

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

DIPLOMOVÁ PRÁCA

OLMOUC 2024

Bc. Karolína Ficeriová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Prírodovedecká fakulta

Laboratórium rastových regulátorov



**Expresia fototropínov vplyvom zasolenia počas klíčenia semien
v závislosti na kryptochrómovej signalizácii**

DIPLOMOVÁ PRÁCA

Autor: **Bc. Karolína Ficeriová**
Študijný program: N1501 Experimentálna biológia
Študijný odbor: Experimentálna biológia
Forma štúdia: Prezenčné
Vedúci práce: **prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.**
Termín odovzdania práce: 2024

BIBLIOGRAFICKÉ IDENTIFIKÁCIE

Meno a priezvisko autora	Bc. Karolína Ficeriová
Názov práce	Expresia fototropínov vplyvom zasolenia počas klíčenia semien v závislosti na kryptochrómovej signalizácii
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Laboratórium rastových regulátorov
Vedúci práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Diplomová práca je zameraná na skúmanie klíčenia a relatívnej expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* u mutantov *Solanum lycopersicum* L. s pozmeneným fotoreceptorom kryptochrómom 2 (*cry2*). Mutant *cry2-1* má *cry2* nefunkčný a mutant *cry2-ox3* má tento fotoreceptor preexprimovaný. Mutanti boli porovnávaní s kultivarom MoneyMaker (cv. MM; wild-type). Klíčenie bolo skúmané v tme, na modrom a na červenom svetle po dobu 7 dní v stresových podmienkach vyvolaných zasolením tak, že kultivačné médium obsahovalo rôzne koncentrácie chloridu sodného. Ďalej bola pomocou qPCR skúmaná relatívna expresia génov *PHOT1* a *PHOT2*, zmena ich expresie v stresových a rôznych svetelných podmienkach, za účelom zistenia prepojenia signálnych dráh fotoreceptorov modrého svetla a ich roli pri strese vyvolanom zasolením.

V predloženej diplomovej práci bolo zistené, že klíčenie u všetkých troch genotypov je závislé na svetle a mutant *cry2-1* je k zasoleniu tolerantnejší, naopak, *cry2-ox3* je voči stresovým podmienkam citlivejší v porovnaní s kontrolným genotypom. Ďalej bola u mutantu *cry2-1* v tme bez stresových podmienok pozorovaná najvyššia relatívna expresia *PHOT1*, nasledovaná vysokým znížením expresie v stresových podmienkach. Z relatívnej expresie génu *PHOT2* nebolo možné vytvoriť celistvé výsledky.

V diplomovej práci bola zistená súvislosť medzi *cry2* a abiotickým stresom, taktiež bola zistená funkčná súvislosť medzi fotoreceptormi *cry2* a *phot1*.

Kľúčové slova	<i>cry2</i> , červené svetlo, expresia génov, fotoreceptory, klíčenie semien, modré svetlo, <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i>
Počet strán	60
Počet príloh	1
Jazyk	Slovenský

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATIONS

Author's first name and surname	Bc. Karolína Ficeriová
Title of thesis	Salinity–regulated expression of phototropins during seed germination as a function of cryptochrome signaling
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2024

Abstract

The master's thesis is focused on seed germination and relative expression of *PHOT1* and *PHOT2* genes of *Solanum lycopersicum* L. mutants with modified photoreceptor cryptochrome 2 (*cry2*). Mutant *cry2-1* is a loss-of-function mutant and *cry2-ox3* mutant is a *cry2* overexpressor. Both mutants were compared to cultivar MoneyMaker (cv.MM; wild-type). Seeds of the mentioned genotypes were germinated in the dark, in blue light and in red light in salinity stress conditions, as the medium contained various amounts of sodium chloride. The seeds were germinated in the time period lasting 7 days. Furthermore, by using qPCR the relative expression of *PHOT1* and *PHOT2* in stress conditions and the mentioned light conditions were analyzed in order to find a cross-talk between blue light photoreceptors and salinity stress pathway.

In the presented master's thesis it was found that the germination of all three studied genotypes is dependent on light conditions. It was also concluded that the *cry2-1* mutant is less affected by the salinity stress, whereas the *cry2-ox3* was shown to be more sensitive to the stress conditions when compared to control genotype. Moreover, it was observed that the relative expression of *PHOT1* was the highest in the dark in the absence of sodium chloride in *cry2-1* mutant, followed by noticeable decrease when presented to the salinity stress. It was not possible to conclude any results from the relative expression of *PHOT2*.

In the master thesis, a cross talk between *cry2* and abiotic stress was found, as well as functional connection between photoreceptors *cry2* and *phot1*.

Keywords	blue light, <i>cry2</i> , gene expression, <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i> , photoreceptors, red light, seed germination
Number of pages	60
Number of appendices	1
Language	Slovak

Prehlásenie

Prehlasujem, že som predloženú diplomovú prácu vypracovala samostatne pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. za použitia uvedenej citovanej literatúry.

V Olomouci dňa

podpis.....

Pod'akovanie

Toto pod'akovanie patri predovšetkým prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, Ph.D. za jeho profesionálny a ľudský prístup a taktiež za jeho ochotu. Toto pod'akovanie taktiež patri celému jeho tímu, ktorý mi v priebehu mojej diplomovej práce bol stále nápomocný a vytváranie tejto práce mi spríjemnil.

OBSAH

Zoznam použitých skratiek.....	9
1 ÚVOD A CIELE	11
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	13
2.1 Vplyv svetla na rastliny	13
2.2 Fotoreceptory	13
2.2.1 Kryptochrómy	14
2.2.2 Fototropíny.....	15
2.2.3 Fytochrómy	17
2.3 Klíčenie semien rastlín.....	20
2.3.1 Vplyv svetla na klíčenie semien rastlín	20
2.4 Stres	21
2.4.1 Abiotický stres	22
2.4.2 Fotoreceptory a ich role v osmotickom strese	24
2.4.3 Obranné mechanizmy rastliny voči abiotickému stresu vyvolanému zasolením	26
3 MATERIÁL A METÓDY	28
3.1 Rastlinný materiál	28
3.1 Príprava kultivačného MS média.....	28
3.2 Výsev a kultivácia semien	29
3.3 Homogenizácia semien	30
3.4 Izolácia, prečistenie RNA a syntéza cDNA	31
3.5 Kvantitatívna PCR (qPCR).....	31
4 VÝSLEDKY.....	35
4.1 Klíčivosť semien.....	35
4.2 Expresia génov <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i>	39
5 DISKUSIA	45
6 ZÁVER.....	50
7 ZOZNAM CITOVANEJ LITERATÚRY.....	51

Zoznam použitých skratiek

- ABA – abscisic acid (kyselina abscisová)
- BIC (2) – blue-light inhibitor of cryptochromes (2) (inhibítory modrého svetla)
- BL – blue light (modré svetlo)
- CCE – cryptochrome C-terminal extension
- cDNA – complementary deoxyribonucleic acid (komplementárna deoxyribonukleová kyselina)
- CIB – cryptochrome – interacting basic-helix-loop-helix
- CO – constans
- COP1 – constitutive photomorphogenic 1
- cry 1, 2 – cryptochrome 1,2 (krytochróm 1, 2)
- CRY-SPA/COP1 – cryptochrome – constitutive photomorphogenic 1 / supressor of phytochrome A 105
- cv. MM – cultivar Moneymaker (kultivar Moneymaker)
- D – dark (tma)
- DNA – deoxyribonucleic acid (deoxyribonukleová kyselina)
- EMS – ethyl methansulfonát
- F – forward primer
- FAD – flavín adenín dinukleotid
- FMD – flavín mononukleotid
- GA – gibberellic acid (kyselina giberelová)
- GAF – cGMP phosphodiesterase/adenyl-cyclase/Fhl1
- GI – gene of interest
- HG – housekeeping gene
- HKRD – histidine kinase-related domain
- HKT – high affinity K⁺ transporters
- HY5 – long hypocotyl 5
- HYH – long hypocotyl 5 homologue
- LOV 1, 2 – light-, oxygen-, or voltage 1, 2
- LRGs – light responsive genes
- MES – 2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina
- MS – Murashige and Skoog
- MTHF – 5,10-methenyltetrahydrofolát
- NSCCs – non-selective cation channels (neselektívne kationové kanály)

OS – osmotický stres
PCR – polymerase chain reaction (polymerázová reťazová reakcia)
Pfr – aktívna forma fytochrómu
phot 1,2 – phototropin 1,2 (fototropín 1,2)
PHR – photolyase-homologous region
phy A,B,C,D,E – phytochrome A,B,C,D,E (fytochróm A,B,C,D,E)
PIFs – phytochrome-interacting factors
PKs – phytochrome kinase substrate
Pr – neaktívna forma fytochrómu
qPCR – kvantitatívna polymerázová reťazová reakcia
R – reverse primer
RL – red light (červené svetlo)
RNA – ribonucleic acid (ribonukleová kyselina)
RNS – reactive nitrogen species
ROS – reactive oxygen species
RPT2 – root phototropism
SOS – salt overly sensitive
SPA – supressor of phytochrome A 105
TFs – transcription factors (transkripčné faktory)
TILLING – targeting induced local lesions in genomes
UV – ultraviolet light (ultrafialové svetlo)
WT – wild type

1 ÚVOD A CIELE

Voľne rastúce, ale aj pestované rastliny sú neustále vystavované rôznym typom abiotického stresu, medzi ktoré sa radí aj zvýšená koncentrácia soli v pôde, čo negatívne ovplyvňuje fyziologické mechanizmy rastlín (Nejat and Mantri, 2017). Viacerými výskumami bolo preukázané, že modré svetlo vnímané receptormi rastlín kryptochrómi 1 a 2 (*cry1* a *cry2*) a fototropínmi (*phot 1* a *phot 2*) má schopnosť do istej miery regulovať osmoreguláciu v niektorých rastlinách. U niektorých druhov rastlín nadmerná expresia kryptochrómov vedie k zvýšenej citlivosti rastlín k osmotickému stresu (OS), medzi ktorý sa radia sucho a zvýšená koncentrácia soli v pôde (Fantini et al., 2019; Mao et al., 2005; Xu et al., 2009). Nedávno však bolo zistené, že fotoreceptor *cry1a* u *Solanum lycopersicum* L. chráni rastliny pred nadmerným osmotickým stresom (D'Amico-Damião et al., 2021; Fantini et al., 2019). Napriek tomu bolo však zistené, že mutant paradajky *7B-1* s narušenou fototropínovou signalizáciou ukazuje na modrom svetle toleranciu voči OS (Fellner and Sawhney, 2002). Tieto výsledky naznačujú, že modré svetlo prostredníctvom *phot* signalizácie môže zosilňovať citlivosť semien paradajok k OS. Na základe týchto a aj neskorších výsledkov (Fellner, nepublikované dáta) bola vytvorená hypotéza, ktorej sa venuje táto diplomová práca. Podľa tejto hypotézy abiotický stres zvyšuje expresiu fototropínov *phot1* a *phot2*, čo môže viesť k indukcii stresovej reakcie pri pôsobení modrého svetla. Exprimované *phot* sú následne schopné zvyšovať efekt modrého svetla na rastlinu, čo vo výsledku môže zvýšiť stresovú reakciu. Fotoreceptory modrého svetla spolu funkčne interagujú, avšak zatiaľ nie je objasnené, akým spôsobom sú signálne dráhy *phot* ovplyvňované signalizáciou *cry* (Rusaczoněk et al., 2021). Je možné, že táto interakcia je ovplyvňovaná práve abiotickými stresmi.

V tejto diplomovej práci boli skúmané rastliny *S. lycopersicum* L. troch genotypov – kultivaru MoneyMaker (cv. MM), od ktorého boli následne odvodené mutanty *cry2-1* s nefunkčným *cry2* a transgénné rastliny *cry2-ox3* s preexprimovaným *cry2* (Fantini et al., 2019; Giliberto et al., 2005). Bola skúmaná inhibícia klíčenia semien v tme, v kontinuálnom modrom svetle a kontinuálnom červenom svetle pri rôznych koncentráciách chloridu sodného (0, 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹) v kultivačnom médiu po dobu 7 dní od vysiatia. Ďalej bola pomocou qPCR metódy skúmaná expresia génov *PHOT1* a *PHOT2* v semenách paradajok kultivovaných v spomínaných svetelných podmienkach v médiu s a bez obsahu chloridu sodného. Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, ako na klíčenie vplyva pozmenenie funkcie *cry2*, ako sa mení expresia génov *PHOT1* a *PHOT2* a zároveň ako je expresia daných génov prepojená s funkciou *cry2* pri zasolení a v spomínaných svetelných podmienkach.

Experimenty boli vykonané v Skupine molekulárnej fyziológie, ktorá je súčasťou Laboratória rastových regulátorov, spoločného pracoviska Univerzity Palackého Olomouc a Ústavu experimentálnej botaniky Akadémie vied Českej republiky.

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Vplyv svetla na rastliny

Pre rastliny je charakteristické, že sú nepohyblivé a foto-autotrofné organizmy, tým pádom je celý ich životný cyklus značne ovplyvnený prostredím, v ktorom sa nachádzajú (Kami et al., 2010). Svetlo rastlinám slúži ako primárny zdroj na prežitie, nakoľko energiu získanú zo svetla sú schopné spracovať pomocou fotosyntézy (Ruban, 2009).

Rastliny nevyužívajú svetlo len pri fotosyntéze ako zdroj energie, ale sú ho schopné vnímať aj ako signál, ktorý informuje o tom, v akých svetelných podmienkach sa nachádza. Tento signál je kľúčový pri procese fotomorfogenézy (Taiz and Zeiger, 2010). Rastlina, ktorá sa vyvíjala v tme po presunutí na svetlo nie je schopná fotosyntézy, nakoľko u nej absentujú listy a chlorofyl. V takomto prípade svetelný signál spúšťa proces fotomorfogenézy, pri ktorom rastlina získava schopnosť vykonávať fotosyntézu, a tak využívať svetlo ako zdroj energie. Počas fotomorfogenézy sa rastlina okamžite prestáva predlžovať, a takto ušetrená energia je ďalej využitá pre tvorbu chýbajúcich listov a biosyntézu chlorofylu. Počas celého procesu je rastlina schopná pohlcovať svetlo pomocou špeciálnych fotoreceptorov, ktoré vnímajú všetky vlnové dĺžky svetelného spektra.

2.2 Fotoreceptory

Nakoľko sú svetelné podmienky pomerne kolísavé, vyššie rastliny obsahujú fotoreceptory, ktoré sú na ne schopné efektívne odpovedať. Medzi fotoreceptory schopné vnímať ultrafialové svetlo typu A (UV-A) až modré svetlo (390 – 500 nm) sú radené cry, phot a členy rodu Zeitlupe, zatiaľ čo medzi fotoreceptory schopné vnímať dlhovlnné červené svetlo (700 – 750 nm) až červené svetlo (600 – 700 nm) sú radené fytochrómy (phy) (Fantini et al., 2019; Ruban, 2009).

Dané fotoreceptory spolupracujú a koordinovane reagujú na zmenu svetelných podmienok (Kami et al., 2010). Okrem odpovede fotoreceptorov, rastliny dokážu odpovedať na svetelné podmienky aj systémovo, alebo aj na bunkovej úrovni, napríklad upravením orientácie listov, ktorých pohyb je umožnený pohybovými bunkami, ktoré dostávajú signál od fotoreceptorov modrého svetla. Odpoveď na bunkovej úrovni na zmenu svetelných podmienok je pohyb chloroplastov, ktorý má za následok zníženie absorpcie svetelnej energie. Oba typy spomínaných adaptačných odpovedí majú obmedzený efekt na zníženie spracovania svetelnej energie (Ruban, 2009).

2.2.1 Kryptochrómy

Fotoreceptory cry obsahujú flavín, sú schopné vnímať UV-A/modré svetlo a okrem rastlín sa nachádzajú aj u živočíchov (Fantini et al., 2019; Perrotta et al., 2000). Pravdepodobne sa vyvinuli z fotolyáz, ktorých hlavnou funkciou je oprava deoxyribonukleovej kyseliny (DNA) po poškodení UV žiarením (Perrotta et al., 2000). Dané fotoreceptory sa vyskytujú u všetkých organizmov a sú zapojené do regulácie a kontrolovania cirkadiálneho rytmu (Fantini et al., 2019).

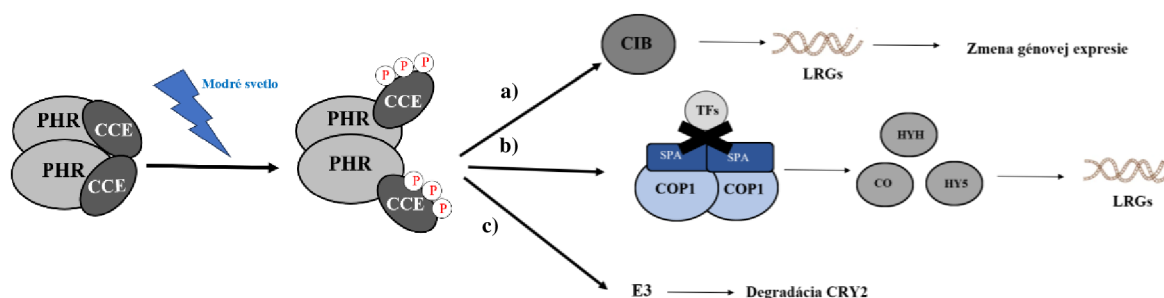
U rastlín boli cry ako prvé objavené u *Arabidopsis thaliana*, konkrétne cry1, cry2 a cry3, na ktorej boli aj ďalej skúmané (Wang et al., 2018). Apoprotein cry sa skladá z dvoch domén – z N-terminálnej domény (PHR), ktorá je schopná absorbovať svetlo nekovalentnými väzbami chromoforov flavín adenín dinukleotid (FAD), 5,10-methenyltetrahydrofolát (MTHF) a C-terminálnej domény kryptochrómových C-terminálnych predĺžení (CCE), ktorá ale absentuje u cry3 a je považovaná za efektorovú doménu. Za hlavný svetelný senzor je považovaný FAD a MTHF má funkciu ako prenášač energie na FAD (Liu et al., 2011). Hlavný sprostredkovateľ odpovede na vnímanie svetla je PHR, čo má za následok zmenu konformácie CCE a vyvolanie signalizácie cry (Christie et al., 2015). Bolo zistené, že cry1 nachádzajúci sa v jadre a cytoplazme, sprostredkováva fotomorfogénu stimulovanú modrým svetlom, cry2 nachádzajúci sa v jadre ovplyvňuje fotoperiodické kvitnutie a cry3 nachádzajúci sa v mitochondriách a plastidoch má funkciu ako jednovláknový reparačný enzým DNA (Liu et al., 2011; Wang et al., 2018).

U rastlín hrajú cry dôležitú rolu pri fyziologických procesoch vyvolaných a regulovaných svetlom, ako je klíčenie, otváranie a rozširovanie kľúčnych listov, rast koreňa, kvitnutie, predlžovanie internodií, otváranie prieduchov, potlačovanie senescencie listov, pigmentácia listov aj plodov a syntéza antokyanov (Fantini et al., 2019; Perrotta et al., 2000; Wang et al., 2018).

2.2.1.1 Mechanizmy kryptochrómovej signalizácie

Po absorbovaní fotónu sú cry fotoexcitované elektrónovým prenosom a redukciou flavínu vo flavínovom chromofore, ktorý následne prechádza do rôznych redoxných stavov (Wang et al., 2018). Po excitácii sa mení konformácia cry, dochádza k homodimerizácii, oligomerizácii, fosforylácii, proteín-proteín interakciám závislým na modrom svetle a priamym interakciám so signálnymi proteínmi a transkripčnými faktormi, ktoré následne menia génovú expresiu, čo má za následok fyziologické zmeny spomenuté na konci predošlej podkapitoly. Proteín-proteín interakcie závislé na modrom svetle sú hlavným mechanizmom pri transdukcii signálov, zatiaľ čo excitované cry sú schopné interagovať s transkripčnými faktormi a regulátormi génovej expresie.

U *A. thaliana* bolo dokázané, že zmeny génovej expície u *cry1* a *cry2*, ktoré sa nachádzajú v jadre, sú späté s vnemom modrého svetla, a to dráhou cryptochrome – interacting basic-helix-loop-helix (CRY-CIB), kedy je modulácia transkripcie závislá na svetle (Obrázok 1a) a dráhou cryptochrome – constitutive photomorphogenic1/superessor of phytochrome A 105 (CRY-SPA/COP1), kedy dochádza k potlačeniu degradácie proteínov závislej na svetle (Obrázok 1b).



Obrázok 1 – Dráhy *cry1* a *2* závislé na modrom svetle. Fotoexcitácia vyvolaná pôsobením modrého svetla vyvolá konformačné zmeny, kryptochróm je fosforylovaný a interaguje so signálnymi proteínmi. **(a)** Fotoreceptory *cry* interagujú s transkripčným faktorom CIB, čo má za výsledok transkripciu a následnú expíciu génov odpovedajúcich na svetlo (LRGs) (Fraikin et al., 2023; Liu et al., 2011). **(b)** Fotoreceptory *cry* interagujú so SPA proteínmi a dochádza ku kompetícii medzi väzbami transkripcčných faktorov (TFs) a fotoaktivovaného cry. Naviazanie cry namiesto TFs potlačuje aktiváciu COP1 nevyhnutnú pre degradáciu proteínov regulujúcich génovú expíciu long hypocotyl 5 (HY5), HY5 homologue H (HYH) a constans (CO), čo má za následok génovú expíciu LRGs namiesto ich degradácie (Fraikin et al., 2023; Liu et al., 2011). **(c)** Fosforylovaný cry je následne ubiquitovaný E3 ligasou a degradovaný 26S proteasomom (Fraikin et al., 2023). Schéma vytvorená v programe Microsoft Office Word, upravené a prevzaté z Fraikin et al., 2023.

2.2.2 Fototropíny

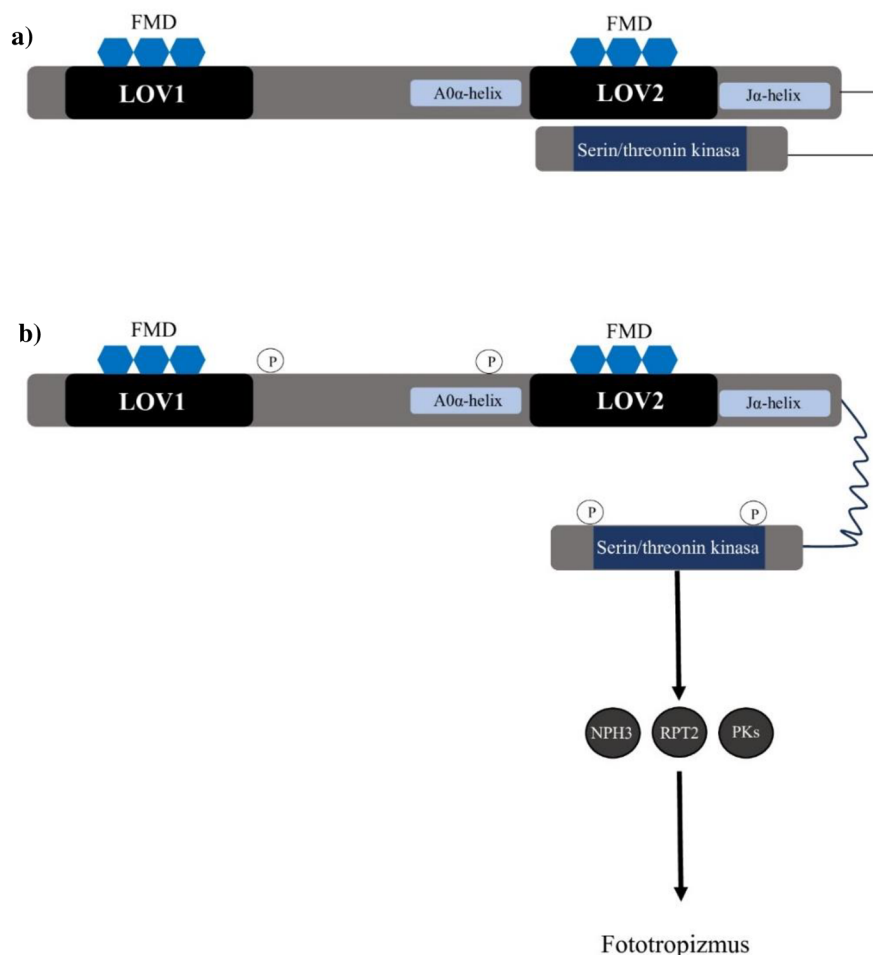
Membránové fotoreceptorové kinasy phot sa vyskytujú u vyšších rastlín (Petersen et al., 2017). Ako prvé boli phot objavené u *A. thaliana*, zatiaľ sú známe len phot1 a phot2 (Christie et al., 1998; Stone et al., 2005). Sú kľúčové pre mnoho procesov, ktoré optimalizujú zachytávanie svetla spracovaného fotosyntézou, ako sú fototropizmus, poloha a rozširovanie listov, pohyb chloroplastov a otváranie prieduchov (Hart and Gardner, 2021; Petersen et al., 2017).

Fotoreceptory phot sa skladajú z dvoch domén – N-terminálne light-, oxygen-, or voltage domény 1 a 2 (LOV1 a LOV2) a C-terminálnych domén serin/threonin kinas (Kimura and Kagawa, 2006). Na LOV domény sa v tme nekovalentne viaže chromofor absorbujúci UV a modré svetlo flavín mononukleotid (FMD), ktorý sa následne po aktivácii modrým svetlom viaže na obe domény kovalentne.

Doména LOV2 je hlavná v odpovedi na svetelné podmienky, zatiaľ čo LOV1 moduluje aktivitu LOV2. Domény LOV taktiež regulujú katalytickú aktivitu serin/threonin kinas, ktoré následne šíria svetelný signál v bunke (Hart and Gardner, 2021; Petersen et al., 2017).

2.2.2.1 Mechanizmus fototropínovej signalizácie

Ako už bolo spomínané, LOV2 doména je kľúčová pre odpoveď na svetlo a aktiváciu phot aktivity. Jadro domény LOV2 lemujú 2 alfa-helixy, A0 α a J α (Hart and Gardner, 2021). V tme A-LOV2-J oblasť tvorí inaktívnu konformáciu s C-terminálnymi kinasami, čo má za výsledok potlačanie kinasovej aktivity phot (Obrázok 2a). Po fotoexcitácii dochádza k zmenám polohy A a J, čo má za výsledok autofosforyláciu C-terminálnych domén, pričom kľúčovú rolu pri aktivácii a funkčnosti phot zohráva fosforylácia serinových zbytkov (Petersen et al., 2017). V tme je taktiež nekovalentne viazaný FMD na LOV domény. Po fotoexcitácii modrým svetlom vzniká kovalentná väzba medzi isoalloxazinovým kruhom a konzervovanými cysteinovými zbytkami nachádzajúcimi sa v LOV doméne (Hart and Gardner, 2021). Vznik tejto väzby patrí medzi hlavné mechanizmy vyvolania aktivácie LOV domén (Obrázok 2b) (Petersen et al., 2017). V tme sa následne tento kruh spontánne rozpadne a domény sa vracajú do konformačných stavov, v ktorých sa nachádzali pred fotoexcitáciou (Kimura and Kagawa, 2006).



Obrázok 2 – Mechanizmus aktivácie phot. (a) V tme sa FMD nekovalentne viažu na LOV1 a LOV2 domény, A-LOV2-J komplex sa nachádza v neaktívnej konformácii s C-terminálnymi kinasami (Petersen et al., 2017). (b) Po fotoexcitácii modrým svetlom sa FMD kovalentne viažu na LOV domény, A0- α a J- α helixy menia polohy a dochádza k autofosforylácii C-terminálnych kinas (Hart and Gardner, 2021). Fosforylované kinasy následne aktivujú signálne proteíny pre fototropizmus – non-phototropic hypocotyl 3 (NPH3), root phototropism (RPT2) a phytochrome kinase substrate (PKs) (Xin et al., 2022). Schéma vytvorená pomocou Microsoft Office Word, prevzaté z Xin et al., 2022 a <https://www.slideshare.net/227777222an/phototropin>

2.2.3 Fytochrómy

Fotoreceptory phy sa nachádzajú v cytosole v neaktívnej forme a v jadre rastlín v aktívnej forme. Tieto fotoreceptory sú schopné vnímať a následne odpovedať na spektrum vzdialeného červeného svetla a červeného svetla (Pham et al., 2018). U *A. thaliana* bolo nájdených 5 druhov phy – phyA – phyE, u jednoklíčnolistových rastlín sa však nachádzajú len 3 – phyA – phyC (Wang et al., 2022).

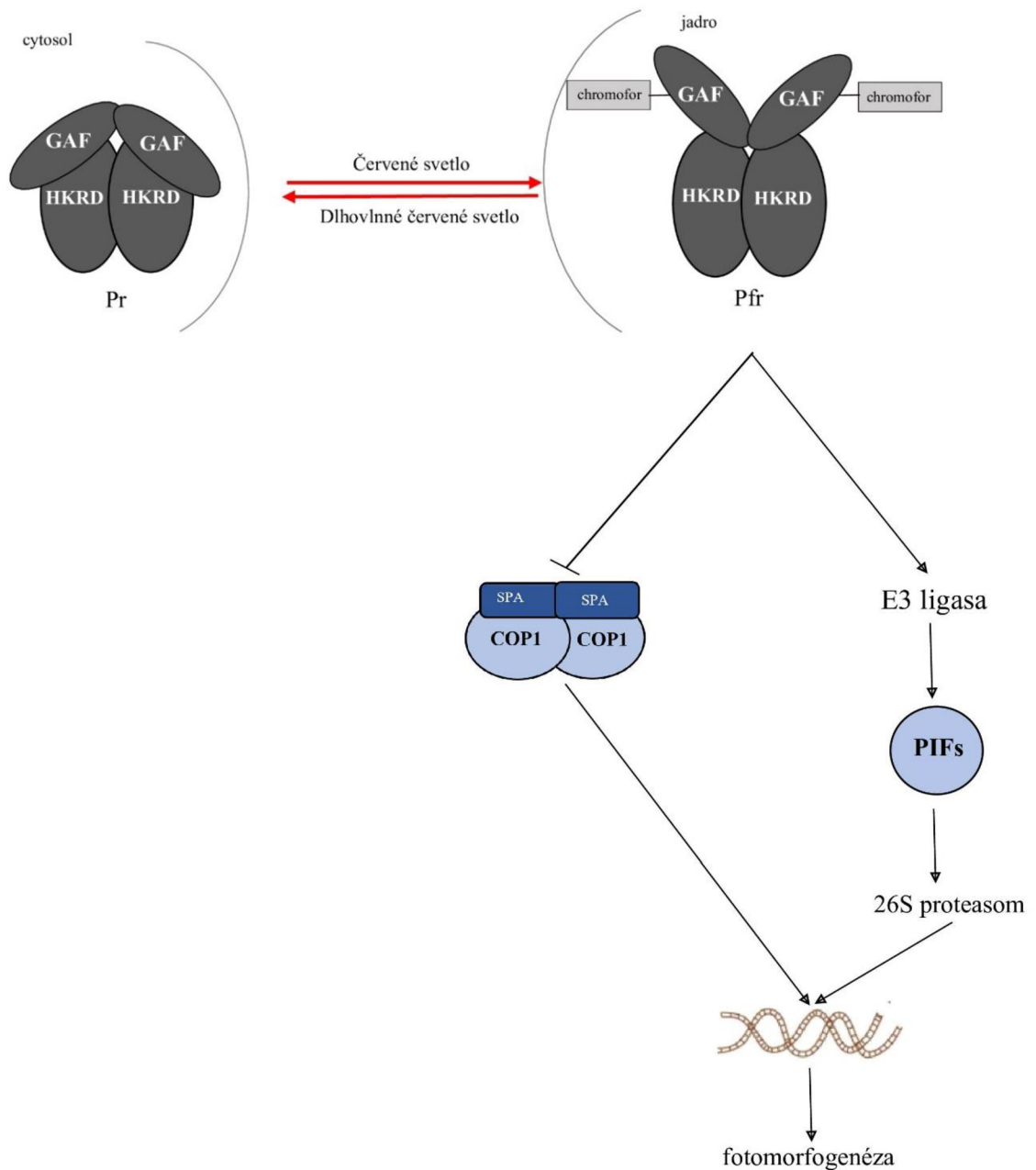
Signálne dráhy phy a phy samotné sú v rastline dôležité pre udržiavanie fyziologických procesov, ako sú klíčenie, de-etiolizácia, predlžovanie stonky, vetvenie, kvitnutie, odpoveď na abiotický stres a prechod zo skotomorfogenézy do fotomorfogenézy (Qiu et al., 2023).

Fotoreceptory phy sú radené medzi dimérické chromoproteíny, ktorých apoprotein je kovalentne viazaný na billinový chromofor, čím vzniká holoprotein (Pham et al., 2018). N-terminálna doména má funkciu ako fotosenzitívne jadro, v ktorom sa nachádza cGMP phosphodiesterase/adenyl-cyclase/Fhl1 (GAF) subdoména obsahujúca billin lyasu a chromofor viažuci sa na GAF doménu. C-terminálna doména má funkciu ako dimerizačná doména s kinasovou aktivitou (Qiu et al., 2023). U *A. thaliana* sú phy delené do 2 kategórií – typ I, do ktorého sa radí fotolabilný phyA spúšťajúci klíčenie a de-etiolizáciu pri nedostatku svetla a typ II, do ktorého sa radia fotostabilné phyB – phyE spúšťajúce signálne dráhy odpovedajúce na červené svetlo. Medzi hlavné funkcie fotostabilných phy patrí spúšťanie klíčenia v rôznych podmienkach, ako sú nízke (phyB) a vysoké (phyD) teploty či tieň (Wang et al., 2022).

2.2.3.1 Mechanizmus fytochrómovej signalizácie

V rastlinách sa phy nachádzajú v dvoch formách – neaktívna forma phy (Pr) schopná absorbovať červené svetlo a aktívna forma phy (Pfr) schopná absorbovať dlhovlnné červené svetlo (Qiu et al., 2023). V tme je holoprotein phy zložený do stabilnej konformácie absorbujúcej červené svetlo.

Po absorpcii dochádza k reverzibilnej zmene konformácie Pr tak, že apoproteíny neaktívnej formy viažu chromofor, čím vzniká aktívna forma Pfr absorbujúca dlhovlnné červené svetlo. Po absorpcii dlhovlnného červeného svetla dochádza k zmene konformácie Pfr a phy prechádza do Pr stavu (Sharrock, 2008). Neaktívna forma phy je lokalizovaná v cytosole a po zmene konformácie Pfr putuje do jadra. Na oboch miestach, v jadre aj cytosole Pfr interaguje s proteínmi, ktoré sú závislé na prechodných faktoroch phytochrome-interacting factors (PIFs), ďalej s COP1, SPA1 a HY5, čo vo výsledku reguluje dráhy prenosu svetelných signálov, rast a vývoj rastliny (Obrázok 3) (Pham et al., 2018; Qiu et al., 2023).



Obrázok 3 – Mechanizmus aktivácie a pôsobenia phy

Absorpciou červeného svetla sa z neaktívnej formy phy Pr stáva aktívna forma Pfr, na ktorú sa viaže chromofór v mieste vysoko konzervovaných cysteinových zbytkov GAF domény, ktorá je spojená s histidin kinasovou doménou (HKRD) (Sharrock, 2008). V tme sú aktívne PIFs a SPA/COP1 komplex, ktoré proteolýzou negatívne regulujú transkripčné faktory a udržiavajú tak stav skotomorfogenézy (Choi et al., 2023) Po zmene konformácie z aktívnej na neaktívnu je Prf premiestnené z cytosolu do jadra, kde potlačujú aktivitu SPA/COP1 komplexu a zároveň je aktivovaná ubiquitinácia a degradácia PIFs cez 26S proteasom. Oba procesy vedú k stimulácii transkripčných faktorov potrebných pre exprimáciu rôznych génov spojených s fotomorfofogenézou, ako napríklad HY5 (Choi et al., 2023; Rodrigues et al., 2014). Schéma vytvorená pomocou Microsoft Word Office, prevzaté a upravené z Li et al., 2011 a Rodrigues et al., 2014. Šípky naznačujú aktiváciu mechanizmu a rovná čiara jeho potlačenie.

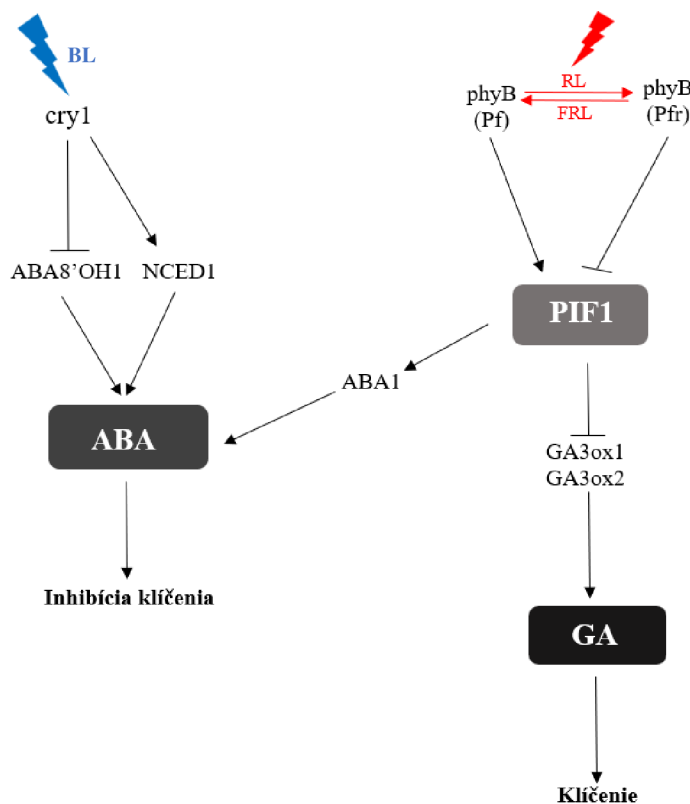
2.3 Klíčenie semien rastlín

Klíčenie semien rastlín je ontogenetická fáza vývoja, ktorá začína, keď semeno vstrebáva vodu z okolia a končí predĺžovaním embryonálneho primárneho koreňa (Llanes et al., 2016). Vstrebaním vody sú spustené viaceré biochemické a metabolické fyziologické procesy, ktoré regulujú signály pre klíčenie, ako sú aktivácia rôznych enzýmov, pôsobenie fytohormónov, opravy poškodenej DNA a translokácia živín skladovaných v semene. Tieto procesy sú kľúčové pre správny vývoj a kvalitu rastliny (Ge et al., 2023; Macovei et al., 2017). Avšak, semená sú schopné začať klíčiť iba ak na to majú optimálne podmienky, ktoré môžu byť narušené výkyvmi teploty, nepomerom fytohormónov, nedostatkom svetla, nedostatkom živín a suchou alebo slanou pôdou (Eckstein et al., 2016; Farooq et al., 2022; Llanes et al., 2016). Pri vymenovaných nepriaznivých podmienkach sú semená v dormantnej fáze, ktorá je charakterizovaná ako neschopnosť semien klíčiť (Fantini and Facella, 2020).

2.3.1 Vplyv svetla na klíčenie semien rastlín

Semenám, ktoré sa nachádzajú v dormantnej fáze, nestačí absorbovať vodu, aby začali klíčiť, ale potrebujú špecifický signál na iniciáciu klíčenia, ktorým je mnohokrát svetlo (Eckstein et al., 2016). Viaceré štúdiá boli zamerané na vplyvy častí spektra svetla na klíčenie rastlín. Bolo dokázané, že u semien jačmeňa fotoreceptor *cry1* navodzuje inhibíciu klíčenia, nakoľko semená s poškodeným *cry1* mali zníženú inhibíciu klíčenia pod modrým svetlom, zatiaľ čo u semien s poškodeným *cry2* nebolo zníženie pozorované. Na molekulárnej úrovni bolo zistené, že *cry1* spúšťa gény pre biosyntézu kyseliny abscisovej (ABA), čo má za výsledok inhibíciu klíčenia (Barrero et al., 2014). Podobné výsledky boli pozorované aj u *A. thaliana*, naopak, u *S. lycopersicum* L. nebola pozorovaná inhibícia klíčenia pod modrým svetlom (Izzo et al., 2020). Ďalej bolo dokázané, že *cry1* a *cry2* regulujú predĺžovanie primárneho koreňa nezávisle na svetelných podmienkach. Inhibičné vlastnosti *cry* spojené s modrým svetlom boli pozorované až pri dĺžke hypokotylu mutantov s nefukčnými *cry1*, *cry1* a *cry2* (Fantini et al., 2019).

Naopak, vo viacerých štúdiách bolo dokázané, že červené svetlo je nevyhnutné pre iniciáciu klíčenia (Paik and Huq, 2019). Kľúčovú úlohu v endosperme v skorých fázach klíčenia má hlavne svetlom aktivovaný *phyB*, zatiaľ čo *phyA* je aktívny v embryu. Zvyšné *phy*, *phyC*, *phyD* a *phyE* tiež podporujú klíčenie pod červeným svetlom (Farooq et al., 2022). Aktívne formy *phy* (*Prf*) v jadre spúšťajú degradáciu *PIF1*, čo aktivuje signálne dráhy, ktoré podporujú syntézu kyseliny giberelovej (GA) a inhibujú syntézu ABA (Obrázok 4) (Fantini and Facella, 2020). To, že červené svetlo a GA podporujú klíčenie za optimálnych podmienok bolo dokázané u viacerých druhov rastlín vrátane *A. thaliana* a *S. lycopersicum* L. (Farooq et al., 2022; Izzo et al., 2020).



Obrázok 4 – Signálne dráhy klíčenia semien vyvolané modrým a červeným svetlom

Pri absorpcii modrého svetla (BL) je aktivovaný *cry1*, ktorý zvyšuje expresiu génu potrebného na syntézu ABA, *NCED1* a potláča expresiu katabolického génu ABA, *ABA8'OH1*, čo má za výsledok inhibíciu klíčenia (Wei et al., 2023). Pri pôsobení červeného svetla (RL) je neaktívna forma *phyB* konvertovaná na aktívnu formu *Pfr* a pri pôsobení vzdialeného červeného svetla (FRL) sa z *Pfr* formy *phyB* stáva neaktívna forma *Pf*. Po aktivácii je *Pfr* premiestnené do jadra, kde vyvoláva degradáciu *PIF1*, ktorý potláča expresiu GA. Degradácia *PIF1* má za výsledok expresiu génov potrebných pre syntézu GA (*GA3ox1*, *GA3ox2*) a klíčenie. Nedegradovaný *PIF1* pri pôsobení vzdialeného červeného svetla zvyšuje expresiu génu potrebného pre syntézu ABA (*ABA1*) a potláča expresiu GA génov, čo má za výsledok inhibíciu klíčenia.

Schéma vytvorená v Microsoft Office Word, upravené a prevzaté z Wei et al., 2023.

2.4 Stres

Stres u rastlín môže byť definovaný ako stav, kedy je rastlina v podmienkach, v ktorých je na ňu vyvíjaná sila. Na tieto podmienky rastlina reaguje stresovou odpoveďou a vzniká poškodenie ako odpoveď na príliš vysoké hladiny stresu, ktoré rastlina už nedokáže kompenzovať (Lichtenthaler, 1998). Rastliny sú citlivé na zmeny podmienok ich okolia, ako sú výkyvy teplôt, radiácia a dažďové zrážky (Georgieva and Vassileva, 2023). Pred pôsobením stresových podmienok sa rastlina nachádza v optimálnom fyziologickom stave, ktorý je daný rastom, svetlom, vodou a dostupnosťou rôznych minerálnych látok.

Zmeny okolitých podmienok môžu na rastlinu vplývať tak, že vyvolajú trojstupňové stresové odpovede (fáza odpovede, fáza odporu a fáza vyčerpania). Stresová odpoveď je zakončená regeneračnou fázou, ku ktorej dochádza iba po odstránení stresoru a pokiaľ poškodenie nebolo príliš vážne (Lichtenthaler, 1998).

Odpoveď rastliny na stres sa prejaví ako pokles fyziologických funkcií, ako sú realizácia fotosyntézy, transport metabolitov a translokácia alebo príjem iónov (Lichtenthaler, 1998). Po dlhšom zotrvaní rastliny v prvej fáze stresovej odpovede dochádza k miernemu prispôsobeniu na dané podmienky morfológickými a metabolickými zmenami, z ktorých sa vo výsledku stáva nové fyziologické optimum. Po prejdení do tretej fázy (fáza vyčerpania) dochádza k vážnemu poškodeniu rastliny, čo následne vedie k senescencii a bunkovej smrti, avšak, ak je stresor odstránený pred prechodom do senescencie, rastlina prejde do fázy regenerácie.

Stres u rastlín sa delí do dvoch kategórií – biotický a abiotický stres (Nejat and Mantri, 2017). Medzi biotické stresory sú radené rôzne baktérie, huby, vírusy a škodci, ktorých pôsobenie na rastliny môže spôsobiť zmenu farby, vyschnutie, rôzne infekcie a mechanické poškodenie v prípade, že iné organizmy využívajú jednotlivé časti rastliny ako potravu (Georgieva and Vassileva, 2023).

2.4.1 Abiotický stres

Abiotický stres je charakterizovaný ako podmienky životného prostredia, ktoré znižujú rast rastliny pod fyziologickú optimálnu hladinu (Cramer et al., 2011). Medzi abiotický stres sa radia zmeny teploty (príliš vysoké teploty alebo príliš nízke teploty až mrznutie), osmotický stres (OS) (sucho, vysoké hladiny soli v pôde, záplavy), nevyváženosť hladín živín a minerálnych látok a vystavenie infračervenej a UV radiácii. Všetky vymenované stresory vyvolávajú molekulárne zmeny v rastline, ktoré vedú k zníženiu rastu a vývoju, zníženiu tvorbe semien, klíčenia, absorpcie živín a ku zvýšeniu náchylnosti k patogénom. Odpoveď na stresory môže byť vyvolaná v jednotlivých častiach rastliny, alebo môžu byť v každej časti rastliny rôzne (Georgieva and Vassileva, 2023). Medzi signálne molekuly abiotického stresu sa radia reaktívne formy kyslíka (ROS) a dusíka (RNS), ktoré spôsobujú oxidatívne poškodenie makromolekúl ako sú lipidy, nukleové kyseliny a proteíny, čo môže mať za výsledok zmenu aktivity enzýmov a génovej expresie (Gupta and Huang, 2014). Hormóny taktiež ovplyvňujú odpoveď rastliny na stres, a to hlavne ethylen a ABA, ktoré sú kľúčové najmä pri OS. Ďalej môže abiotický stres vyvolať mutácie a epigenetické zmeny DNA (Cramer et al., 2011; Georgieva and Vassileva, 2023).

2.4.1.1 Stres vyvolaný zasolením

Zasolenie vody a pôdy je prirodzený proces, avšak ľudský faktor zvyšuje hladiny zasolenia cez nevhodné zavlažovanie pôdy (Roşca et al., 2023). Pôda je považovaná za slanú, keď jej elektrická vodivosť je nad $4 \text{ dS}\cdot\text{m}^{-1}$, čo je v prepočte $40 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ chloridu sodného v pôde a osmotický tlak dosahuje hodnoty okolo $0,2 \text{ MPa}$ (Acosta-Motos et al., 2017). V slaných pôdach sa zhromažďujú prebytočné rozpustné soli, hlavne chlorid sodný, ktoré negatívne vplyvajú na rast a vývoj rastlín, dokonca môžu rast a klíčenie rastliny úplne inhibovať, alebo môžu viesť k bunkovej smrti (Guo et al., 2022; Zhou et al., 2023). Odpovede rastliny na stres vyvolaný zasolením sú delené do dvoch skupín – odpoveď nezávislá na iónoch, ktorá je spustená po pár hodinách od pôsobenia stresoru a odpoveď závislá na iónoch, ktorá sa prejaví po niekoľkých dňoch od pôsobenia stresoru (Roşca et al., 2023). V počiatočnej fáze stresu spôsobeného zasolením je znížená kapacita absorpcie vody koreňovým systémom a je zvýšená strata vody z listov, čo je výsledok hyperosmotického stresu. Tento stres poškodzuje membrány, spôsobuje nevyváženosť živín, narušuje schopnosť detoxifikovať ROS, vyvoláva zmeny v aktivite antioxidantných enzýmov, znižuje schopnosť fotosyntézy a znižuje otváranie prieduchov (Gupta and Huang, 2014).

Doposiaľ nie je známe, akými presne dráhami sa sodný kation a chloridový anión dostávajú do koreňov, avšak bolo dokázané, že neselektívne kationové kanály (NSCCs) a transportéry s vysokou afinitou k draselnému katiónu (HKT) sú hlavné prenášače cez plazmatické membrány do koreňov, odkiaľ putujú xylémovou dráhou do listov (Guo et al., 2022). Po vstupe soli do rastliny sa znižuje príjem draselného katiónu rastlinou, nakoľko sodný a draselný kation majú rovnaký transportný systém, čo má za výsledok inhibíciu aktivity enzýmov závislých na draselnom katióne (Zhou et al., 2023).

Vstup sodného katiónu do rastliny taktiež depolarizuje membrány, dochádza k otvoreniu kanálov pre vápenaté katióny a zvýšeniu ich koncentrácie v cytosole (Gharsallah et al., 2016; Guo et al., 2022). Tieto katióny slúžia ako jedna zo signálnych molekúl stresových podmienok tak, že na seba viažu proteíny, ktoré regulujú bunkový metabolizmus a génovú expresiu cez dráhu Salt overly sensitive (SOS). Dráha SOS cez vytvorenie komplexu proteínov SOS3/vápenatý kation/SOS2 fosforyluje SOS1, ktorý exprimuje gén pre sodíko-protónový antiport v plasmatickej membráne a podieľa sa na vylúčení katiónov z cytoplazmy alebo tvorbe vakuol, v ktorej sú následne uskladnené. Antiport sa taktiež podieľa na transporte katiónov z koreňa do zvyšných častí rastlín (Hao et al., 2021). Signálne dráhy závislé na vápenatých katiónoch zvyšujú expresiu génov pre ABA syntézu, čo má za výsledok syntézu ABA, ktorá sa následne hromadí hlavne v koreni a xylémovou dráhou

môže byť transportovaná aj do ostatných častí rastlín (Hao et al., 2021). Upravuje otváranie prieduchov a vyvoláva expresiu génov podporujúcich odolnosť voči daným podmienkam.

Stres vyvolaný zasolením má negatívny dopad aj na klíčenie rastlín tak, že kvôli vyššej koncentrácii soli a nepomeru iónov je klíčenie znížené, dokonca dopad OS môže viesť k vážnemu poškodeniu pletiva až odumretiu embrya (Ge et al., 2023). Po pôsobení OS na semená rastlín je spustený obranný mechanizmus vo forme začatia osmoticky vyvolanej dormancie, pričom dochádza k zníženiu syntézy látok potrebných pre klíčenie, ako je GA, zvýšeniu syntézy ABA, zmene permeability membrány a taktiež dochádza k zmene správania vody v semene (Llanes et al., 2016). Tolerancia voči zasoleniu a následné klíčenie sú vyvolané hlavne signálnou dráhou SOS, ktorá je spustená fytochrómami phyA a phyB (Qiu et al., 2023).

2.4.2 Fotoreceptory a ich role v osmotickom strese

Štúdiá pozorujúce vplyv fotoreceptorov na abiotický stres nie sú početné, preto sa o tomto mechanizme zatiaľ nevie dostatok informácií. Keďže na odpovedi na abiotický stres sa podieľa viacero mechanizmov, nie je úplne jasné, akú presne rolu v tolerancii voči stresu majú fotoreceptory. Avšak, bolo zistené, že fotoreceptory cry, phot a phy spolupracujú, a tak prispievajú k aktivácii daných mechanizmov spúšťaných pri strese (D'Amico-Damião and Carvalho, 2018; Gururani, 2023).

2.4.2.1 Kryptochrómy a osmotický stres

Bolo dokázané, že pri OS vyvolanom suchom skúmanom na dvojítych mutantoch rastliny *A. thaliana* s nefunkčnými cry1 a cry2 boli tieto mutanti viac tolerantní voči suchu s porovnaním k rastline bez mutácie a rastlinám, ktoré mali nefunkčný len jeden z cry.

U rastlín, ktoré mali cry1 preexprimovaný bol pozorovaný opačný efekt, čiže bola zaznamenaná väčšia strata vody. Taktiež bolo dokázané, že cry a phot regulujú otváranie prieduchov pod modrým svetlom, pričom u štvoritých mutantov s nefunkčnými cry a phot bolo otváranie najmenšie a pri preexprimovaných mutantoch najväčšie (Mao et al., 2005). Ďalej bolo dokázané, že preexprimované cry u mutantov *A. thaliana* zvyšujú citlivosť k zasoleniu a k ABA a naopak, mutanti bez prítomnosti cry1 mali zvýšenú toleranciu k OS a ABA, čo dokazuje, že cry priamo súvisia s toleranciou voči abiotickému stresu a ABA signálnymi dráhami aktivovanými pri OS (D'Amico-Damião and Carvalho, 2018; Xu et al., 2009).

Podobné výsledky boli pozorované aj u sadenic *S. lycopersicum* L., kedy bol skúmaný mutant s absenciou cry1a vystavený OS. Mutant *cry1a* vykazoval známky rastliny so zvýšenou toleranciou k OS, mal zvýšenú toleranciu k zasoleniu aj pod modrým svetlom, avšak len pri nižších intenzitách.

Ďalej bolo zistené, že cry1a reguluje gény odpovedajúce na ROS a negatívne reguluje zhromažďovanie prolinu pri OS (D'Amico-Damião et al., 2021).

2.4.2.2 Fototropíny a osmotický stres

Ako už bolo spomínané, bolo dokázané, že cry, phot a phy spolu spolupracujú pri otváraní a zatváraní prieduchov a pri abiotickom strese v *A. thaliana* (Mao et al., 2005). Zatiaľ čo u štvoritých mutantov pod modrým svetlom bolo otváranie prieduchov výrazne zmenšené, u dvojitých mutantov s nefunkčnými phot1 a phot2 sa prieduchy vôbec neotvárali (Sharma et al., 2021). Taktiež bolo dokázané, že phot pozitívne ovplyvňujú ich hustotu. Zmena vodivosti prieduchov tak, že boli takmer rezistentné voči stimulu modrého svetla, bola zaznamenaná aj u samčieho sterilného mutantu *S. lycopersicum* L. *7B-1*, ktorý má poškodené fototropínové dráhy a je viac odolný voči OS na modrom svetle (Fellner and Sawhney, 2001, Hlavinka et. al, 2013). Ďalej bolo dokázané, že phot negatívne regulujú efektivitu využitia vody, nakoľko mutanti spotrebovali menej vody ako rastliny bez mutácií (Rusaczek et al., 2021), navyše, aj u *7B-1* dochádza k efektívnemu využitiu už nachádzajúcej sa vody v rastline (Hlavinka et. al, 2013). Pri nedostatku vody v pôde phot, hlavne phot1 spúšťa mechanizmy, ktoré majú za výsledok rast vo vyššej plochej časti koreňa, čo zvyšuje absorpciu vody z pôdy, a tak znižujú dopad sucha na rastlinu (Sharma et al., 2021).

Okrem roli phot pri OS bolo dokázané, že phot hrajú rolu aj pri výskyte ROS. Hodnoty ROS v *A. thaliana* s vyradenými phot1 a phot2 boli oveľa nižšie ako u tých s funkčnými phot pri strese vyvolanom UV-C svetlom, čo naznačuje, že obranný mechanizmus pri strese je úmyselne znížené expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* (Rusaczek et al., 2021).

2.4.2.3 Fytochrómy a osmotický stres

Viacero výskumov dokazuje priamu súvislosť fytochrómov a abiotického stresu, a to hlavne pri oxidatívnom strese. Bolo dokázané, že antioxidačný enzým hem oxygenasa priamo interaguje s phy, čo podporuje odstraňovanie ROS pri OS a tým zvyšuje toleranciu (Gururani, 2023). Ďalej bolo dokázané, že signálne dráhy sprostredkované phy sú spojené s expresiou génov spojených s toleranciou voči zasoleniu, ako je salt tolerance protein (STO), nakoľko u mutantov *A. thaliana*, u ktorých absentovali phyA a phyB, bola expresia STO znížená pri pôsobení červeného svetla (Gavassi et al., 2017; Indorf et al., 2007). Avšak, STO je degradovaný phyB na červenom svetle, čo znamená, že phyB negatívne reguluje odpoveď rastliny na stres (Gururani, 2023).

Vplyv phyA a phyB na toleranciu OS boli podrobne skúmané vo viacerých štúdiách a bolo zistené, že phy znižujú exprimáciu génov v metabolizme ABA, čím znižujú jej celkovú syntézu (Boggs et al., 2010; Carvalho et al., 2011).

Bolo dokázané, že phy sú negatívne regulátory tolerancie voči OS, nakoľko mutanti s neaktívnymi phyA, phyB alebo oboma neaktívnymi phy boli viac tolerantní voči OS u niekoľkých druhov rastlín, ako je *S. lycopersicum* L. a *Nicotiana tabacum*. U týchto mutantov boli zvýšené hladiny ABA, zvýšené zhromažďovanie prolinu a znížená produkcia ROS alebo ich zvýšené odstraňovanie (Gavassi et al., 2017; Gururani, 2023; Silva et al., 2021; Yang et al., 2018). Naopak, u *A. thaliana* a *Oryza sativa* boli phyA, phyB a phyAB mutanti viac citliví na stres vyvolaný suchom (Gururani, 2023; Qiu et al., 2023).

2.4.3 Obranné mechanizmy rastliny voči abiotickému stresu vyvolanému zasolením

Rastliny, ktoré sú prirodzene tolerantné voči soli sa nazývajú halofyty, avšak všetky úžitkové rastliny sú charakterizované ako glykofyty a sú voči soli citlivé (Hao et al., 2021). Kvôli citlivosti voči zasoleniu majú rastliny vyvinuté isté obranné a adaptačné mechanizmy, ktoré zahŕňujú morfologické zmeny, zmeny fyziologických a biochemických procesov, aktiváciu rôznych signálnych dráh a prispôsobenie rastu a vývoja (Zhou et al., 2023).

Typy tolerancií sa delia do troch skupín – osmotická tolerancia, iónová tolerancia a pletivová tolerancia. K osmotickej tolerancii sa radia mechanizmy zníženia vodivosti prieduchov, čo vedie k zadržiavaniu vody. Iónová tolerancia je vyvolaná vstúpením sodného kationu do koreňa, čo aktivuje signálne dráhy, ktoré zabraňujú vstupu ďalších kationov do koreňa a znižujú ich translokáciu do ostatných častí rastliny (Isayenkov and Maathuis, 2019). Taktiež sa znižuje rozširovanie buniek v koncových častiach koreňov a mladých listoch a sodný kation je nasmerovaný hlavne do starších listov, čím rastlina chráni mladšie listy pred jeho toxickými účinkami (Guo et al., 2022; Roşca et al., 2023). Výsledok pletivovej tolerancie je oddeľovanie toxických iónov do vakuol s cieľom obmedziť ich škodlivé pôsobenie na procesy prebiehajúce v cytoplazme (Isayenkov and Maathuis, 2019).

Rastliny sa bránia škodlivým vplyvom soli štyrmi spôsobmi – vylučovanie soli, riedenie soli, nahromadenie soli a zamedzenie (Hao et al., 2021). Vylučovanie soli je bežný proces u halofytov, riedenie soli je proces, pri ktorom rastliny absorbujú veľké množstvo vody alebo zväčšia veľkosť svojich buniek za účelom zamedzenia dosiahnutia toxických koncentrácií soli. Nahromadenie soli má za výsledok tvorbu vakuol a zamedzenie soli je proces, pri ktorom rastliny inhibujú vstup soli do koreňa.

Medzi fyziologické procesy, ktorými sa rastlina bráni vplyvu zasolenia je prispôsobenie osmotických podmienok, ktoré je dosiahnuté zvyšovaním koncentrácie draselného kationu a organických rozpúšťadiel ako sú prolin a betain v bunkách (Gharsallah et al., 2016). Rozpúšťadlá stabilizujú štruktúry makromolekúl, menia elasticitu bunkovej steny, udržiavajú absorpciu vody, znižujú osmotický rozdiel medzi cytosolom a okolím bunky, znižujú počet akvaporínov, zbavujú rastlinu ROS, udržiavajú integritu membrán

a enzýmovú aktivitu (Acosta-Motos et al., 2017; Roşca et al., 2023). Medzi ďalšie významné látky odpovedajúce na stres vyvolaný zasolením sa radia sukrosa, ktorá je dôležitá pre metabolizmus alebo manitol a inositol, ktoré zvyšujú toleranciu rastliny k zasoleniu (Hao et al., 2021).

Medzi ďalší, už spomínaný obranný mechanizmus, typický pre vyššie rastliny, patrí tvorba soľných vezikúl (Hao et al., 2021). Mimo skladovania nadbytočnej soli medzi jej funkcie patrí skladovanie vody za účelom ochránenia rastliny pred krátkodobým OS, skladovanie organických osmolytov a skladovanie látok odstraňujúcich ROS.

Na molekulárnej úrovni sú iónové kanály kľúčové pre zvýšenie tolerancie k zasoleniu v rastlinách (Gharsallah et al., 2016). Bolo zistené, že HKT transportéry zvyšujú toleranciu tak, že regulujú koncentráciu a pohyb sodných katiónov v pletivách. Zvýšenie tolerancie bolo dosiahnuté tak, že sodné katióny boli vrátené zo xylémových ciev do parenchymatických xylémových buniek, čím sa zvýšilo nahromadenie vakuol, čo má za výsledok ochranu pletív listov, v ktorých prebieha fotosyntéza.

3 MATERIÁL A METÓDY

3.1 Rastlinný materiál

Pre praktickú časť tejto práce bola vybraná rastlina *Solanum lycopersicum* L. troch genotypov – kultivar Moneymaker (cv. MM), *cry2-1* a *cry2-ox3* (Fantini et al., 2019; Giliberto et al., 2005). Semená genotypov *cry2-1* a *cry2-ox3* boli poskytnuté E. Heuvelink (Wageningen University, Wageningen, Holandsko) a E. Fantini (ENEA-Centro Ricerche Trisaia, Taliansko).

V genotype *cry2-1* nie je *cry2* funkčný a vypnutie jeho funkcie bolo dosiahnuté použitím molekulárnej metódy TILLING (targeting induced local lesions in genomes) a chemicky pomocou ethyl methansulfonátu (EMS), pričom bol mutant izolovaný z cv. MM (Fantini et al., 2019). Genotyp *cry2-1* má predčasný stop kodón lokalizovaný na triplete 318. Štúdia ukázala, že *cry2-1* mal pri kultivácii v kontinuálnom modrom svetle dlhší hypokotyl a inhibícia rastu, ako aj jeho dĺžka sú závislé na intenzite modrého svetla. Ďalej bolo zistené, že v tomto genotype bolo kvitnutie oddialené a plody *cry2-1* obsahovali menšie percento chlorofylu, karotenoidov a lykopénu.

V genotype *cry2-ox3* je *cry2* nadmerne exprimovaný, čo bolo dosiahnuté transformáciou komplementárnej DNA (cDNA) génu *CRY2* do cv. MM využitím 35S promotéra mozaikového vírusu vyskytujúceho sa u karfiolu za použitia *Agrobacterium tumefaciens* (Giliberto et al., 2005). Štúdia ukázala, že u *cry2-ox3* je vyššia koncentrácia antokyanov a chlorofylu v listoch, ako aj nadmerná produkcia flavonoidov a lykopénu v plodoch. Ďalej boli pozorované skrátene hypokotyly a zvýšené hladiny antokyanov pri kultivácii na modrom svetle a bielom svetle. Pri zvýšení intenzity bieleho svetla bola zvýšená pigmentácia a znížená výška rastliny. Ďalej bolo dokázané, že nezávisle na svetelných podmienkach v tomto genotype dochádza ku skrátaniu internodií, oneskoreniu kvitnutia a všeobecne zmenšeniu celkovej výšky rastliny.

Tieto genotypy boli vybrané na výskum za účelom zistenia, či je aktivita génov *PHOT1* a *PHOT2* pre fotoreceptory phot závislá na aktivite *cry2* kryptochrómu pri abiotickom strese navodenom zasolením.

3.1 Príprava kultivačného MS média

Erlenmeyerova banka s objemom 3 l bola naplnená 1 l destilovanej vody. Za neustáleho miešania pomocou magnetického miešadla na miešačke bolo pridaných navážených 20 g sacharózy (Lach-Ner, Česká Republika, kat č. 40135-AP0), 8,6 g MS média (Murashige and Skoog, 1962; Duchefa Biochemie, Holandsko, kat.č. M0221.0100) a 390,4 mg MES pufry ((kyselina 2-(N-morpholino) ethansulfonová, Serva, Nemecko).

Následne bol objem doplnený destilovanou vodou na 2 l a pH bolo upravené na hodnotu 6,1 pomocou malého množstva 1M roztoku hydroxidu draselného. Po ustálení pH bola miešačka vypnutá. Do piatich 500ml fliaš bolo pridaných 2,8 g naváženej agarózy (Duchefa Biochemie, Holandsko, kat. č. P1003.1000) a fľaše boli naplnené 400 ml pripraveného roztoku. Následne boli fľaše sterilizované v parnom autokláve pri teplote 121 °C a tlaku 101,3 kPa.

3.2 Výsev a kultivácia semien

Do nesterilných plastových 50ml skúmaviek typu Falcon bolo napočítaných 360 semien

S. lycopersicum L. už spomínaných troch genotypov a následne bolo pridaných 40 ml roztoku chlórnanu sodného obsahujúceho 2,8 % aktívneho chlóru za účelom povrchovej sterilizácie semien po dobu 20 minút. Medzitým bolo dopredu pripravené médium zohriate v mikrovlnnej rúre a ďalšia práca prebiehala v laminárnom flowboxe (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Fisher Scientific, USA), ktorého pracovná plocha bola vyčistená 70% ethanolom.

Po uplynutí 20 minút boli semená 6x premyté sterilnou destilovanou vodou pomocou 10ml automatickej pipety. Po poslednom premytí bolo do skúmaviek naliatych cca 5 ml sterilnej destilovanej vody, aby semená nevyschli. Boli pripravené média o rôznych koncentráciách, vrátane média bez obsahu chloridu sodného. Daný objem sterilného 5M zásobného roztoku chloridu sodného bol napipetovaný do 120 ml teplého MS média podľa toho, aká bola potrebná výsledná koncentrácia média (Tabuľka 1). Roztoky o príslušných koncentráciách boli rozliate na okrúhle plastové sterilné Petriho misky (priemer 90 mm) tak, že objem média v každej miske bol 20 ml. Po stuhnutí média bolo na každú miskú pomocou pinzety vysterylizovanej v 96% roztoku ethanolu a vyžihanej v plameni liehového kahanu vysiatych 30 semienok. Genotypy boli vysiate na každú koncentráciu dokopy trikrát – jedna miska pre každú svetelnú podmienku kultivácie. Po vysiatí bola každá Petriho miska zalepená páskou z netkanej textílie (Urgopore, Softpore; Batist Medical, a.s., Česká republika) a na vrch Petriho misiek boli nakreslené čiary pre orientáciu rastu.

Tabuľka 1 - Príprava médií o rôznych koncentráciách pomocou prídania 5 mol.l⁻¹ zásobného roztoku chloridu sodného

Požadovaná koncentrácia média [mmol.l ⁻¹]	5 mol.l ⁻¹ zásobný roztok chloridu sodného [ml]
80	1,9
60	1,4
50	1,2
20	0,48
10	0,24

Misky so semenami určenými na kultiváciu v kontinuálnom modrom alebo červenom svetle bez nočnej periódy boli umiestnené do plastových stojanov vo vertikálnej polohe a umiestnené do automatických kultivačných komôr (Microclima 1000E, 39 Snijders Scientific, Holandsko). Zdrojom modrého svetla bola trubica (Philips TLD-36 W/18-Blue, USA) s maximálnou ožiarenosťou 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pri 440 nm a zdrojom červeného svetla bola trubica (Philips TLD-36 W/15-Red, USA) s maximálnou ožiarenosťou 10 $\mu\text{mol.m}^{-2}\text{s}^{-1}$ pri 660 nm. Pre kultiváciu v tme boli koncentračné rady všetkých genotypov oddelene zabalené vo vertikálnej polohe do alobalu tak, aby k nim neprenikalo svetlo a kultivované v komore s modrým svetlom.

Semená boli následne kultivované pri teplote 23 °C po dobu 7 dní, kedy bolo za tento časový údaj pozorované klíčenie všetkých genotypov v rozdielnych podmienkach a hodnoty klíčivosti boli denne zaznamenávané. Zaznamenávanie klíčenia začalo tretí deň od vysiatia semien.

3.3 Homogenizácia semien

Pre štúdium expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* boli semená všetkých troch genotypov kultivované na médiu bez prídavku chloridu sodného a na médiu s prídavkom chloridu sodného. Pre genotyp *cry2-1* bola použitá koncentrácia 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného, zatiaľ čo pre genotyp *cry2-ox3* bola použitá koncentrácia 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného. Pre cv.MM boli použité obe koncentrácie (50 mmol.l⁻¹ a 20 mmol.l⁻¹). Tieto koncentrácie boli vybrané na základe vyhodnotenia výsledkov inhibície klíčenia. Expresie génov boli študované v spomínaných podmienkach 72 hodín po vysiatí semien. Semená boli pomocou sterilnej pipety odobrané z Petriho misiek, prenesené do sterilnej hliníkovej fólie a zvážené na analytických váhach (HR-200 EC, A&D, Japonsko). So semenami bolo manipulované pod svetlom, v ktorom boli kultivované. Semená kultivované v tme boli zbierané pod zeleným svetlom, kultivované v modrom svetle pod modrým svetlom a kultivované v červenom svetle pod červeným svetlom. Následne boli odvážené semená uschované v sterilnej hliníkovej fólii dané do tekutého dusíku a boli ponechané v mrazničke pri teplote

–80 °C na 24 hodín. Následne boli všetky semená zhomogenizované v trecej miske pomocou tĺčika a tekutého dusíku na jemný prášok tak, aby bol celkový výťažok hmotnosti zhomogenizovaných semien v rozmedzí 90 – 120 mg. Zhomogenizovaný materiál bol prenesený do 2ml sterilných mikroskúmaviek a uskladnený v mrazničke pri –80 °C na 24 hodín.

3.4 Izolácia, prečistenie RNA a syntéza cDNA

Po uplynutí 24 hodín bola vykonaná izolácia a prečistenie ribonukleovej kyseliny (RNA) podľa protokolu (Isolate II RNA Plant Kit, Bioline, UK, kat. č. BIO-52077; Trávníčková, 2021). To, či je vyizolovaná RNA vhodná na ďalšie použitie bolo kontrolované pomocou elektroforézy a meraním koncentrácie vyizolovanej RNA na Nanodrop spektrofotometri (Nanodrop one, Thermo Scientific, USA), ktorý bol nastavený na meranie RNA a následne bola zmeraná jej celková koncentrácia [ng/μl] v 1 μl vzorky. Vzorky s koncentráciou nad 80 ng/μl boli vhodné pre syntézu cDNA.

Na elektroforézu bol použitý 1,5% agarózový gél, ktorý bol pripravený navážením 1,2 g agarózy (Invitrogen, USA, kat. č. 15510-027) a následným zahriatím navážky v 80 ml 0,5x TBE pufri. Po úplnom rozohriatí agarózy v mikrovlnnej rúre bolo do roztoku pridaných 5 μl fluorescenčného farbiva nukleových kyselín GelRed 1000x riedeného s vodou (GelRed® Nucleic Acid Stain, Merck, Nemecko). Objem 2 μl 6x Loading Dye (Thermo Scientific, USA) bol spolu s 2 μl vzorky napipetovaných do jamiek v géli. Ako DNA ladder bol použitý GeneRuler 100 bp (Thermo Scientific, USA). Elektroforetická vaňa (Bio-rad, USA) bola naplnená po rysku 0,5x TBE pufrom a elektroforéza bola nastavená na 110 V na 30 minút. Výsledok bol analyzovaný pomocou gélového zobrazovacieho a analytického systému Ingenius 3 (Syngene, India) a pomocou softwaru GeneSys (Genesys, USA).

Nedegradované vzorky boli vhodné pre použitie na syntézu cDNA. Syntéza cDNA bola vykonaná podľa protokolu (PrimeScript™ 1st cDNA Synthesis Kit, Takara Bio, Japonsko; Trávníčková, 2021) a po syntéze bola skladovaná v mrazničke pri teplote –20 °C.

3.5 Kvantitatívna PCR

Pomocou kvantitatívnej PCR (real-time PCR; qPCR) bola sledovaná expresia génov *PHOT1* a *PHOT2*. Ako housekeeping gén bol použitý gén *PP2Acs*. Do troch sterilných 1,5ml mikroskúmaviek (pre každý gén jedna) bol pripravený mix z 10 mM zásobných forward (F) a reverse (R) primerov (Tabuľka 2) pre gény *PHOT1*, *PHOT2* (Omidvar et al., 2015) a *PP2Acs* (Humplík et al., 2015) (Tabuľka 3). Ako fluorescenčné farbivo bol použitý SYBR green (SensiFAST SYBR Lo-ROX Kit, Bioline, UK, kat. č. BIO-94005). Objem bol rátaný pre 6 vzoriek v triplikátoch, negatívnu kontrolu, čo bola v tomto prípade voda a jeden objem navyše.

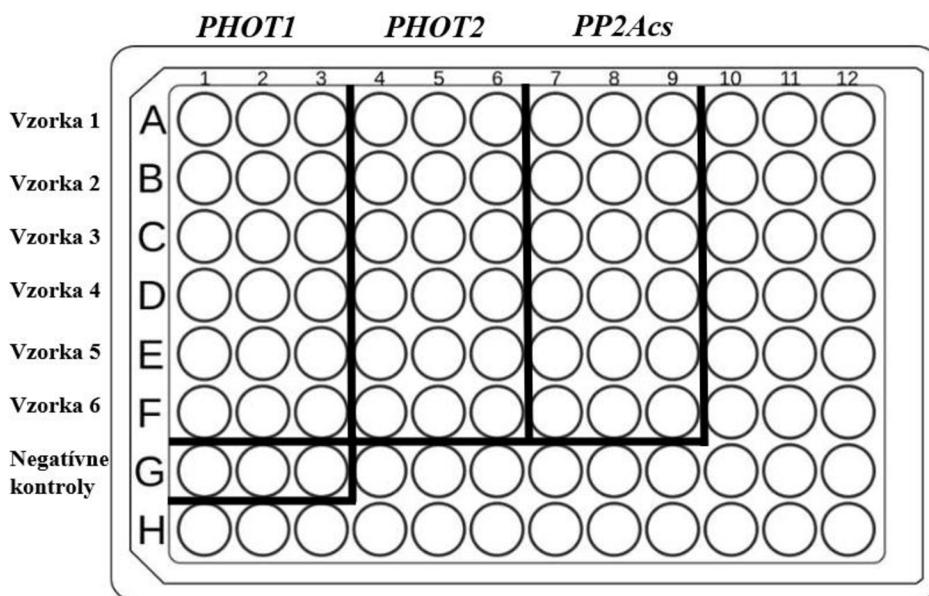
Tabuľka 2 - Priprava mixov pre expresiu génov

	1 vzorka [μ l]	6 vzoriek v triplikátoch + negatívna kontrola [μ l] + extra objem
SYBR green	10	200
Forward primery (<i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i> , <i>PP2Acs</i>)	0,8	16
Reverse primery (<i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i> , <i>PP2Acs</i>)	0,8	16
Voda (nuclease free)	4,4	88

Tabuľka 3 – Sekvencie F a R primerov použitých na expresiu génov *PHOT1*, *PHOT2* a *PP2Acs* pri qPCR

Gén	Forward sekvencia	Reverse sekvencia
<i>PHOT1</i>	GCTGGCAAAGAGAGGGGAAT	CCCGATTGCAATGCTTCTCG
<i>PHOT2</i>	GAAGGTGTTAATGAGAAAGAAT	CGTCCTGACTAGACTTTATA
<i>PP2Acs</i>	CGATGTGTGATCTCCTATGGTC	AAGCTGATGGGCTCTAGAAATC

Vzorky cDNA, F a R primery všetkých troch génov, voda a SYBR green boli vybrané z mrazničky a boli nechané v ľade, dokým sa mierne neroztopili. Následne boli vzorky cDNA stočené na minicentrifúge (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA) a ich koncentrácia bola zameraná na Nanodrope. Po roztopení primerov boli taktiež stočené na mikrocentrifúge a bol pripravený mix podľa Tabuľky 2. Následne boli tieto mixy opäť stočené na minicentrifúge a 16 μ l z každého mixu bolo napipetovaných do 96-jamkovej dosky (Bio-Rad Laboratories, USA). cDNA bola riedená na $\frac{1}{4}$ a to tak, že do 0,2ml sterilných mikroskúmaviiek bolo napipetovaných 30 μ l vody a 10 μ l vzorky. Do každej jamky bolo napipetovaných 4 μ l nariadenej cDNA podľa schémy. (Obrázok 5). Celá práca prebiehala na ľade.



Obrázok 5 – Schéma pipetovania 96-jamkovej dosky pre expresiu génov *PHOT1*, *PHOT2* a *PP2Acs*

Po napipetovaní bola doska zalepená priehľadnou fóliou, stočená na centrifúge (PCR plate spinner, VWR, USA) a daná do termocycleru (C1000 Touch, CFX96 Real-Time System, Bio-rad, USA). Následne bol zvolený program pre gény *PHOT1+PHOT2* (Tabuľka 4).

Tabuľka 4 – Schéma real-time PCR programu pre gény *PHOT1* a *PHOT2*

Proces	Teplota [°C]	Čas [sek]	
Hot Start aktivácia	95	120	
Denaturácia	95	5	40 cyklov
Nasadanie primerov	60,5	20	
Elongácia reťazca	75	10	

Následne boli výsledky vyhodnotené pomocou softwaru CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) a ďalšie matematické úkony boli prevedené v Microsoft Office Excel. Z výsledkov zo spomínaného softwaru boli vybrané tie hodnoty C_t v triplikátoch, ktoré sa nelíšili viac ako o 0,5 a nedosahovali hodnoty nad 35 alebo pod 10. Následne bola vyrátaná relatívna expresia génov pomocou matematických operácií v Microsoft Office Excel. Všetky výpočty sa vzťahovali k cv. MM kultivovanom v tme bez zasolenia po 72 hodinách. Najprv bol vyrátaný priemer hodnoty C_t triplikátov a ich smerodajná odchýlka.

Následne bola vypočítaná hodnota ΔC_t vzťahnutá k cv. MM v spomínaných podmienkach:

$$\Delta C_t = C_{t_{GI,HG}} - C_{t_{cv.MM0}}$$

$C_{t_{GI,HG}}$ = priemerná C_t hodnota triplikátov génu *PHOT1*, *PHOT2* (GI – gene of interest) alebo *PP2Acs* (HG – housekeeping gene).

$C_{t_{cv.MM0}}$ = priemerná C_t hodnota triplikátov génov *PHOT1*, *PHOT2* alebo *PP2Acs* v genotype cv.MM kultivovanom 72 hodín v tme bez zasolenia.

Z týchto hodnôt bola ďalej vyrátaná relatívna expresia génov:

$$R_{GI,HG} = (1 + E_{GI,HG})^{\Delta C_{t_{GI,HG}}}$$

Kde $E_{GI,HG}$ = hodnota účinnosti primerov *PHOT1*, *PHOT2* (GI) alebo *PP2Acs* (HG) (Omidvar and Fellner, 2015)

Následne bol vyrátaný podiel relatívnej expresie R génov *PHOT1*, *PHOT2* a *PP2Acs*:

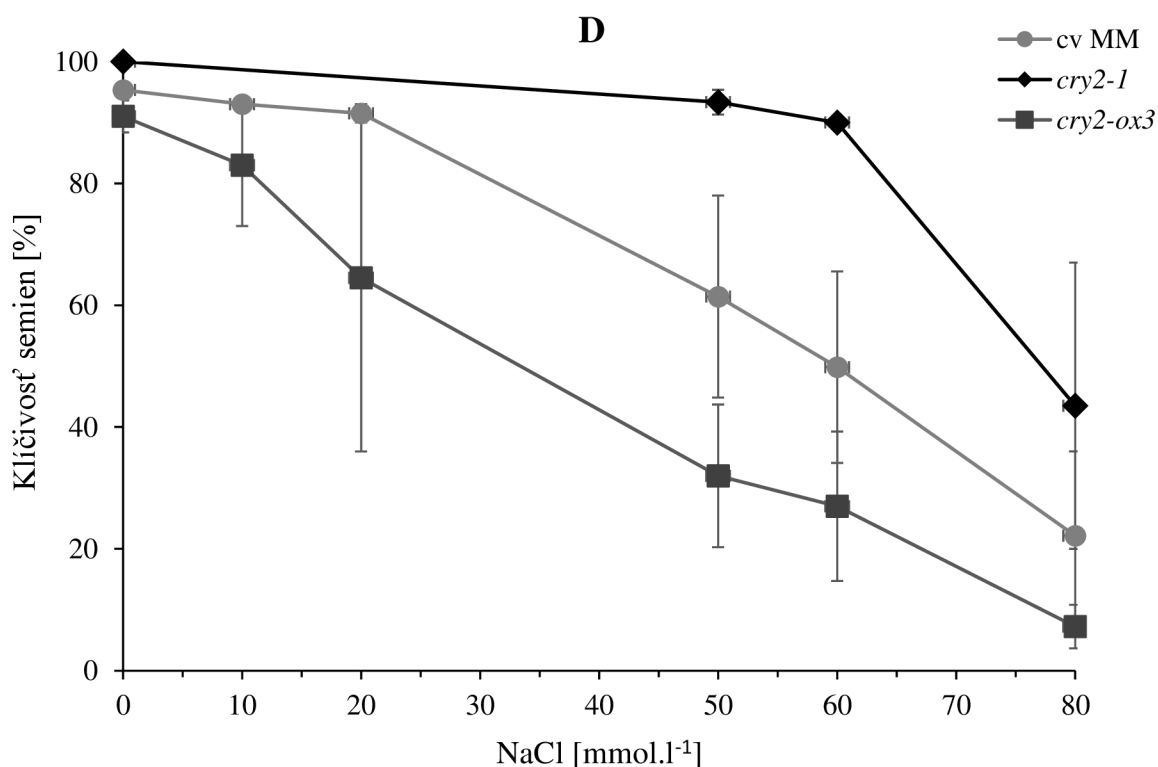
$$R = \frac{R_{GI}}{R_{HG}}$$

Výsledky a porovnania relatívnej expresie všetkých skúmaných genotypov v spomínaných podmienkach sú ďalej analyzované v kapitole Výsledky.

4 VÝSLEDKY

4.1 Klíčivosť semien

Ako už bolo spomínané v kapitole 3, semená *S. lycopersicum* L. genotypov cv. MM, *cry2-1* a *cry2-ox2* boli kultivované v tme (D), na kontinuálnom modrom svetle (BL) a na kontinuálnom červenom svetle (RL) po dobu 7 dní, počas ktorých bolo od tretieho dňa zaznamenávané percento klíčenia semien v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného vybraných koncentrácií (0, 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹). Po zaznamenávaní klíčenia v celkovo deviatich nezávislých experimentoch bola porovnaná maximálna klíčivosť mutantov *cry2-1* a *cry2-ox3* s kultivarom cv. MM, v daných svetelných podmienkach (Obrázky 6 – 8). Cieľom bolo zistiť, či *cry2* ovplyvňuje odpoveď rastliny na zasolenie a či je vplyv zasolenia závislý na svetle.

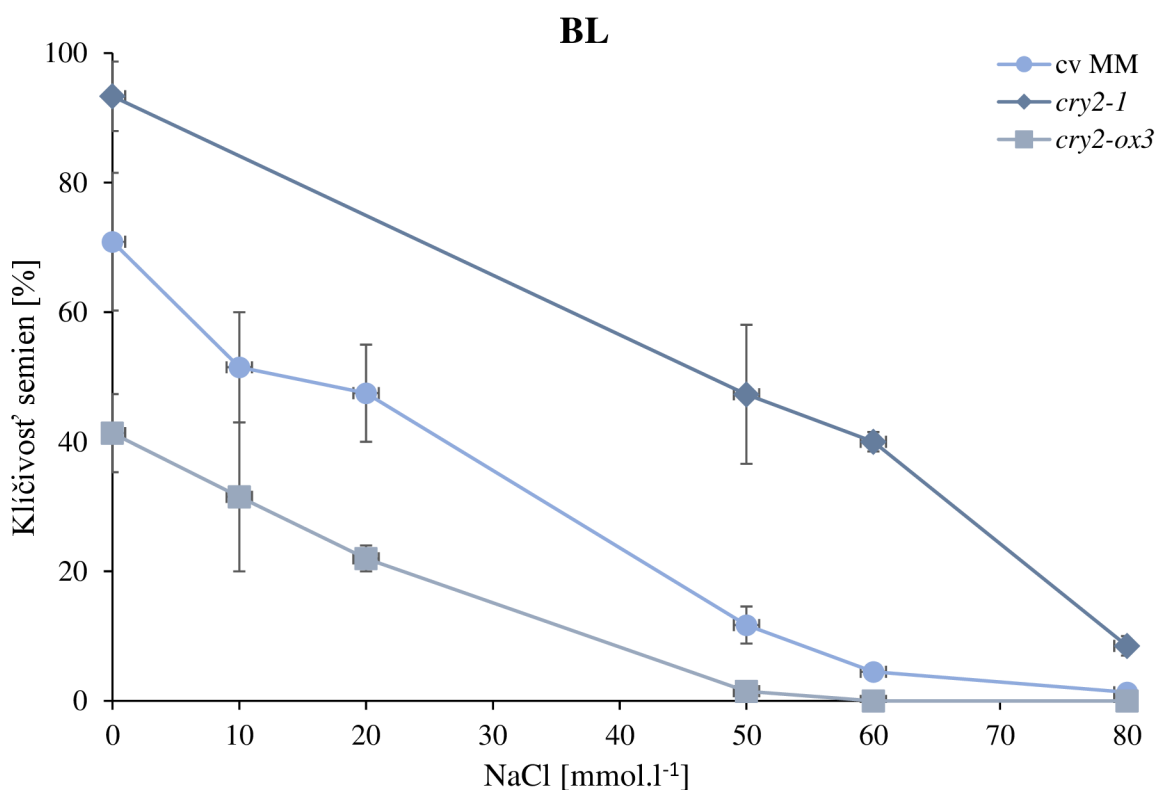


Obrázok 6 – Maximálna klíčivosť semien genotypov cv. MM, *cry2-1* a *cry2-ox3* v tme po 7 dňoch od vysiatia. Genotypy cv. MM a *cry2-ox3* boli kultivované v MS médiu bez obsahu chloridu sodného a v koncentráciách 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹, genotyp *cry2-1* bol kultivovaný v MS médiu bez chloridu sodného a v koncentráciách 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹. Priemerné hodnoty klíčivosti a \pm SE boli získané z celkovo 9 nezávislých experimentov.

Pri klíčení v D bolo možné pozorovať, že klíčenie cv. MM bez obsahu soli začínalo na hodnote 95 % a so zvyšujúcou koncentráciou chloridu sodného v médiu sa klíčivosť znižovala. Tento trend bol pozorovaný aj u oboch mutantov. Genotyp *cry2-1* vykazoval vyššiu klíčivosť ako cv. MM, a to 100% pri kultivácii bez chloridu sodného.

U genotypu *cry2-ox3* bola klíčivosť bez prítomnosti chloridu sodného nižšia ako u cv. MM s hodnotou 91 %.

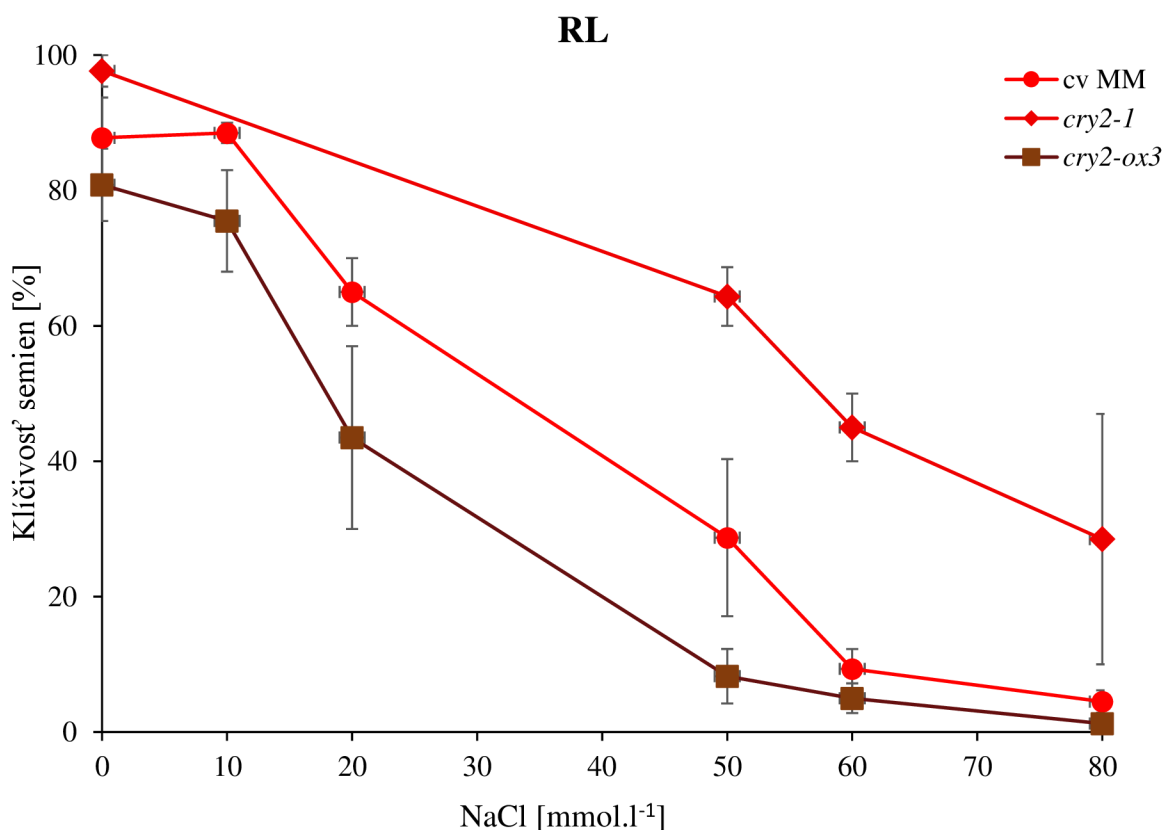
Pri najvyššej koncentrácii chloridu sodného v médiu (80 mmol.l⁻¹) dosiahla maximálna klíčivosť cv. MM 22 %, pričom mutant *cry2-1* dosahoval v tejto koncentrácii až 43,5 %. U mutantu *cry2-ox3* bola maximálna hodnota klíčivosti najnižšia, a to 7,25 %. Vo výsledku mal v D genotyp *cry2-1* vo všetkých koncentráciách vyššiu klíčivosť ako cv. MM a aj ako *cry2-ox3*.



Obrázok 7 – Maximálna klíčivosť semien genotypov cv. MM, *cry2-1* a *cry2-ox3* na BL po 7 dňoch od vysiatia. Genotypy cv. MM a *cry2-ox3* boli kultivované v MS médiu bez obsahu chloridu sodného a v koncentráciách 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹, genotyp *cry2-1* bol kultivovaný v MS médiu bez chloridu sodného a v koncentráciách 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹. Priemerné hodnoty klíčivosti a ± SE boli získané z celkovo 9 nezávislých experimentov.

V porovnaní s D bola v podmienkach bez obsahu soli v médiu maximálna klíčivosť v BL znížená u všetkých troch genotypov, kedy u cv. MM začínala klíčivosť na 71 %. Hodnota klíčivosti cv. MM je však nižšia ako pri *cry2-1*, ktorá bola 93 %. Mutant *cry2-ox3* dosahoval najnižšiu hodnotu klíčivosti, a to 41 %, čo je výrazný pokles oproti D. So zvyšujúcou sa koncentráciou chloridu sodného v médiu bolo opäť pozorované znižovanie klíčivosti. Pri kultivácii v najvyššej koncentrácii (80 mmol.l⁻¹) chloridu sodného v médiu bola maximálna klíčivosť cv. MM iba 1,3 %, pričom u *cry2-1* dosiahla 8,5 %.

U mutanta *cry2-ox3* bola klíčivosť v tejto koncentrácii nulová. Tak ako v D, aj pri kultivácii v BL bola pozorovaná najvyššia klíčivosť u genotypu *cry2-1*.

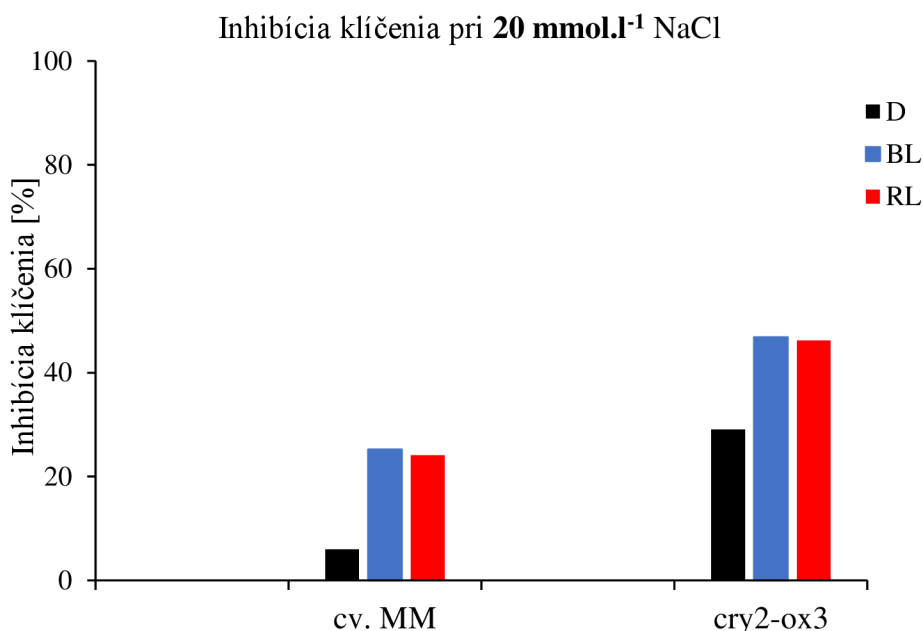


Obrázok 8 – Maximálna klíčivosť semien genotypov cv. MM, *cry2-1* a *cry2-ox3* v RL po 7 dňoch od vysatia. Genotypy cv. MM a *cry2-ox3* boli kultivované v MS médiu bez obsahu chloridu sodného a v koncentráciách 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹, genotyp *cry2-1* bol kultivovaný v MS médiu bez chloridu sodného a v koncentráciách 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹. Priemerné hodnoty klíčivosti a \pm SE boli získané z celkovo 9 nezávislých experimentov.

Pri kultivácii v kontinuálnom RL bola klíčivosť semien vyššia ako v BL, ale nižšia ako v D, kedy pri kultivácii cv. MM v médiu bez obsahu soli klíčivosť začínala na hodnote 88 %, u *cry2-1* bola opäť vyššia ako u cv. MM, a to 98 % a u mutanta *cry2-ox3* začínala na hodnote 80 %. Bol zachovaný trend klesania klíčivosti so zvyšujúcou sa koncentráciou chloridu sodného v MS médiu. Pri najvyššej skúmanej koncentrácii (80 mmol.l⁻¹) bola maximálna klíčivosť cv. MM 4,5 %, pričom u *cry2-1* bola výrazne vyššia a hodnota dosahuje 28,5 %. Mutant *cry2-ox3* mal v týchto podmienkach maximálnu klíčivosť 1,5 %, čo je výsledok bližší k hodnotám cv. MM. Výsledky klíčenia v RL bez obsahu soli sa približujú kultivácii v D, avšak pri najvyššej koncentrácii boli výsledky bližšie výsledkom z BL. Ako v predošlých svetelných podmienkach, aj v RL bola najvyššia klíčivosť pozorovaná u genotypu *cry2-1*.

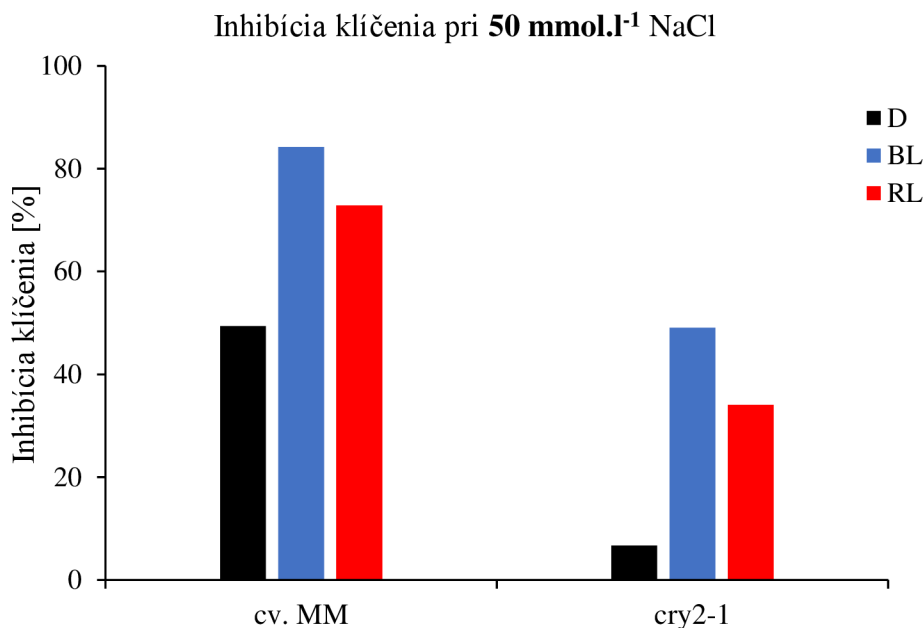
Z grafov popisujúcich maximálnu klíčivosť v D, v kontinuálnom BL a v kontinuálnom RL je viditeľné, že genotyp *cry2-1* s neaktívnym *cry2* mal najvyššiu maximálnu klíčivosť v každej svetelnej podmienke, zatiaľ čo *cry2-ox3* s preexprimovaným *cry2* mal klíčivosť zníženú aj v nižších koncentráciách soli v porovnaní s cv. MM.

Okrem maximálnej klíčivosti, ktorá nie je z grafov zreteľne prehľadná, bola pozorovaná aj inhibícia klíčenia chloridom sodným v rovnakých koncentráciách, ako maximálna klíčivosť. Kvôli veľmi nízkej klíčivosti pri koncentrácii 50 mmol.l⁻¹ genotypu *cry2-ox3* bola inhibícia klíčenia daného genotypu porovnaná s inhibíciou klíčenia cv. MM pri koncentrácii 20 mmol.l⁻¹ (Obrázok 9). Pre porovnanie inhibície klíčenia u cv. MM a *cry2-1* bola vybraná koncentrácia 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného, nakoľko pri týchto koncentráciách je rozdiel v inhibíciách najviac viditeľný (Obrázok 10).



Obrázok 9 – Inhibícia klíčivosti semien genotypov cv. MM a *cry2-ox3* pri koncentrácii 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu po 7 dňoch od vysiatia v D, BL a RL. Hodnoty inhibície klíčivosti semien boli vypočítané z priemerných hodnôt maximálnej klíčivosti (Obrázok 6-8).

Pri inhibícii klíčivosti na 7. deň od vysiatia v koncentrácii 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu dosahovala inhibícia klíčivosti semien cv. MM kultivovaných v D len 6%, zatiaľ čo u *cry2-ox3* to bolo až 29%. V BL je pozorovaný rovnaký trend, kedy u cv. MM bola vypočítaná hodnota inhibície klíčivosti 25 % a u *cry2-ox3* bola táto hodnota 46,8 %. V RL boli výsledky v podstate totožné s tými, ktoré boli vypočítané pre BL, kedy inhibícia klíčivosti cv. MM bola 24 % a *cry2-ox3* 46 %.



Obrázok 10 – Inhibícia klíčivosti genotypov cv. MM a *cry2-1* pri koncentrácii 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu po 7 dňoch od vysiatia v D, BL a RL. Hodnoty inhibície klíčivosti semien boli vypočítané z priemerných hodnôt maximálnej klíčivosti (Obrázok 6-8).

Pri inhibícii klíčivosti na 7. deň od vysiatia v koncentrácii 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu dosahovala inhibícia klíčivosti semien cv. MM kultivovaných v D 49,5 %, pričom u *cry2-1* len 6,7 %. V BL bola vypočítaná hodnota inhibície klíčivosti pre semená cv.MM 84,2 %, pričom u *cry2-1* bola táto hodnota opäť nižšia, a to 49 %. V RL je pozorovaný rovnaký trend, kedy u cv. MM bola vypočítaná hodnota inhibície klíčivosti pre semená cv. MM na 72,8 % a u *cry2-1* na 34 %.

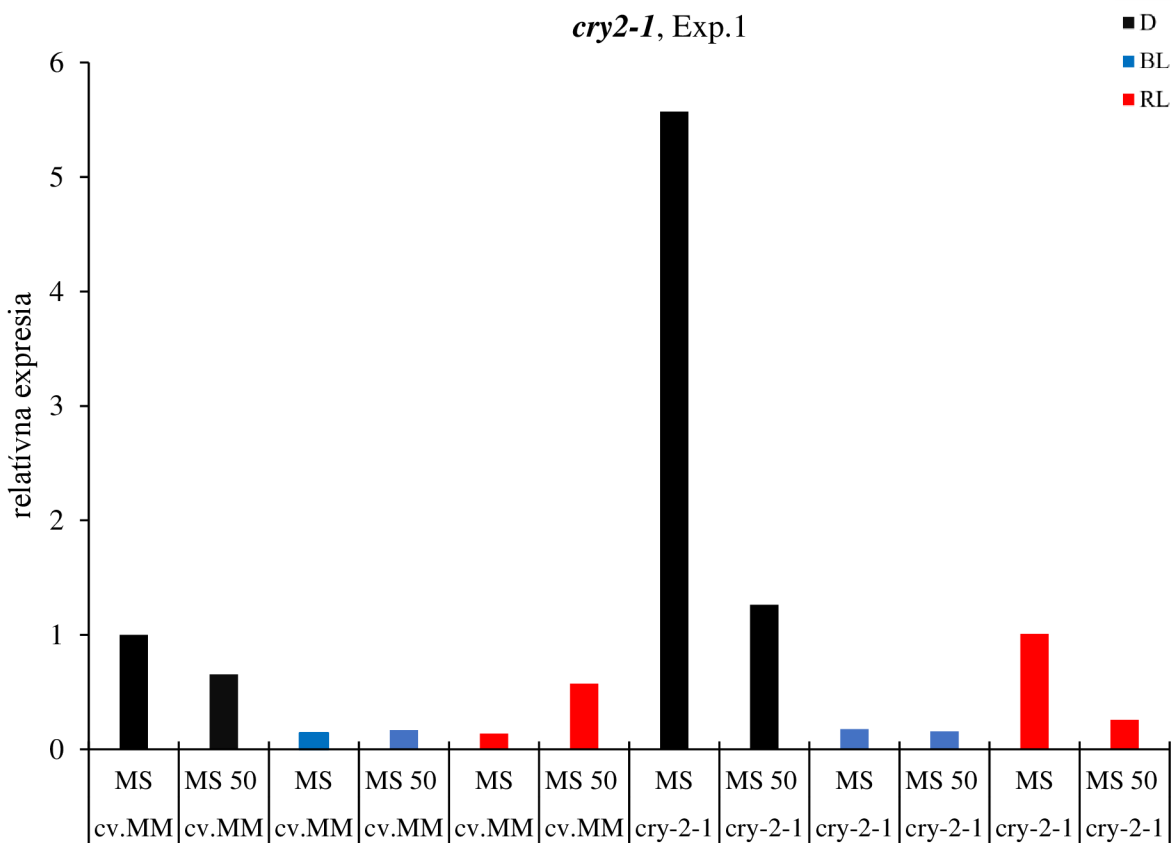
Pri porovnaní inhibície klíčenia v dvoch rôznych koncentráciách (20 mmol.l⁻¹ a 50 mmol.l⁻¹) bolo možné pozorovať, že pri nižšej koncentrácii bola inhibícia klíčenia v BL a RL porovnateľná, ako u cv. MM, tak aj u *cry2-ox3*. Všeobecne bola najnižšia inhibícia klíčenia vo všetkých troch genotypoch a v oboch koncentráciách pozorovaná v D.

4.2 Expresia génov *PHOT1* a *PHOT2*

Pre analýzu miery relatívnej expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* vo všetkých troch genotypoch bola použitá metóda qPCR. Genotyp *cry2-1* bol analyzovaný pri koncentráciách 0 a 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu po 72 h od vysiatia v D, BL a RL a porovnaný s cv. MM v rovnakých popísaných podmienkach. Genotyp *cry2-ox3* bol analyzovaný pri koncentráciách 0 a 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu 72 h od vysiatia v D, BL a RL a porovnaný s cv. MM v rovnakých popísaných podmienkach. Boli analyzované výsledky celkovo štyroch experimentov, pričom dva experimenty boli sústredené na relatívnu expresiu *PHOT1* a *PHOT2* v *cry2-1* a dva experimenty boli sústredené na expresiu týchto

génov v *cry2-ox3*. Relatívna expresia bola vzťahovaná k housekeeping génu *PP2Acs* a k cv. MM kultivovanom v tme bez obsahu soli v MS médiu.

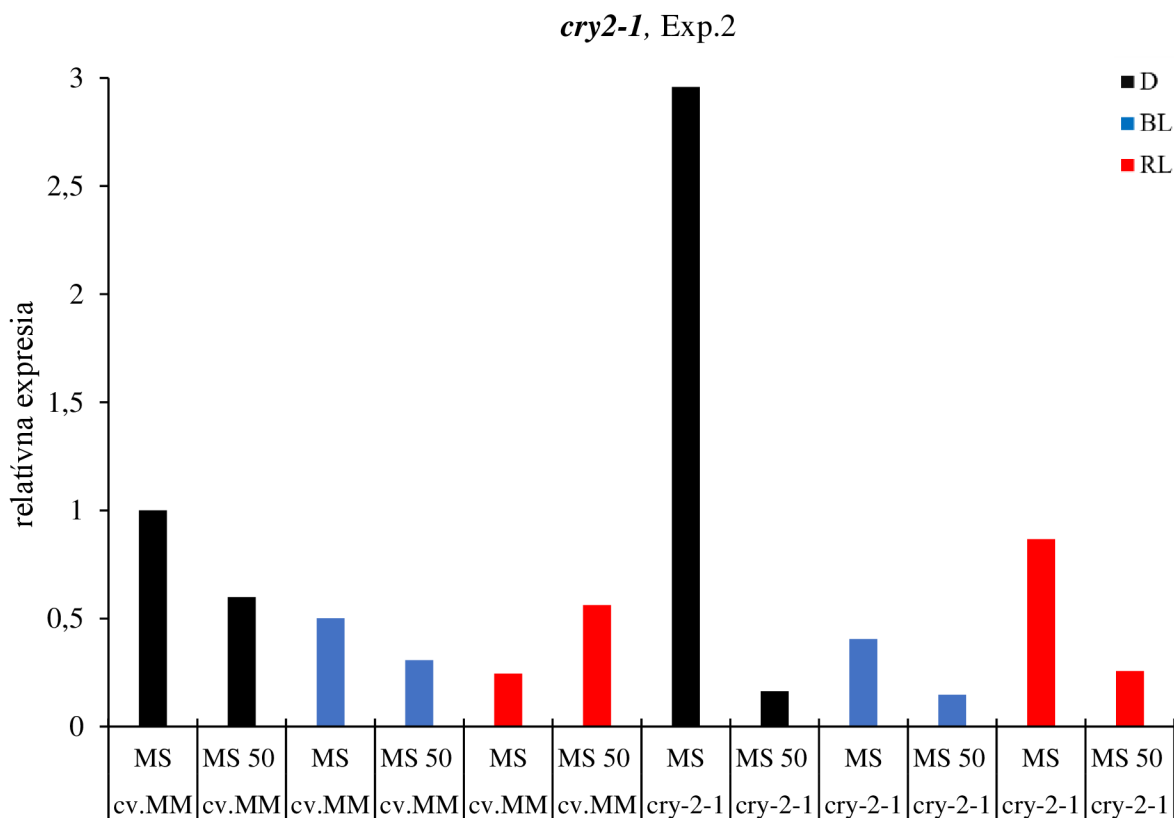
Experimenty neboli priemerované kvôli rozdielnym absolútnym hodnotám, avšak trend výsledkov sa nemenil (Obrázok 11 – 14). Výsledky expresie génu *PHOT2* vykazovali až príliš veľkú biologickú variabilitu na to, aby sa dal formulovať záver. Preto sú tieto výsledky uvedené v Prílohe 1.



Obrázok 11 – Relatívna expresia génu *PHOT1* v semenách muntanta *cry2-1* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (50 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 1). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vzťahovaná k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv.MM.

Miera relatívnej expresie génu *PHOT1* v semenách cv. MM kultivovaných v D bez prítomnosti chloridu sodného bola vypočítaná na hodnotu 1. Z Obr. 11 je zreteľné, že expresia génu *PHOT1* sa v skúmaných svetelných podmienkach líši, ako u cv. MM, tak aj u *cry2-1*, pričom najnižšia expresia je v BL. Výrazný bol taktiež rozdiel v expresii *PHOT1* genotypov v D bez prítomnosti soli, kedy u mutanta *cry2-1* bola expresia zvýšená až o 95 % v porovnaní s cv. MM. V BL nie sú pozorované takmer žiadne zmeny, nakoľko bez prítomnosti soli bola expresia génu u *cry2-1* zvýšená len o 8 % v porovnaní s cv. MM. V RL bola taktiež výrazne zvýšená expresia génu u *cry2-1* v porovnaní s cv. MM, a to o 87 %.

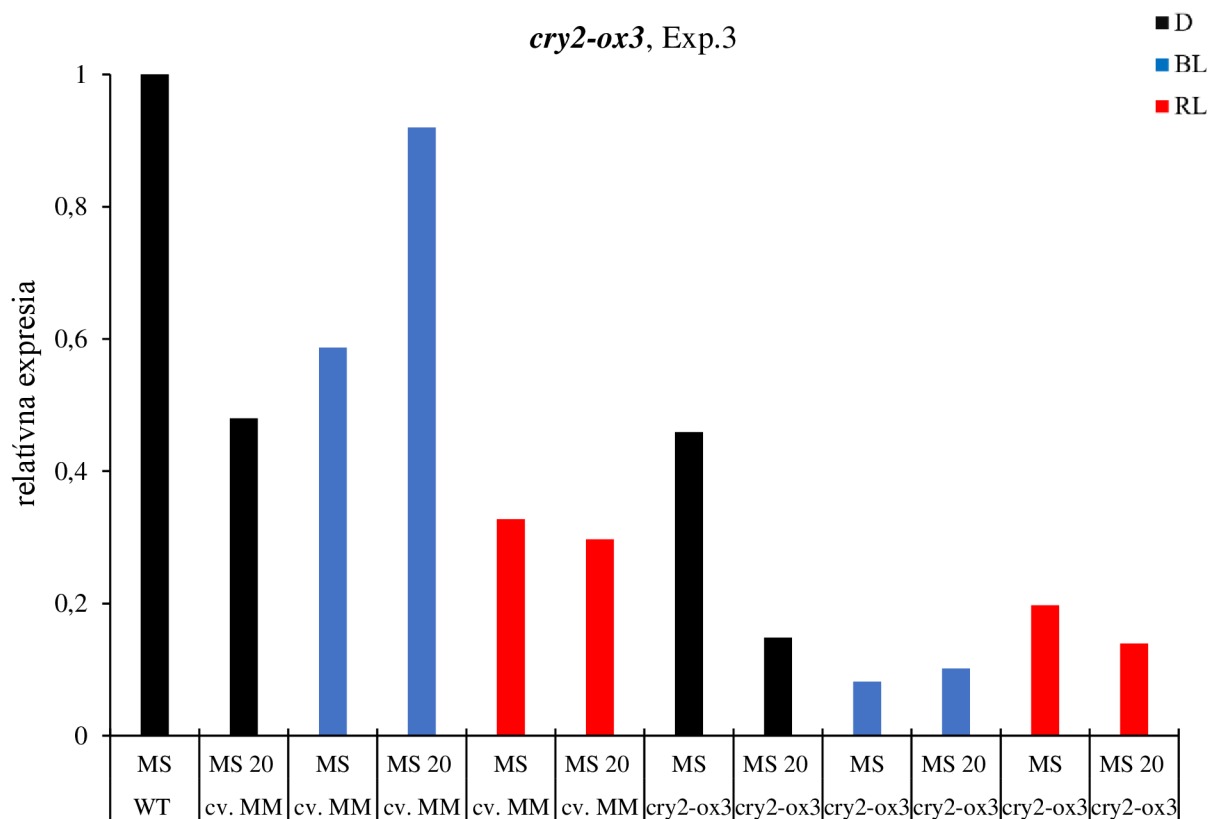
Čo sa týka expresie génu v podmienkach zasolenia, u cv. MM v D po pridaní chloridu sodného do MS média klesla relatívna expresia génu o 35 %, v BL a v RL naopak relatívna expresia pri zasolení stúpla, a to o 18 % (BL) a o 77 % (RL). Naopak, u *cry2-1* došlo k poklesu expresie pri zasolení vo všetkých skúmaných svetelných podmienkach. V D klesla expresia génu pri zasolení o 78 %, v BL o 12 % a v RL o 75 % (Obrázok 11).



Obrázok 12 – Relatívna expresia génu *PHOT1* v semenách muntanta *cry2-1* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (50 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 2). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vzťahovaná k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv.MM.

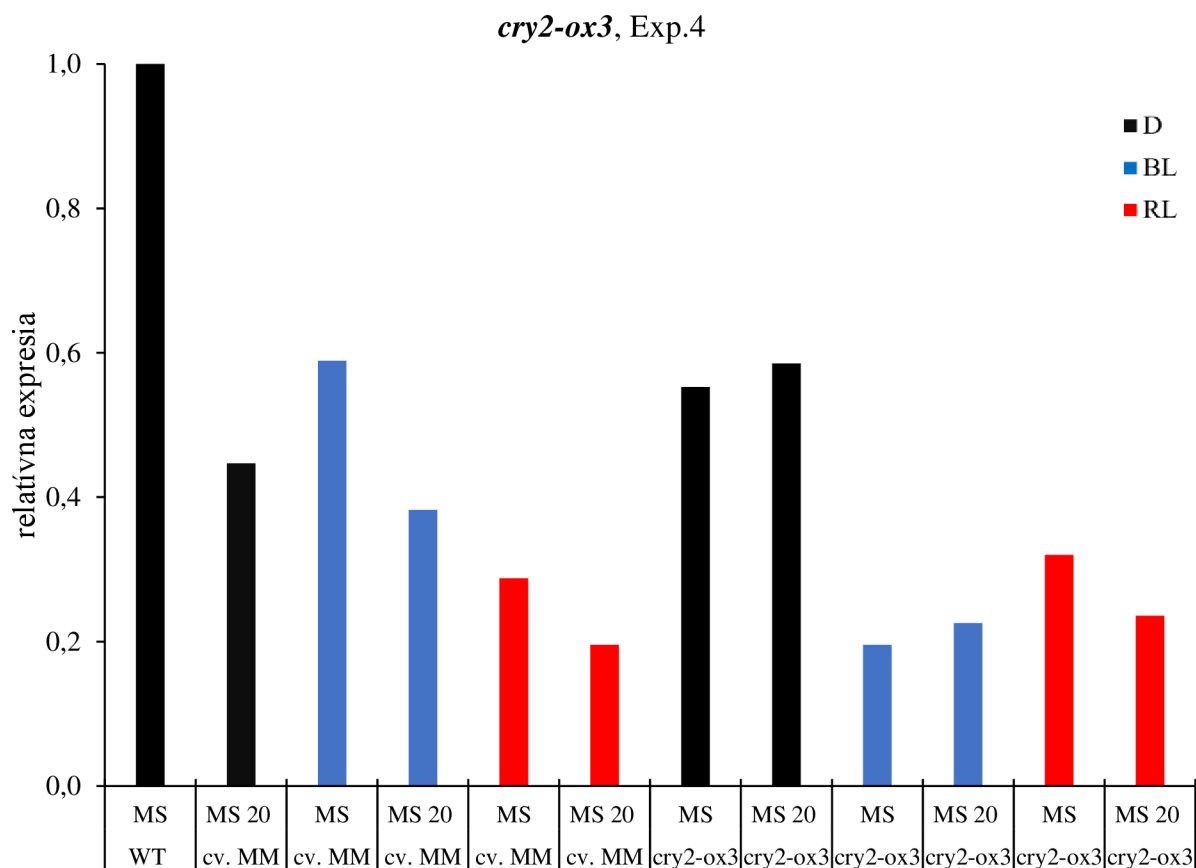
Nakoľko Experiment 2 (Obrázok 12) bol rovnaký ako predošlý (Obrázok 11), opäť bola miera relatívnej expresie génu *PHOT1* v semenách cv. MM kultivovaných v D bez prítomnosti chloridu sodného vypočítaná na hodnotu 1. Aj v Experimente 2 (Obrázok 12) bol pozorovaný rovnaký trend ako v Experimente 1 (Obrázok 11), kedy sa expresia líši v závislosti na svetelných podmienkach, pričom najnižšia je pozorovaná v BL. V D bola v neprítomnosti soli expresia *PHOT1* trikrát vyššia u mutanta *cry2-1* v porovnaní s cv. MM. V BL bez prítomnosti sa tentokrát líšila expresia v porovnaní s Exp.1 o trochu viac, a to o 20 %. V RL bola opäť v neprítomnosti soli vyššia expresia u *cry2-1*, a to o 72 %. Po pridaní chloridu sodného do média sa opäť expresia znižovala v niektorých svetelných podmienkach.

V D u cv. MM expresia pri podmienkach zasolenia klesla o 40 %, v BL rovnako o 40 % a v RL opäť expresia génu pri zasolení stúpila, a to o 55 %. U mutanta *cry2-1* v D je opäť pozorovaný vyšší pokles expresie po pridaní chloridu sodného, kedy expresia klesá o 94 %. Ako aj u cv. MM, aj u *cry2-1* je v tomto experimente pozorovaný vyšší rozdiel medzi expresiami v BL bez prítomnosti a v prítomnosti chloridu sodného, kedy expresia génu pri zasolení klesá o 65 %. V RL v prípade mutanta *cry2-1* dochádza k zníženiu relatívnej expresie génu v prítomnosti chloridu sodného o 70 %. Obecne je možné zhodnotiť, že s prítomnosťou chloridu sodného v médiu klesá relatívna expresia génu *PHOT1* u mutanta *cry2-1* (Obrázok 11 a 12).



Obrázok 13 – Relatívna expresia génu *PHOT1* v semenách mutanta *cry2-ox3* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (20 mmol.l^{-1}) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 3). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vztiahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv. MM.

Výsledky expresie *PHOT1* u mutanta *cry2-ox3* sú znázornené na Obrázkoch 13 a 14. Opäť bola miera relatívnej expresie génu *PHOT1* v semenách cv. MM kultivovaných v D bez prítomnosti chloridu sodného vypočítaná na hodnotu 1. Ako aj v prípade *cry2-1*, aj v prípade *cry2-ox3* (Obrázok 13) sa relatívna expresia génu *PHOT1* líši v závislosti na svetelných podmienkach. Všeobecne bola v porovnaní s cv. MM pozorovaná znížená expresia génu *PHOT1* u mutanta *cry2-ox3*. V D v neprítomnosti soli bola relatívna expresia génu u *cry2-ox3* znížená o 55 %, v BL o 86 % a v RL o 40 % v porovnaní s cv. MM. V prítomnosti zasolenia bolo u cv. MM, aj u mutanta *cry2-ox3* pozorované zníženie relatívnej expresie génu v prítomnosti soli v D aj v RL. Expresia v D u cv. MM sa po zasolení znížila o 53 %, u *cry2-ox3* o 70 %. V RL boli pozorované menej výrazné zmeny expresie, nakoľko u cv. MM bola expresia génu znížená v prítomnosti soli len o 10 %, u *cry2-ox3* sa expresia v RL v prítomnosti soli znížila o 32 %. V BL bola zvýšená expresia *PHOT1* v prítomnosti chloridu sodného u oboch genotypov. U cv. MM bola hodnota relatívnej expresie pri zasolení zvýšená o 36 %, zatiaľčo u *cry2-ox3* stúpala relatívna expresia pri zasolení o 20 %.



Obrázok 14 – Relatívna expresia génu *PHOT1* v semenách mutanta *cry2-ox3* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (20 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 4). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vztiahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv.MM.

Nakoľko sú Experimenty 3 a 4 (Obrázok 13 a 14) rovnaké, opäť bola miera relatívnej expresie génu *PHOT1* v semenách cv. MM kultivovaných v D bez prítomnosti chloridu sodného vypočítaná na hodnotu 1. Opäť sú pozorované zmeny relatívnej expresie génu *PHOT1* vo vybraných svetelných podmienkach. Čo sa týka rozdielu relatívnej expresie génu *PHOT1* bez prítomnosti chloridu sodného v MS médiu, v porovnaní s cv. MM bola expresia u semien transgenného *cry2-ox3* znížená v D o 45 %, v BL o 67 % a naopak v RL bola expresia u *cry2-ox3* zvýšená o 10 %. Tak ako v Exp. 3 (Obr. 13), aj v Exp.4 (Obr. 14) bol zachovaný trend klesania relatívnej expresie génu v prítomnosti soli v médiu u cv. MM v D aj v RL a to o 55 % (D) a 32 % (RL). Na rozdiel od predošlého experimentu, kedy expresia génu u cv. MM v BL v prítomnosti soli stúpala, v Exp.4 expresia klesla o 37 %. U mutantu *cry2-ox3* bol zachovaný trend zmeny relatívnej expresie génu *PHOT1* po zasolení v porovnaní s Exp. 3 (Obr. 13) v BL, kedy expresia stúpala a v RL, kedy klesla. Na rozdiel od Exp.3, kde expresia v prítomnosti soli v D u *cry2-ox3* klesla, v Exp. 4 (Obr. 14) mierne stúpala, a to o 9 %. V BL v prítomnosti chloridu sodného expresia stúpala o 13 % a v RL klesla o 25 %.

5 DISKUSIA

V predošlých prácach bolo zistené, že citlivosť klíčenia semien *S. lycopersicum* L. k zasoleniu a osmotickému stresu je zosilovaná vplyvom modrého svetla, pričom mechanizmus nie je známy (Fellner and Sawhney, 2001; 2002). Bola vyslovená hypotéza, že modré svetlo zosiluje citlivosť semien k abiotickým stresom prostredníctvom fotoreceptorov fototropínov a kryptochrómov (Fellner, nepublikované výsledky), avšak funkčná spolupráca týchto dvoch skupín fotoreceptorov nebola doposiaľ objasnená. Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť, či sú fototropíny a kryptochrómy zapojené v procese klíčenia semien vystavených zasoleniu a či a ako spolu tieto dve skupiny fotoreceptorov modrého svetla funkčne interagujú. Experimentálnym cieľom bolo pomocou genetického prístupu skúmať klíčivosť semien *S. lycopersicum* L. v podmienkach zasolenia v závislosti na svetelných podmienkach. Konkrétne bolo zisťované, ako svetlo vplýva na klíčenie mutantov *S. lycopersicum* L., *cry2-1* a *cry2-ox3* v porovnaní s cv. MM, od ktorých boli títo mutanti odvodení, v podmienkach stresu vyvolaným zasolením (vysokej salinity). Ďalej bolo potrebné zistiť, ako sa za týchto podmienok mení expresia génov *PHOT1* a *PHOT2* a ako môžu byť prepojené signálne dráhy fotoreceptorov pre modré svetlo.

V experimentoch zaoberajúcich sa klíčivosťou bolo zistené že pri absencii stresu bola v našich podmienkach klíčivosť semien cv. MM redukovaná BL asi o 25 %, kdežto v RL bola klíčivosť redukovaná len o 8 % v porovnaní s klíčivosťou v tme. Tieto výsledky potvrdzujú niektoré literárne údaje, že BL má negatívny účinok na klíčivosť semien *S. lycopersicum* L. (Fellner and Sawhney. 2002; Piterková et al. 2012). U mutantu *cry2-1* inhibícia klíčivosti semien modrým svetlom pozorovaná nebola, zatiaľčo u transgénu *cry2-ox3* bola klíčivosť zredukovaná až o 50 %. Čo sa týka klíčivosti oboch mutantov v RL, tak ako u semien cv. MM, aj v tomto prípade nedochádzalo v RL k redukcii klíčivosti, kedy u mutantu *cry2-1* nedochádza k redukcii vôbec a u transgénneho *cry2-ox3* je redukcia klíčivosti len 10 %, čo je porovnateľný výsledok s cv. MM. Tieto výsledky demonštrujú, že BL redukuje klíčivosť semien *S. lycopersicum* L. prostredníctvom fotoreceptoru *cry2*. Naše výsledky súčasne ukazujú, že RL nemá výrazný redukčný účinok na klíčivosť semien, alebo nepôsobí na klíčivosť prostredníctvom *cry2*.

Po zasolení dochádzalo k redukcii klíčivosti vo všetkých svetelných podmienkach u všetkých skúmaných genotypov. S rastúcou koncentráciou chloridu sodného v médiu klesala klíčivosť, čo potvrdzuje, že stres u rastlín oddiaľuje alebo úplne inhibuje klíčenie, čo je podrobne popísané vo viacerých publikáciách (Farooq et al., 2022). Výsledky klíčiacych experimentov ukázali, že všetky študované genotypy mali najnižšiu klíčivosť na modrom svetle.

Ďalej bolo ukázané, že mutant *cry2-1* vo všetkých svetelných podmienkach (teda aj v tme) vykazoval toleranciu k zasoleniu, zatiaľ čo mutant *cry2-ox3* bol naopak k zasoleniu citlivejší, a to tiež vo všetkých skúmaných svetelných podmienkach. Tieto výsledky demonštrujú, že fotoreceptor *cry2*, a to aj neaktivovaný svetlom (v prípade tmy) zvyšuje citlivosť semien *S. lycopersicum* L. k zasoleniu. Každopádne, výsledky taktiež demonštrujú, že u všetkých troch genotypov, s funkčným (cv. MM), nefunkčným (*cry2-1*) či preexipovaným (*cry2-ox3*) *cry2*, BL aj RL výrazne zvyšujú citlivosť klíčivosti semien k chloridu sodnému. Tieto výsledky naznačujú, že *cry2* je zapojený do signálnych dráh spúšťajúcich sa pri vysokej salinite a negatívne ovplyvňuje schopnosť rastliny sa pred týmito podmienkami chrániť. Ďalej tieto výsledky dokazujú, do zvyšovania citlivosti semien k zasoleniu na svetle sú zapojené aj iné receptory než *cry2*.

Výsledky expresných experimentov ukazujú, že relatívna expresia génu *PHOT1* sa mení v závislosti na svetelných podmienkach. Medzi experimentami boli rozdiely v relatívnej expresii génu v rovnakých podmienkach, čo mohlo byť zapríčinené biologickou variabilitou testovaných semien. Obecne bolo zistené, že najvyššia relatívna expresia génu *PHOT1* je v tme u všetkých skúmaných genotypov, pričom u mutantu *cry2-1* bola expresia viacnásobne vyššia ako u cv. MM, u *cry2-ox3* bola naopak v porovnaní s cv. MM nižšia. Z týchto výsledkov môžeme vyvodiť záver, že neaktivovaný fotoreceptor *cry2* znižuje v semenách *S. lycopersicum* L. expresiu génu *PHOT1*. Hladina transkriptu *PHOT1* bola redukovaná BL aj RL podobne u cv. MM aj u oboch mutovaných genotypov.

Čo sa týka vplyvu zasolenia na expresiu génu *PHOT1*, u semien cv. MM dochádzalo k zvýšeniu expresie po zasolení v RL, ale len pri koncentrácii 50 mmol.l^{-1} , pri 20 mmol.l^{-1} bol pozorovaný opačný jav. V D stále dochádzalo po zasolení k zníženiu expresie, kdežto v BL sa úroveň expresie od seba líšia vo všetkých štyroch experimentoch. U mutantu *cry2-1* bola v D a RL expresia výrazne znížená v podmienkach zasolenia, pričom v BL dochádzalo k najmenej výraznej zmene expresie. Čo sa týka zmeny expresie génu *PHOT1* u semien transgénneho mutantu *cry2-ox3* v podmienkach zasolenia, výsledky pozorované v D sa líšia, avšak v BL dochádza k zvýšeniu expresie génu a v RL naopak k zníženiu. Výsledky ukazujú, že u mutantu *cry2-1* s nefunkčným fotoreceptorom *cry2* dochádza vo všetkých svetelných podmienkach k zníženiu expresie génu *PHOT1*, pričom najmenej výrazná zmena je pozorovaná práve v BL, čo naznačuje interakciu fotoreceptorov kryptochrómov a fototropínov. Naopak, u mutantu *cry2-ox3* s preexipovaným *cry2* dochádzalo k zvýšeniu expresie *PHOT1* v BL, čo taktiež poukazuje na to, že tieto fotoreceptory spolupracujú. U oboch mutantov bola práve v BL najnižšia expresia zo všetkých svetelných podmienok, zatiaľ čo u cv. MM, ktorý má funkčný *cry2* bola najnižšia expresia v RL.

Tento výsledok, tak ako aj výsledky klíčivosti poukazujú na to, že do tejto dráhy nie sú zapojené len fotoreceptory modrého svetla, ale pravdepodobne aj receptory červeného svetla.

Výsledky klíčivosti a expresnej analýzy ukázali zaujímavú koreláciu medzi citlivosťou klíčivosti semien oboch mutantov *cry2-1* a *cry2-ox3* a expresnými profilmi *PHOT1* v prítomnosti soli. Semená mutanta *cry2-1* s nefukčným *cry2* vykazovali výraznú toleranciu voči zasoleniu vo všetkých študovaných svetelných podmienkach a zároveň bola expresia génu *PHOT1* v semenách mutanta *cry2-1* značne redukovaná vplyvom zasolenia. To môže viesť k špekulácii, že tolerancia semien voči zasoleniu je tým väčšia, čím je silnejšia inhibícia expresie *PHOT1* vplyvom zasolenia. Alebo, čím viac je expresia génu *PHOT1* inhibovaná vplyvom chloridu sodného, tým viac budú semená tolerantnejšie voči zasoleniu. Výsledky experimentov s overexpressorom *cry2*, mutantom *cry2-ox3* by túto teóriu mohli podporiť. Inhibícia expresie *PHOT1* v semenách *cry2-ox3* bola vplyvom zasolenia výrazne nižšia než v *cry2-1*. Semená *cry2-ox3* súčasne vykazujú vysokú citlivosť voči zasoleniu. Výsledky teda potvrdzujú hypotézu, že v citlivosti semien *S. lycopersicum* L. sú nejakým spôsobom zapojené fotoreceptory kryptochrómy a fototropíny.

V súčasnosti nebolo publikovaných mnoho prác, ktoré by boli sústredené iba na klíčivosť študovaných mutantov v tejto práci. Boli pozorované celkové vlastnosti mutantov *cry2-1* a *cry2-ox3* *S. lycopersicum* L. v rovnakých svetelných podmienkach ako v tejto práci, avšak neboli sledované odpovede mutantov na salinitu (Fantini et al., 2019; Giliberto et al., 2005). Existuje mnoho výskumov, ktoré sa venujú fotoreceptorom u *A. thaliana*, avšak momentálne nie je dostupná žiadna literatúra, s ktorou je možné porovnať danú časť výsledkov tejto diplomovej práci.

Ako už bolo spomínané, *cry2-1* je tolerantnejší voči zasoleniu a vykazuje vyššiu klíčivosť v BL v porovnaní s cv. MM a naopak, *cry2-ox3* je voči zasoleniu viac citlivý a v BL jeho klíčivosť klesá. Najvyššia maximálna klíčivosť bola stále pozorovaná v tme, čo dokazuje aktivitu COP/SPA1 komplexu a jeho kľúčovú rolu pri klíčení rastlín v tme (Peng et al., 2022). U rastlín *Arabidopsis* bolo zistené, že BL prostredníctvom pšeničných kryptochrómov *cry1* a *cry2* znižuje toleranciu klíčenia k zasoleniu (Xu et al., 2009). Podobne bolo zistené, že u *Arabidopsis* overexprimujúce *cry1* z rastliny čiroku (*Sorghum bicolor*) ukazujú zvýšenú citlivosť klíčenia semien k zasoleniu (Zhou et al., 2018). U jačmeňa bola pozorovaná úplná inhibícia klíčenia v BL skrz *cry1* receptor, u *S. lycopersicum* L. inhibícia modrým svetlom nebola pozorovaná (Barrero et al., 2014; Izzo et al., 2020). Toto tvrdenie sa potvrdilo aj v tejto práci, nakoľko je klíčení v BL len znížené a nie inhibované. Ďalej literárne zdroje uvádzajú, že *cry2* je fotolabilný, zatiaľ čo *cry1* je fotostabilný.

Degradácia cry2 je vyvolaná BL s vysokou intenzitou, ale dochádza k nej aj v RL a je vykonaná prostredníctvom COP1. Dôvodom pre degradáciu fotoaktivovaného receptora je pravdepodobne regulácia aktivity cry na svetle a zároveň znecitlivenie fotoreceptora v tme (Mishra and Khurana, 2017; Ponnu and Hoecker, 2021). Znecitlivenie ale neznamená inaktivácia, čo súhlasí s výsledkami. Výsledky ďalej ukazujú, že cry2 hrá kľúčovú rolu v tolerancii voči salinite, avšak podrobné molekulárne mechanizmy zatiaľ nie sú známe.

Po analýze výsledkov je možné navrhnúť molekulárne mechanizmy alebo signálne dráhy, pri ktorých je pravdepodobné, že sa v rastline odohrávajú na základe doposiaľ zistených skutočností obsiahnutých v dostupnej literatúre. Fotorceptory cry sa nachádzajú v jadre, kde po fotoexcitácii modrým svetlom ovplyvňujú rôzne transkripčné faktory, ktorých funkcia je nevyhnutá pre správny vývoj. V jadre sa tiež nachádzajú inhibitory modrého svetla (BIC), ktoré sú schopné inhibovať funkciu cry tak, že nahromadenie proteínu HY5, čo je spôsobené potláčaním aktivity E3 ubikvitin ligasy COP1/SPA komplexu, spúšťa ich transkripciu a BIC následne inhibujú homodimerizáciu cry2-cry2 (Wang and Lin, 2020; Wang et al., 2023). Bolo zistené, že tento proces je vyvolaný modrým svetlom u *A. thaliana* a *O. sativa*, čo môže naznačovať rovnakú skutočnosť u *S. lycopersicum* L. Taktiež bolo u *A. thaliana* zistené, že expresia BIC2 je zvýšená pri pôsobení ABA, ktorá inhibuje klíčenie pri stresových podmienkach. Tieto skutočnosti dokazujú, že pri strese, ktorý pôsobí na rastlinu, sú zvýšené hladiny ABA a zároveň je zvýšená expresia BIC2, čo potláča fyziologické funkcie cry, ako je rast a metabolizmus závislý na svetle (Wang et al., 2023). Je možné, že práve tento mechanizmus u *S. lycopersicum* L. je dôvod, prečo je pozorovaná najnižšia maximálna klíčivosť na modrom svetle u všetkých skúmaných genotypov. U *cry2-1* je pozorovaná vyššia klíčivosť v BL, pretože BIC2 sa nemá na čo viazať, naopak u *cry2-ox3* je cry2 preexprimovaný, čo vedie k vyššej expresii BIC2 a zároveň k potenciálne vyšším hladinám ABA, ktorá klíčenie inhibuje. A zároveň, ako už bolo spomínané, cry2 je fotolabilný práve na modrom svetle.

Čo sa týka súvislosti expresie *PHOT1* s cry2, literatúra týkajúca sa tejto problematiky je obmedzená. Je známe, že phot sú membránové receptory, zatiaľ čo cry sa nachádzajú v jadre, avšak, oba fotoreceptory sa podieľajú na správnom vývoji rastliny. Bolo zistené, že cry môžu byť ovplyvňované inými fotoreceptormi alebo proteínmi, ako napríklad už spomínanými BIC. Avšak, expresia BIC nie je závislá len na modrom svetle a HY5, ale aj na fytochrómoch a post-translačne je ich expresia kontrolovaná fotoreceptormi, ktoré obsahujú LOV/F – box domény (Wang and Lin, 2020). Fotoreceptory cry fyzicky interagujú s LOV doménami fotoreceptorov modrého svetla Zeitlupe (Liu et al., 2013). Práve phot obsahujú LOV domény, avšak neobsahujú F-box (Kimura and Kagawa, 2006).

Každopádne táto skutočnosť naznačuje, že ak sú cry schopné interagovať s LOV doménami iného receptora, je možné, že dokážu interagovať s LOV doménami phot a tak ovplyvňovať ich expresiu. Rozdiel expresie *PHOT1* je najväčší u *cry2-1* v tme a v červenom svetle, čo môže byť spôsobené komplexom COP1/SPA. U *A. thaliana* pôsobenie ABA spúšťa nahromadenie COP1 v tme, čo zvyšuje jeho aktivitu v ABA signalizácii (Peng et al., 2022). K jej nahromadeniu dochádza počas stresových podmienok a je dosť možné, že COP1/SPA komplex taktiež interaguje s *PHOT1*, alebo na tento gén pôsobia ABA signálne dráhy. Na svetle je aktivita tohto komplexu potláčaná, preto v iných svetelných podmienkach pozorujeme menšie zmeny.

Vo výsledku existuje mnoho faktorov, ktoré vplyvajú na toleranciu voči zasoleniu a osmotickému stresu u rastliny. Na základe výsledkov bola zistená súvislosť medzi zasolením, *cry2* a *PHOT1*, avšak sú potrebné ďalšie výskumy, ktoré by pomohli objasniť molekulárne mechanizmy tejto interakcie, nakoľko v modrom svetle je pozorovaná minimálna zmena expresie génu *PHOT1*.

6 ZÁVER

Táto diplomová práca bola sústredená na štúdium mutantov *S. lycopersicum* L. *cry2-1*, ktorý má nefunkčný fotoreceptor *cry2* a *cry2-ox3*, ktorý má *cry2* preexprimovaný, ich klíčivosť a relatívnu expresiu génov *PHOT1* a *PHOT2* metódou qPCR v porovnaní s kontrolným genotypom cv. MM. Bola skúmaná klíčivosť mutantov pri strese vyvolanom zasolením v MS médiu s obsahom rôznej koncentrácie chloridu sodného (0, 10, 20, 50, 60 a 80 mmol.l⁻¹) v troch sveletných podmienkach – D, kontinuálnom BL a kontinuálnom RL po dobu siedmich dní. Cieľom bolo zistiť, ako svetlo ovplyvňuje klíčenie semien u mutantov v porovnaní s cv. MM. Bolo zistené, že najvyššiu klíčivosť vo všetkých svetelných aj stresových podmienkach mal mutant *cry2-1*, naopak, *cry2-ox3* mal klíčivosť zníženú a bol viac citlivý k zasoleniu. To je dôvod, prečo bol mutant *cry2-ox3* kultivovaný v podmienkach 10 a 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu, zatiaľ čo testované koncentrácie u *cry2-1* začínali na koncentrácii 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu. Výsledky diplomovej práce vedú k záveru, že fotoreceptor *cry2* zvyšuje citlivosť semien *S. lycopersicum* L. k zasoleniu a potvrdzujú tak spojitosť fotoreceptoru *cry2* s dráhami zasolenia, a to nielen v BL. Výsledky taktiež vedú k záveru, že do zvyšovania citlivosti semien k zasoleniu na svetle sú zapojené aj iné fotoreceptory než *cry2*.

Skúmanie relatívnej expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* vziahnutej k housekeeping génu *PP2Acs* metódou qPCR bolo sústredené na nájdenie interakcií medzi fotoreceptormi modrého svetla *cry2* a *phot* a ich spojitosti so stresom vyvolaným zasolením. Relatívna expresia u mutantu *cry2-1* bola skúmaná v koncentráciách 0 a 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu 72 hodín od vysatia v D, BL a RL a následne bola porovnaná s relatívnou expresiou u cv. MM v rovnakých podmienkach. U mutantu *cry2-ox3* experimenty prebiehali rovnako, ale koncentrácie boli zmenené na 0 a 20 mmol.l⁻¹ a následne porovnané s cv. MM v rovnakých podmienkach. Bolo zistené, že čím viac je rastlina tolerantnejšia voči zasoleniu, ako je *cry2-1*, tým viac sa zníži expresia *PHOT1* pri zasolení v D a RL. Naopak, pri zvýšenej citlivosti k zasoleniu, ako vykazovali semená *cry2-ox3*, bola expresia génu *PHOT1* na modrom svetle v prítomnosti soli mierne zvýšená. Z relatívnej expresie *PHOT2* nebolo možné vytvoriť ucelené výsledky, nakoľko sa expresie v experimentoch líšili, kvôli vysokej biologickej variabilite.

Vo výsledku bola zistená súvislosť medzi *cry2* a expresiou *PHOT1* a stresom vyvolaným zasolením. Tieto výsledky naznačujú isté signálne dráhy, avšak, je ešte potrebné preskúmať niekoľko molekulárnych signálnych dráh a mechanizmov predtým, než bude možné navrhnúť celú signálnu dráhu spájajúcu *cry*, *phot* a stres vyvolaný zasolením v klíčiach semenách *S. lycopersicum* L.

7 ZOZNAM CITOVA NEJ LITERATÚRY

Acosta-Motos, J. R., Ortuño, M. F., Bernal-Vicente, A., Diaz-Vivancos, P., Sanchez Blanco, M. J., Hernandez, J. A. (2017) Plant responses to salt stress: Adaptive mechanisms. *Agronomy* 7(1):18. <https://doi.org/10.3390/agronomy7010018>

Ruban A.V. (2009) Plants in Light. *Communicative & Integrative Biology* 2(1), 50–55. <https://doi.org/10.4161/cib.2.1.7504>

Barrero, J. M., Downie, A. B., Xu, Q., Gubler, F. (2014) A role for barely CRYPTOCHROME1 in light regulation of grain dormancy and germination. *Plant Cell* 26(3), 1094–1104. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.121830>

Boggs, J. Z., Loewy, K., Bibee, K., Heschel, M. S. (2010) Phytochromes influence stomatal conductance plasticity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Growth Regulation* 60(2), 77–81. <https://doi.org/10.1007/s10725-009-9427-3>

Carvalho, R. F., Campos, M. L., Azevedo, R. A. (2011) The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* 53(12), 920–929. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2011.01081.x>

Choi, D. M., Kim, S. H., Han, Y. J., Kim, J. II. (2023) Regulation of plant photoresponses by protein kinase activity of phytochrome A. *International Journal of Molecular Sciences* 24(3): 2110. <https://doi.org/10.3390/ijms24032110>

Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., Sullivan, S. (2015) Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* 56(3), 401–413. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcu196>

Christie J.M., Reymond P., Powell G., Bernasconi P., Reibekas A.A., Liscum E., Briggs W.R. (1998) *Arabidopsis* NPH1_A flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. *Science*, 282(5394), 1698–1701. <https://doi.org/doi:10.1126/science.282.5394.1698>

Cramer, G. R., Urano, K., Delrot, S., Pezzotti, M., Shinozaki, K. (2011) Effects of abiotic stress on plants: A systems biology perspective. *BMC Plant Biology* 11:163. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-11-163>

D’Amico-Damião, V., Carvalho, R. F. (2018) Cryptochrome-related abiotic stress responses in plants. *Frontiers in Plant Science* 9:1897. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01897>

D’Amico-Damião, V., Lúcio, J. C. B., Oliveira, R., Gaion, L. A., Barreto, R. F., Carvalho, R. F. (2021) Cryptochrome 1a depends on blue light fluence rate to mediate osmotic stress responses in tomato. *Journal of Plant Physiology*, 258–259. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2021.153374>

- Eckstein, A., Jagiello-Flasińska, D., Lewandowska, A., Hermanowicz, P., Appenroth, K. J., Gabryś, H.** (2016) Mobilization of storage materials during light-induced germination of tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds. *Plant Physiology and Biochemistry*, 105, 271–281. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2016.05.008>
- Fantini, E., Facella, P.** (2020) Cryptochromes in the field: how blue light influences crop development. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 336–346. <https://doi.org/10.1111/ppl.13088>
- Fantini, E., Sulli, M., Zhang, L., Aprea, G., Jiménez-Gómez, J. M., Bendahmane, A., Perrotta, G., Giuliano, G., Facella, P.** (2019) Pivotal roles of cryptochromes 1a and 2 in tomato development and physiology 1. *Plant Physiology*, 179(2), 732–748. <https://doi.org/10.1104/pp.18.00793>
- Farooq, M. A., Ma, W., Shen, S., Gu, A.** (2022) Underlying biochemical and molecular mechanisms for seed germination. *International Journal of Molecular Sciences* 23(15):8502 <https://doi.org/10.3390/ijms23158502>
- Fellner, M., Sawhney, V.** (2001) Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* (102), 215–221 <https://doi.org/10.1007/s001220051638>
- 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(5), 675–682. <https://doi.org/10.1007/s004250100671>
- Fraikin, G. Y., Belenikina, N. S., Rubin, A. B.** (2023) Molecular bases of signaling processes regulated by cryptochrome sensory photoreceptors in plants. *Biochemistry* 88(6), pp. 770–782. <https://doi.org/10.1134/S0006297923060056>
- Gavassi, M. A., Monteiro, C. C., Campos, M. L., Melo, H. C., Carvalho, R. F.** (2017) Phytochromes are key regulators of abiotic stress responses in tomato. *Scientia Horticulturae* 222, 126–135. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.035>
- Ge, L., Yang, X., Liu, Y., Tang, H., Wang, Q., Chu, S., Hu, J., Zhang, N., Shi, Q.** (2023) Improvement of seed germination under salt stress via overexpressing caffeic acid O-methyltransferase 1 (SICOMT1) in *Solanum lycopersicum* L. *International Journal of Molecular Sciences* 24(1):734. <https://doi.org/10.3390/ijms24010734>
- Georgieva, M., Vassileva, V.** (2023) Stress management in plants: examining provisional and unique dose-dependent responses. *International Journal of Molecular Sciences* 24(6):5105. <https://doi.org/10.3390/ijms24065105>
- Gharsallah, C., Fakhfakh, H., Grubb, D., Gorsane, F.** (2016) Effect of salt stress on ion concentration, proline content, antioxidant enzyme activities and gene expression in tomato cultivars. *AoB PLANTS*, 8:plw055 <https://doi.org/10.1093/aobpla/plw055>

Giliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J. L., Fraser, P. D., Bramley, P. M., Fiore, A., Tavazza, M., Giuliano, G. (2005) Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiology*, 137(1), 199–208.

<https://doi.org/10.1104/pp.104.051987>

Guo, M., Wang, X. S., Guo, H. D., Bai, S. Y., Khan, A., Wang, X. M., Gao, Y. M., Li, J. S. (2022) Tomato salt tolerance mechanisms and their potential applications for fighting salinity: A review. *Frontiers in Plant Science* 13:949541.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2022.949541>

Gupta, B., Huang, B. (2014) Mechanism of salinity tolerance in plants: Physiological, biochemical, and molecular characterization. *International Journal of Genomics*

2014:701596 <https://doi.org/10.1155/2014/701596>

Gururani, M. A. (2023). Photobiotechnology for abiotic stress resilient crops: Recent advances and prospects. *Heliyon* 9(9): e20158.

<https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e20158>

Hao, S., Wang, Y., Yan, Y., Liu, Y., Wang, J., Chen, S. (2021) A review on plant responses to salt stress and their mechanisms of salt resistance. *Horticulturae* 7(6):132

<https://doi.org/10.3390/horticulturae7060132>

Hart, J. E., Gardner, K. H. (2021) Lighting the way: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors. *Journal of Biological Chemistry*

296:100594 <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2021.100594>

Hlavinka, J., Nauš, J., Fellner, M. (2013) Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*(209),75-80.

<https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2013.04.010>.

Humplík, J. F., Bergougnoux, V., Jandová, M., Šimura, J., Pěňčík, A., Tomanec, O., Rolčík, J., Novák, O., Fellner, M. (2015) Endogenous abscisic acid promotes hypocotyl growth and affects endoreduplication during dark-induced growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS ONE*, 10(2): e0117793.

<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117793>

Indorf, M., Cordero, J., Neuhaus, G., Rodríguez-Franco, M. (2007) Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling. *Plant Journal*, 51(4),

563–574. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03162.x>

Isayenkov, S. V., Maathuis, F. J. M. (2019) Plant salinity stress: Many unanswered questions remain. *Frontiers in Plant Science* 10:80.

<https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00080>

- Izzo, L. G., Hay Mele, B., Vitale, L., Vitale, E., Arena, C.** (2020) The role of monochromatic red and blue light in tomato early photomorphogenesis and photosynthetic traits. *Environmental and Experimental Botany*, 179:104195. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2020.104195>
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., Fankhauser, C.** (2010) Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology* 91(C), 29–66. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(10\)91002-8](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(10)91002-8)
- Kimura, M., Kagawa, T.** (2006) Phototropin and light-signaling in phototropism. *Current Opinion in Plant Biology* 9(5), 503–508. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.07.003>
- Li, J., Li, G., Wang, H., Wang Deng, X.** (2011) Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book*, 9:e0148. <https://doi.org/10.1199/tab.0148>
- Lichtenthaler, H. K.** (1998) The stress concept in plants: An introduction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 851, 187–198. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb08993.x>
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., Lin, C.** (2011) The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16(12), 684–691. <https://doi.org/10.1016/J.TPLANTS.2011.09.002>
- Liu, H., Wang, Q., Liu, Y., Zhao, X., Imaizumi, T., Somers, D. E., Tobin, E. M., Lin, C.** (2013) Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(43), 17582–17587. <https://doi.org/10.1073/pnas.1308987110>
- Llanes, A., Andrade, A., Masciarelli, O., Alemano, S., Luna, V.** (2016) Drought and salinity alter endogenous hormonal profiles at the seed germination phase. *Seed Science Research* 26(1), 1–13. <https://doi.org/10.1017/S0960258515000331>
- Macovei, A., Pagano, A., Leonetti, P., Carbonera, D., Balestrazzi, A., Araújo, S. S.** (2017) Systems biology and genome-wide approaches to unveil the molecular players involved in the pre-germinative metabolism: implications on seed technology traits. *Plant Cell Reports* 36(5), 669–688. <https://doi.org/10.1007/s00299-016-2060-5>
- Mao, J., Zhang, Y.-C., Sang, Y., Li, Q.-H., Yang, H.-Q.** (2005) A role for Arabidopsis cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(34), 12270–12275. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0501011102
- Mishra, S., Khurana, J. P.** (2017) Emerging roles and new paradigms in signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36(2), 89–115. <https://doi.org/10.1080/07352689.2017.1348725>

- Murashige, T., Skoog, F.** (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nejat, N., Mantri, N.** (2017) Plant immune system: Crosstalk between responses to biotic and abiotic stresses the missing link in understanding plant defence. *Current Issues in Molecular Biology* 23, 1–16. <https://doi.org/10.21775/cimb.023.001>
- Omidvar, V., Fellner, M.** (2015) DNA methylation and transcriptomic changes in response to different lights and stresses in 7B-1 male-sterile tomato. *PLoS ONE*, 10(4): e0121864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121864>
- Paik, I., Huq, E.** (2019) Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology* 92, 114–121. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.007>
- Peng, J., Wang, M., Wang, X., Qi, L., Guo, C., Li, H., Li, C., Yan, Y., Zhou, Y., Terzaghi, W., Li, Z., Song, C. P., Qin, F., Gong, Z., Li, J.** (2022) COP1 positively regulates ABA signaling during Arabidopsis seedling growth in darkness by mediating ABA-induced ABI5 accumulation. *Plant Cell*, 34(6), 2286–2308. <https://doi.org/10.1093/plcell/koac073>
- Perrotta, G., Ninu, L., Flamma, F., Weller, J. L., Kendrick, R. E., Nebuloso, E., Giuliano, G.** (2000) Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2. *Plant Molecular Biology* 42(5), 765–773. <https://doi.org/10.1023/A:1006371130043>
- Petersen, J., Inoue, S. ichiro, Kelly, S. M., Sullivan, S., Kinoshita, T., Christie, J. M.** (2017) Functional characterization of a constitutively active kinase variant of Arabidopsis phototropin 1. *Journal of Biological Chemistry*, 292(33), 13843–13852. <https://doi.org/10.1074/jbc.M117.799643>
- Pham, V. N., Kathare, P. K., Huq, E.** (2018) Phytochromes and phytochrome interacting factors. *Plant Physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01384>
- 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(4), 767–776. <https://doi.org/10.1093/aob/mcs141>.
- Ponnu J., Hoecker U.** (2021) Illuminating the COP1/SPA ubiquitin ligase: Fresh Insights Into Its Structure and Functions During Plant Photomorphogenesis. *Frontier in Plant Science* 12:662793. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.662793>
- Qiu, X., Sun, G., Liu, F., Hu, W.** (2023) Functions of plant phytochrome signaling pathways in adaptation to diverse stresses. *International Journal of Molecular Sciences* 24(17): 13201. <https://doi.org/10.3390/ijms241713201>

- Rodrigues, M. A., Bianchetti, R. E., Freschi, L.** (2014) Shedding light on ethylene metabolism in higher plants. *Frontiers in Plant Science* 5:665.
<https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00665>
- Roşca, M., Mihalache, G., Stoleru, V.** (2023) Tomato responses to salinity stress: From morphological traits to genetic changes. *Frontiers in Plant Science* 14:1118383
<https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1118383>
- Rusaczonok, A., Czarnocka, W., Willems, P., Sujkowska-Rybkowska, M., Breusegem, F. Van, Karpiński, S.** (2021) Phototropin 1 and 2 influence photosynthesis, UV-C induced photooxidative stress responses, and cell death. *Cells* 10(2), 1–24.
<https://doi.org/10.3390/cells10020200>
- Sharma, S., Sanyal, S. K., Sushmita, K., Chauhan, M., Sharma, A., Anirudhan, G., Veetil, S. K., Kateriya, S.** (2021) Modulation of phototropin signalosome with artificial illumination holds great potential in the development of climate-smart crops. *Current Genomics* 22(3), 181–213. <https://doi.org/10.2174/1389202922666210412104817>
- Sharrock, R. A.** (2008) The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biology* 9:230. <https://doi.org/10.1186/gb-2008-9-8-230>
- Silva, C. A. J., D’Amico-Damião, V., Carvalho, R. F.** (2021) Phytochrome type B family: The abiotic stress responses signaller in plants. *Annals of Applied Biology* 178(2), 135–148. <https://doi.org/10.1111/aab.12655>
- Stone, B. B., Esmon, C. A., Liscum, E.** (2005) Phototropins, other photoreceptors, and associated signaling: The lead and supporting cast in the control of plant movement responses. *Current Topics in Developmental Biology* 66, 215–238.
[https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(05\)66007-3](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(05)66007-3)
- Taiz, L. and Zeiger, E.** (2010) *Plant Physiology*. 5th Edition, Sinauer Associates Inc., Sunderland, UK
- Trávníčková T.** (2021) Diplomová práce – Interakce modrého světla a ABA během klíčení semen vystavených stresu zasolením.
- Wang, P., Abid, M. A., Qanmber, G., Askari, M., Zhou, L., Song, Y., Liang, C., Meng, Z., Malik, W., Wei, Y., Wang, Y., Cheng, H., Zhang, R.** (2022) Photomorphogenesis in plants: The central role of phytochrome interacting factors (PIFs). *Environmental and Experimental Botany* 194:104704.
<https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2021.104704>
- Wang, Q., Lin, C.** (2020) Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. *Annual Review of Plant Biology* 71,103–129.
<https://doi.org/10.1146/annurev-arplant-050718-100300>

Wang, Q., Zuo, Z., Wang, X., Liu, Q., Gu, L., Oka, Y., Lin, C. (2018) Beyond the photocycle — how cryptochromes regulate photoresponses in plants? *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 120–126. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2018.05.014>

Wang, Y., Wang, W., Jia, Q., Tian, H., Wang, X., Li, Y., Hussain, S., Hussain, H., Wang, T., Wang, S. (2023) BIC2, a cryptochrome function inhibitor, is involved in the regulation of ABA responses in Arabidopsis. *Plants*, 12(11):2220. <https://doi.org/10.3390/plants12112220>

Wei, Y., Wang, S., Yu, D. (2023) The role of light quality in regulating early seedling development. *Plants* 12(14): 2746. <https://doi.org/10.3390/plants12142746>

Xin, G. yuan, Li, L. ping, Wang, P. tao, Li, X. yue, Han, Y. ji, Zhao, X. (2022). The action of enhancing weak light capture via phototropic growth and chloroplast movement in plants. *Stress Biology* 2:50. <https://doi.org/10.1007/s44154-022-00066-x>

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(2), 760–774. <https://doi.org/10.1104/pp.108.132217>

Yang, T., Lv, R., Li, J., Lin, H., Xi, D. (2018) Phytochrome A and B negatively regulate salt stress tolerance of nicotiana tobacum via ABA-jasmonic acid synergistic cross-talk. *Plant and Cell Physiology*, 59(11), 2381–2393. <https://doi.org/10.1093/pcp/pcy164>

Zhou, T., Meng, L., Ma, Y., Liu, Q., Zhang, Y., Yang, Z., Yang, D., Bian, M. (2018). Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in Arabidopsis. *Plant Cell Reports*. 37, 251-264 <https://doi.org/10.1007/s00299-017-2227-8>

Zhou, H., Shi, H., Yang, Y., Feng, X., Chen, X., Xiao, F., Lin, H., Guo, Y. (2023) Insights into plant salt stress signaling and tolerance. *Journal of Genetics and Genomics* 51(1), 16-34. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2023.08.007>

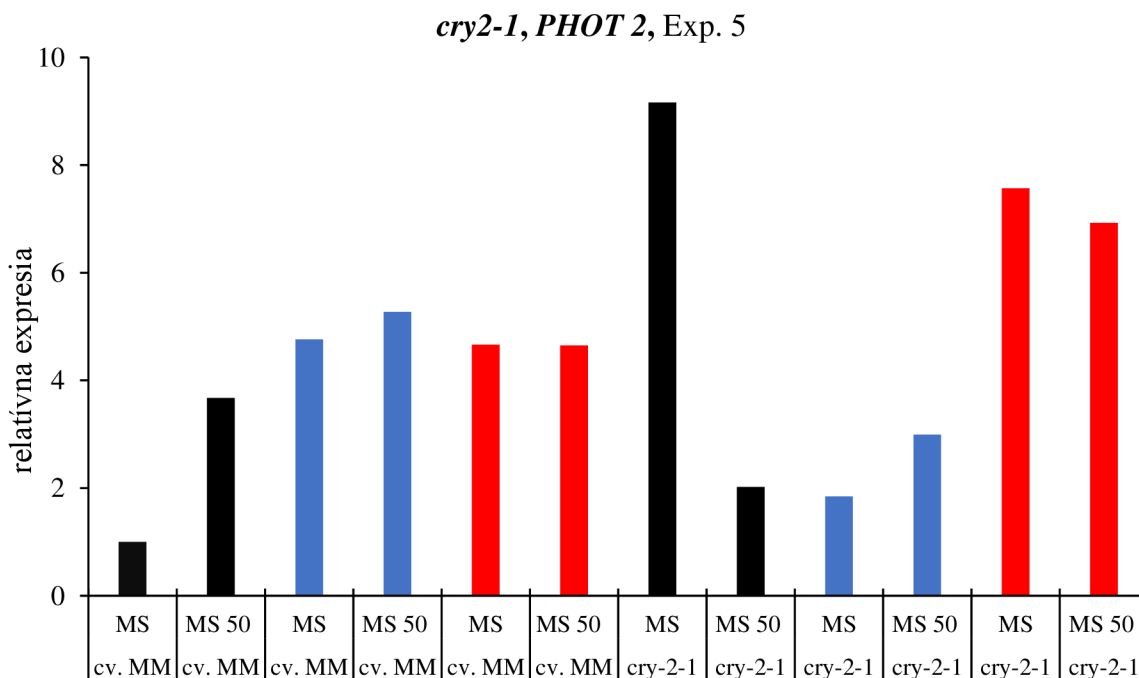
Internetové zdroje:

Phototropin <https://www.slideshare.net/227777222an/phototropin>; stiahnuté 5.2.2024.

Prílohy

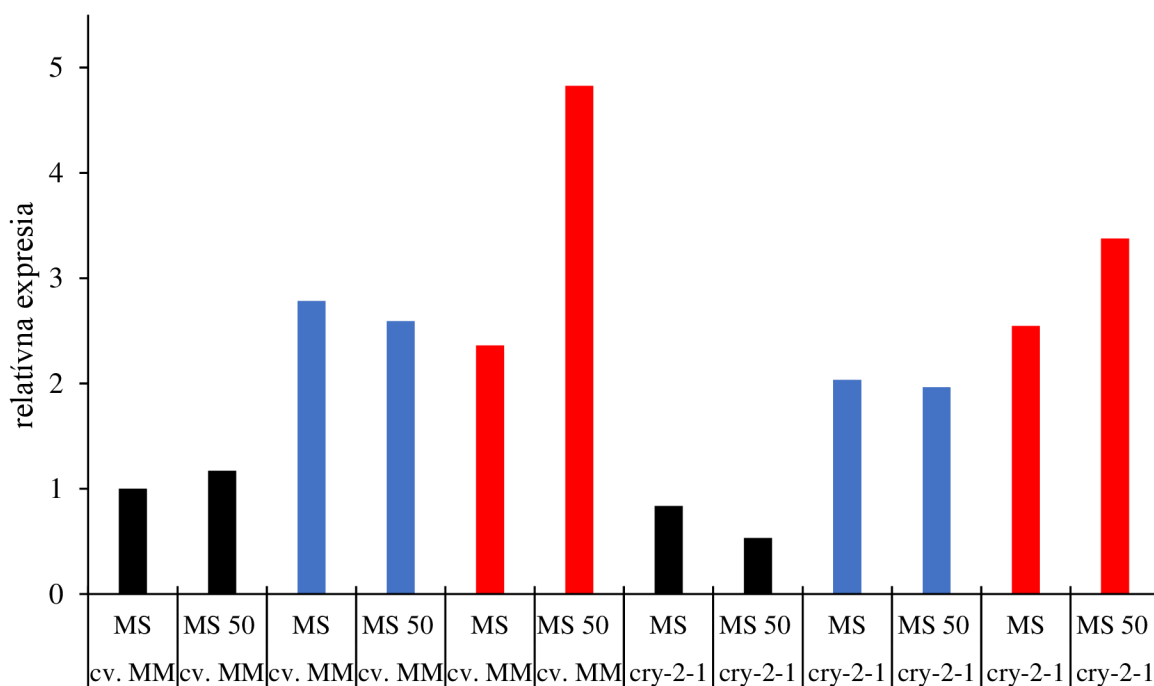
Príloha 1: Relatívna expresia génu *PHOT2* v mutantoch *cry2-1* a *cry2-ox3* porovnaná s cv.MM

Rovnako ako pri sledovaní relatívnej expresie génu *PHOT1*, relatívna expresia génu *PHOT2* bola vzťahnutá k housekeeping génu *PP2Acs* a k cv. MM kultivovanom v tme bez obsahu chlorid sodného v MS médiu po 72 hodinách od vysiatia. Relatívna expresia bola v prípade mutantu *cry2-1* analyzovaná v koncentráciách 0 a 50 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu po 72 h od vysiatia v D, BL a RL a porovnaný s cv. MM v rovnakých popísaných podmienkach. Genotyp *cry2-ox3* bol analyzovaný pri koncentráciách 0 a 20 mmol.l⁻¹ chloridu sodného v MS médiu 72 h od vysiatia v D, BL a RL a porovnaný s cv. MM v rovnakých popísaných podmienkach. Boli analyzované výsledky celkovo štyroch experimentov, pričom dva experimenty boli sústredené na relatívnu expresiu *PHOT1* a *PHOT2* v *cry2-1* a dva experimenty boli sústredené na expresiu týchto génov v *cry2-ox3* (Obrázok 18 – 21). Výsledky experimentov neboli priemerované, nakoľko výsledky relatívnej expresie sa líšili a zároveň nebolo možné z týchto výsledkov určiť relatívnu expresiu génu *PHOT2*, nakoľko F a R primer pre tento gén vykazujú veľkú biologickú variabilitu, čo sa potvrdilo aj v iných experimentoch (Fellner, nepublikované výsledky).



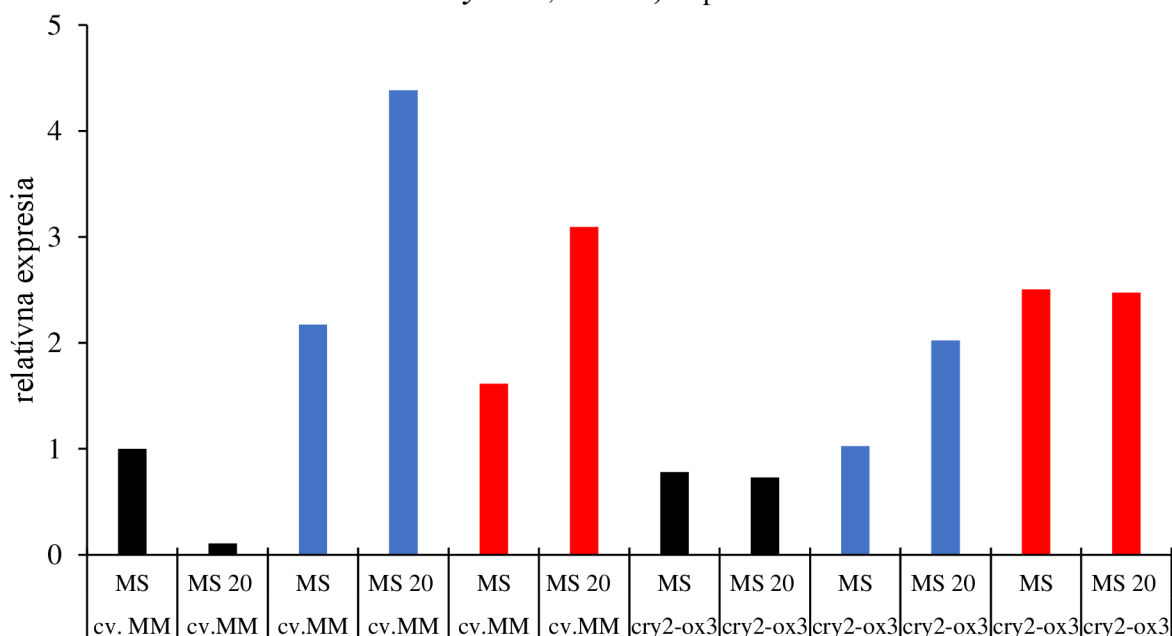
Obrázok 18 – Relatívna expresia génu *PHOT2* v semenách mutantu *cry2-1* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (50 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 5). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vzťahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv. MM.

cry2-1, PHOT2, Exp. 6



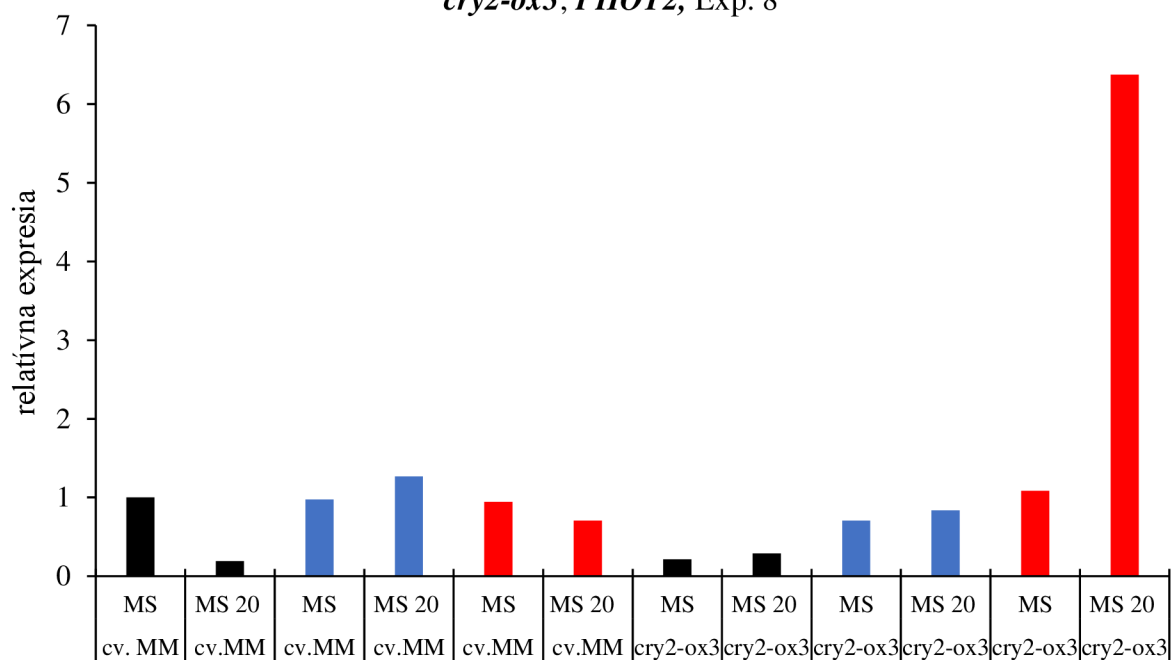
Obrázok 19 – Relatívna expresia génu *PHOT2* v semenách muntanta *cry2-1* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (50 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 6). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vztiahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv. MM.

cry2-ox3, PHOT2, Exp.7



Obrázok 20 – Relatívna expresia génu *PHOT2* v semenách muntanta *cry2-ox3* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (20 mmol.l⁻¹) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 7). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vztiahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv. MM.

cry2-ox3, PHOT2, Exp. 8



Obrázok 21 – Relatívna expresia génu *PHOT2* v semenách muntanta *cry2-ox3* porovnaná s cv. MM v závislosti na koncentrácii chloridu sodného (20 mmol.l^{-1}) a vybraných svetelných podmienkach D, BL a RL (Experiment 8). Semená boli kultivované po dobu 72 h od vysiatia v MS médiu bez alebo s obsahom chloridu sodného. Relatívna expresia bola vzťahnutá k expresii housekeeping génu *PP2Acs* v tme u cv. MM.