

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalárska práca

Olomouc 2017

Andrea Chalachanová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vplyv modrého svetla na rastové reakcie
rastlín k hormónu kyseline abscisovej (ABA)**

Bakalárska práca

Andrea Chalachanová

Študijný program: Biologie

Študijný odbor: Molekulární a buněčná biologie

Forma štúdia: Prezenční

Olomouc 2017

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

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s využitím citovanej literatúry.

V Olomouci dňa:.....

Podpis:.....

Súhrn

Predkladaná bakalárska práca je venovaná štúdiu rastových reakcií rastlín rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) k známemu rastlinnému fytohormónu kyseline abscisovej (ABA), v závislosti na rôznych svetelných podmienkach. Všeobecným cieľom bakalárskej práce bolo zistiť, ako ABA ovplyvňuje rast rastlín rajčiaka v závislosti na svetelných podmienkach a súčasne, ktoré fotoreceptory sú v týchto reakciách zapojené.

Teoretická časť je venovaná spracovaniu literárnej rešerše týkajúcej sa danej problematiky. Jednotlivé kapitoly v teoretickej časti sú venované nasledujúcim témam: rast a vývoj rastlín, fotoreceptory a fotomorfogenéza, kyselina abscisová, jej chemická podstata, biosyntéza, signálna dráha a interakcia so signálnymi dráhami svetla.

K štúdiu interakcie kyseliny abscisovej a svetla v podmienkach *in vitro* bol využitý genetický prístup spočívajúci v analýze vybraných fotomorfogenných mutantov *7B-1*, *cry1-1* a *hp1* modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* L. Na vybraných rastlinách bol sledovaný vplyv rôznych svetelných podmienok (tma, modré a červené svetlo) na rastové reakcie hypokotylu a koreňov ku kyseline abscisovej. Výsledkom štúdia bolo potvrdené, že svetlo inhibuje rast hypokotylu a stimuluje rast koreňa. Zistené bolo, že ABA inhibuje rast hypokotylu a koreňa u všetkých genotypov a všetkých testovaných svetelných podmienok. Zároveň bolo zistené, že modré a červené svetlo môže zvyšovať citlivosť rastlinných orgánov k exogénnej ABA. Zo získaných výsledkov boli definované nasledujúce závery:

- a) funkčný gén *7B-1* a fotoreceptor CRY1 nie sú významne zapojené v citlivosti hypokotylu a koreňa k ABA,
- b) svetlo nezvyšuje citlivosť hypokotylu a koreňa k exogénnej ABA prostredníctvom fotoreceptoru modrého svetla CRY1 ani prostredníctvom produktu génu *7B-1*,
- c) funkčný proteín DDB1 zvyšuje rastové reakcie hypokotylu, ale znižuje rastové reakcie koreňa k exogénnej ABA.

Summary

Submitted bachelor thesis is devoted to the study of growth responses of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) to the known plant phytohormone abscisic acid (ABA), in dependence on various light conditions. The general aim of the bachelor thesis was to find out, how ABA affects the growth of tomato plants in dependence of the light conditions and at the same time which photoreceptors are involved in these reactions.

The theoretical part of the thesis is devoted to the writing of literature review focused on the problems of the bachelor thesis. The individual chapters in the theoretical part of the thesis are devoted to the following topics: plant growth and development, photoreceptors and photomorphogenesis, abscisic acid, its chemical nature, biosynthesis, signaling pathway and interaction with light signaling pathway.

To investigate the crosstalk between abscisic acid and light under *in vitro* conditions, the genetic approach was used consisting in the analysis of the selected photomorphogenic mutants *7B-1*, *cry1-1* and *hp1* of the model plant *Solanum lycopersicum* L. The effect of different light conditions (dark, blue and red light) on the growth responses of hypocotyls and roots to abscisic acid was studied on the selected plants. The result of the study confirmed that light inhibits hypocotyl growth and stimulates the growth of root. It was revealed that ABA inhibits the growth of hypocotyl and root in all genotypes. At the same time, it was found, that blue and red light can increase the responsiveness of the plant organs to exogenous ABA. From the acquired results, the following conclusions were defined:

- a) the *7B-1* functional gene and CRY1 photoreceptor are not significantly involved in the sensitivity of hypocotyl and root to ABA,
- b) light does not increase hypocotyl and root sensitivity to exogenous ABA through the blue light photoreceptor CRY1, not even through the product of *7B-1* gene,
- c) functional protein DDB1 increases growth responses of hypocotyl, but decreases growth responses of roots.

Pod'akovanie

Na tomto mieste by som rada pod'akovala prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, Ph.D. za odbornú pomoc a usmernenie pri písaní bakalárskej práce, za všetky cenné rady, čas a v neposlednom rade za trpezlivosť a ochotu, ktorú mi venoval.

Obsah

| | | |
|----------|--|----|
| 1 | Úvod | 8 |
| 2 | Cieľ práce | 10 |
| 3 | Súčasný stav riešenej problematiky | 11 |
| 3.1 | Rast a vývoj rastlín | 11 |
| 3.1.1 | Regulácia rastu | 12 |
| 3.2 | Fotomorfofenéza a fotoreceptory | 13 |
| 3.2.1 | Receptory modrého svetla (BL) | 15 |
| 3.2.1.1 | <i>Kryptochrómy</i> | 16 |
| 3.2.1.2 | <i>Fototropíny</i> | 17 |
| 3.2.1.3 | <i>Fotoreceptory ZTL/FKF1/LKP2</i> | 17 |
| 3.3 | Kyselina abscisová (ABA) | 18 |
| 3.3.1 | Chemická podstata ABA | 19 |
| 3.3.2 | Biosyntéza ABA | 20 |
| 3.3.3 | Signálna dráha ABA | 21 |
| 3.4 | Interakcia signálnej dráhy ABA a svetla | 23 |
| 3.4.1 | Modelová rastlina <i>7B-1</i> | 26 |
| 3.4.1.1 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a ABA</i> | 27 |
| 3.4.1.2 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a ethylén</i> | 28 |
| 3.4.1.3 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a zmeny vo fotosyntéze</i> | 28 |
| 3.4.1.4 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a oxid dusnatý (NO)</i> | 29 |
| 3.4.1.5 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a antokyány</i> | 29 |
| 3.4.1.6 | <i>Modelová rastlina 7B-1 a biotický stres</i> | 29 |
| 4 | Materiál a metodika | 31 |
| 4.1 | Rastlinný materiál | 31 |
| 4.2 | Chemikálie a roztoky | 32 |
| 4.3 | Prístrojové vybavenie | 32 |
| 4.4 | Pomôcky | 32 |
| 4.5 | Pracovné postupy | 33 |
| 4.5.1 | Príprava kultivačného média (Murashige-Skoog médium) | 33 |
| 4.5.2 | Použité koncentrácie ABA | 33 |
| 4.5.3 | Sterilizácia a výsev semien | 34 |
| 4.5.4 | Kultivácia rastlín na médiu obsahujúcom ABA | 34 |

| | | |
|----------|--|-----------|
| 4.5.5 | Meranie dĺžky koreňa a hypokotylu rastlín | 35 |
| 5 | Výsledky | 36 |
| 5.1 | Fenotypy študovaných mutantov a príslušných kultivarov | 36 |
| 5.2 | Rastové reakcie koreňa a hypokotylu k exogénnej ABA | 37 |
| 5.2.1 | Rastové reakcie hypokotylu | 37 |
| 5.2.2 | Rastové reakcie koreňa | 44 |
| 6 | Diskusia | 51 |
| 7 | Záver | 56 |
| 8 | Literatúra | 57 |
| 9 | Zoznam použitých skratiek | 64 |

1 Úvod

Svetlo patrí medzi jeden z najdôležitejších faktorov ovplyvňujúci rast a vývoj rastlín. Predstavuje nielen hlavný zdroj energie pre priebeh fotosyntézy, ale taktiež na základe jeho kvality a intenzity výrazne ovplyvňuje rôzne fyziologické a biochemické procesy v rastlinách (fotomorfogenéza, fototropizmus, metabolizmus, kvitnutie a pod.). Svetlo je zachytávané fotoreceptormi, medzi ktoré patria predovšetkým kryptochrómy a fototropíny - receptory modrého svetla (350-400 nm) a fytochrómy - receptory červeného svetla (650-680 nm). Obzvlášť veľký vplyv na rast rastlín má vysokoenergetické modré svetlo, ktoré sa okrem fototropizmu podieľa na inhibícii rastu hypokotylu, stimulácii syntézy chlorofylu a karotenoidov, aktivácii génovej expresie, stomatálnom pohybe a rade ďalších procesov (Taiz and Zeiger, 2010; Jones *et al.*, 2013).

Cieľom bakalárskej práce bolo zistiť, či regulácia rastu rastlín rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) vplyvom exogénnej ABA je ovplyvňovaná modrým svetlom a pokiaľ áno, prostredníctvom ktorých fotoreceptorov (fototropínov či kryptochrómov) môže modré svetlo ovplyvňovať účinok ABA na rast rastlín. Na dosiahnutie cieľa bakalárskej práce bol využitý genetický prístup, teda analýza mutantov modelovej rastliny *Solanum lycopersicum* L. a príslušných kultivarov, od ktorých boli mutanty odvodené. V podmienkach *in vitro* bol študovaný potenciálny vzťah mutácií vybraných mutantov *7B-1*, *hpl* a *cry1-1* k vplyvu známeho rastlinného fytohormónu – ABA, v závislosti na rôznych svetelných podmienkach (tma, modré a červené svetlo). Recesívny monogénny („single-gene“) mutant rajčiaka *7B-1* sa vyznačuje zvýšenou toleranciou k abiotickým a biotickým stresom, ktorá je zvýraznená predovšetkým na modrom svetle (BL). Rezistencia môže byť čiastočne spojená so zvýšenou hladinou pre-existujúcej endogénnej kyseliny abscisovej (ABA) (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001). Aj keď úloha génu *7B-1* nie je doposiaľ známa, predchádzajúce výsledky naznačujú, že ide o mutanta so zníženou aktivitou fototropínovej signálnej dráhy (Hlavinka *et al.*, 2013; Fellner, Bergougnot, Špundová a Savara, nepublikované výsledky). Naopak, zvýšená citlivosť na svetlo, vrátane zosilnenej fototropickej reakcie, je typická pre monogénny recesívny mutant *hpl* (Lieberman *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004). Pre recesívny mutant *cry1-1* je charakteristická redukovaná citlivosť k BL (Weller *et al.*, 2001).

Bakalárska práca bola vypracovaná v Skupine molekulárnej fyziológie, ktorá je súčasťou Laboratória rastových regulátorov Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu

experimentálnej botaniky Akadémie vied Českej republiky.

2 Cieľ práce

Cieľom prvej časti bakalárskej práce je oboznámiť sa s výskumným projektom, z ktorého vyplýva téma bakalárskej práce, a zhromaždiť najnovšie literárne zdroje vzťahujúce sa na danú problematiku. Zo získanej odbornej literatúry následne vypracovať literárnu rešerše k danej téme, ktorou je vplyv modrého svetla na rastové reakcie rastlín k hormónu kyseline abscisovej (ABA).

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce je zistiť ako, a prostredníctvom ktorých fotoreceptorov svetlo ovplyvňuje rastové reakcie fotomorfogenných mutantov *7B-1*, *cry1-1* a *hp1* rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) k známemu fytohormónu, kyseline abscisovej.

3 Súčasný stav riešenej problematiky

3.1 Rast a vývoj rastlín

Rast rastlín je vo všeobecnosti definovaný ako nezvratné pribúdanie rastlinnej hmoty, čo je spojené s delením buniek (embryonálna fáza), ich predlžovaním (predlžovacia fáza) a diferenciáciou (diferenciačná fáza) (Brzeska, 2006). Samotný rast v spojení s diferenciáciou vedie k procesu formovania kompletnej stavby rastlinného tela, inak nazývaný aj proces morfogénézy. Vznik nových rastlinných orgánov je iniciovaný v meristémoch. Meristémy predstavujú zóny nediferencovaných buniek, ktoré sa v priebehu mitózy mnohonásobne delia, pričom novovzniknuté bunky môžu byť následne diferencované do zrelých pletív.

Apikálne meristémy, primárne delivé pletivá, sú lokalizované na vrcholoch stoniek a koreňov a zabezpečujú rast týchto orgánov do dĺžky. Stonkový apikálny meristém (SAM) je organizovaný do niekoľkých zón. Centrálna zóna (CZ) je zdrojom buniek pre okrajovú zónu (PZ) a Rib zónu (RZ) lokalizovanú pod CZ a PZ. PZ predstavuje oblasť buniek, ktoré rýchlo menia svoju aktivitu, a vedú k tvorbe laterálnych orgánov. RZ je možné považovať za oblasť buniek, ktoré sú dôležité pre samotný rast stonky. V SAM sú bunky usporiadané do vrstiev L1, L2, L3 atď. Vonkajšia vrstva, tunika (zahrňujúca L1 a často L2), sa od vnútornej vrstvy, korpusu, líši rovinou delenia buniek. Iniciály tuniky sa delia antiklinálne, teda kolmo na povrch orgánu (zväčšenie povrchu vrcholu), naopak, iniciály korpusu sa delia v rôznych smeroch, teda antiklinálne i periklinálne. Delením buniek vrstvy L1 vzniká epidermálne pletivo (niekedy nazývané aj protoderm). Delením buniek korpusu vzniká prokambium, z ktorého sa diferencujú primárne vodivé pletivá. Postupné zvyšovanie množstva kmeňových buniek vedie k tomu, že SAM produkuje listové primórdia (=termín označujúci orgán v začiatočnom štádiu vývoja), z ktorých sa vyvíjajú nové listy.

Neustály rast a vývoj koreňa je udržiavaný apikálnym koreňovým meristémom (RAM), ktorý sa v mnohých smeroch odlišuje od SAM. Hlavný rozdiel spočíva v tom, že RAM nie je zapojený v procese organogenézy. Neustále delenie buniek RAM zabezpečuje rast koreňa do dĺžky. Zároveň sa RAM podieľa na produkcii buniek dôležitých na obnovu koreňovej čiapočky. Postranné korene vznikajú pôsobením sekundárneho meristému, pericyklu, ktorý sa zakladá medzi endodermis a centrálnymi vodivými pletivami. V špičke koreňového meristému sa vyskytujú multipotentné kmeňové bunky, ktoré obklopujú malú skupinu organizovaných buniek. Ide o tzv. pokojovú zónu (QC). Každá kmeňová bunka sa

asymetricky rozdelí, čím sa získa jedna dcérska bunka, ktorá ostáva pod vplyvom signálu z QC. Signál zabraňuje diferenciácii a zároveň umožňuje bunke zachovať si status kmeňovej bunky. Všetky ostatné dcérske bunky sa stávajú súčasťou diferencovaných pletív.

Dôležitým poznatkom je, že morfogenéza je určená polaritou a diferenciálnym rastom. Neobmedzené bunečné delenie a expanzia buniek má za následok uniformný trojrozmerný rast. Polarizácia rastu (asymetrické bunečné delenie) vedie k diferenciácii. Rast môže byť polarizovaný vplyvom rôznych vývojových regulátorov (napr. hormóny, Ca^{2+} a transkripčné faktory) (Clark, 1997; Benková and Hejátko, 2009; Perilli *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013; Taiz and Zeiger, 2015).

Ontogenéza (inak aj morfogenéza) predstavuje individuálny vývoj jedinca od vzniku zárodku, až do jeho zániku. Tento termín je však veľmi často používaný v súvislosti s fylogenezou (evolučná príbuznosť) pri porovnávaní vývojových procesov naprieč jednotlivých taxonomických skupín. Evolúcia predstavuje proces, ktorý poskytuje základné indicie nevyhnutné pre pochopenie základných vývojových mechanizmov, ktoré vedú k zmenám, či už v podobe orgánov alebo ich funkcií. V dôsledku toho bola moderná syntéza fylogény a ontogenézy pomenovaná ako evo-devo. V širšom slova zmysle ide odbor, ktorý sa zaoberá evolúciou vývoja (Evolution of Development), teda skúma mechanické vzťahy medzi procesmi individuálneho vývoja a fenotypických zmien v priebehu evolúcie. Jedným z príkladov evo-devo prístupu, ktorý bol aplikovaný na vývoj rastlín, je komparatívna analýza diploidných a haploidných štádií v priebehu životného cyklu u zelenej riasy *Chlamydomonas reinhardtii* (Müller, 2007; Jones *et al.*, 2013).

3.1.1 Regulácia rastu

Rast a vývojové procesy rastlín sú regulované vnútornými faktormi, medzi ktoré patria i fytohormóny, v interakcii s rôznymi podnetmi životného prostredia, ako napríklad svetlo a teplota. Dôležitým faktom je, že vývoj nie je regulovaný funkciou jedného hormónu, ale spravidla ide o vzájomnú interakciu niekoľkých hormónov. Svetlo je jeden z faktorov, ktorý pozmeňuje hladinu endogénnych hormónov v rastlinných pletivách (de Wit *et al.*, 2016).

Fytohormóny (=rastlinné hormóny; rastové regulátory; signálne látky) patria medzi rastlinné biokatalyzátory podieľajúce sa na intracelulárnej humorálnej regulácii. Sila signálu príslušného fytohormónu závisí predovšetkým od jeho hladiny (koncentrácie),

ktorá je riadená na mnohých úrovniach, a to hlavne intenzitou biosyntézy, rýchlosťou transportu k cieľovému miestu a intenzitou degradácie alebo reverzibilnej inaktivácie v mieste pôsobenia. V rastlinnom tele sa tieto nízkomolekulové organické látky vyskytujú spravidla vo veľmi nízkych koncentráciách. Fytohormóny, ktoré vo fyziologických koncentráciách podporujú rast, sa označujú ako stimulatory. Naopak, fytohormóny, ktoré vo fyziologických koncentráciách rast brzdia, sa označujú ako inhibítory. Medzi stimulatory sa zaraďujú auxíny, giberelíny a cytokiníny; medzi inhibítory hlavne ABA.

V súčasnosti už boli pripravené aj syntetické regulátory, ktoré môžu po exogénnej aplikácii vykazovať silnú rastovú aktivitu, či už v zmysle inhibície (retardanty) alebo v zmysle stimulácie, teda povzbudenia rastu (auxinoidy).

Dôležitú úlohu v regulácii rastu zohrávajú aj vonkajšie faktory, medzi ktoré patrí optimálna teplota, svetlo, voda a dostatočné množstvo živín (Brzeska, 2006; Pavlová, 2006; Nováček, 2009).

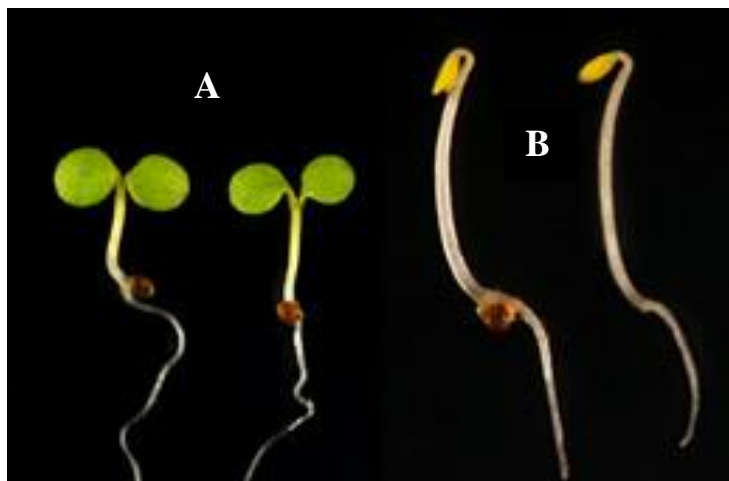
3.2 Fotomorfogenéza a fotoreceptory

Svetlo je hlavným zdrojom energie pre väčšinu života na Zemi. Drvivá väčšina biologických procesov je závislá od časti elektromagnetického spektra, ktoré je inak nazývané aj viditeľné svetlo. Toto pomenovanie je odvodené od faktu, že ľudské oko je schopné detekovať krátky rozsah svetelného spektra siahajúceho od približne 380 nm do približne 700 nm. Mnoho druhov organizmov je však schopné reagovať aj na svetlo, ktorého vlnové dĺžky siahajú mimo rozsah vlnových dĺžok viditeľného spektra. Pravdepodobne preto bude svetlo a všetky jeho interakcie s organizmami vždy považované za nevyčerpatel'ný zdroj v oblasti výskumu.

Pre rastliny, ktoré patria medzi organizmy žijúce prisadlým spôsobom života, je svetlo kľúčovým faktorom v ich raste a vývoji. Svetlo je jedným z hlavných podnetov vonkajšieho prostredia, ktoré ovplyvňuje celú škálu fyziologických procesov od klíčenia, cez asimiláciu, až po rozvoj rastlinných orgánov. Rastliny si vyvinuli sofistikovaný systém, ktorým sú schopné rôznorodo reagovať na zmeny svetelných podmienok (Neff *et al.*, 2000; Carvalho *et al.*, 2011a; Fankhauser and Christie, 2015).

Rastliny sa môžu vyvíjať dvoma odlišnými spôsobmi podľa intenzity a kvality okolitého svetla. Vývoj v tme je označovaný ako skotomorfogenéza (inak etiolizácia) (Taiz and Zeiger, 2015). Rastliny, ktoré sa vyvíjali počas neprítomnosti svetla, vykazujú typické vlastnosti odrážajúce podmienky, v ktorých sa vyvíjali. Je pre ne charakteristický dlhý

hypokotyl ukončený nevyvinutými kotyledónmi bez prítomnosti fotosynteticky aktívnych chloroplastov. V momente, kedy etiolizované rastliny prijmu svetelné signály, dochádza k vývoji cestou fotomorfogenézy. Prechod zo skotomorfogenézy do fotomorfogenézy je označovaný ako de-etiolizácia. Tento proces zahŕňa niekoľko vývojových zmien, ku ktorým patrí inhibícia prudkého rastu hypokotylu, aktivácia apikálneho meristému a konečný vývoj kotyledónov (neskôr listov) a plastidov (Kendrick *et al.*, 1997; Waters and Langdale, 2009; Jones *et al.*, 2013; Taiz and Zeiger, 2015).

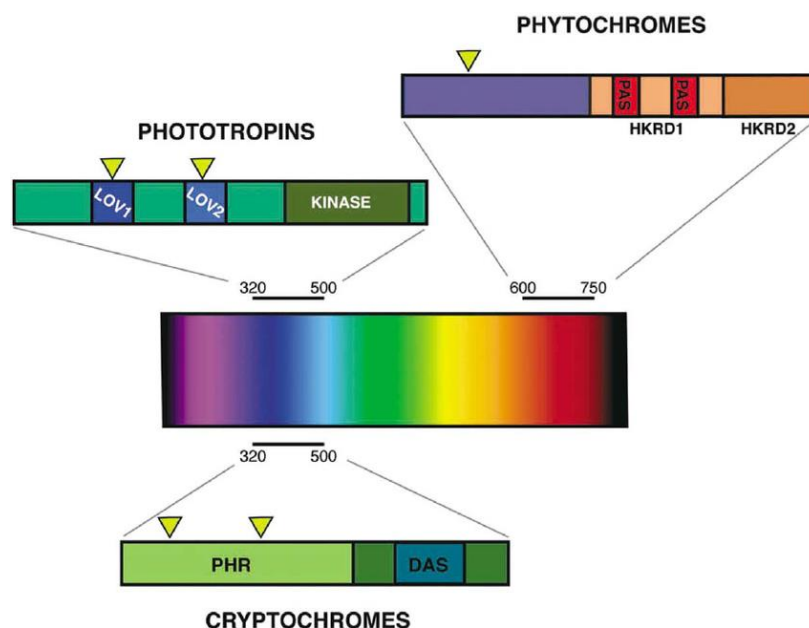


Obrázok č. 1: A – Na svetle vyvíjajúce sa rastliny (de-etiolizované) rodu *Arabidopsis*; B – V tme vyvíjajúce sa rastliny (etiolizované) rodu *Arabidopsis* (prevzaté a upravené z <http://www.cragenomica.es/research-groups>)

Rastliny zachytávajú dopadajúce svetlo prostredníctvom fotoreceptorov, ktoré sú prítomné v celej rastline, dokonca aj v koreňovej časti. Fotoreceptory (viď Obrázok č. 2) sú charakterizované vlnovými dĺžkami svetla, ktoré prijímajú. Fytochrómy, známe regulátory klíčenia, majú svoje absorpčné maximum v červenej oblasti svetelného spektra, t.j. v rozmedzí vlnových dĺžok 600-750 nm. Vyskytujú sa spravidla v dvoch fotoreverzibilných formách, ktoré medzi sebou prechádzajú v závislosti na kvalite svetla. Neaktívna forma Pr je pôsobením krátkovlnového červeného svetla konvertovaná na biologicky aktívnu formu Pfr, ktorá je citlivá k dlhovlnovej oblasti červeného spektra (FR). Aktívna forma Pfr môže byť späť premenená na neaktívnu formu Pr v dôsledku opätovného ožiarenia krátkovlnovým červeným svetlom (Quail, 1997; Kagawa, 2002; Galvão and Fankhauser, 2015). Modrá (400-500 nm) a UV-A oblasť (320-400 nm) svetelného spektra je zachytávaná prostredníctvom kryptochrómov a fototropínov. V súčasnosti sú už známe aj niektoré receptory pre UV-B (290-320 nm) oblasť svetelného spektra. Identifikovaný bol receptor UVR8, ktorého aktivita a funkcia dodnes nie je úplne

preskúmaná (Carvalho *et al.*, 2011a). Kombinovaná aktivita týchto molekúl umožňuje rastlinám reagovať na prítomnosť/absenciu, farbu, intenzitu a smer dopadajúcich svetelných signálov. Zatiaľ, čo kryptochrómy a fytochrómy regulujú rast a vývojové reakcie vyvolané zmenami vo vlnovej dĺžke, intenzite a dobe pôsobenia žiarenia, fototropíny riadia predovšetkým smer rastu.

Vysoká svetelná vnímavosť fotoreceptorov je zodpovedná za spustenie špecifických intracelulárnych signálnych dráh, ktoré indukujú selektívne zmeny v expresii génov, ktoré riadia rôzne rastové a vývojové reakcie. Zistené bolo, že fytochrómy pôsobia transkripčne, pretože sú schopné nasmerovať svetelné signály priamo do promotora prostredníctvom väzby na transkripčný regulátor. Naopak, kryptochrómy pôsobia zrejme posttranslačne, čo znamená, že sú schopné narušiť, a tým zastaviť prebiehajúcu degradáciu kľúčového transkripčného aktivátora v proteázome, a to priamym naviazaním na E3 ubiquitín ligázu. Výsledkom je zvýšená hladina aktivátora, čo vedie k zvýšeniu expresie cieľového génu (Quail, 2002).



Obrázok č. 2: Základné typy fotoreceptorov a oblasti svetelného spektra, v ktorých fotoreceptory žiarenie absorbujú (prevzaté zo Sullivan and Deng, 2003)

3.2.1 Receptory modrého svetla (BL)

Medzi receptory vnímajúce modré svetlo patria kryptochrómy, fototropíny a členovia rodiny Zeitlupe (ZTL/FKF1/LKP2). Odpovede rastlín na pôsobenie BL sú príliš rozsiahle. Zahrňujú, napríklad, inhibíciu predlžovania, fototropizmus, stimuláciu rastu listov a kvitnutia, stimuláciu otvárania prieduchov, pohyb chloroplastov a jadra, reguláciu

cirkadiánných hodín, reguláciu osmotickej rovnováhy v bunkách stomat a reguláciu génovej expresie (Taiz and Zeiger, 2010; Christie *et al.*, 2015).

V prípade *Solanum lycopersicum* L. sú za majoritné fotoreceptory sprostredkujúce de-etiolizáciu indukovanú BL považované kryptochróm 1 (CRY1) a receptor červeného svetla, fytochróm A (PhyA) (Weller *et al.*, 2001).

3.2.1.1 Kryptochrómy

Kryptochrómy boli prvými receptormi modrého svetla, ktoré boli charakterizované na molekulárnej úrovni. Sú to flavoproteíny (70 – 80 kD) vyskytujúce sa nielen u rastlín, ale aj u baktérií, húb a živočíchov. V interakcii s ďalšími fotoreceptormi vyvolávajú širokú škálu odpovedí, ktoré zahŕňajú potlačenie predlžovania hypokotylu, posilnenie vývoja kotyledónov, depolarizáciu membrán, produkciu antokyánov a reguláciu cirkadiánných hodín. Rastlinné kryptochrómy vykazujú vysokú štruktúrnú podobnosť k reparačnému enzýmu DNA fotolyáze. Reparačná schopnosť im však chýba. DNA fotolyáza je flavoproteín (~55 – 65 kD), ktorý sa nachádza v mikroboch vrátane baktérií, archeónov a kvasiniek. Katalyzuje reparáciu pyrimidínových dimérov, ktoré vznikli pôsobením UV svetla (UV-B a UV-C). Kryptochrómy, podobne ako DNA fotolyáza, obsahujú dva chromofory: flavínadenínindinukleotid (FAD) a metyltetrahydrofolát (MTHF).

Molekula kryptochrómu je zložená z dvoch domén, a to N-koncovej PHR domény, ktorá vykazuje vysokú sekvenčnú podobnosť s DNA fotolyázami a C-koncovej domény, označovanej ako DAS (Lin, 2002; Banerjee and Batschauer, 2005; Taiz and Zeiger, 2010; Carvalho *et al.*, 2011a; Jones *et al.*, 2013; Galvão and Fankhauser, 2015; Christie *et al.*, 2015).

Genóm *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. obsahuje tri gény (*CRY1*, *CRY2* a *CRY3*, ktorý patrí do triedy CRY-DASH superrodiny fotolyáza/kryptochróm), ktoré kódujú kryptochrómy. Fotoreceptory *CRY1* a *CRY2* sa primárne vyskytujú v jadre. *CRY3* funguje pravdepodobne aj v mitochondriách, aj v chloroplastoch. Zatiaľ čo sa *CRY1* a *CRY2* podieľajú na všetkých uvedených reakciách na BL, funkcia *CRY3* nebola dodnes presne popísaná (Liu *et al.*, 2011; Facella *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013).

V prípade *Solanum lycopersicum* L. boli doteraz objavené a identifikované štyri gény kódujúce kryptochrómy: *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY-DASH*. Gén *CRY1* vykazuje vyššiu homológiu ku génu *CRY1* u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *CRY1a* sa podieľa na regulácii fotomorfogenézy, akumulácie antokyánov a vývoji dospelých rastlín. *CRY1a*

neovplyvňuje ani dobu kvitnutia, ani pigmentáciu plodov (Ninu *et al.*, 1999; Facella *et al.*, 2012).

3.2.1.2 Fototropíny

Medzi fotoreceptory vnímajúce modrú (400-500 nm) a UV-A oblasť (320-400 nm) svetelného spektra patria okrem kryptochrómov aj fototropíny (Briggs and Huala, 1999). Fototropíny boli pôvodne pri hrachu a iných rastlinách (vrátane *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) identifikované ako proteíny – kinázy (~120 kD) asociované s plazmatickou membránou. Ich kinázová aktivita je stimulovaná absorpciou svetla, ktorá za prítomnosti ATP spôsobuje autofosforyláciu (Lin, 2002; Srinivas *et al.*, 2004; Buchanan *et al.*, 2015).

V genóme *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. boli identifikované dva gény (*PHOT1* a *PHOT2*) kódujúce fototropíny. Molekuly fototropínov obsahujú serín/threonín kinázovú doménu na C-konci a dve špecializované LOV (z *angl. Light/Oxygen/Voltage*) domény označované ako LOV1 a LOV2 na N-konci. Obe LOV domény zabezpečujú vďaka asociácii s flavínmononukleotidovým (FMN) chromoforom absorpciu modrého žiarenia. Naopak, serín/threonín kinázová doména je pravdepodobne spojená s transdukciou signálu (Christie *et al.*, 2002; Kagawa, 2002; Lin, 2002; Jones *et al.*, 2013).

Fototropíny (*phot1* a *phot2*) sú silne exprimované v deliacich a elongačných zónach koreňov a listov. Subcelulárna lokalizácia oboch fototropínov je závislá na svetelných podmienkach. V neprítomnosti svetelného žiarenia sú fototropíny lokalizované predovšetkým v plazmatickej membráne. Po zachytení BL je drvivá väčšina fototropínov premiestnená do cytoplazmy buniek (Sakamoto and Briggs, 2002; Kong *et al.*, 2006).

Fototropíny sú zapojené v regulácii fototropizmu, otvárania prieduchov, pohybu chloroplastov a expanzii listov (Christie, 2007; Fankhauser and Christie, 2015).

3.2.1.3 Fotoreceptory ZTL/FKF1/LKP2

Okrem fototropínov sa u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. vyskytujú ďalšie fotoreceptory obsahujúce LOV doménu. Ide o členy rodiny Zeitlupe (*ztl*), ktoré sú lokalizované buď v jadre, alebo cytosole. Skupina týchto fotoreceptorov zohráva dôležitú úlohu v riadení cirkadiálneho rytmu a zároveň sa podieľa na kontrole kvitnutia v závislosti na dĺžke svetelnej periódy. Na svojom N-konci obsahujú LOV doménu, za ktorou nasleduje F-box a šesť tandemových repetícií proteínového motívu „kelch“ na C-konci. F-box interaguje s ubikvitinačným komplexom E2-E3, ktorý značí proteínové substráty určené k degradácii. V princípe je primárna proteínová štruktúra členov rodiny *ztl* podobná

štruktúre kryptochrómov a fototropínov. Jediný rozdiel oproti fototropínom spočíva v tom, že obsahujú len jednu LOV doménu viažucu FMN (flavínmononukleotid).

Genetickou analýzou *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bolo zistené, že ZTL, FKF1 a LKP2 sa čiastočne prekrývajú vo svojej funkcii. U mutantov s absenciou ZTL bola pozorovaná porucha vo funkcii cirkadiánných hodín. Naopak, mutanty bez prítomnosti FKF1 vykazovali zmeny v dobe kvitnutia. V poslednom prípade boli testované mutanty s neprítomnosťou LKP2, u ktorých nebola zaznamenaná žiadna výrazná zmena vo funkcii cirkadiánných hodín ani zmena v čase kvitnutia (Banerjee and Batschauer, 2005; Jones *et al.*, 2013; Galvão and Fankhauser, 2015; Christie *et al.*, 2015; Taiz and Zeiger, 2015).

3.3 Kyselina abscisová (ABA)

Kyselina abscisová (ABA) bola objavená pri štúdiu dvoch fyziologických procesov - opadanie listov a dormancia púčikov stromov. Z listov javora (*Acer pseudoplatanus*) v období dormancie bola izolovaná frakcia (neskôr pomenovaná dormín), ktorá vykazovala inhibičné účinky na rast segmentov koleoptílií. Veľmi podobná frakcia (neskôr pomenovaná abscisín) bola izolovaná z opadnutých plodov bavlníka (*Gossypium*). Štúdiom bolo dokázané, že v oboch prípadoch ide o rovnakú účinnú látku, ktorá bola pomenovaná ako kyselina abscisová (Addicott *et al.*, 1968; Procházka, 1998).

ABA je všadeprítomný rastlinný hormón hrajúci významnú úlohu v procesoch dormancie, vegetatívneho rastu, klíčenia a adaptácie k rade rôznych abiotických stresov (nízka teplota, nedostatok vody, osmotický stres). Tento hormón bol detekovaný vo všetkých majoritných orgánoch alebo pletivách, od koreňovej čiapočky až po apikálny meristém (Xiong and Zhu, 2003; Taiz and Zeiger, 2010).

Obsah endogénnej ABA v jednotlivých častiach rastlín nie je konštantný. Hladina endogénnej ABA stúpa pri pôsobení nepriaznivých (stresových) podmienok. Mení sa taktiež v závislosti na svetelných podmienkach. Zatiaľ, čo pôsobením BL dochádza k redukcii koncentrácie endogénnej ABA v hypokotyle a kotyledónoch, v priebehu skotomorfogenézy sa ABA v týchto častiach rastliny značne akumuluje, čím podporuje bunecnú expanziu a samotný rast (Takahashi, 1972).

Nedávnym vedeckým výskumom, ktorý sa venoval štúdiu pôsobenia ABA u mladých etiolizovaných modelových rastlín *Solanum lycopersicum* L., bolo zistené, že deficiencia ABA spôsobuje redukcii rastu hypokotyly. Pôsobením exogénnej ABA môže byť rast u ABA-deficientných rastlín značne zvýšený. Naopak, u WT nemá exogénna ABA

v nízkych koncentráciách žiaden vplyv. Príčinou je to, že u WT sú receptory plne saturované endogénnou ABA a prídavok exogénnej ABA môže spustiť „over-dose“ efekt, ktorého výsledkom je inhibícia rastu. Naopak, u ABA-deficientných mutantov je hladina endogénnej ABA natoľko nízka, že receptory nie sú plne saturované a môžu viazať exogénnu ABA. Štúdiom bolo preukázané, že ABA stimuluje DNA endoreduplikáciu a bunecnú expanziu prostredníctvom zvýšenej expresie génov kódujúcich inhibítory CDK (SIKRP1 a SIKRP3) (Humplík *et al.*, 2015a; Humplík *et al.*, 2015b). Druhým dôležitým procesom, ktorý vedie k posilneniu endoreduplikácie, je inhibícia biosyntézy cytokinínov. Cytokiníny pôsobia voči ABA antagonisticky, čo znamená, že inhibujú endoreduplikáciu a bunecnú expanziu. Výsledkom tejto inhibície je potlačený rast mladých etiolizovaných rastlín (Bergougnoux *et al.*, 2012).

Zatiaľ, čo ABA je vo všeobecnosti považovaná za inhibítor rastu, GA sú zodpovedné za posilnenie rastových reakcií (Potts *et al.*, 1985). K dosiahnutiu primeraného rastu je počas obdobia vývoja semena a klíčenia využité antagonistické pôsobenie ABA a GA. Vysoký pomer GA:ABA zaisťuje zvýšenú rýchlosť bunecného delenia a následnú expanziu buniek v skorých štádiách vývoja semena. V priebehu dozrievania semena, hladina GA klesá a, naopak, hladina ABA stúpa, čím je spôsobené zastavenie rastu, čo vedie k nástupu obdobia dormancie. Pri klíčení dochádza k rapídnejmu zvýšeniu hladiny GA, čo vedie k iniciácii transformácie sadeníc v dospelé rastliny. ABA má teda širokú škálu praktického využitia. Jednou z možností je použitie ABA v mikropropagácii, kde môže ABA iniciovať vývojové procesy, ako, napríklad, somatickú embryogenézu. Tieto techniky sú komerčne používané vo vysokej miere k produkcii obrovského množstva klonov niektorých plantážnych plodín alebo k regenerácii niektorých transgénnych plodín (Murphy, 2011).

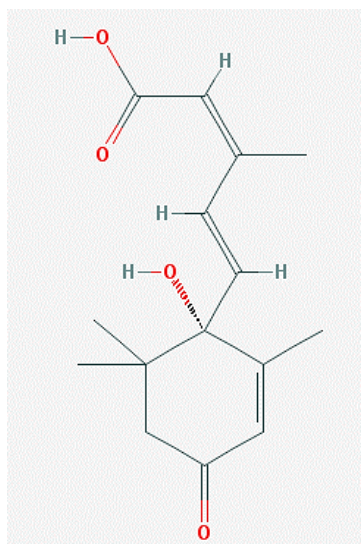
3.3.1 Chemická podstata ABA

ABA je isoprenoid zložený z pätnástich uhlíkov ($C_{15}H_{20}O_4$). Svojou štruktúrou (viď Obrázok č. 3) je táto zlúčenina veľmi podobná terminálnej časti niektorých molekúl karotenoidov. Orientácia karboxylovej skupiny na druhom uhlíku určuje, či ide o izomér *cis* alebo *trans*. Dôležité je však podotknúť, že ABA sa prirodzene vyskytuje vždy v *cis* forme, o čom svedčí aj jej názov „abscisic acid“.

ABA patrí medzi opticky aktívne látky, čo znamená, že obsahuje asymetrický atóm uhlíka (pozícia 1' v cyklickom reťazci). Môže sa teda vyskytovať vo forme izomérov

S alebo R (+/-). S enantiomér sa vyskytuje prirodzene. Naopak, komerčne dostupná syntetická ABA je zmesou približne rovnakého množstva S a R formy. Aktivita enantiomérov závisí od typu reakcie, ktorú ABA vyvoláva. V prípade dlhodobých vývojových reakcií (napr. dozrievanie semien) sú aktívne obe formy v približne rovnakom rozsahu, pričom pri krátkodobých vývojových reakciách (napr. uzatváranie prieduchov) je aktívny prevažne enantiomér S (Nováček, 2009; Taiz and Zeiger, 2010).

Molekulárna štruktúra ABA má rad vlastností, ktoré sú dôležité pre biologickú aktivitu v rastlinách. Jednou z dôležitých vlastností je postranný reťazec obsahujúci dve dvojité väzby konjugované ku karboxylovej kyseline. Dvojité väzba susediaca s cyklickou časťou molekuly je v *trans*-konfigurácii, naopak, druhá dvojité väzba je v *cis*-konfigurácii. Pôsobením UV žiarenia sa aktívna 2-*cis*, 4-*trans* ABA reverzibilne transformuje na neaktívnu formu 2-*trans*, 4-*trans* ABA. Za znížených svetelných podmienok môže byť 2-*trans*, 4-*trans* ABA použitá ako neaktívny analóg k štúdiu biologických procesov regulovaných prostredníctvom ABA. Naopak, za zvýšených svetelných podmienok môže dôjsť k posunu rovnováhy medzi 2-*cis*, 4-*trans* ABA a 2-*trans*, 4-*trans* ABA, čím je získané väčšie množstvo aktívnych foriem ABA. Aktívne a neaktívne formy je možné od seba veľmi ľahko odlíšiť použitím chromatografických analýz (Cutler *et al.*, 2010).

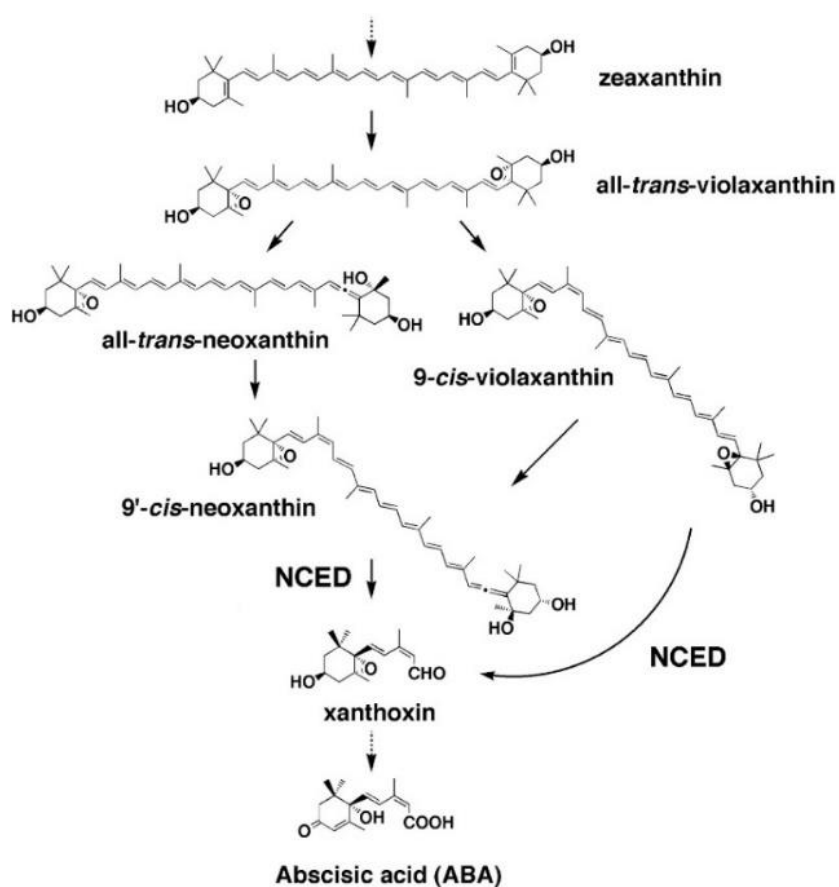


Obrázok č. 3: Chemická štruktúra ABA (prevzaté a upravené z https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/___-Abscisic_acid#section=Top)

3.3.2 Biosyntéza ABA

ABA je syntetizovaná takmer vo všetkých bunkách obsahujúcich chloroplasty alebo amyloplasty. Biosyntéza ABA prebieha vždy nepriamou cestou cez jednotlivé medziprodukty karotenoidov s veľkosťou C₄₀ a následnou dvojkrokovou premenou

medziproduktu xanthoxínu na ABA cez medziprodukt ABA-aldehyd. Na začiatku dráhy stojí isopentenyl difosfát (IPP), ktorý je zároveň prekursorom viacerých fytohormónov, a to konkrétne cytokinínov, brassinosteroidov a giberelínov. Ďalším krokom je syntéza violaxanthínu (C₄₀) a jeho následné prevedenie na *trans*-neoxanthín (C₄₀), ktorý je procesom izomerizácie prevedený na 9-*cis*-neoxanthín (C₄₀). Štiepením 9-*cis*-neoxanthínu enzýmom NCED vzniká zlúčenina xanthoxín (C₁₅), ktorá je transportovaná do cytosolu, kde sledom niekoľkých oxidatívnych reakcií dochádza k premene xanthoxínu na ABA za prítomnosti enzýmov SDR a AAO (Cutler and Krochko, 1999; Xiong and Zhu, 2003; Taiz and Zeiger, 2010; Taiz and Zeiger, 2015).



Obrázok č. 4: Biosyntéza ABA u vyšších rastlín (prevzaté z Han et al., 2004)

3.3.3 Signálna dráha ABA

ABA ako multifunkčný rastlinný hormón vyvoláva dva rozdielne typy reakcií u rastlín. Prvým typom je krátkodobá fyziologická reakcia, ktorá zahŕňa zmenu v toku iónov skrz membrány, čím dochádza k rapídному zníženiu turgorového tlaku v zvieracích bunkách, čo vedie k uzavretiu stomat (= prieduchov). V druhom prípade je ABA zapojená v dlhodobých vývojových procesoch, ktoré zahŕňajú predovšetkým reakcie na abiotický

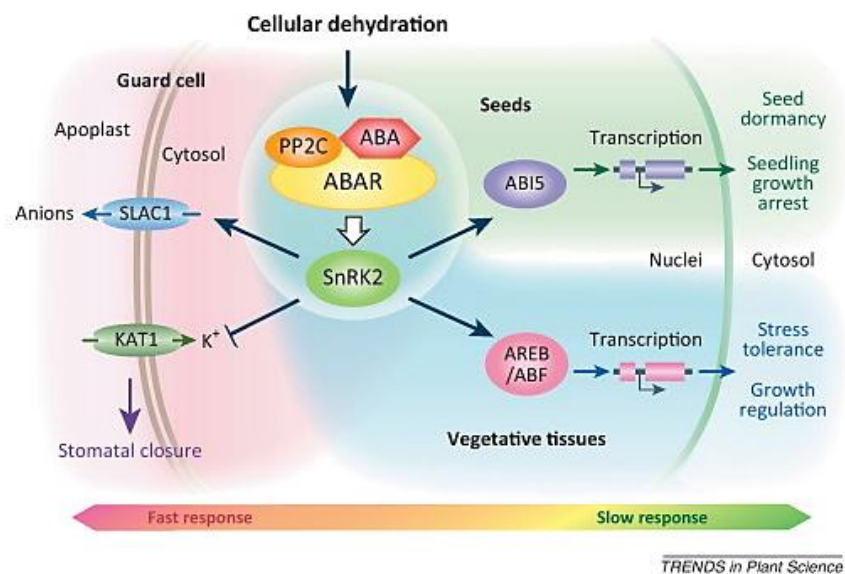
stres alebo taktiež obdobie dormancie. Oba typy reakcií, či už krátkodobé, alebo dlhodobé využívajú pri signálnej transdukcii rôzne receptory (Taiz and Zeiger, 2010; Kim *et al.*, 2012; Jones *et al.*, 2013).

V súčasnosti sú známe tri základné triedy ABA receptorov, ktoré zahŕňujú G proteíny GTG1 a GTG2 lokalizované na plazmatickej membráne, enzým lokalizovaný v plastidoch a PYR/PYL/RCAR členovia START (STEROIDOGENIC ACUTE REGULATORY PROTEIN-RELATED LIPID-TRANSFER) domény proteínovej superrodiny podieľajúci sa na iniciácii jadrovej signálnej dráhy ABA. Nedávnym výskumom bolo dokázané, že práve rozpustné proteíny START domény sú hlavnými ABA receptormi, ktoré sú zodpovedné za širokú škálu fyziologických odpovedí (napr. klíčenie, zatváranie prieduchov a pod.) (Klingler *et al.*, 2010).

Nomenklatúra jednotlivých členov START domény vznikla podľa dvoch rozdielnych experimentálnych stratégií, ktoré viedli k ich objavu. Prvou stratégiou bolo klonovanie génu, ktorý spôsobuje rezistenciu k pyrabactinu (analóg ABA). Tento gén bol následne pomenovaný ako *PYR1* (*PYRABACTIN RESISTANCE1*) (Park *et al.*, 2009). *PYR1* a jeho homológy, ktoré sú u *Arabidopsis* nazývané *PYL* (*PYR1-LIKE*) sú proteínmi START domény a predstavujú ABA-dependentné inhibítory triedy proteínov PP2C (protein phosphatase type 2C). Zaujímavosťou tohto objavu bola vedomosť, že produkty génov – *ABI1* a *ABI2*, ktoré sú zodpovedné za niekoľko typov mutácií prejavujúcich sa necitlivosťou k ABA u *Arabidopsis*, boli zapojené do ABA signalizácie ešte skôr. Ďalšou experimentálnou stratégiou bolo použitie *ABI1* a *ABI2* v hybridných testoch kvasiniek, ktoré viedli k izolácii *PYR1/PYL* homológov – *RCARs* (*REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTORS*).

Proteíny skupiny *PYR1/PYL/RCAR* vytvárajú diméry, ktoré špecificky viažu ABA. Po naviazaní ABA na jeden z dimérov, môže následne dôjsť k naviazaniu členov PP2C triedy fosfatáz, ktoré inhibujú aktivitu PP2Cs (Jones *et al.*, 2013). PP2Cs regulujú „downstream“ aktivitu serín/threonín proteínkináz triedy SnRK2 (SNF1-related protein kinase 2). PP2Cs zároveň regulujú reakcie, ktoré vznikajú ako odpoveď na rôzne typy abiotických stresov (Krzywińska *et al.*, 2016). SnRK kinázy sú nevyhnutné pre ABA signálnu transdukciu (Taiz and Zeiger, 2015). V neprítomnosti ABA, PP2Cs zahrňujúce *ABI1*, *ABI2*, *PP2CA/AHG3*, *AHG1*, *HAB1* a *HAB2* inhibujú prostredníctvom defosforylácie SnRK2. Naopak, v prítomnosti ABA, PP2Cs sú inaktivované a SnRK2 aktivované. Aktívne SnRK2 fosforylujú a aktivujú ABFs, bZIP transkripčné faktory, ktoré

viažu ABREs (ABA-responsive elements). V dôsledku toho, aktívne ABFs podporujú expresiu ABA-responsive genes (napr. RD29, RAB16 a pod.) (Kim *et al.*, 2012).



Obrázok č. 5: Signálna dráha ABA (prevzaté z Miyakawa *et al.*, 2013)

3.4 Interakcia signálnej dráhy ABA a svetla

ABA i svetlo patria medzi dôležité faktory, ktoré sa podieľajú na regulácii mnohých vývojových procesov v priebehu celého životného cyklu rastlín. Je teda možné predpokladať, že signálne dráhy svetla a signálne alebo popríklad metabolické dráhy ABA môžu vzájomne interagovať (Xu *et al.*, 2014).

Svetlo reguluje expresiu génov zapojených v procesoch biosyntézy a katabolizmu ABA, čím ovplyvňuje aj hladinu endogénnej ABA. Vplyv svetla na tieto metabolické procesy bol sledovaný predovšetkým u semien *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a *Lactuca sativa* L. Kľúčovú úlohu v biosyntetickej dráhe ABA zohrávajú gény *NCED*, ktoré kódujú enzým katalyzujúci jeden z najdôležitejších krokov biosyntézy. Dôležitú úlohu zohrávajú aj gény *CYP707A*, ktoré, naopak, kódujú enzým ABA 8'hydroxylázu. Tento enzým katalyzuje prvý krok v katabolickej dráhe ABA. Zistené bolo, že regulácia *NCED* a *CYP707A* determinuje hladinu endogénnej ABA.

Expresia génov *NCED* a *CYP707A* je ovplyvnená pôsobením červeného svetla. Obzvlášť dôležitú úlohu má fotoreceptor phyB. V prípade že je fotoreceptor phyB v aktívnej forme, expresia génov (*ABA1*, *AtNCED6* a *AtNCED9*) zapojených v biosyntéze ABA je znížená. Opačný efekt sa vyskytuje v prípade génu (*CYP707A2*) zapojeného v katabolických procesoch ABA, kde je jeho expresia značne posilnená pôsobením

červeného svetla (Seo *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 2008).

Svetlo s rôznymi vlnovými dĺžkami môže výrazne meniť koncentráciu ABA v jednotlivých pletivách a orgánoch rastlín. Zatiaľ, čo pôsobením červeného svetla dochádza k zvýšeniu hladiny ABA v koreňoch kukurice, v prípade vegetatívnych pletív u *Lemma* a *Arabidopsis* je koncentrácia ABA negatívne regulovaná fotoreceptormi červeného svetla – fytochrómami. Pri štúdiu niekoľkých génov izolovaných z *Lemma gibba*, ktoré boli negatívne regulované aktivitou fytochrómov (gény *NPR1* a *NPR2*) bolo zistené, že proteíny NPR majú určitý súvis s rodinou proteínov kódovaných génmi, ktoré boli v iných rastlinných druhoch pozitívne regulované kyselinou abscisovou (Okubara *et al.*, 1993; Williams *et al.*, 1994; Weatherwax *et al.*, 1996; Fellner, osobné zdelenie). Kľúčovým záverom ďalšieho výskumu bolo, že ABA môže taktiež pozitívne regulovať gény *NPR*. Pri prenose rastlín pestovaných na svetle do tmy (na 24 h) bola pozorovaná zvýšená úroveň transkripcie génov *NPR* a zároveň rapídne zvýšenie koncentrácie endogénnej ABA. Toto pozorovanie prudko dvihlo pravdepodobnosť, že zvýšená úroveň transkripcie génov *NPR* indukovaná v tme je výsledkom zvýšenej hladiny endogénnej ABA (Williams *et al.*, 1994; Weatherwax *et al.*, 1996).

Koncentrácia endogénnej ABA môže byť taktiež regulovaná pôsobením modrého svetla (BL). Napríklad, v prípade *Prunus*, BL zvyšuje hladinu endogénnej ABA. Pri kombinovanom pôsobení modrého svetla s krátkovlnovým alebo dlhovlnovým červeným svetlom, hladina endogénnej ABA výrazne klesá. Z týchto pozorovaní vyplýva, že signálne dráhy BL a RL svetla môžu navzájom interagovať a ovplyvňovať hladinu ABA, a tým aj samotný rast rastlín (Baraldi *et al.*, 1995; Volmaro *et al.*, 1998).

Princíp, akým rastliny integrujú externé svetelné signály so signálnymi dráhami endogénnej ABA, nie je dodnes kompletne objasnený. Zistené bolo, že HY5, známy bZIP transkripčný faktor podporujúci proces fotomorfogenézy v širokom spektre vlnových dĺžok (FR, RL, BL a UV-B), je zapojený v signálnej dráhe ABA. HY5 sa priamo viaže na promotor génu *ABI5* a aktivuje jeho expresiu (Chen *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2014). Zaujímavosťou je, že gén *ABI5* je exprimovaný aj v mladých rastlinách, čo naznačuje, že proteín ABI5 môže mať okrem klíčenia a vývoja semien aj ďalšie funkcie (Brocard *et al.*, 2002). Hypokotyly modifikovaných rastlín, ktoré nadmerne exprimujú *ABI5*, boli podstatne citlivejšie k svetlu (či už BL, RL alebo FR) v procese inhibície elongácie, než hypokotyly WT. Avšak zvýšená expresia *ABI5* u mutantov *hy5* nebola dostatočná na úplné obnovenie reakcie *hy5* k svetlu, čo poukazuje na fakt, že k inhibícii elongácie hypokotyly

počas fotomorfogenézy sú okrem *ABI5* požadované aj iné cieľové gény. HY5 teda čiastočne integruje svetelnú signálnu dráhu a ABA signálnu dráhu priamou aktiváciou *ABI5* (Chen *et al.*, 2008).

Niekoľko nedávnych štúdií ukázalo, že dôležitými transkripčnými faktormi v odozve na svetlo je proteínová rodina B-box (BBOX). Tieto proteíny boli prvýkrát identifikované u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Proteínová rodina BBOX pozostáva z 32 proteínov, pričom niektoré z nich regulujú fotomorfogenézu pozitívne, iné zase negatívne. Pozoruhodné je, že BBX21, BBX22, BBX24 a BBX25 fyzicky interagujú s HY5. Nedávnym výskumom bolo zistené, že BBX21, transkripčný regulátor podieľajúci sa na regulácii fotomorfogenézy u rastlín, negatívne reguluje expresiu génu *ABI5* interferenciou s transkripčnou aktivitou HY5. Zaujímavosťou je, že *ABI5* je schopný viazať sa do svojho promotora a tým aktivovať svoju vlastnú expresiu, pričom BBX21 negatívne reguluje túto aktiváciu priamou interakciou s *ABI5*. Výsledkom tohto výskumu bolo zistenie, že BBX21 koordinuje s HY5 a *ABI5* na promotore *ABI5*. Vďaka tejto koordinácii je zabezpečená integrácia svetelnej a ABA signalizácie (Xu *et al.*, 2014).

Kyselina abscisová sa podieľa na regulácii expresie génov zapojených v svetelnej signálnej dráhe. Svetlozberné proteíny viažuce chlorofyl a/b (LHCb) sú apoproteíny fotosystému II, ktoré absorbujú a transferujú svetelnú energiu. Expresia génov *LHCb* je striktno regulovaná svetlom. Za stresových podmienok je expresia týchto génov regulovaná prostredníctvom ABA. Aplikáciou exogénnej ABA vo vysokých koncentráciách vedie k okamžitej inhibícii expresie génov *LHCb* v rôznych pletivách, vrátane listov *Solanum lycopersicum* L., buniek *Lemma gibba* a pod. Naopak, vo fyziologických koncentráciách ABA zvyšuje expresiu génov *LHCb*. ABA funguje prostredníctvom transkripčného faktoru WRKY40, ktorý potláča expresiu *LHCb* s cieľom vyvážiť funkciu LHCb členov v signalizácii ABA (Liu *et al.*, 2013).

Ďalším transkripčným faktorom, ktorý zohráva určitú úlohu v integrácii signálnej dráhy svetla, ABA a JA je ZBF1/MYC2bHLH u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. MYC2 funguje ako represor fotomorfogenézy. Na druhej strane môže MYC2 fungovať, napríklad, ako pozitívny regulátor vývoja laterálnych koreňov. Gupta sa spolu s ostatnými spoluautormi (2014) venoval funkčnej analýze LeMYC2 u rajčiaka jedlého (*Lycopersicon esculentum*). Aminokyselinová sekvencia LeMYC2 vykazuje silnú homológiu s MYC2 u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. LeMYC2 pôsobí ako negatívny regulátor fotomorfogenetického rastu indukovaného modrým svetlom. Naopak, v prípade dospelých

rastlín rajčiaka jedlého pôsobí LeMYC2 ako stimulátor rastu (Gupta *et al.*, 2014).

Vzájomná interakcia signálnej dráhy svetla a ABA bola sledovaná aj u modelovej rastliny *7B-1*. Nasledujúce podkapitoly sú venované základnej charakteristike tejto modelovej rastliny a popisu vzťahov modelovej rastliny k rôznym faktorom.

3.4.1 Modelová rastlina *7B-1*

Rajčiak jedlý (*Solanum lycopersicum* L.) patrí do čeľadi ľuľkovitých (*Solanaceae* Juss.). Ide o jednu z najdôležitejších druhov plodín na celom svete, ktorá má využitie nielen v oblasti hospodárstva, ale taktiež aj v oblasti genetiky a rastlinnej fyziológie (Bergougnoux, 2014). Veľmi často je pri výskumoch využívaný tzv. genetický prístup, ktorý spočíva v izolácii a charakterizácii mutantov, ktorý majú značne odlišný fenotyp v porovnaní s WT. Príkladom môže byť štúdium funkcie rastlinných hormónov v geneticky regulovanom raste a vývoji rastlín (Fellner *et al.*, 2001).

Spontánny recesívny jednoduchý („single-gene“) mutant *7B-1* bol vyselektovaný na základe samčej sterility, ktorá sa prejavuje počas dlhých dní (16 hod svetelná perióda). Pri tejto fotoperióde sa v kvetoch mutovaných rastlín vytvárajú zvrátené tyčinky produkujúce neživotaschopné mikrospóry. Naopak, počas krátkych dní (8 hod svetlo/16 hod tma) je väčšina rastlín *7B-1* fertily. Vytvárajú normálne tyčinky, ktoré produkujú životaschopné peľové zrná (Sawhney, 1997).

Pre tento mutant je charakteristická zvýšená tolerancia k abiotickému stresu (napr. osmotický stres, nízka teplota, zasolenie a pod.), zvýšená citlivosť k exogénnej ABA a znížená hladina auxínu, etylénu, gibberelínov a cytokinínov. Pravdepodobne je rezistencia na abiotický stres spojená so zvýšenou hladinou pre-existujúcej endogénnej ABA v semenách a hypokotyloch mutantu. Dôležité je zmieniť sa, že mutant *7B-1* vykazuje vyššiu rezistenciu len pri pôsobení svetla, obzvlášť pri pôsobení vysokoenergetického modrého svetla (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2005).

Primárna podstata mutácie *7B-1* nie je doposiaľ známa. S využitím molekulárnych metód bolo zistené, že ide pravdepodobne o defekt v signálnej dráhe modrého svetla. Doposiaľ nebolo preukázané, či má *7B-1* defekt v receptore phot1 alebo phot2. Je však možné, že defekt v jednom z receptorov môže ovplyvňovať výslednú reakciu regulovanú druhým receptorom. Toto tvrdenie je odôvodnené faktom, že oba receptory (phot1 i phot2) vzájomne spolupracujú vo výsledných reakciách na BL (napr. fototropizmus, pohyby chloroplastov, otváranie prieduchov) (Hlavinka *et al.*, 2013).

Prednedávnom sa podarilo identifikovať niekoľko génov s pozmenenou úrovňou expície (vrátane β -1,3-glukanáza, GA2oxs, cystatín, cysteín proteáza, pektínesteráza, TA29 a aktín), ktoré by potenciálne mohli regulovať vývoj prašníkov a samčiu sterilitu u *7B-1*. K objasneniu mechanizmov regulácie samčej sterility u *7B-1*, bolo vykonané štúdium transkriptomických profilov peľníc *7B-1* a WT využitím sekvenovania mRNA (Omidvar *et al.*, 2017).

Rastliny, ktoré vykazujú samčiu sterilitu a zvýšenú rezistenciu, sú veľmi často používané v šľachtiteľských programoch. Ich využitie je však niekedy limitované zvýšenou citlivosťou k rôznym abiotickým a biotickým stresom (Bergougnoux *et al.*, 2009; Hlavinka *et al.*, 2013).

3.4.1.1 Modelová rastlina *7B-1* a ABA

Jedným z možných mechanizmov, ktorým rastliny odolávajú abiotickému stresu je akumulácia endogénnej ABA. Rastliny *7B-1* a WT vystavené rôznym stresom môžu mať teda zvýšenú hladinu ABA. Inhibičný efekt pôsobiaceho stresu môže byť čiastočne alebo úplne potlačený vplyvom fluridonu (inhibitor ABA biosyntézy). Experimentom bolo preukázané, že fluridon v nízkych koncentráciách (0,1 a 1 μ M) stimuloval rast hypokotylu vo väčšej miere u WT, než u *7B-1*. Dôvodom môže byť zvýšená hladina pre-existujúcej ABA u *7B-1*, ktorá má na rast inhibičné účinky. Zároveň môže byť zvýšená citlivosť *7B-1* k exogénnej ABA vysvetlená na základe vysokého obsahu ABA v semenách rastlín (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001).

V prípade, ak je rastlina vystavená suchu, dochádza k zvýšeniu transpirácie a zníženiu vodného potenciálu, na čo rastlina reaguje syntézou ABA. ABA môže následne indukovať uzatvorenie prieduchov alebo inhibovať ich otvorenie. Princíp uzavretia prieduchov spočíva vo väzbe ABA na receptor, čím dochádza k produkcii H_2O_2 a NO a aktivácii signálnej kaskády, ktorá vedie k toku K^+ a Cl^- von z buniek prieduchov. Svetlo, obzvlášť BL, stimuluje otváranie prieduchov. U mutovaných rastlín *7B-1* nebolo otváranie prieduchov stimulované modrým svetlom. Využitím ABA a látky, ktorá blokuje aniónové kanály, bolo zistené, že mutácia *7B-1* pravdepodobne ovplyvňuje funkciu aniónových kanálov v plazmatickej membráne buniek, ktoré sú zapojené v procese otvárania prieduchov. Aktivita aniónových kanálov u mutanta je znížená v dôsledku rezistencie k BL a zároveň kvôli zvýšenej hladine endogénnej ABA (Fellner and Sawhney, 2002; Ježilová *et al.*, 2012; Hlavinka *et al.*, 2013).

3.4.1.2 Modelová rastlina 7B-1 a ethylén

Experimentálne testovaný bol aj vzťah modelovej rastliny 7B-1 a iných fytohormónov, napríklad ethylénu. Ethylén je plynňý hormón, ktorý reguluje veľké množstvo fyziologických procesov vrátane klíčenia rastlín, kvitnutia, dozrievanie plodov, rastu koreňa a pod. Prvý účinok, ktorý bol u ethylénu popísaný, bola tzv. trojitá odozva („triple response“). Trojitá odozva znamená redukované predlžovanie hypokotylu, zhrubnutie stonky a vytvorenie apikálneho háčiku. Konkrétne ide o vplyv ethylénu na etiolizované rastliny (Procházka 1998; Taiz and Zeiger, 2010). Biosyntéza ethylénu a citlivosť pletív k ethylénu môže byť ovplyvnená inými rastlinnými fytohormónmi. Napríklad, produkcia ethylénu môže byť regulovaná auxínmi, cytokinínmi a ABA. Svetlo je taktiež zapojené do regulácie syntézy ethylénu.

Skúmaný bol vzťah rastlín 7B-1 k prekursoru ethylénu, ktorým je 1-aminocyklopropán-1-karboxylová kyselina (ACC). V tme vykazoval 7B-1 normálnu trojitú odozvu k aplikovanej ACC. Rovnaká reakcia bola pozorovaná aj u WT. Na svetle bol hypokotyl 7B-1 viac citlivý k ACC, ale zároveň menej citlivý k inhibítoru aktivity ethylénu (thiosulfát strieborný) než u WT. U mutanta bola zaznamenaná znížená produkcia ethylénu, čo mohlo mať za následok zvýšenú citlivosť k exogénne aplikovanej ACC. Listy rastlín obsahovali zvýšené množstvo chlorofylu (v porovnaní s WT), ktorý bol zároveň pri reakcii na ACC degradovaný. Experimentom bolo zistené, že znížená produkcia ethylénu u 7B-1 je pravdepodobne prepojená s vyššou koncentráciou endogénnej ABA (Fellner *et al.*, 2005).

3.4.1.3 Modelová rastlina 7B-1 a zmeny vo fotosyntéze

U rastlín 7B-1 boli pod modrým svetlom skúmané aj zmeny vo fotosyntéze. Sledované boli zmeny v rýchlosti fotosyntézy (P_N), vodivosti prieduchov (g_s), vnútornej efektivity využitia vody (WUE_i) a obsahu chlorofylu [Chl ($a+b$)]. V mladých listoch boli hodnoty P_N , g_s a [Chl ($a+b$)] takmer rovnaké u oboch genotypov (7B-1 i WT). S postupným starnutím listov zvyšovalo BL hodnoty P_N a g_s až na stálu hodnotu, ktorá bola v prípade 7B-1 nižšia než u WT. Naopak, hodnota WUE_i bola medzi 4. a 9. týždňom vyššia u 7B-1 v porovnaní s WT. Odlišnosti v jednotlivých hodnotách medzi WT a 7B-1 môžu byť opäť odôvodnené na základe zvýšenej hladiny ABA u rastlín 7B-1 a ich zníženou citlivosťou k ABA v skorých štádiách rastu (Ježilová *et al.*, 2012).

3.4.1.4 Modelová rastlina 7B-1 a oxid dusnatý (NO)

NO je dôležitou signálnou molekulou, ktorá je zapojená v signálnej dráhe a regulácii rastu, vývoja a schopnosti reagovať na stimuly vonkajšieho prostredia. NO sa taktiež zúčastňuje reakcie na biotický stres vyvolaný vírusovými, bakteriálnymi alebo hubovými patogénmi. Za určitých okolností môže NO pôsobiť ako antioxidant a chrániť rastliny pred zvýšenou koncentráciou reaktívnych foriem kyslíka.

Donor NO (SNG) zohráva dôležitú úlohu v prelomení obdobia dormancie a navodení klíčenia semien. Naopak, scavenger NO (PTIO) čiastočne alebo takmer úplne inhibuje klíčenie. Fakt, že SNG bol schopný čiastočne obnoviť klíčenie semien, svedčí o tom, že existuje určité prepojenie medzi inhibíciou klíčenia prostredníctvom ABA a nízkou koncentráciou NO. NO sa akumuluje vo vyššej miere u 7B-1 než u WT. Miesta produkcie NO boli detekované využitím fluorescenčne značenej sondy DAF-FM DA. Výsledkom bolo zistenie, že semená rastliny 7B-1 vystavené osmotickému stresu produkujú väčšie množstvo NO, než semená štandardného genotypu. Koncentrácia NO a ABA je regulovaná svetlom. BL zvyšuje intenzitu reakcie rastlín na stres (Shi *et al.*, 2005; Piterková *et al.*, 2012).

3.4.1.5 Modelová rastlina 7B-1 a antokyány

Antokyány predstavujú jednu z najrozšírenejších tried rastlinných pigmentov. Sú to flavonoidné látky, ktoré majú funkciu fotoprotektantov, teda sú schopné chrániť rastlinu pred účinkami silného svetelného žiarenia (napr. UV-B radiácia). Zároveň sú schopné zmierniť fotooxidatívne poškodenie listov, a to zachytávaním voľných radikálov a reaktívnych foriem kyslíka.

Hladina antokyánov sa líši podľa druhu rastlín a orgánov/pletív. Hypokotyl mutantnej rastliny 7B-1 vystavený pôsobeniu fluridonu vykazoval intenzívne fialové sfarbenie. Za vysokú intenzitu sfarbenia je pravdepodobne zodpovedná vysoká hladina antokyánov. Dokonca aj semená 7B-1 boli tmavšie sfarbené než semená WT. Antokyány môžu byť produkované nielen pôsobením svetla, ale aj ako odpoveď na stres a hormóny, vrátane ABA. Zvýšená koncentrácia antokyánov v hypokotyloch rastlín 7B-1 môže pravdepodobne súvisieť so zvýšenou koncentráciou endogénnej ABA v spomínanej mutovanej rastline (Fellner *et al.*, 2001; Sheoran *et al.*, 2006; Carvalho *et al.*, 2011a).

3.4.1.6 Modelová rastlina 7B-1 a biotický stres

Koronatín (COR) je fytotoxín, ktorý je produkovaný niektorými kmeňmi baktérie

Pseudomonas syringae. Jeho produkcia je nevyhnutná pre zabezpečenie úplnej virulencie baktérií v rastlinných bunkách. U rastlín spôsobuje širokú škálu poškodení. Medzi symptómy vyvolané COR patrí degradácia chlorofylu, hypertrofia, inhibícia rastu koreňa, stimulácia produkcie ethylénu, syntéza antokyánov, akumulácia alkaloidov a mnohé ďalšie. Mutant *7B-1* je k tomuto toxínu menej citlivý než rastliny štandardného genotypu. Pôsobením BL dochádza k zníženej degradácii chlorofylu. Znížená citlivosť rastlín *7B-1* na COR pri pôsobení BL je pravdepodobne spojená s nadmernou expresiou génu *NPR1* na BL.

Rastliny si vytvorili sofistikovaný mechanizmus, ako sa brániť proti útoku patogénov. Rastliny *7B-1* i WT akumulujú vo svojich hypokotyloch kyselinu salicylovú (SA), kyselinu jasmónovú (JA) a ABA ako odpoveď na COR. Hladina SA a ABA bola u *7B-1* zreteľne vyššia než u WT, obzvlášť pri pôsobení BL (Bergougnoux *et al.*, 2009).

4 Materiál a metodika

4.1 Rastlinný materiál

K jednotlivým experimentom boli použité semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.). Konkrétne semená mutantov *7B-1*, *hp1*, *cry1-1* a semená príslušných kultivarov, od ktorých boli mutanty odvodené (cv. Rutgers, cv. Rutgers; LA3004 a cv. Money Maker):

- mutant *7B-1*, genetický základ cv. Rutgers,
- mutant *hp1*, genetický základ cv. Rutgers; LA3004,
- mutant *cry1-1*, genetický základ cv. Money Maker.

Spontánny recesívny jednoduchý mutant *7B-1* bol vyizolovaný na základe samčej sterility, ktorá sa prejavuje počas dlhých dní (16 hod denné svetlo / 8 hod tma). Funkcia samotného mutovaného génu *7B-1* nie je doposiaľ známa, ale podľa doterajších štúdií ide pravdepodobne o defekt v signálnej dráhe modrého svetla (Hlavinka *et al.*, 2013). Mutant bol získaný zo základného genotypu, kultivaru Rutgers (cv. Rutgers). Semená porovnávaných genotypov boli poskytnuté Vipen K. Sawhney (University of Saskatchewan, Canada).

Recesívny mutant *cry1-1* sa vyznačuje svojou redukovanou citlivosťou k modrému svetlu (BL), ktorá je výsledkom mutácie génu *CRY1*, kódujúceho receptor modrého svetla – kryptochróm 1 (*cry1*). V tomto prípade ide o indukovanú mutáciu, teda mutáciu vyvolanú pôsobením γ -žiarenia. Mutant bol získaný zo štandardného genotypu, kultivaru Money Maker (cv. MM) (Weller *et al.*, 2001). Semená mutanta *cry1-1* a kontrolného genotypu cv. MM boli poskytnuté R. E. Kendrickom (Wageningen University, Wageningen, The Netherlands).

Posledným testovaným mutantom bol monogénny recesívny mutant *hp1* (*high pigment1*). Tento mutant je taktiež charakterizovaný oneskorením fyziologických procesov (rast a vývoj) závislých na svetelných podmienkach (Azari *et al.*, 2010). Charakteristická je jeho zvýšená citlivosť k svetlu (Lieberman *et al.*, 2004; Srinivas *et al.*, 2004). Mutácia spočíva v poruche génu *SlDDB1*, ktorý kóduje DDB1 (UV-damaged DNA-binding protein 1) (Yuxiang *et al.*, 2016). Typickými znakmi mutovaných rastlín je kratší hypokotyl, zvýšené hladiny antokyánov, zvýšený počet plastidov a celkovo vyššia pigmentácia listov a plodov v porovnaní s WT (Bino *et al.*, 2005; Azari *et al.*, 2010). Mutant bol odvodený zo štandardného genotypu, kultivaru Rutgers (cv. Rutgers; LA3004)

(Carvalho *et al.*, 2011b). Semená mutanta *hpl* a kontrolného genotypu cv. Rutgers; LA3004 boli poskytnuté C. M. Rickom (TGC: Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>).

4.2 Chemikálie a roztoky

- Sacharosa
- Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS; Murashige and Skoog, 1962; Cat. no. M5524, Caisson, USA)
- Pufn MES
- Phyto agar
- 1 M KOH
- NaClO (2,8 %) – SAVO (0,6 l SAVO + 0,4 l dH₂O)
- Ethanol (96 %)
- ABA – zásobný roztok o koncentrácii 10⁻² mol/l
- Sterilná destilovaná voda (dH₂O)

4.3 Prístrojové vybavenie

- laminárny flowbox (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific)
- automatická rastová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific B.V., The Netherlands) s modrým svetlom (Blue light – BL; zdroj svetla: trubice Philips TLD-36W/18-Blue, Philips USA; maximálne ožiarenie pri 440 nm 10 μmol m⁻² s⁻¹)
- automatická rastová komora (Microclima 1000E, Snijders Scientific B.V., The Netherlands) s červeným svetlom (Red light – RL; zdroj svetla: trubice Philips TLD-36W/15-Red, Philips USA; maximálne ožiarenie pri 660 nm 10 μmol m⁻² s⁻¹)
- pH meter
- magnetická miešačka
- analytické váhy
- predvážky

4.4 Pomôcky

Plastové okrúhle Petriho misky (priemer 90 mm), plastové sterilné skúmavky (50 ml) typu Falcon, automatické pipety Proline (2-20 μl, 20-200 μl, 1 ml a 10 ml), sterilné plastové

špičky, sterilná Erlenmayerova banka (250 ml), kadička (600 ml), liehový kahan, pinzeta, skalpel, lepiaca páska z netkanej textílie (REF: 1320103112, BATIST), alobal, plastové pravítko (30 cm), zápalky

4.5 Pracovné postupy

4.5.1 Príprava kultivačného média (Murashige-Skoog médium)

Pri všetkých vykonaných experimentoch bolo použité pevné kultivačné médium, a to MS médium (Murashige and Skoog, 1962). Na prípravu 2 l kultivačného média bolo navážených: 20 g sacharózy, 8,66 g MS média a 390,4 mg pufru MES. Pufr MES bol kvôli nízkej požadovanej hmotnosti a vyššej presnosti navážený na analytických váhach. Následne boli všetky navážené zložky rozpustené za neustáleho miešania na magnetickej miešačke v 1 l destilovanej vody. Po dôkladnom rozpustení všetkých zložiek bol roztok doplnený na objem 2 l.

Vložením elektródy pH metru do pripraveného roztoku v Erlenmayerovej banke bolo zmerané jeho pH, ktoré bolo následne upravené pomocou 1 M KOH na hodnotu 6,1.

Po úprave pH bolo za pomoci odmerného valca médium rozdelené po 400 ml do piatich sklenených fliaš o objeme 500 ml. Ešte pred samotným rozdelením média bolo do každej sklenenej fľaše navážených 2,8 g agaru. Pripravené médium v sklenených fľašiach bolo vysterylizované v autokláve. Sklenené fľaše boli následne uchovávané v chladničke.

4.5.2 Použité koncentrácie ABA

Pri testovaní vplyvu exogénnej ABA na rastové reakcie porovnávaných genotypov, bol použitý zásobný roztok ABA o koncentrácii 10^{-2} mol/l.

Zásobný roztok ABA bol následne pipetovaný do 120 ml kultivačného média podľa nasledujúcej tabuľky:

Tabuľka č.1: Testované koncentrácie a pridávané objemy ABA do 120 ml kultivačného média

| Koncentrácia zásobného roztoku ABA [mol/l] | 10^{-2} | | | | |
|---|-----------|-----------|--------------------|-----------|--------------------|
| Testované koncentrácie ABA [mol/l] | 0 | 10^{-6} | 3×10^{-6} | 10^{-5} | 3×10^{-5} |
| Pridávané objemy do 120 ml média [μ l] | - | 12 | 36 | 120 | 360 |

4.5.3 Sterilizácia a výsev semien

Pred začatím každého experimentu bolo napočítané príslušné množstvo semien z každého testovaného genotypu (vždy 250 semien).

Semená boli následne povrchovo sterilizované v plastových skúmavkách (50 ml) typu Falcon v približne 40 ml 2,8% roztoku SAVA (0,6 l SAVO + 0,4 l dH₂O). Sterilizácia prebiehala za občasného premiešania (kvôli zvýšenej účinnosti sterilizácie) po dobu 25-30 min. Po ukončení sterilizácie boli semená opláchnuté destilovanou vodou, a to tak, že za pomoci automatickej pipety (10 ml) bol odpipetovaný celý objem roztoku SAVA zo skúmavky a do prázdnej skúmavky so semenami bolo, naopak, naliatych 40 ml sterilnej destilovanej vody. Týmto spôsobom boli semená v oboch plastových skúmavkách opláchnuté päťkrát. Pri celom postupe sterilizácie semien bolo dôležité dbať na to, aby sa plastová špička pipety nedotýkala pracovnej plochy flowboxu (zabránenie kontaminácie).

Pred vykonaním samotného výsevu bolo pripravené kultivačné médium (200 ml MS média) rozohriaté v mikrovlnnej rúre (po rozohriatí podoba číreho roztoku) a následne rozdelené po 20 ml na plastové okrúhle sterilné Petriho misky (priemer 90 mm). Výsev prebiehal v laminárnom flowboxe za sterilných podmienok pri dennom svetle. Pomocou pinzety (sterilizácia 96 % ethanolom a opálenie nad plameňom liehového kahana) bolo na každú Petriho misku so stuhnutým kultivačným médiom vysiatych približne 50 semien.

Všetky Petriho misky s vysiatymi semenami boli po obvodu dvakrát oblepené lepiacou páskou z netkanej textílie a zabalené do alobalu. Následne boli všetky misky vložené do automatickej rastovej komory, kde boli semená kultivované 3 dni pri teplote 23°C.

4.5.4 Kultivácia rastlín na médiu obsahujúcom ABA

Po vyklíčení dostatočného počtu semien (po 3-dňovej kultivácii v tme pri teplote 23°C), boli semená za sterilných podmienok prenesené na nové kultivačné médium (MS médium) obsahujúce požadovanú koncentráciu ABA.

Pred samotným transferom bolo kultivačné médium rozohriaté v mikrovlnnej rúre (600 ml MS média). Zo sklenenej fľaše s rozohriatým médiom bolo vždy 120 ml média odliatych do sterilnej Erlenmayerovej banky (za pomoci sterilnej plastovej skúmavky typu Falcon). Následne bolo do média napipetované príslušné množstvo ABA (koncentrácia zásobného roztoku 10⁻² mol/l), čím bolo získaných 120 ml MS média s prídavkom ABA s rôznou koncentráciou (0, 10⁻⁶, 3×10⁻⁶, 10⁻⁵ a 3×10⁻⁵ mol/l). Požadovaný objem ABA

mohol byť aplikovaný do kultivačného média až v momente, kedy sa teplota kultivačného média blížila izbovej teplote. Médium s príslušným prídavkom ABA bolo rozdelené vždy na 6 plastových okrúhlych sterilných Petriho misiek (na každú Petriho misku 20 ml média).

Pomocou pinzety (sterilizácia 96 % ethanolom a opálenie nad plameňom liehového kahana) bolo na každú Petriho misku so stuhnutým kultivačným médiom prenesených približne 6-9 vyklíčených semien testovaného genotypu (podľa množstva vyklíčených semien). Semená boli uložené do jedného horizontálneho radu na povrch kultivačného média v Petriho miskách (konkrétne 30 sterilných Petriho misiek – každých 6 sterilných Petriho misiek s inou koncentráciou ABA; z toho každé 3 sterilné Petriho misky pre iný testovaný genotyp). Pri prenášaní semien na nové médium bolo dôležité dbať na to, aby na každej Petriho miske bol rovnaký počet semien s krátkymi i dlhšími koreňkami.

Všetky Petriho misky s prenesenými vyklíčenými semenami boli po obvode dvakrát oblepené lepiacou páskou z netkanej textilie. Časť Petriho misiek s vyklíčenými semenami bolo zabalených do alobalu a vložených do automatickej rastovej komory. Druhá časť Petriho misiek s kľúčiacimi semenami bola vložená do plastových stojanov umožňujúcich kultiváciu rastlín vo vertikálnej polohe a umiestnená do rovnakej automatickej komory s modrým svetlom. Tretia časť rastlín v Petriho miskách a plastových stojanoch bola umiestnená do automatickej rastovej komory s červeným svetlom. Všetky Petriho misky s rastlinami boli kultivované po dobu 7 dní pri teplote 23°C.

4.5.5 Meranie dĺžky koreňa a hypokotylu rastlín

Pred samotným meraním jednotlivých rastlín kultivovaných 7 dní pri teplote 23°C v automatických rastových komorách pri rôznych podmienkach (rôzne svetlo, odlišná koncentrácia ABA) boli rastliny najprv vizuálne zhodnotené. Zhodnotené boli ich charakteristické znaky (sfarbenie, veľkosť a tvar kotyledónov, dĺžka hypokotylu a koreňa, prípadne prítomnosť listovej alebo koreňovej nekrózy).

Pri meraní rastlín bola nutná opatnosť kvôli ich krehkosti (predovšetkým rastliny kultivované v tme). U každej rastliny bola najprv zmeraná koreňová časť a následne dĺžka hypokotylu (s presnosťou na 1 mm). Z troch opakovaní experimentu boli vypočítané priemerné hodnoty dĺžky koreňa a dĺžky hypokotylu. Hodnoty boli spracované pomocou programu Microsoft Excell 2013.

5 Výsledky

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo zistiť, či, ako, a prostredníctvom ktorých fotoreceptorov svetlo, predovšetkým modré, ovplyvňuje rastové reakcie hypokotylu a koreňa rastlín rajčiaka k rastovému hormónu kyseline abscisovej (ABA). K naplneniu cieľa práce bol využitý tzv. genetický prístup, ktorý spočíval vo fyziologickej analýze mutantov rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) a príslušných kultivarov, od ktorých boli mutanty odvodené. Všetky experimenty boli vykonané podľa postupu, detailne popísaného v metodike (viď predchádzajúca kapitola).

5.1 Fenotypy študovaných mutantov a príslušných kultivarov

Fenotypy jednotlivých genotypov sa výrazne líšili v závislosti od koncentrácie exogénnej ABA pridanej do kultivačného média a svetelných podmienok, pri ktorých prebiehal ich rast.

Všetky genotypy pestované v tme vykazovali charakteristické znaky skotomorfogenézy. Ich hypokotyly boli krehké s typickým bielo-žltým sfarbením (bez prítomnosti chlorofylu). So stúpajúcou koncentráciou ABA bol hypokotyl rastlín stále kratší v porovnaní s rastlinami pestovanými na kultivačnom médiu s nulovou koncentráciou ABA. Dĺžka koreňa bola v porovnaní s dĺžkou hypokotylu výrazne menšia, čo je charakteristické pre rastliny pestované bez svetelnej energie.

U rastlín pestovaných na modrom svetle boli, naopak, pozorované znaky typické pre fotomorfogézu. Predlžovanie hypokotylu bolo inhibované svetlom. Hypokotyly mali zelené sfarbenie rovnako ako aj kotyledóny. So stúpajúcou koncentráciou ABA mali rastliny kratší hypokotyl, menšie a tmavšie kotyledóny a kratšie korene v porovnaní s rastlinami na Petriho miske s nulovou koncentráciou ABA. Hypokotyl a koreň u mutantu *7B-1* a mutantu *cry1-1* bol výrazne dlhší než u odpovedajúcich kultivarov. V prípade mutantu *hp1* bol, naopak, hypokotyl a koreň výrazne kratší, než u WT.

Fenotyp rastlín pestovaných na červenom svetle sa výrazne nelíšil od fenotypu rastlín pestovaných na modrom svetle. Rozdiel bol pozorovaný iba pri dĺžke a sfarbení hypokotylu a veľkosti kotyledónov. Rastliny mali dlhší a tmavší hypokotyl a väčšie kotyledóny v porovnaní s rastlinami pestovanými na modrom svetle. U mutantu *7B-1* a mutantu *cry1-1* sa dĺžka koreňa a hypokotylu výrazne neodlišovala od dĺžky koreňa a hypokotylu u WT. Naopak, u mutantu *hp1* bola podobne ako na modrom svetle dĺžka

koreňa a hypokotylu výrazne kratšia, než u WT.

5.2 Rastové reakcie koreňa a hypokotylu k exogénnej ABA

Pri každom vykonanom experimente bol rast rastlín ovplyvnený prídavkom ABA (koncentrácia zásobného roztoku 10^{-2} mol/l) do základného kultivačného média. Testovaných bolo päť rôznych koncentrácií ABA (0, 10^{-6} , 3×10^{-6} , 10^{-5} a 3×10^{-5} mol/l). Experimenty prebiehali *in vitro* pod vplyvom svetla o rôznej vlnovej dĺžke (BL, RL) a súčasne v tme (D). U každého mutanta a príslušného kultivaru bol experiment zopakovaný trikrát, predovšetkým kvôli prirodzenej variabilite rastu rastlín, a teda kvôli vyššej presnosti získaných výsledkov.

5.2.1 Rastové reakcie hypokotylu

Pri vyhodnocovaní výsledkov získaných z troch nezávislých experimentov bolo sledované, aký vplyv majú vybrané mutácie *7B-1*, *cry1-1* a *hpl* na citlivosť hypokotylu k ABA a zároveň, ako sa citlivosť hypokotylu k ABA mení v závislosti na rôznych svetelných podmienkach (D, BL a RL). V nasledujúcej časti sú výsledky prezentované dvoma typmi grafov. Prvý typ grafov zobrazuje závislosť priemernej dĺžky hypokotylu vybraných genotypov na koncentrácii ABA pod vplyvom modrého a červeného svetla a taktiež aj tmy. Druhý typ grafov (stĺpcový graf) zobrazuje percentuálnu mieru inhibície rastu hypokotylu daných genotypov pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l exogénnej ABA.

Inhibícia rastu hypokotylu (i koreňa v ďalšej časti práce) bola vypočítaná podľa nasledujúceho vzorca:

$$\% \text{ inhibícia} = \frac{a - b}{a} \times 100 \%$$

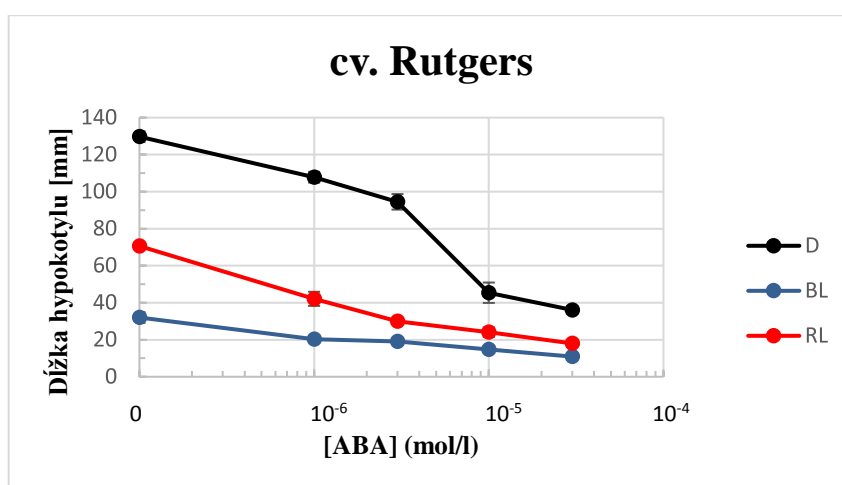
kde a = hodnota dĺžky hypokotylu pri koncentrácii 0 mol/l, b = hodnota dĺžky hypokotylu pri koncentrácii 10^{-6} mol/l.

- mutant **7B-1**; genetický základ **cv. Rutgers (WT)**

V prípade rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers bola po kultivácii na modrom a červenom svetle pozorovaná inhibícia rastu hypokotylu. Išlo o jednu z typických reakcií v procese fotomorfogenézy, pri ktorom svetelný signál mení rastlinu na formu, ktorá je schopná fotosyntetizovať. Pri nulovej koncentrácii exogénnej ABA dosahovala dĺžka hypokotylu WT kultivovaných v tme 130 mm. Na modrom svetle bol hypokotyl dlhý už iba 32 mm a na červenom svetle 71 mm. Rovnaký trend vplyvu modrého a červeného

svetla bol pozorovaný u všetkých nižšie popísaných genotypov.

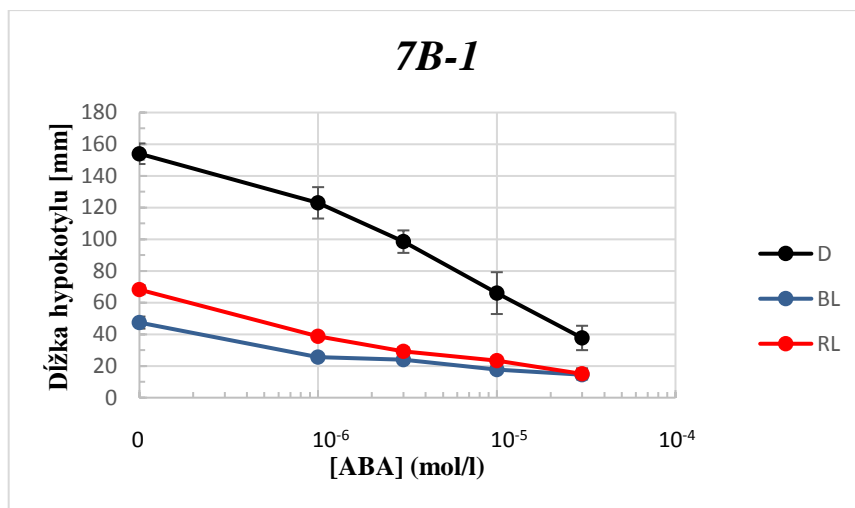
Na Obrázku č. 6 je viditeľná zvýšená inhibícia rastu hypokotylu cv. Rutgers s postupne narastajúcou koncentráciou exogénnej ABA. Napr., pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA sa dĺžka hypokotylu skrátila viac než o polovicu, konkrétne zo 130 mm na približne 45,5 mm (t.j. inhibícia 65 %). Podobné rastové reakcie hypokotyllov k zvyšujúcej sa koncentrácii ABA boli pozorované aj u rastlín pestovaných na modrom a červenom svetle. Na modrom svetle bola priemerná dĺžka hypokotylu rastlín pôsobením koncentrácie 10^{-5} mol/l ABA znížená približne o polovicu, t.j. 54 %. Na červenom svetle bola pri rovnakej koncentrácii inhibícia rovná takmer 66 %, čo znamená, že dĺžka hypokotylu bola skrátaná podobne ako v tme o viac než polovicu.



Obrázok č. 6: Priemerná dĺžka hypokotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypokotylu \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

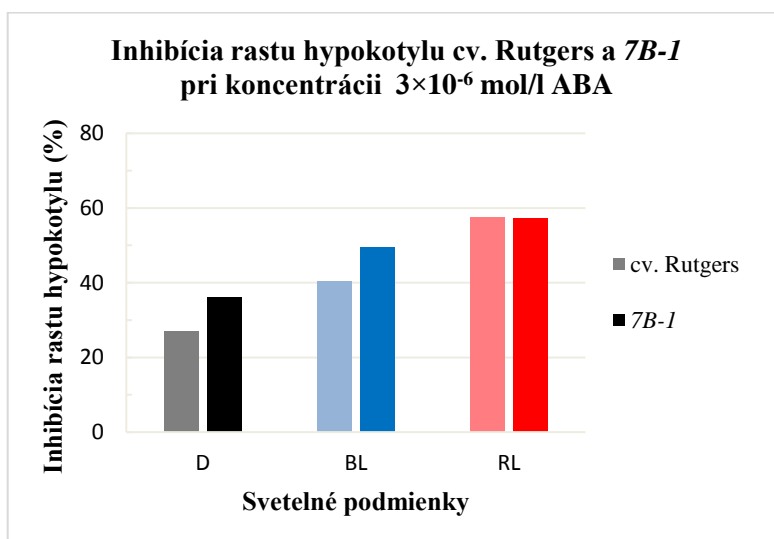
V prípade genotypu *7B-1* bol hypokotyl po kultivácii na modrom svetle dlhší v porovnaní s hypokotylom genotypu cv. Rutgers. Pri nulovej koncentrácii dosahovala priemerná dĺžka hypokotylu WT 32 mm, u *7B-1* to bolo približne 47 mm. Po kultivácii v tme a na červenom svetle sa priemerná dĺžka hypokotylu oboch genotypov výrazne neodlišovala.

Získané výsledky u genotypu *7B-1* sú porovnateľné s výsledkami získanými pri genotype cv. Rutgers. So stúpajúcou koncentráciou exogénnej ABA priemerná dĺžka hypokotylu klesala. Pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA bol hypokotyl skrátaný viac než dvojnásobne pri všetkých svetelných podmienkach (tzn. inhibícia bola vyššia než 50%) (viď Obrázok č. 7).



Obrázok č. 7: Priemerná dĺžka hypocotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *7B-1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypocotylu \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

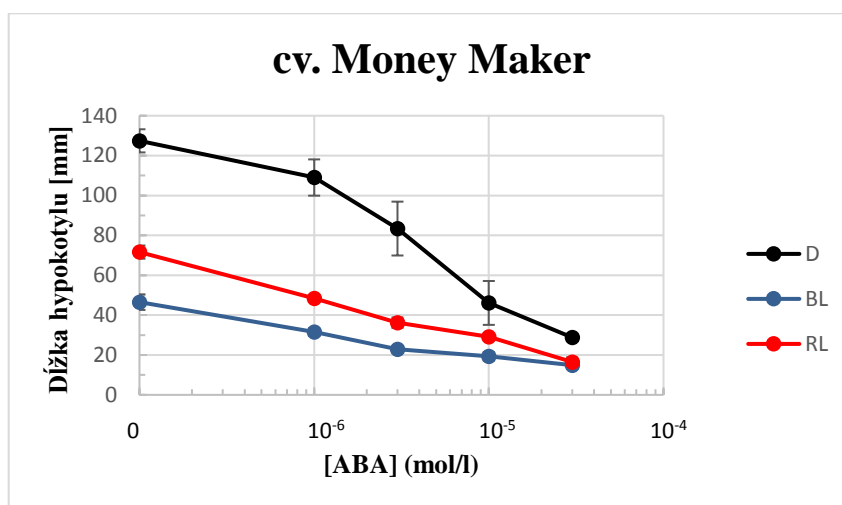
Obrázok č. 8 zobrazuje percentuálnu mieru inhibície dĺžky hypocotylu cv. Rutgers a *7B-1* pri vybranej koncentrácii 3×10^{-6} mol/l exogénnej ABA. U oboch sledovaných genotypov bola pozorovaná zvýšená citlivosť k exogénnej ABA pri pôsobení svetla. Inhibícia rastu hypocotylu bola ako u cv. Rutgers, tak aj u *7B-1* na modrom svetle výrazne silnejšia v porovnaní s inhibíciou v tme. Na červenom svetle bola inhibícia oboch genotypov približne dvojnásobne silnejšia než v tme. Citlivosť hypocotylu k ABA sa medzi cv. Rutgers a *7B-1* takmer nijako nelíšila ani v tme, ani na modrom a červenom svetle.



Obrázok č. 8: Inhibícia rastu hypocotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a *7B-1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypocotylu, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

- mutant *cryI-1*; genetický základ cv. **Money Maker** (WT)

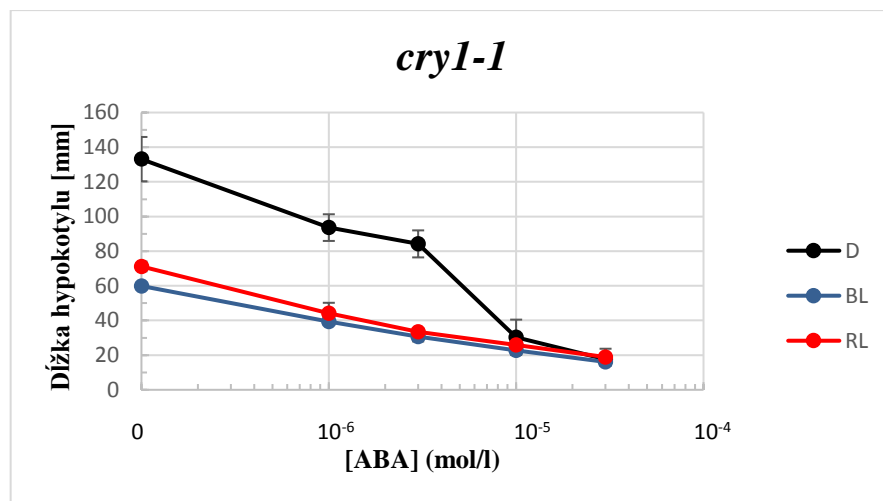
Citlivosť na kyselinu abscisovú sa prejavila aj u rastlín štandardného genotypu cv. MM kultivovaných v tme, na BL a RL. V tme, rovnako ako aj na modrom a červenom svetle, bola dĺžka hypokotylu pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA skrátaná o viac než o polovicu. Inhibícia rastu hypokotylu v tme bola pri spomínanej koncentrácii ABA približne 64 % (hypokotyl skrátaný zo 127 mm na 46 mm). Na modrom a červenom svetle bola inhibícia pri tejto koncentrácii približne 59 %. Najväčší rozdiel v dĺžke hypokotylu, medzi rastlinami rastúcimi v tme, na BL a RL bol pozorovaný predovšetkým pri nižších koncentráciách ABA (10^{-6} a 3×10^{-6} mol/l).



Obrázok č. 9: Priemerná dĺžka hypokotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Money Maker v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypokotylu \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

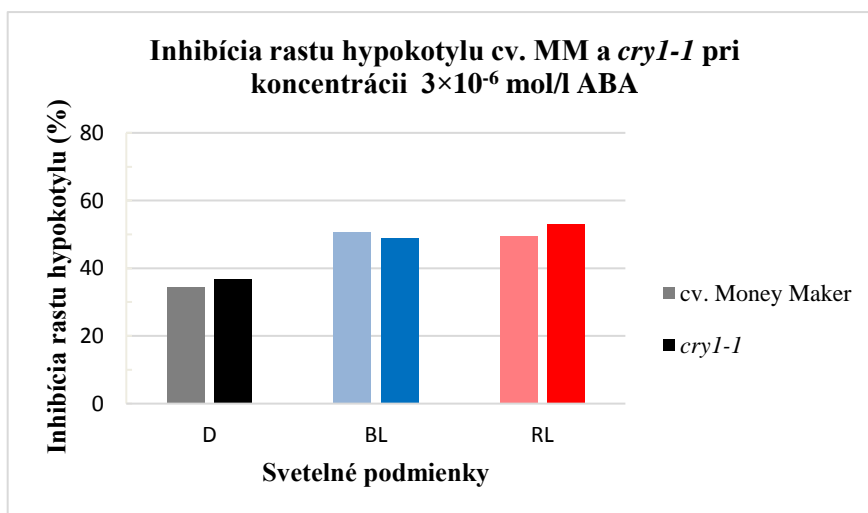
Aj u hypokotylu mutantu *cryI-1* spôsobila postupne zvyšujúca sa koncentrácia exogénnej ABA inhibíciu jeho elongácie.

Zaujímavým pozorovaním bolo, že na modrom svetle bol hypokotyl v porovnaní s cv. Money Maker dlhší. Pri nulovej koncentrácii ABA dosahovala dĺžka hypokotylu u WT približne 46 mm, u *cryI-1* to bolo 60 mm.



Obrázok č. 10: Priemerná dĺžka hypokotyly rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *cry1-1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypokotyly \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

Porovnanie úrovne inhibície rastu hypokotyly cv. MM a *cry1-1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA v závislosti na rôznych svetelných podmienkach zobrazuje Obrázok č. 11. Na svetle bola miera inhibície u oboch genotypov o niečo málo vyššia v porovnaní s mierou inhibície v tme. Neboli však zaznamenané žiadne výrazné rozdiely. Medzi cv. MM a *cry1-1* nebol pozorovaný takmer žiadny rozdiel v inhibícii za rovnakých svetelných podmienok. Napr., na modrom svetle dosahovala inhibícia hypokotyly u cv. Rutgers 51 % a u *cry1-1* 49%.

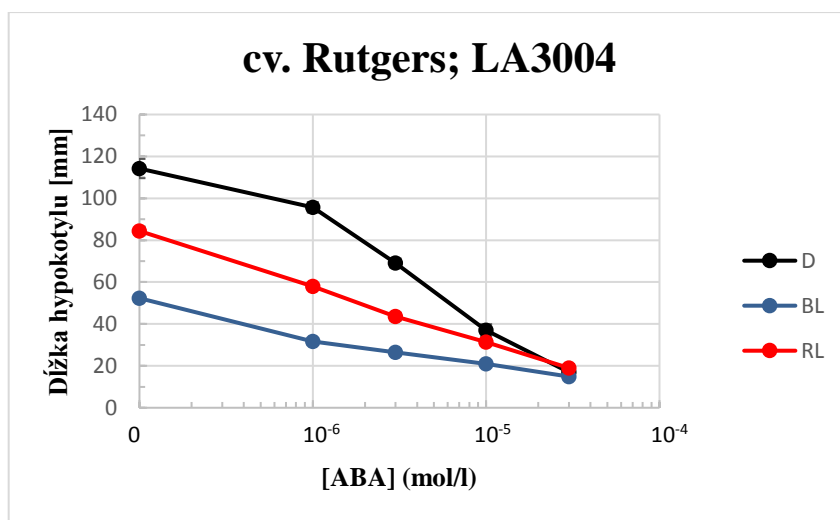


Obrázok č. 11: Inhibícia rastu hypokotyly rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Money Maker (MM) a *cry1-1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypokotyly, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

- mutant *hpl*; genetický základ cv. Rutgers; LA3004 (WT)

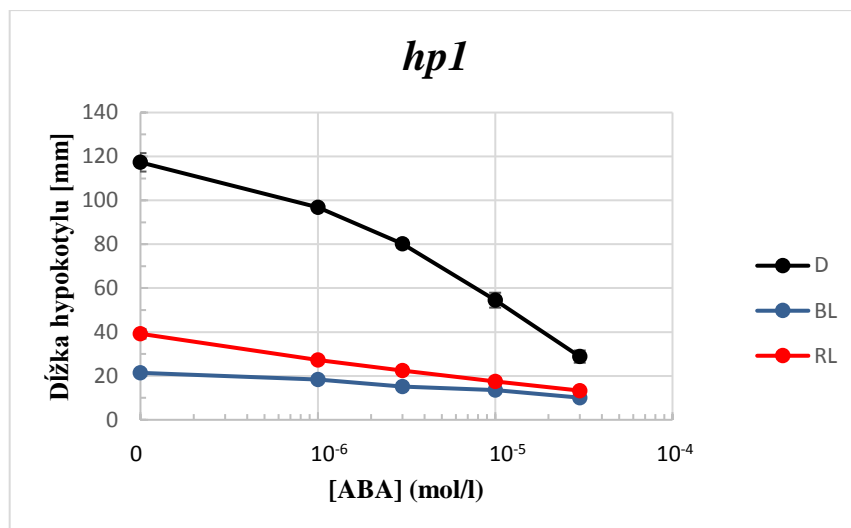
Výsledky v Obrázku č. 12 zobrazujú, že ABA inhibovala rast hypokotyly cv. Rutgers; LA3004 úmerne so zvyšujúcou sa koncentráciou. Napr., pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA bola dĺžka hypokotyly skrátená na 37 mm.

Výrazný rozdiel v inhibícii medzi rastlinami kultivovanými v tme, na modrom a červenom svetle bol pozorovaný iba pri nižších koncentráciách použitej exogénnej ABA, a to konkrétne pri koncentráciách 10^{-6} a 3×10^{-6} mol/l. Pri vyšších koncentráciách nebol rozdiel v inhibícii taký výrazný.



Obrázok č. 12: Priemerná dĺžka hypokotyly rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers; LA3004 v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypokotyly \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

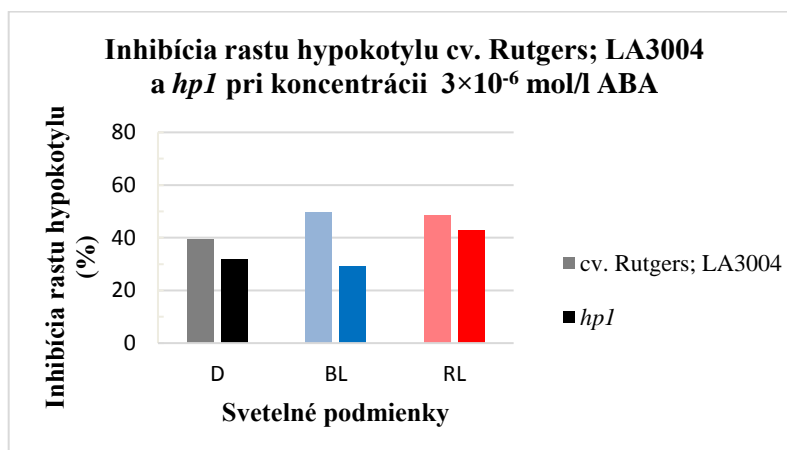
Mutant *hpl* sa vyznačoval tým, že na modrom a červenom svetle vytváral v porovnaní s cv. Rutgers; LA3004 veľmi krátky hypokotyl, pričom dĺžka hypokotyly *hpl* v tme bola porovnateľná s dĺžkou hypokotyly u cv. Rutgers; LA3004. I u mutantu *hpl* ABA inhibovala rast hypokotyly. S rastúcou koncentráciou exogénnej ABA sa dĺžka hypokotylov zmenšovala výrazne u rastlín kultivovaných v tme a na červenom svetle. Pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA bola dĺžka hypokotyly u etiolizovaných rastlín a rastlín pestovaných na červenom svetle skrátená o niečo viac než o polovicu. Naopak, na modrom svetle dosahovala inhibícia pri spomínanej koncentrácii iba 37 % (hypokotyl zmenšený z 21 mm na 13 mm).



Obrázok č. 13: Priemerná dĺžka hypocotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *hp1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky hypocotylu \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

Z Obrázku č. 14 je opäť viditeľná mierne zvýšená citlivosť hypocotylu cv. Rutgers; LA3004 k exogénnej ABA pri pôsobení svetla. Počas neprítomnosti svetla bola inhibícia 40 %, zatiaľ čo pri pôsobení vysokoenergetického modrého svetla inhibícia stúpala na 50 %.

Inhibícia rastu hypocotylu u genotypu *hp1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA sa od štandardného genotypu líšila v závislosti od svetelných podmienok. Na rozdiel od cv. Rutgers; LA3004 bol genotyp *hp1* menej citlivý k exogénnej ABA, a to predovšetkým na modrom svetle. Na modrom svetle dosahovala inhibícia u *hp1* 29 %, zatiaľ čo u cv. Rutgers; LA3004 až 50 %. Na červenom svetle nebol rozdiel v inhibícii medzi oba genotypmi výrazný.



Obrázok č. 14: Inhibícia rastu hypocotylu rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers; LA3004 a *hp1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu hypocotylu, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

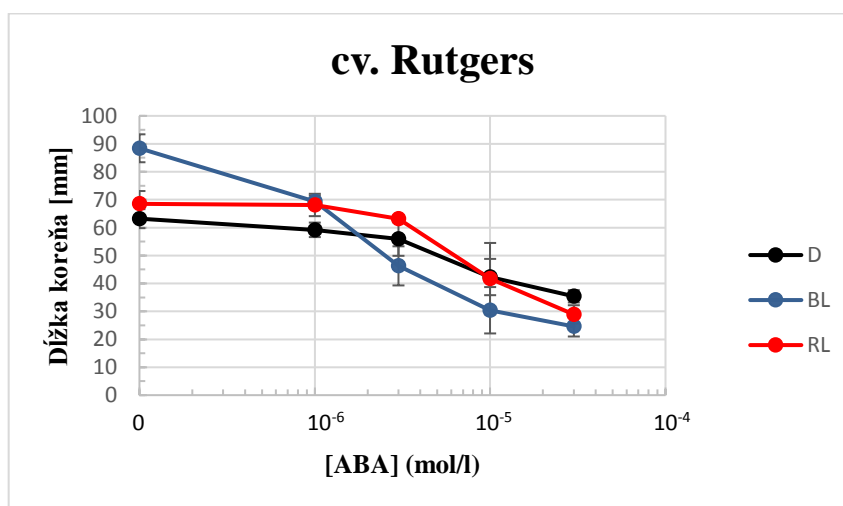
5.2.2 Rastové reakcie koreňa

Pri vyhodnocovaní výsledkov, získaných z troch nezávislých experimentov boli sledované dva deje, a to: vplyv mutácie vybraných genotypov (*7B-1*, *cry1-1* a *hpl*) na citlivosť koreňa k exogénne aplikovanej ABA a zároveň vplyv svetla s rôznymi vlnovými dĺžkami na túto citlivosť. V nasledujúcej časti sú podobne ako v predchádzajúcej podkapitole (viď Rastové reakcie hypokotylu) uvedené dva typy grafov zhrňujúce získané výsledky. Prvý typ grafov zobrazuje závislosť priemernej dĺžky koreňa vybraných genotypov na koncentrácii ABA pod vplyvom rôznych svetelných podmienok (BL, RL a D). Druhý typ grafov (stĺpcový graf) zobrazuje inhibíciu rastu koreňa vybraných genotypov pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l exogénnej ABA.

- mutant *7B-1*; genetický základ cv. **Rutgers** (WT)

U koreňov rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers nebola pozorovaná inhibícia elongácie po pôsobení svetla. Naopak, svetlo stimulovalo predlžovanie koreňa. Pri nulovej koncentrácii ABA dosahovala dĺžka koreňa WT kultivovaných na modrom svetle 88 mm a na červenom svetle 69 mm. V tme bol koreň dlhý iba 63 mm (viď Obrázok č. 15).

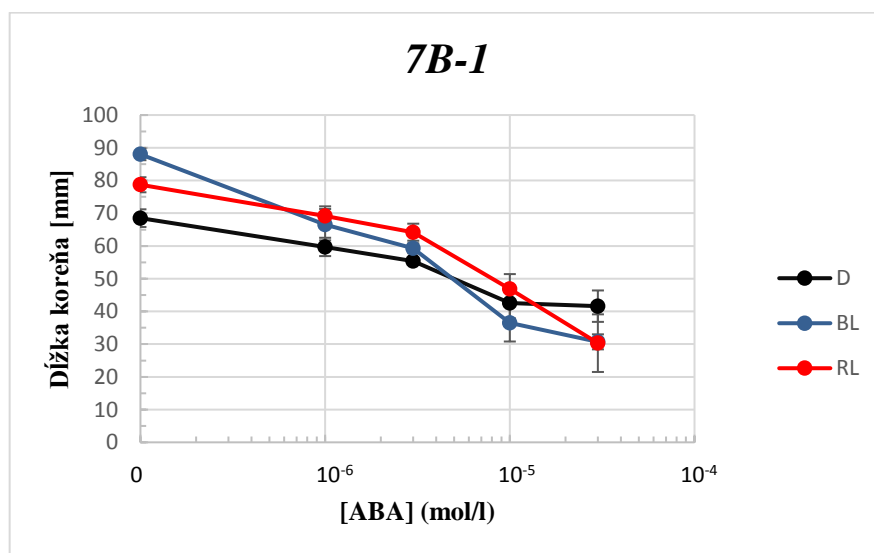
U rastlín štandardného genotypu cv. Rutgers bola pozorovaná inhibícia rastu koreňa s rastúcou koncentráciou exogénnej ABA. Dĺžka koreňa sa znižovala výrazne u rastlín kultivovaných na modrom svetle. Napr., pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA bola dĺžka koreňa u rastlín pestovaných na modrom svetle skrátená o viac než polovicu (t.j. z 88 mm sa dĺžka koreňa zmenšila na 30 mm). Naopak, u etiolizovaných rastlín a rastlín kultivovaných na červenom svetle dosahovala inhibícia pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA iba 33 – 39 %.



Obrázok č. 15: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

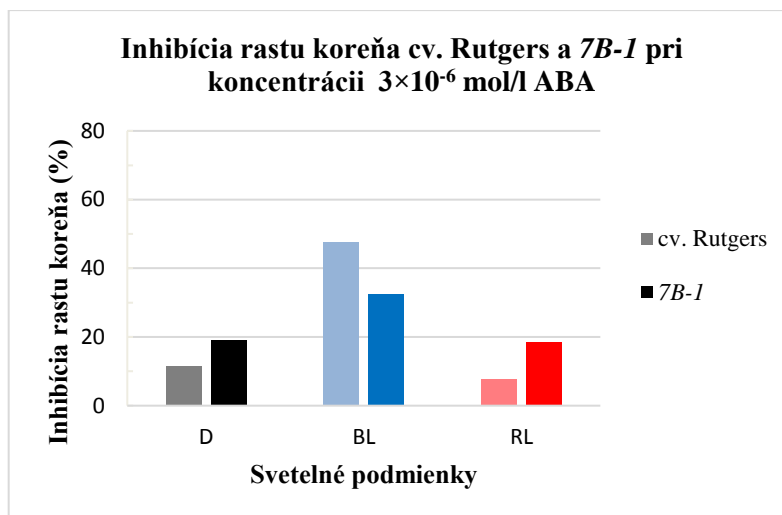
Svetlo stimulovalo rast koreňa u rastlín *7B-1* podobne ako u cv. Rutgers. V tme dosahovala dĺžka koreňa pri nulovej koncentrácii ABA takmer 69 mm. Na modrom svetle bola dĺžka koreňa 88 mm a na červenom svetle 79 mm (vid' Obrázok č. 16).

Vplyv exogénnej ABA na rast koreňa sa u genotypu *7B-1* oproti genotypu cv. Rutgers nijako výrazne neodlišoval. Rast koreňa bol inhibovaný úmerne s rastúcou koncentráciou ABA. U rastlín, ktoré rástli sedem dní na červenom svetle a v tme, sa inhibícia takmer nijako neodlišovala. Výraznejší rozdiel bol pozorovaný iba pri najvyššej koncentrácii ABA (3×10^{-5} mol/l). V tme dosahovala inhibícia pri koncentrácii 3×10^{-5} mol/l ABA 39 %, teda dĺžka koreňa bola oproti dĺžke koreňa pri nulovej koncentrácii zmenšená menej než o polovicu. Na červenom svetle bola dĺžka koreňa pri rovnakej koncentrácii zmenšená zo 79 mm na 30 mm (inhibícia takmer 62 %). Najvýraznejší inhibičný vplyv ABA na rast koreňa *7B-1* bol pozorovaný na modrom svetle (vid' Obrázok č. 16).



Obrázok č. 16: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *7B-1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

Najväčší rozdiel v sile inhibície rastu koreňa medzi genotypmi cv. Rutgers a *7B-1* bol pozorovaný u rastlín kultivovaných na modrom svetle. Pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l exogénnej ABA bola inhibícia v porovnaní s inhibíciou na červenom svetle a v tme takmer dvojnásobne zvýšená, čo je viditeľné aj na Obrázku č. 17. Medzi cv. Rutgers a *7B-1* neboli zaznamenané žiadne výrazné rozdiely v citlivosti k ABA ani v tme, ani na modrom a červenom svetle.

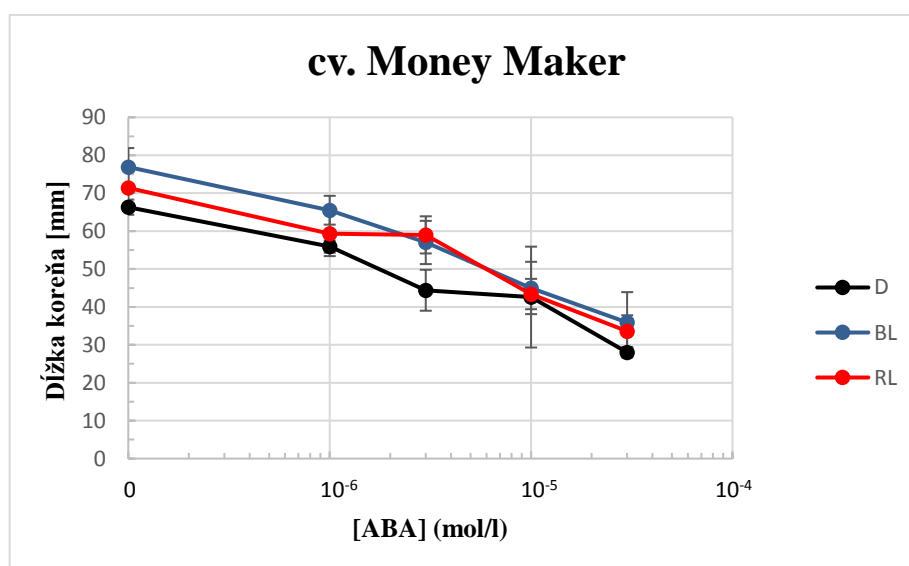


Obrázok č. 17: Inhibícia rastu koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu koreňa, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

- mutant *cryI-1*; genetický základ cv. **Money Maker** (WT)

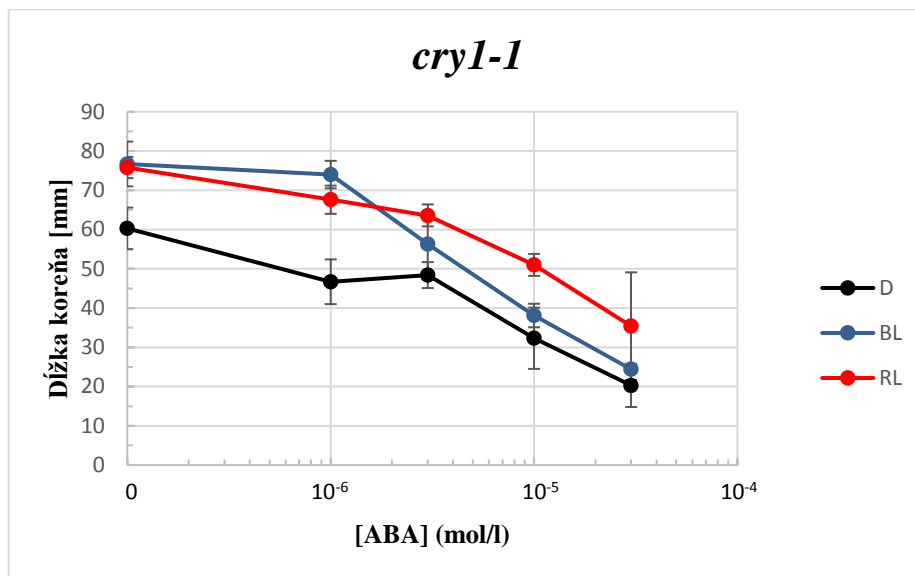
U genotypov cv. Money Maker a *cryI-1* stimulovalo svetlo rast koreňa podobne ako u všetkých vyššie spomínaných mutantov a ich kultivarov.

Exogénna ABA opäť inhibovala elongáciu koreňa genotypu cv. MM. So stúpajúcou koncentráciou ABA dĺžka koreňa úmerne klesala. Svetlo výrazne nezvyšovalo citlivosť koreňa k ABA. Napr., v tme pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA klesla dĺžka koreňa zo 66 mm na 43 mm (t.j. o 36 %), na modrom svetle zo 77 mm na 45 mm (t.j. o 42 %) a na červenom svetle zo 71 mm na 43 mm (t.j. o 39 %) (viď Obrázok č. 18).



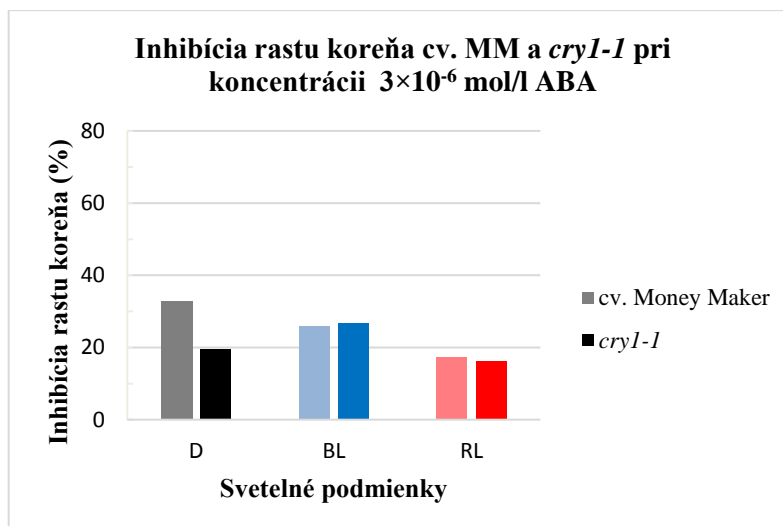
Obrázok č. 18: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Money Maker v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

U rastlín *cry1-1* bola zaznamenaná výraznejšia inhibícia rastu koreňa pri vyšších koncentráciách exogénnej ABA (10^{-5} a 3×10^{-5} mol/l). Citlivosť koreňa k ABA bola výrazná predovšetkým u rastlín kultivovaných v tme a na modrom svetle. Napríklad, pri koncentrácii 10^{-5} mol/l ABA bola dĺžka koreňa rastlín rastúcich v tme a na modrom svetle zmenšená približne o polovicu. Na červenom svetle dosahovala inhibícia pri rovnakej koncentrácii iba 33 % (viď Obrázok č. 19).



Obrázok č. 19: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *cry1-1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

Z Obrázku č. 20 je viditeľné, že svetlo výrazne neovplyvňovalo citlivosť koreňa k exogénnej ABA ani u cv. MM, ani u *cry1-1*. Inhibícia rastu koreňa pri oboch genotypoch bola pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA takmer rovnaká vo všetkých prípadoch. Medzi genotypom cv. MM a *cry1-1* nebol zaznamenaný žiaden rozdiel v citlivosti k exogénnej ABA za žiadnych svetelných podmienok (D, BL a RL).

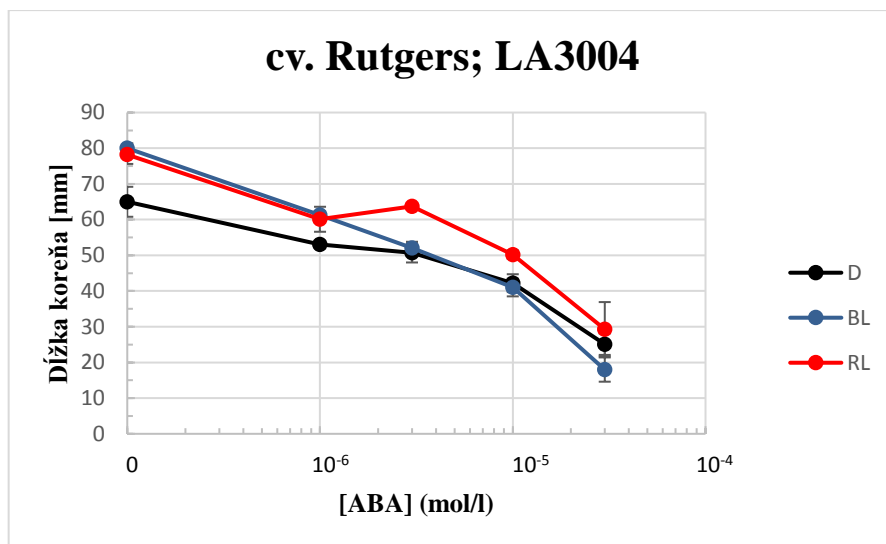


Obrázok č. 20: Inhibícia rastu koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Money Maker (MM) a *cryI-1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu koreňa, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

- mutant *hp1*; genetický základ cv. Rutgers; LA3004 (WT)

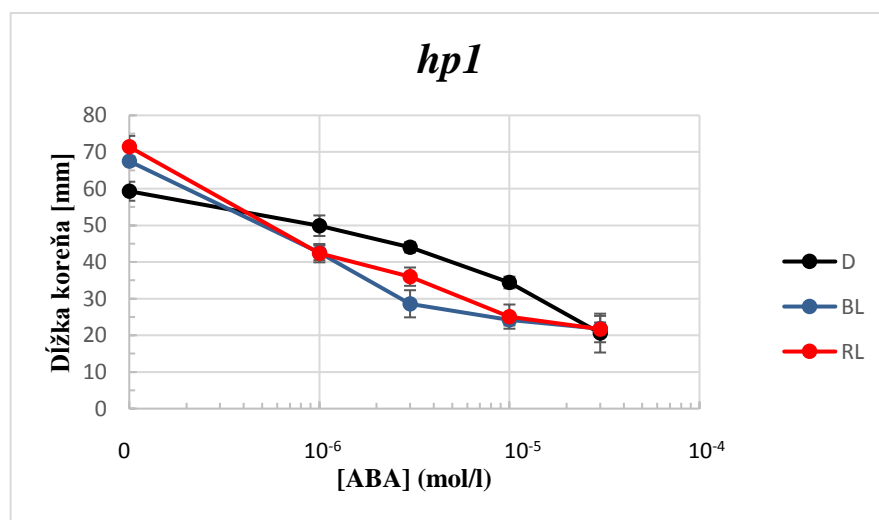
U genotypov cv. Rutgers; LA3004 a *hp1* bola pozorovaná rovnaká fyziologická reakcia koreňa na svetlo, než v predchádzajúcich prípadoch. Po pôsobení svetla dochádzalo u rastlín k stimulácii elongácie koreňa (viď Obrázok č. 21).

Na Obrázku č. 21 je ďalej znázornený vplyv koncentrácie exogénne aplikovanej ABA na rast koreňa u cv. Rutgers; LA3004 pri pôsobení svetla o rôznej vlnovej dĺžke alebo tmy. Z grafu je viditeľné, že ABA pôsobila na rast koreňa opäť inhibične. S rastúcou koncentráciou ABA sa jej inhibičný účinok úmerne zvyšoval. Pri koncentrácií 10^{-6} mol/l ABA nebol pozorovaný výrazný rozdiel v miere inhibície medzi rastlinami kultivovanými v tme, na modrom a červenom svetle. Naopak, pri koncentráciách 3×10^{-6} , 10^{-5} a 3×10^{-5} mol/l ABA bol už medzi rastlinami pestovanými v tme, na modrom a červenom svetle zaznamenaný výraznejší rozdiel v inhibícií rastu koreňa. Rozdiel bol pozorovaný hlavne u rastlín rastúcich na modrom svetle, ktoré zvyšovalo citlivosť koreňa k vyšším koncentráciám ABA. Inhibícia sa medzi etiolizovanými rastlinami a rastlinami kultivovanými na červenom svetle takmer nelíšila.



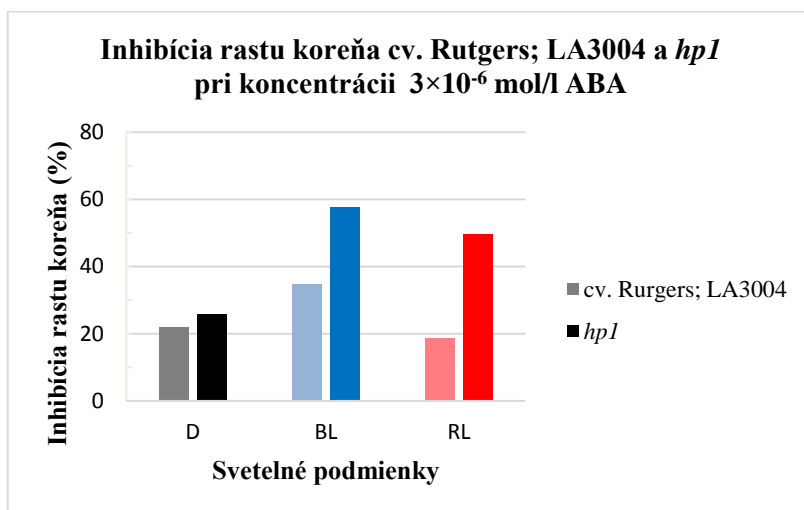
Obrázok č. 21: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers; LA3004 v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

V prípade genotypu *hp1* sa rastové reakcie koreňa ku koncentrácii ABA v závislosti na rôznych svetelných podmienkach líšili od rastových reakcií pozorovaných u štandardného genotypu cv. Rutgers; LA3004. U *hp1* zvyšovalo citlivosť koreňa k ABA nielen modré svetlo, ale aj červené svetlo. Napr., pri koncentrácii 10⁻⁵ mol/l ABA bola dĺžka koreňa na svetle zmenšená o viac než polovicu (približne o 64-65 %), zatiaľ čo v tme to bolo o niečo menej než o polovicu (približne o 42 %) (viď Obrázok č. 22).



Obrázok č. 22: Priemerná dĺžka koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. mutanta *hp1* v závislosti na rastúcej koncentrácii exogénnej ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty dĺžky koreňa \pm SE získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

Z Obrázku č. 23 je viditeľné, že pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA bola inhibícia koreňa u *hp1* na svetle (BL i RL) výrazne silnejšia v porovnaní s inhibíciou v tme. Napr., na modrom svetle dosahovala inhibícia 58 %, zatiaľ čo v tme iba 26 %. U cv. Rutgers; LA3004 svetlo nezvyšovalo významne citlivosť koreňa k exogénne aplikovanej ABA. Pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l bola inhibícia v tme približne 22 %, na modrom svetle 35 % a červenom svetle 19 %.



Obrázok č. 23: Inhibícia rastu koreňa rastlín *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers; LA3004 a *hp1* pri koncentrácii 3×10^{-6} mol/l ABA. Rastliny pestované 7 dní v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Výsledky zobrazujú priemerné hodnoty inhibície rastu koreňa, získané z troch nezávislých experimentov. Priemerný počet rastlín zahrnutých do experimentu = 5 až 10.

6 Diskusia

Všeobecne je známe, že ABA patrí medzi rastlinné fytohormóny s inhibičnými účinkami (Hansen and Grossmann, 2000; Davies, 2010; Rai *et al.*, 2011). Tento záver je založený na fakte, že ABA sa akumuluje vo vysokých koncentráciách v stresovaných rastlinách, pričom vysoká hladina ABA koreluje s inhibíciou rastu (Zhang and Davies, 1990) a taktiež, že exogénna ABA aplikovaná v μM koncentráciách inhibuje rast stonky (Hayashi *et al.*, 2014).

Na druhej strane, ABA-deficientné mutanty sú kratšie než kontrolné rastliny a ich rast je obnovený aplikáciou exogénnej ABA (Quarrie, 1987; Sharp *et al.*, 2000; LeNoble *et al.*, 2004; Barrero *et al.*, 2005), čo podporujú práce poukazujúce na to, že veľmi nízke koncentrácie ABA stimulovali predlžovanie mezokotylov ryže (Takahashi, 1972). Tieto fakty naznačujú, že ABA môže za určitých podmienok rast stimulovať. V zhode s tým Humplík *et al.* (2015a) ukázali, že nízke koncentrácie ABA stimulujú rast etiolizovaných hypokotylov rajčiaku. Ich výsledky taktiež naznačujú, že fotomorfogenéza hypokotylu rajčiaka indukovaná modrým svetlom je čiastočne spôsobená znižovaním endogénnej hladiny ABA. Aj napriek tomu, že fakty ukazujú, že ABA je zapojená v regulácii skotomorfogenézy a fotomorfogenézy, špecifická úloha ABA v týchto fyziologických procesoch nie je intenzívne študovaná.

Cieľom experimentálnej časti bakalárskej práce bolo zistiť, či, ako, a prostredníctvom ktorých fotoreceptorov, svetlo, predovšetkým modré, ovplyvňuje rastové reakcie hypokotylu a koreňa rastlín rajčiaka k rastovému hormónu kyseliny abscisovej (ABA). V experimentálnej časti bakalárskej práce boli teda sledované rastové reakcie hypokotylu a koreňa fotomorfogenných mutantov rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) *7B-1*, *cry1-1* a *hpl* k vybraným koncentráciám ABA v závislosti na rôznych svetelných podmienkach (tma, modré a červené svetlo). Ako kontrolné rastliny boli použité kultivary cv. Rutgers, cv. Money Maker a cv. Rutgers; LA3004, od ktorých boli vybrané mutanty odvodené.

Vykonanými experimentami v podmienkach *in vitro* sme ukázali, že ABA inhibovala rast hypokotylu i koreňa u všetkých testovaných genotypov v závislosti na zvyšujúcej sa koncentrácii, pričom vplyv ABA bol výrazne ovplyvnený testovanými svetelnými podmienkami. U všetkých kultivarov sme zistili, že modré i červené svetlo zvyšovalo reakciu hypokotylu k inhibičnému účinku exogénnej ABA. To mohlo byť

spôsobené napríklad tým, že svetlo zvyšovalo hladinu endogénnej ABA. V bakalárskej práci neboli hladiny ABA v hypokotylloch merané. Literárne zdroje však ukazujú, že červené svetlo znižuje hladinu ABA vo vegetatívnych častiach rastliny prostredníctvom fytohormónov (Weatherwax *et al.*, 1996, 1998; Seo *et al.*, 2006; Sawada *et al.*, 2008). Modré svetlo však môže hladinu endogénnej ABA zvyšovať (Baraldi *et al.*, 1995; Volmaro *et al.*, 1998) alebo znižovať (Humplík *et al.*, 2015a). Informácie o vplyve svetla na hladinu ABA sú inak veľmi obmedzené. Druhá, teoretická možnosť, ktorá pripadá do úvahy, je, že modré svetlo by mohlo zvyšovať citlivosť signálnych dráh ABA, a to buď priamo samotných fotoreceptorov alebo ďalších nasledujúcich elementov signálnej dráhy ABA. Literárne informácie sú však v tomto prípade taktiež veľmi obmedzené. Gupta *et al.* (2014) informujú, že transkripčný factor LeMYC2, ktorý je negatívnym regulátorom fotomorfofenézy, zvyšuje citlivosť rastlín k ABA. Yadav *et al.* (2002, 2005) ukázali, že mutanty *atmyc2* sú menej citlivé k ABA. Inak povedané, výsledky ukazujú, že na svetle sa citlivosť rastlín rajčiaka či *Arabidopsis* k ABA znižuje. Je jasne viditeľné, že tieto výsledky nekorešponujú s naším pozorovaním, kde bolo zaznamenané, že modré i červené svetlo zvyšujú reakcie rastlín k inhibičnému účinku ABA. Na základe toho je zrejmé, že interakcia svetla a ABA v priebehu predlžovacieho rastu rastlín môže predstavovať veľmi zložitý proces.

Prvým testovaným mutantom v experimentálnej časti bakalárskej práce bol mutant *7B-1*. Pôsobením modrého a červeného svetla bola pozorovaná zvýšená odpoveď hypokotylu *7B-1* k exogénnej ABA. Rovnaký trend bol pozorovaný i u štandardného genotypu cv. Rutgers. Citlivosť hypokotylu k exogénnej ABA sa medzi cv. Rutgers a *7B-1* nijako nelíšila ani v tme, ani na modrom a červenom svetle. Z tohto pozorovania je možné usúdiť, že funkčný gén *7B-1* nie je významne zapojený v citlivosti hypokotylu k ABA, a to bez ohľadu na svetelné podmienky. Zaujímavosťou je, že *7B-1* obsahuje určitú hladinu pre-existujúcej endogénnej ABA, čo má za následok zvýšenú citlivosť k exogénnej ABA (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001). V prípade rastových reakcií hypokotylu *7B-1* bolo, pravdepodobne, na základe tohto faktu očakávané, že citlivosť k exogénne aplikovanej ABA bude vyššia v porovnaní s cv. Rutgers. Výsledky však ukázali, že pre rastové reakcie hypokotylu táto skutočnosť neplatí.

Fotomorfofený mutant *cry1-1* s mutáciou vo fotoreceptore CRY1 ukazoval podobnú citlivosť k ABA ako odpovedajúci cv. MM, a to v tme, na modrom i červenom svetle. Je teda evidentné, že funkčný fotoreceptor modrého svetla CRY1 nie je zapojený

v citlivosti hypokotylu k exogénnej ABA. Navyše sa dá urobiť záver, že CRY1 nie je ani tým receptorom, prostredníctvom ktorého by svetlo zvyšovalo citlivosť hypokotylu k ABA.

Posledným testovaným mutantom bol mutant *hp1*. Bolo zistené, že mutácia *hp1* spočíva v zmene A⁹³¹ (asparagín) na T⁹³¹ (tyrozín) v kódujúcej sekvencii génu *DDB1* (Lieberman *et al.*, 2004). Gén *DDB1* (*DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1*) je homológom ľudského génu HsDDB1 (Wang *et al.*, 2006). U rastlín bolo odhalené, že je DDB1 súčasťou proteínového komplexu CDD (COP10, DDB1 a DET1) (Schroeder *et al.*, 2002; Yanagawa *et al.*, 2004), ktorý je spojený s E3 ubiquitín ligázou COP1 a signalozómom COP9 (CSN). U rastlín tento systém zaisťuje degradáciu fotomorfogenných faktorov prostredníctvom procesu nazývaného ubiquitinácia (Osterland *et al.*, 2000; Yanagawa *et al.*, 2004). Tým dochádza k ochrane rastliny pred nadmerným svetelným žiarením. Defekt v géne *DDB1* vedie teda k nadmernej citlivosti na svetlo, ako je zrejmé u mutantu *hp1*. Nedávno bolo publikované, že mutant *hp1* sa vyznačuje i zvýšenou fototropickou reakciou na modré svetlo (Srinivas *et al.*, 2004). Pretože u rajčiaka zatiaľ fototropínový mutant nebol identifikovaný, *hp1* bol vhodným objektom na štúdium toho, či je nepriamy element fototropínovej signalizácie, DDB1, zapojený v regulácii citlivosti hypokotylu k ABA.

Vykonané experimenty potvrdili, že mutant *hp1* je viac citlivý k svetlu, než odpovedajúci kultivar cv. Rutgers; LA3004, pretože hypokotyl *hp1* na modrom i červenom svetle bol omnoho kratší, než hypokotyl kontrolného genotypu (viď Obrázok č. 12 a 13). Na modrom svetle hypokotyl *hp1* ukazoval výrazne nižšiu citlivosť k inhibičnému účinku ABA, než odpovedajúci WT (viď Obrázok č. 14). Tieto výsledky naznačujú, že na modrom svetle funkčný proteín DDB1 zvyšuje reakciu hypokotylu k exogénnej ABA. Navrhuje sa tu možné vysvetlenie. Humplík *et al.* (2015b) ukázali, že modré svetlo znižuje hladinu ABA v hypokotyloch rajčiaka, čo vedie k obmedzenému rastu hypokotylu. Zosilnená reakcia mutantu *hp1* na modré svetlo môže teda viesť k výraznému poklesu endogénnej hladiny ABA, oveľa výraznejšiemu, než u kontrolného genotypu. Pri aplikácii exogénnej ABA sa potom hladina endogénnej ABA u *hp1* zvyšuje na inhibičnú koncentráciu pomalšie, než u cv. Rutgers; LA3004, čo sa u *hp1* prejaví nižšou inhibíciou rastu hypokotylu než u WT.

V súčasnej dobe je veľmi dobre známe, že svetlo má na rast koreňa stimulačné účinky, pričom v prípade hypokotylu je účinok svetla na rast opačný, teda inhibičný.

S využitím testovaných mutantov *7B-1*, *cry1-1*, *hpl* a odpovedajúcich kultivarov cv. Rutgers, cv. MM a cv. Rutgers; LA3004 bolo experimentálne potvrdené, že svetlo v prípade koreňa naozaj rast stimulovalo. U *7B-1* a cv. Rutgers malo na stimuláciu rastu najväčší efekt modré svetlo, pričom u cv. Rutgers bol tento efekt v porovnaní so *7B-1* omnoho výraznejší. Rovnaký trend bol pozorovaný aj u *cry1-1* a cv. MM. Zaujímavým pozorovaním bolo, že za rovnakých rastových podmienok bol cv. Rutgers na svetlo výrazne viac citlivý, než cv. MM. Zo všetkých testovaných kultivarov vykazoval najvyššiu citlivosť na svetlo na úrovni koreňov cv. Rutgers; LA3004, pretože v tomto prípade nielen modré, ale aj červené svetlo stimulovalo elongáciu koreňa. Ako už bolo spomínané, mutant *hpl* je charakteristický svojou nadmerne zvýšenou citlivosťou na svetlo. Je však zaujímavé, že predĺženie koreňa *hpl* na modrom svetle voči koreňu v tme je menšie, než predĺženie koreňa cv. Rutgers; LA3004. To znamená, že na úrovni koreňa mutant *hpl* ukazuje skôr nižšiu citlivosť na modré svetlo, než odpovedajúci WT.

Podobne ako u hypokotyllov, súčasťou bakalárskej práce bolo sledovanie citlivosti koreňa vybraných mutantov a príslušných kultivarov k exogénnej ABA za súčasného pôsobenia rôznych svetelných podmienok (D, BL a RL). Ako už bolo zmienené vo výsledkoch, ABA inhibuje rast koreňa (viď Rastové reakcie koreňa) u všetkých genotypov, či už v tme, na modrom alebo červenom svetle.

V prípade *7B-1* bol zaznamenaný výraznejší vplyv modrého svetla na citlivosť koreňov k exogénnej ABA, zatiaľ čo pri pôsobení červeného svetla bola citlivosť koreňov k tomuto fytohormónu porovnateľná s tmou. Pôsobením modrého svetla bola pozorovaná zvýšená odpoveď k exogénnej ABA nielen u *7B-1*, ale taktiež aj cv. Rutgers. Pri porovnaní reakcií koreňa k exogénnej ABA v závislosti na rozdielnych svetelných podmienkach neboli medzi *7B-1* a cv. Rutgers zaznamenané žiadne rozdiely. Z tohto pozorovania je možno vyvodit' záver, že funkčný produkt génu *7B-1* nie je pravdepodobne zapojený v citlivosti koreňa k exogénnej ABA.

Recesívny mutant *cry1-1* vykazoval v tme, na modrom i na červenom svetle veľmi podobnú citlivosť k ABA, ako odpovedajúci štandardný kultivar cv. MM. Zaujímavé taktiež je, že ani u jedného z týchto genotypov svetlo neovplyvňovalo citlivosť koreňov k exogénnej ABA. Zo získaných výsledkov je možné dedukovať, že receptor CRY1 nijako neovplyvňuje reakciu koreňa k exogénnej ABA.

V prípade posledného testovaného mutantu *hpl* výsledky ukázali, že u *hpl* tak modré svetlo, ako aj červené výrazne zvyšovalo citlivosť koreňa k ABA. U štandardného

kultivaru však táto reakcia pozorovaná nebola. To teda ukazuje, že na úrovni zvyšovania odpovede koreňa k ABA so svetlom sa *hpl* javí viac citlivý na svetlo, než odpovedajúci kontrolný genotyp. S tým korešponduje i fakt, že citlivosť *hpl* k inhibičnému účinku exogénnej ABA bola na modrom a červenom svetle výrazne vyššia než u cv. Rutgers; LA3004. Tento výsledok môže byť v súhlase s výsledkami Xu *et al.* (2009), ktorí ukázali, že korene transgenných rastlín *Arabidopsis* over-exprimujúce fotoreceptor CRY1 alebo CRY2 ukazujú zvýšenú citlivosť k exogénnej ABA. Z výsledkov experimentov s mutantom *hpl* sa dá vyvodiť záver, že funkčný proteín DDB1 v tomto prípade znižuje reakciu koreňa k exogénnej ABA. Možným vysvetlením je, že pôsobením modrého svetla sa v prípade koreňa zvyšuje hladina endogénnej ABA, z čoho vyplýva, že po pridaní exogénnej ABA sa u *hpl* dosiahne inhibičná úroveň oveľa rýchlejšie, než u cv. Rutgers; LA3004. Do dnešnej doby nebol, pravdepodobne, tento fakt experimentálne potvrdený. Výsledky experimentov s koreňmi ukazujú ďalšie perspektívy štúdia vplyvu svetla na rast koreňov v interakcii s rastlinným hormónom kyselinou abscisovou. Táto problematika je relatívne málo študovaná.

7 Záver

Cieľom bakalárskej práce bolo zistiť, či modré svetlo reguluje rast rastlín rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) vplyvom exogénnej ABA a ak áno, tak prostredníctvom ktorých fotoreceptorov môže svetlo ovplyvňovať účinok ABA na rast hypokotylu a koreňa rastlín. Skúmaná bola teda existencia interakcie signálnych dráh kyseliny abscisovej a svetla v raste rastlín rajčiaka.

Pre splnenie daného cieľa bol použitý tzv. genetický prístup, ktorý spočíval v použití fotomorfogenných mutantov rajčiaka jedlého a odpovedajúcich kultivarov, od ktorých boli mutanty odvodené. Konkrétne boli použité mutanty *7B-1*, *cry1-1*, *hp1* a kultivary cv. Rutgers, cv. Money Maker a cv. Rutgers; LA3004. Rastové reakcie hypokotylu a koreňa boli testované v podmienkach *in vitro* pri vybraných koncentráciách exogénnej ABA za súčasného pôsobenia svetla s rôznou vlnovou dĺžkou (BL a RL) a zároveň tmy.

Z vykonaných experimentov bolo potvrdené, že svetlo inhibuje rast hypokotylu a stimuluje rast koreňa rastlín. Zároveň sa podarilo zistiť, že ABA inhibuje elongáciu vegetatívnych orgánov rajčiaka jedlého, pričom svetlo reakcie hypokotylu a koreňov k inhibičnému účinku exogénnej ABA zvyšovalo.

Zo získaných výsledkov experimentálnej časti bakalárskej práce vyplýva, že funkčný gén *7B-1* a fotoreceptor CRY1 nie sú nijako významne zapojené v citlivosti hypokotylu a koreňa k ABA. Zaujímavým výsledkom bolo, že v prípade hypokotylu mutantu *hp1*, bola citlivosť k ABA na modrom svetle nižšia, zatiaľ čo u koreňa *hp1* bola situácia opačná. Z týchto výsledkov vyplýva, že funkčný proteín DDB1 zvyšuje reakciu hypokotylu k exogénnej ABA, pričom v prípade koreňa túto reakciu znižuje. Boli navrhnuté dve hypotézy, ktoré by tento výsledok mohli objektívne vysvetľovať. Prvou hypotézou je, že vplyvom vysokoenergetického modrého svetla sa hladina endogénnej ABA znižuje, čo znamená, že pridaním exogénnej ABA sa inhibičná úroveň u hypokotylu *hp1* dostaví pomalšie než u cv. Rutgers; LA3004. Druhou hypotézou je, že pri pôsobení modrého svetla by mohla hladina endogénnej ABA v koreni stúpať, čo by viedlo k tomu, že inhibičná koncentrácia by bola u *hp1* dosiahnutá rýchlejšie, než u cv. Rutgers; LA3004. Tieto hypotézy ponúkajú nové perspektívy štúdia mechanizmov interakcie svetla a ABA v raste a vývoji rastlín.

8 Literatúra

Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF; 1968. Abscisic acid: a new name for abscisin II (dormin). *Science*. 159: 1493

Azari R, Reuveni M, Evenor D, Nahon S, Shlomo H, Chen L, Levin I; 2010. Overexpression of UV-DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1 links plant development and phytonutrient accumulation in *high pigment-1* tomato. *Journal of Experimental Botany*. 61: 3627-3637

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

Baraldi R, Bertezza G, Bogino J, Luna V, Bottini R; 1995. The effect of light on *Prunus cerasus*. II. Changes in hormone levels in plants grown under different light conditions. *Photochemistry and Photobiology*. 62: 800-803

Barrero JM, Piqueras P, González-Guzmán M, Serrano R, Rodríguez PL, et al.; 2005. A mutational analysis of the ABA1 gene of *Arabidopsis thaliana* highlights the involvement of ABA in vegetative development. *Journal of Experimental Botany*. 56: 2071-2083

Benková E, Hejátko J; 2009. Hormone interactions at the root apical meristem. *Plant Molecular Biology*. 69: 383.

Bergougnoux V; 2014. The history of tomato: From domestication to biopharming. *Biotechnology Advances*. 32: 170-189

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

Bergougnoux V, Zalabák D, Jandová M, Novák O, Wiese-Klinkenberg A, Fellner M; 2012. Effect of blue light on endogenous isopentenyladenine and endoreduplication during photomorphogenesis and de-etiolation of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seedlings. *PLoS One*. 7, e45255. doi: 10.1371/journal.pone.0045255

Bino RJ, Ric de Vos CH, Lieberman M, Hall RD, Bovy A, Jonker HH, Tikunov Y, Lommen A, Moco S, Levin I; 2005. The light-hyperresponsive *high pigment-2^{ds}* mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytologist*. 166 : 427-438

Briggs WR, Huala E; 1999. Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. 15: 33-62

Brocard IM, Lynch TJ, Finkelstein RR; 2002. Regulation and role of the *Arabidopsis abscisic acid-insensitive 5* gene in abscisic acid, sugar, and stress response. *Plant Physiology*. 129: 1533-1543

Brzeska P; 2006. Růst rostlin a faktory růstu. *Trifid* 1999/3, 4

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL; 2015. *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd ed., Wiley-Blackwell

Carvalho RF, Campos ML, Pino LE, Crestana SL, Zsögön A, Lima JE, Benedito VA, Peres L; 2011b. Convergence of developmental mutants into a single tomato model system: 'Micro-Tom' as an effective toolkit for plant development research. *Plant Methods*. 7: 18

- Carvalho RF, Takaki M, Azevedo RA;** 2011a. Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum*. 33: 241-248
- Clark SE;** 1997. Organ formation at the vegetative shoot meristem. *The Plant Cell*. 9: 1067-1076
- Cutler AJ, Krochko JE;** 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*. 4: 472-478
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR;** 2010. Abscisic acid: Emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*. 61: 651-679
- Davies PJ;** 2010. The plant hormones: their nature, occurrence, and functions. In: Davies PJ, editor. *Plant hormones: biosynthesis, signal transduction, action!* Dordrecht, The Netherlands: Springer. 9–11 p
- de Wit M, Gálvao VC, Fankhauser C;** 2016. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology*. 67: 513-537
- Facella P, Daddiego L, Giuliano G, Perrotta G;** 2012. Gibberellin and auxin influence the diurnal transcription pattern of photoreceptor genes via CRY1a in tomato. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pone.0030121
- Fankhauser C, Christie JM;** 2015. Plant phototropic growth. *Current Biology*. 25: 384-389
- Fellner M, Franklin JA, Reid DM, Sawhney VK;** 2005. Increased sensitivity to, and reduced production of, ethylene in a ABA-overproducing tomato mutant. *Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica*. 47: 205-212
- Fellner M, Sawhney VK;** 2001. Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics*. 102: 215-2217
- Fellner M, Sawhney VK;** 2002. The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*. 214: 675-682
- Fellner M, Zhang R, Pharis RP, Sawhney VK;** 2001. Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*. 52: 725-738
- Gálvao VC, Fankhauser C;** 2015. Sensing the light environment in plants: photoreceptors and early signaling steps. *Current Opinion in Neurobiology*. 34: 46-53
- Gupta N, Prasad VBR, Chattopadhyay S;** 2014. LeMYC2 acts as a negative regulator of blue light mediated photomorphogenic growth, and promotes the growth of adult tomato plants. *BMC Plant Biology*. 14: 38
- Han SY, Kitahata N, Sekimata K, Saito T, Masatomo K, Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K, Yoshida S, Asami T;** 2004. A novel inhibitor of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in abscisic acid biosynthesis in higher plants. *Plant Physiology*. 135: 1574-1582
- Hansen H, Grossmann K;** 2000. Auxin-induced ethylene triggers abscisic acid biosynthesis and growth inhibition. *Plant Physiology*. 124: 1437–1448
- Hayashi Y, Takahashi K, Inoue S-I, Kinoshita T;** 2014. Abscisic acid suppresses hypocotyl elongation by dephosphorylating plasma membrane H(+)-ATPase in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiology*. 55: 845–853

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

Humplík JF, Bergougnoux V, Jandová M, Šimura J, Pěňčík A, Tomanec O, Rolčík J, Novák O, Fellner M; 2015a. Endogenous abscisic acid promotes hypocotyl growth and affects endoreduplication during dark-induced growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS One*. 10, e0117793. doi: 10.1371/journal.pone.0117793

Humplík J, Turečková V, Fellner M, Bergougnoux V; 2015b. Spatio-temporal in endogenous abscisic acid contents during etiolated growth and photomorphogenesis in tomato seedling. *Plant Signaling & Behavior* 10:8, e1039213

Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong SW, Zhang H, Deng XW, Xiong L; 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *PNAS*. 105: 4495-4500

Christie JM; 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev. Plant Biol.* 58: 21-45

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

Christie JM, Swartz TE, Bogomolni RA, Briggs WR; 2002. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal*. 32: 205-219.

Ježilová E, Fellner M, Bergougnoux V, Špundová M; 2012. Is the rate of photosynthesis under blue light altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica*. 50: 477-480

Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S; 2013. *The Molecular Life of Plants*. Wiley-Blackwell

Kagawa T; 2002. The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. *Journal of Plant Research*. 116: 75-80

Kendrick RE, Kerckhoffs LHJ, Tuinen AV, Koornneef M; 1997. Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant, Cell and Environment*. 20: 746-751

Kim H, Hwang H, Hong JW, Lee YN, Ahn IP, Yoon IS, Yoo SD, Lee S, Lee SC, Kim BG; 2012. A rice orthologue of the ABA receptor, OsPYL/RCAR5, is a positive regulator of the ABA signal transduction pathway in seed germination and early seedling growth. *Journal of Experimental Botany*. 63: 1013-1024

Klingler JP, Batelli G, Zhu JK; 2010. ABA receptors: the START of a new paradigm in phytohormone signalling. *The Journal of Experimental Botany*. 61: 3199-3210

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

Krzywińska E, Kulik A, Bucholc M, Fernandez MA, Rodriguez PL, Dobrowolska G; 2016. Protein phosphatase type 2C PP2CA together with ABI1 inhibits SnRK2.4 activity and regulates plant responses to salinity. *Plant Signaling & Behavior*. 11

LeNoble ME, Spollen WG, Sharp RE; 2004. Maintenance of shoot growth by endogenous ABA: genetic assessment of the involvement of ethylene suppression. *Journal of Experimental Botany*. 55: 237-245

- Lieberman M, Segev O, Gilboa N, Lalazar A, Levin I;** 2004. The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics*. 108: 1574-1581
- Lin C;** 2002. Blue light receptors and signal transduction. *Plant Cell*. 14: 207-225
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C;** 2011. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*. 16 : 684-691
- Liu H, Xu YH, Jiang SC, Lu K, Lu YF, Feng XJ, Wu Z, Liang S, Yu YT, Wang XF, Zhang DP;** 2013. Light-harvesting chlorophyll *a/b*-binding proteins, positively involved in abscisic acid signalling, require a transcription repressor WRKY40, to balance their function. *Journal of Experimental Botany*. 64: 5443-5456
- Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Schinozaki K, Tanokura M;** 2013. Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*. 18: 259-266
- Murashige T, Skoog F;** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473-497
- Murphy D;** 2011. *Plants, Biotechnology and Agriculture*. University of Glamorgan, UK: CAB International.
- Müller GB;** 2007. Evo-devo: extending the evolutionary synthesis. *Nature Reviews Genetics*. 8: 943-949
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J;** 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes & Development*. 14: 257-271
- Ninu L, Ahmad M, Miarelli C, Cashmore AR, Giuliano G;** 1999. Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *The Plant Journal*. 18 (5): 551-556
- Nováček F;** 2009. *Fytochemické základy botaniky*. Fontána, Olomouc. 284 s.
- Okubara PA, Williams SA, Doxsee RA, Tobin EM;** 1993. Analysis of genes negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* and identification of a promoter region required for phytochrome responsiveness. *Plant Physiology*. 101: 915-924
- Omidvar V, Mohorianu I, Dalmay T, Zheng Y, Fei Z, Pucci A, Mazzucato A, Večeřová V, Sedlářová M, Fellner M;** 2017. Transcriptional regulation of male-sterility in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *PLoS One*. doi:10.1371/journal.pone.0170715
- Osterland MT, Hardtke CS, Wei N, Deng XW;** 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*. 405, 462–466
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR;** 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*. 324: 1068-1071
- Pavlová L;** 2006. *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha.
- Perilli S, Mambro RD, Sabatini S;** 2012. Growth and development of the root apical meristem. *Current Opinion in Plant Biology*. 15: 17-23

- Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M;** 2012. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany*. 110: 767-776
- Potts WC, Reid JB, Murfet IC;** 1985. Internode in *Pisum*. Gibberellins and the slender phenotype. *Physiologia Plantarum*. 63: 357-364
- Procházka S, Macháčková I, Krekule J, Šebánek J a kolektiv;** 1998. *Fyziologie rostlin*. Academia, Praha. 484 s.
- Quarrie SA;** 1987. Use of genotypes differing in endogenous abscisic acid levels in studies of physiology and development. In: Hoad GV, Lenton J R, Jackson MB, Atkin RK, editors. *Hormone action in plant development—a critical appraisal*. London: Butterworths. pp. 89–105
- Rai MK, Shekhawat NS, Gupta AK, Phulwaria M, Ram K, et al.;** 2011. The role of abscisic acid in plant tissue culture: a review of recent progress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 106: 179–190
- Sakamoto K, Briggs WR;** 2002. Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *The Plant Cell*. 14: 1723-1735
- Sawada Y, Aoki M, Nakaminami K, Mitsunashi W, Tatematsu K, Kushihiro T, Koshihara T, Kamiya Y, Inoue Y, Nambara E, Toyomasu T;** 2008. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*. 146: 1386-1396
- Sawhney VK;** 1997. Genetic male sterility. In: Shivanna KR, Sawhney VK (eds) *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 183-198
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshihara T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E;** 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*. 48: 354-366
- Sharp RE, LeNoble ME, Else MA, Thorne ET, Gherardi F;** 2000. Endogenous ABA maintains shoot growth in tomato independently of effects on plant water balance: evidence for an interaction with ethylene. *Journal of Experimental Botany*. 51: 1575–1584
- Sheoran IS, Datla R, Dumonceaux T, Sawhney VK;** 2006. Anthocyanin accumulation in the hypocotyl of an ABA-overproducing male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum*) mutant. *Physiologia Plantarum*. 127: 681-689
- Shi S, Wang G, Wang Y, Zhang L, Zhang L;** 2005. Protective effect of nitric oxide against oxidative stress under ultraviolet-B-radiation. *Nitric Oxide*. 13: 1-9
- Schroeder DF, Gahrtz M, Maxwell BB, Cook RK, Kan JM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J;** 2002. Deetiolated1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Current Biology*. 12:1462–1472
- Srinivas A, Behera RK, Kagawa T, Wada M, Sharma R;** 2004. *High Pigment1* Mutation Negatively Regulates Phototropic Signal Transduction in Tomato Seedlings. *Plant Physiology*. 134: 790-800
- Sullivan JA, Deng XW;** 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology*. 260: 289-297

- Quail, PH;** 1997. An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell & Environment*. 20: 657-665
- Quail, PH;** 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology*. 14: 180-188
- Taiz L, Zeiger E;** 2010. *Plant Physiology*, 5th ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Taiz L, Zeiger E, Møller IM, Murphy A;** 2015. *Plant Physiology and Development*, 6th ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Takahashi K;** 1972. Abscisic acid as a stimulator for rice mesocotyl growth. *Nature New Biology*. 238: 92-93
- Volmaro C, Pontín M, Luna V, Baraldi R, Bottini R;** 1998. Blue light control of hypocotyl elongation in etiolated seedlings of *Lactuca Sativa* (L.) cv. Grand Rapids related to exogenous growth regulators and endogenous IAA, GA3 and abscisic acid. *Plant Growth Regulation*. 26: 165-173
- Wang H, Zhai L, Xu J, Joo HY, Jackson S, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Xiong Y, Zhang Y;** 2006. Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular Cell*. 22: 383-394
- Waters MT, Langdale JA;** 2009. The making of a chloroplast. *The EMBO Journal*. 28: 2861-2873
- Weatherwax SC, Ong MS, Degenhardt J, Bray EA, Tobin EM;** 1996. The interaction of light and abscisic acid in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology*. 111: 363-370
- Weatherwax SC, Williams SA, Tingay S, Tobin EM;** 1998. The phytochrome response of the *Lemna gibba* NPR1 gene is mediated primarily through changes in abscisic acid levels. *Plant Physiology*. 116:1299–1305
- Weller JL, Perrotta G, Schreuder ME, van Tuinen A, Koornneef M, Giuliano G, Kendrick RE;** 2001. Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *The Plant Journal*. 25: 427-440
- Williams SA, Weatherwax SC, Bray EA, Tobin EM;** 1994. NPR genes, which are negatively regulated by phytochrome action in *Lemna gibba* L. G-3, can also be positively regulated by abscisic acid. *Plant Physiology*. 105: 949-954
- Xiong L, Zhu JK;** 2003. Regulation of abscisic acid biosynthesis. *Plant Physiology*. 133: 29-36
- Xu D, Li J, Gangappa SN, Hettiarachchi C, Lin F, Andersson MX, Jiang Y, Deng XW, Holm M;** 2014. Convergence of light and ABA signaling on the *ABI5* promoter. *PLoS One*. doi: 10.1371/journal.pgen.1004197
- Xu P, Xiang Y, Zju H, Xu H, Zhang Z, Zhang C, Zhang L, Ma Z;** 2009. Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses. *Plant Physiology*. 149: 760-774
- Yadav V, Kundu S, Chattopadhyay D, Negi P, Wei N, Deng XW, Chattopadhyay S;** 2002. Light regulated modulation of Z-box containing promoters by photoreceptors and down-stream regulatory components, COP1 and HY5, in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*. 31: 741–753

Yadav V, Mallappa C, Gangappa SN, Bhatia S, Chattopadhyay S; 2005. A basic helix-loop-helix transcription factor in Arabidopsis, MYC2, acts as a repressor of blue light-mediated photomorphogenic growth. *The Plant Cell* 17: 1953-1966

Yanagawa Y, Sullivan JA, Komatsu S, Gusmaroli G, Suzuki G, Yin J, Ishibashi T, Saijo Y, Rubio V, Kimura S, Wang J, Deng XW; 2004. COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo Arabidopsis and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & Development*. 18: 2172-81

Yuxiang L, Deng H, Miao M, Li H, Huang S, Wang S, Liu Y; 2016. Tomato MBD5, a methyl CpG binding domain protein, physically interacting with UV-damaged DNA binding protein-1, functions in multiple processes. *New Phytologist*. 210: 208-226

Zhang J, Davies WJ; 1990. Does ABA in the xylem control the rate of leaf growth in soil-dried maize and sunflower plants? *Journal of Experimental Botany*. 41: 1125–1132

Internetové zdroje:

<http://www.cragenomica.es/research-groups>

9 Zoznam použitých skratiek

| | |
|-------------------|--|
| AAO | ABA-oxidáza |
| ABA | kyselina abscisová |
| ATP | adenozíntrifosfát |
| BL | blue light; modré svetlo |
| CDK | cyklín-dependentné kinázy |
| CRY | krytochróm |
| D | dark; tma |
| DDB1 | UV-damaged DNA-binding protein 1 |
| dH ₂ O | destilovaná voda |
| FKF1 | FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX1 |
| FR | far-red light |
| GA | giberelíny |
| LKP2 | LOV KELCH |
| MS | Murashige-Skoog |
| NCED | 9- <i>cis</i> -epoxycarotenoid dehydrogenáza |
| PHOT | fototropín |
| PTIO | 2-phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazoline-1-oxyl-3-oxide |
| RL | red light; červené svetlo |
| SNG | S-nitrosoglutathione |
| WT | wild-type |
| ZTL | ZEITLUPE |