

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Růstové reakce mutanta *7B-1* k brassinosteroidům
v závislosti na světelných podmínkách**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|----------------------------------|
| Autorka: | Lucie Pilařová |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2014 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Lucie Pilařová |
| Název práce | Růstové reakce mutantu <i>7B-1</i> k brassinosteroidům v závislosti na světelných podmínkách |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů, Skupina molekulární fyziologie |
| Vedoucí práce | doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2014 |
| Abstrakt | <p>Předložená bakalářská práce se věnuje studiu růstových reakcí recesivního monogenního mutantu rajčete <i>7B-1</i> k brassinosteroidům za různých světelných podmínek. Teoretická část patří literární rešerši na téma mutace <i>7B-1</i> a její fenotypové projevy, brassinosteroidy, jejich signální dráha a interakce se signální dráhou světla. V experimentální části práce bylo zjištěno, že mutace <i>7B-1</i> ovlivňuje růstové reakce hypokotylu a prodlužování epidermálních buněk hypokotylu specificky na modrém světle. Byla také provedena analýza endogenní hladiny brassinosteroidů u rostlin mutantu <i>7B-1</i> kultivovaných za různých světelných podmínek. Byla porovnána intenzita exprese genu pro brassinosteroidní receptor BRI1 mezi mutantem <i>7B-1</i> a standardním genotypem. Na základě výsledků z těchto experimentů bylo navrženo schéma, jež ukazuje možnou funkci produktu genu <i>7B-1</i> v interakci signálních drah modrého světla a brassinosteroidů.</p> |
| Klíčová slova | <i>24-epibrassinolid</i> , <i>24-epikastasteron</i> , <i>7B-1</i> , brassinosteroidy, BRI1, modré světlo, rajče |
| Počet stran | 65 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český |

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|---|
| Author's first name and surname | Lucie Pilařová |
| Title of thesis | Growth responses of tomato mutant <i>7B-1</i> to brassinosteroids as a function of light conditions |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators, Group of molecular physiology |
| Supervisor | doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| The year of presentation | 2014 |

Abstract

The presented bachelor thesis studies growth responses of recessive single-gene tomato mutant *7B-1* to brassinosteroids as a function of light conditions. The theoretical part of this work consists in review of *7B-1* mutant and its phenotype, brassinosteroids, their signaling pathway and a crosstalk between BRs and light. The experimental part shows that *7B-1* mutation affects growth responses of hypocotyl and epidermal cells under blue light. An analysis of endogenous brassinosteroids levels in tomato *7B-1* and wild type was performed as a part of this work, along with a comparison of expression of *BRI1* gene in mutant *7B-1* and wild type. Based on the experimental data, the working model was proposed showing possible function of *7B-1* gene product in crosstalk between blue light signaling and brassinosteroids.

Keywords 24-*epi*brassinolide, 24-*epi*castasterone, *7B-1*,
bluelight, brassinosteroids, BRI1, tomato

| | |
|----------------------|-------|
| Number of pages | 65 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech |

„Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D s použitím citované literatury.“

V Olomouci dne

Poděkování:

Ráda bych poděkovala především doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D za odborné vedení, cenné rady a čas, který mi při řešení této práce věnoval.

Dále chci také poděkovat členům Skupiny molekulární fyziologie, zvláště pak Mgr. Renátě Plotzové a Mgr. Janě Balarynové, za přínosné rady a pomoc při experimentech.

Vřelé díky patří také Mgr. Danuši Tarkowské, Ph.D. za provedení analýzy brassinosteroidů, RNDr. Pavle Válové za poskytnutí mikroskopu a Haně Martinkové za pořízení fotografií rostlin.

Obsah

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | Úvod a cíle práce..... | 8 |
| 2 | Současný stav řešené problematiky | 9 |
| 2.1 | <i>Mutant rajčete 7B-1</i> | 9 |
| 2.1.1 | Původ mutantu 7B-1 | 9 |
| 2.1.2 | Vztah mutace 7B-1 ke kyselině abscisové | 10 |
| 2.1.3 | Vztah mutace 7B-1 k oxidu dusnatému..... | 11 |
| 2.1.4 | Vztah mutace 7B-1 k fytohormonům | 11 |
| 2.1.5 | Mutant 7B-1 a biotický stres..... | 13 |
| 2.1.6 | Vztah mutace 7B-1 k antokyanům | 13 |
| 2.1.7 | Růstové reakce mutantu 7B-1 ke světlu | 14 |
| 2.2 | <i>Brassinosteroidy.....</i> | 16 |
| 2.2.1 | Biologická aktivita a biosyntéza brassinosteroidů..... | 17 |
| 2.2.2 | Percepce a signální dráha brassinosteroidů | 20 |
| 2.3 | <i>Interakce signální dráhy brassinosteroidů a světla</i> | 22 |
| 2.3.1 | Fotoreceptory..... | 22 |
| 2.3.2 | Světlo a BRs | 22 |
| 3 | Materiál a metodika..... | 25 |
| 3.1 | <i>Rostlinný materiál</i> | 25 |
| 3.2 | <i>Pracovní postupy.....</i> | 25 |
| 3.2.1 | Příprava média..... | 25 |
| 3.2.2 | Používané koncentrace brassinosteroidů..... | 26 |
| 3.2.3 | Výsev semen a přenos rostlin | 26 |
| 3.2.4 | Měření délky rostlin a epidermálních buněk hypokotylu | 27 |
| 3.2.5 | Měření hladiny endogenních brassinosteroidů | 28 |
| 3.2.6 | Expresce genu kódujícího receptor BRI1..... | 29 |
| 4 | Výsledky..... | 33 |
| 4.1 | <i>Fenotypy rostlin v závislosti na světelných podmínkách</i> | 33 |
| 4.2 | <i>Růstové reakce kořene a hypokotylu k BRs.....</i> | 36 |
| 4.2.1 | Reakce k 24-epibrassinolidu | 36 |
| 4.2.2 | Reakce k 24-epikastasteronu..... | 41 |
| 4.3 | <i>Délka epidermálních buněk hypokotylu.....</i> | 44 |
| 4.4 | <i>Analýza endogenní hladiny brassinosteroidů.....</i> | 46 |
| 4.5 | <i>Expresce genu BRI1</i> | 50 |

| | | |
|---|----------------------|----|
| 5 | Diskuze | 53 |
| 6 | Závěr | 56 |
| 7 | Seznam zkratek | 57 |
| 8 | Literatura | 58 |

1 Úvod a cíle práce

Recesivní monogenní mutant rajčete *7B-1* byl izolován pro svou samčí sterilitu projevující se pouze při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy (Sawhney, 1997). Jeho další fyziologické studie však prokázaly komplexní (pleiotropický) efekt této mutace. Mutant *7B-1* se ukázal být odolnější vůči abiotickému i biotickému stresu díky nadprodukcí kyseliny abscisové (Fellner and Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2009). Jeho vyšší tolerance ke stresu je specificky zvýrazněná na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002). Endogenní hladiny dalších rostlinných hormonů, jako jsou ethylen, kyselina indolyl-3-octová, gibereliny či isopentenyladenin, jsou účinkem mutace *7B-1* sníženy (Fellner *et al.*, 2001; Fellner *et al.*, 2005; Bergougnoux *et al.*, 2012). U mutantu *7B-1* byla také pozorována změna v de-etiolizaci a v prodlužování hypokotylu i epidermálních buněk při působení modrého světla na rostlinu (Fellner and Sawhney, 2002; Bergougnoux *et al.*, 2012). Funkce genu, ve kterém je mutant *7B-1* defektní, není dosud objasněná. Z předešlých experimentů však vyplývá, že by se mohlo jednat o mutaci v elementu signální dráhy modrého světla zprostředkované fototropiny (Hlavinka *et al.*, 2013).

Předkládaná bakalářská práce s názvem „Růstové reakce mutantu *7B-1* k brassinosteroidům za různých světelných podmínek“ si klade za cíl pomocí fyziologických a molekulárních metod osvětlit potenciální vztah mutace *7B-1* k další skupině rostlinných hormonů – brassinosteroidům. Případně podhalit možnou spojitost zatím neznámého produktu genu *7B-1* s biosyntézou či signální dráhou brassinosteroidů.

Tato práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí společného pracoviště Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky. Práce byla finančně podpořena projektem PostUP (Podpora vytváření excelentních výzkumných týmů a intersektorální mobility na Univerzitě Palackého v Olomouci), č. projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0004.

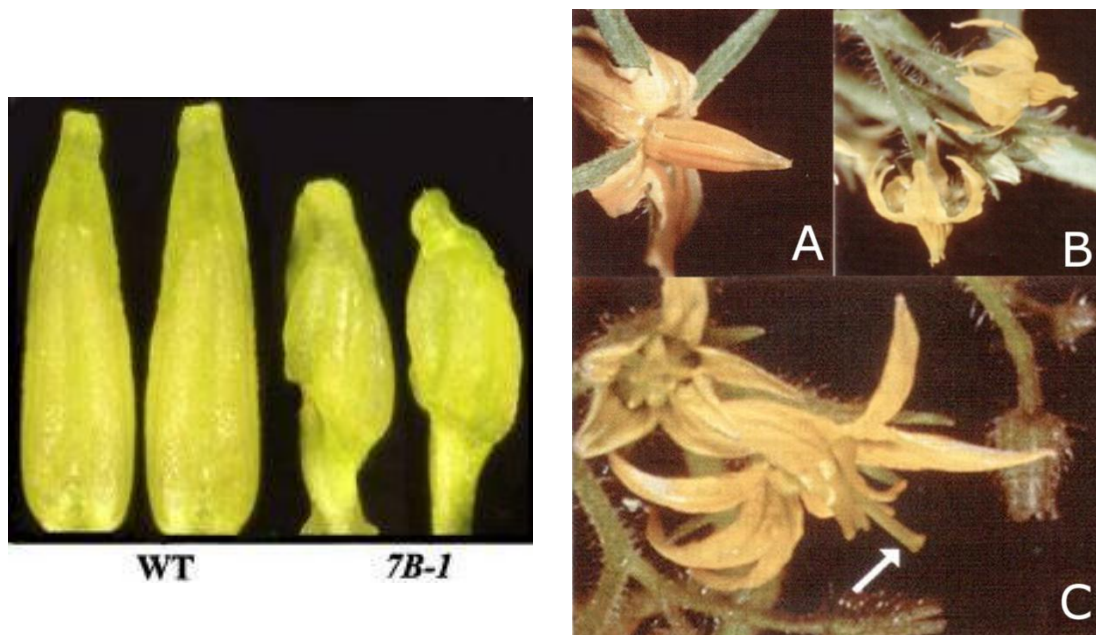
2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Mutant rajčete 7B-1

2.1.1 Původ mutanta 7B-1

Lilek rajče, latinským názvem *Solanum lycopersicum* L., patří do čeledi lilkovitých (*Solanaceae* Juss.). Jedná se o hospodářsky významnou plodinu, a proto je využívána také pro výzkum v oblasti rostlinné fyziologie a genetiky. Pro tyto účely jsou často využívány mutantní rostliny (tzv. genetický přístup), které svým odlišným fenotypem mohou demonstrovat změny probíhající na molekulární úrovni. Své nezastupitelné místo mají při studiu působení světla, biotických či abiotických stresů na rostlinu, nebo také při výzkumu rostlinných hormonů a jejich interakcí.

Recesivní monogenní mutant rajčete 7B-1 byl původně izolován z populace kultivaru Rutgers (dále WT, wild-type) pro svou samčí sterilitu projevující se pouze za dlouhého dne, tedy při 16 hod světelné fotoperiodě (Sawhney, 1997). Při této fotoperiodě se v květech mutované rostliny vyvíjejí sraštělé tyčinky (Obr. 1 vlevo), které produkují mikrospory s nízkou životností. Květy 7B-1 jsou nápadné také dlouhým pestíkem, který vyčnívá z koruny (Obr. 1 vpravo, C). Naopak zkrátí-li se doba osvětlení pouze na 8 hodin světla, pak se rostliny 7B-1 stávají fertillními a vytváří plody se



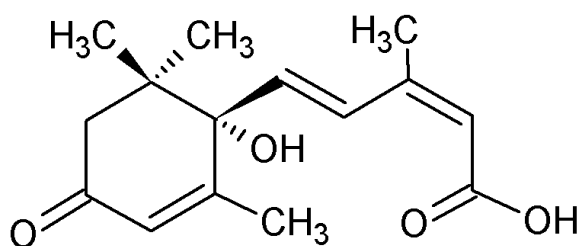
Obr. 1: Vlevo: Tyčinky rostlin WT a 7B-1 pěstovaných na dlouhém dni (při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy) (převzato z Sheoran et al., 2009). Vpravo: A - květ WT pěstovaného na dlouhém dni; B – květy 7B-1 na krátkém dni (8 hodin světla a 16 hodin tmy), u takto pěstovaných rostlin je blizna uzavřena v květu; C – květ 7B-1 na dlouhém dni. V květu se nacházejí krátké tyčinky, šipka ukazuje čnělku a bliznu vyčnívající z květu. (převzato ze Sawhney, 2004).

semeny.

Rostliny vykazující samčí sterilitu jsou často používány ve šlechtitelských programech, ale jejich využití je limitováno tím, že bývají často citlivé k abiotickým stresům. Mutant *7B-1* byl pro tyto účely shledán jako zajímavý systém. Bylo totiž experimentálně prokázáno, že jeho semena vykazují zvýšenou odolnost vůči osmotickému stresu, zasolení a nízké teplotě. U standardního genotypu (cv. Rutgers, WT) byla při exogenní aplikaci manitolu, polyethylenglykolu či při zasolení pozorována inhibice klíčení. U mutantu *7B-1* byla klíčivost semen pod osmotickým stresem výrazně vyšší, zvláště pokud byly rostliny pěstovány na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2001, 2002).

2. 1. 2 Vztah mutace *7B-1* ke kyselině abscisové

Jedním z možných mechanismů, jak rostliny mohou odolávat abiotickému stresu, je akumulace kyseliny abscisové (ABA) (Obr. 2) (Goldbach and Michael, 1976; Daie and Campbell, 1981; Mäntylä *et al.*, 1995), která kromě regulace klíčení a růstu rostlin způsobuje také uzavírání průduchů (Taiz and Zeiger, 2010). Proto proběhlo testování mutantu *7B-1* k fluridonu (inhibitoru biosyntézy ABA) a k exogenně přidané ABA. Na světle byla prokázána vyšší citlivost semen *7B-1* k exogenní ABA než u semen standardního genotypu. Fluridon zvyšoval odolnost semen vůči manitolu a solím u obou genotypů, avšak u *7B-1* již v nižších koncentracích. Částečná rezistence mutantu *7B-1* ke stresům je tedy s největší pravděpodobností spojena se zvýšenou hladinou pre-existující ABA v semenech i hypokotylech těchto rostlin (Fellner and Sawhney, 2001). Růst kořene genotypu *7B-1* byl desetkrát více inhibován účinkem exogenní ABA, avšak pouze pokud byly rostliny pěstovány na dlouhém dni (Fellner *et al.*, 2001). Bílé světlo a zvláště jeho modrá složka zvyšuje inhibiční účinek ABA a manitolu na semena WT. Rezistence semen i hypokotylu mutantu *7B-1* k těmto látkám je specificky zvýrazněna na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002).



Obr. 2: Vzorec kyseliny abscisové (ABA)

2. 1. 3 Vztah mutace *7B-1* k oxidu dusnatému

Jednou z látek hrající významnou roli v signální dráze ovlivňující klíčení semen indukované světlem, ale také v odpovědi na abiotický stres či patogeny, je oxid dusnatý (NO). Působí v rostlinách též jako antioxidant a chrání rostliny před zvýšenou koncentrací reaktivních forem kyslíku (Taiz and Zeiger, 2010). U rajčete lze přidáním donoru oxidu dusného narušit dormanci semen a stimulovat tak klíčení. Oxid dusnatý je zapojen i v signální dráze ABA, která kontroluje otevírání průduchů specificky na modrém světle (Desikan *et al.*, 2002). Inhibice klíčení semen způsobená vysokou hladinou ABA či osmotickým stresem je alespoň částečně spojená se sníženou koncentrací oxidu dusnatého v semenech rajčete. Klíčící semena genotypu *7B-1*, která byla vystavena osmotickému stresu, produkují více oxidu dusnatého než semena WT. Zároveň byla pozorována větší akumulace oxidu dusnatého v rostlinách *7B-1*. Hladina oxidu dusnatého i ABA pod osmotickým stresem je ovlivňována světlem. Modré světlo konkrétně zvyšuje intenzitu odpovědi na stres. Pod osmotickým stresem vede defekt v genu *7B-1* ke snížené akumulaci ABA a zároveň zvýšené akumulaci oxidu dusnatého, což vede k aktivaci katabolismu ABA a dalšímu snížení její endogenní hladiny (Piterková *et al.*, 2012).

2. 1. 4 Vztah mutace *7B-1* k fytohormonům

Dále byl také zkoumán vztah mutace *7B-1* k produkci ethylenu v rostlině. Tento plyný fytohormon ovlivňuje růst kořene, senescenci pletiv a také takzvanou trojnou odezvu (triple response) u etiolovaných rostlin (Obr. 3). Jedná se o redukované prodlužování hypokotylu, hypertrofii (ztloustnutí) hypokotylu a vytvoření háčku (Taiz and Zeiger, 2010). Biosyntéza ethylenu v rostlinách je ovlivněna ostatními fytohormony jako například ABA (Spollen *et al.*, 2000), jejíž produkce je u genotypu *7B-1* zvýšena (Fellner and Sawhney, 2001). Proto byla testována reakce rostlin k prekurzoru ethylenu, kterým je 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina (ACC). Ve tmě

vykazoval mutant *7B-1* i WT srovnatelnou trojnou odezvu k exogenně aplikované ACC. Světlo podporuje v rostlinách rajčete konverzi ACC na ethylen. Hypokotyl mutantu na světle byl více citlivý k ACC, ale naopak méně k inhibitoru aktivity ethylenu, thiosulfátu stříbrnému). Jedno i sedmidenní mutantní rostliny produkovaly snížené množství ethylenu. Jejich listy vykazovaly zvýšenou koncentraci chlorofylu, který byl při odpovědi na ACC více degradován (Fellner *et al.*, 2005).

Snížená produkce ethylenu v rostlinách *7B-1* je pravděpodobně spojena s vyšší endogenní hladinou ABA. Zvýšená senzitivita k ethylenu ani jeho redukováná produkce není primárním defektem mutantu *7B-1*, jelikož ve tmě je jeho růstová reakce k ethylenu stejná jako u WT.



Obr. 3: Trojná odezva (*triple response*) u etiolizovaných rostlin hrachu. Šestidenní rostliny byly pěstovány ve tmě bez přítomnosti ethylenu (vlevo) či za jeho přítomnosti (vpravo) (převzato z Taiz a Zeiger, 2002).

Analýza hladiny dalších rostlinných hormonů ukázala, že koncentrace kyseliny indolyl-3-octové (IAA) a růstově aktivních giberelinů (GAs) je oproti kontrolním rostlinám snížena. Tyto odchylky byly opět výraznější u rostlin vystavených dlouhému dni (Fellner *et al.*, 2001). Endogenní hladina některých rostlinných hormonů je ovlivněna světelnými podmínkami (Kraepiel and Miginiac, 1997), světlo také ovlivňuje senzitivitu pletiv k těmto hormonům (Szekeres *et al.*, 1996).

Cytokiny hrají významnou roli při fotomorfogenezi včetně vývoje chloroplastů. Jejich exogenní přidání způsobuje de-etiolizaci rostlin rostoucích ve tmě (Taiz and Zeiger, 2010). Isopentenyladenin (iP) patří mezi cytokiny a účastní se procesu fotomorfogeneze indukované modrým světlem. V hypokotylech etiolovaných rostlin se vyskytuje ve velmi malém množství. Naopak v hypokotylech rostlin standardního genotypu, které byly vytaveny modrému světlu, byla prokázána jeho silná akumulace.

To však neplatilo pro mutanta *7B-1*. U rostlin mutantního genotypu zvýšená koncentrace iP indukovaná modrým světlem zaznamenána nebyla. Z toho vyplývá, že defekt v genu *7B-1* ovlivňuje syntézu volného iP (Bergougnoux *et al.*, 2012).

2. 1. 5 Mutant *7B-1* a biotický stres

Koronatin je fytoxin, který je produkován patogenem *Pseudomonas syringae*. V rostlinách standardního genotypu způsobuje degradaci chlorofylu, akumulaci antokyanů a změny v rostlinném metabolismu, konkrétně koncentraci aminokyselin (více tryptofanu a asparaginu na úkor alaninu a aspartátu). Mutant *7B-1* je méně citlivý k tomuto fytoxinu a jeho chlorofyl je méně degradován specificky na modrém světle (Bergougnoux *et al.*, 2009).

2. 1. 6 Vztah mutace *7B-1* k antokyanům

Antokyaniny jsou jedny z nejvíce rozšířených tříd pigmentů vyšších rostlin. Jedná se o sekundární metabolity flavonoidové biosyntetické dráhy (Taiz and Zeiger, 2010). Jejich biosyntéza je ovlivněna strukturálními geny kódujícími enzymy zapojené v biosyntéze, a regulátorovými geny, které kontrolují transkripci strukturálních genů (Piazza *et al.*, 2002, Winkel-Shirley, 2001).

Na regulaci biosyntézy a akumulaci antokyanů se podílejí jak vnější faktory (světlo, teplota), tak podněty z vnitřního prostředí (rostlinné hormony, sekundární metabolity). Je také známo, že akumulace antokyanů negativně koreluje se samčí sterilitou. Světlem indukovaná akumulace antokyanů pozorovaná v hypokotylu WT je u genotypu *7B-1* značně redukována. Exogenní ABA má u testovaných genotypů rozdílný účinek. Zvyšuje akumulaci antokyanů u WT, v hypokotylu mutantu ji naopak snižuje. Tato snížená akumulace může být spojena se sníženou senzitivitou mutantu k ABA. V hypokotylech *7B-1* byla zaznamenána nižší aktivita fenylalaninamoniaklyasy (PAL) – enzymu ovlivňujícího biosyntézu antokyanů. A to i přes to, že nebyl pozorován výrazný rozdíl v expresi genů. Z toho vyplývá, že odlišná akumulace u *7B-1* je řízena posttranslačními modifikacemi. Redukovaná hladina antokyanů může být jedním z faktorů určujících samčí sterilitu mutantu *7B-1* (Sheoran *et al.*, 2006).

2. 1. 7 Růstové reakce mutantu 7B-1 ke světlu

Další rozdílnou růstovou reakcí ke světlu, která byla pozorována mezi standardním genotypem a 7B-1 je de-etiolizace. To je proces, při kterém rostlina vyvíjející se ve tmě (proces zvaný skotomorfogeneze) mění svoji formu vlivem světla (procesem zvaným fotomorfogeneze). Při fotomorfogenezi dochází k redukci rychlosti prodlužování rostliny, ke zvětšování děloh a listů a tvorbě chloroplastů. Mutant 7B-1 vykazuje redukovanou de-etiolizaci oproti WT nejvýrazněji při kontinuálním osvětlení modrou složkou světelného spektra (Fellner and Sawhney, 2002). Ve tmě nebyl pozorován výrazný rozdíl v průměrné délce hypokotylů obou genotypů. Na modrém světle je prodlužování hypokotylu redukováno, avšak v případě mutantu 7B-1 je délka hypokotylu o 74 % větší než u WT (Obr. 4). To potvrzuje i skutečnost, že epidermální buňky genotypu 7B-1 byly na modrém světle signifikantně delší než u WT. Modré světlo tedy inhibuje prodlužování pokožkových buněk hypokotylu rajčete a mutant 7B-1 je v tomto směru defektní (Bergougnoux *et al.*, 2012).



Obr. 4: Porovnání sedmidenních rostlin WT a 7B-1 rostoucích v růstové komoře na modrém světle (foto Hana Martinková)

Mezi genotypy byl také na modrém světle prokázán rozdíl v ploeditě buněk neboli počtu sad chromosomů v jádře. V obou genotypech se vyskytovaly tři verze ploidity: dvě sady chromosomů (2C), čtyři sady (4C) a osm sad (8C). Nejčastější verzí je 4C. Na modrém světle přibývá více 2C buněk na úkor 4C buněk. Modrým světlem je totiž snižována endoreduplikace - zdvojení počtu sad chromosomů bez následného mitotického rozdělení jádra. To také ovlivňuje zvětšování buněk. Endoreduplikace doprovází proces fotomorfogeneze indukovaný modrým světlem. V pletivech

mutantních rostlin bylo oproti standardnímu genotypu méně 2C buněk a více 4C (Bergounoux *et al.*, 2012).

Na základě všech těchto skutečností byla podpořena hypotéza, že hypokotyl genotypu *7B-1* je méně citlivý k modrému světlu, a to díky defektu v percepci či signální kaskádě modrého světla.

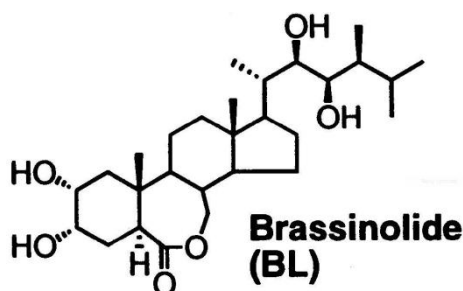
U rostlin genotypu *7B-1* byly také pod modrým světlem pozorovány změny ve fotosyntéze: rychlost čisté fotosyntézy (P_n), vodivost průduchů (g_s) a vnitřní efektivní využití vody (WUE_i). V listech mladých rostlin nebyl u mutantu pozorován žádný rozdíl v P_n ani g_s oproti WT. Postupně jak listy stárnou, modré světlo zvyšuje hodnotu P_n a g_s až na stálou hodnotu. Ta je pro genotyp *7B-1* nižší. Naopak WUE_i byla mezi 4. a 9. týdnem u *7B-1* vyšší než u standardního genotypu. Tyto odlišnosti od WT mohou být spojeny se zvýšenou endogenní hladinou ABA, neboť je známo, že WUE_i roste se zvýšenou koncentrací ABA v rostlině (Ježilová *et al.*, 2012).

Kyselina abscisová produkovaná během vodního stresu ovlivňuje uzavírání průduchů či inhibuje jejich otevírání. Pravděpodobně se tak děje skrze zvýšení produkce peroxidu vodíku a oxidu dusnatého. Tyto látky pak působí na aniontové kanály, které otevírají průduchy. Také světlo reguluje výměnu plynů pomocí průduchů. Fototropiny, jako receptory modrého světla, jsou nejčastěji označovány za spouštěče pohybu průduchů. U listů mutantních rostlin *7B-1* však na rozdíl od standardního genotypu nebylo pozorováno otevírání průduchů v závislosti na modrém světle. Samotné průduchy *7B-1* poškozeny nejsou, ale mutace *7B-1* pravděpodobněji ovlivňuje aniontové kanály v plazmatické membráně svěřacích buněk, které jsou zapojeny do otevírání stomat. Snížená aktivita aniontových kanálů je u mutantu *7B-1* ovlivněna zvýšenou hladinou ABA a resistencí vůči modrému světlu (Hlavinka *et al.*, 2013).

Funkce genu, ve kterém je mutant *7B-1* defektní, zatím není známa. Z předešlých výzkumů však vyplývá, že se jedná o mutaci v základním elementu signalizace modrého světla. Nedávné experimenty také ukázaly, že tato mutace ovlivňuje procesy zapojující fotoreceptory fototropiny, jako například pohyb chloroplastů, fototropismus a rané stádium prodlužování hypokotylu vyvolané modrým světlem (Bergounoux, Fellner *et al.*, dosud nepublikovaná data). Stále však chybí přímý důkaz, že jde o defekt ve fototropinové signální dráze. Není jasné, zda by se mohlo jednat o mutaci ve fotoreceptoru PHOT1 či PHOT2, nebo v některém z následujících elementů přenosu signálu modrého světla.

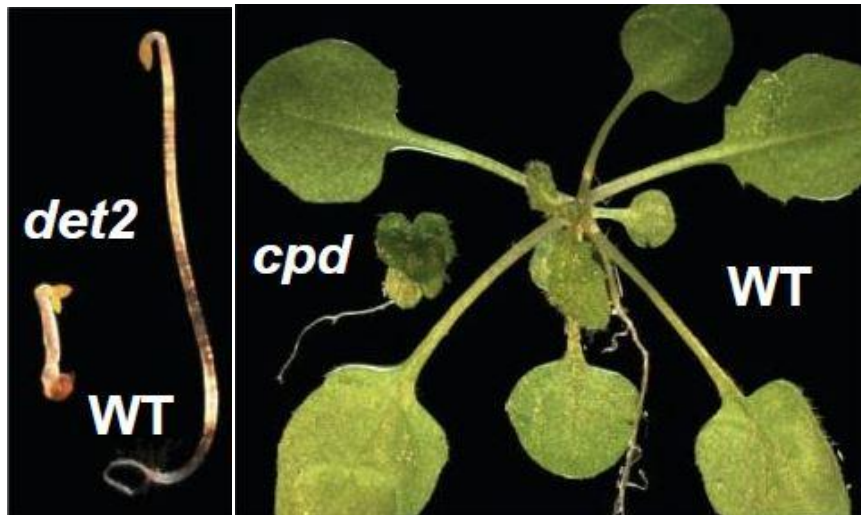
2.2 Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BRs) jsou skupina rostlinných hormonů, jež byla poprvé izolována z pylu brukve řepky latinským názvem *Brassica napus* L. (Mitchell *et al.*, 1970). Sloučenina, jež měla nejvyšší biologickou aktivitu, byla pojmenována brassinolid (BL, Obr. 5) a pomocí rentgenové krystalografie bylo určeno, že se jedná o polyhydroxylovanou steroidní látku strukturně podobnou živočišným steroidním hormonům (Grove *et al.*, 1979).



Obr. 5: Strukturální vzorek brassinolidu (BL) (převzato z Noguchi *et al.*, 2000).

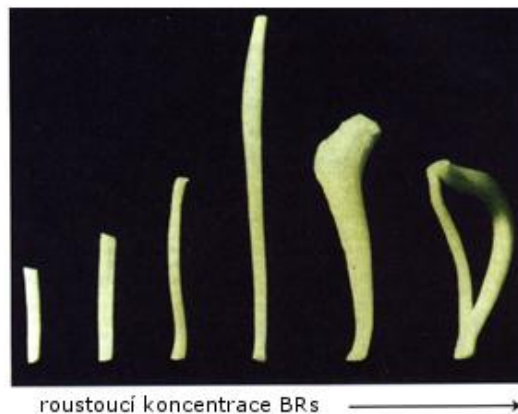
První experimenty byly zaměřeny hlavně na exogenní aplikaci BRs na rostliny a následnou růstovou reakci. Že se jedná o esenciální endogenní rostlinný hormon, bylo objeveno později, hlavně díky izolaci BR-deficientních a později BR-insenzitivních mutantů *Arabidopsis thaliana*. Jejich defektní fenotyp, jako například potlačená etiolizace (*det2*, *de-etiolated-2*, Obr. 6 vlevo) či zakrslý vzrůst (*cpd*, *constitutive photomorphogenesis and dwarfism*, Obr. 6 vpravo), byl exogenní aplikací BRs potlačen (Clouse *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Szekeres *et al.*, 1996). Změna fenotypu mutantů tedy pomohla odhalit, jaké fyziologické a vývojové procesy brassinosteroidy u rostlin ovlivňují. Kromě esenciální role ve fotomorfogenezi, prodlužování a dělení buněk jsou důležité také při klíčení semen, otevírání průduchů, diferenciaci vodivých pletiv, kvetení. Ovlivňují také stavbu buněčné stěny, pylovou sterilitu či senescenci buněk (Wang *et al.*, 2012).



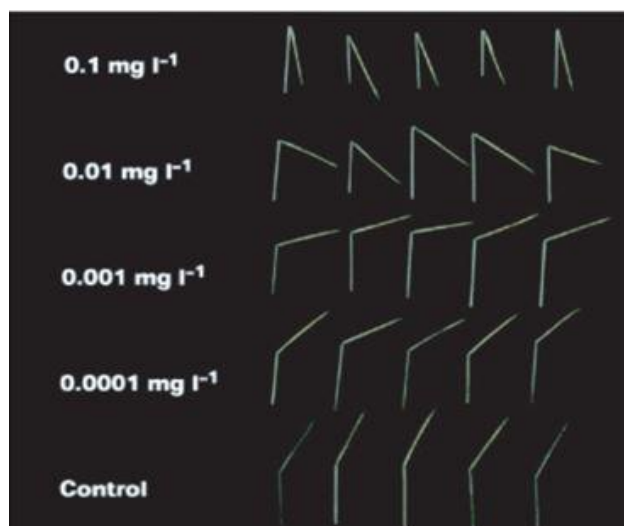
Obr. 6: Fenotyp BR-mutantů *Arabidopsis thaliana*. Vlevo: *det2* (de-etiolated2) a standardní genotyp (WT) rostoucí ve tmě. Vpravo: třítydenní rostliny *cpd* (constitutive photomorphogenesis and dwarfism) a WT rostoucí na světle (převzato z Taiz a Zeiger, 2006).

2. 2. 1 Biologická aktivita a biosyntéza brassinosteroidů

Brassinosteroidy ovlivňují biologické procesy v rostlinách již při velmi nízkých koncentracích. K oddělení biologicky aktivních BRs od jejich neaktivních prekurzorů či metabolitů bylo navrženo několik biotestů jako například prodlužování druhého internodia fazole (Thompson *et al.*, 1981; Obr. 7) či test odchytky jazýčku rýže (Wada *et al.*, 1981; Obr. 8).

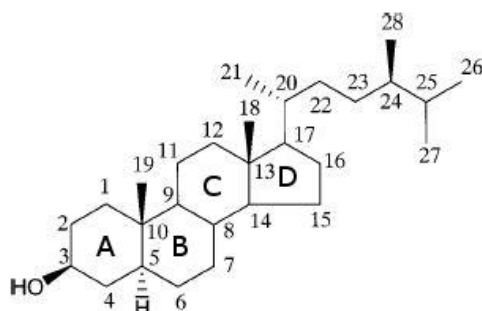


Obr. 7: Biotest druhého internodia fazole. Část druhého internodia byla po několik dní ponořena do roztoku obsahujícího BRs o různých koncentracích. Nejnižší koncentrace BRs způsobují mírné prodlužování stonku, vyšší koncentrace způsobují kyjovité ztlouštění až rozdělení stonku (převzato a upraveno z Taiz a Zeiger, 2006).

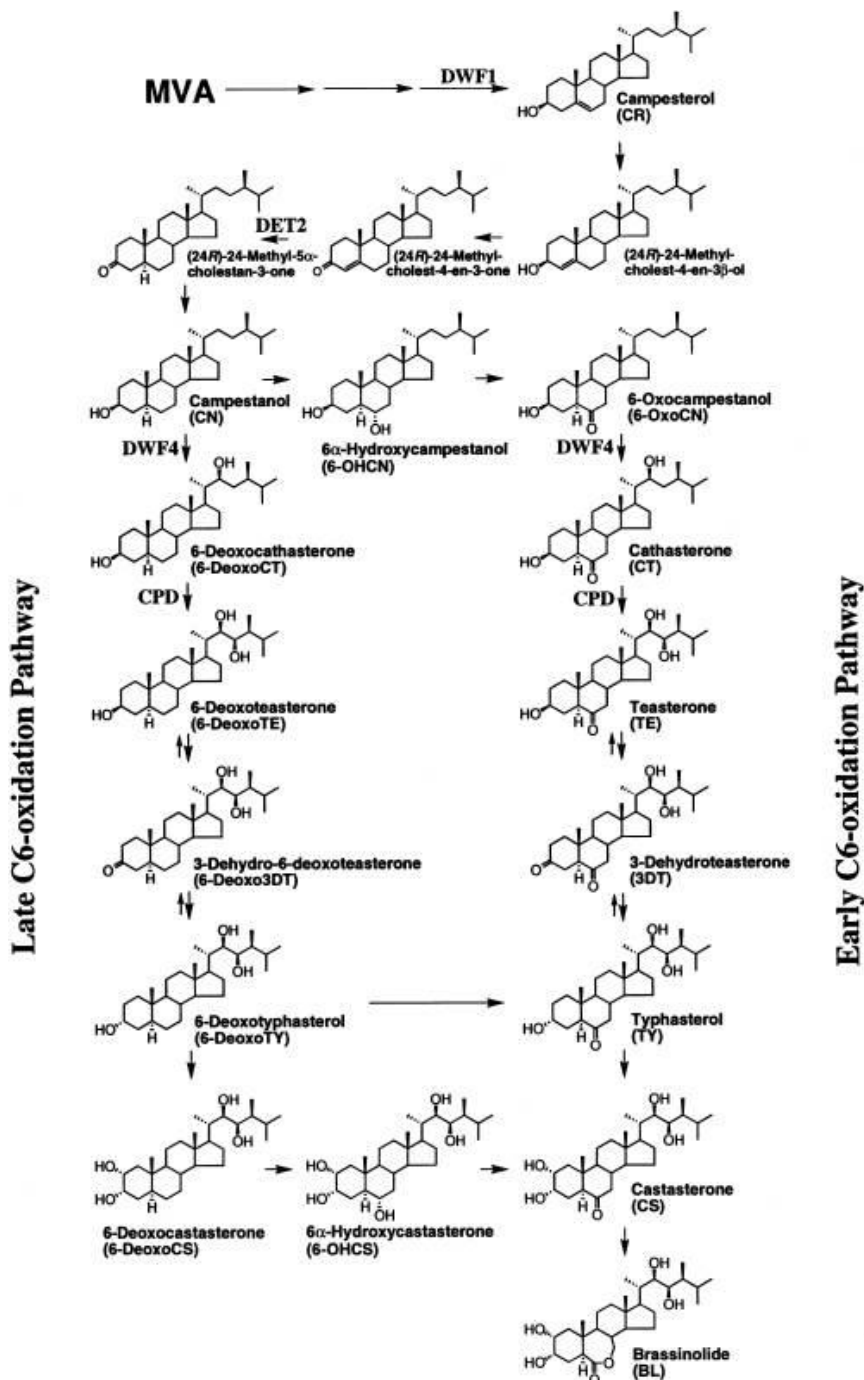


Obr. 8: Biotest odchylky jazýčku rýže, efekt různých koncentrací BRs na odklonění čepele listu rýže (převzato z Jones *et al.*, 2013).

Biosyntéza brassinolidu (BL) začíná konverzí kampestanolu (Obr. 9) cestou rané či pozdní oxidace uhlíku C-6 (Obr. 10). Tyto dvě paralelní cesty se spojují u kastasteronu (CS), který je přímým prekurzorem brassinolidu. Pozdní C-6 oxidace převládá u druhů jako je například *Arabidopsis thaliana* (Nomura *et al.*, 2001), je také hlavní cestou biosyntézy BL u rajčete (Bishop and Yokota, 2001).

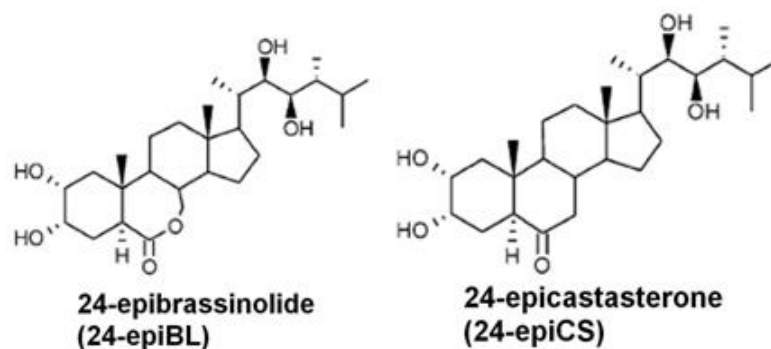


Obr. 9: Struktura kampestanolu prekurzoru biosyntézy biologicky aktivních brassinosteroidů (převzato a upraveno z Bishop and Yokota, 2001).



Obr. 10: Zjednodušený průběh biosyntézy brassinolidu ranou a pozdní C-6 oxidací (převzato z Noguchi et al., 2000)

Pomocí biotestů byly identifikovány strukturální vlastnosti, jež ovlivňují biologickou aktivitu BRs. Absence jedné hydroxylové skupiny na C-2 nebo C-3 či změna v jejich konfiguraci způsobuje ztrátu funkce. Modifikace B kruhu neruší biologickou aktivitu, ale výrazně ji snižují. Orientace hydroxylových skupin na uhlících C-22 a C-23 ovlivňuje bioaktivitu molekuly (Mandava, 1988). Variace na C-24 dávají vzniknout například 24-*ep*BRs (Obr. 11).



Obr. 11: Struktura 24-epibrassinolidu a 24-epikastasteronu (převzato z Lachman *et al.*, 2011).

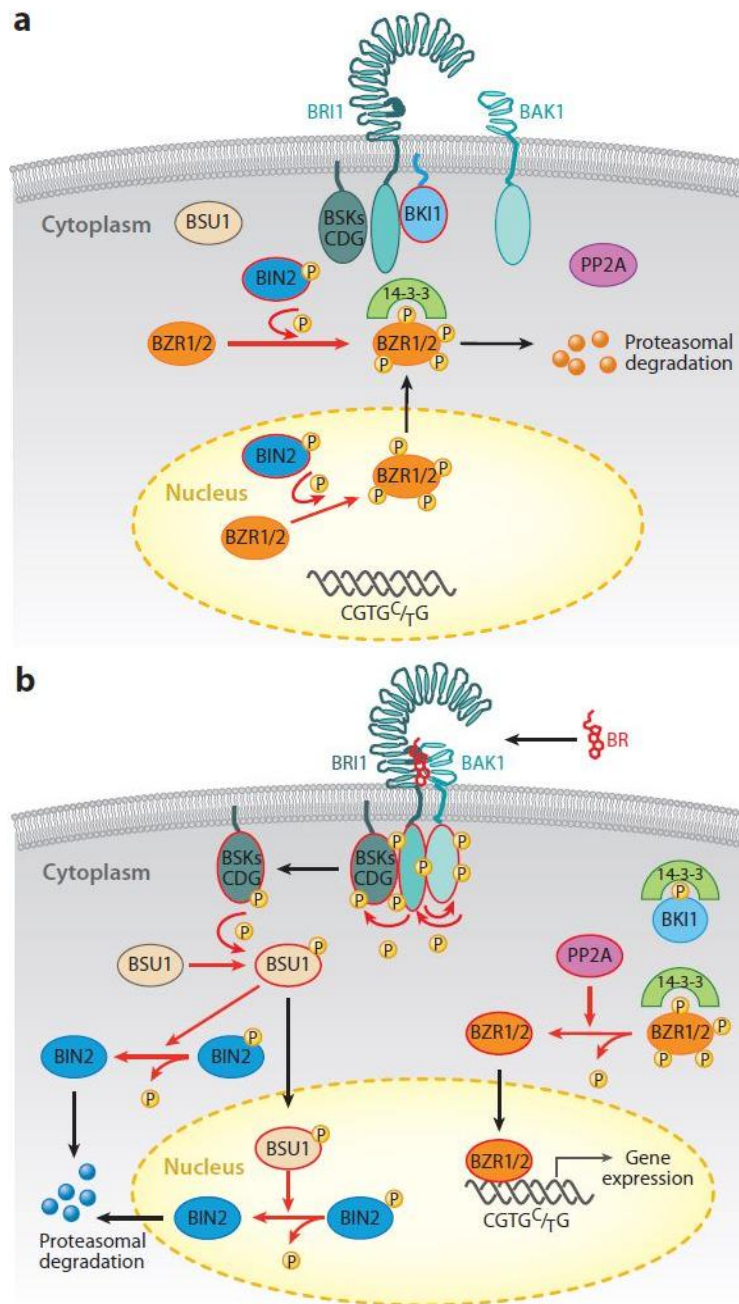
2. 2. 2. Percepce a signální dráha brassinosteroidů

Brassinosteroidy regulují mnoho vývojových procesů, proto byla jejich signální dráha intenzivně zkoumána. U *Arabidopsis* je zmapována kompletní dráha od povrchového receptoru BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1) až po proteinové rodiny jaderných transkripčních faktorů jako jsou BZR1 (BRASSINAZOLE RESISTANT1) a BES1/BZR2 (BRI1-EMS-SUPPRESSOR1) (Fridman and Savaldi-Goldstein 2013).

Pomocí pozičního klonování BR-insenzitivního mutanta (*bri1*) byla identifikována receptorová kinasa BRI1, která je nezbytnou součástí v odpovědi na BRs (Clouse *et al.*, 1996; Li and Chory, 1997). Bylo prokázáno, že se jedná o brassinosteroidní receptor, který obsahuje extracelulární doménu s 25 opakováními, které jsou bohaté na leucin (LRRs). LRRs jsou uspořádány do šroubovice a mezi LRR-21 a 22 se nachází 70-aminokyselinový ostrůvek, který formuje vazebné místo pro brassinosteroidy. Navázání BRs nezpůsobí výraznou strukturní změnu extracelulární domény, nýbrž pouze lokální konformační změnu. To umožní vazbu BRI1 s dosud neznámým proteinem (Wang *et al.*, 2001; Kinoshita *et al.*, 2005; Hothorn *et al.*, 2011; She *et al.*, 2011). Tímto způsobem je BRI1 aktivován a vykazuje kinasovou aktivitu. V této formě se může vázat na BAK1 (BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1) (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002) a tím se oddělit od BKI1 (BRI1 KINASE INHIBITOR1) (Wang *et al.*, 2005; Wang and Chory, 2006). BRI1 pak dále fosforyluje dvě podtřídy kinas RLCKs (receptor-like cytoplasmic kinases): BSK (BR-SIGNALING KINASE) a CDG1 (CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH) (Tang *et al.*, 2008; Kim *et al.*, 2011). BSK a CDG1 pak aktivují BSU1 (BRI1-SUPPRESSOR 1), který defosforyluje, inaktivuje a tím odsuzuje k degradaci BIN2 (BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2) (Kim *et al.*, 2009).

Pokud nejsou přítomny BRs (Obr. 12 a), BIN2 je aktivní a postará se o inaktivaci vysoce homologních transkripčních faktorů BRZ1 a BES1/BRZ2. V případě přítomnosti BRs (Obr. 12 b) je BIN2 degradován, BRZ1 a BES1/BRZ2 tak mohou být masivně defosforylovány protein fosfatasou 2A, přesouvají se do jádra a vazbou na

genomickou DNA regulují expresi cílových genů (He *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005; Sun *et al.*, 2010; Yin *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005).



Obr. 12: Signální kaskáda BRs. Signální komponenty v aktivním stavu jsou ohraničeny červeně, P značí přenos fosfátové skupiny, červené šipky představují fosforylaci či defosforylaci, černé šipky pohyb proteinů. (a) situace bez přítomnosti BRs, (b) situace za přítomnosti BRs (převzato z Wang *et al.* 2012).

Studium protein-DNA interakcí vedlo k identifikaci velkého množství cílových sekvencí, se kterými BRZ1 či BES1/BRZ2 přímo interagují. První skupinou jsou geny zapojené v brassinosteroidní biosyntetické dráze a mnoho genů ovlivňujících jejich signální dráhu a zpětnou vazbu. Další skupinou genů jsou geny zapojené v syntéze a modifikaci buněčné stěny a v organizaci cytoskeletu, což potvrzuje roli BRs

v prodlužování buněk. Velké množství genů potlačovaných BRs je spojeno s elementy, které inhibují vývoj chloroplastů a fotomorfogenezi. Poslední velkou skupinou genů ovlivněných těmito transkripčními faktory jsou ty, jež kódují regulační proteiny (např. kinasy či další transkripční faktory), které zprostředkovávají interakci se signální kaskádou rostlinných hormonů, jako jsou gibereliny, auxin či ABA (Wang *et al.*, 2012).

2.3 Interakce signální dráhy brassinosteroidů a světla

2.3.1 Fotoreceptory

Světlo je elektromagnetické vlnění, které je pro rostliny jedním z hlavních environmentálních podnětů. V rostlinách ovlivňuje celou řadu fyziologických procesů. Vývoj probíhající bez přístupu světla je označován jako skotomorfogeneze, vývoj na světle se nazývá fotomorfogeneze. Zahnuje procesy na molekulární úrovni, ale také růstové reakce. Fotomorfogeneze je spuštěna signální drahou, která začíná percepcí světla o určité vlnové délce jí příslušným typem fotoreceptorů. Červené a dlouhovlnné červené světlo (640 až 740 nm) je vnímáno fytochromy. Modrou oblast spektra (425 až 490 nm) s přesahem do UV-A oblasti (320 až 400 nm) a zelenou oblast (490 až 560 nm) monitorují kryptochromy. Světelný signál z modré části spektra spolu s informacemi, jež udávají, z jakého směru světlo přichází, přenáší fototropiny (Pavlová a Fischer, 2011).

Fytochromy a kryptochromy regulují expresi genů skrze CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 (COP1), který zprostředkovává ubikvitinaci mnoha transkripčních faktorů zapojených ve fotomorfogenezi. COP1 je aktivní ve tmě a je světlem inaktivován (Lau and Deng, 2012).

Fototropiny (phot1 a phot2) zprostředkovávají mimo jiné především fototropní reakci rostlin – růst směrem ke zdroji světla. Tyto receptory obsahují dvě domény LOV1 a LOV2. LOV2 je nepostradatelná pro fototropismus zprostředkovaný fototropinem 1. LOV1 je méně citlivá ke světlu, ale je pravděpodobně zodpovědná za fototropismus vyvolaný modrým světlem o vysoké intenzitě (Sakai *et al.*, 2000).

2.3.2 Světlo a BRs

Brassinosteroidy i světlo ovlivňují mnoho stejných procesů, jako například klíčení, prodlužování stonku, kvetení nebo únik ze stínu (shade-avoidance) (Wang, *et al.*, 2012). Je proto logické předpokládat, že signální dráhy světla a signální či

biosyntetické dráhy brassinosteroidů se mohou vzájemně ovlivňovat nebo mít společné elementy. Fakt, že fenotyp BR-deficientních a BR-insenzitivních mutantů rostoucích ve tmě ukazuje fenotyp rostlin WT rostoucích na světle (Chory *et al.*, 1991; Li *et al.*, 1996), vede k závěru, že redukce hladiny BRs může hrát důležitou roli ve fotomorfogenezi (Clouse, 2001; Chory and Li, 1997; Szekeres *et al.*, 1996). Nezbytnost brassinosteroidů pro etiolizovaný růst rostlin ukazují rovněž experimenty, ve kterých rostliny *Arabidopsis* rostoucí ve tmě a ošetřené inhibitory syntézy brassinosteroidů vytvářely krátký hypokotyl (Clouse and Sasse, 1998; Schumacher and Chory, 2000).

Signály z prostředí ve kterém rostlina roste a vyvíjí se, jako například světlo, ovlivňují hladinu a spektrum endogenních hormonů, které následně řídí růst rostliny. Proto vznikla hypotéza, že světlo snižuje hladinu BRs či citlivost rostliny na ně, čímž zastavuje prodlužování buněk. Výsledky řady prací naznačují propojení světelné signalizace a metabolismu BRs. Například, Neff *et al.* (1999) identifikoval cytochrom P450, nazývaný BAS1, který katalyzuje inaktivaci/degradaci BRs. V inaktivaci BRs je zapojen rovněž cytochrom P450, nazvaný SOB7 (Turk *et al.*, 2005). U hrachu byl identifikován malý G-protein DDFW1, který má funkci cytochrom-P450-steroid-C-2-hydrolasy a katalyzuje krok v biosyntéze BRs (Kang *et al.*, 2001). Bylo zjištěno, že exprese *DDFW1* je potlačována světlem a gen je exprimován především v rychle rostoucích prodlužovacích zónách epikotylu hrachu (Nagano *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2001).

V některých případech však redukce BRs světlem zjištěna nebyla. U *Arabidopsis*, hrachu či ječmene nebyl pozorován rozdíl v endogenní hladině BRs mezi rostlinami, jež rostly pod kontinuálním osvětlením a ve tmě (Symons *et al.*, 2007). Navíc, nebyla zaznamenána ani změna v aktivaci BZR1 u etiolizovaných semenáčků *Arabidopsis* ani semenáčků, jež rostly na světle (Luo *et al.*, 2010). Světlo tedy neovlivňuje obsah BRs ani jejich signální dráhu zesílením aktivity transkripčního faktoru BZR1 (Wang *et al.*, 2012).

Na druhé straně však bylo rovněž zjištěno, že u některých druhů je hladina BRs významně vyšší u rostlin rostoucích na světle, než u etiolizovaných rostlin (Symons *et al.*, 2002; Symons and Reid, 2003; Tamaki *et al.*, 2002). Například, v rostlinách hrachu rostoucích na světle (ve srovnání s rostlinami tmě) bylo zvýšení exprese genu *DWF4* zapojeného v syntéze BRs a snížení exprese genu *BAS1* spojeno s vyšší hladinou BRs (Symons *et al.*, 2002).

Porovnání dat z microarray experimentů prokázalo antagonistický vztah světlem regulovaných genů a genů přímo či nepřímo ovlivněných BZR1. Nedávné studie ukazují, že by se mohlo jednat o některou z těchto interakcí či jejich kombinaci (Wang *et al.*, 2012):

a) BZR1 koreguje cílové geny společně s transkripčními faktory, které jsou regulovány světlem;

b) BZR1 reguluje expresi některých komponent signální dráhy světla a nepřímo ovlivňuje geny, které jsou regulovány světlem. Například, mnoho genů, jež kódují komponenty světelné dráhy, je cílem pro BZR1 a jsou tedy regulovány BRs, např. protein PIF4 (Oh *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2012; Jaillais and Vert, 2012). Brassinosteroidy regulují transkripci většiny známých komponent signální dráhy světla a snižují tak odpověď na světelný signál (Wang *et al.*, 2012).

c) Světlo reguluje aktivitu BZR1 nezávisle na BRs signální dráze, například přes protein-proteinové interakce. Tato možnost byla velmi nedávno podpořena výsledky Kima *et al.* (2014). Autoři ukázali, že tma zvyšuje aktivitu transkripčního faktoru BZR1. Děje se to prostřednictvím COP1, který ve tmě váže a degraduje neaktivní (fosforylované) formy BZR1. Tím se zvyšuje podíl aktivních nefosforylovaných BZR1, které indukují prodlužování buněk. Tyto výsledky tedy naznačují, že světlo přímo kontroluje signalizaci BRs tím, že moduluje aktivitu BZR1 (zvyšuje podíl neaktivních BZR1).

Interakce mezi signálními drahami světla a BRs byly studovány také například u rýže (Jeong *et al.*, 2007). Autoři ukázali, že fotomorfogenní mutant *osphyB* má zvýšenou citlivost koleoptile k brassinolidu. Analýzy pomocí RT-PCR u mutantu *osphyB* odhalily zvýšenou expresi genů indukovaných BRs a sníženou hladinu transkriptů genů biosyntézy BRs. Výsledky tedy naznačují, že fotoreceptor phyB funguje jako negativní regulátor brassinolidem regulovaného prodlužování koleoptile rýže (Jeong *et al.*, 2007). Podobně, u *Arabidopsis* bylo zjištěno, že aktivace kryptochromů a phytochromů vede k aktivaci enzymu ROTAMASE CYCLOPHILIN 1, jež inhibuje transkripční faktor BES1, zapojený v indukci genů pro expanzi buněk (Trupkin *et al.*, 2012; Vriet *et al.*, 2013).

V roce 2010 Luo *et al.* identifikovali transkripční regulátor GATA2, který přímo řídí expresi genů, které reagují ke světlu i k BRs. V etiolizovaných rostlinách BRs potlačují expresi GATA2 prostřednictvím BZR1. Protein GATA2 je současně degradován prostřednictvím COP1. V celkovém důsledku tedy dochází k etiolizaci rostlin. Na světle je vazba transkripčního faktoru BZR1 na GATA2 potlačena (zatím neznámým způsobem). GATA2 je tedy exprimován a navíc, protein GATA2 není degradován COP1. Aktivní GATA2 indukuje geny zapojené v de-etiolizaci. Zpětnou vazbou však současně potlačuje svou vlastní expresi (Luo *et al.*, 2010; Gudesblat and Russinova, 2011).

Nejen fotomorfogeneze, ale také fototropismus, jako další z procesů vyvolaných světelným signálem, je ovlivňován BRs. Analýzou *Arabidopsis* mutantu *elg* (elongated)

bylo zjištěno, že BRs, prostřednictvím receptorové kinázy BAK1 (BAK1 tvoří za přítomnosti BRs komplex s receptorem BRI1), modulují fototropismus vyvolaný světlem o vysoké intenzitě (Whippo and Hangerter, 2005).

3 Materiál a metodika

3.1 Rostlinný materiál

K pokusům byla použita semena dvou genotypů rajčete *Solanum lycopersicum* L. Spontánní recesivní "single gene" mutant *7B-1* byl vyselektován na základě samčí pylové sterility projevující se za dlouhého dne (16 hod světelná fotoperioda) (Sawhney, 1997). Mutovaný gen *7B-1* není dosud znám, ale výsledky naznačují defekt v signální dráze modrého světla (Fellner and Sawhney 2002; Hlavinka *et al.*, 2013). Mutant byl vyselektován z populace standardního genotypu, kultivaru Rutgers (Sawhney, 1997). Semena obou genotypů byla poskytnuta na základě licence V. K. Sawhney z University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada.

3.2 Pracovní postupy

3.2.1 Příprava média

Při všech experimentech bylo použito pevné MS médium (Murashige and Skoog, 1962), jež bylo připraveno následujícím způsobem: V 1 l destilované vody bylo za stálého míchání rozpuštěno 20 g sacharózy (tj. 1%), 8,6 g MS média (kat. č. MSP01-50LT, Caisson LABS) a 390,4 mg (tj. 1 mol · l⁻¹) pufru MES (Morpholinoethane sulfonic acid; kat. č. 29834.04, Serva). Poté bylo pomocí 1M hydroxidu draselného upraveno pH na hodnotu 6,1 a roztok byl doplněn destilovanou vodou na objem 2 l.

Médium bylo následně rozděleno po 400 ml do pěti termolahví o objemu 500 ml. Do každé z nich bylo přidáno 2,8 g (tj. 0,7%) agaru (kat. č. P1001.1000, Duchefa Biochemie). V těchto lahvích bylo médium sterilizováno v autoklávu. Autoklávováním se hodnota pH média snížila přibližně na 5,7. Po vychladnutí byly láhve uchovávány v lednici.

Před vlastním použitím bylo médium rozehríváno v mikrovlnné troubě. Do tekutého média zchladlého na laboratorní teplotu pak byl za sterilních podmínek v laminárním boxu přidáván požadovaný objem roztoku testovaného brassinosteroidu.

3. 2. 2 Používané koncentrace brassinosteroidů

Při studiu vlivu exogenních brassinosteroidů na růst porovnávaných genotypů rajčete byly použity následující látky:

- 24-*epi*brassinolid (24-*epi*BL; Mr = 480,68)
- 24-*epi*kastasteron (24-*epi*CS; Mr = 464,678)

Brassinosteroidy byly poskytnuty Mgr. Janou Oklešťkovou, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů, PŘF, UP v Olomouci. Zásobní roztoky brassinosteroidů o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním vypočítané navážky brassinosteroidu v 99,5% DMSO a následným postupným přidáváním destilované vody. Finální koncentrace DMSO v zásobním roztoku byla 25 %. Tento roztok byl následně pipetován do 120 ml média podle následující tabulky:

Tabulka 1: Požadované koncentrace brassinosteroidu přidávány do 120 ml média a odpovídající objemy zásobního roztoku.

| Koncentrace v médiu ($\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$) | 10^{-9} | 10^{-8} | 10^{-7} | 10^{-6} |
|---|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Objem zásobního roztoku o koncentraci $10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (μl) | 1,2* | 1,2 | 12,0 | 120,0 |

*použit zásobní roztok o koncentraci $10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$

3. 2. 3 Výsev semen a přenos rostlin

Požadovaný počet semen od každého genotypu byl nejprve v plastových zkumavkách (objem 50 ml) za stálého protřepávání sterilizován v přibližně 30 ml 3% roztoku Savo (Bochemie a. s.) po dobu 20 minut. Poté byla semena v laminárním boxu pětkrát promyta sterilní destilovanou vodou.

Pomocí nástrojů sterilizovaných v 96% ethanolu a ožehnutím nad plamenem byla semena vyseta na základní MS médium v plastových Petriho miskách (průměr 90 mm; 20 ml média v jedné misce). Výsev probíhal za denního světla či pod zářivkou s bílým světlem. Po výsevu byly Petriho misky dokola oblepeny dvěma vrstvami pásky SoftPore (BATIST s.r.o.) z netkané textilie, zabaleny do alobalu a vertikálně uloženy v růstové kultivační komoře (Snijders Scientific, Nizozemsko) za stálé teploty 23 °C.

Po vyklíčení dostatečného počtu semen (cca po 3 až 4 dnech od výsevu) byla ve sterilních podmínkách semena přenesena na misky s 20 ml média, které obsahovalo požadované koncentrace brassinosteroidu. V případě, že vyklíčil dostatečný počet semen, bylo na každou koncentraci umístěno deset rostlin. Do každého experimentu byla zahrnuta také kontrola, kde bylo použito médium bez

exogenního brassinosteroidu. Misky byly po obvodu oblepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie a vertikálně umístěny v růstové komoře se stálou teplotou 23 °C. Zde byly rostliny kultivovány sedm dní pod kontinuálním osvětlením modrým světlem (zářivka Philips TLD-36W/18-Blue), červeným světlem (zářivka Philips TLD36W/15-Red), nebo ve tmě (zabalené do alobalu).

3. 2. 4 Měření délky rostlin a epidermálních buněk hypokotylu

Nejprve byly rostliny zhodnoceny vizuálně v miskách proti tmavé podložce. Byly porovnány rozdíly mezi oběma genotypy, jednotlivými koncentracemi brassinosteroidů a rozdílnými světelnými podmínkami. Následně bylo provedeno měření délky hypokotylu a kořene všech rostlin. K měření bylo použito pravítko a milimetrový papír. Délky byly měřeny s přesností na 1 mm. Hodnoty byly zpracovány pomocí programu Microsoft Excel 2007.

Pro měření délky epidermálních buněk byly použity hypokotylu rostlin obou testovaných genotypů, jež byly po vyklíčení sterilně pěstovány na agarovém médiu v růstové komoře pod kontinuálním modrým osvětlením po dobu jednoho týdne. Délky buněk byly měřeny pouze u rostlin kultivovaných za přítomnosti 24-*ep*BL, protože pouze na tomto brassinosteroidu byly pozorovány rozdíly v růstových reakcích WT a 7B-1.

Nejprve byla pomocí skalpelu izolována prodlužovací zóna hypokotylu testovaných rostlin (tj. segment o délce 10 mm pod apikálním meristémem). Následně proběhla 30 minutová fixace segmentů v 96% ethanolu. Všechny vzorky pak byly ponořeny do snižující se koncentrační řady roztoků ethanolu (80%, 70% a poté 50% ethanol, v každém roztoku po dobu 20 min), dvakrát promyty vodou a následně 10 min barveny 1% roztokem toluidinové modře (Kat. č. 36692, Serva). Fragmenty hypokotylů pak byly pozorovány v kapce vody na podložním sklíčku mikroskopem Olympus BX60 (Olympus, Japan) s připojenou kamerou Olympus DP71 (Olympus, Japan), pomocí níž byly pořízeny mikrofotografie epidermálních buněk (zvětšení 200×). Mikroskop byl laskavě poskytnut RNDr. Pavlou Válovou z Katedry buněčné biologie a genetiky, PŘF, UP v Olomouci.

V softwaru ImageJ Processing Program (Collins, 2007) byly pro každý experiment změřeny délky sta epidermálních buněk vždy u tří reprezentativních rostlin, celkem tedy 300 buněk od každého genotypu a koncentrace 24-*ep*BL. Naměřená data byla zpracována a vyhodnocena pomocí programu Microsoft Excel 2007.

3. 2. 5 Měření hladiny endogenních brassinosteroidů

Pro analýzu byly použity hypokotyle a kořeny desetidenních rostlin WT a 7B-1. Ty byly pěstovány v růstové komoře na pevném MS médiu za různých světelných podmínek (ve tmě, na červeném či na modrém světle). Vzorky čerstvého rostlinného pletiva (FW) byly homogenizovány v tekutém dusíku (pro narušení buněčných stěn) v třecí misce pomocí tloučku.

Kvantifikaci brassinosteroidů v rostlinném materiálu provedla Mgr. Danuše Tarkowská, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů, PřF, UP v Olomouci dle dříve publikované metody (Swaczynová *et al.*, 2007) s několika modifikacemi.

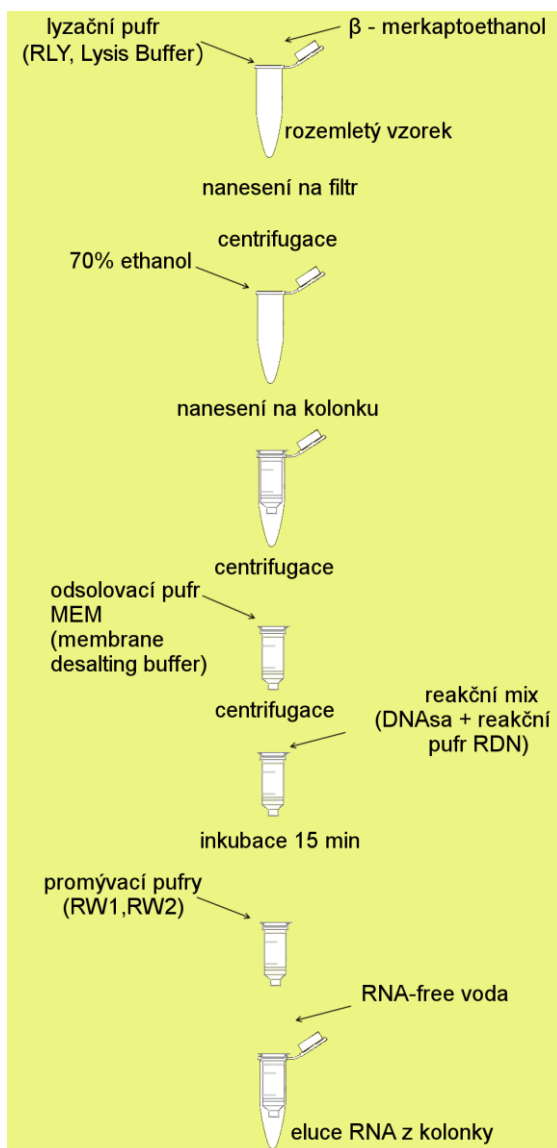
Z každého biologického vzorku byly připraveny alikvoty velikosti cca 40 mg FW ve třech opakováních. Každý z nich byl extrahován v 1 ml 80% metanolu vychlazeného na -20°C jako extrakčního činidla. Ke zvýšení účinnosti extrakce (přechod brassinosteroidů z buněk do extrakčního činidla) byly všechny vzorky ještě sonifikovány po dobu 5 min, homogenizovány 3-mm kuličkami z oxidu zirkoničitého v kulovém mlýnku (MM 301, Retsch GmbH & Co. KG, Haan, Německo; frekvence 27 Hz, 3min) a po přidavku 30 pmol interních standardů ($[^2\text{H}_3]$ brassinolid, $[^2\text{H}_3]$ kastasteron, $[^2\text{H}_3]$ 24-*epi*brassinolid, $[^2\text{H}_3]$ 24-*epi*kastasteron; OIChemim, Olomouc, Česká republika) byly extrahovány přes noc mícháním pomocí laboratorního rotátoru (Stuart SB3, Bibby Scientific Ltd., Staffordshire, UK; 15 rpm, 4°C). Homogenáty byly následně zcentrifugovány (Beckman Avanti™ 30; 20 000 rpm, 15 min, 4°C), supernatant odebrán do čisté borosilikátové zkumavky a pelet reextrahován po dobu 60 min stejným způsobem jak bylo uvedeno výše. Po centrifugaci byly supernatanty z první a druhé extrakce spojeny a přečištěny pomocí extrakce na tuhé fázi (SPE) za použití sorbentu zachycujícího primárně rostlinné pigmenty (hlavně chlorofyly a karotenoidy; Discovery® DPA-6S, Supelco, Bellefonte, PA, USA), které jsou hlavními interferenty následného stanovení pomocí ultra účinné kapalinové chromatografie ve spojení s tandemovou hmotnostní spektrometrií (UHPLC-MS/MS). Po odpaření eluátu do sucha ve vakuovém koncentrátoru (CentriVap® Acid-Resistant, Labconco Corp., MO, USA) byly vzorky rekonstruovány v 50 μl 100% metanolu vychlazeného na -20°C a analyzovány pomocí UHPLC-MS/MS (Micromass, Manchester, UK). MS data byla analyzována pomocí softwaru Masslynx 4.1 (Waters, Milford, MA, USA) a obsah brassinosteroidů byl kvantifikován na základě metody izotopového ředění.

3. 2. 6 Exprese genu kódujícího receptor BRI1

K porovnání intenzity exprese zkoumaných genotypů byly použity rostliny, které 7 dní od vyklíčení rostly v růstové komoře ve sterilních podmínkách na čistém agarovém MS médiu pod kontinuálním modrým osvětlením či ve tmě. Z nich byla pro tento experiment odebrána pouze apikální část hypokotylu. Tento krok byl proveden při osvětlení modrou zářivkou (pro rostliny pěstované na modrém světle), či pod zelenou zářivkou (pro rostliny, jež rostly ve tmě). Pro každý genotyp a růstové podmínky bylo izolováno přibližně 200 mg vzorku, jež byl okamžitě zchlazen v kapalném dusíku. Vzorky byly následně pomocí tloučku rozemlety ve sterilní vychlazené třecí misce.

3. 2. 6. 1 Izolace a purifikace RNA

Izolace RNA probíhala podle schématu (Obr. 13) za použití kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie).



Obr. 13: Schéma izolace RNA pomocí kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie)

Po izolaci byla pomocí spektrofotometru SmartSpec Plus (Bio-Rad, USA) změřena koncentrace celkové RNA a bylo ověřeno, zda není vzorek kontaminován DNA. V případě kontaminace vzorku celkové RNA byla provedena amplifikace kontaminující DNA pomocí PCR ve směsi obsahující 0,1 µl My Taq Polymerase (Bioline), 4 µl 5× My Taq buffer (Bioline), 0,5 µl specifických primerů, 2 µl templátu a celkový objem v reakci byl 20 µl. Gen *LeGAPDH* (glyceraldehyd-3-fosfátdehydrogenasu; U97257; Chen, 1997) byl použit v reakci o 45 cyklech. Primery pro amplifikaci genu *LeGAPDH* byly následující:

LeGAPDH-F primer: 5' – ATC CAT TTA TTT CCA CTG ATT ACA A – 3'

LeGAPDH-R primer: 5' – CAT GGG AGC ATC TTT GCT A – 3'

PCR probíhala v termocykléru MJ Mini (Personal Thermal Cycler, BioRad) podle programu v Tab. 2: Templát byl denaturován při teplotě 94 °C po dobu 3 min. Po té následovaly cykly 94 °C po dobu 30 s, 55 °C 30 s, a 72 °C po dobu 1 min. Konečné prodlužování bylo prováděno při teplotě 72 °C po dobu 5 min, a po něm následovalo závěrečné zchlazení směsi na 15 °C. Produkty PCR byly rozděleny pomocí elektroforézy na 1,5% agarosovém gelu obarveném barvivem GelRed Nucleic Acid Stain (Kat. č. 41 003, Biotinum). Produkty PCR byly smíchány s barvivem 6× loading Dye (Biogen) (20 µl PCR produktu s 1 µl barviva) a spolu s kontrolními vzorky naneseny do jamek. Byla provedena elektroforéza při konstantním napětí 80 V a následně vizualizace nukleových kyselin v gelu pomocí Gel DOC EZ Imageru (BioRad).

Tabulka 2: Program PCR pro amplifikaci genu *LeGAPDH*

| | | |
|-------|-------|----------|
| 94 °C | 3 min | 45 cyklů |
| 94 °C | 30 s | |
| 55 °C | 30 s | |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 5 min | |
| 15 °C | ∞ | |

Pokud se ve vzorcích nacházela kontaminace způsobená zbytkovou DNA (nález bendů na elektroforéze), byla provedena purifikace vzorku celkové RNA s použitím roztoků z kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline) a to přidáním DNasy I a reakčního RDN pufru. Následně byl vzorek inkubován při 37 °C po dobu 10 minut. Ke

vzorku byl přidán octan sodný a 96% ethanol. Precipitace probíhala přes noc při teplotě - 80 °C. Vzorek byl při 4 °C centrifugován, tak aby se pelet obsahující RNA zachytil na dně mikrozkuhavky. Jejím otočením dnem vzhůru se odstranil supernatant. Byl přidán 70% ethanol, opět byla provedena centrifugace a odstranění supernatantu. Poté byl stejný krok proveden s 96% ethanolem. Zbytek supernatantu byl odebrán pomocí pipety a následně se mikrozkuhavka nechala otevřená dnem vzhůru na filtračním papíře, dokud se všechen ethanol neodpařil. Purifikovaná RNA pak byla rozpuštěna v RNA-free vodě, jež je také součástí kitu.

3. 5. 6. 2 Syntéza cDNA

Z čisté izolované celkové RNA byla syntetizována cDNA pomocí kitu PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Japonsko) následujícím způsobem: k 8 µl vzorku RNA (naředěných tak, aby obsahovaly 2 µg celkové RNA) byl přidán 1 µl 50µM oligo dT primeru a 1 µl 10mM dNTP, následovala 5 minutová inkubace při 65 °C a zchlazení na ledu. Dále byl přidán 5× Prime Script pufr o objemu 4 µl, 0,5 µl Rnase inhibitoru, 1 µl Prime Script Rnasy a 4,5 µl RNA-free vody. Reakční směs byla inkubována v termocykléru 60 minut při 42 °C a poté 15 minut při 70 °C.

Zda byla cDNA správně syntetizována bylo ověřeno pomocí PCR opět s použitím *LeGAPDH* primerů. Produkty PCR byly naneseny na 1,5% agarosový gel a byla opět provedena elektroforéza. V případě úspěšně provedené cDNA syntézy bylo možné na gelu pozorovat výrazné fragmenty o velikosti 350 pb.

3. 5. 6. 3 Exprese genu *BRI1*

Pro porovnání intenzity exprese genu pro brassinosteroidní receptor *BRI1* byl jako referenční gen použit gen pro aktin (Montoya *et al.*, 2002). Každý ze vzorků syntetizované cDNA byl tedy použit pro PCR s primery pro *Actin*:

TACT1-F: 5' – ATT GCT CTT TAT GAA CAG G – 3'

TACT2-R: 5' – CTT GCT CAT CCT ATC AGC AAT ACC – 3'

a také pro PCR s primery pro *BRI1* (Montoya *et al.*, 2002):

TBR35-F: 5' – AGA TCT ATG GAG TCT AAA GTA ACC – 3'

TBR41-R: 5' – CAT CAA GAG CTC AAG CTA TAG ATT CAG – 3'

Reakční směs pro PCR obsahovala 4 µl 5× My Taq pufru (Bioline), 0,5 µl F-primeru, 0,5 µl R-primeru, 0,1 µl My Taq polymerasy (Bioline), 13 µl nuclease-free vody, a 2 µl cDNA.

Pomocí PCR s teplotním gradientem byla optimalizována teplota nasedání primerů pro *Actin* a *BRI1*. Výsledný program PCR, stejný pro amplifikaci obou genů *BRI1* nebo *Actin* je uveden v tabulce 3.

Tabulka 3: Program PCR pro amplifikaci genu *Actin* a *BRI1*

| | | |
|-------|-------|----------|
| 94 °C | 3 min | 35 cyklů |
| 94 °C | 30 s | |
| 53 °C | 30 s | |
| 72 °C | 1 min | |
| 72 °C | 5 min | |
| 15 °C | ∞ | |

Produkty PCR byly následně smíchány s barvivem 6× loading Dye (Biogen) a nanášeny do jamek 1,5% agarosového gelu s barvivem GelRed. Byla provedena elektroforéza při konstantním napětí 80 V a pak vizualizace nukleových kyselin v gelu pomocí Gel DOC EZ Imageru (BioRad). Porovnání intenzity jednotlivých pruhů na gelu bylo provedeno pomocí softwaru ImageJ a výsledky zpracovány v programu Microsoft Excel 2007.

4 Výsledky

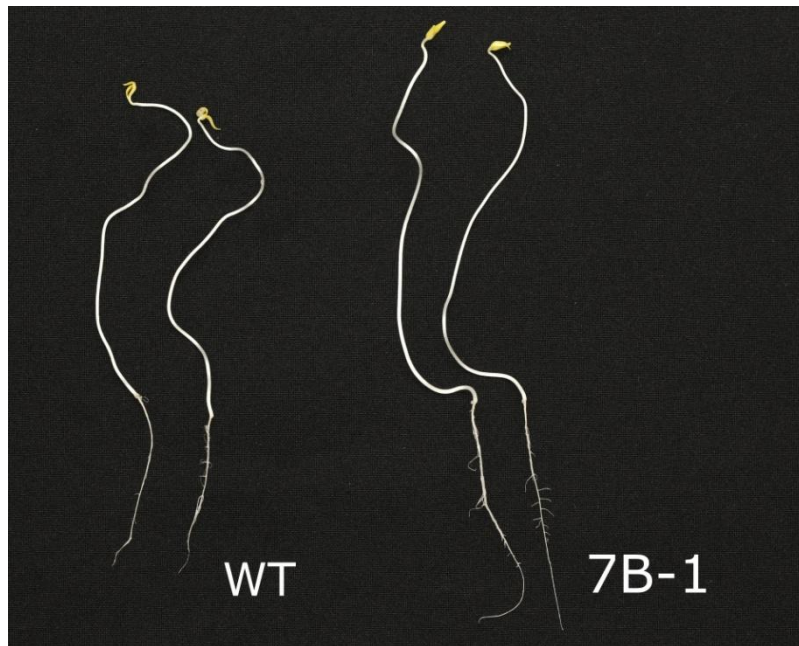
Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda existuje vztah mezi mutací *7B-1* u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) (Sawhney, 1997) a brassinosteroidy. Proto byly navrženy experimenty, ve kterých byly zkoumány růstové reakce kořene a hypokotylu k exogenním brassinosteroidům obsaženým v médiu. Jelikož již dříve byla prokázána odlišná reakce mutanta *7B-1* k modrému světlu, byly reakce k exogenním BRs zkoumány také v závislosti na světelných podmínkách (ve tmě, na modrém a na červeném světle). Výsledky z těchto experimentů prokázaly rozdílnou reakci hypokotylu mutanta *7B-1* k 24-*epi*BL na modrém světle od hypokotylu WT. Na jejich základě pak byly navrženy experimenty, ve kterých byly měřeny délky epidermálních buněk v prodlužovací zóně hypokotylu rostlin pěstovaných pod modrým světlem na médiu s různou koncentrací 24-*epi*BL. Tím bylo možné zjistit, zda je mutací *7B-1* ovlivněno dělení anebo prodlužování epidermálních buněk.

Otázkou tedy bylo, za tato rozdílná reakce k 24-*epi*BL nemůže být způsobena odlišnou endogenní hladinou BRs v hypokotylech mutanta *7B-1* nebo změněnou expresí genu pro brassinosteroidní receptor BRI1. V další části práce proto byla provedena analýza hladiny endogenních brassinosteroidů u rostlin pěstovaných za různých světelných podmínek. V poslední části bakalářské práce pak byla zkoumána intenzita exprese genu pro receptor BRI1 u testovaných genotypů *7B-1* a cv. Rutgers v závislosti na světelných podmínkách.

Všechny experimenty byly provedeny dle metodiky uvedené v předchozí kapitole.

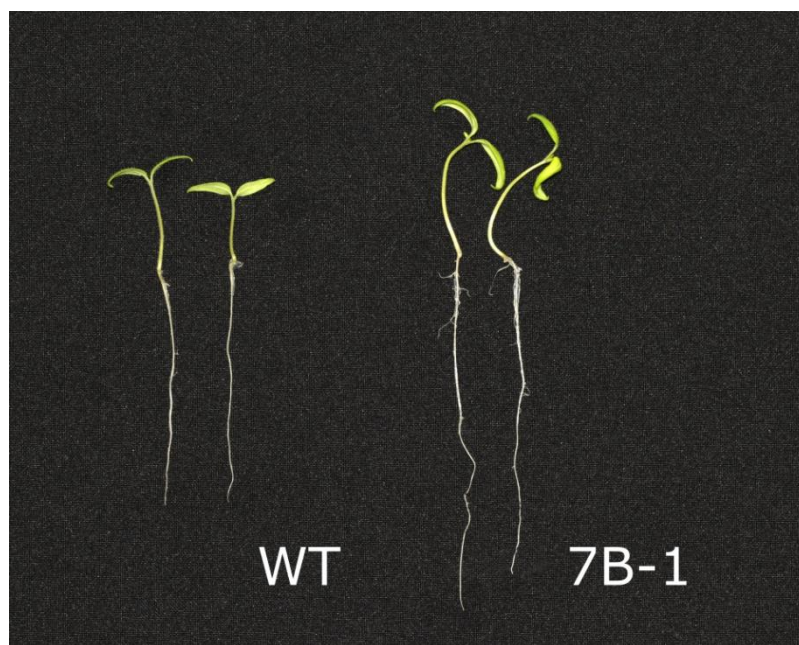
4.1 Fenotypy rostlin v závislosti na světelných podmínkách

Rostliny obou genotypů pěstované ve tmě vykazovaly charakteristický fenotyp skotomorfogeneze. Byl pozorován dlouhý křehký nezelený hypokotyl a žluté zakrslé dělohy, kořen byl výrazně kratší než hypokotyl. Průměrná délka kořenů i hypokotylů mutanta *7B-1* byla mírně vyšší než u WT (Obr. 14).



Obr. 14: Fenotyp desetidenních rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na základním médiu v růstové komoře ve tmě (foto Hana Martinková)

Fenotyp rostlin pěstovaných na modrém světle se výrazně lišil od etiolizovaných rostlin. Hypokotyl obou genotypů byl zelený, modré světlo inhibovalo jeho prodlužování. Dělohy byly rovněž zelené a otevřené. Hypokotyl i kořen byl výrazně delší u mutanta 7B-1 než u WT. Inhibice prodlužování hypokotylu, jež byla způsobena modrým světlem, byla tedy u mutanta 7B-1 výrazně slabší (Obr. 15).



Obr. 15: Fenotyp desetidenních rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na základním médiu v růstové komoře na modrém světle (foto Hana Martinková)

Rostliny pěstované na červeném světle se také výrazně lišily od etiolizovaných rostlin. Hypokotyl obou genotypů byl zelený, výrazně kratší než ve tmě, ale zároveň delší než u rostlin kultivovaných na modrém světle. Dělohy byly zelené a otevřené. Délka kořene a hypokotylu byla srovnatelná. V průměru měl mutant *7B-1* mírně delší kořen než WT (Obr. 16).



Obr. 16: Fenotyp desetidenních rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* kultivovaných na základním médiu v růstové komoře na červeném světle (foto Hana Martinková)

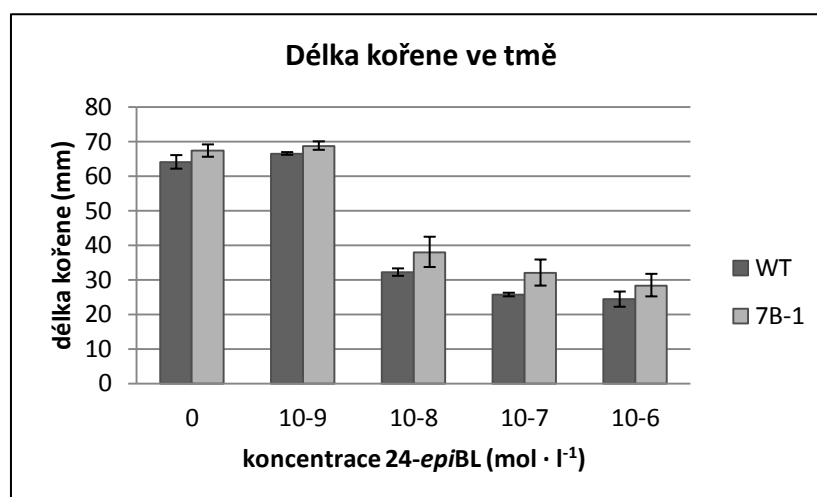
4. 2 Růstové reakce kořene a hypokotylu k BRs

4. 2. 1 Reakce k 24-epi brassinolidu

Růst rostlin obou genotypů byl ovlivněn přidáním 24-epiBL o koncentracích 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} a 10^{-6} mol \cdot l $^{-1}$ do základního MS média. Byly provedeny tři nezávislé experimenty s rostlinami pěstovanými v růstových komorách ve tmě a na červeném světle, čtyři nezávislá opakování s rostlinami kultivovanými pod modrým světlem. V jednotlivých experimentech byla z každé koncentrace a genotypu změřena délka kořene a hypokotylu deseti rostlin.

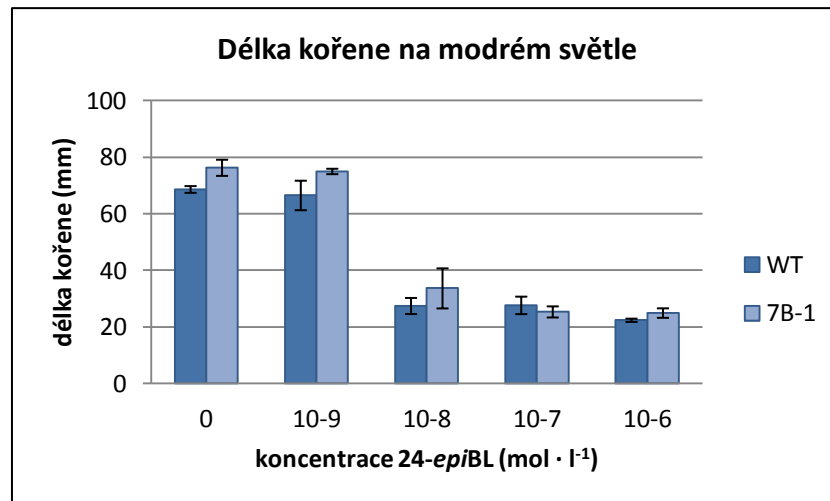
Růstové reakce kořene

U kořenů rostlin, jež rostly ve tmě, byla pozorována inhibice prodlužování při koncentracích 24-epiBL 10^{-8} mol \cdot l $^{-1}$ a vyšší. Mezi průměrnou délkou kořene WT a 7B-1 nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl (Graf 1).



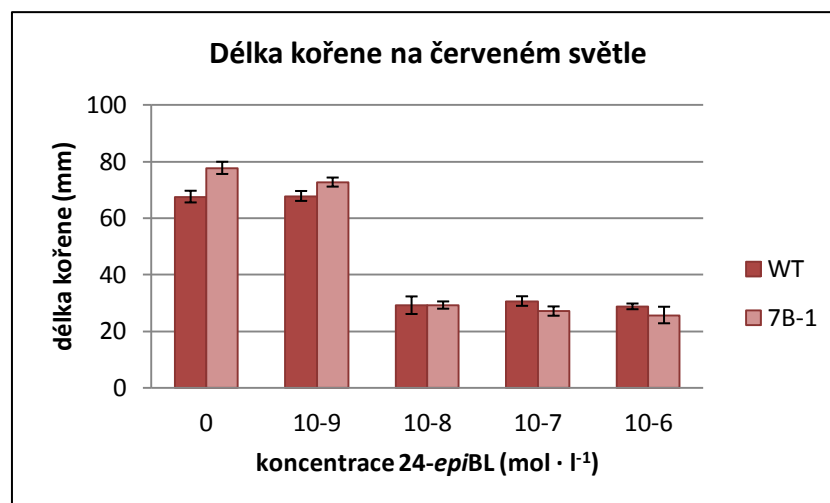
Graf 1: Průměrná délka kořene etiolizovaných rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Růstové reakce kořenů rostlin kultivovaných na modrém světle byly podobné jako u těch, jež byly pěstovány ve tmě. U obou genotypů byla zaznamenána inhibice prodlužování kořene vyvolaná exogenním 24-epiBL přítomným v médiu. Míra inhibice byla závislá na jeho koncentraci. Opět nebyl pozorován významný rozdíl v délce kořene mutanta 7B-1 a WT (Graf 2).



Graf 2: Průměrná délka kořene rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 rostoucích na modrém světle v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů.

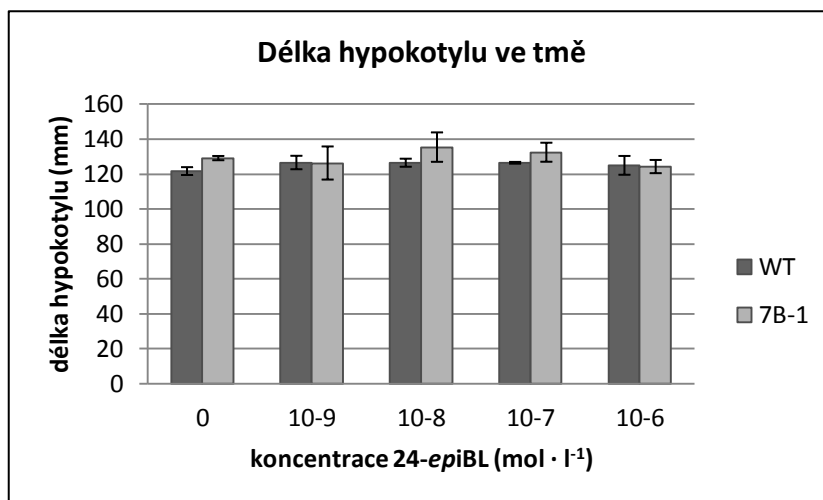
V případě rostlin kultivovaných na červeném světle byla (podobně jako u etiolizovaných rostlin a rostlin kultivovaných na modrém světle) pozorována inhibice růstu kořene vyvolaná 24-epiBL. Rozdíl v průměrné délce kořene mezi testovanými genotypy nebyl patrný (Graf 3).



Graf 3: Průměrná délka kořene rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 rostoucích na červeném světle v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze tří nezávislých experimentů.

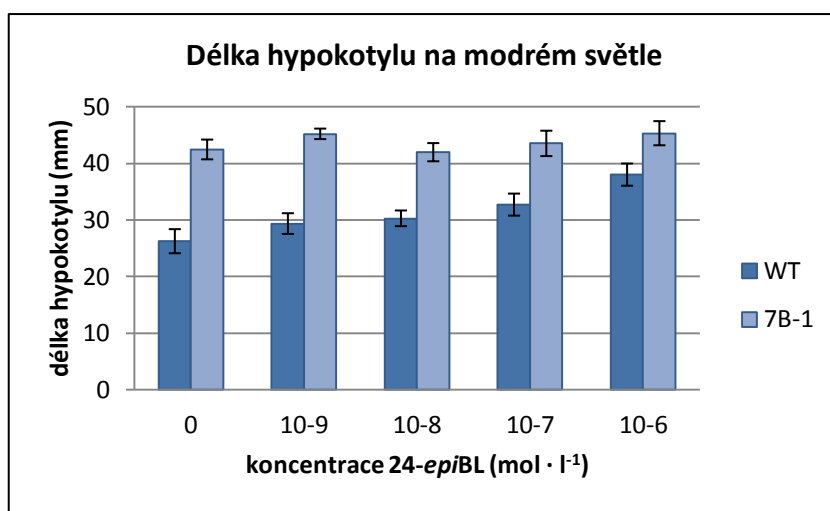
Růstové reakce hypokotylu

Průměrná délka hypokotylů etiolizovaných rostlin WT ani 7B-1 nebyla exogenním 24-epiBL přítomným v médiu nijak ovlivněna. Mezi testovanými genotypy nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl v délce hypokotylů (Graf 4).



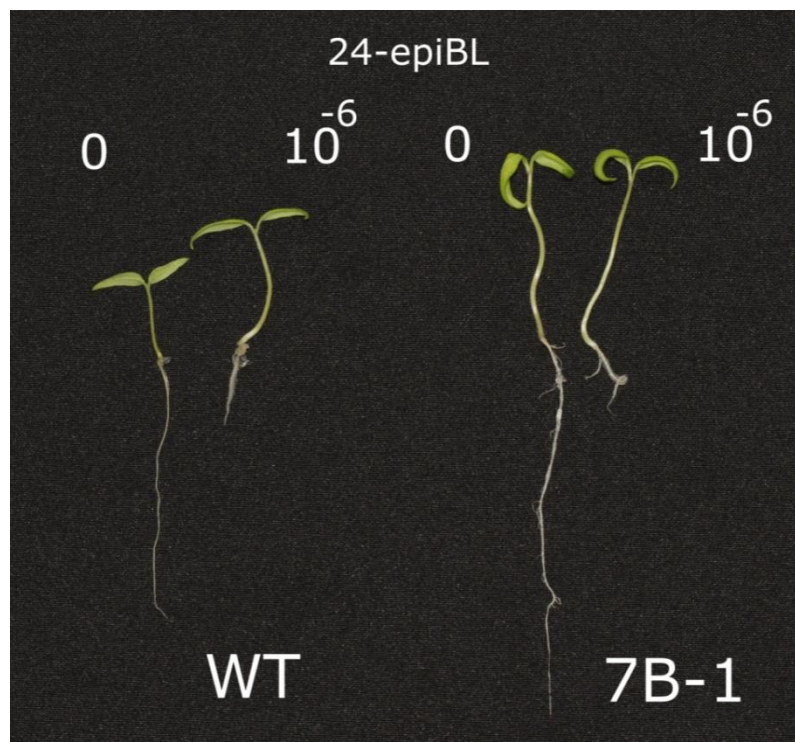
Graf 4: Průměrná délka hypokotylu etiolizovaných rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivarů Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Hypokotyl genotypu *7B-1* byl při kultivaci na modrém světle výrazně delší než hypokotyl standardního genotypu (Graf 5, Obr. 15). Na modrém světle byla také zaznamenána výrazně odlišná růstová reakce hypokotylů WT a mutantu *7B-1* při jejich kultivaci přidaným 24-*epiBL*. Ve všech testovaných koncentracích za současného působení modrého světla 24-*epiBL* stimuloval prodlužování hypokotylu u WT. Naopak, prodlužování hypokotylu vlivem exogenního 24-*epiBL* nebylo u *7B-1* pozorováno (Graf 5).



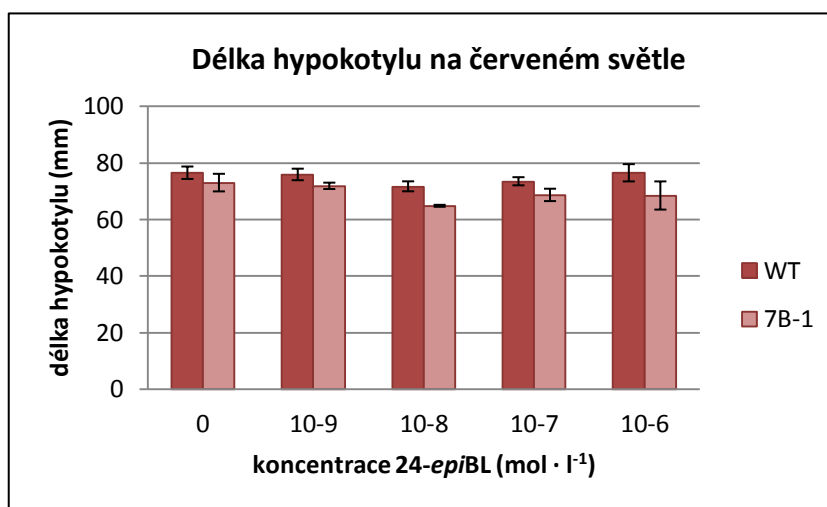
Graf 5: Průměrná délka hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* rostoucích na modrém světle v závislosti na koncentraci 24-*epibrassinolidu* v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze čtyř nezávislých experimentů.

Přidáním 24-*epiBL* v dostatečné koncentraci do média, na němž byly rostliny pěstovány, a společným působením modrého světla lze tedy u WT navodit podobný fenotyp hypokotylu jako u mutantu *7B-1* (Obr. 17).



Obr. 17: Fenotyp desetidenních rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných v růstové komoře na modrém světle. Rostlina vlevo byla pěstována na médiu bez přidaného 24-epibrassinolidu, rostlina vpravo na médiu obsahující 24-epibrassinolid o koncentraci $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ (foto Hana Martinková)

Průměrná délka hypokotylů rostlin, jež byly kultivovány pod červeným světlem, byla u obou genotypů kratší než u etiolizovaných rostlin, ale delší než u rostlin na modrém světle. Délka hypokotylu však podobně jako ve tmě nezávislá na koncentraci exogenního 24-epiBL v médiu. Hypokotyl mutanta 7B-1 byl v průměru mírně kratší než hypokotyl WT (Graf 6).



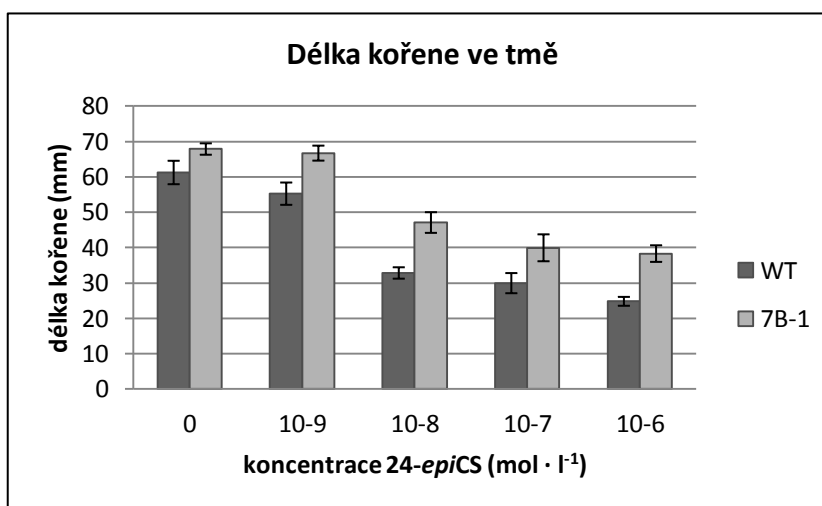
Graf 6: Průměrná délka hypokotylu rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 rostoucích na červeném světle v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané ze tří nezávislých experimentů.

4. 2. 2 Reakce k 24-epikastasteronu

Růstové reakce mutantu *7B-1* a WT k 24-epiCS v závislosti na světelných podmínkách byly hodnoceny z pěti nezávislých experimentů. Do média, na které byly rostliny pěstovány, byl přidán 24-epiCS v koncentracích 10^{-9} , 10^{-8} , 10^{-7} a 10^{-6} mol · l⁻¹. V jednotlivých experimentech byla změřena délka kořene a hypokotylu deseti rostlin od každé koncentrace a genotypu.

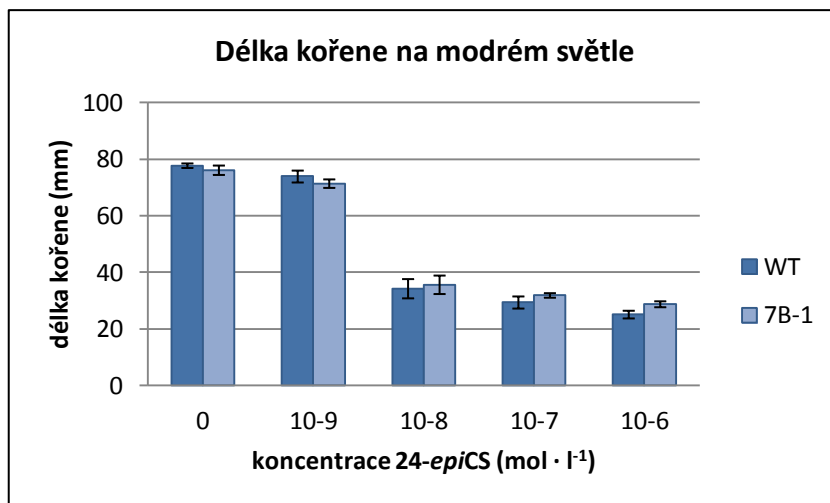
Růstové reakce kořene

U etiolizovaných rostlin byla pozorována inhibice prodlužování kořene se vzrůstající koncentrací 24-epiCS. Kořen mutantu *7B-1* byl delší než u WT za všech koncentrací 24-epiCS v médiu (Graf 7).



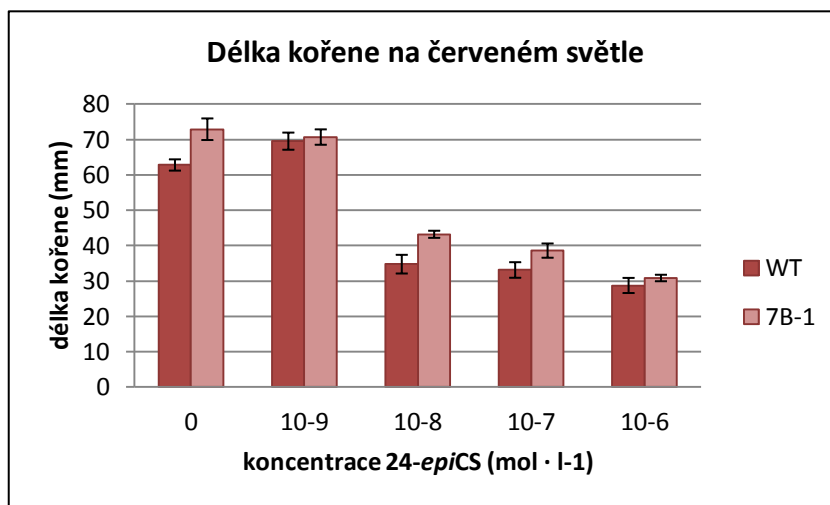
Graf 7: Průměrná délka kořene etiolizovaných rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* v závislosti na koncentraci 24-epikastasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty ± SE získané z pěti nezávislých experimentů.

Kořeny obou genotypů na modrém světle byly inhibovány 24-epiCS. Mezi průměrnou délkou kořene mutantu *7B-1* a WT nebyl pozorován rozdíl (Graf 8).



Graf 8: Průměrná délka kořene rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na modrém světle v závislosti na koncentraci 24-epikasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty ± SE získané z pěti nezávislých experimentů.

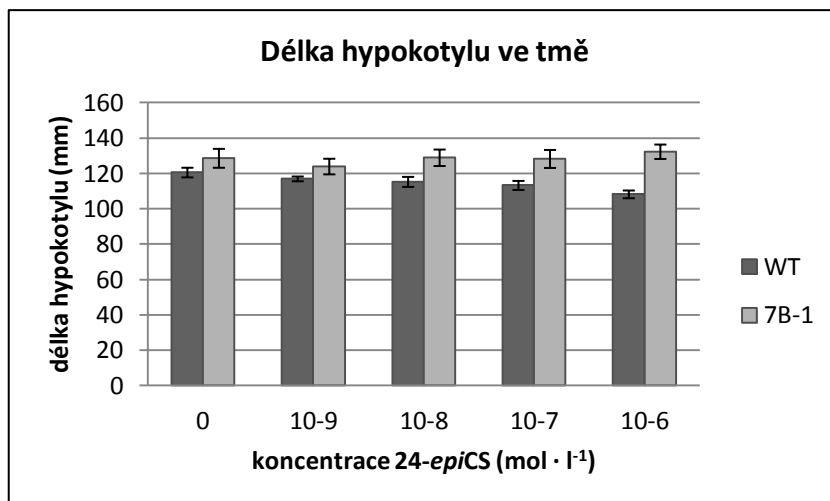
Inhibice kořene působením 24-epiCS byla u obou genotypů pozorována také na červeném světle. Kořen mutanta 7B-1 byl inhibován 24-epiCS v podobném rozsahu jako WT (Graf 9).



Graf 9: Průměrná délka kořene rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na červeném světle v závislosti na koncentraci 24-epikasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty ± SE získané z pěti nezávislých experimentů.

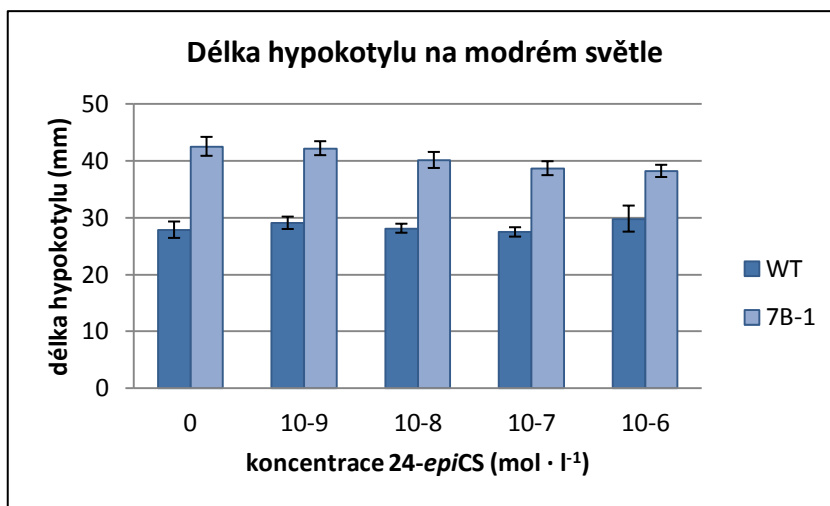
Růstové reakce hypokotylu

Stejně jako v případě 24-epBL, žádný významný účinek 24-epiCS na délku hypokotylu etiolizovaných rostlin WT či 7B-1 nebyl pozorován. Etiolizovaný hypokotyl mutanta byl za všech koncentrací mírně delší než hypokotyl WT (Graf 10).



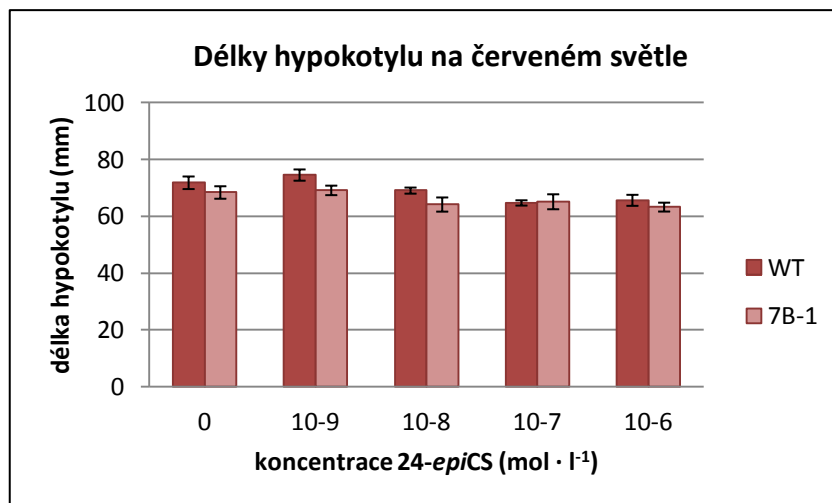
Graf 10: Průměrná délka hypokotyly etiolizovaných rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na koncentraci 24-epikastasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané z pěti nezávislých experimentů.

U hypokotylů rostlin pěstovaných pod modrým světlem nebylo, na rozdíl od 24-epiBL, pozorováno výrazné ovlivnění jejich průměrné délky v důsledku zvýšené koncentrace 24-epiCS v médiu. Průměrná délka hypokotyly mutanta 7B-1 byla výrazně větší než u WT (Graf 11).



Graf 11: Průměrná délka hypokotyly rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na modrém světle v závislosti na koncentraci 24-epikastasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané z pěti nezávislých experimentů.

Rostliny mutanta 7B-1 kultivované na červeném světle vytvářely hypokotyl srovnatelné délky, jaká byla pozorována u WT. U obou genotypů neměl exogenní 24-epiCS v médiu na délku hypokotyly žádný vliv (Graf 12).

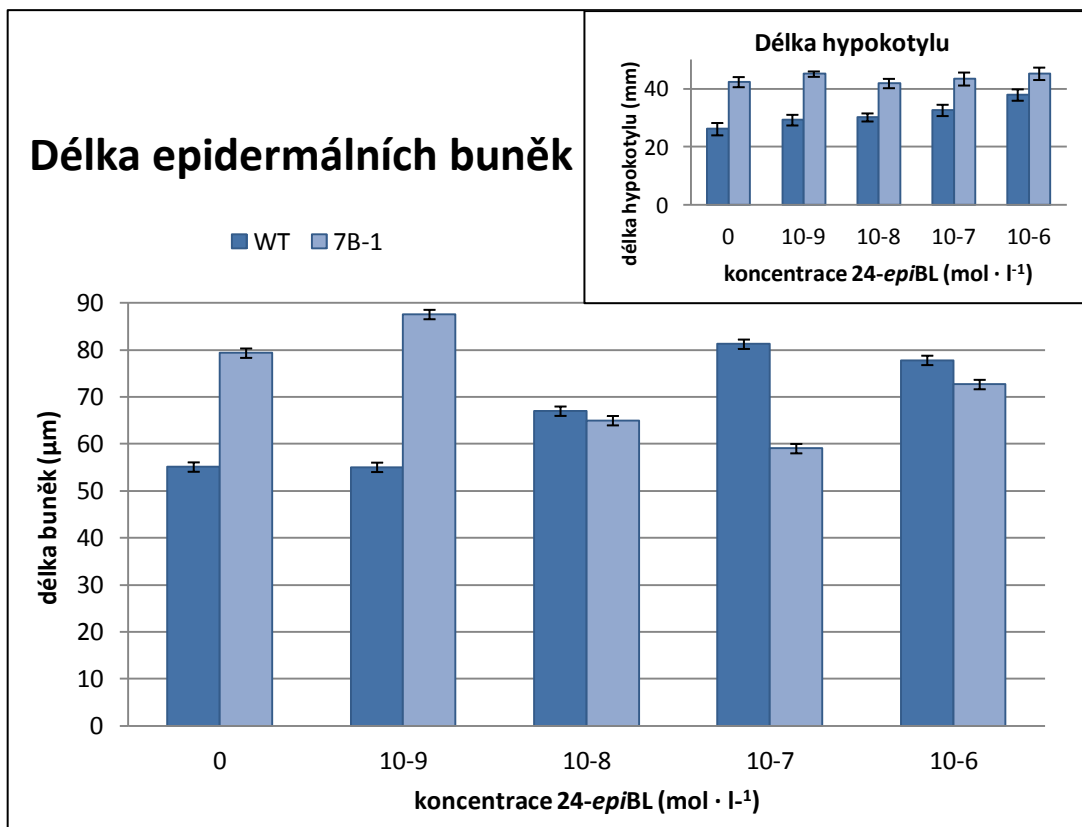


Graf 12: Průměrná délka hypokotyly rostlin *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných na červeném světle v závislosti na koncentraci 24-epikastasteronu v médiu. Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE získané z pěti nezávislých experimentů.

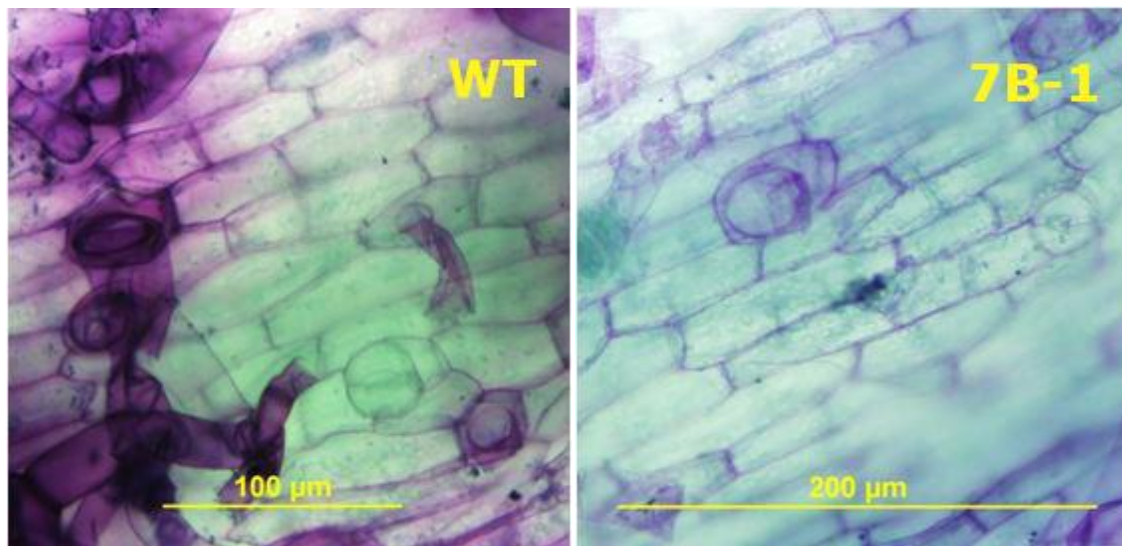
4.3 Délka epidermálních buněk hypokotyly

Mutant 7B-1 vytvářel na modrém světle podstatně delší hypokotyl, než standardní genotyp cv. Rutgers. Podobně, 24-epiBL stimuloval prodlužování hypokotyly standardního genotypu, nikoliv však u 7B-1. Zjišťovali jsme proto, zda je toto prodlužování důsledkem prodloužení buněk hypokotyly.

Délka epidermálních buněk hypokotyly byla měřena podle postupu uvedeného v metodice. V experimentu byly použity rostliny kultivované pod modrým světlem na základním médiu i na médiu obsahujícím 24-epiBL. Od každého genotypu byly pro jednotlivé koncentrace brassinosteroidu změřeny délky 300 buněk. Hodnota průměrné délky epidermálních buněk hypokotyly standardního genotypu se s rostoucí koncentrací 24-epiBL zvyšuje. Tento trend však nebyl zaznamenán u genotypu 7B-1. Výsledné hodnoty tak korelují s průměrnými délkami hypokotylů rostlin obou genotypů (Graf 13, Obr. 18).



Graf 13: Průměrná délka epidermálních buněk hypocotylu *Solanum lycopersicum* L. v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu v médiu. (standardního genotypu kultivaru Rutgers a genotypu 7B-1). Vpravo: Průměrné délky hypocotylů WT a 7B-1 v závislosti na koncentraci 24-epibrassinolidu. Kultivace rostlin probíhala pod modrým světlem.

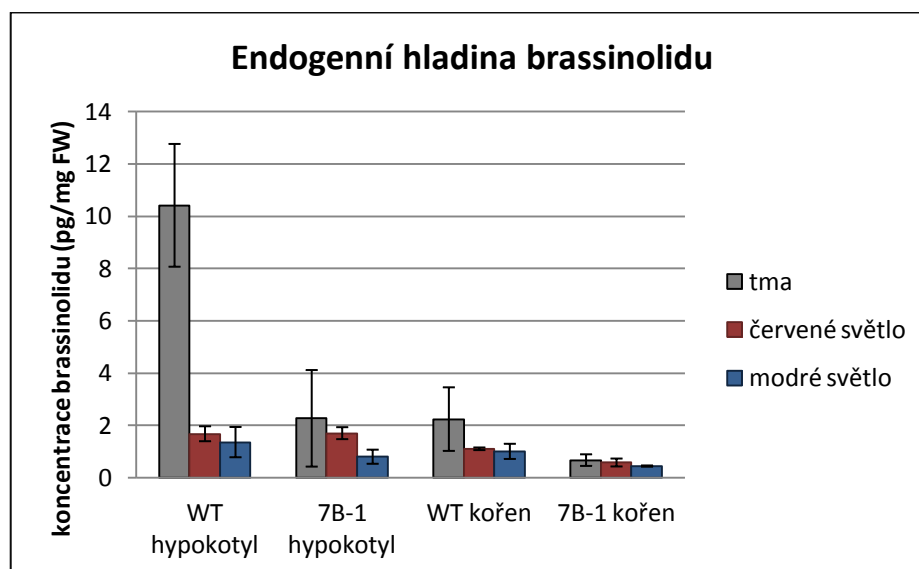


Obr. 18: Epidermální buňky hypocotylu rostlin rostoucích pod modrým světlem, barvené toluidinovou modří. Vlevo WT, vpravo 7B-1.

4. 4 Analýza endogenní hladiny brassinosteroidů

Kvantifikace brassinosteroidů v hypokotylech a kořenech rostlin kultivovaných za různých světelných podmínek (tma, červené či modré světlo) probíhala podle metodiky uvedené v předchozí kapitole. Od obou testovaných genotypů byly pro jednotlivé světelné podmínky odebrány vždy tři biologické vzorky. Každý biologický vzorek byl následně ještě rozdělen na tři vzorky technické. Analýza byla provedena Mgr. Danuší Tarkowskou, Ph.D. z Laboratoře růstových regulátorů, PŘF, UP v Olomouci.

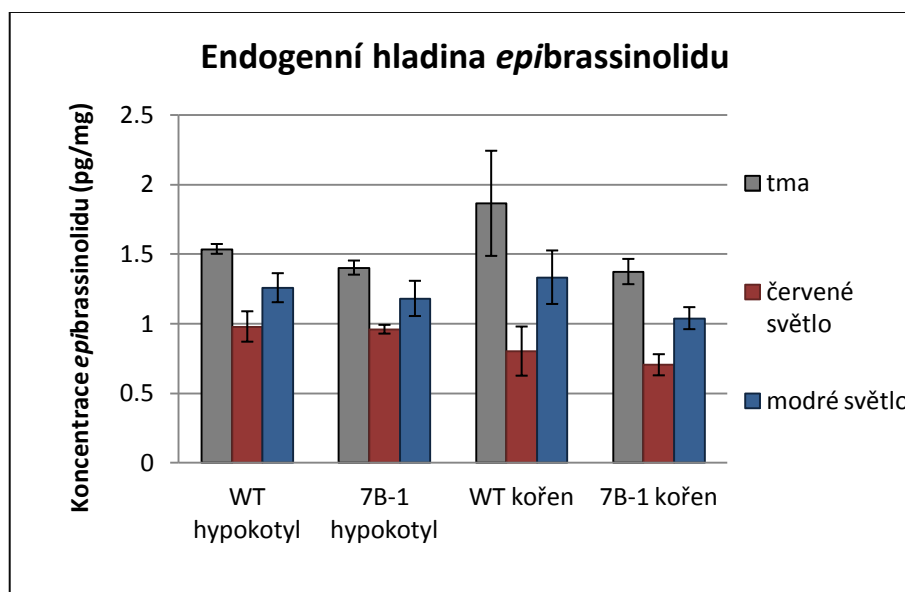
Ve vzorcích bylo detekováno 6 látek patřící mezi brassinosteroidy: brassinolid, *epibrassinolid*, kastasteron, *epikastasteron*, *norteasteron* a *tyfasteron*. V hypokotylu obou genotypů byla zjištěna nejvyšší koncentrace brassinolidu. Jeho hladina se v rostlinách standardního genotypu a *7B-1* nijak výrazně nelišila, pokud byly rostliny pěstovány na červeném či na modrém světle. Naopak u etiolizovaných rostlin byl mezi genotypy pozorován zásadní rozdíl. U standardního genotypu byla zjištěna téměř pětkrát vyšší endogenní hladina brassinolidu než u *7B-1*. Koncentrace brassinolidu v kořeni byla rovněž větší u WT než u *7B-1*, avšak rozdíl nebyl tak zásadní jako u hypokotylu (Graf 14). Na rozdíl od hypokotylů, u kořenů obou genotypů nebyl pozorován výrazný inhibiční účinek světla na hladinu brassinolidu.



Graf 14: Koncentrace brassinolidu v hypokotylu a kořeni *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu cv. Rutgers a mutanta *7B-1* v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

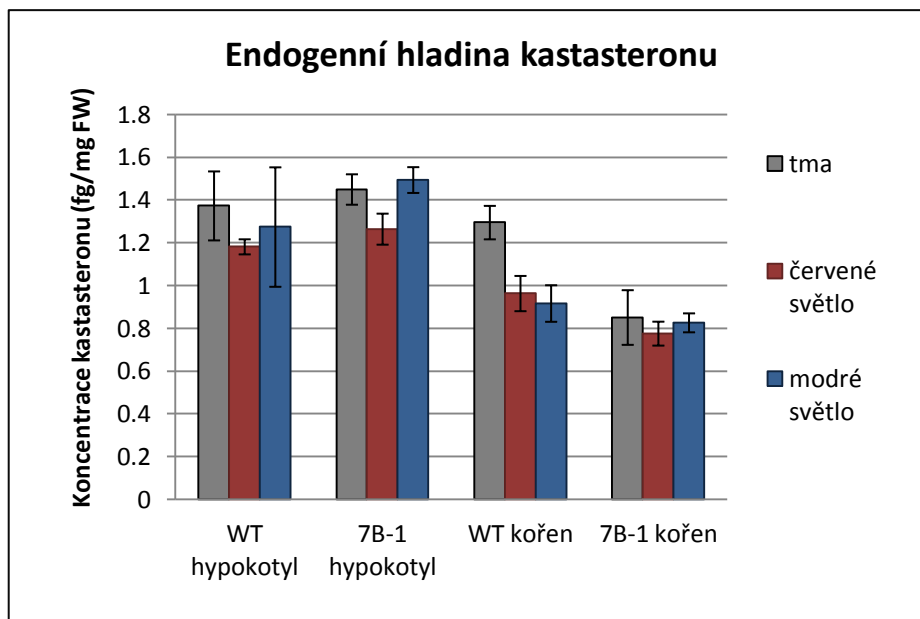
Endogenní hladina druhého detekovaného brassinosteroidu, *epibrassinolidu*, byla výrazně nižší, než hladina brassinolidu, a to u všech rostlin nezávisle na světelných

podmínkách (Graf 15). Hladina *epibrassinolidu* byla u obou genotypů podobná, a jeho množství bylo snižováno modrým i červeným světlem.



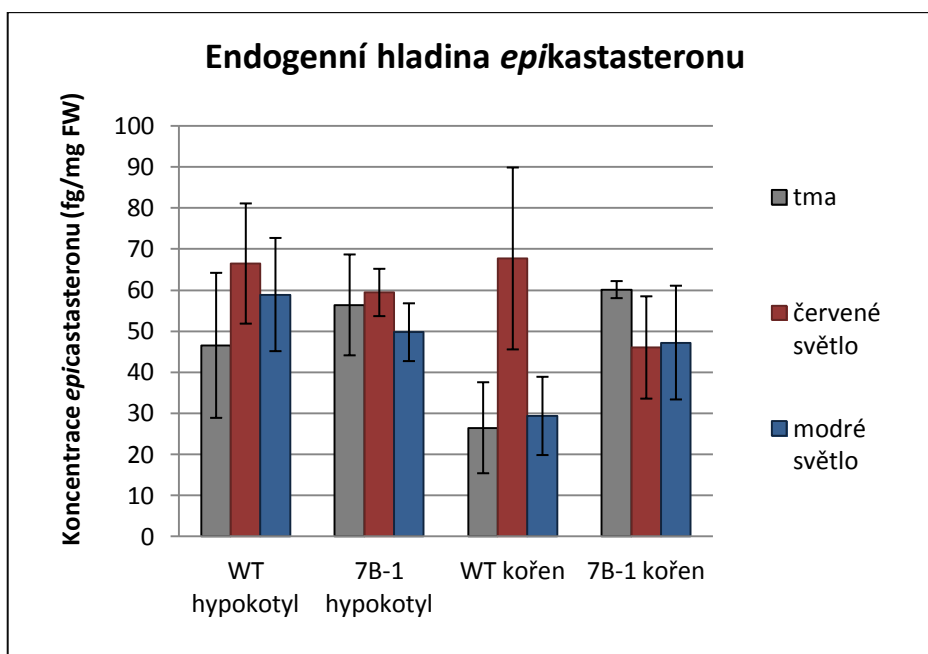
Graf 15: Koncentrace *epibrassinolidu* v hypokotylu a kořeni *Solanum lycopersicum L.* standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

Kastasteron byl v rostlinách přítomný v mnohem menším množství než ostatní testované brassinosteroidy. Jeho koncentrace se ve všech rostlinách pohybovaly okolo 1 fg na miligram čerstvého rostlinného materiálu. V kořeni obou genotypů byla koncentrace mírně nižší než v hypokotylu. V kořeni WT byla endogenní hladina kastasteronu redukována světlem, zatímco u 7B-1 tento vliv světla pozorován nebyl (Graf 16).



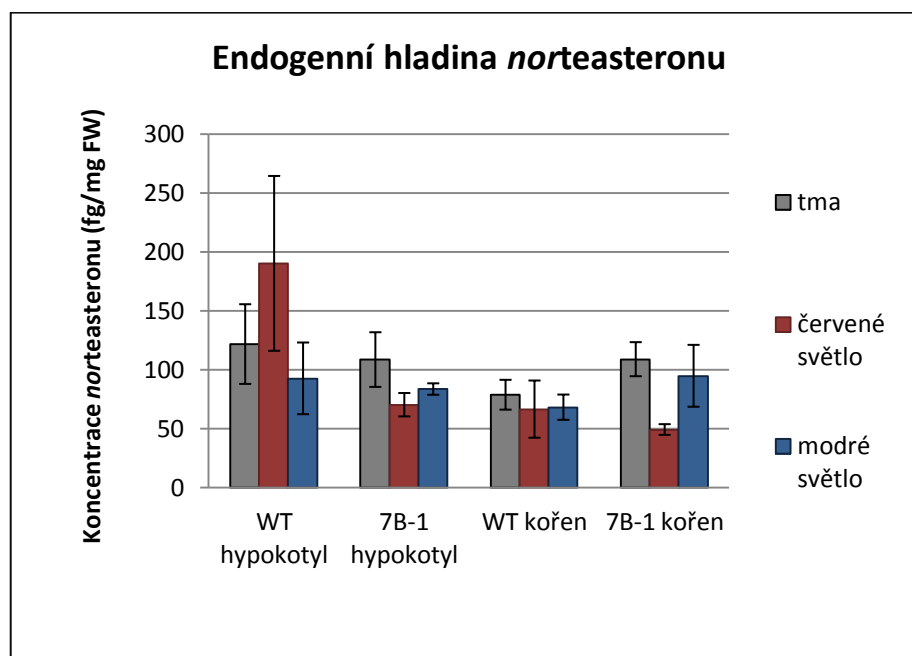
Graf 16: Koncentrace kastasteronu v hypocotylu a kořeni *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

Epikastasteron byl ve všech rostlinách přítomen v desítkách femtogramů na miligram čerstvé váhy. Standardní chyby průměrů hodnot získaných z analýzy vzorků byly v případě *epikastasteronu* natolik velké, že nelze s uspokojivou přesností porovnat vliv odlišných světelných podmínek na koncentraci *epikastasteronu* v rostlinách (Graf 17).



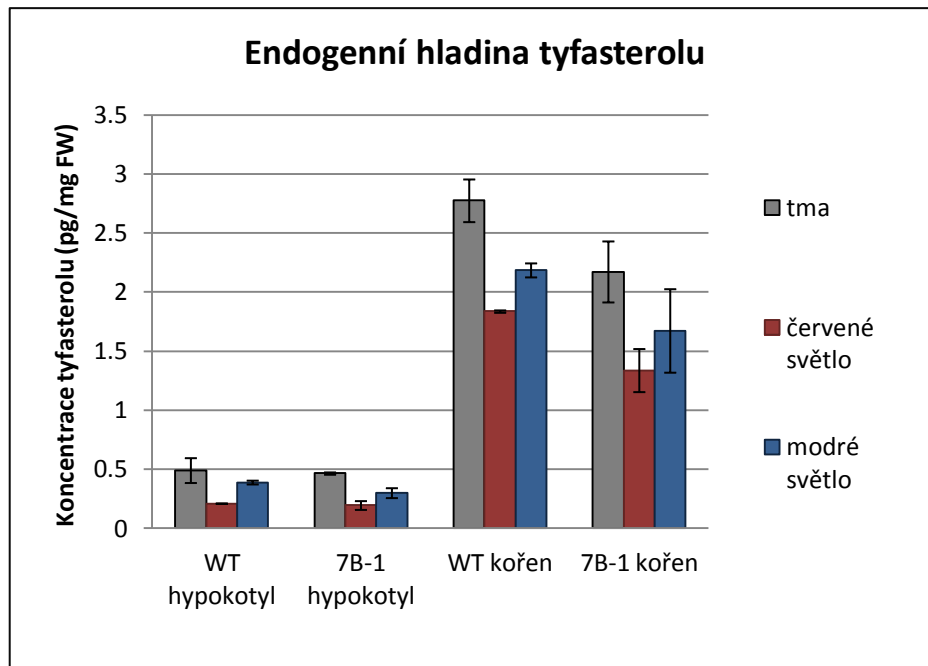
Graf 17: Koncentrace epikastasteronu v hypocotylu a kořeni *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

Endogenní hladina *nor*teasteronu byla podobná u obou genotypů a pohybovala se v hypokotylu i kořeni rovněž v desítkách femtogramů na mg čerstvé váhy. Výrazný vliv světla na hladiny *nor*teasteronu nebyl pozorován (Graf 18).



Graf 18: Koncentrace *nor*teasteronu v hypokotylu a kořeni *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

Tyfasterol se vyskytoval převážně v kořenech obou genotypů, jeho endogenní hladina v hypokotylu byla výrazně nižší než v kořeni. Nejvíce tyfasterolu obsahovaly kořeny rostlin WT, jež byly pěstovány ve tmě a byla pozorována mírná redukce množství tyfasterolu vlivem modrého i červeného světla. Podobný trend byl pozorován i u mutanta 7B-1 (Graf 19).

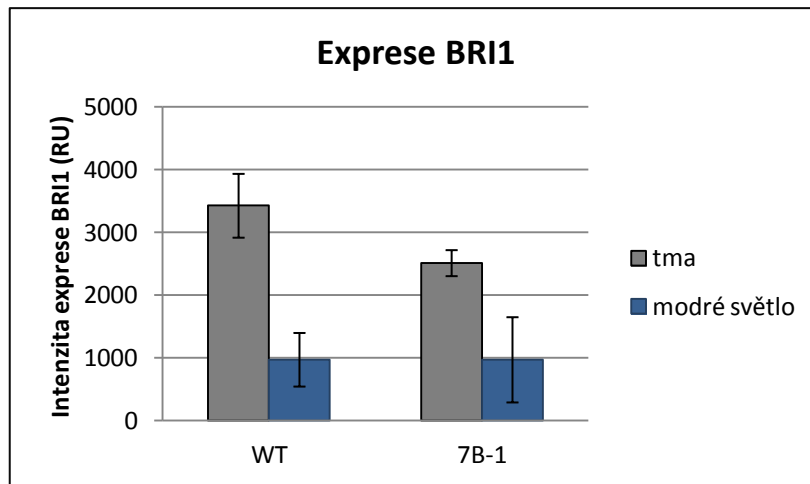


Graf 19: Koncentrace tyfasterolu v hypocotylu a kořeni *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách, jimž byly rostliny vystaveny při kultivaci (tma, červené, modré světlo).

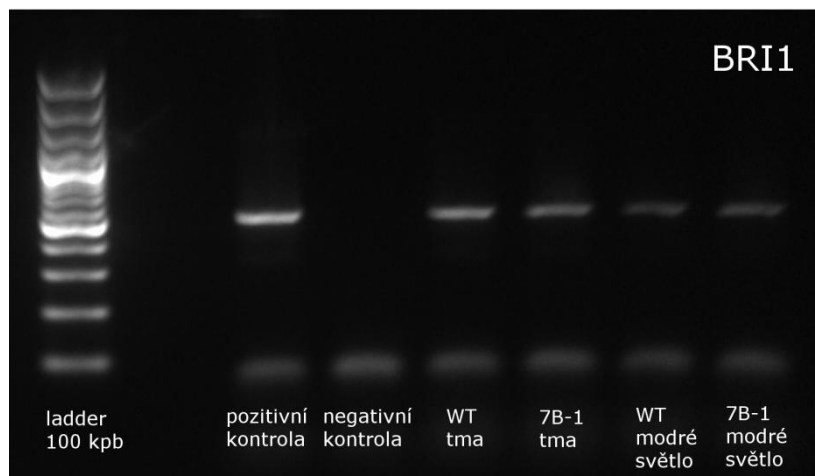
4.5 Exprese genu *BRI1*

Byly provedeny dva nezávislé experimenty, ve kterých byla izolována celková RNA z hypocotylů rostlin WT a 7B-1 (kultivovaných ve tmě či na modrém světle), provedena syntéza cDNA a pomocí specifických primerů amplifikovány geny *Actin* a *BRI1*.

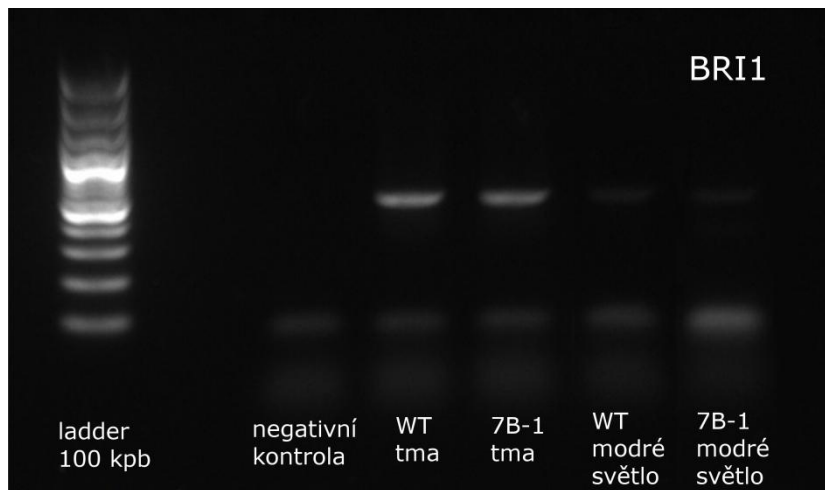
Exprese genu *Actin*, jež měl být použit jako kontrolní provozní (housekeeping) gen, však byla u jednotlivých genotypů i světelných podmínek odlišná. Z toho důvodu nemohla být exprese *BRI1* porovnána vůči genu *Actin*. Byly tedy porovnány pouze hodnoty intenzity exprese genu *BRI1* jednotlivých genotypů a světelných podmínek mezi sebou. Intenzita exprese genu *BRI1* byla v případě etiolizovaných rostlin přibližně o třetinu vyšší u WT než u 7B-1. U obou genotypů byla exprese *BRI1* výrazně snižována působením modrého světla, přičemž průměrné hodnoty intenzity exprese byly u testovaných genotypů srovnatelné (Graf 20, Obr. 19 a 20)



Graf 20: Průměrná intenzita exprese genu *BRI1* u *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutovaného genotypu 7B-1 v závislosti na světelných podmínkách.



Obr. 19: Experiment I: záznam 1% agarosového gelu na němž byly pomocné elektroforézy rozděleny PCR produkty po amplifikaci genu *BRI1* z cDNA izolované ze standardního genotypu (WT) a mutanta 7B-1 kultivovaných ve tmě či na modrém světle.



Obr. 20: Experiment II: záznam 1% agarosového gelu na něž byly pomocní elektroforézy rozděleny PCR produkty po amplifikaci genu *BRI1* z cDNA izolované z *Solanum lycopersicum* L. standardního genotypu (WT) a mutantu 7B-1 kultivovaných ve tmě či na modrém světle.

5 Diskuze

Z předchozích studií vyplývá, že mutace *7B-1* u rajčete *Solanum lycopersicum* snižuje de-etiolizaci hypokotylu na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002). Ve shodě s tím mutant vykazuje na modrém světle redukovanou inhibici prodlužování epidermálních buněk hypokotylu (Bergougnoux *et al.*, 2012). Nedávné práce ukazující absenci otevírání průduchů *7B-1* na modrém světle (Hlavinka *et al.*, 2012) a dosud nepublikované výsledky experimentů pohybu chloroplastů (Ježilová, Bergougnoux, Fellner, dosud nepublikováno) naznačují, že mutace *7B-1* pravděpodobně zasahuje také procesy spojené s fototropinovou signální drahou.

Analýza endogenních hormonů ukázala u mutantu *7B-1* sníženou hladinu auxinu a giberelinů (Fellner *et al.*, 2001), ethylenu (Fellner *et al.*, 2005) i cytokininů (Bergougnoux *et al.*, 2012) a naopak zvýšenou produkci ABA (Fellner *et al.*, 2001). Cílem této bakalářské práce bylo osvětlit potenciální vztah mutace *7B-1* k další skupině rostlinných hormonů, jež stimulují prodlužování buněk a jsou zapojeny ve fotomorfogenezi i fototropismu – k brassinosteroidům. Případně poodhalit možnou spojitost signalizace či biosyntézy brassinosteroidů s elementem signální dráhy modrého světla, ve kterém je mutant *7B-1* defektní. Výsledky práce by mohly obohatit znalosti týkající se interakce signálních drah BRs a světla (především modrého), které regulují růst hypokotylu.

Experimentální část bakalářské práce se jako první zaměřila na růstové reakce mutantu *7B-1* k *24-ep*brassinolidu a *24-ep*kastasteronu ve tmě, na modrém a na červeném světle. V další části byla provedena analýza endogenní hladiny BRs u testovaných genotypů kultivovaných za různých světelných podmínek. Poslední část experimentů se věnovala expresi genu kódujícího brassinosteroidní receptor BR11 v závislosti na světelných podmínkách.

Průměrné délky rostlin kultivovaných bez přítomnosti exogenních BRs potvrzují již zmíněnou redukovanou de-etiolizaci hypokotylu u mutantu *7B-1* na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002). Větší délce hypokotylu odpovídají také průměrně delší epidermální buňky. Získaná data potvrzují předchozí výsledky publikované Bergougnoux *et al.* (2012).

Změně v percepce či signální kaskádě modrého světla u mutantu *7B-1* nasvědčují také růstové reakce hypokotylu k *24-ep*BL. Z experimentů provedených v této práci vyplývá, že *24-ep*BL stimuluje prodlužování hypokotylu WT pouze za současného působení modrého světla. Ve shodě s tím, exogenní *24-ep*BL na modrém světle prokazatelně stimuloval prodlužování epidermálních buněk. Na rozdíl od WT, hypokotyl *7B-1* i jeho epidermální buňky jsou na modrém světle necitlivé k exogennímu

24-*ep*BL. Výsledky tedy naznačují, že funkční produkt genu *7B-1* funguje jako pozitivní regulátor de-etiolizace hypokotylu (fotomorfogeneze) na modrém světle. *7B-1* je však současně nutný pro zachování citlivosti buněk k BRs na modrém světle.

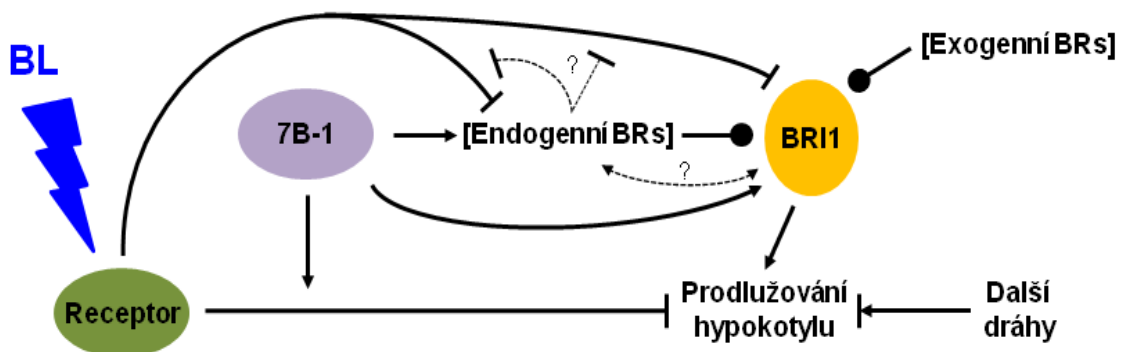
Jednou z hypotéz, proč hypokotyl mutantu *7B-1* ukazuje na modrém světle necitlivost k exogennímu 24-*ep*BL, bylo, že má vyšší endogenní hladinu BRs. Tím by se vysvětlilo, proč jsou epidermální buňky *7B-1* na modrém světle delší a také to, že fenotyp mutantu je podobný fenotypu WT po stimulaci pomocí 24-*ep*BL. U mutantu *7B-1* by pak byla další aplikací 24-*ep*BL překročena hraniční koncentrace hormonu, která vede k prodlužování buněk. Tato hypotéza však byla vyvrácena kvantifikací endogenních BRs v obou genotypech. Z výsledků vyplynulo, že výrazný rozdíl v koncentraci BRs mezi testovanými genotypy je pouze ve tmě. Za těchto podmínek byla koncentrace brassinolidu v hypokotylech mutantu *7B-1* pětkrát menší než u WT. Modré světlo obecně pak snižovalo endogenní hladinu brassinolidu v hypokotylech obou genotypů, což je ve shodě s řadou literárních zdrojů (Wang *et al.*, 2012; Vriet *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014).

Další možností je, že by modré světlo mohlo ovlivňovat, konkrétně zvyšovat, intenzitu exprese receptoru BRs. Z experimentů, ve kterých byla porovnána intenzita exprese genu *BR11*, vyplývá, že etiolizované hypokotyle *7B-1* mají nižší expresi *BR11*, než bylo pozorováno u WT. Na modrém světle je pak exprese *BR11* u obou genotypů podobná. To by tedy mohlo znamenat, že expresi genu *BR11* snižuje jiná signální dráha modrého světla než ta, která řídí inhibici prodlužování hypokotylu. Protože v tomto případě mutant *7B-1* reaguje na modré světlo podobně jako WT, tak je pravděpodobné, že ve tmě funkční produkt *7B-1* zvyšuje expresi *BR11* i hladinu endogenního brassinolidu. Na základě literárních údajů (Oh *et al.*, 2012; Bai *et al.*, 2012; Jaillais and Vert, 2012; Wang *et al.*, 2012) je také možné, že elementy regulující syntézu BRs (např. transkripční faktor BZR1) současně potlačují zpětnou vazbu signalizaci modrého světla regulující hladinu BRs a/nebo expresi *BR11*.

Více by k této problematice mohlo napovědět srovnání exprese *BR11* s jiným provozním genem, či použití Real-time PCR. Změna brassinosteroidního receptoru by však mohla u genotypu *7B-1* také nastat až na posttranslační úrovni (ovlivněním transportu receptoru do cytoplazmatické membrány, jeho degradací či změnou funkčnosti). Nebo by mohla být ovlivněna jiná komponenta brassinosteroidní signální dráhy. Brassinosteroidní signál musí být přenesen od receptoru v cytoplazmatické membráně až k transkripčním faktorům jako jsou BZR1 či BZR2/BSU1 (Wang *et al.*, 2012). Jakákoli část této dráhy by mohla přímo či nepřímo interagovat s elementem signální dráhy modrého světla, v němž může být *7B-1* defektní, nebo být dokonce společným elementem pro obě signální dráhy.

Nezávisle na světelných podmínkách byla (při námi testovaných koncentracích BRs) pozorována inhibice kořene u obou genotypů. Brassinosteroidy o vyšších koncentracích obecně inhibují prodlužování kořene, kdežto při nízkých koncentracích jej naopak mohou stimulovat. Koncentrace BRs použité v této bakalářské práci jsou pro testování růstu kořene příliš vysoké a je možné, že z tohoto důvodu nebyl mezi *7B-1* a WT zaznamenán žádný rozdíl v růstových reakcích kořene k BRs. Proto by další otázkou mohlo být, zda by použití nižších koncentrací BRs vedlo ke stimulaci růstu kořene a zda by byl pozorován rozdíl mezi *7B-1* a WT, podobně jako tomu bylo u hypokotylů. Zajímavým problémem pro další studium vztahu mutace *7B-1* k BRs by byla také kvantifikace endogenní hladiny BRs u rostlin, jejichž prodlužování epidermálních buněk bylo stimulováno *24-epiBL*.

Na základě výsledků bakalářské práce a současných literárních údajů byl sestaven pracovní model, který navrhuje, jakým způsobem je ovlivňováno prodlužování hypokotylu rajčete modrým světlem, prostřednictvím BRs, a jakou úlohu v tomto mechanismu hraje produkt zatím neznámého genu *7B-1* (Obr. 21).



Obr. 21: Schéma zapojení produktu genu *7B-1* do signální dráhy modrého světla, brassinosteroidů a těmito drahami ovlivněného prodlužování hypokotylu rajčete: Modré světlo inhibuje prodlužování hypokotylu. Jinou signální dráhou snižuje endogenní hladinu BRs i expresi *BRI1*, což inhibici prodlužování podporuje. Funkční produkt *7B-1* pozitivně ovlivňuje fotomorfogenezi, ale současně naopak stimuluje expresi *BRI1* i endogenní hladinu BRs. Zvýšená hladina BRs, či exprese *BRI1* má pozitivní účinek na prodlužování hypokotylu. Pozitivní vliv brassinolidu na prodlužování buněk WT specificky na modrém světle může být vysvětlen zpětnou vazbou, při níž endogenní BRs mohou potlačovat účinky modrého světla na biosyntézu BRs i a expresi *BRI1*. Dále je možné, že endogenní BRs mohou ovlivňovat expresi *BRI1* a naopak. Šipky ve schématu označují stimulaci, tupé konce (T) označují inhibici.

6 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo osvětlit vztah mutace *7B-1* u rajčete *Solanum lycopersicum* a skupinou rostlinných hormonů – brassinosteroidů. Zároveň také zkoumat interakce signální dráhy světla se signální dráhou BRs.

Byly provedeny experimenty týkající se růstových reakcí kořene a hypokotylu ke dvěma brassinosteroidům (*24-epibrassinolid* a *24-epikastasteron*) rostlin WT a *7B-1*, jež byly kultivovány ve tmě, pod modrým či pod červeným světlem. Dále byla provedena kvantifikace endogenních BRs v kořenech a hypokotylech WT a *7B-1*, jež byly také pěstovány za různých světelných podmínek. Poslední část experimentů se věnovala intenzitě exprese genu pro brassinosteroidní receptor *BRI1* u obou testovaných genotypů v závislosti na světelných podmínkách.

Bylo zjištěno, že modré světlo snižuje endogenní hladinu BRs a také intenzitu exprese genu *BRI1* v hypokotylu rajčete. Analýzy mutantu *7B-1* naznačují, že funkční produkt *7B-1* pozitivně ovlivňuje fotomorfogenezi rostlin rajčete indukovanou modrým světlem. Výsledky experimentů vedou dále k závěru, že produkt *7B-1* je zapojen v signální dráze brassinosteroidů, a to tak, že stimuluje expresi genu pro receptor *BRI1* i akumulaci endogenních BRs. Navrhovaný pracovní model naznačuje další možné interakce mezi signálními drahami modrého světla a brassinosteroidy a ukazuje možnosti další experimentální práce a testování tohoto modelu.

7 Seznam zkratek

| | |
|-------------------|---|
| 24- <i>epi</i> BL | 24- <i>epi</i> brassinolid |
| 24- <i>epi</i> CS | 24- <i>epi</i> kastasteron |
| ABA | kyselina abscisová |
| ACC | 1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina |
| BAK1 | BRI1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE1 |
| BES1/BZR2 | BRI1-EMS-SUPPRESSOR1 |
| BIN2 | BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE 2 |
| BKI1 | BRI1 KINASE INHIBITOR1 |
| BL | brassinolid |
| BRI1 | BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1 |
| BRs | brassinosteroidy |
| BSK | BR-SIGNALING KINASE |
| BSU1 | BRI1-SUPPRESSOR 1 |
| BZR1 | BRASSINAZOLE RESISTANT1 |
| CS | kastasteron |
| CDG1 | CONSTITUTIVE DIFFERENTIAL GROWTH |
| COP1 | CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1 |
| <i>cpd</i> | <i>constitutive photomorphogenesis and dwarfism</i> |
| <i>det2</i> | <i>de-etiolated-2</i> |
| FW | fresh weight |
| GAs | gibereliny |
| g_s | vodivost průduchů |
| IAA | indolyl-3-octová kyselina |
| iP | Isopentenyladenin |
| MES | Morpholinoethane sulfonic acid |
| NO | oxid dusnatý |
| PAL | fenylalaninamoniaklyasa |
| Pn | rychlost čisté fotosyntézy |
| RLCKs | receptor-like cytoplasmic kinases |
| SPE | extrakce na tuhé fázi |
| WT | wild-type |
| WUE _i | vnitřní efektivní využití vody |

8 Literatura

Bai MY, Shang JX, Oh E, Fan M, Bai Y, Zentella R, Sun T, Wang ZY; 2012. Brassinosteroid, Gibberellin and phytochrome impinge on a common transcription module in Arabidopsis. *Nature Cell Biology*. **14**: 810-817

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-Klinkengerg A, Fellner M; 2012. Effect of Blue Light on Endogenous Isopentenyladenine and Endoreduplication during Photomorphogenesis and De-Etiolation of Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Seedlings. *PLoS ONE*. **7**: e45455

Bishop GJ, Yokota T; 2001. Plants Steroid Hormones Brassinosteroids: Current Highlights of Molecular Aspects on their Synthesis/Metabolism, Transport, Perception and Response. *Plant and Cell Physiology*. **42**: 114-120

Clouse SD, Langford M, McMorris T; 1996. A Brassinosteroid-Insensitive Mutant in *Arabidopsis thaliana* Exhibits Multiple Defects in Growth and Development. *Plant Physiology*. **111**: 671-678

Clouse SD, Sasse JM; 1998. Brassinosteroids: Essential Regulators of Plant Growth and Development. *Annual Review of Plant Physiology and Development*. **49**: 427-451

Clouse SD; 2001. Integration of light and brassinosteroid signals in etiolated seedling growth. *Trends in Plant Science*. **6**: 443-445

Daie J, Campbell WF; 1981. Response of Tomato Plants to Stressful Temperatures. *Plant Physiology*. **67**: 26-29

Desikan R, Griffiths R, Hancock J, Neill S; 2002. A new role for an old enzyme: Nitrate reductase-mediated nitric oxide generation is required for abscisic acid-induced stomatal

closure in *Arabidopsis thaliana*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **99**: 16314-16318

Fellner M, Franklin JA, Reid DM, Sawhney VK; 2005. Increased Sensitivity to, and Reduced Production of Ethylene in an ABA-overproducing Tomato Mutant. Acta Biologica Cracoviensia, Series Botanica. **47**: 205-212

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

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

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

Fridman Y, Savaldi-Goldstein S; 2013. Brassinosteroids in growth control: How, when and where. Plant Science. **209**: 24-31

Goldbach H, Michael G; 1976. Abscisic Acid Content of Barley Grains During Ripening as Affected by Temperature and Variety. Crop Science. **16**: 797-799

Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK; 1979. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. Nature. **281**: 216-217

Gudesblat GE, Russinova E; 2011. Plants grow on brassinosteroids. Current Opinion in Plant Biology **14**: 530-537

He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N; 2005. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. Science. **307**: 1634-38

He JX, Gendron JM, Yang Y, Li J, Wang ZY; 2002. The GSK3-like kinase BIN2 phosphorylates and destabilizes BZR1, a positive regulator of the brassinosteroid signaling pathway in *Arabidopsis*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA. **99**: 10185-90

- Hlavinka J, Nauš J, Fellner M;** 2013. Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs light-induced stomatal opening. *Plant Science*. **209**: 75-80
- Hothorn M, Belkhadir Y, Dreux M, Dabi T, Noel JP;** 2011. Structural basis of steroid hormone perception by the receptor kinase BRI1. *Nature*. **474**: 467-471
- Chen BY;** 1997. PCR cloning of multiple glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase cDNAs from tomato fruit. Unpublished; Gene bank, accession U97257
- Chory J, Li J;** 1997. Gibberellins, brassinosteroids and light-regulated development. *Plant, Cell and Environment*. **20**: 801-806
- Chory J, Nagpal P, Peto CA;** 1991. Phenotypic and genetic-analysis of DET2, a new mutant that affects light-regulated seedling development in Arabidopsis. *Plant Cell*. **3**: 445-459
- Jaillais Y, Vert G;** 2012. Brassinosteroids, gibberellins and light-mediated signaling are the three-way controls of plant sprouting. *Nature Cell Biology*. **14**: 788-790
- Jeong D-H;** 2007. Regulation of brassinosteroid responses by Phytochrome B in rice. *Plant, Cell and Environment*. **30**: 590-599
- 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
- Kang J-G, Yun J, Kim DH, Chung KS, Fujioka S, Kim JI, Dae HW, Yoshida S, Takatsuo S, Song PS, Park CM;** 2001 Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell*. **105**: 625–628
- Kim B, Jeong YJ, Corvalan C, Fujioka S, Cho S, Park T, Choe S;** 2014. Darkness and gulliver2/phyB mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in Arabidopsis. *The Plant Journal*. **77**: 737-747
- Kim TW, Guan S, Burlingame AL, Wang ZY;** 2011. The CDG1 kinase mediates brassinosteroid signal transduction from BRI1 receptor kinase to BSU1 phosphatase and GSK3-like kinase BIN2. *Molecular Cell*. **43**: 561–71
- Kim TW, Guan S, Sun Y, Deng Z, Tang W;** 2009. Brassinosteroid signal transduction from cell-surface receptor kinases to nuclear transcription factors. *Nature Cell Biology*. **11**: 1254–60

- Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S;** 2005. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature*. **433**: 167–71
- Kraepiel Y, Miginiac E;** 1997. Photomorphogenesis and phytohormones. *Plant, Cell and Environment*. **20**: 807-812
- Lau OS, Deng XW;** 2012. The photomorphogenic repressors COP1 and DET1: 20 years later. *Trends in Plant Science*. **17**: 584-593
- Li J, Chory J;** 1997. A putative leucine-rich repeat receptor kinase involved in brassinosteroid signal transduction. *Cell*. **90**: 929–38
- Li J, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J;** 1996. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science*. **272**: 398–401
- Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC;** 2002. BAK1, an *Arabidopsis* LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* **110**: 213–22
- Luo XM, LinWH, Zhu S, Zhu JY, Sun Y;** 2010. Integration of light- and brassinosteroid-signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis*. *Dev. Cell*. **19**: 872–83
- Mandava NB;** 1988. Plant growth-promoting brassinosteroids. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. **39**: 23-52
- Mäntylä E, Lang V, Palva ET;** 1995. Role of abscisic acid in drought-induced freezing tolerance, cold acclimatization, and accumulation of LTI78 and RAB18 proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. **107**: 141–148
- Mitchell JW, Mandava N, Worley JF, Plimmer JR, Smith MW;** 1970. Brassins – a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature*. **225**: 1065-1066
- Montoya T, Nomura T, Farrar K, Kaneta T, Yokota T, Bishop GJ;** 2002. Cloning the Tomato Curl3 Gene Highlights the Putative Dual Role of the Leucine-Rich Repeat Receptor Kinase tBRI1/SR160 in Plant Steroid Hormone and Peptide Hormone Signaling. *The Plant Cell*. **14**: 3163-3176

- Murashige T, Skoog F**; 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. **15**: 473–497
- Nagano Y, Okada Y, Narita Y, Asaka Y, Sasaki Y**; 1995. Location of light-repressible, small GTP-binding protein of the YPT/rab family in the growing zone of etiolated pea stems. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*. **92**: 6314-6318
- Nam KH, Li J**; 2002. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell*. **110**: 203–12
- Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuo S, Yoshida S, Chory J**; 1999. BAS1: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proceedings of National Academy of Science of the USA*. **96**: 15316-15323
- Nomura R, Sato T, Bishop GJ, Kamiya Y, Takatsuto S, Yokota T**; 2001. Accumulation of 6-deoxocathasterone and 6-deoxocastasterone in *Arabidopsis*, pea and tomato is suggestive of common rate-limiting steps in brassinosteroid biosynthesis. *Phytochemistry*. **57**: 171-178
- Oh E, Zhu JY, Wang ZY**; 2012. Interaction between BZR1 and PIF4 integrates brassinosteroid and environmental responses. *Nature Cell Biology*. **14**: 802-809
- Pavlová L, Fischer L**; *Růst a vývoj rostlin*, Praha: Krolinum, 2011; ISBN: 978-80-246-1913-2
- Piazza P, Procissi A, Jenkins GI, Tonelli C**; 2002. Members of the c1/pl1 regulatory gene family mediate the response of maize aleurone and mesocotyl to different light qualities and cytokinins. *Plant Physiology*. **128**: 1077-1086
- 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
- Sakai T, Wada T, Ishiguro S, Okada K**; 2000. RPT2: a signal transducer of the phototropic response in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*. **12**: 225–236
- Sawhney VK**; 1997. Genetic male sterility. In: Shivanna KR, Sawhney VK, *Pollen biotechnology for crop production and improvement*. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 183–198

- She J, HanZ, KimTW, Wang J, Cheng W;** 2011. Structural insight into brassinosteroid perception by BRI1. *Nature*. **474**: 472–76
- Sheoran IS, Dumonceaux T, Datla R, Sawhney VK;** 2006. Anthocyanin accumulation in the hypocotyl of an ABA-overproducing male-sterile tomato (*Lycopersicon esculentum*) mutant. *Physiologia Plantarum*. **127**: 681-689
- Sheoran IS, Ross ARS, Olson DJH, Sawhney VK;** 2009. Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*). A proteomic analysis. *Journal of Proteomics*. **71**: 624-636
- Schumacher K, Chory J;** 2000. Brassinosteroid signal transduction: still casting the actors. *Current Opinion in Plant Biology*. **3**: 79-84
- Spollen WG, Lenoble ME, Samuels TD, Bernstein N, Sharp RE;** 2000. Abscisic acid accumulation maintains maize primary root elongation at low water potentials by restricting ethylene production. *Plant Physiology*. **122**: 967–976.
- Sun Y, Fan XY, Cao DM, Tang W, He K;** 2010. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. **19**: 765–77
- Swaczynová J, Novák O, Hauserová E, Fuksová K, Šiša M, Kohout L, Strnad M;** 2007. New techniques for the estimation of naturally occurring brassinosteroids. *Journal of Plant Growth Regulation*. **26**: 1-14.
- Symons GM, Reid JB;** 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea . *Planta*. **216**: 422-431
- Symons GM, Schultz L, Kerckhoffs LHJ;** 2002. Uncoupling brassinosteroid levels and de-etiolation in pea. *Physiologia Plantarum*. **115**: 311-319
- Symons GM, Smith JJ, Nomura T, Davies NW, Yokota T, Reid JB;** 2008. The hormonal regulation of de-etiolation. *Planta*. **227**: 1115–25
- Szekeres M, Nemeth K, KonczKalman Z;** 1996. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in arabidopsis. *Cell*. **85**: 171-182

- Taiz L, Zeiger E**; 2010. *Plant Physiology*, 5th ed., Sunderland, Mass.: Sinauer Associates
- Tamaki Y, Takeuchi K, Nomura T**; 2002. Effect of light quality on the level of endogenous brassinosteroids in rice, and the rice DWARF gene. *Plant and Cell Physiology*. **43**: S185
- Tang W, Kim TW, Osés-Prieto JA, Sun Y, Deng Z**; 2008. BSKs mediate signal transduction from the receptor kinase BRI1 in *Arabidopsis*. *Science*. **321**: 557–560
- Thompson MJ, Mandava NB, Meudt WJ, Lusby WR, Spaulding DW**; 1981. Synthesis and biological activity of brassinolide and its 22 β ,23 β -isomer: Novel plant growth-promoting steroids. *Steroids*. **38**: 567-580
- Trupkin SA, Mora-Garcia S, Casel JJ**; 2012. The cyclophilin ROC1 links phytochrome and cryptochrome to brassinosteroid sensitivity. *Plant Journal*. **71**: 712-723
- Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres Q, Ward JM, Murthy G, Zhang J, Walker JC, Neff MM**; 2005. *BAS1* and *SOB7* act redundantly to modulate *Arabidopsis* photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant Journal*. **42**: 23-34
- Vriet C, Russinova E, Reuzeau C**; 2013. From squalene to brassinolide: The steroid metabolic and signaling pathways across the plant kingdom. *Molecular Plant*. **6**: 1738-1757
- Wada K, Marumo S, Ikekawa N**; 1981. Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology*. **22**: 323-325
- Wang X, Chory J**; 2006. Brassinosteroids regulate dissociation of BKI1, a negative regulator of BRI1 signaling, from the plasma membrane. *Science*. **313**: 1118–22
- Wang X, Li X, Meisenhelder J, Hunter T, Yoshida S**; 2005. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell*. **8**: 855–65
- Wang ZY, Bai MY, Oh E, Zhu JY**; 2012. Brassinosteroid Signaling Network and Regulation of Photomorphogenesis. *Annual Review of Genetics*. **46**: 701-724.
- Wang ZY, Seto H, Fujioka S, Yoshida S, Chory J**; 2001. BRI1 is a critical component of a plasmamembrane receptor for plant steroids. *Nature*. **410**: 380–83

Whippo CW, Hangerter RP; 2005. A Brassinosteroid-Hypersensitive Mutant of BAK1 Indicates That a Convergence of Photomorphogenic and Hormonal Signaling Modulates Phototropism. *Plant Physiology*. **139**: 448-457

Winkel-Shirley B; 2001. Flavonoids biosynthesis: a colorful model for genetic, biochemistry, cell biology, and biotechnology. *Plant Physiology*. **126**: 485-493

Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J; 2005. A New Class of Transcription Factors Mediates Brassinosteroid-Regulated Gene Expression in *Arabidopsis*. *Cell*. **120**: 249-259

Yin YH, Wang ZY, Mora-Garcia S; 2002. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell*. **109**: 181-191