



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Regulace exprese genů *PHOT1* a *PHOT2*
v semenech rajčete vlivem světla a abiotických
stresů**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Jarošová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Konzultant:	Mgr. Kristýna Schenková
Termín odevzdání práce:	2019

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Jarošová
Název práce	Regulace exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> v semenech rajčete vlivem světla a abiotických stresů
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>Předkládaná diplomová práce se věnuje pochopení mechanismů interakce signálních fototropinových a stresových drah probíhajících v modelové rostlině <i>Solanum lycopersicum L.</i> Teoretická část byla věnována aktuální problematice abiotického stresu a světelných signálních drah modelových rostlin. Experimentální část zahrnuje analýzu exprese vybraných kandidátních genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> v semenech rajčete jedlého a mutantního genotypu <i>7B-1</i>, vyznačujícího se zvýšenou tolerancí k abiotickým stresům na modrém světle. Ke sledování exprese byla použita metoda kvantitativní PCR. Výsledky prováděných experimentů vedly k závěru, že modré světlo a funkční produkt <i>7B-1</i> může zvyšovat toleranci semen rajčete k zasolení prostřednictvím fotoreceptoru <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i>.</p>
Klíčová slova	<i>Solanum lycopersicum L.</i> , <i>7B-1</i> , fototropiny, abiotický stres, <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i>
Počet stran	55
Jazyk	Český (anglický)

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Bc. Kateřina Jarošová
Title of thesis	Expression of <i>PHOT1</i> and <i>PHOT2</i> genes in tomato seeds as a function of light and abiotic stress
Type of thesis	Diploma
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	<p>This diploma thesis deals with the understanding of the mechanisms of cross-talk between phototropin and stress signalling pathways in the model plant <i>Solanum lycopersicum L.</i> The theoretical part was devoted to current problems of abiotic stress and light signalling pathways in the model plants. The experimental part includes the analysis of the expression of selected candidate genes <i>PHOT1</i> and <i>PHOT2</i> in tomato seeds of the edible and mutant genotype <i>7B-1</i>, characterized by enhanced tolerance to abiotic stress in blue light. Quantitative PCR was used to monitor the gene expression. The results of the conducted experiments led to the conclusion that the blue light and the functional product <i>7B-1</i> increase the tolerance of tomato seeds to salinization through the photoreceptor PHOT1 and PHOT2.</p>
Keywords	<i>Solanum lycopersicum L.</i> , <i>7B-1</i> , phototropins, abiotic stress, <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i>
Number of pages	55

Language

Czech (English)

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování

Na tomto místě bych chtěla poděkovat svému vedoucímu Prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D.za umožnění vypracování diplomové práce pod jeho vedením, za cenné rady a připomínky. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Kristýně Schenkové za pomoc při práci v laboratoři, při vyhodnocování výsledků a za veškeré rady, které mi poskytla.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK	9
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	10
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	11
2.1 Modelový organismus <i>Solanum lycopersicum</i> L.	11
2.2 Mutant <i>7B-1</i>	12
2.3 Klíčení semen	13
2.4 Reakce rostlin na světlo	14
2.4.1 Fytochromy	16
2.4.2 Kryptochromy	17
2.4.3 Fototropiny	18
2.4.4 Fotoreceptory Zeitlupe	19
2.5 Reakce rostlin na zasolení	21
2.5.1 SOS signální dráha	21
2.5.2 Iontová homeostáza	22
2.5.3 Vakuola	23
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Rostlinný materiál	24
3.2 Příprava MS média	24
3.3 Studium klíčení semen	24
3.4 Hodnocení klíčení semen	25
3.5 Studium exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i>	25
3.5.1 Sklizení semen a homogenizace vzorků	26
3.5.2 Izolace celkové RNA	26
3.5.3 Přechištění izolované celkové RNA	28
3.5.4 Syntéza cDNA	29

3.5.5 PCR nasyntetizované cDNA	31
3.5.6 Optimalizace primerů	32
3.5.7 Real-time PCR	33
4 VÝSLEDKY	34
4.1 Studium klíčení semen	34
4.2 Studium exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i>	36
4.2.1 Exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> v semenech klíčících na základním MS médiu	36
4.2.2 Exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> v semenech klíčících na médiu s přídavkem NaCl	42
4.2.3 Exprese genů <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> v semenech klíčících na základním MS médiu – sledování vlivu doby inkubace	44
5 DISKUZE	49
6 ZÁVĚR	52
7 ZDROJE	53
8 INTERNETOVÉ ZDROJE	57

SEZNAM ZKRATEK

UV	Ultrafialové záření
UV-A	Ultrafialové záření A
COP1	Constitutive photomorfogenesis 1
PHYA	Fytochrom A
PHYB	Fytochrom B
PHYE	Fytochrom E
PHYF	Fytochrom F
CRY1	Krytochrom 1
CRY2	Krytochrom 2
CRY3	Krytochrom 3
FAD	Flavinadenindinukleotid
MTHF	Methenyltetraydrofolát
MS	Murashige and Skoog medium
SOS	Salt Overly Sensitive
ATP	Adenosintrifosfát
WT	Wild-type
DARK	Tma
BL	Blue light = modré světlo
RL	Red light = červené světlo
PCR	Polymerázová řetězová reakce

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Předložená diplomová práce se zabývá modelovým organismem *Solanum lycopersicum L.* a od něj odvozeným mutantem *7B-1*, který se vyznačuje samčí sterilitou závislou na periodě dlouhého dne (Sawhney, 1997). Funkce mutovaného genu *7B-1* není zcela známá, avšak se předpokládá, že se jedná o mutaci v signalizaci modrého světla, díky čemuž dochází k ovlivňování procesů zprostředkovaných fototropinovými dráhami. Předpokládá se, že tato mutace zasahuje signální dráhu modrého světla (Fellner et Sawhney, 2002).

Obecným cílem diplomové práce bylo zjistit, zda zasolení jako abiotický stres je schopno měnit signální dráhy modrého světla zprostředkované fototropiny. Samotným experimentálním cílem pak bylo zjistit závislost exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* na světelných podmínkách a zasolení.

Pro pochopení fyziologických funkcí modelového organismu byly provedeny klíčící experimenty probíhající ve tmě, na modrém a červeném světle. Semena klíčila na MS médiu s přítomností NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l, 100 mmol/l a bez přítomnosti NaCl. Pro studium závislosti exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* byla použita metoda kvantitativní PCR. Semena klíčila po dobu 24 h, 48 h, 72 h a 96 h ve tmě a na modrém světle na základním MS médiu. Pro zjištění tolerance k zasolení klíčila semena na médiu s NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l po dobu 72 hodin ve tmě a na modrém světle.

Diplomová práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Modelový organismus *Solanum lycopersicum* L.

Rostlina *Solanum lycopersicum*, neboli lilek rajče, patří do čeledi lilkovitých – *Solanaceae*. Rodina *Solanaceae* zahrnuje přes 3000 druhů, mezi které se řadí trvalé stromy i jednoleté rostliny nacházející se na suchozemských stanovištích, pouštích i deštných pralesech (Hanssen et Lapidot, 2012). Rostlina lilek rajče je původem z Jižní Ameriky a k nám do Evropy se dostala v 16. století nejprve jako okrasná rostlina, později jako potravina. Jedná se o jednoletou bylinu vysokou 40-50 cm s velmi bohatou lodyhou. Květenství je vijan obsahující až 20 oboupohlavných květů, plodem je bobule (Slavík, 2005).



Obr. 1: *Solanum lycopersicum* (L.), převzato z: <http://www.blanokridlivpraze.cz/rostliny/detail/?rosId=208>, 3. 10. 2018

Model rajčete a jeho divoké typy byly používány pro molekulární a buněčnou genetiku ve 20. století kvůli své snadné kultivaci a morfologické rozmanitosti (Gebhardt, 2016). S pomocí nových sekvenačních technologií bylo dokončeno sekvenování celého genomu rajčete v roce 2012 a bylo zjištěno, že genom rajčete je přibližně 900 Mb velký (Sato et al., 2013).

2.2 Mutant 7B-1

Mutant 7B-1 je odvozený od kultivaru rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers. Tato mutace je recesivní a vznikla spontánně v jednom genu (Sawhney, 1997). Mutant se vyznačuje samčí sterilitou závislou na fotoperiodě dlouhého dne (16 hodin světlo a 8 hodin tma) a v tomto případě produkují sterilní rostliny tyčinky, které se skrývají a produkují většinou neživotaschopný pyl. Naopak za krátkého dne jsou semena mutanta fertilní, vytvářejí normální tyčinky s životaschopným pylem. Rostliny pěstované za krátkého dne mohou být použity jako samičí populace pro produkci hybridních semen (Sawhney, 1997).

Semena samčího sterilního mutanta vykazují rezistenci k abiotickým a biotickým stresům – k vysokým hodnotám zasolení různorodými solemi, jako jsou NaCl, Na₂SO₄, KCl, K₂SO₄, vůči osmotickému stresu a k nízkým teplotám. Jak údaje naznačují, tato rezistence souvisí s vysokými hodnotami kyseliny abscisové nacházející se v mladých rostlinách mutanta (Fellner et Sawhney, 2001). V případě standardního genotypu byla při aplikaci manitolu, polyethylenglykolu nebo NaCl pozorována inhibice klíčení. Mutant 7B-1 vykazuje vyšší klíčivost pod osmotickým stresem, zvláště pokud byly rostliny pěstovány na modrém světle (Fellner et Sawhney, 2002).

Reakce mutanta 7B-1 a standardního genotypu ke světlu jsou velice odlišné. Dochází k procesu tzv. de-etiolizace, což je proces, při kterém rostlina, vyvíjející se ve tmě, mění vlivem světla svou formu (fotomorfogeneze) (Fellner et al., 2001). Při fotomorfogenezi dochází ke snížení rychlosti prodlužování rostliny. V případě tmy není výrazný rozdíl v prodlužování hypokotylu obou genotypů, avšak na modrém světle dochází k výraznějšímu prodlužování hypokotylů u mutanta 7B-1 (Bergougnoux et al., 2012).

Z výzkumů vyplývá, že mutace genu 7B-1 souvisí se signalizací modrého světla. Tato mutace ovlivňuje procesy, které jsou zprostředkovány fototropinovými signálními drahami, např. pohyb chloroplastů, otevírání průduchů, prodlužování hypokotylu vyvolané modrým světlem (Fellner et Sawhney, 2002; Ježilová et al., 2012; Hlavinka et al., 2013).

V roce 2017 byla vydána publikace ohledně charakterizace genetické podstaty mutace 7B-1. Byl vybrán kandidátní gen *SIGLO2*, který by mohl souviset s mutací 7B-1. Tento gen patří do skupiny genů *MADS-box* třídy B, které jsou zapojeny ve vývoji tyčinek (Pucci et al., 2017).

2.3 Klíčení semen

Semena tvoří základní světový zdroj potravin, a proto jsou hojně využívána ve výzkumu k pochopení fyziologických reakcí rostlin. Hlavní funkcí semen je tvorba nové generace (Bewley, 1997).

Klíčení semen je počátečním vývojem životního cyklu každé rostliny. Zahrnuje události, které začínají nasáváním vody suchým semenem, prasknutím osemení a končí prodloužením zárodečné osy embrya (Bewley, 1997). Prvotním krokem je tzv. embryonální vývoj (embryogeneze), který je zahájen dvojitým oplozením a končí kumulací makromolekulárních látek v děložních lístcích. V této fázi je zároveň zastaven buněčný cyklus v embryu. Semena jsou v tomto stádiu dormantní a odolné vůči vysychání (McCarty et al., 1991). Po následném prolomení dormance dochází k samotnému klíčení, které začíná příjmem vody a končí průnikem kořínků strukturou embrya (Bewley, 1997).

Klíčení je ovlivňováno endogenními a exogenními podněty. Mezi endogenní podněty patří hlavně vliv fytohormonů – kyseliny abscisové a giberelinů. Funkcí kyseliny abscisové je udržování semen ve stádiu dormance (Yasuda et al., 2008), oproti tomu gibereliny způsobují přechod dormantního semene ke klíčícímu (Fath et al., 2001).

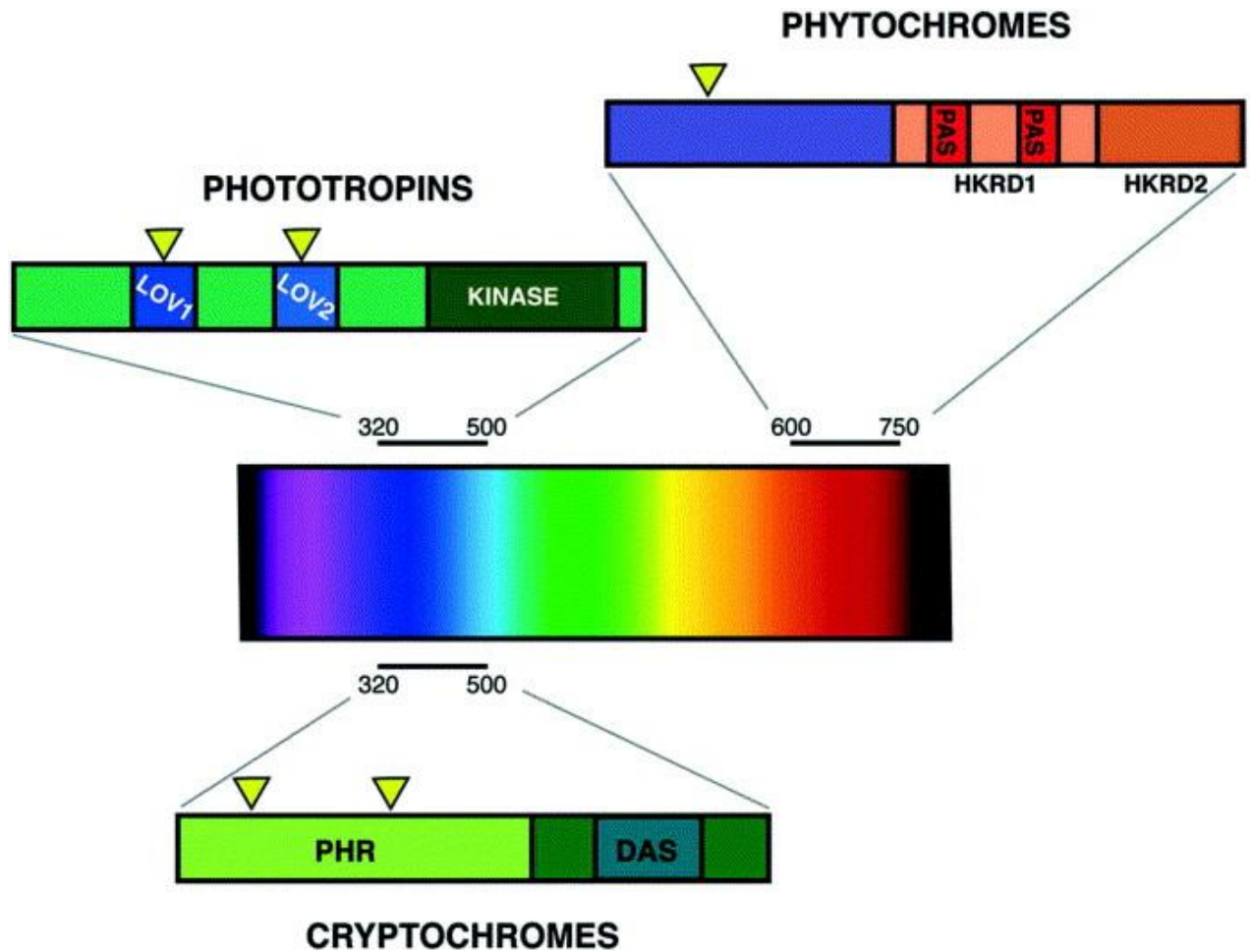
Nejvýznamnějším exogenním podnětem na klíčení je světlo, které slouží jako stimul. Semena se v závislosti na světle dělí na fotoblastická a nefotoblastická. Mezi nefotoblastické rostliny patří *Solanum lycopersicum* L. Tyto rostliny se vyznačují schopností klíčení i ve tmě, díky fytochromům nacházející se v semenech. Mezi fotoblastické rostliny se řadí např. *Arabidopsis thaliana* (Sawada et al., 2008).

2.4 Reakce rostlin na světlo

Sluneční světlo neslouží pouze jako zdroj energie pro fotosyntézu, ale i jako signál, který reguluje různé procesy v rostlinách, od klíčení semen po dozrávání plodů a senescenci. Pokud probíhá růst rostliny ve tmě, označujeme tento proces jako skotomorfogeneze a rostliny jako etiolované. Rostliny jsou bledé a mají neobvykle dlouhý vzrůst (Taiz et Zeiger, 2015). Jakmile dojde k proniknutí rostliny na povrch půdy začne působit světlo jako signál, kdy dochází k rychlému vývoji chloroplastů, zvětšování listů a zpomalování prodlužování hypokotylu. Tento proces se nazývá fotomorfogeneze. Receptorové molekuly, které rostliny využívají k detekci slunečního záření, se nazývají fotoreceptory a stejně jako receptory pro hormony reagují fotoreceptory na signál iniciační reakcí, která končí vyvoláním fosforylační kaskády (Montgomery et al., 2002).

Oblastmi vlnového spektra s nejvýznamnějším vlivem na vývoj rostlin jsou oblast modrého světla (400-500 nm), oblast červeného světla (650-680 nm) a oblast dlouhovlnného červeného světla (710-740 nm) (Russell et al., 2012).

Fotoreceptory absorbují fotony dané vlnové délky a používají energii jako signál k iniciaci světelné reakce. Všechny známé fotoreceptory se skládají z proteinové skupiny a prostetické skupiny absorbující světlo (Sullivan et al., 2003).



Obr. 2: Fotoreceptory rostlin. Tři třídy fotoreceptorů byly charakterizovány z rostlin na molekulární úrovni. Fytochromy vnímají červené, dlouhovlnné červené světlo mezi 600 a 750 nm a modré světlo. Kryptochromy vnímají modré a UVA světlo (320-500 nm). Fototropiny také vnímají modré a UVA světlo (320-500 nm) (Montgomery et al., 2002).

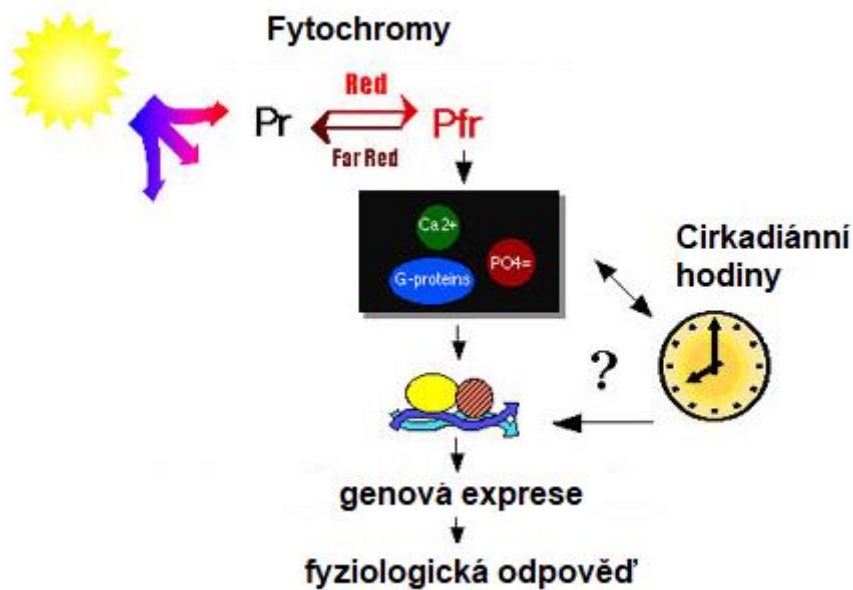
2.4.1 Fytochromy

Fytochromy byly jako první fotoreceptory identifikovány v kvetoucích rostlinách zodpovědné za fotomorfogenezi v reakci na červené a dlouhovlnné červené světlo. Tyto fotoreceptory byly zkoumány na základě zodpovědnosti za reverzibilní kontrolu krátkodobě klíčících rostlin přes noc. Tato studie vedla k identifikaci odpovědného fotoreceptoru fytochromu (Borthwick et al., 1952)

Fytochrom sestává z apoproteinu kovalentně připojeného k lineárnímu tetrapyrolovému chromoforu. Chromofor detekuje barvu, intenzitu, směr a periodicitu světelného záření. V rostlinách rostoucích ve tmě se tvoří fytochrom v podobě Pr absorbující červené světlo. Při expozici červeným světlem se Pr mění na formu Pfr. Forma Pfr se považuje za biologicky aktivní. Změna mezi Pr a Pfr je spojena nejen s konformační změnou struktury, ale i s odpovídajícími změnami absorpčních maxim z 666 nm (Pr) na 730 nm (Pfr). Dále dochází k přesunu molekul z cytoplasmy do jádra, kde regulují genovou expresi (Quail, 1997). Jedním z hlavních regulátorů fotomorfogeneze je protein COP1 (constitutive photomorphogenesis 1), který neinteraguje pouze s fytochromy, ale i s kryptochromy – potlačuje fotomorfogenezi pomocí ubikvitinace transkripčních faktorů, které regulují expresi fotomorfogenních genů (Franklin et al., 2005).

Fytochromy regulují signální dráhy, které začínají v cytoplasmě. Dochází k aktivaci Pfr formy fytochromu, která putuje do jádra, kde dojde k navázání na transkripční faktory (například PIF3 – fytochrom interagující faktor 3) (Franklin et al., 2005).

Fytochromy lze všeobecně rozdělit do dvou skupin, a to typ 1, jež se rychle odbourává při vystavení červenému nebo bílému světlu (PHYA) a typ 2, který lze považovat za světelně stabilní. Do této skupiny patří fytochromy PHYB až PHYE (Clough et al., 1997). U rajčete jedlého byly poznány geny, které kódují apoproteiny fytochromů: PHYA, PHYB1, PHYB2, PHYE a PHYF (Thiele et al., 1999). I když jsou fytochromy receptory pro červené světlo, mají schopnost absorbovat i v oblasti modrého světla, k jehož absorpci přispívají právě fytochromy PhyA a PhyB (Neff et Chory, 1998).



Obr. 3: Princip změny konformace fytochromu. Biologicky neaktivní forma Pr je při ozáření červeným světlem převedena na biologicky aktivní formu Pfr, což vede ke genové expresi a k fyziologické odpovědi. Naopak tomu ozáření dlouhovlnným červeným světlem dochází k převodu aktivní formy k neaktivní. Upraveno a převzato 19. 12. 2018 z: <https://www.mobot.org/jwccross/duckweed/phytochrome.htm>

2.4.2 Kryptochromy

Kryptochromy (CRY1, CRY2, CRY3) jsou flavoproteiny, o nichž se předpokládá, že se vyvinuly z fotolyáz (Lin, 2005). Nejvíce prozkoumané kryptochromy jsou u modelového organismu *Arabidopsis*, kde zprostředkovávají světlem řízené prodloužení hypokotylu, růst listů, fotoperiodické kvetení a cirkadiánní hodiny (Bagnall et al., 1996).

Kryptochromy obsahují chromoforní kofaktory – flavinadeninindinukleotid (FAD) a methenyltetrahydrofolát (MTHF). CRY1 a CRY2 mají sekvenční podobnost s fotolyázami, což je rodina proteinů, které katalyzují opravu DNA po poškození UV světlem odstraněním pyrimidinových dimerů, avšak kryptochromy nemají fotolyázovou aktivitu (Yang et al., 2001). Veškeré kryptochromy jsou složeny ze dvou domén – PHR (photolyase-related) a C-koncovou doménu DAS, kde doména PHR váže dva chromofory – FAD a MTHF (Lin et Todo, 2005).

CRY1 je hlavní fotoreceptor modrého světla, který řídí inhibici prodlužování hypokotylu a řapíku, zprostředkuje kvetení a expresi genů (Ahmad, 1996). CRY2 řídí fotoperiodickou iniciaci kvetení (Liu, 2008). CRY3 je protein, který je schopen opravit UV-indukované léze v jednovláčkové DNA (Selby et Sancar, 2006).

Geny *CRY1* a *CRY2* jsou homologní a odpovídají za regulaci reakcí modrého světla jako je růst hypokotylu a cirkadiánní hodiny. Všeobecně geny *CRY* kódují proteiny o velikosti 70-80 kDa, které ve své aktivní formě tvoří dimery (Lin et Todo, 2005).

CRY1 se prvotně nachází v jádře, avšak po ozáření se velká část přemísťuje do cytoplasmy. CRY2 se nachází v jádře. Další rozdíl mezi těmito kryptochromy je v degradaci na světle, kdy CRY2 je degradován, ale CRY1 je na světle stabilní. Oba kryptochromy zprostředkovávají regulaci genové exprese, kontrolují vývojové změny v rostlinách pomocí změn exprese genů v reakci na světlo a jsou schopné přenosu elektronů z FAD na signální molekulu, což vede ke konformačním změnám receptoru (Yang et al., 2001).

Molekula kryptochromu interaguje s proteiny asociovanými s transkripčními mechanismy, a tím přímo ovlivní transkripci. Bylo zjištěno, že interagují s E3 ubiquitin ligázou COP1, která negativně reguluje fotomorfogenezi (Lin et Todo, 2005).

2.4.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory modrého světla. Fototropismus je děj, při kterém se rostliny ohýbají směrem ke světlu využitím světla jako signálu, na rozdíl od fotosyntézy, při které rostliny využívají světlo a přeměňují ho na chemickou energii (Taiz, 2010). V experimentálních studiích se běžně používá jednostranné světlo, avšak fototropismus lze pozorovat také tehdy, pokud je rostlina vystavena dvěma nerovnoměrně jasným zdrojům světla (Taiz, 2010).

Podněty vyvolané modrým světlem a zprostředkované fototropiny byly pozorovány u vyšších rostlin, kapradin, řas, hub a prokaryot. Mimo fototropismus vyvolávají tyto podněty vychytávání aniontů v řasách, ranou inhibici prodlužování semenáčku hypokotylu, stimulaci syntézy chlorofylu a karotenoidů, pohyby průduchů a chloroplastů a aktivací genové exprese. U jednobuněčných nepohyblivých organismů, jako jsou řasy, bylo pozorováno, že modré světlo způsobuje fototaxi, neboli pohyb jednobuněčných organismů

ke světlu nebo od světla. Modré světlo je zodpovědné také za infekční proces u bakterií (Swartz, 2007).

Signály modrého světla napomáhají snížit rostlině přítomnost světla. Modré světlo stimuluje asymetrický růst a ohýbání. Fototropní ohýbání je možné pouze u rostoucích orgánů, proto výhonky, které se již přestaly prodlužovat, nebudou ohýbány. Mezi další účinky modrého světla patří otevírání průduchů. Průduchy patří mezi hlavní regulátory ve výměně plynů v listech. Tento proces je rychlý a reversibilní. Na rozdíl od fototropismu nebo prodlužování hypokotylu, které probíhají jen v počátečních stádiích života rostliny, je otevírání průduchů pomocí modrého světla přítomno po dobu celého života rostliny (Taiz, 2010).

V roce 1997 byl izolován gen *PHOT1* u *Arabidopsis thaliana* a následně i *PHOT2*. Tyto dva geny mají překrývající funkci, ale fyziologicky jsou jedinečné. Gen *PHOT1* reguluje rychlou inhibici růstu hypokotylu po přenosu rostliny ze tmy na světlo a gen *PHOT2* koriguje reakci chloroplastů vystavených vysoké intenzitě světla (McDonald, 2003).

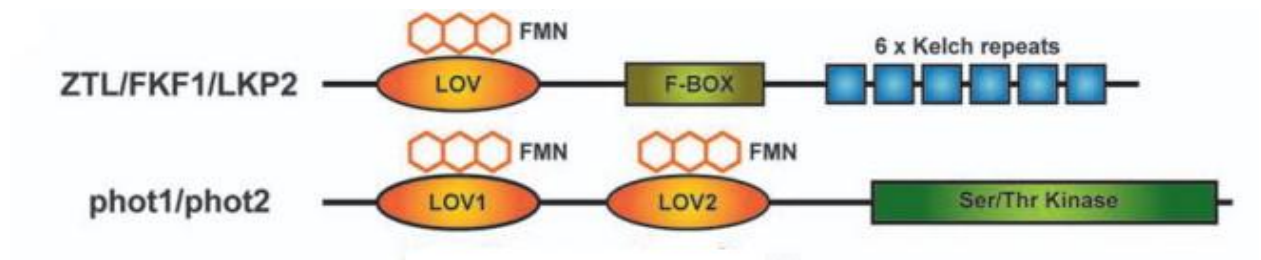
PHOT1 a *PHOT2* se nacházejí v cytoplazmě. Jejich struktura se skládá z C-terminální oblasti, která obsahuje serin threonin kinázu a z N-terminální oblasti, která nese LOV domény, jež mají obdobnou sekvenci a funkci – fungují jako kyslíkové a světelné senzory. Na N-terminální konec se váže flavinmononukleotid, který je autofosforylován na modrém světle (Banerjee et Batschauer, 2005).

2.4.4 Fotoreceptory Zeitlupe

Fotoreceptory Zeitlupe jsou receptory modrého světla mající důležitou roli v řízení cirkadiánních hodin a fotoperiodicitě kvetení. Nacházejí se v cytosolu a v jádře a obsahují 3 skupiny – Zeitlupe (ZTL), F-box 1 (FKF1) a LOV doménu (LKP2) (Liu et al., 2013).

Fotoreceptory ZTL obsahují doménu LOV na svém N-terminálním konci, za kterým následuje F-box, jež se skládá z 50 aminokyselin, usnadňující proteinové interakce. Proteiny F-boxu jsou součástí některých E3 ubiquitin ligáz. Genetická analýza u *Arabidopsis* naznačuje, že ZTL, FKF1 a LOV doména se částečně překrývají ve funkci. Mutanti *Arabidopsis* postrádající ZTL mají narušeny cirkadiánní hodiny, naopak tomu postrádají-li FKF1, vykazují změny doby kvetení (Christie et al., 2015).

Funkcí těchto receptorů je cílená proteolýza spojována s kontrolou doby kvetení a činností cirkadiálních hodin (Christie et al., 2015).



Obr. 4: Schéma struktury Zeitlupe rodiny fotoreceptorů – LOV doména, F-box; struktura *PHOT1/PHOT2* genů – LOV1, LOV1, serin threonin kináza; převzato a upraveno z Ito et al., 2012

2.5 Reakce rostlin na zasolení

Zasolení půdy, které vzniká nesprávnými postupy při hospodaření s vodou, patří k nejzávažnějšímu problému obzvláště v zemědělství, protože drasticky snižuje výnos. Vlivem zasolení půdy se kolem kořenů rostliny zvyšuje osmotický tlak, kvůli němuž se snižuje schopnost kořenů získávat vodu, avšak daleko horším efektem je toxický efekt iontů akumulujících se v buňce, což vede k inhibici fotosyntézy (Epstein et al., 1980).

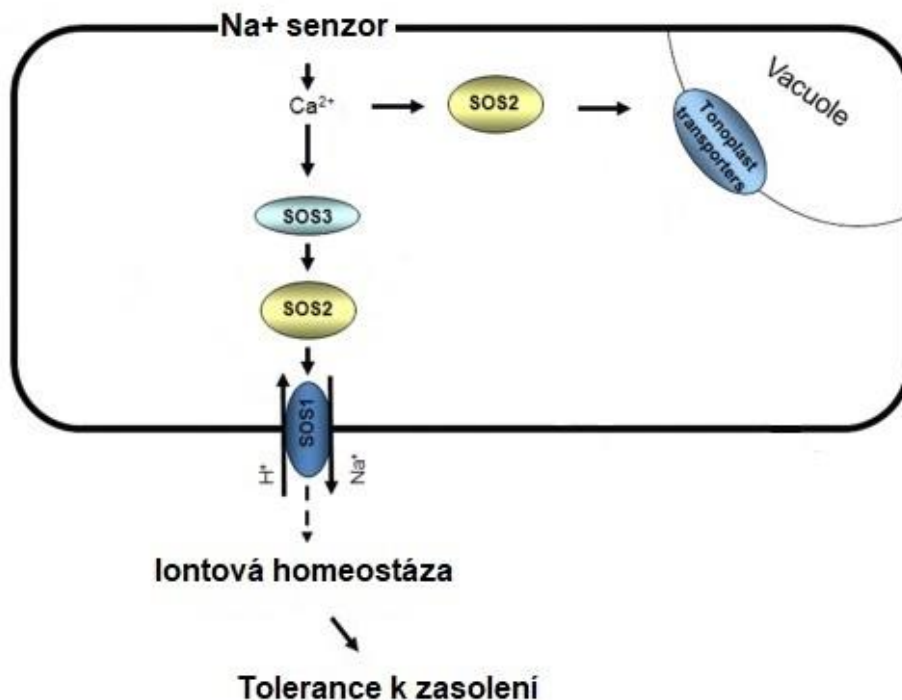
Divoké druhy rajčat jsou více tolerantní vůči soli než kultivované druhy. Tato vlastnost souvisí se zvýšenou akumulací sodných iontů v nadzemních částech, naproti tomu kultivované druhy akumulují sodné ionty více v kořenech (Gálvez et al., 2012).

2.5.1 SOS signální dráha (Salt Overly Sensitive)

Tato dráha je známá jako klíčový mechanismus k řízení iontové homeostázy pro vyloučení sodných iontů na úrovni buněk (Wu et al., 1996) a je dělena na 3 složky: SOS1, SOS2 a SOS3. Tyto složky jsou vzájemně funkčně propojeny. Bylo zjištěno, že pokud jsou tyto geny mutované, jsou rostliny méně tolerantní k zasolení (Wu et al., 1996).

SOS1 je lokalizován v plasmatické membráně, kde má za úkol čerpání sodných iontů ven z cytosolu. Zvýšená exprese SOS1 byla pozorována zejména v epidermálních buňkách kořene, z čehož vyplývá, že kořenový systém se dostane se solí jako první do styku. Samotný mechanismus prostřednictvím SOS1 je však nedostatečný pro toleranci k zasolení, proto je nutné zapojení ostatních mechanismů (Zhu et al., 1998). SOS1 je zapojen i v antiportu Na^+/H^+ . Tato funkce byla identifikována u rajčete jedlého, kde byly identifikovány geny *SISOS1*, které mají význam nejen pro již zmíněný antiport, ale i pro distribuci Na^+ z kořene do rostlinných orgánů, což je velmi výhodné z hlediska toxického efektu sodných iontů – jejich zadržení ve stonku (Olias et al., 2009).

Gen *SOS3* kóduje protein vázající vápník a jeho funkcí je vnímání hladiny vápenatých iontů, která koresponduje s nárůstem sodných iontů v cytoplasmě. SOS3 interaguje s SOS2, díky čemuž ho aktivuje. Tento komplex SOS2/SOS3 reguluje aktivitu SOS1 (Shi et al., 2000).



Obr. 5: Schéma SOS dráhy (Salt Overly Sensitive). Senzor pro sodné ionty zachytí zvýšenou hladinu, což vede ke zvýšení hladiny vápenatých iontů. Vápenaté ionty jsou signálem pro SOS3, který interaguje s SOS2. Komplex SOS2/SOS3 ovlivňuje SOS1, který slouží jako membránový antiport, jehož funkcí je dostat sodné ionty pryč z cytoplasmy (převzato a upraveno: Ji et al., 2013).

2.5.2 Iontová homeostáza

Existuje široké spektrum reakcí rostlin na zasolení, které jsou definovány řadou úprav nejen na úrovni buněk, ale i celých rostlin. Na úrovni buněk se sodíkové ionty dostávají do buněk prostřednictvím několika plazmatických membránových kanálů bez pomoci proteinových transportérů. Je to dáno díky zápornému náboji na intracelulární straně membrány. Tato strana vtahuje sodné ionty dovnitř buňky. Naopak tomu transport sodných iontů ven z buňky vyžaduje přísun energie ve formě ATP (Blumwald, 2000).

Buňka na zasolení reaguje snížením sodných iontů v cytoplasmě pomocí enzymu **H⁺-ATPázy**, který katalyzuje hydrolyzu ATP, díky čemuž se vzniklá energie využívá k přenosu **H⁺** iontů do extracelulárního prostředí, proto dochází k přenosu sodných iontů ven z buňky. U rostlin rajčete bylo identifikováno 8 genů kódující různé izoenzymy **H⁺-ATPázy** *SIHA1-8* (Liu et al., 2016).

Dále může docházet k nižšímu příjmu draselných iontů. Tento deficit vzniká díky sodným iontům, protože tyto dva ionty jsou velice podobné fyzikálně a chemicky. Díky deficitu draslíku dochází k poruchám metabolismu, protože je tento iont nepostradatelný pro výživu a správnou funkci buňky (Zhu et al., 1998).

2.5.3 Vakuola

Další reakcí na zasolení je uskladnění sodných iontů ve vakuole, díky čemuž nedochází k ovlivnění metabolismu. Ionty jsou odděleny od všech reakcí membránou vakuoly – tonoplastem.

U rostliny rajčete jedlého jsou známy 4 izoformy vakuolárního antiportu z rodiny proteinů NHX. Na reakci k zasolení jsou zodpovědné geny *LeNHX1-4*. U mutantních rostlin byly zjištěny vyšší hladiny genů *SISOS2* a zvýšená aktivita výměnného transportu Na^+/H^+ ve vezikulech a zároveň byla zjištěna vyšší exprese *SISOS1*, *LeNHX4* a *LeNHX2* v kořenech rostlin. Tyto výsledky naznačují, že zvýšená tolerance k zasolení souvisí se zvýšenou akumulací Na^+ a K^+ v organelách buňky (Gálvez et al., 2012).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

Pro provádění experimenty byla využita semena rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* cv. Rutgers a semena mutanta *7B-1* odvozeného od tohoto kultivaru rajčete. Ačkoliv není funkce genu *7B-1* zcela známá, tento mutant se vyznačuje rezistencí k abiotickým a biotickým stresům specificky na modrém světle (Fellner et al., 2002).

3.2 Příprava MS média

Pro přípravu 2 litrů MS média (Murashige and Skoog, 1962) bylo naváženo 20 g sacharosu, 8,66 g MS média (Cat. no. M0221.0050, Duchefa Biochemie) a 390,4 mg MES pufru. Poté bylo naváženo 2,8 g agaru na 400 ml média. Látky potřebné pro přípravu média byly rozpuštěny v 1 litru vody v Erlenmeyerově baňce na magnetické míchačce. Objem byl doplněn na 2 litry a pH roztoku bylo upraveno na hodnotu 6,1 pomocí 1 M KOH. Do 500 ml termolahví bylo přidáno 2,8 g agaru a 400 ml hotového média. Médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po sterilizaci byly láhve skladovány v lednici.

3.3 Studium klíčení semen

Pro následující experiment byla použita semena dvou genotypů zmíněných výše – wild type a mutant *7B-1*. Od každého genotypu bylo potřeba 360 semen na jeden experiment. Semena byla sterilizována v 50 ml plastových zkumavkách roztoku SAVA (3% aktivního chlóru) po dobu 30 minut. Během sterilizace byla semena ve zkumavce několikrát promíchána protřepáním. Po sterilizaci byla semena 5x propláchnutá sterilní destilovanou vodou v laminárním boxu pomocí 10 ml pipety. Semena byla vyseta do kulatých plastových sterilních Petriho misek (průměr 90 mm) obsahujících 20 ml MS média a příslušnou koncentraci NaCl dle Tabulky 1. Zásobní roztok NaCl byl 5 mmol/l.

Tabulka 1: Objemy a koncentrace přidaného NaCl

Genotypy	Testované koncentrace [mmol/l]	Objem NaCl na 120 ml MS média [ml]
WT, <i>7B-1</i>	0	0
	50	1,2
	75	1,8
	100	2,4

Výsev semen byl proveden za sterilních podmínek v laminárním boxu. Na každou misku bylo vyseto 30 semen. Výsev byl proveden sterilní pinzetou (sterilizace v 96% etanolu a následné vyžihání v plameni lihového kahanu). Petriho misky byly po výsevu oblepeny dvakrát po svém obvodu pomocí textilní pásky (Softpore) a vertikálně umístěny do růstových komor (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Holandsko) do příslušných světelných podmínek. Semena byla kultivována po dobu 7 dnů na modrém, nebo červeném světle. Zdrojem modrého světla s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 440 nm byla zářivka Philips TLD36W/18-Blue, zdrojem červeného světla s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 660 nm byla zářivka Philips TLD36W/15-Red. Pro kultivaci ve tmě byly misky zabaleny do alobalu a umístěny do stejné růstové komory, jako misky kultivovány na modrém světle.

3.4 Hodnocení klíčení semen

Semena byla pozorována 3. až 7. den od vysetí. Klíčení bylo hodnoceno na denním světle. Experiment byl opakován čtyřikrát. Z těchto opakování byla vypočtena průměrná hodnota pro každý genotyp a hodnoty klíčivosti 7. den byly využity pro zpracování grafů závislosti klíčivosti semen na koncentraci NaCl. Byla vypočítána i procentuální inhibice klíčení, a to podle vzorce: $(a - b / a) * 100$, kde a = průměr procentuální klíčivosti při koncentraci 0 mol/l, b = průměr procentuální klíčivosti při zvolené koncentraci NaCl.

3.5 Studium exprese genů *PHOT1* a *PHOT2*

Cílem studia exprese vybraných kandidátních genů bylo zjistit závislost exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* na světelných podmínkách a zasolení. Pro následující experiment byla použita semena dvou genotypů – cv. Rutgers (WT) a *7B-1*. Od každého genotypu bylo potřeba 180 semen na jeden experiment. Semena byla sterilizována v roztoku SAVA (3% aktivního chlóru) 50 ml v plastových zkumavkách po dobu 30 minut. Během sterilizace byla

semena ve zkumavce několikrát promíchána protřepáním. Po sterilizaci byla semena 5x propláchnuta sterilní destilovanou vodou v laminárním boxu pomocí 10 ml pipety.

Semena byla vyseta na Petriho misku obsahujících 20 ml MS média bez přítomnosti NaCl a s přítomností NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l. Výsev semen byl proveden stejně, jako je popsáno v odstavci 3.3. Semena byla kultivována po dobu 24, 48, 72 a 96 hodin ve tmě a na modrém světle bez přítomnosti NaCl a 72 hodin s NaCl. Světelné podmínky pro kultivaci byly stejné, jako bylo popsáno v odstavci 3.3.

3.5.1 Sklizení semen a homogenizace vzorků

Po uplynutí doby kultivace byla semena sklizena. V komoře pro sklizení bylo zapnuto modré světlo (pro sklizení semen kultivovaných na modrém světle), resp. zelené světlo (pro sklizení semen kultivovaných ve tmě). Misky byly otevřeny, sterilní pinzetou (sterilizace v 96% etanolu) byla sklizena semena a zabalena do sterilního alobalu (sterilizace pomocí 96% etanolu). Semena z každé misky byla sklizena zvlášť do příslušného alobalu. Vzorky v alobalových sáčcích byly ihned vloženy do nádoby s tekutým dusíkem.

Sklizená semena byla nadrcena. Sterilní třecí miska a tlouček byly vychlazeny tekutým dusíkem, do misky byla vhozena semena z alobalu a nadrcena tloučkem na prášek. Nadrcený prášek byl vložen do označených vychlazených mikrozkuvek eppendorf (1,5 ml) pomocí sterilní špachtle vychlazené v tekutém dusíku. Tyto zkumavky byly uchovány v hluboko mrazícím boxu při teplotě -70 °C.

3.5.2 Izolace celkové RNA

Všechny vzorky v mikrozkuvkách uchovány v mrazícím boxu byly přeneseny do stojánku v digestoři. Před rozmrznutím bylo do každého vzorku přidáno 350 µl Lysis Bufferu (RLS, Isolate II RNA Plant Kit; Bionline) a 3,5 µl β-mercaptoethanolu. Každý vzorek byl důkladně homogenizován na vortexu 10x po dobu 15 sekund. Po homogenizaci byl vzorek stočen v centrifuze na 24 °C 5 minut při 13 tisíc rpm. Supernatant každého vzorku byl přenesen do fialové kolony s filtrem a 2 ml mikrozkuvkou. Kolona byla stočena v centrifuze po dobu 2 minut při 24 °C a 13 tisíc rpm. Po centrifugaci byla fialová kolona vyhozena a obsah mikrozkuvky byl předán do další mikrozkuvky (1,5 ml epp.) Ke vzorku byl přidán 70% etanol a celá směs byla homogenizována na vortexu po dobu

5 sekund. Vzorek byl předán do modré kolony v mikrozkuhavce a centrifugován po dobu 30 sekund při 24 °C a 13 tisících rpm. Modrá kolona byla předána na novou 2 ml mikrozkuhavku. Do vzorku bylo přidáno 350 µl Membrane Desalting Buffer (MEM, Isolate II RNA Plant Kit; Bioline) a vzorek byl stočen v centrifuze po dobu 60 sekund při 24 °C a 13 tisících rpm. Vzorek RNA navázané na kolonu byl přenesen do nové mikrozkuhavky, do které byly jímána vyeluoavá RNA. Nyní bylo možné pracovat mimo digestoř.

Do 1,5 ml mikrozkuhavky na ledě byla připravena Dnase I reakční směs dle tabulky 2. Na každý vzorek bylo potřeba 10 µl DNaseI a 90 µl RDN (reaction buffer for Dnase I, Isolate II RNA Plant Kit; Bioline).

Tabulka 2: Příprava DnaseI reaction mixture

	1 vzorek
RDN	90 µl
DnaseI	10 µl
Celkem	100 µl

Z připravené směsi bylo přidáno 95 µl do každého vzorku přímo do středu na membránu. Vzorek byl ponechán při pokojové teplotě po dobu 15 minut. Poté bylo do vzorku přidáno 200 µl Wash Buffer RW1 (Isolate II RNA Plant Kit; Bioline) a byla provedena homogenizace v centrifuze po dobu 30 sekund. Kolona byla přenesena na novou 2 ml mikrozkuhavku. Ke vzorku bylo přidáno 600 µl Wash Buffer RW2 (Isolate II RNA Plant Kit; Bioline) a byla provedena centrifugace po dobu 30 sekund. Znovu bylo ke každému vzorku přidáno 2x 250 µl RW2 a byla provedena centrifugace po dobu 2 minut. Obsah mikrozkuhavky byl vylit a kolona se vzorkem byla přenesena na novou 1,5 mikrozkuhavku z kitu.

Do každé kolony bylo přidáno 40 µl RNase-free water. Vzorek byl ponechán po dobu 5 minut při pokojové teplotě a centrifugován 1 minutu. Tento proces byl zopakován znovu tak, že odfiltrována RNase-free water byla znovu přidána do kolony, a ta pak centrifugována po dobu 1 minuty. Celkově bylo získáno 40 µl RNA.

3.5.3 Přečištění izolované celkové RNA

Bylo nutné pracovat se vzorky na ledu. Byla vytvořena reakční směs do mikrozkušavky dle tabulky 3. Z této směsi bylo odebráno 10 μl do každého vzorku. Vzorky byly promíchány a stočeny v centrifuze. Následně byly vzorky vloženy do termobloku na 37 °C po dobu 1 hodiny. Po uplynutí stanoveného času byly přidány 2 μl EDTA do každého vzorku. Poté byly vzorky vloženy zpět do termobloku na 80 °C po dobu 2 minut. Do vzorků bylo přidáno 48 μl RNase-free vody, 10 μl 3M octanu sodného, 250 μl vychlazeného 96% etanolu a 2 μl glykogenu. Vzorky byly promíchány a uloženy přes noc do hlubokomrazícího boxu při -70 °C.

Následující den byly vzorky vloženy do stojánku na ledu a ponechány samovolnému rozmrznutí. Poté byly stočeny v centrifuze vychlazené na 4 °C po dobu 30 minut při 13 000 rpm. Veškerý supernatant byl odstraněn a do každého vzorku bylo přidáno 500 μl vychlazeného 70% etanolu. Vzorky byly stočeny na centrifuze po dobu 5 minut při 4 °C a supernatant byl vylit do odpadu. Ke každému vzorku bylo přidáno 500 μl 96% etanolu a vzorky byly stočeny po dobu 5 minut při 4 °C v centrifuze. Supernatant byl odstraněn a prázdné zkumavky byly v centrifuze stočeny po dobu 2 minut při 4 °C. Zbylý etanol byl odpipetován a mikrozkušavky se vzorky byly ponechány na vzduchu dnem vzhůru z důvodu doschnutí zbytkového etanolu po dobu 5 minut. Pellet byl rozpuštěn ve 20 μl RNase-free water (Isolate II RNA Plant Kit; Bionline). Koncentrace celkové RNA byla změřena pomocí přístroje Nanodrop (Thermo Scientific).

Tabulka 3: Složení reakčního mixu pro přečištění izolované RNA

	1 vzorek
10x DNaseI buffer	4 μl
Recombinant DnaseI	4 μl
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0,5 μl
H ₂ O nuclease – free	1,5 μl
Celkem	10 μl

V případě dostatečné vysoké koncentrace izolované celkové RNA byla do 1,5 ml mikrozkušavky přichystána reakční směs pro PCR dle tabulky 4. Byl zapnut termocycler a navolen příslušný program dle tabulky 5. Do 0,2 ml mikrozkušavky bylo přidáno 18 μl

reakční směsi a 2 μ l příslušného vzorku, tedy templátu RNA. Sekvence použitých primerů kontrolního genu *LeGAPDH* v reakční směsi byly následující: – F primer: 5'- ATC CAT TTA TTT CCA CTG ATT ACA A – 3' a R primer: 5'- CAT GGG AGC ATC TTT GCT A – 3'.

Vzorky byly vloženy do termocycleru. Během PCR byl připraven agarosový gel. Po proběhnutí PCR byl výsledek zobrazen pomocí elektroforézy. Byl připraven 1,5% agarózový gel obsahující 1,2 g agarózy, 80 ml 0,5x TBE pufu a 5 μ l barvy GelRed (ředěný 10000x ve vodě). Každý vzorek o objemu 20 μ l byl smíchán s 1 μ l barvy 6x Loading Dye. Do první a poslední jamky gelu bylo přidáno 8 μ l velikostního markeru (100 bp). Elektroforéza proběhla v 0,5x TBE pufu při 80 V po dobu 40 minut. Poté byl gel vyfotografován softwarem GeneSys a vizuálně byla hodnocena čistota celkové RNA.

Tabulka 4: Složení reakční směsi pro PCR

	1 vzorek
Nuclease-free H ₂ O	13 μ l
5x My Taq Buffer	4 μ l
10 μ M primer GAPDH – F	0,5 μ l
10 μ M primer GAPDH – R	0,5 μ l
My Taq Polymerase	0,1
Celkem	18,1 μ l

Tabulka 5: Program pro PCR, kroky 2-4 opakovány 44x

94 °C	3 min
94 °C	30 sek
55 °C	30 sek
72 °C	1 min
72 °C	5 min
4 °C	...

3.5.4 Syntéza cDNA

Nejprve bylo nutné spočítat objem RNA na syntézu cDNA. Do jedné reakce byl použit 1 μ g celkové RNA, 1000/koncentrace RNA. Ze změřených koncentrací izolované RNA byla vybrána ta nejnižší. Ze zbylých naměřených koncentrací izolované RNA byl vypočítán

objem, který se přidal do reakce tak, aby výsledná koncentrace všech vzorků byla stejná. Do 1,5 ml mikrozkušavky byla připravena reakční směs 1, viz Tabulka 6.

Tabulka 6: Reakční směs 1 pro syntézu cDNA

	1 vzorek
50 μ M Oligo dT Primer	1 μ l
10 mmol/l dNTP	1 μ l
Celkem	2 μ l

Ze směsi byly přidány 2 μ l do každého vzorku. Dle tabulky 7 byl nastaven termocycler. Víčko bylo nahřáto na teplotu 105 °C, poté se nahřála deska na 65 °C. V tomto okamžiku byl program zastaven, zkumavky byly vloženy do termocycleru a program byl spuštěn na 5 minut. Po pěti minutách byl program zastaven, zkumavky byly ihned vloženy do stojánku na ledu z důvodu zastavení reakce. Byla připravena směs 2, dle tabulky 8. Ze směsi bylo přidáno 10 μ l do každého vzorku, vzorky byly promíchány a vloženy zpět do termocycleru. Program byl spuštěn na 75 minut (60 + 15 minut, dle Tab. 7). Poté byl program zastaven, bylo přidáno 0,5 μ l RNasyH. Po opětovném spuštění programu byly vzorky vloženy zpět do termocycleru na dobu 15 minut. Po skončení programu bylo nasyntetizováno 20 μ l cDNA.

Tabulka 7: Program pro syntézu cDNA

65 °C	5 min
42 °C	60 min
70 °C	15 min
37 °C	15 min
4 °C	...

Tabulka 8: Reakční směs 2 pro syntézu cDNA

	1 vzorek
Rnase-free water	4,5 μ l
5x PrimeScript buffer	4 μ l
Rnase Inhibitor	0,5 μ l
PrimeScript Rtase	1 μ l
Celkem	10 μ l

3.5.5 PCR nasyntetizované cDNA

Vzorky nasyntetizované cDNA byly naředěny 1/5 vodou do 0,2 ml mikrozkušavek následně: 1 μ l cDNA + 4 μ l H₂O. Byla připravena reakční směs pro PCR dle tabulky 9. Ze směsi bylo přidáno 18 μ l do 0,2 ml mikrozkušavky a přidány 2 μ l naředěné cDNA. Primery kontrolního genu *PP2Acs* použité ve směsi byly následující: F primer: 5'-TCC GAG TCC CAG GTC AAG AG – 3' a R primer: 5'- GCT ACA AGC AGT GTA ACT GTT TCA – 3'. Byl zapnut termocycler dle tabulky 10. Po proběhnutí PCR byl výsledek zobrazen na elektroforéze. Byl připraven 1,5% agarózový gel obsahující 1,2 g agarózy, 80 ml 0,5x TBE pufru a 5 μ l barvy GelRed (ředěný 10000x ve vodě). Každý vzorek o objemu 20 μ l byl smíchán s 1 μ l barvy 6x Loading Dye. Do první a poslední jamky gelu bylo přidáno 8 μ l velikostního markeru (10 bp). Elektroforéza proběhla v 0,5x TBE pufru při 80 V po dobu 40 minut. Poté byl gel vyfotografován softwarem GeneSys a vizuálně byla hodnocena integrita cDNA.

Tabulka 9: Reakční směs pro nasyntetizovanou cDNA

	1 vzorek
Rnase-free water	13 μ l
5x My Taq Buffer	4 μ l
10 μ M primer PP2Acs – F	0,5 μ l
10 μ M primer PP2Acs – R	0,5 μ l
My Taq Polymerase	0,1 μ l
Celkem	18,1 μ l

Tabulka 10: Program PCR pro nasyntetizovanou cDNA, kroky 2-4 opakovány 29x

94 °C	3 min
94 °C	30 sek
60 °C	30 sek
72 °C	45 sek
72 °C	5 min
15 °C	...

3.5.7 Optimalizace primerů

Nejprve bylo potřeba si promyslet, jaká ředící řada by mohla být ideální v našem případě. Pro vzorky s vysokou koncentrací cDNA bylo voleno vysoké ředění, např. 1:50, 1:100, 1:500 a 1:1000. Pro vzorky s nízkou koncentrací cDNA bylo voleno nízké ředění – 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16. Ředění bylo dále upraveno dle získaných CT hodnot a vypočítané účinnosti primerů, která by se měla pohybovat od 95-105 %. Po zvolení ředící řady byly nachystány 4x0,2 ml mikrozkuřavky (pro 4 ředící řady – 1:2, 1:4, 1:8 a 1:16), 2x1,5 ml mikrozkuřavky na přípravu mixu (pro 2 studované geny), 96 jamkovou desku a fólie na desku. Na ledu byla nechána nasyntetizovaná cDNA na pozvolné roztání, dále RNase/DNase free voda, SYBR green a R, F primery všech studovaných genů – *EF1*, *PP2acs*, *PHOT1* a *PHOT2*. Každý vzorek byl přidáván na desku v triplikátu pro zamezení chybovosti. Do každé jamky bylo přidáno 16 µl mixu (pro gen *EF1* celý řádek A a jamka E1 pro negativní kontrolu, pro gen *PP2acs* celý řádek B a jamka E2 pro negativní kontrolu, pro gen *PHOT1* celý řádek C a jamka E3 pro negativní kontrolu a pro gen *PHOT2* celý řádek D a jamka E4 pro negativní kontrolu). Poté byly přidány 4 µl naředěné cDNA dle schématu (ředění 1:2 řádek A-D, jamky 1-3, ředění 1:4 řádek A-D, jamky 4-6, ředění 1:8 řádek A-D jamky 7-9 a ředění 1:16 řádek A-D jamky 10-12). Do negativní kontroly bylo přidáno místo cDNA voda. Následně byl připraven program cycleru dle tabulky 11. U všech studovaných genů byla účinnost primerů v rozmezí 95-100 %, proto bylo přistoupeno k samotné expresi genů.

Tabulka 11: Program pro optimalizaci primerů a studium exprese, kroky 2-3 opakovány 39x

95 °C	2 min
95 °C	5 sek
60,5 °C	20 sek
75 °C	10 sek
95 °C	2 sek

3.5.8 Real-time PCR

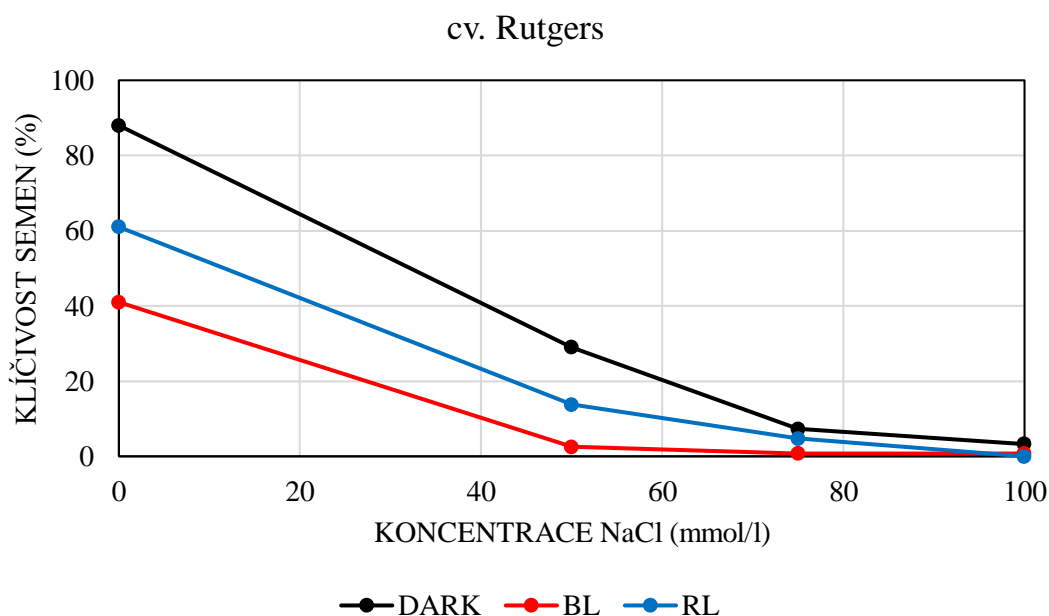
Úroveň genové exprese byla sledována pomocí kvantitativní PCR. Jako housekeepingové (provozní) geny byly použity *PP2Acs* a *EF1*. Geny zájmu byly *PHOT1* a *PHOT2*. Všechny primery byly naředěny dle instrukcí výrobce pomocí Tris-HCl na koncentraci 100 mmol/l. Byly připraveny 4x0,2 ml mikrozkuavky (pro 4 vzorky), 4x1,5 ml mikrozkuavky (4 mix pro 4 studované geny), 96 jamková deska a fólie na přelepení desky. Na ledu byly ponechány vzorky cDNA, SYBR green, RNase/DNase free voda a primery na roztání. Ředící řada byla vybrána 1:4 na základě neoptimálnějších CT hodnot. Byla připravena směs pro každý primer zvlášť – *EF1*, *PP2Acs*, *PHOT1* a *PHOT2*. Do směsi bylo přidáno 250 µl SYBR green, 110 µl vody a 20 µl R a 20 µl F primeru. Nejprve byly přidány mixy po 16 µl na jamku (pro gen *EF1* jamky A-D a sloupce 1-3, pro gen *PP2acs* jamky A-D a sloupce 4-6, pro gen *PHOT1* jamky A-D a sloupce 7-9 a pro gen *PHOT2* jamky A-D a sloupce 10-12). Poté byla naředěna cDNA – 12,5 µl cDNA a 37,5 µl vody. Následně byly přidány 4 µl naředění cDNA (WT-D řádek A a sloupce 1-12, 7B-1-D řádek B a sloupce 1-12, WT-BL řádek C a sloupce 1-12 a 7B-1-BL řádek D a sloupce 1-12. Sekvence použitých primerů pro gen *EF1α* byly následující: F primer: 5'- CCC AAG CCA TCA GAC AA – 3' a R primer: 5'- CAA CAG GGA CAG TTC CAA TAC CA – 3'. Sekvence použitých primerů pro gen *PP2Acs* byly následující: F primer: 5'-TCC GAG TCC CAG GTC AAG AG – 3' a R primer: 5'- GCT ACA AGC AGT GTA ACT GTT TCA – 3'. Sekvence použitých zájmových genů pro *PHOT1*: F primer: 5'- ATG GAA GAA GAA ACA AGC – 3' a R primer: 5'TTA GAA AAC ATT GTT TG – 3', pro *PHOT2*: F primer: 5'- ATG GAA AAC CAG AGA AG – 3' a R primer: 5'- CTA GAA TAA GTC CAT TG – 3'. Byl nastaven program v cycleru dle tabulky 11. Po proběhnutí PCR byly v excelu vypočítány exprese jednotlivých genů.

4 VÝSLEDKY

4.1 Studium klíčení semen

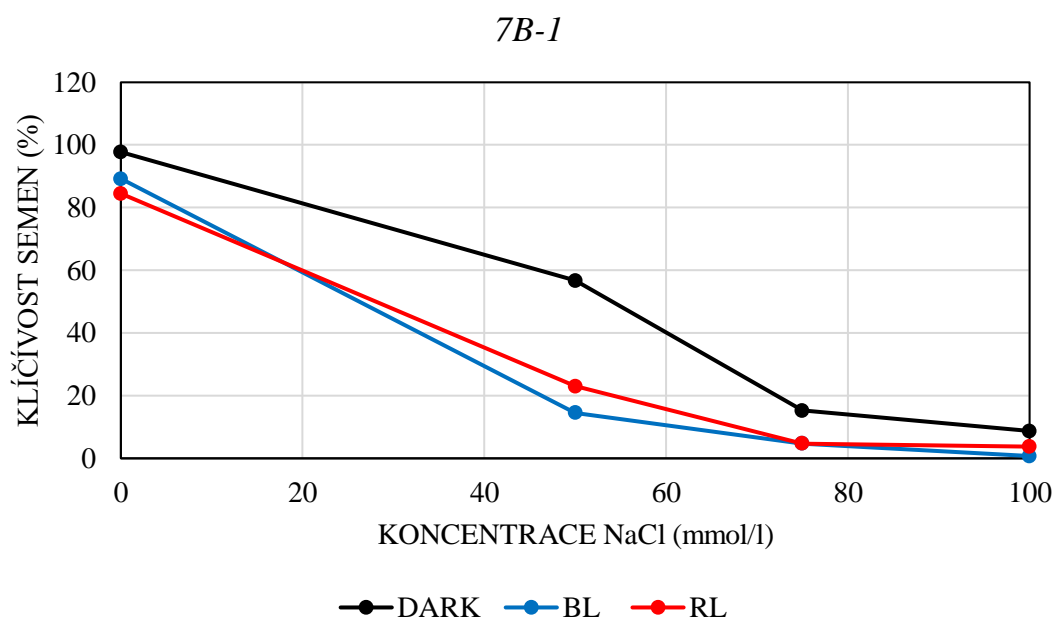
Maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* bylo ovlivňováno přidavkem chloridu sodného (NaCl) v koncentracích 0 mmol/l, 50 mmol/l, 75 mmol/l a 100 mmol/l v kombinaci se světelnými podmínkami (tma-DARK, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Grafy znázorňují průměrné výsledky ze 4 po sobě následujících experimentů pro každý genotyp.

Z obrázku 6 je patrné, že se zvyšující se koncentrací chloridu sodného dochází ke snižování klíčivosti semen. Semena genotypu cv. Rutgers (WT) klíčila ve tmě na základním médiu téměř stoprocentně a s rostoucí koncentrací chloridu sodného docházelo k postupnému snižování klíčení. Naproti tomu semena kultivována na základním médiu na modrém a červeném světle klíčila výrazně méně a s postupně vyšší koncentrací NaCl se klíčivost prudce snižovala až téměř na nulu.



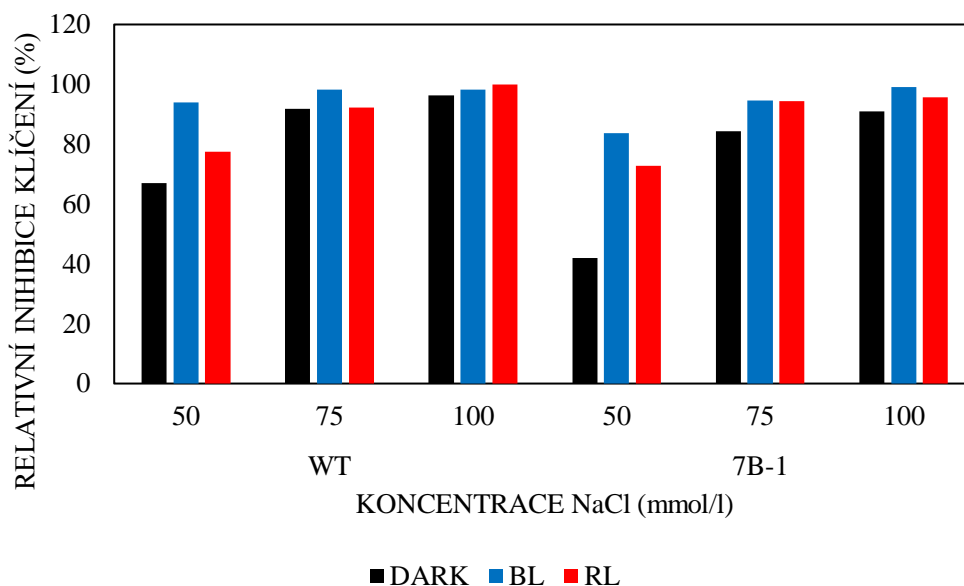
Obr. 6: Závislost klíčivosti semen *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers v procentech 7. den po výsevu na koncentraci chloridu sodného v mmol/l a světelných podmínkách. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.

Semena mutantního genotypu *7B-1* klíčila na základním médiu téměř 100%, a to, na rozdíl od cv. Rutgers, nezávisle na světelných podmínkách. S rostoucí koncentrací chloridu sodného docházelo k inhibici klíčení semen při různých světelných podmínkách obdobně (Obr. 7).



Obr. 7: Závislost klíčivosti semen mutantu *7B-1* v procentech 7. den po výsevu na koncentraci chloridu sodného v mmol/l a světelných podmínkách. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.

Obrázek 8 reprezentuje relativní inhibici klíčení semen obou genotypů. Je vidět, že zatímco klíčivost semen genotypu WT se zvyšující se koncentrací NaCl byla inhibována téměř stoprocentně, klíčivost semen mutantního genotypu *7B-1* odolávala 50 mmol/l NaCl ve tmě, poté již s vyšší koncentrací NaCl docházelo téměř ke stoprocentní inhibici nezávisle na světelných podmínkách.



Obr. 8: Závislost inhibice klíčení semen *Solanum lycopersicum L.* a jeho mutantu *7B-1* v závislosti na koncentraci chloridu sodného v mmol/l a světelných podmínkách 7. den po výsevu

4.2 Studium exprese genů *PHOT1* a *PHOT2*

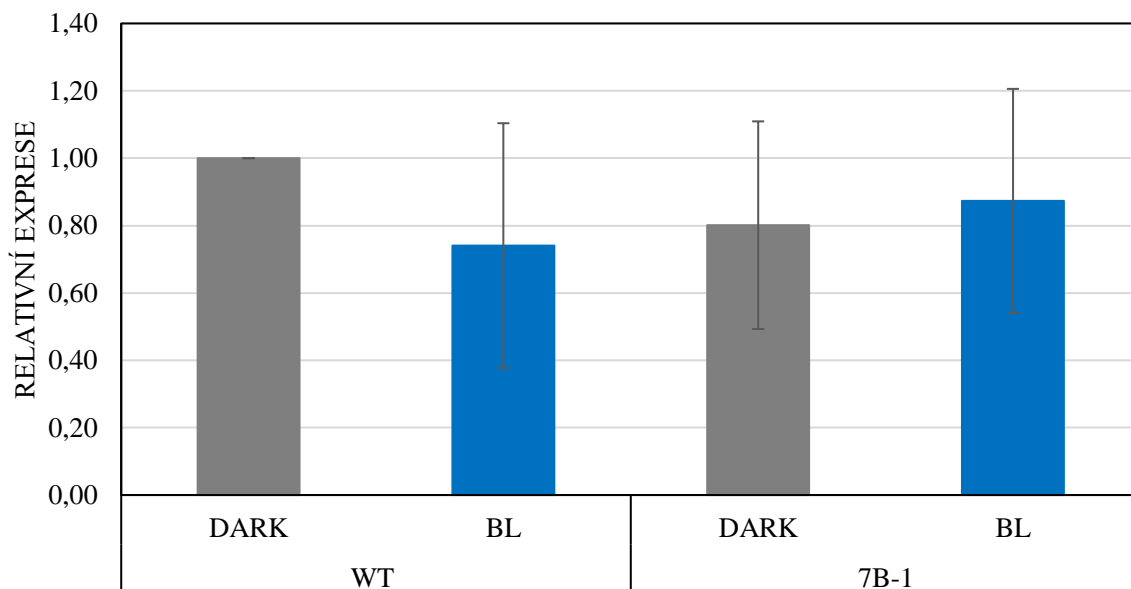
Ke studiu genové exprese byla použita semena rostlin *Solanum lycopersicum cv. Rutgers* – WT a mutantu *7B-1*. Semena byla pěstována na základním médiu MS nebo na MS médiu s přidávkou NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l při světelných podmínkách – tma a modré světlo po dobu 24, 48, 72 a 96 hodin. Exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech ovlivněných NaCl byla studována pouze po 72 hod inkubaci.

Cílem experimentu bylo zjistit, zda je exprese genů zájmu *PHOT1* a *PHOT2* ovlivněna solným stresem a zda je případný vliv zasolení na expresi obou genů ovlivňován modrým světlem. Jako kontrolní vzorek byl považován WT ve tmě na MS médiu nezávisle na čase.

4.2.1 Exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech klíčících na základním MS médiu

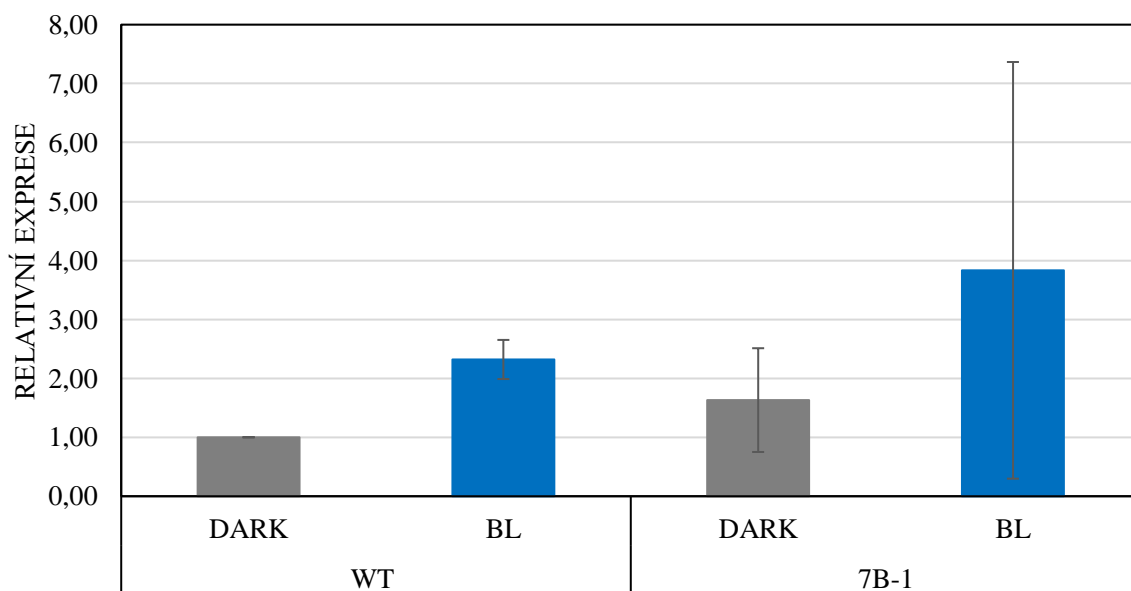
Obrázky 9 a 10 reprezentují data exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* u WT a *7B-1* klíčících 24 hodin na základním MS médiu. Z obrázku 9 je patrné, že exprese genu *PHOT1* je téměř identická nezávisle na druhu genotypu ani na světelných podmínkách, naopak tomu gen *PHOT2* se exprimuje naprosto odlišně (Obr. 10). Na modrém světle dochází k rapidnější expresi genu *PHOT2*, u genotypu *7B-1* je tato exprese vyšší ve srovnání s WT.

PHOT1 - inkubace 24 hodin



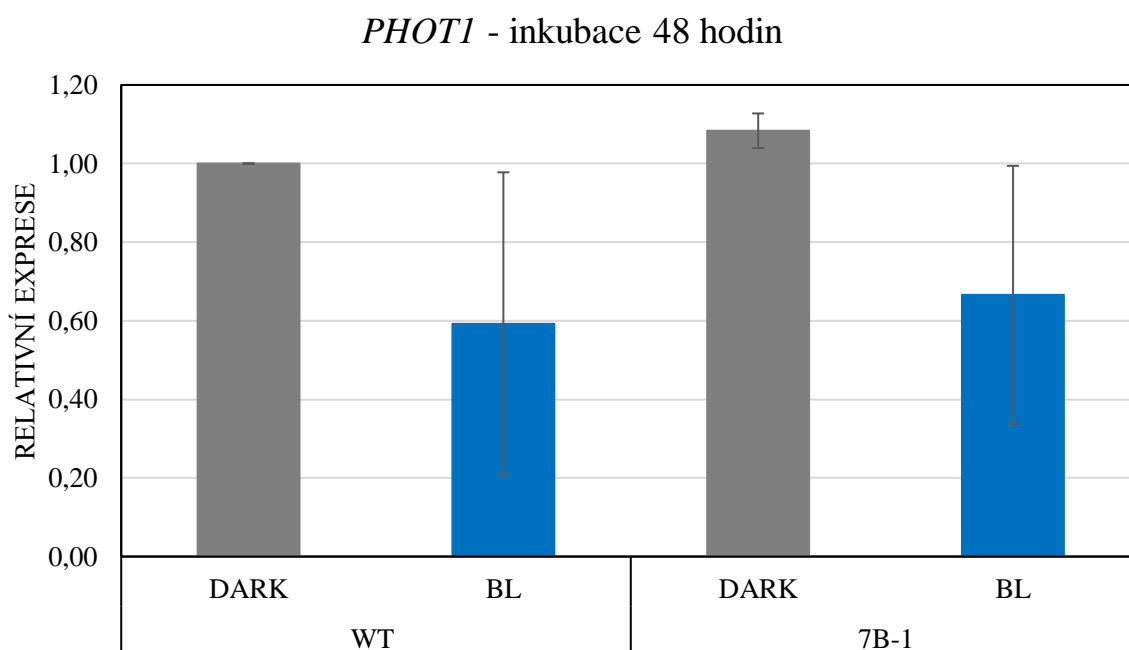
Obr. 9: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 24 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

PHOT2 - inkubace 24 hodin



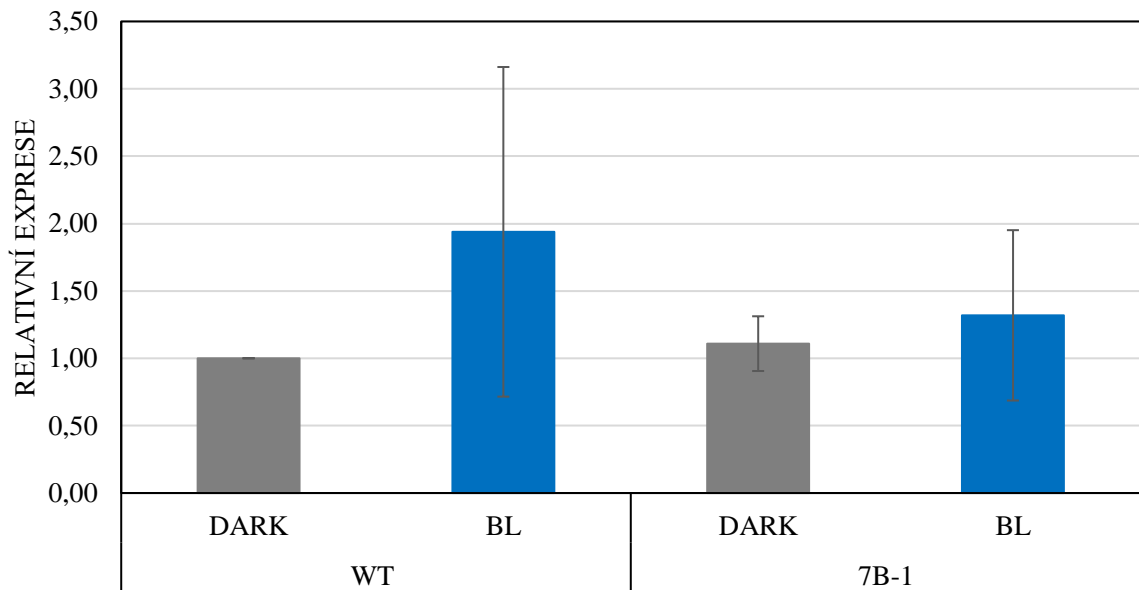
Obr. 10: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 24 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

Po prodloužení doby klíčení semen na základním MS médiu na 48 hodin lze vidět rozdíl v expresi studovaných genů. Gen *PHOT1* se exprimuje téměř identicky v semenech WT a *7B-1* klíčících ve tmě, rovněž na modrém světle dochází u obou genotypů k identické expresi *PHOT1* (Obr. 11). Exprese genu *PHOT2* je také identická u obou genotypu klíčících ve tmě. Naproti tomu, na modrém světle dochází k výraznější expresi *PHOT2* v semenech WT ve srovnání se semeny mutantu *7B-1* (Obr. 12).



Obr. 11: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 48 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

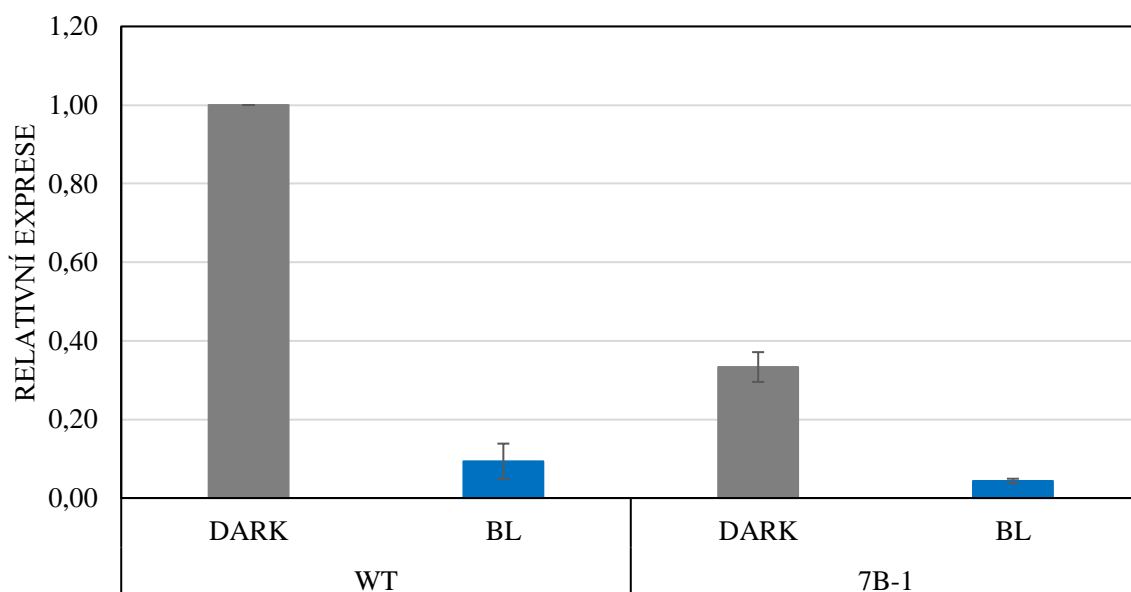
PHOT2 - inkubace 48 hodin



Obr. 12: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 48 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

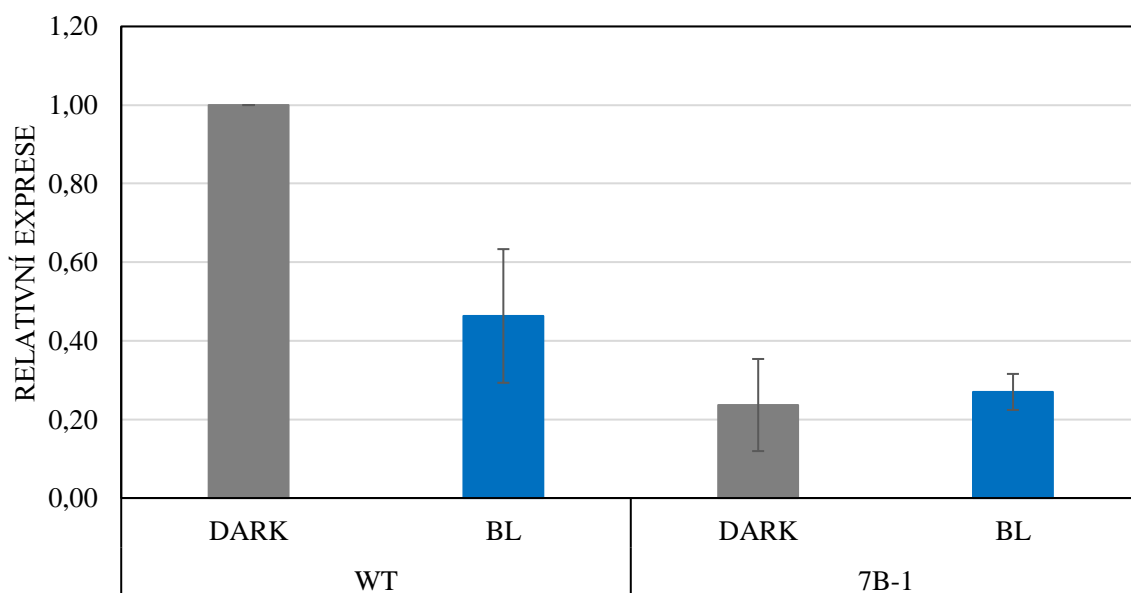
Data experimentů po 72 hodinách ukazují, že exprese genu *PHOT1* probíhá intenzivněji v semenech genotypu WT ve tmě než v semenech *7B-1* klíčících ve tmě, na modrém světle probíhá exprese genu *PHOT1* intenzivněji v semenech WT než v semenech *7B-1* (Obr. 15). U genu *PHOT2* probíhá intenzivnější exprese v semenech WT ve tmě i na modrém světle ve srovnání se semeny *7B-1* (Obr. 16).

PHOT1 - inkubace 72 hodin



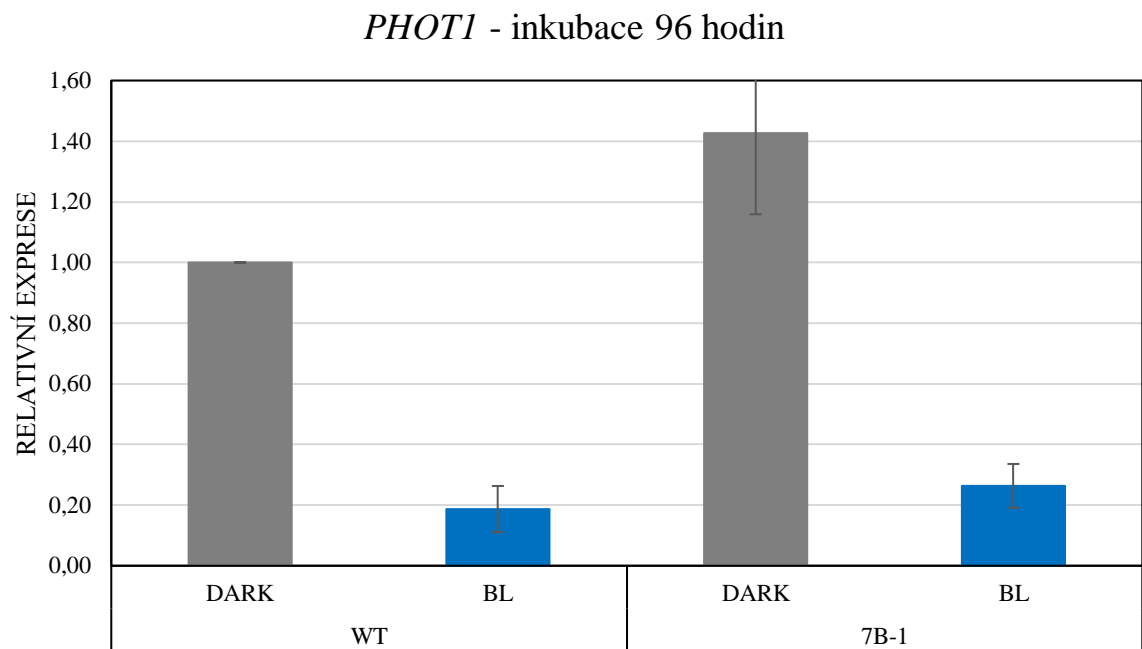
Obr. 13: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 72 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

PHOT2 - inkubace 72 hodin



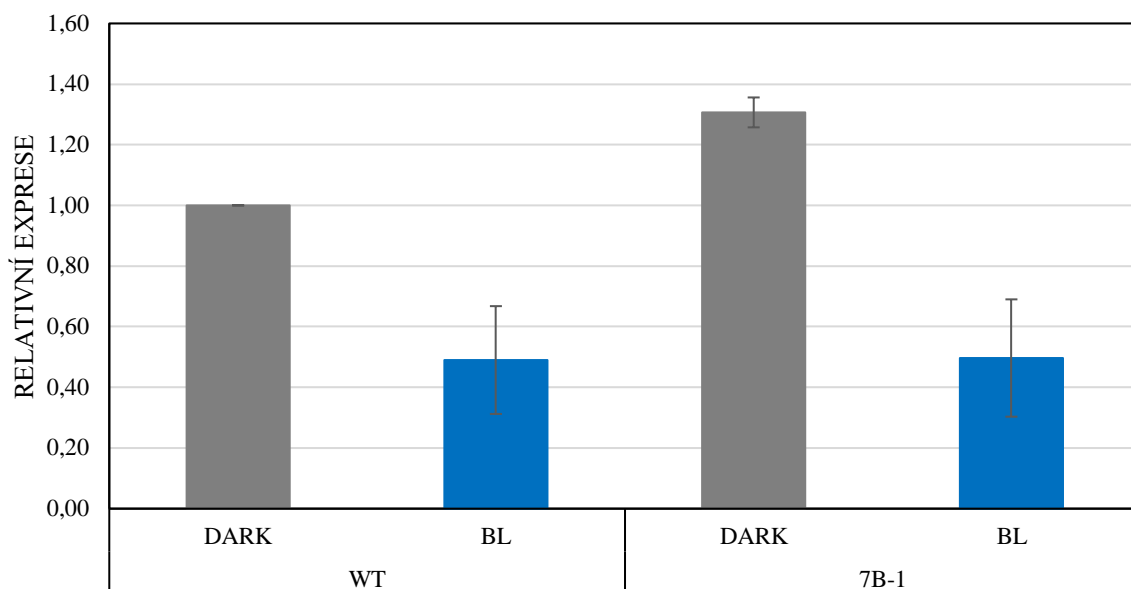
Obr. 14: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 72 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

Data experimentů po 96 hodinách ukazují, že exprese genu *PHOT1* probíhá intenzivněji v semenech genotypu *7B-1* ve tmě než v semenech WT klíčících ve tmě, na modrém světle probíhá exprese *PHOT1* u obou genotypů téměř identicky (Obr. 15). Obdobně je tomu u genu *PHOT2* (Obr. 16).



Obr. 15: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 96 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

PHOT2 - inkubace 96 hodin

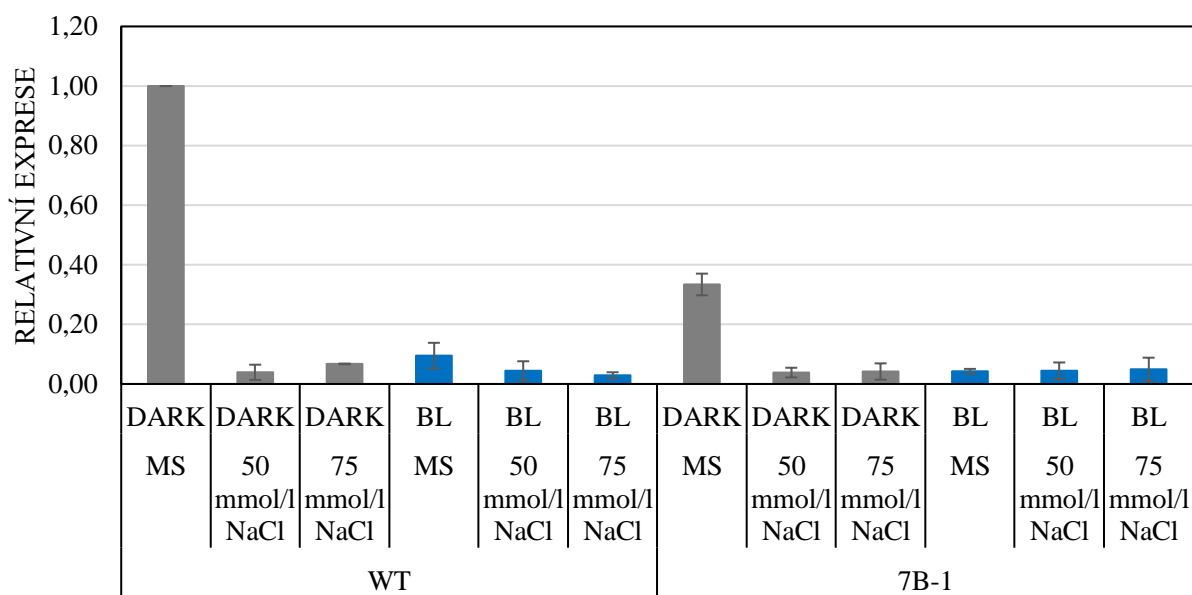


Obr. 16: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace na základním MS médiu – 96 hodin, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

4.2.2 Exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech klíčících na médiu s přídavkem NaCl

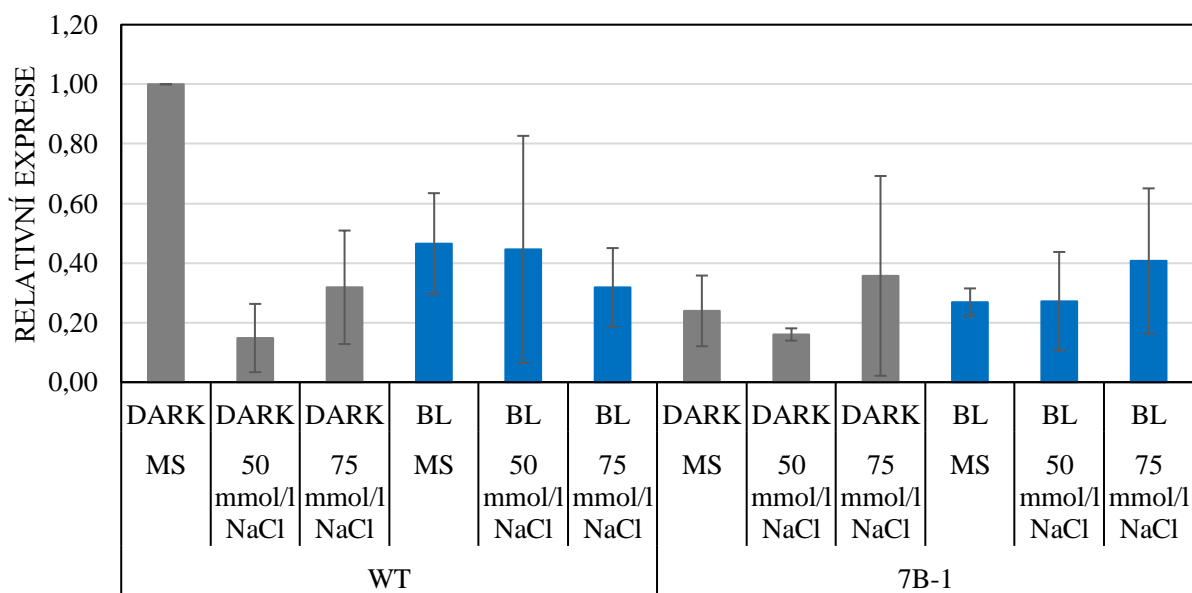
Na obrázcích 17 a 18 jsou vyobrazeny výsledky experimentů probíhajících na základním médiu a na médiu obsahující 50 mmol/l a 75 mmol/l NaCl po dobu 72 hodin. Na obrázku 17 je viditelný trend, že na čím vyšší byla koncentrace NaCl, na které semena klíčila, tím nižší byla exprese genu *PHOT1*. Exprese genu *PHOT1* v semenech mutanta *7B-1* klíčících ve tmě je téměř poloviční ve srovnání se semeny WT klíčící ve tmě. Oproti tomu u genu *PHOT2* dochází ke zvyšující se expresi genu při vyšších koncentracích NaCl v semenech WT ve tmě a v semenech mutanta *7B-1* ve tmě a na modrém světle. V semenech WT klíčících na modrém světle dochází ke snižování exprese s vyšší koncentrací NaCl (Obr. 18).

PHOT1 - inkubace 72 hodin



Obr. 17: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace – 72 hodin, koncentraci NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 2 nezávislých experimentů.

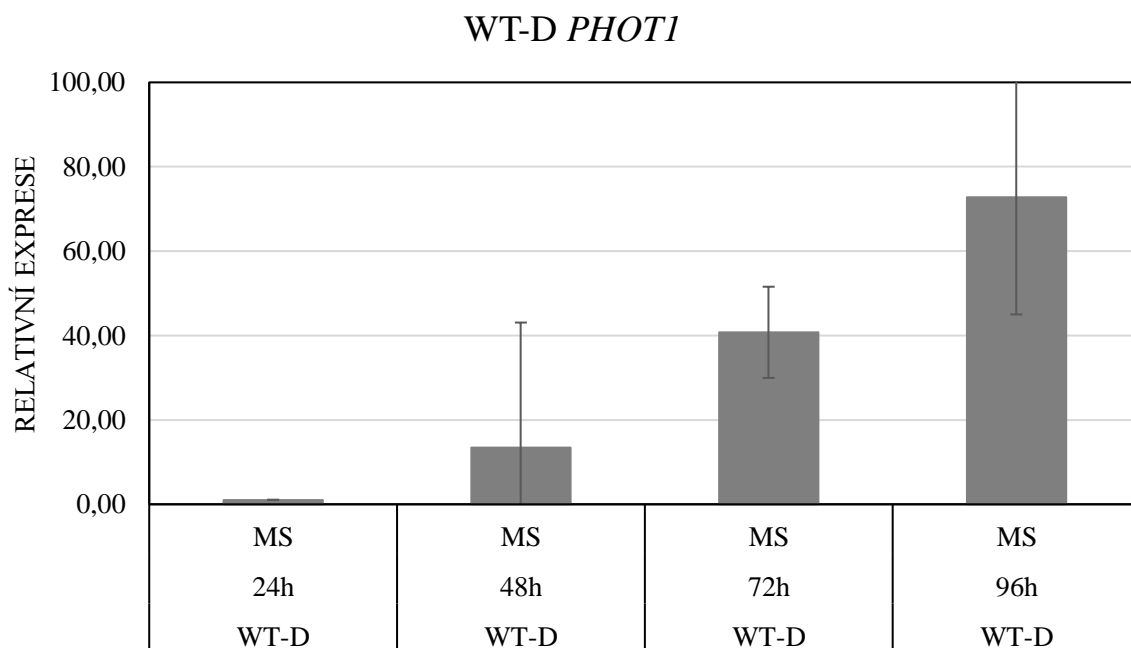
PHOT2 - inkubace 72 hodin



Obr. 18: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT a *7B-1* v závislosti na době inkubace – 72 hodin, koncentraci NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l, a odlišných světelných podmínkách. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 2 nezávislých experimentů.

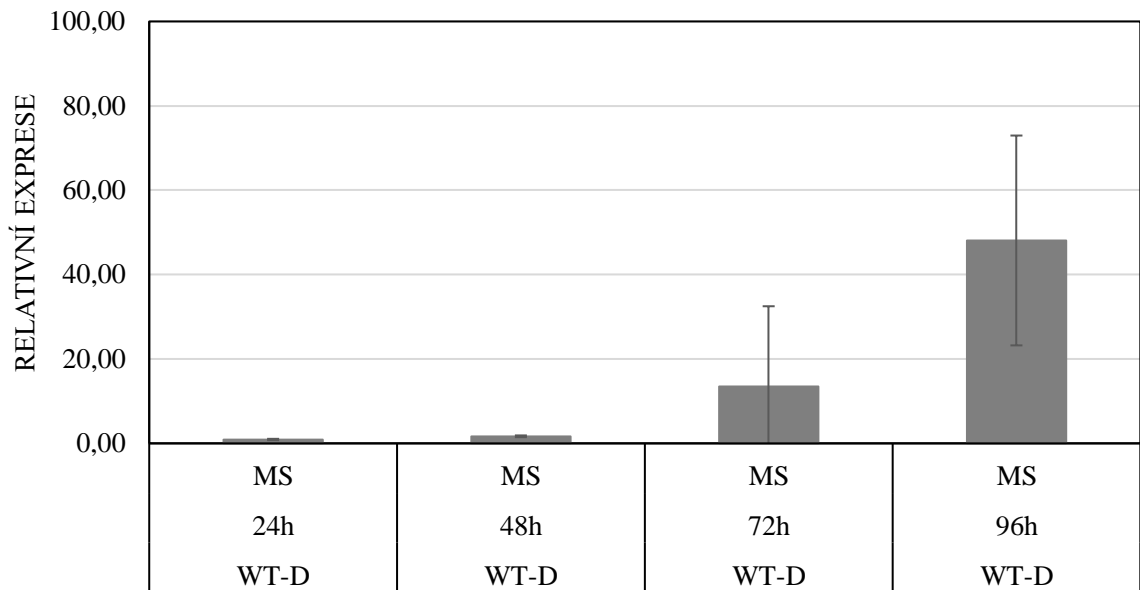
4.2.3 Exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech klíčících na základním MS médiu – sledování vlivu doby inkubace

Obrázky 19–26 reprezentují srovnání exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v semenech jednotlivých genotypů na odlišných světelných podmínkách – tma (D) a modré světlo (BL) v závislosti na době inkubace semen na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Na všech obrázcích je patrné, že dochází ke zvyšování intenzity exprese obou genů s prodlužující se délkou inkubace semen. Při klíčení ve tmě dochází k vyšší expresi genu *PHOT1* u WT než genu *PHOT2* (Obr. 19 a Obr. 20). Semena WT klíčící na modrém světle vykazují zvýšenou expresi genu *PHOT1* ve srovnání s *PHOT2* (Obr. 21 a 22). Obdobně je tomu i u mutanta *7B-1*. Nezávisle na světelných podmínkách dochází k vyšší expresi genu *PHOT1* oproti *PHOT2*.



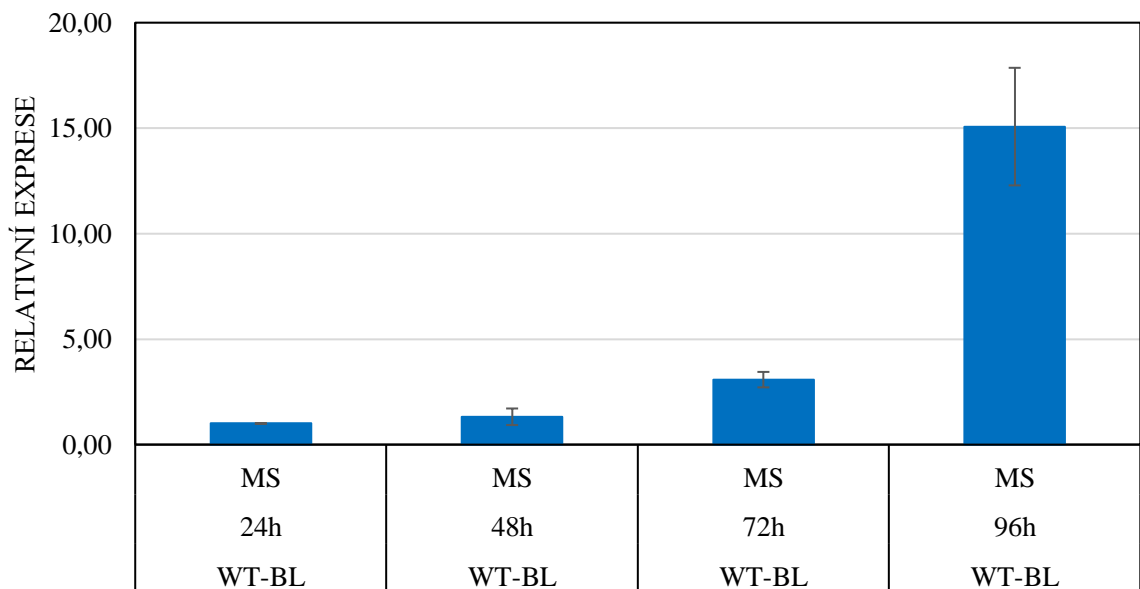
Obr. 19: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT klíčícího ve tmě (D) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

WT-D *PHOT2*



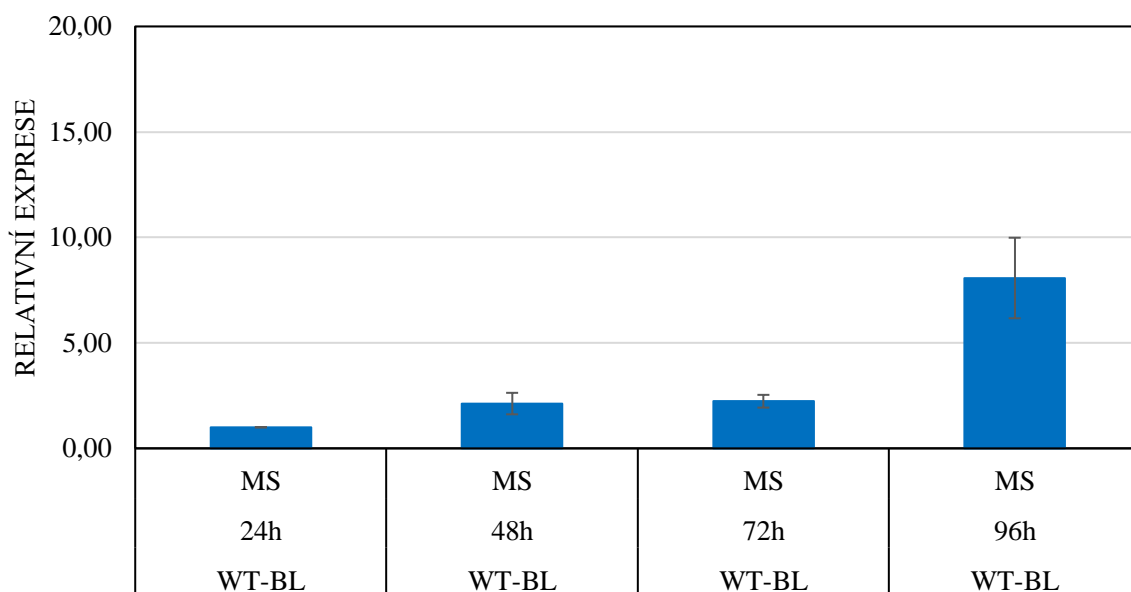
Obr. 20: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT klíčícího ve tmě (D) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

WT-BL *PHOT1*



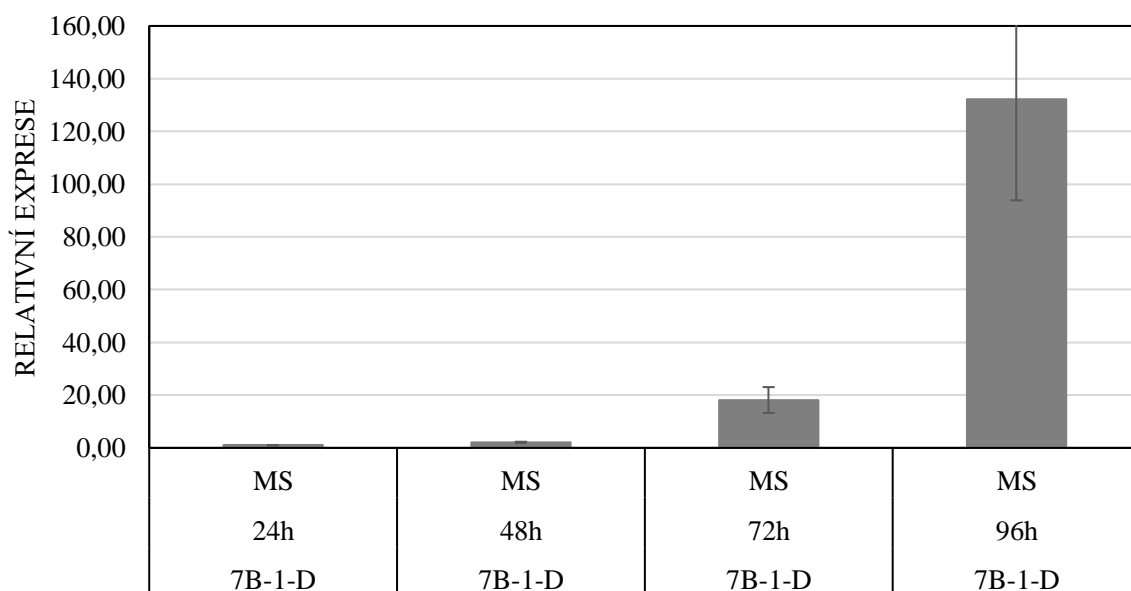
Obr. 21: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech WT klíčícího na modrém světle (BL) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h, a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

WT-BL *PHOT2*



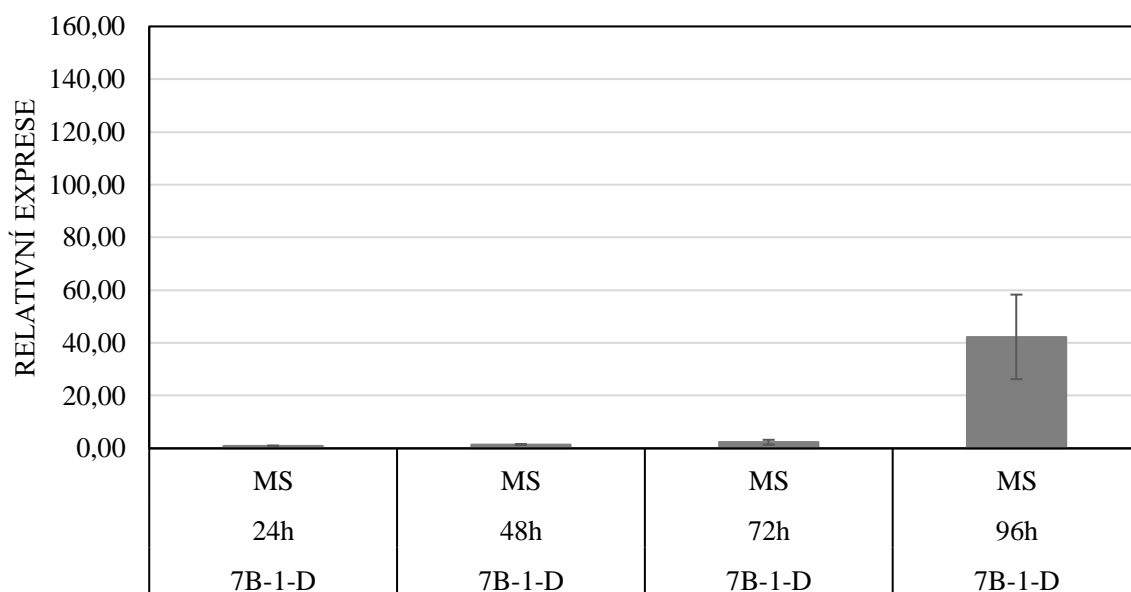
Obr. 22: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech WT klíčícího na modrém světle (BL) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

7B-1-D *PHOT1*



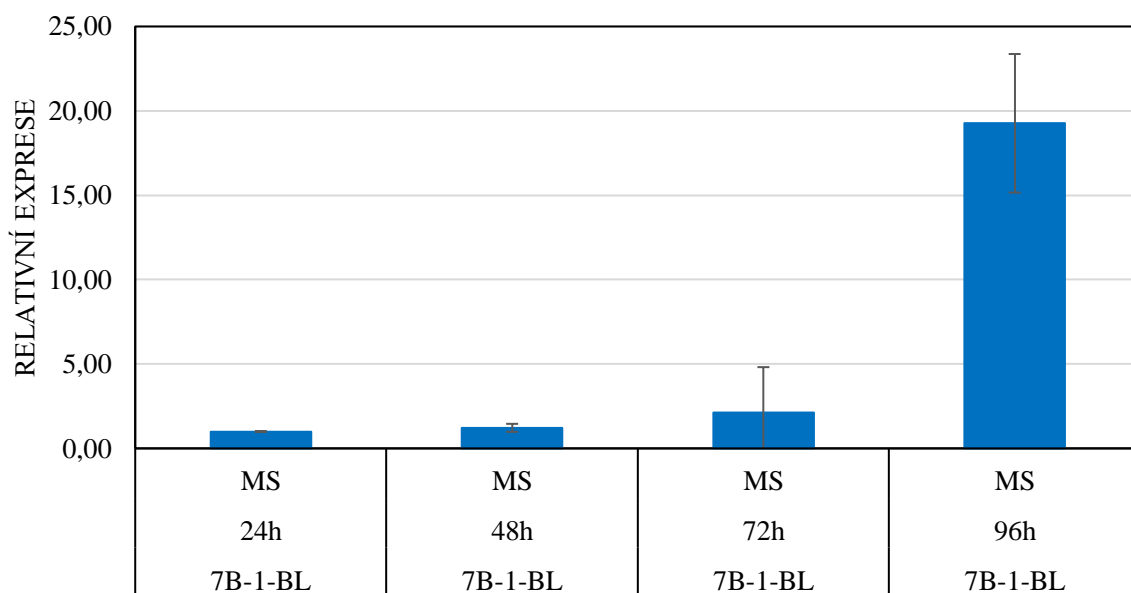
Obr. 23: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech 7B-1 klíčícího ve tmě (D) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

7B-1-D PHOT2



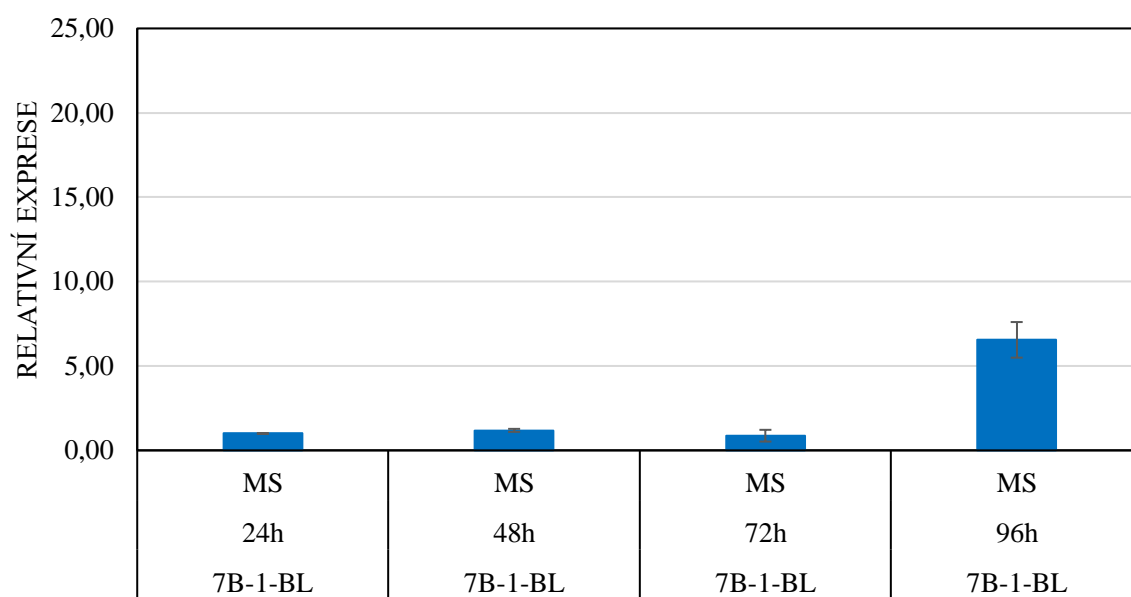
Obr. 24: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech *7B-1* klíčícího ve tmě (D) na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

7B-1-BL PHOT1



Obr. 25: Závislost relativní exprese genu *PHOT1* v semenech *7B-1* klíčícího na modrém světle na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

7B-1-BL *PHOT2*



Obr. 26: Závislost relativní exprese genu *PHOT2* v semenech *7B-1* klíčícího na modrém světle na době inkubace na základním MS médiu – 24 h, 48 h, 72 h a 96 h. Data reprezentují relativní hodnoty exprese vypočítané z CT hodnot \pm SE ze 3 nezávislých experimentů.

5 DISKUZE

Předmětem experimentální části diplomové práce bylo studium vlivu abiotického stresu na signální dráhy modrého světla, které zprostředkovávají fototropiny. Pro toto studium byla vybrána semena *Solanum lycopersicum* L cv. Rutgers a mutanta *7B-1*. Dále byly vybrány kandidátní geny *PHOT1* a *PHOT2*, kódující fotoreceptory modrého světla, jejichž exprese byla studována v semenech v časových intervalech 24-96 hodin po výsevu na kultivační médium. Klíčení semen bylo studováno ve tmě nebo ovlivněno modrým světlem. Semena klíčila na základním MS médiu a na médiu s přídavkem NaCl – v koncentracích 50 mmol/l a 75 mmol/l.

Z dřívějších experimentů byl prokázán negativní vliv modrého světla na toleranci rostlin *Solanum lycopersicum* k zasolení. Mutant *7B-1* má zvýšenou toleranci k zasolení specificky na modrém světle (Fellner et Sawhney, 2002). Ve fyziologických experimentech prováděných v rámci této diplomové práce bylo nejprve studováno, jak je klíčení semen ovlivněno NaCl a jak se citlivost semen mění na modrém světle. Semena klíčila na základním MS médiu a na médiu s přídavkem NaCl – 50 mmol/l, 75 mmol/l a 100 mmol/l. Výsledky experimentů ukázaly, že modré světlo zvyšovalo citlivost semen cv. Rutgers k zasolení, naproti tomu semena mutanta *7B-1* byla méně citlivá k zasolení, jak na modrém světle, tak i ve tmě. Tyto výsledky potvrdily předchozí závěry, že funkční produkt genu *7B-1* snižuje toleranci rostlin k zasolení ve tmě a na modrém světle.

Cílem molekulárních experimentů bylo zjistit, jak modré světlo ovlivňuje expresi genů *PHOT1* a *PHOT2*, zda a jak je exprese těchto receptorů modrého světla ovlivňována solným stresem, a nebo mutací *7B-1*.

Pro analýzu exprese kandidátních genů byla využita kvantitativní RT-PCR. Semena klíčila ve tmě a na modrém světle v časových intervalech 24-96 hodin na MS médiu. Pro studium abiotického stresu – zasolení, byla vybrána doba klíčení 72 hodin a koncentrace NaCl – 50 mmol/l a 75 mmol/l.

Při studiu exprese genu *PHOT1* bylo sledováno, jak je exprese genu ovlivňována světelnými podmínkami – tma a modré světlo, v závislosti na době inkubace – 24-48 hodin. Veškeré výsledky byly porovnávány s genotypem WT klíčícím ve tmě, jehož exprese obou kandidátních genů byla rovna 1. Z výsledků exprese genu *PHOT1* u semen klíčících 24 hodin lze upozorovat, že mutace genu *7B-1* snižuje expresi *PHOT1* ve tmě a na modrém světle. Obdobný jev lze pozorovat i u semen klíčících po dobu 48 hodin.

Změnu pozorujeme u semen klíčících po dobu 72 hodin, kdy vidíme že modré světlo razantně snižuje expresi genu *PHOT1*. Ve srovnání s WT mutace genu *7B-1* také snižuje expresi genu *PHOT1*, ve tmě téměř 3x a 2x na modrém světle. Lze tedy říci, že funkční produkt genu *7B-1* zvyšuje expresi *PHOT1*. Semena klíčící po dobu 96 hodin vykazují jiný trend. Po této době jsou semena již téměř vyklíčená a nedochází ke zvýšení exprese genu *PHOT1* vlivem funkčního produktu genu *7B-1*, takže můžeme usuzovat, že po 96 hodinách funkční produkt *7B-1* nemá vliv na expresi genu *PHOT1*.

Pro gen *PHOT2* vyplývají obdobné výsledky jako pro gen *PHOT1*. Rápidní změna exprese genu *PHOT2* je pozorována u semen klíčících 72 hodin. Zde vidíme, že mutace *7B-1* u semen genotypu *7B-1* snižuje expresi téměř 5x ve tmě i na modrém světle. Modré světlo také snižuje expresi ve srovnání s WT klíčícím ve tmě. Můžeme znovu usuzovat, že funkční produkt *7B-1* zvyšuje expresi genu *PHOT2* ve tmě. U semen klíčících 96 hodin pozorujeme stejný jev exprese *PHOT2* jako u *PHOT1*, tedy že funkční produkt *7B-1* nemá vliv na expresi genu *PHOT2*.

Výsledky experimentů exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v závislosti na koncentraci NaCl v kultivačním médiu a po 72 hod inkubaci ve tmě či na modrém světle ukazují, že modré světlo snižuje expresi genu *PHOT1* a se zvyšující se koncentrací NaCl dochází k dalšímu rapidnímu snižování exprese genu *PHOT1* u obou použitých genotypů ve tmě i na modrém světle. Lze tedy říci, že zasolení negativně ovlivňuje fototropinové dráhy a samotnou expresi genu *PHOT1*.

Při sledování změn exprese obou kandidátních genů vlivem doby inkubace lze vyvodit, že exprese genů *PHOT1* se zvyšuje vlivem doby inkubace postupně u WT klíčícího ve tmě. Ovšem u semen WT klíčících na modrém světle vidíme, že dochází k rapidnějšímu nárůstu exprese genu *PHOT1* po 96 hodinách. Pro genotyp *7B-1* klíčícího ve tmě a na modrém světle lze říci, že výrazné zvýšení exprese *PHOT1* je pozorováno až u semen inkubovaných 96 hodin, i když nárůst exprese *PHOT1* je zřetelný již u semen inkubovaných 72 hodin. Můžeme usuzovat, že funkční produkt genu *7B-1* v průběhu klíčení semen rajčete zrychluje nárůst exprese genu *PHOT1*. Pro gen *PHOT2* můžeme formulovat obdobné závěry jako u genu *PHOT1*.

Z výsledků diplomové práce lze sumarizovat, že exprese genu *PHOT1* je závislá na světelných podmínkách a na abiotickém stresu zasolení. Je tedy možné učinit obecný závěr, že abiotické stresy jsou schopny ovlivňovat světelné signální dráhy modrého světla.

Z výsledků můžeme rovněž usuzovat, že funkční produkt 7B-1 stimuluje expresi genu *PHOT1* v průběhu klíčení semen rajčete, především u semen inkubovaných 72 hodin. Tyto výsledky potvrzují již publikované závěry, že mutace genu *7B-1* narušuje reakce rostliny k modrému světlu zprostředkované specificky fototropiny (Hlavinka et al. 2013). Výsledky v případě genu *PHOT2* jsou nejednoznačné a experimenty bude třeba zopakovat.

6 ZÁVĚR

Cílem diplomové práce bylo zjistit, zda zasolení jako abiotický stres je schopno měnit signální dráhy modrého světla zprostředkované fototropiny. Experimentálním cílem bylo zjistit závislost exprese vybraných kandidátních genů *PHOT1* a *PHOT2* na světelných podmínkách a abiotickém stresu zasolení. Pomocí kvantitativní RT-PCR byly provedeny experimenty studující expresi kandidátních genů v semenech rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. cv Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1* pěstovaných ve tmě a na modrém světle. Výsledky ukázaly, že funkční produkt genu *7B-1* snižuje toleranci semen k zasolení. Výsledky práce potvrdily, že mutace *7B-1* ovlivňuje procesy zprostředkované fototropinovými dráhami. Rovněž bylo zjištěno, že funkční produkt genu *7B-1* zvyšuje expresi genu pro fototropin PHOT1 u semen rajčete inkubovaných po dobu 72 hodin. Po této době již nemá funkční produkt genu *7B-1* na expresi genů vliv. Vlivem abiotického stresu zasolení dochází ke snížení exprese genu *PHOT1*, je tedy zřejmé, že signální dráhy abiotických stresů a modrého světla se ovlivňují. Ovšem z důvodů vysokých standartních chyb v expresi genu *PHOT2* by bylo vhodné dané experimenty zopakovat.

7 ZDROJE

- Ahmad M., Cashmore A. R. Seeing blue: The discovery of cryptochrome. *Plant Molecular Biology*, 851-861, 1996
- Bagnall D. J., King R. W., Hangarter R. P. Blue-light promotion of flowering in absent in *hy4* mutants of *Arabidopsis*. *Planta*, 278-280, 1996
- Banerjee R., Batschauer A. Plant blue-light receptors. *Planta*, 498-502, 2005
- Bergougnoux V., Ježilová E., Fellner M. Is the rate of photosynthesis under blue light altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica*, 477-480, 2012
- Bewley J. D. Seed germination and dormancy. *Plant Cell*, 1055-1066, 1997
- Blumwald E., Aharon G.S., Apse M. P. Sodium transport in plant cells. *Biochimica et Biophysica Acta*, 140-151, 2000
- Borthwick H. A. A reversible photoreaction controlling seed germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 662-666, 1952
- Clough R. C. Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment*, 713-721, 1997
- Epstein E., Norlyn J. D., Rush D. W., Kingsbury R. W. Saline culture of crops: a genetic approach. *Science*, 399-404, 1980
- Fath A., Bethke P.C., Jones R. L. Enzymes that scavenge reactive oxygen species are down-regulate prior to gibberellic acid-induced programmed cell death in barely aleurone. *Plant Physiology*, 156-166, 2001
- Fellner M., Sawhney V. K. Seed germination in tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stress. *Theoretical and Applied Genetics*, 215-221, 2001
- Fellner M., Sawhney V. K. The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*, 675-682, 2002
- Franklin K. A., Larner V. S., Whitelam G. C. The signal transducing photoreceptors of plants. *The International Journal of Developmental Biology*, 653-664, 2005
- Gebhardt Ch.. The historical role of species from the Solanaceae plant family in genetic research. *Theoretical and Applied Genetics*, 1-14, 2016

- Gálvez F. J., Baghout M., Hao G., Cagnac O. Expression of LeNHX isoforms in response to salt stress in salt sensitive and salt tolerant tomato species. *Plant Physiology and Biochemistry*, 109-115, 2012
- Hanssen I. M., Lapidot M. Major tomato viruses in the mediterranean basin. *Advances in Virus Research*, 31-66, 2012
- Hlavinka J., Nauš J., Fellner M. Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, 75-80, 2013
- Christie J. M., Blackwood L., Petersen J., Sullivan S. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, 401-413, 2015
- Ito S., Song Y. H., Imaizumi T. LOV domain containing F-box proteins: light-dependent protein degradation modules in Arabidopsis. *Molecular Plant*, 573-582, 2012
- Ježilová E., Bergougnoux V., Fellner M., Špundová M. Is the rate of photosynthesis altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica*, 477-480, 2012
- Ji H., Pardo J. M., Batelli G., Oosten M. J. V. The salt overly sensitive pathway: established and emerging roles. *Molecular Plant*, 275-286, 2013
- Lin C., Todo T. The cryptochromes. *Genome Biology*, 220, 2005
- Liu H. T., Xuhong Y., Kunwu L., Hongyun Y., Chentao L. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in Arabidopsis. *Science*, 1535-1539, 2008
- Liu H., Wang Q., Liu Y., Zhao X., Imaizumi T., Somers D. E., Tobin E. M., Lin Ch. Arabidopsis CRY2 and ZTL mediate blue-light regulation of the transcription factor CIB1 by distinct mechanisms. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17582-17587, 2013
- Liu J., Chen A., Ji M., Chen J. Analysis of tomato plasma membrane H⁺-ATPase gene family suggest a mycorrhiza-mediated regulatory mechanism conserved in diverse plant species. *Mycorrhiza*, 645-656, 2016
- McCarty D. R., Carson C. B. The molecular genetics of seed maturation in maize. *Physiologia Plant*, 267-272, 1991
- McDonald M. S. *Photobiology of higher plants*. Wiley, 1 edition, 2003

- Montgomery B. L., Lagarias J. C. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends in Plant Science*, 357-366, 2002
- Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 473-497, 1962
- Neff M. M., Chory J. Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B and cryptochrome 1 during *Arabidopsis* development. *Plant Physiology*, 27-36, 1998
- Olias R., Eljakaoui Z., Li J., Jose M., Belver A. The plasma membrane Na⁺/H⁺ antiporter SOS1 is essential for salt tolerance in tomato and affects the partitioning of Na⁺ between plant organs. *Plant, Cell and Environment*, 904-916, 2009
- Pucci A., Picarella M. E., Mazzucato A. Phenotypic, genetic and molecular characterization of *7B-1*, a conditional male-sterile mutant in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 2361-2374, 2017
- Quail P. H. An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant, Cell and Environment*, 657-665, 1997
- Russell J., Ougham H., Thomas H., Waaland S. The molecular life of plants. *American Society of Plant Biologist*, 181, 251, 2012
- Sato S., Shirasawa K., Tabata S. Structural analyses of the tomato genome. *Plant Biotechnology*, 257-263, 2013
- Sawada Y., Aoki M., Nakaminami K., Mitsuhashi W., Tatematsu K., Kushiro T., Toshiba T., Kamila Y. Phytochrome and gibberellin mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*, 1386-1396, 2008
- Sawhney V. K. Genic male sterility. Cambridge University Press, Cambridge UK, 183-198, 1997
- Selby C. P., Sancar A. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 17696-17700, 2006
- Shi H., Ishitani M., Kim C., Zhu J. K. The *Arabidopsis thaliana* salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na⁺/H⁺ antiporter. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 6896-6901, 2000
- Slavík B. Květena České republiky 7. Academia, 2004

- Sullivan J. A., Deng X. W. From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology*, 289-297, 2003
- Swartz T. E., Tseng T. S., Frederickson M. A. Blue-light-activated histidine kinases: two component sensors in bacteria. *Science*, 1090-1093, 2007
- Taiz L., Zeiger E., Moller I. M., Murphy A. *Plant Physiology and Development*, 6th edition, Sunderland, Ma: Sinauer Associates, 2002.
- Taiz L., Zeiger E. *Plant Physiology*, 5th edition, Sunderland, MA: Sinauer Associates, 2010
- Thiele A., Herold M., Lenk I., Quail P. H., Gatz Ch. Heterologous expression of Arabidopsis phytochrome B in transgenic potato influences photosynthetic performance and tuber development. *Plant Physiology*, 73-82, 1999
- Wu S. J., Lei D., Zhu J. K. SOS1, a genetic locus essential for salt tolerance and potassium acquisition. *Plant Cell*, 617-627, 1996
- Yang H. Q., Tang R. H., Cashmore A. R. The signaling mechanism of Arabidopsis CRY1 involves direct interaction with COP1. *Plant Cell*, 2573-2587, 2001
- Yasuda M., Ishikawa A., Jikumaru Y., Seki M., Umezawa T., Asami T., Nakashita A. M., Kudo T., Shinozaki K., Yoshida S., Nakashita H. Antagonistic interaction between systemic acquired resistance and the abscisic acid – mediated abiotic stress response in Arabidopsis. *Plant Cell*, 1678-1692, 2008
- Zhu J. K., Liu J., Xiong L. Genetic analysis of salt tolerance in Arabidopsis: evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell Online*, 1181-1191, 1998

8 INTERNETOVÉ ZDROJE

Autor neuveden. *Blanokřídlí v Praze* [online]. [cit. 15.7.2019]. Dostupný na [www:
http://www.blanokridlivpraze.cz/rostliny/detail/?rosId=208](http://www.blanokridlivpraze.cz/rostliny/detail/?rosId=208)

Elaine Tobin. *Mobot* [online]. [cit. 15.7.2019]. Dostupný na [www:
https://www.mobot.org/jwcross/duckweed/phytochrome.htm](https://www.mobot.org/jwcross/duckweed/phytochrome.htm)