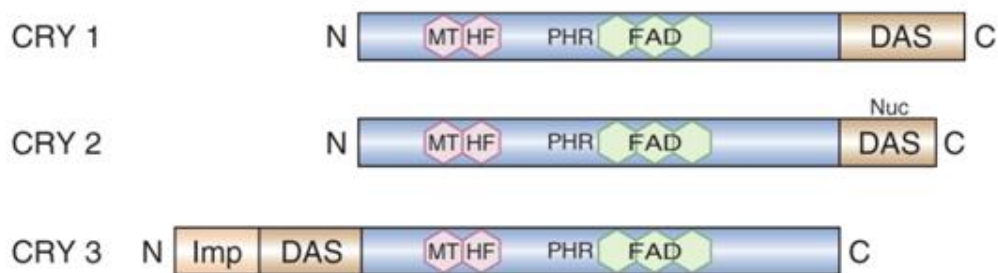
Kryptochromy jsou receptory pro modré a ultrafialové světlo. Jsou to flavoproteiny, které regulují například elongaci, klíčení a fotoperiodicitu vyšších rostlin. Vyskytují se i u živočichů, kde hrají velkou roli při vzniku a udržování cirkadiálních rytmů. Poprvé byly identifikovány studiem mutanta *hy4* u *Arabidopsis thaliana* s nefunkčním kryptochromem, u něhož nebylo prodlužování hypokotylu inhibováno modrým světlem. Kryptochromy jsou podobné enzymům DNA fotolyázy (PHR), které se podílejí na reparaci poškozené DNA. Avšak kryptochromy tuto schopnost nemají (Banerjee *et Batschauer*, 2005). U *Arabidopsis*

thaliana byly nalezeny kryptochromové geny *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*. Receptory *CRY1* a *CRY2* jsou zodpovědné za odpověď související s elongací hypokotylu a zvětšováním děloh, cirkadiánními rytmy a s dobou kvetení. *CRY3* se od nich strukturně liší a jeho funkce není zatím známa.

Kryptochromy jsou dimery tvořené apoproteinem a dvěma chromofory, flavinadenindinukleotid (FAD) a pterinem (methenyltetrahydrofolát, MTHF) na N-terminální doméně. Kryptochromy obsahují také C-terminální doménu, která je důležitá pro funkci fotoreceptoru. C-terminální konec zahrnuje DAS doménu. Tato doména je důležitá pro buněčnou lokalizaci a mezimolekulární interakci (např. s COP1). Na Obr. 1 jsou znázorněny kryptochromové proteiny a jejich struktura. N-terminální doména zajišťuje tvorbu homodimerů nutných pro aktivaci C-terminální domény. Homodimery se tvoří jak na světle, tak ve tmě a dimer se liší svými vlastnostmi na světle a ve tmě.

Kryptochromy se spolu s fytochromy podílí na fotomorfogenezi, avšak uspořádání a délka signální dráhy se liší. Hlavní roli v signalizaci CRY hraje světlem regulující proteinová degradace, ve které vystupuje COP1 protein, který interaguje s C-terminální doménou *CRY1* a *CRY2* za tmy a za světla (Yu *et al.*, 2009). Tento protein je nezbytný pro světlem regulující degradaci hned několika transkripčních faktorů např. bZIP protein HY5. Mechanismus degradace začíná za světelných podmínek, kdy dochází k modifikaci *CRY1*, což vede ke konformační změně COP1 uvolňující transkripční faktor HY5, který aktivuje příslušné geny. Za tmy COP1 spustí degradaci HY5. U kryptochromů se nachází další signální složky jako např. SUB1. Je to protein vázající Ca^{2+} a účastní se signalizace *CRY1*, *CRY2* a PHYA. SUB1 potřebuje k signalizaci světlem aktivovaný HY5. Ve tmě tento protein nevykazuje reakci. Kryptochromy se také podílí na aktivaci aniontových kanálů, které vedou k depolarizaci membrány.

Obr. 1: Struktura tří kryptochromů nalezených u *A. thaliana*. FAD, flavinadenindinukleotid; MTHF, pterin; PHR, fotolýasová doména; DAS motiv; Nuc značí jaderný motiv na C-terminálním konci *CRY2*; Imp indikuje organelový importní signál na N-terminálním konci *CRY3* (převzato a upraveno podle Russell *et al.*, 2013).



2.2.2.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory pro UV a modré světlo a nachází se v cytoplazmě. Skládají se z C-terminální oblasti, která zahrnuje serin/threonin kinázu a N-terminální oblast, která obsahuje dvě LOV domény. Každá tato doména je tvořena zhruba 110 aminokyselinami a označují se LOV1 a LOV2 (Obr. 2). LOV domény mají podobnou sekvenci jako proteiny bakterií a savců a mají funkci světelných, napěťových a kyslíkových senzorů. N-terminální konec váže flavinmononukleotid (FMN), který podléhá autofosforylaci v závislosti na modrém světle. Za tmy je molekula FMN kovalentně vázána k LOV doméně a po působení modrého světla FMN tvoří kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem molekuly fototropinu (Banerjee *et* Batschauer, 2005). Fototropin je znázorněn na Obr. 2.

Obr. 2: Struktura fototropinu zahrnující LOV1 a LOV2 domény (upraveno podle Russell *et al.*, 2013)



U modelového organismu *Arabidopsis thaliana* byly nalezeny dva druhy fototropinů, a to fototropin 1 (PHOT1) a fototropin 2 (PHOT2). Oba tyto fototropiny regulují fototropismus, reakci chloroplastů na intenzitu světla, iontový transport, či otevírání průduchů. Fototropin 1 má za následek rychlou inhibici růstu hypokotylu po přenosu

rostlin ze tmy na světlo. PHOT2 způsobuje vyhýbavou reakci chloroplastů za vysoké intenzity světla a zajišťuje jejich akumulaci na bázi buněk ve tmě.

2.3 Mutant rajčete *7B-1*

2.3.1 Původ mutantu *7B-1*

Recesivní mutant rajčete *7B-1* byl izolován z populace kultivaru Rutgers (WT) pro svou samčí sterilitu závislou na fotoperiodě, konkrétně na dlouhém dni (16 hod světlo a 8 hodin tma). Za krátkého dne, tedy 16 hod tmy a 8 hod světla, jsou rostliny mutantu fertillní (Sawhney, 1997). Mutant *7B-1* je odolný vůči osmotickému stresu, zasolení a nízké teplotě (Fellner *et Sawhney* 2001). U WT byla pozorována inhibice klíčení při užití manitolu, PEG (polyethylenglykol) nebo solí. Mutant měl o mnoho vyšší klíčivost při působení osmotického stresu na modrém světle než standardní rostlina WT (Fellner *et Sawhney*, 2002).

2.3.2 Reakce mutantu *7B-1* na modré světlo

Bylo prokázáno, že hypokotyl mutantu *7B-1* je oproti WT méně citlivý k modrému světlu díky, zatím neznámému, defektu v signální dráze modrého světla. Mutant dále vykazuje rozdíl v de-etiolizaci, a to takový, že při ozáření modrým světlem se neredukovalo prodlužování rostliny, zvětšování děloh a listů a tvorba chloroplastů, jako tomu bylo u WT (Fellner *et Sawhney*, 2002). Epidermální buňky mutantního genotypu byly na modrém světle větší než buňky WT, přičemž ve tmě nebyl pozorován rozdíl v délce hypokotyly. Autoři tedy potvrdili, že modré světlo inhibuje prodlužování epidermálních buněk hypokotyly rajčete, přičemž genotyp *7B-1* má v tomto ohledu defekt (Bergougnoux *et al.*, 2012). Mutace genotypu *7B-1* ovlivňuje pravděpodobně aniontové kanály ve svěracích buňkách v plazmatické membráně, které se zapojují do otevírání stomat. Mutant *7B-1* má sníženou aktivitu aniontových kanálů, která je ovlivněna zvýšenou hladinou kyseliny abscisové a rezistencí vůči modrému světlu (Hlavinka *et al.*, 2013).

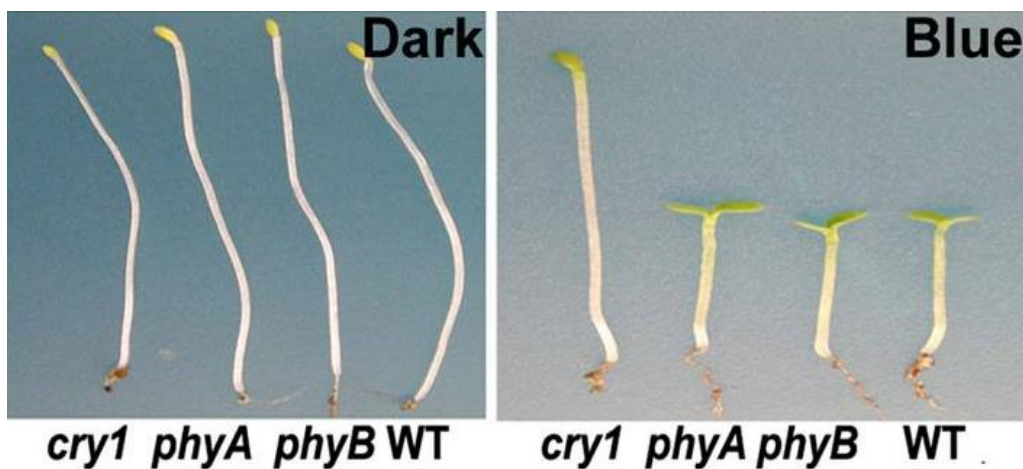
Funkce defektního genu mutantu *7B-1* není známá, ale z dosud provedených experimentů vyplývá, že jde o mutaci v signalizaci modrého světla zprostředkované

fototropiny. Mutace ovlivňuje například pohyb chloroplastů, fototropismus, ale také prodlužování hypokotylu, které je vyvolané v důsledku působení modrého světla (Bergougnoux *et al.*, 2012; Bergougnoux *et Fellner*, nepublikované výsledky).

2.4 Mutant rajčete *cry1-1*

Mutant *cry1-1* byl izolován z kultivaru Moneymaker (cv. MM). Jeho mutace byla způsobena γ -zářením a mutant vykazuje defekt v genu kódující fotoreceptor modrého světla *CRY1*. Je to monogenní mutant vykazující sníženou de-etiolizaci při působení modrým světlem (Obr. 3) (Weller *et al.*, 2001a). Gen *CRY1* hraje důležitou roli také u dospělých rostlin, kdy přispívá ke kvetení za dlouhého dne, ovlivňuje protažení internodií a množství chlorofylu v listech a plodech rajčat (Weller *et al.*, 2001b).

Obr. 3: Znázornění růstu hypokotylu na modrém světle a ve tmě u *Arabidopsis* s mutacemi *cry1*, *phyA*, *phyB* a wild-type (převzato a upraveno podle Xuhong *et al.*, 2010)



2.5 Dvojitý mutant rajčete *7B-1cry1-1*

Dvojitý mutant *7B-1cry1-1* vznikl zkřížením mutantů *7B-1* a *cry1-1* (Fellner, nepublikované výsledky). Mutant *7B-1* má defektní morfologii květu a *cry1-1* má výrazně světlý a malý plod. Bylo zjištěno, že tyto dva znaky se dědí monogenně a recesivně. Double mutant byl také porovnáván s křížencem kultivarů Rutgers a Moneymaker a po 74 dnech od výsevu, měl mutant *7B-1cry1-1* značně větší vzrůst než kříženec Rutgers a Moneymaker (Humplík, nepublikované výsledky).

3 Materiál a metodika

3.1 Rostlinný materiál

Pokusy byly provedeny na semenech pěti genotypů rajčete *Solanum lycopersicum* L. a jeho mutantech. Použiti byli tito mutanti rajčete a jim odpovídající standardní rostliny (wild-type, WT). Spontánní recesivní „single gene“ mutant *7B-1* s doposud neznámým defektem v signální dráze modrého světla (Fellner *et* Sawhney 2002; Hlavinka *et al.*, 2013) byl vyselektován na základě samčí sterility projevující se za dlouhého dne (fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma). Za krátkého dne (fotoperioda 8 hodin světlo, 16 hodin tma) jsou rostliny fertillní. Odpovídající WT tohoto mutanta je kultivar Rutgers (Sawhney, 1997). Mutant byl poskytnut na základě licence V. K. Sawhney z Univerzity of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. Dále byl použit mutant *cry1-1* s defektem v genu kódující kryptochrom1 (CRY1; Weller *et al.*, 2001) a k němu odpovídající WT je kultivar Moneymaker (cv. MM). Tento mutant byl vytvořen ozářením rostlin Moneymaker γ -paprsky. Mutant byl poskytnut R. E. Kendrickem z Wageningen University, Wageningen, The Netherlands. Dále byl použit dvojitý mutant *7B-1cry1-1*, jenž byl vyselektován z populace potomstva křížení mutantů *7B-1* a *cry1-1* a který obsahoval současně defekty obou mutantů (Humplík nepublikované výsledky).

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava MS média

Pro přípravu 2 l pevného (agarového) kultivačního média Murashige-Skoog (MS) (Murashige *et* Skoog, 1962) bylo použito 20 g 1% sacharózy, 8,66 g MS média (Caison Labs, USA), 0,3904 g 1mM MES pufru a 2,8 g 0,7% fytoagaru. V Erlenmeyerově baňce bylo postupně rozpuštěno v 1,5 l destilované vody dané množství sacharózy, MS média a MES pufru. Po promíchání byl objem doplněn na 2 l a následně upraveno pH pomocí 1M KOH na hodnotu 6,1.

Médium bylo následně rozděleno po 400 ml do pěti termolahví o objemu 500 ml. V každé z nich bylo 2,8 g (tj. 0,7%) agaru. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po vychladnutí byly termoláhve s médiem uchovávány v lednici.

Před použitím bylo médium rozehráno v mikrovlnné troubě. V případě experimentů se zasolením, bylo do částečně zchladlého média za sterilních podmínek v laminárním boxu přidáváno požadované množství sterilního zásobního roztoku 5M NaCl tak, aby výsledné koncentrace byly 25 a 75 mM. Pro koncentraci 25 mM bylo do 200 ml média přidáno 1 ml 5M NaCl a pro koncentraci 75 mM bylo do 20 ml média přidáno 3 ml 5M NaCl.

3.2.2 Příprava MS média s manitolem

Pro přípravu 2 l pevného kultivačního média MS s manitolem byly použity stejné ingredience a stejný postup, jak byl popsán výše, s tím, že místo NaCl byl do média přidán manitol, a to v takovém množství, aby výsledné koncentrace manitolu v médiu dosahovaly hodnot 50, 70 a 100 mM (viz Tabulka č. 1). Na rozdíl od NaCl byl manitol přidán do média ještě před sterilizací autoklávováním. Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu a poté uchováváno v lednici do doby vlastního použití.

Tab. č. 1: Navážka manitolu k požadované koncentraci.

Koncentrace manitolu (mM)	Navážka manitolu (g)
50	18,22
70	25,51
100	36,44

3.2.3 Sterilizace a výsev semen

Požadovaný počet semen každého genotypu byl za občasného protřepání sterilizován v plastových centrifugačních zkumavkách (objem 50 ml) po dobu 30 minut ve zředěném roztoku Savo (Bochemie a.s.) obsahujícím 3% hypochloridu sodného. Poté byla semena pomocí 10ml pipety šestkrát promyta sterilní destilovanou vodou. Všechny operace byly prováděny ve flow-boxu za sterilních podmínek.

Následně byla semena vyseta pomocí pinzety sterilizované v 96 % ethanolu a ožehnuté nad plamenem na MS médium umístěné v kulatých plastových Petriho miskách (průměr 90mm, 20 ml média v jedné misce). Bylo vždy vyseto 30 semen na jednu Petriho misku. Po výsevu byly misky oblepeny dokola dvěma vrstvami pásky SoftPore (Batist s.r.o.) z netkané textilie. Všechny misky se semeny byly vertikálně uloženy do růstové kultivační komory (Snijders Scientific, Nizozemsko). Semena byla kultivována při stálé teplotě 23 °C a na kontinuálním modrém světle. Zdrojem modrého světla s maximem ozáření při 460 nm byly modré zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Phillips, USA). Pro kultivaci semen kultivovaných ve tmě byly misky zabaleny do alobalu.

3.2.4 Stanovení klíčivosti a výpočty

Semena kultivovaná na základním médiu začínala klíčit 3. – 4. den po vysetí, a proto také bylo zahájeno sčítání klíčících semen až 3. den. Sčítání probíhalo 7 dní od vysetí, jež bylo stanoveno jako dostatečné řadou přechozích pokusů. Byly porovnávány rozdíly mezi genotypy s rozdílnými světelnými podmínkami a také s rozdílnými koncentracemi dané látky v médiu. Získané hodnoty klíčení byly zapsány do programu MS Excel 2010 a byly vypočítány průměrné hodnoty se standardní chybou (SE), které byly nadále vyneseny do grafů.

3.3 Použité přístroje a chemikálie

3.3.1 Přístroje a pomůcky

pH metr WTW pH 526

flow-box Holter LaminAir model 1,2

kultivační komora, Snijders Scientific, Nizozemsko

míchačka, P-Lab a.s.

automatická pipeta (10 ml)

3.3.2 Chemikálie a roztoky

Médium Murashige *et* Skoog, 1962, Caison Labs

Sacharóza Lach-Ner s.r.o.

Fytoagar, Duchefa Bohemie

MES pufr, SERVA Electrophoresis GmbH

Savo, Bochemie, s.r.o.

Manitol, Duchefa Bohemie

NaCl, Lach-Ner s.r.o.

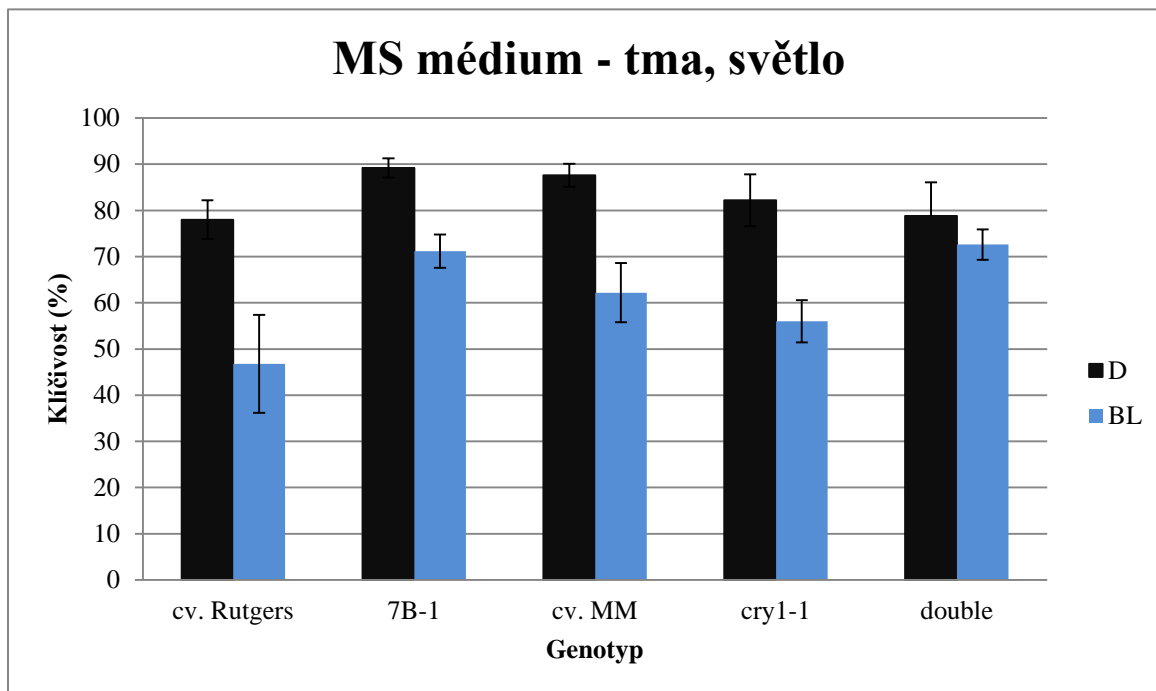
4 Výsledky

Mutant *7B-1* se na rozdíl od mutanta *cry1-1* vyznačuje zvýšenou tolerancí ke stresům specificky na modrém světle. Zatímco CRY1 je specifickým receptorem modrého světla, funkce produktu *7B-1* zatím není známa. Bylo však zjištěno, že *7B-1* hraje úlohu v signalizaci modrého světla. Cílem této bakalářské práce bylo proto studovat, jak na modrém světle mohou spolu fotoreceptor CRY1 a neznámý produkt *7B-1* funkčně spolupracovat v procesu klíčení semen rajčete vystavených osmotickému stresu nebo zasolení. Pokusy se tedy prováděly na semenech mutanta *7B-1* a k němu odpovídající kontrolní rostliny cv. Rutgers, na mutantu *cry1-1* a k němu odpovídající kontrolní rostlině cv. Moneymaker a na selektovaném dvojitým mutantu *7B-1cry1-1*. Bylo sledováno klíčení semen inkubovaných ve tmě a na modrém světle za přítomnosti různých koncentrací manitolu nebo NaCl v inkubačním médiu. Hodnoty klíčení byly zaznamenávány každý den, 7 dní od výsevu a následně se z hodnot klíčivosti (v %) sestavily grafy maximálního klíčení jednotlivých genotypů v závislosti na kvalitě světla a osmotickém stresu nebo zasolení.

4.1 Vliv mutace *7B-1* a *cry1-1* na klíčení semen rajčete na modrém světle

Obr. 4 a 5 ukazují maximální klíčivost semen rajčete *Solanum lycopersicum* L. pěti genotypů za různých světelných podmínek, a to na modrém světle a ve tmě.

Obr. 4: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na základním MS médiu v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré světlo). Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze šesti nezávislých experimentů.

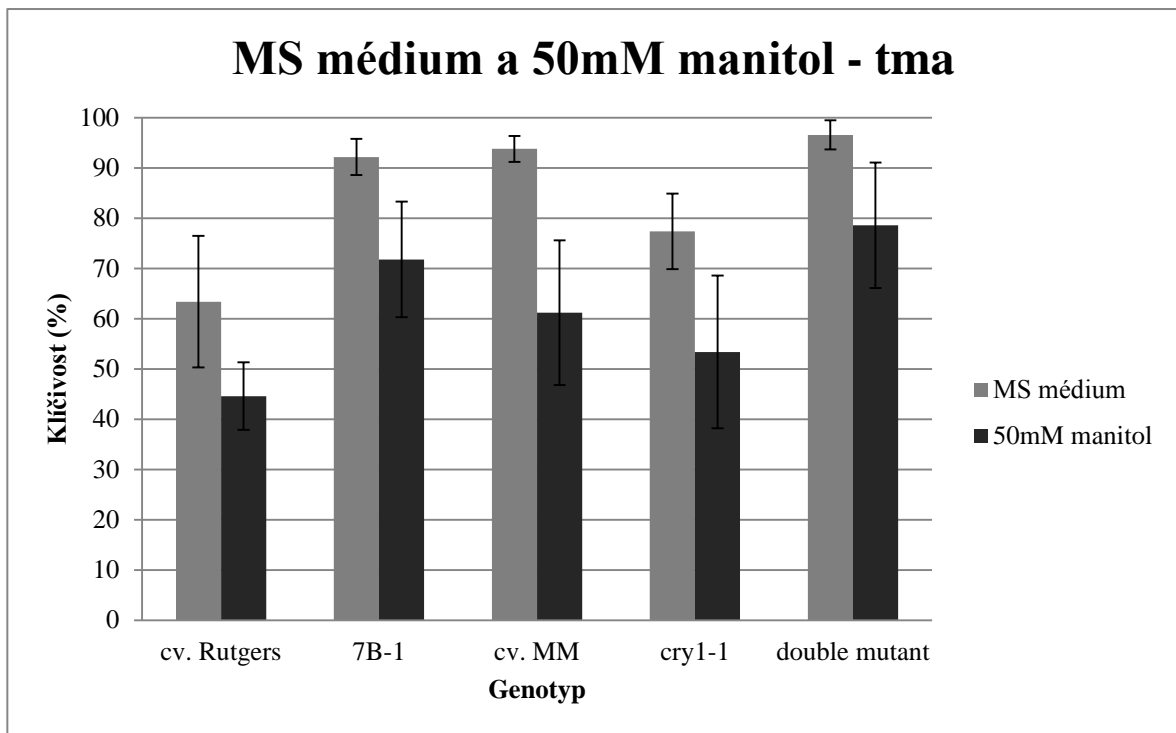


Na Obr. 4 maximální klíčivosti genotypů *Solanum lycopersicum L.* na MS médiu lze vidět rozdíly mezi kultivarem Rutgers a mutantem *7B-1*. Ve tmě je klíčení u obou genotypů podobné (mezi 78-90 %), kdežto na modrém světle je klíčení mutanta *7B-1* znatelně vyšší (72 %). U kontrolního genotypu cv. Rutgers bylo zjištěno, že BL redukuje klíčení asi o 40 %, kdežto u mutanta *7B-1* to bylo pouze o 20 %. U mutanta *cry1-1* a kontrolního kultivaru Moneymaker bylo klíčení semen ve tmě podobné, kolem 85-90 %. Na modrém světle bylo klíčení obou genotypů cv. MM i *cry1-1* výrazně inhibováno, a to konkrétně o 28 % u cv. MM a o 31 % u *cry1-1*. Maximální klíčivost double mutanta *7B-1cry1-1* ve tmě byla kolem 79 % a modré světlo klíčení inhibovalo pouze nevýrazně, asi o 8 %.

4.2 Klíčení semen rajčete v přítomnosti manitolu na modrém světle a ve tmě

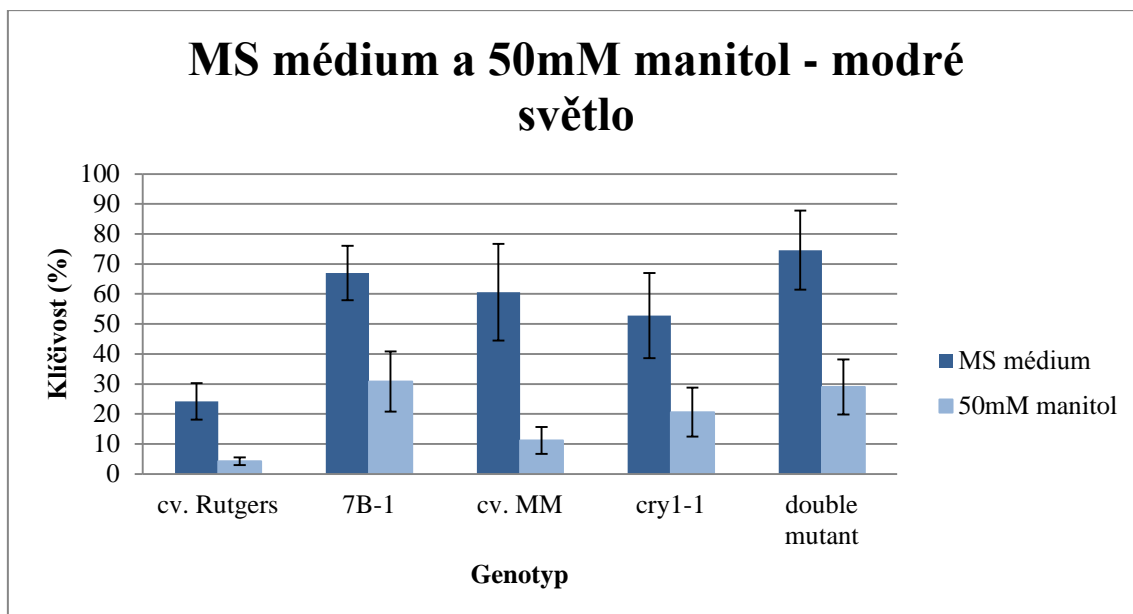
Na Obr. 5, 6, 7, 8 je znázorněno maximální klíčení jako funkce různých světelných podmínek a také koncentrace manitolu.

Obr. 5: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum L.* na MS médiu a MS médiu s přidavkem manitolu (50mM) ve tmě. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané z pěti nezávislých experimentů.



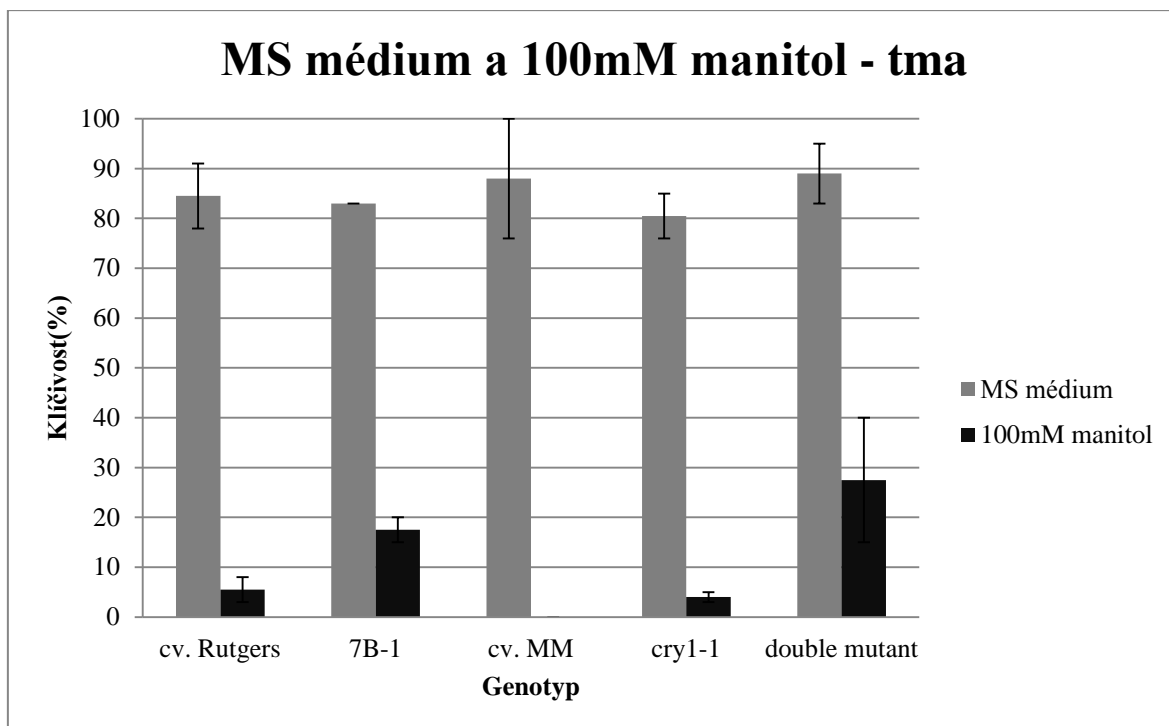
Manitol přidáný do kultivačního média v koncentraci 50 mM inhiboval klíčení semen kultivovaných ve tmě u všech testovaných genotypů rajčete (Obr. 5). Klíčení semen kultivaru Rutgers a mutanta *7B-1* bylo manitolem inhibováno podobně, a to asi o 30 % u WT a 23 % u *7B-1*. U kultivaru MM byla hodnota inhibice 34 % a mutant *cry1-1* manitol redukoval klíčení asi o 32 %. Klíčení semen dvojitého mutanta bylo k manitolu nejméně citlivé oproti ostatním genotypům, protože bylo manitolem inhibováno asi 20 % (Obr. 5).

Obr. 6: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum L.* na základním MS médiu a MS médiu s 50mM koncentrací manitolu na modrém světle. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané z pěti nezávislých experimentů.



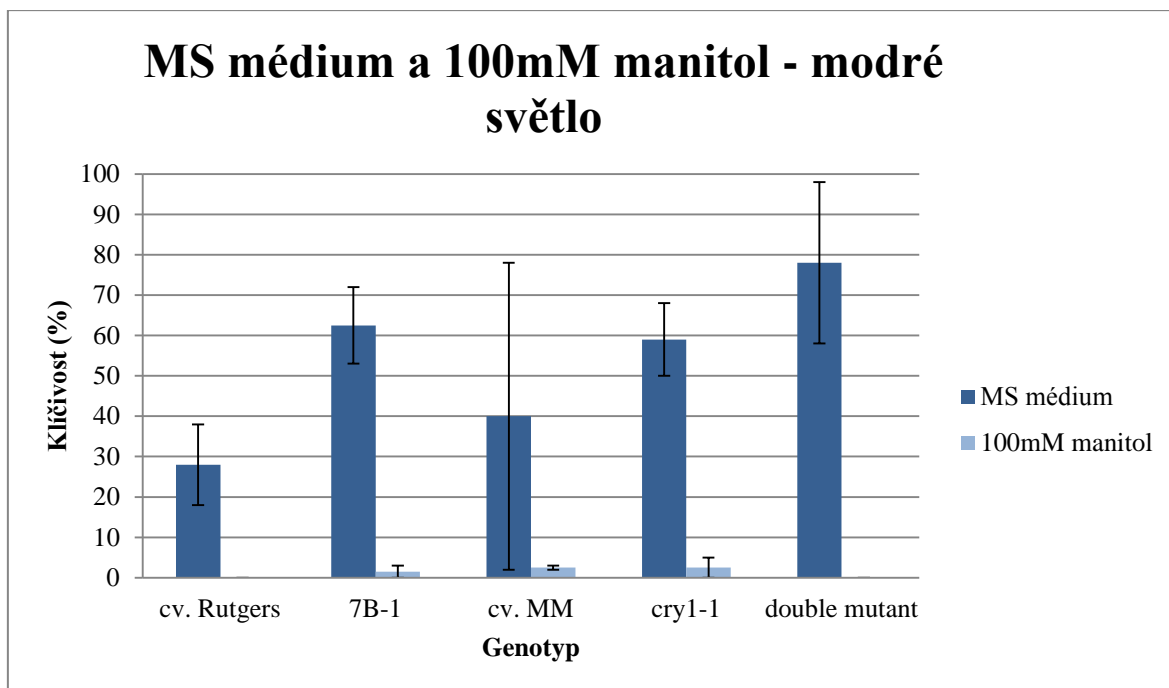
Na modrém světle byl inhibiční účinek manitolu na klíčení semen mnohem zřetelnější, a to u všech testovaných genotypů (Obr. 6). U kontrolního genotypu WT byl inhibiční účinek manitolu kolem 80 %, kdežto u mutantu *7B-1* kolem 50 %. Klíčení semen kultivaru MM bylo velmi výrazně inhibováno manitolem (asi 80 %) oproti mutantovi *cry1-1*, jehož inhibice byla asi 60 %. Klíčení semen dvojitého mutantu bylo na modrém světle inhibováno manitolem kolem 60 % (Obr. 6).

Obr. 7: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na základním MS médiu a MS médiu se 100mM koncentrací manitolu ve tmě. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.



Manitol v koncentraci 100mM, který byl přidán do MS média, je silným inhibiátorem klíčení a růstu. Z Obr. 7 lze vyčíst, že jediná semena, která překonala tuto vysokou koncentraci a klíčila, byla semena mutanta *7B-1* (inhibice klíčení 75 %) a double mutanta *7B-1cry1-1* (inhibice klíčení kolem 70 %). Naopak, u kontrolních kultivarů Rutgers a Monemaker a mutanta *cry1-1* došlo k téměř úplné (WT a *cry1-1*) či k úplné (cv. MM) inhibici klíčení semen.

Obr. 8: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na základním MS médiu a MS médiu se 100mM koncentrací manitolu na modrém světle. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.

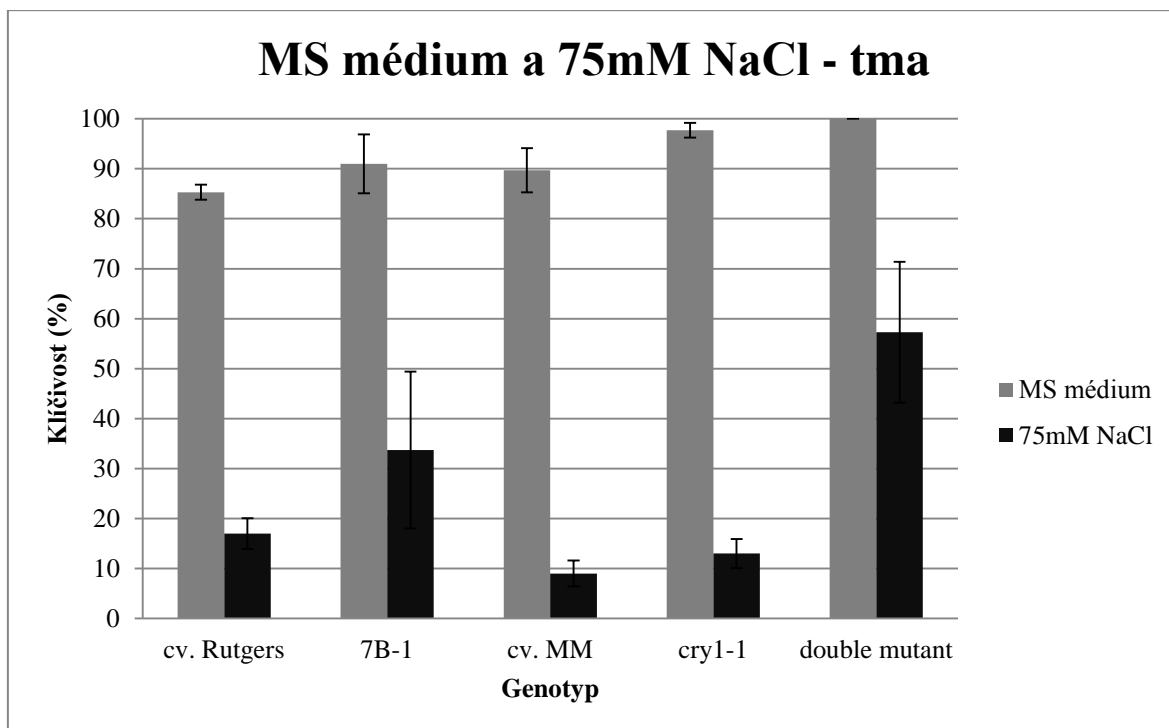


Obr. 8 ukazuje klíčení semen za působení 100mM manitolu na modrém světle. Maximální klíčení za těchto osmotických podmínek bylo prakticky nulové u všech testovaných genotypů.

4.3 Vliv mutace *7B-1* a *cry1-1* na citlivost semen k NaCl na modrém světle a ve tmě

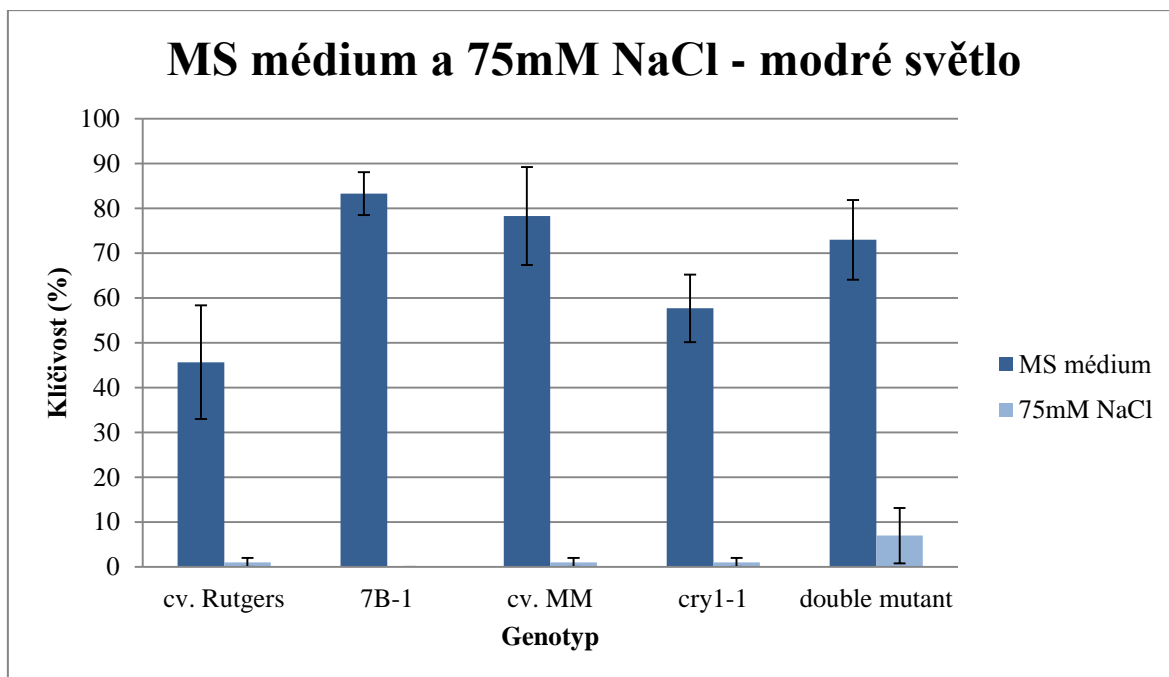
Na Obr. 9, 10, 11 a 12 je vidět maximální klíčení za různých světelných podmínek a při koncentracích NaCl 25 mM a 75 mM.

Obr. 9: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na MS médiu a MS médiu s přidavkem NaCl (75mM) ve tmě. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.



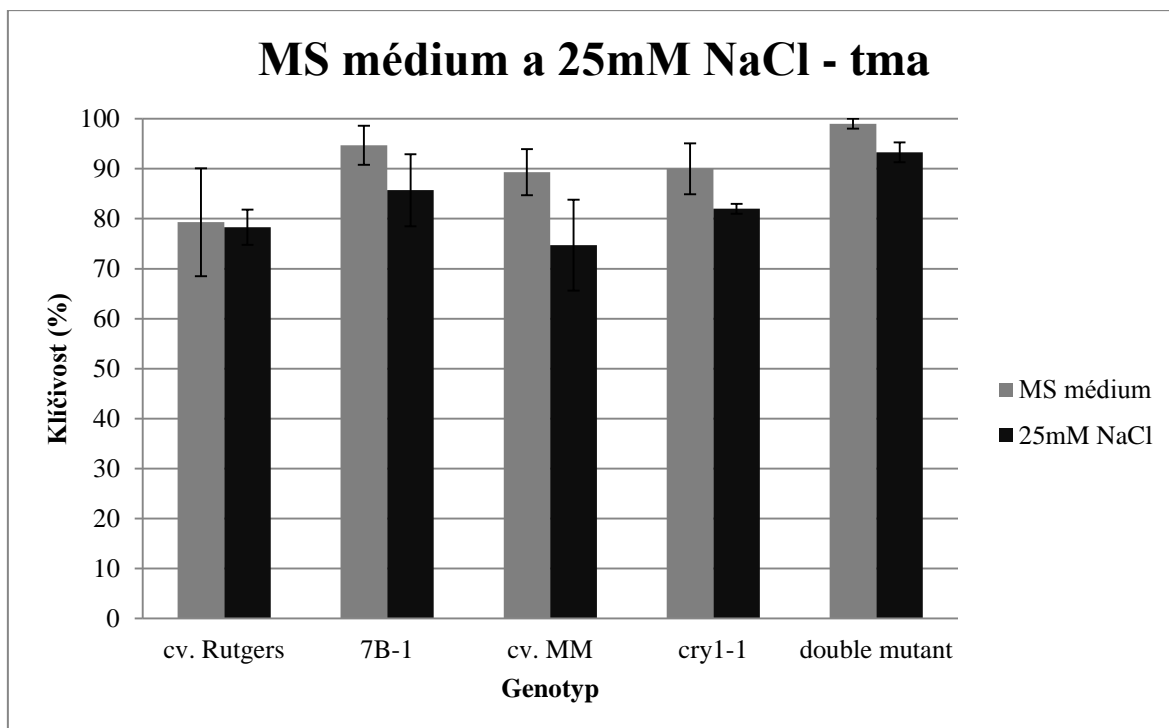
Z Obr. 9 je patrné, že ve tmě 75 mM koncentrace NaCl v médiu značně inhibovala klíčení u všech genotypů. U kultivaru Rutgers redukoval NaCl klíčení asi o 80 %, kdežto u mutantu 7B-1 o 60 %. Kultivar MM měl klíčení zredukováno vlivem NaCl o 90 %. Jeho mutant *cry1-1* byl podobně citlivý k NaCl a hodnota inhibice klíčení dosahovala téměř 85 %. Klíčení semen dvojitého mutantu bylo nejméně citlivé k NaCl, protože klíčení bylo inhibováno vlivem NaCl asi jen ze 43 %.

Obr. 10: : Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na MS médiu a MS médiu se 75mM koncentrací NaCl na modrém světle. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.



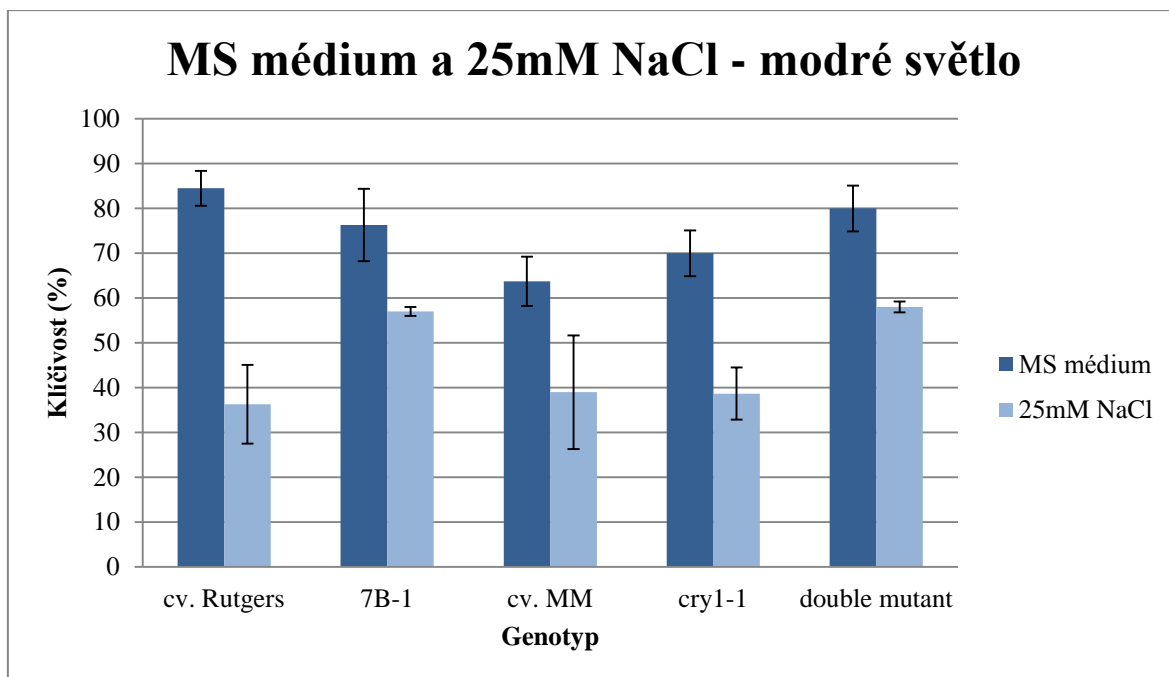
Jak je vidět na Obr. 10, modré světlo zesilovalo inhibiční účinek NaCl u všech pěti genotypů, podobně jako bylo pozorováno v případě manitolu. S výjimkou dvojitého mutanta, kde bylo pozorováno klíčení semen kolem 7 %, byly hodnoty klíčení u ostatních genotypů v podstatě nulové.

Obr. 11: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na MS médiu a MS médiu s 25mM koncentrací NaCl ve tmě. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.



Vzhledem k vysokému inhibičnímu účinku NaCl o koncentraci 75 mM na klíčení semen na modrém světle, byla koncentrace NaCl snížena na 25 mM, a bylo předpokládáno, že při této koncentraci bude možno lépe posoudit vliv mutací na citlivost klíčení semen k NaCl. Ve tmě byla max. klíčivost semen všech testovaných genotypů za přítomnosti 25 mM NaCl relativě vysoká, protože inhibice klíčení semen byly u všech genotypů nízké (max. kolem 10 %) (Obr. 11).

Obr. 12: Průměrná klíčivost pěti genotypů *Solanum lycopersicum* L. na MS médiu a MS médiu s 25 mM koncentrací chloridu sodného na modrém světle. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze tří nezávislých experimentů.



Při porovnání Obr. 12 s Obr. 11 je opět vidět, že modré světlo výrazně zesilovalo inhibiční účinek NaCl na klíčení semen. Kontrolní kultivar cv. Rutgers měl na modrém světle zredukované klíčení vlivem NaCl asi o 57 %. U mutanta *7B-1* NaCl inhiboval klíčení asi o jen o 25 %. Klíčení semen kultivaru MM bylo inhibováno 25 mM NaCl asi z 38 % a u jeho mutanta *cry1-1* to bylo asi 46 %. Klíčení semen dvojitého mutanta bylo zredukováno působením NaCl podobně jako u *7B-1*, tedy okolo 25 %.

5 Diskuze

Již dříve bylo ukázáno, že modré světlo je schopno inhibovat klíčení semen, a že zvyšuje citlivost semen rajčete k inhibičním účinkům osmotika manitolu a soli NaCl (Fellner *et Sawhney*, 2002). V této bakalářské práci byl použit mutant *7B-1* a k němu kontrolní WT cv. Rutgers. Mutant *7B-1* má defekt v signální dráze modrého světla a vyznačuje se tím, že inhibice klíčení semen modrým světlem je u něj, ve srovnání s kontrolního genotypu cv. Rutgers, snížena. Mutace *7B-1* také způsobuje, že zesilovací efekt BL na inhibiční účinky manitolu a NaCl jsou mnohem slabší než u WT (Fellner and Sawhney 2002). Dále byl použit mutant *cry1-1* a jeho kontrolní rostlina cv. Moneymaker. Mutant *cry1-1* má defekt v genu kódující fotoreceptor modrého světla *CRY1*. Dřívější expresní analýzy prokázaly, že gen *7B-1* není totožný s genem *CRY1* (Sheoran *et al.*, 2006; Fellner, nepublikované výsledky). Zajímalo nás tedy, jaký je funkční vztah mezi geny *7B-1* a *CRY1* právě v reakcích klíčení semen k osmotickému stresu a zasolení, např. zda mutace v receptoru *CRY1* ovlivňuje funkci *7B-1*. Z tohoto důvodu byl již dříve vyselektován dvojitý mutant *7B-1cry1-1* (Fellner, Humplík, nepublikované výsledky). V bakalářské práci byla tedy semena tohoto dvojitého mutanta testována pro citlivost klíčení k manitolu či NaCl. Protože jsme k dvojitému mutantu neměli k dispozici odpovídající kontrolní genotyp (dvojitého WT cv. Rutgers x cv. MM), byl pro porovnávání reakcí stanoven modelový (umělý) dvojitý mutant z wild-typů cv. Rutgers a cv. MM, a to tak, že hodnoty klíčení získané pro cv. Rutgers a cv. MM byly zprůměrovány. S těmito průměrnými hodnotami pak byly srovnávány hodnoty získané experimentálně u dvojitého mutanta *7B-1cry1-1*.

Nejdříve byla testována citlivost klíčení semen dvojitého mutanta k modrému světlu. Zatímco semena mutanta *7B-1* byla asi o 50% méně citlivá k inhibičnímu účinku BL než cv. Rutgers, mutace v genu *CRY1* naopak vedla pouze k mírnému zvýšení (o 10%) citlivosti k modrému světlu ve srovnání se semeny cv. MM. Je tedy zřejmé, že receptor *CRY1* není výrazně zapojen v regulaci klíčení semen modrým světlem. Vypočítaná průměrná inhibice klíčení umělého dvojitého WT k modrému světlu byla asi 35% (tj. (cv. Rutgers 40% + cv. MM 29%)/2 = 35%). Zjištěná (naměřená) citlivost klíčení semen dvojitého mutanta k BL byla pouze 8%. Dvojitá mutace *7B-1cry1-1* tedy vedla tedy ke snížení citlivosti k BL asi o 77% vzhledem ke svému umělému dvojitému WT. Je tedy zřejmé, že snížení citlivosti semen dvojitého mutanta k modrému světlu je důsledkem mutace *7B-1*, nikoliv mutace v receptoru *CRY1*.

Podobné analýzy jsme provedli i v případě dalších měřených reakcí klíčení semen k manitolu a NaCl.

Porovnání klíčení experimentálních genotypů za přítomnosti 50 mM a 100 mM manitolu ukázalo, že ve tmě je mutant *7B-1* více tolerantní k manitolu, než odpovídající WT i tolerantnější než mutant *cry1-1*. Analýza dvojitého mutanta pak zřetelně odhalila, že u semen inkubovaných ve tmě gen *7B-1* převažuje v regulaci tolerance k manitolu svým vlivem nad genem *CRY1*.

Experimenty dále potvrdily, že i na modrém světle funkční produkt *7B-1* zvyšuje citlivost semen k manitolu, a že mutace v genu *CRY1* citlivost k manitolu neovlivňuje. Zdá se tedy, že na modrém světle, stejně jako ve tmě, gen *7B-1* rozhoduje o citlivosti semen k manitolu.

Analýzy citlivosti klíčení semen mutantů *7B-1*, *cry1-1* a dvojitého mutanta k zasolení zřetelně potvrdily, že mutace *7B-1* snižuje citlivost semen k NaCl, zatímco defekt ve fotoreceptoru *CRY1* citlivost semen k zasolení neovlivňuje. Experimenty tedy vedou k závěru, že neznámý produkt *7B-1* je v reakci k zasolení zapojen, zatímco *CRY1* nikoliv (Obr. 9 a 12).

Výsledky experimentů provedené v této bakalářské práci potvrdily to, že modré světlo má schopnost inhibovat klíčení semen rajčete *Solanum lycopersicum* L. Také bylo potvrzeno, že mutace *7B-1* snižuje inhibiční účinek modrého světla na klíčení semen rajčete. Výsledky potvrdily, že funkční produkt *7B-1* zesiluje citlivost semen rajčete k osmotickému stresu a zasolení, a to především na modrém světle. Výsledky vedly rovněž k závěru, že receptor *CRY1* není zapojen v inhibici klíčení modrým světlem a že není zapojen ani v regulaci citlivosti semen k manitolu a zasolení. Tento závěr potvrdily i provedené analýzy dvojitého mutanta *7B-1cry1*.

6 Závěr

Působení osmoticky aktivních látek, jako je manitol a NaCl, způsobuje inhibici klíčení semen. V bakalářské práci jsme potvrdili předchozí zjištění, že u rajčete modré světlo redukuje maximální klíčení semen, a že modré světlo inhibici klíčení semen manitolem či NaCl zesiluje. Výsledky experimentů potvrdily závěry, že na modrém světle funkční produkt 7B-1 o zatím neznámé funkci zvyšuje citlivost semen rajčete k osmotickému stresu a zasolení. Z našich analýz monogenních mutantů a dvojitého mutanta vyplývá nový poznatek, že receptor *CRY1* není zapojen v regulaci klíčení modrým světlem a nehraje ani úlohu v modrým světlem regulované citlivosti semen k manitolu a zasolení.

7 Seznam zkratek

ABA	kyselina abscisová
ARR4	regulátor 4 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
BL	modré světlo
BRs	brasinosteroidy
bHLH	transkripční faktor helix-smyčka-helix
CKs	cytokininy
COP1	constitutive photomorfogenesis 1
cv. MM	kultivar MoneyMaker
FAD	flavinadenindinukleotid
FR	dlohovlnné červené světlo
GAs	gibereliny
HIR	vysoce intenzivní odpověď
HY5	protein
LFR	málo intenzivní odpověď
LOV	doména v N-terminální oblasti
MES	puf
MS	Murashige and Skoog médium
MTHF	methenyltetrahydrofolát
PEG	polyethylenglykol
P _{FR}	aktivní forma monomeru fytochromů
PHOT	fototropin
PHR	DNA fotolyázy
PHYA-E	členové genové rodiny fytochromu
PIF3	fytochrom-interagující faktor 3
P _R	inaktivní forma monomeru fytochromů
UV	ultrafialové světlo
UV-A	ultrafialové světlo 420 – 320 nm
UV-B	ultrafialové světlo 320 – 280 nm
UV-C	ultrafialové světlo 280 – 100 nm
VLFR	velmi málo intenzivní odpověď
WT	wild-type

8 Seznam použité literatury

Agrawal P. K., Prakash G. (1978) Control on seed germination in some Indian trees. *Tropical Ecology* 19: 174-177

Banerjee R., Batschauer A. (2005) Plant blue-light receptors. *Planta* 220: 498-502

Bergougnoux V., Hlaváčková V., Plotzová R., Novák O., Fellner M. (2009) The *7B-1* mutation in tomato (*Solanum Lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Experimental Botany* 60: 1219-1230

Bergougnoux V., Zalabák D., Jandová M., Novák O., Wiese-Klinkenberg A., Fellner M. (2012) Effect of Blue Light on Endogenous Isopentenyladenine and Endoreduplication during Photomorphogenesis and De-Etiolation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seedlings. *PLoS ONE* 7: e45455

Bewley J. D. (1997) Seed Germination and Dormancy. *Plant Cell* 9: 1055-1066

Fellner M., Franklin J. A., Reid D. M., Sawhney V. K. (2005) Increased sensitivity to, and reduced production of ethylene in an ABA-overproducing tomato mutant. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica* 47: 205-212

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

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

Fellner M., Zhang R., Pharis R. P., Sawhney V. K. (2001) Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* 52: 725-738

- Franklin K. A., Lerner V. S., Whitelam G. C. (2005) The signal transducing photoreceptors of plants. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 653-664
- Franklin K. A., Quail P. H. (2010) Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany* 61 (1): 11-24
- Goggin D. E., Steadman K.J. (2012) Blue and green are frequently seen: Responses of seeds to short- and mid-wavelength light. *Seed Science Research* 22: 27–35
- Gubler F., Hughes T., Waterhouse P., Jacobsen J. (2008) Regulation of dormancy in barley by blue light and after-ripening: effects on abscisic acid and gibberellin metabolism. *Plant Physiology* 147: 886–896
- Hlavinka J., Nauš J., Fellner M. (2013) Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs light-induced stomatal opening. *Plant Science* 209: 75-80
- Kucera B., Cohn M. A., Leubner-Metzger G. (2005) Plant hormone interactions during seed dormancy and release and germination. *Seed Science Research* 15: 281-307
- Manz B, Müller K. Kucera B., Volke F., Leubner-Metzger G. (2005) Water Uptake and Distribution in Germinating TobaccoSeeds Investigated in Vivo by Nuclear Magnetic Resonance Imaging. *Plant Physiology Preview* 1-17
- Murashige T., Skoog F. (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473–497
- Nowak J, Rudnicki RM, & Grzesik M (1996) Effect of light quality on seed germination, seedling growth and pigment content in *Amaranthus caudatus* and *Celosia cristata nana*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 4:179-185
- Pope C, Sweere U., Drumm-Herrel H., Schäfer E. (1998) The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 16: 465-471

Pavlová L. (2005) Fyziologie rostlin. Karolinum, Praha, 253p

Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998): Fyziologie rostlin. Academia, Praha, 484p

Russell J., Ougham H., Thomas H., Waaland S. (2013) The Molecular Life of Plants. American Society of Plant Biologists 742p

Sawhney V. K. (1997) In: Shivanna K. R., Sawhney V. K., ed, Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement, Cambridge University Press, Cambridge, UK, 183-198

Sheoran IS, Dumonceaux T, Datla R, Sawhney VK. (2006) Anthocyanin accumulation in the hypocotyl of an ABA-over producing male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum*) mutant. *Physiologia Plantarum* 127, 681–689

Schäfer E., Nagy F., (2006) Photomorphogenesis in Plants and Bacteria, 3rd Edition, Springer, Netherlands, 605-625

Schopfer P., Plachy C. (1984): Control of seed germination by abscisic acid. II. Effect on embryo water uptake in *Brassica napus* L. *Plant Physiology* 76: 155–160

Taiz L., Zeiger E. (2006) Plant physiology, 4th Ed. Sinauer Associates, Inc., USA, 623p

Tatematsu K., Nakabayashi K., Kymiya Y., Nambara E. (2008): Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* 53: 42-52

Weller J. L., Perrotta G., Schreuder M. E. L., Tuinen A., Koornneef M., Giuliano G., Kendrick R. E. (2001a) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2, *Plant Journal* 25(4), 427-440

Weller, J. L., Beauchamp N., Kerckhoffs L. H., Platten j: D, Reid J. B. (2001b) Interaction of phytochromes A and B in the control of de-etiolation and flowering in pea. *Plant Journal* 26: 283–294

Weller, J. L., Schreuder, M.E.L., Smith, H., Koornneef, M., Kendrick, R.E. (2000) Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in tomato. *Plant Journal* 24: 345-356

Yu J. W., Rubio V., Lee N. Y., Bai S., Lee S. Y., Kim S. S., Liu L., Zhang Y., Irigoyen M. L., Sullivan J. A., Zhang Y., Lee I., Xie Q., Paek N. Ch., Deng X. W. (2009) COP1 and ELF3 control circadian function and photoperiodic flowering by regulating GI stability. *Molecular Cell* 32: 617-630

Yu X., Michaels S. D. (2010) The Arabidopsis Paf1c Complex Component CDC73 Participates in the Modification of Flowering locus C Chromatin. *Plant Physiology* 153: 1074-1084