

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

DIPLOMOVÁ PRÁCE

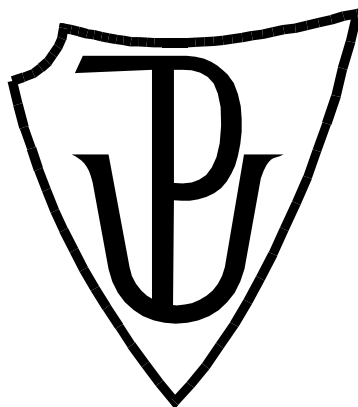
OLOMOUC 2021

Bc. Tereza Trávníčková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Interakce modrého světla a ABA během klíčení semen vystavených stresu
zasolením**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Trávníčková
Studijní program:	N1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora	Bc. Tereza Trávníčková
Název práce	Interakce modrého světla a ABA během klíčení semen vystavených stresu zasolením
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby	2021

Abstrakt

Předložená diplomová práce se zabývá studiem interakce modrého světla (BL) a kyseliny abscisové (ABA) během klíčení semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), která jsou vystavena stresu zasolením. V experimentální části byla za využití UHPLC-ESI(-)MS/MS stanovena hladina endogenní ABA v semenech a následně byla pomocí qPCR studována relativní exprese genu zapojeného v biosyntetické (gen *LeNCEDI*) a katabolické (gen *SICYP707A3*) dráze ABA. Jednotlivé experimenty byly provedeny na semenech kontrolního genotypu cv. Rutgers a od něj odvozeného mutantu *7B-1*. Semena byla kultivována ve tmě a na BL po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu o koncentracích NaCl 0, 50 a 75 mmol/l.

V rámci této diplomové práce bylo zjištěno, že během klíčení semen dochází se vzrůstajícím časem k poklesu hladiny endogenní ABA, a to jak ve tmě, tak i na BL, při všech zvolených koncentracích NaCl. U semen mutantu *7B-1* bylo také zjištěno, že v porovnání s cv. Rutgers obsahuje nižší množství endogenní ABA a BL u tohoto mutantu nezpůsobuje zásadní stimulaci akumulace ABA. Dále bylo vyzorováno, že pouze v některých případech se v důsledku působení NaCl výrazně zvyšuje koncentrace ABA. Bylo rovněž zjištěno, že katabolický gen *SICYP707A3* je zapojený do odbourávání endogenní ABA během klíčení semen, kdy zasolení vykazuje vliv na zvýšení exprese daného genu pouze u semen cv. Rutgers, a to zásadně při inkubaci ve tmě, nikoliv však na BL. Relativní exprese biosyntetického genu *LeNCEDI* nemohla být nakonec kvůli nezdařilé optimalizaci provedena.

Klíčová slova	gen <i>LeNCEDI</i> , gen <i>SICYP707A3</i> , kyselina abscisová (ABA), modré světlo, mutant <i>7B-1</i> , qPCR, solný stres, UHPLC-ESI(-)MS/MS
Počet stran	78
Počet příloh	1
Jazyk	Český (anglický)

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname	Bc. Tereza Trávníčková
Title of thesis	Cross-talk between blue light and ABA during seed germination under salt stress
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2021

Abstract

Presented Master's thesis deals with the study of the cross-talk between blue light (BL) and abscisic acid (ABA) during the germination of tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L.) exposed to salinity stress. In the experimental part, the level of endogenous ABA in seeds was determined using UHPLC-ESI(-)MS/MS and subsequently the relative expression of the gene involved in the biosynthetic (gene *LeNCED1*) and catabolic (gene *SICYP707A3*) ABA pathway was studied using qPCR. Individual experiments were performed on seeds of the control genotype cv. Rutgers and its derived mutant *7B-1*. The seeds were cultured in the dark and BL for 6, 12, 24, 48 and 72 hours on MS medium with NaCl used in concentrations 0, 50 and 75 mmol/l.

Within this Master's thesis, it was found that during seed germination, the level of endogenous ABA decreases with increasing time, both in the dark and BL, at all selected concentrations of NaCl. In the *7B-1* seeds, it was also observed that compared to cv. Rutgers the mutant accumulates lower amount of endogenous ABA and that BL in the mutant does not cause significant stimulation of ABA accumulation. Furthermore, it was observed that only in some cases the concentration of ABA increases significantly due to NaCl treatment. It was also found that the catabolic gene *SICYP707A3* is involved in the degradation of endogenous ABA during seed germination, when the salinity increased the expression of the gene in cv. Rutgers seeds only, distinctly in the dark, but not in BL. Relative expression of the biosynthetic gene *LeNCED1* could not ultimately be performed due to failed optimization.

Keywords	gene <i>LeNCED1</i> , gene <i>SICYP707A3</i> , abscisic acid (ABA), blue light, mutant <i>7B-1</i> , qPCR, salt stress, UHPLC-ESI(-)MS/MS
Number of pages	78
Number of appendices	1
Language	Czech (English)

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. za použití uvedené citované literatury.

V Olomouci dne.....

podpis.....

Poděkování

Mé největší poděkování patří prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, vstřícnost, cenné rady a čas, který mi v průběhu celé diplomové práce věnoval.

Velké poděkování patří také RNDr. Veronice Turečkové, Ph.D. za provedení vlastní kvantifikace fytohormonu ABA a za její veškeré rady a konzultace.

Dále bych chtěla poděkovat Bc. Janě Glogarové a Mgr. Marii Vitáskové za seznámení se s metodami a ochotu mi s čímkoliv v laboratoři pomoci.

Mé poděkování patří rovněž Mgr. Tereze Miksteinové a Ing. Veronice Krbečkové Ph.D. za veškorou pomoc s experimenty.

OBSAH

Seznam použitých zkratk.....	9
1 ÚVOD A CÍLE	13
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	15
2.1 Klíčení	15
2.2 Světlo	16
2.2.1 Modré světlo.....	17
2.2.1.1 Kryptochromy	17
2.2.1.2 Fototropiny	19
2.2.1.3 Členové rodiny Zeitelupe.....	20
2.3 Kyselina abscisová.....	21
2.3.1 Biosyntéza kyseliny abscisové	22
2.3.2 Katabolismus kyseliny abscisové.....	24
2.3.3 Signalizační dráha kyseliny abscisové	25
2.3.4 Interakce kyseliny abscisové a světla.....	27
2.4 Abiotický stres	31
2.4.1 Stres zasolením.....	31
2.4.1.1 Modré světlo a zasolení	32
2.4.1.2 Kyselina abscisová a zasolení.....	35
3 MATERIÁL A METODY	37
3.1 Rostlinný materiál.....	37
3.2 Příprava 5M zásobního roztoku chloridu sodného (NaCl)	37
3.3 Příprava kultivačního média Murashige and Skoog	37
3.4 Kultivace semen rajčete.....	38
3.5 Sklizeň, homogenizace a rozvažování kultivovaných semen	39
3.6 Analýza endogenní kyseliny abscisové	40
3.6.1 Extrakce a purifikace ABA	40
3.6.2 UHPLC-ESI(-)MS/MS analýza.....	40
3.7 Analýza exprese genů zapojených v metabolismu kyseliny abscisové.....	42
3.7.1 Extrakce a izolace RNA	42
3.7.2 Přechištění izolované RNA a PCR pro přechištěnou RNA.....	43
3.7.3 Syntéza cDNA a PCR pro cDNA.....	45
3.7.4 Příprava a optimalizace primerů.....	47
3.7.5 Expres studovaných genů pomocí kvantitativní PCR	49

4	VÝSLEDKY	52
4.1	Analýza endogenní kyseliny abscisové	52
4.1.1	Porovnání množství ABA v semenech kultivovaných na médiu s koncentracemi NaCl 0, 50 a 75 mmol/l.....	52
4.2	Analýza exprese genů zapojených v metabolismu kyseliny abscisové	54
4.2.1	Optimalizace primerů.....	54
4.2.2	Exprese genu <i>SICYP707A3</i> v semenech kultivovaných na médiu s koncentracemi NaCl 0 a 50 mmol/l	55
4.3	Porovnání množství ABA a exprese genu <i>SICYP707A3</i> v semenech vysévaných na MS médiu bez NaCl	58
4.4	Porovnání množství ABA a exprese genu <i>SICYP707A3</i> v semenech vysévaných na MS médium obsahujícím NaCl v koncentraci 50 mmol/l	60
5	DISKUZE	62
6	ZÁVĚR	66
7	SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY	68
	Přílohy	78

Seznam použitých zkratek

AAO	abscisic aldehyd oxidáza
ABA	kyselina abscisová
ABA-GE	ABA - glukosyl ester
ABC transportéry	ATP Binding Cassette transportéry
ABFs, 1	ABA-responsive element Binding factors, 1
ABI (1-5)	ABA-Insensitive (1-5)
ABRE	ABA-Responsive Element
AREB/ABF	ABRE-Binding protein/ABRE-Binding Factor
<i>AtABI5</i>	<i>Arabidopsis thaliana ABI5</i>
ATP	adenosintrifosfát
BBX21	B-Box 21
bHLH	basic Helix-Loop-Helix
BL	blue light (modré světlo)
bZIP	basic leucine ZIPper
CCT	CRY C-Terminus
cDNA	komplementární DNA
CE	Coupling Element
CIB1	Cryptochrome-Interacting Basic-helix-loop-helix protein 1
COP1	Constitutive Photomorphogenic 1
cry1 – cry3	krytochrom 1 – krytochrom 3
CRY-DASH	CRY- <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystic</i> , <i>Homo</i>
C _i hodnota	cycle of treshold
cv	kultivar
CYP707A (1-4)	Cytochrome P450 707A (1-4)
D	dark (tma)
DNA	DeoxyriboNucleic Acid (deoxyribonukleová kyselina)
dNTP	deoxyribonukleosid trifosfát
DPA	kyselina dihydrofaseová
DRE/CRT	Dehydration-Responsive Element/C-RepeaT
DREB2	Dehydration Responsive Element Binding protein 2
dT primer	deoxyThymine primer
E	účinnost
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
<i>epi</i> -DPA	<i>epi</i> -dihydrofaseová kyselina
ESI	ionizace elektrosprejem
F primer	Forward primer
FAD	flavinadenindinukleotid

FAR1	FAR-red impaired Response 1
FHY3	Far-red elongated HYpokotyl 3
FKF1	Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1
FMN	flavinmononukleotid
FR	Far Red
GA	gibereliny
GBFs	G-box Binding Factors
GPCR	G-Protein Coupled Receptor
GTG 1, 2	GPCR-Type G protein 1, 2
HAB1	Hypersensitive to ABA 1
HAc	kyselina octová
HKT 1, 2	High-Affinity K ⁺ Transporter 1, 2
HY5	elongated HYpokotyl 5
ChlH	Mg-Chelatase H subunit
I	Inhibice
IPP	isopentenyl pyrofosfát
JA	kyseliny jasmonová
<i>LeGAPDH</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> GlycerAldehyde-3-Phosphate DeHydrogenase
<i>LeMYC2</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> MYeloCytomatosis 2
<i>LeNCED1</i>	<i>Lycopersicum esculentum</i> 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenase 1
LIP1	Light Insensitive Period 1
LKP2	LOV Kelch Protein 2
LOV 1, 2	Light, Oxygen, Voltage 1, 2
MADS box	MCM1, Agamous, Deficiens, SRF (Serum Response Factor)
MCE	membrány ze směsi esterů celulózy
MEM	Membrane Desalting Buffer
MeOH	methanol
MES pufr	Morpholinoethane sulfonic acid pufr
MRM	Multiple Reaction Monitoring
MS médium	Murashige and Skoog médium
MTHF	methylnetetrahydrofolát
MYB2	transkripční faktory MYeloBlastosis 2
MYC2	transkripční faktory MYeloCytomatosis 2
NCED 6, 9	9-cis-epoxykarotenoid dioxygenáza 6, 9
neoPA	neofaseová kyselina
NHX1	Na ⁺ /H ⁺ Exchanger 1
NPR 1, 2	Nonexpressor of Pathogenesis-Related 1, 2
NSCCs	NonSelective Cation Channels

P450	Pigment 450
PA	kyselina faveová
PCR	Polymerase Chain Reaction (polymerázová řetězová reakce)
PDS	fytoen desaturáza
phot 1, 2	fototropin 1, 2
PHR	PHotolyase-Related doména
phy A, B	fytochrom A, B
PIFs 1, 4	Phytochrome Interacting Factors 1, 4
PIP	aquaporin Plasma membrane Intrinsic Proteins
<i>PP2Acs</i>	<i>Protein Phosphatase type 2A</i>
PP2C	protein fosfatáza 2C
PSY	fytoen syntáza
PYL (1-13)	PYR1-Like (1-13)
PYR 1	PYrabactin Resistant 1
qPCR	quantitative (kvantitativní) PCR
R	Red
R primer	Reverse primer
RE	Relativní exprese genu
RCAR (1-14)	Regulatory Component of ABA Receptor (1-14)
RDN	Reaction Buffer for DNase I
RLS	Guanidin hydrochloride Lysis Buffer
RNA	RiboNucleic Acid (ribonukleová kyselina)
RW 1, 2	Wash Buffer 1, 2
S	Stimulace exprese genu
<i>SbCRY1b</i>	<i>Sorghum bicolor CRY1b</i>
SDR	Short-chain Dehydrogenase/Reductase
<i>SICYP707A (1-4)</i>	<i>Solanum lycopersicum Cytochrome P450 707A (1-4)</i>
<i>SIGLO2</i>	<i>Solanum lycopersicum GLOBOSA 2</i>
<i>SINCED 1,2</i>	<i>Solanum lycopersicum 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1</i>
SnRK 2, 2.3	Sucrose nonfermenting 1 Related protein Kinase 2, 2.3
SOS (1-3)	Salt Overly Sensitive (1-3)
SPA1	Supresor komplex PhyA 1
SPE	solid phase extraction (extrakce na pevné fázi)
START	STeroidogenic Acute Regulatory protein-related lipid-Transfer
<i>TaCRY1a, CRY2</i>	<i>Triticum aestivum CRY1a, CRY2</i>
<i>TaGBF1</i>	<i>Triticum aestivum GBF1</i>
TBE pufr	Tris-Borát-EDTA pufr
<i>Tip41Like</i>	<i>Type 2A-Interacting Protein 41 Like</i>

UHPLC-MS/MS	Ultrahigh-pressure/performance liquid chromatography with tandem mass spectrometry (vysoko-tlaká/účinná kapalinová chromatografie s tandemovou hmotností spektrometrií)
UV-A	ultrafialového záření A
UV-B	ultrafialové záření B
UVR8	UV Resistance locus 8
<i>WABI5</i>	<i>Wheat ABI5</i>
WT	Wild Type
ZBF1/MYC2bHLH	Z-Box binding Factor1/MyeloCytomatosis2 Basic, Helix-Loop-Helix
ZEP	zeaxin epoxidáza
ZTL	ZeiTLupe

1 ÚVOD A CÍLE

Klíčení semen je adaptivním znakem vyšších rostlin, který je ovlivňován jak endogenními rostlinnými hormony, tak různými environmentálními faktory (Koornneef et al., 2002). Hlavní roli v regulaci klíčení semen zastávají fytohormony - kyselina abscisová (ABA) a gibbereliny (GA), jejichž účinek působí na řízení klíčení semen antagonisticky. Zatímco ABA potlačuje klíčení semen a navozuje dormanci, GA klíčení podporují (Kang et al., 2015). Kyselina abscisová je také považována za hlavní stresový hormon, jelikož její zvyšující se koncentrace za nepříznivých podmínek navozuje toleranci vůči stresu (Ng et al., 2014). Světlo, které je důležitým environmentálním faktorem, působí na klíčení semen především stimulačně. Některá semena, označována jako nefotoblastická, však dosahují nejlepší klíčivost ve tmě (Takaki, 2001). Do této skupiny se řadí například semena rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), která byla v rámci této diplomové práce zvolena za výzkumný rostlinný materiál. Na druhou stranu semena rajčete vykazují citlivost na modré (BL), červené a daleko červené světlo, kdy pouze BL působí na jejich klíčení inhibičně. Bylo také prokázáno, že BL zvyšuje u semen rajčete citlivost na abiotický a biotický stres (Fellner and Sawhney, 2002; Piterková et al., 2012).

Kyselina abscisová (ABA) a světlo zastávají klíčovou roli v řadě vývojových a fyziologických procesů u rostlin, během kterých dochází k vzájemné interakci mezi signální dráhou ABA a světlem (Yadukrishnan and Datta, 2020). Obecným cílem této diplomové práce bylo sledovat interakci BL a ABA během fáze klíčení semen rajčete, která byla vystavena stresu zasolením. Konkrétně jsem zjišťovala, jakými mechanismy BL inhibuje klíčení semen rajčete a zesiluje citlivost semen k abiotickému stresu. Zda je v těchto mechanismech zapojena ABA a jak se mění hladina endogenní ABA během klíčení semen vystavených solnému stresu. Veškeré experimenty byly prováděny na semenech rajčete *Solanum lycopersicum* L., konkrétně na mutantu *7B-1* a k němu odpovídajícímu kultivaru cv. Rutgers. Mutant *7B-1*, který obsahuje spontánní recesivní mutaci v jednom genu *7B-1* (Sawhney, 1997), je charakteristický tím, že produkuje nadbytek ABA a je defektní v signalizaci BL. Specificky na BL vyazuje mutant *7B-1* rezistenci vůči abiotickým a biotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002; Bergougnoux et al., 2009).

Pro dosažení výše zmíněných cílů byla v rámci experimentální části této diplomové práce provedena analýza endogenní ABA v semenech pomocí UHPLC-ESI(-)MS/MS a následná relativní kvantifikace genů (*LeNCED1* a *SlCYP707A3*) zapojených v metabolismu ABA za využití qPCR. Kultivace semen mutantu *7B-1* a cv. Rutgers probíhala *in vitro* ve tmě a na BL po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu s vybranými koncentracemi chloridu sodného (NaCl; 0, 50 a 75 mmol/l).

Tato diplomová práce byla vypracována v rámci pracovní skupiny molekulární fyziologie prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a pracovní skupiny RNDr. Veroniky Turečkové, Ph.D., v Laboratoři růstových regulátorů, která je společným pracovištěm Přírodovědecké fakulty

Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Klíčení

Klíčení semen je důležitým vývojovým procesem v životním cyklu rostlin, který je přísně kontrolován (Kang et al., 2015). Semenné rostliny se vyvinuly tak, aby udržovaly zralá semena v klidovém (dormantním) stavu do doby, která je vhodná pro vyklíčení. Dormance a klíčení semen jsou regulovány různými endogenními hormony a podněty z prostředí (Shu et al., 2016a). Kromě základních požadavků na vodu, kyslík a vhodnou teplotu, je semeno citlivé i na jiné faktory, jako je světlo nebo dusičnany (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

Klíčení semen začíná absorpcí vody suchým semenem, což zahrnuje trojfázový proces. Nejdříve dochází k rychlému počátečnímu příjmu vody - tzv. imbibice (fáze I) následovanou fází plátů (fáze II). Rychlé nasátí vody do buněk suchých semen během fáze imbibice má za následek dočasné strukturální poškození membrán, což vede k okamžitému a rychlému úniku rozpuštěných látek a metabolitů. Během krátké doby rehydratace se membrány opět vrátí do své stabilnější konfigurace a únik látek se omezí (Bewley, 1997; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Po imbibici se v suchém semenu rychle obnoví metabolická aktivita. Dochází k obnovení respirační aktivity, glykolytické a pentózofosfátové dráhy, aktivaci enzymů Krebsova cyklu a k zahájení syntézy proteinů (Bewley, 1997). Po prudkém počátečním zvýšení spotřeby kyslíku se rychlost respirační aktivity opět sníží do doby, dokud kořínek embrya (radikula) nepronikne okolními strukturami semene (Botha et al., 1992; Bewley and Black, 1994). V časných stádiích klíčení probíhá také regulace mitochondriálních a jaderných genomů. Tkáně zralého suchého semene obsahují špatně diferenciované mitochondrie, které však mají dostatečné množství enzymů Krebsova cyklu zajišťující adekvátní produkci ATP na podporu metabolismu několik hodin po imbibici (Ehrenshaft and Brambl, 1990; Attucci et al., 1991).

Další zvýšení absorpce vody nastává v momentě, kdy se buňky radikuly začnou prodlužovat a prorazí okolní krycí vrstvy embrya – testu a endosperm. Jedná se o fázi III, též nazývanou jako viditelné klíčení, která je považována za dokončení klíčení. Prodloužení radikuly je proces řízený turgorem, který vyžaduje poddajnost stěn v buňkách embryonálního kořene nacházející se mezi kořenovou čepičkou a hypokotylem. Po ukončení klíčení jsou rezervy v zásobních pletivech mobilizovány, což podporuje následný růst rostliny. Pokud není životaschopné a neporušené semeno schopno dokončit klíčení za příznivých podmínek, nastává stav označovaný jako dormance (Bewley, 1997; Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

Dormance semen je zásadní pro přežití rostlin. Tento blok klíčení se u různých druhů vyvíjel odlišně díky adaptaci na převládající prostředí. Dormance zajišťuje, aby semena klíčila pouze v optimálních podmínkách pro založení nové generace rostlin (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Po dokončení embryogeneze dochází ke zrání embrya. Během zrání vstupuje embryo do vegetativního klidu, stává se tolerantní vůči vysychání a nedochází k dělení ani

prodlužování buněk. Dormantní semena tedy do fáze III nemohou vstoupit (Shu et al., 2016a). Hlavními faktory, které mohou zrušit dormanci a vyvolat klíčení, je světlo, nízká teplota a dlouhé skladování semen v suchu (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006; Finkelstein et al., 2008).

Klíčení semen je regulováno fytohormony. Mezi hlavní fytohormony regulující klíčení semen patří kyselina abscisová (ABA) a gibereliny (GA). Tyto hormony působí při řízení klíčení u dormantních i nedormantních semen antagonisticky. Zatímco ABA navozuje dormanci a potlačuje klíčení semen, GA klíčení podporují. V nedormantních semenech určují endogenní produkci ABA a GA environmentální faktory, jako je kvalita světla, teplota nebo vodní potenciál (Kang et al., 2015). V dormantních semenech je klíčení obvykle blokováno hromaděním vysokých hladin ABA při imbibici (Ali-Rachedi et al., 2004). Před zahájením klíčení semen je hladina endogenní ABA nízká, zatímco koncentrace GA je vysoká. Během zrání semen však dochází k akumulaci endogenní ABA, což indukuje a udržuje dormanci a zároveň brání před viviparií (Robertson, 1955; Shu et al., 2016a). Semena mutantů s deficitem ABA klíčí rychleji než jejich odpovídající kultivar (Frey et al., 2011), zatímco mutanti v katabolické dráze ABA akumulují vysoké hladiny ABA a způsobují tak hyperdormanci v semenech (Matakiadis et al., 2009). Vysoké hladiny GA nebo jejich signalizace stimuluje klíčení semen různými mechanismy, od sekrece hydrolytických enzymů až po oslabení struktury semen (Holdsworth et al., 2008). Gibereliny podporují klíčení také proteazomem zprostředkovanou degradací proteinů DELLA, čímž dojde k negativní regulaci hladin ABA a snížení produkce represorů klíčení, jako jsou například transkripční faktory ABI3 (ABA-Insensitive 3) a ABI5 (ABA-Insensitive 5) (Piskurewicz et al., 2008; Piskurewicz et al., 2009; Kang et al., 2015).

Kromě ABA a GA se na modulaci vegetačního klidu a klíčení pravděpodobně podílejí také téměř všechny ostatní fytohormony, včetně auxinu, ethylenu, brassinosteroidů, kyseliny jasmonové, kyseliny salicylové a cytokininů (Shu et al., 2016a). Například bylo zjištěno, že ethylen narušuje dormanci semen a podporuje klíčení potlačením účinku ABA (Arc et al., 2013; Corbineau et al., 2014). Genetická data také ukazují, že auxin, který se podílí téměř na všech aspektech vývoje rostlin, hraje roli v klíčení a přísně reguluje dormanci vedle působení ABA (Liu et al., 2013).

2.2 Světlo

Rostliny jsou přisedlé, fotoautotrofní organismy, jejichž životní cyklus je silně ovlivňován neustále se měnícím světelným prostředím (Kami et al., 2010). Světlo je důležitým zdrojem energie v přírodě. Pro mnoho organismů, včetně rostlin a řas, je světlo důležitým stimulem prostředí, který řídí jejich vývoj, morfogenezi a fyziologii. Rostliny vnímají světlo pomocí specializovaných fotoreceptorů, které detekují a reagují na změnu intenzity, kvality, směru a trvání světla. Tyto proteiny reagující na světlo obvykle obsahují protetický kofaktor nebo chromofor, který jim umožňuje vnímat a reagovat na specifické vlnové délky světla. Ve vyšších rostlinách bylo prozatím identifikováno pět fotosenzorických systémů (Christie et al., 2015).

Mezi fotoreceptory reagující převážně na červené (600–700 nm) a daleko červené (700–750 nm) oblasti slunečního spektra patří fytochromy (Chen and Chory, 2011). Fytochromy mají ze všech fotoreceptorů největší význam při stimulaci klíčení za příznivých světelných podmínek, kdy primárně působí na syntézu a signalizaci giberelinů (Oh et al., 2007; Piskurewicz et al., 2009). Naproti tomu v neoptimálních světelných podmínkách klíčení zabraňují (Kami et al., 2010). Dále byl objeven fotoreceptor UV Resistance locus 8 (UVR8) zaznamenávající vlnové délky ultrafialového záření B (UV-B, 280–320 nm) (Heijde and Ulm, 2012) a tři třídy fotoreceptorů (krytochromy, fototropiny a členy rodiny Zeitelupe) specifické pro oblast ultrafialového záření A (UV-A, 320–390 nm) a modrého světla (390–500 nm) (Christie et al., 2015).

Světlo je jedním z nejdůležitějších environmentálních faktorů regulující klíčení semen. Semena se dají podle citlivosti na bílé světlo klasifikovat do tří skupin: kladně a záporně fotoblastická semena a semena necitlivá na světlo. Klíčení u kladně fotoblastických semen je bílým světlem stimulováno, zatímco semena záporně fotoblastická klíčí nejlépe ve tmě a bílé světlo u nich klíčení inhibuje. Semena necitlivá na světlo jsou schopna klíčit jak ve tmě, tak pod bílým světlem (Vazquez-Yanes and Orozco-Segovia, 1993; Takaki, 2001).

2.2.1 Modré světlo

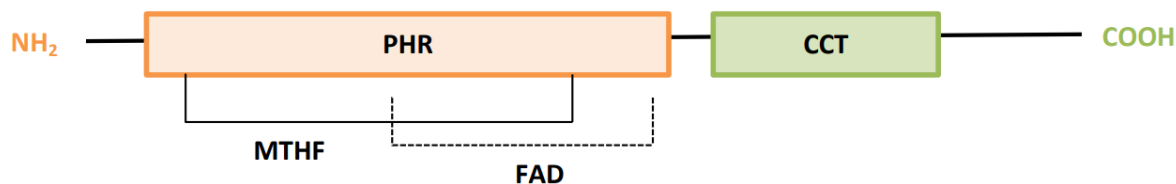
Řada fyziologických odpovědí v rostlinách vzniká jako reakce na modré světlo (390–500 nm) a ultrafialové záření typu A (320–390 nm) (Kong and Nagatani, 2008). Modré světlo se účastní regulace řady rostlinných procesů, jako je fototropismus, fotomorfogeneze, otevírání průduchů a inhibice prodlužování hypokotylu (Hogewoning et al., 2010). Je známo, že modré světlo absorbované krytochromy působí inhibičně na klíčení semen některých jednoděložných rostlin, například u ječmene nebo pšenice (Stawska and Oracz, 2019). Inhibice klíčení vyvolaná modrým světlem byla prokázána také u semen rajčat, u kterých navíc modré světlo zvyšuje citlivost na abiotický a biotický stres (Fellner and Sawhney 2002; Piterková et al., 2012). Úloha a mechanismus působení modrého světla v biologii semen u dvouděložných rostlin, včetně *Arabidopsis thaliana*, jsou však stále velmi špatně pochopeny (Stawska and Oracz, 2019). Rostliny absorbují oblast modrého světla a UV-A záření prostřednictvím krytochromů (Chaves et al., 2011), fototropinů (Christie, 2007) a členy rodiny Zeitelupe (ZTL, FKF1 a LKP2) (Suetsugu and Wada, 2013).

2.2.1.1 Krytochromy

Krytochromy jsou první rostlinné fotoreceptory modrého světla, které byly charakterizovány na molekulární úrovni (Ahmad and Cashmore, 1993). Vykazují významnou homologii s fotolyázami, což jsou enzymy aktivované modrým světlem, které opravují pyrimidinové dimery DNA způsobené expozicí UV-B zářením (Chaves et al., 2011; Christie et al., 2015).

U *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány tři kryptochromy (cry1 – cry3). Fotoreceptory cry1 a cry2 jsou lokalizovány převážně v jádře (Cashmore et al., 1999; Kleiner et al., 1999). Nevykazují schopnost oprav DNA, ale podílejí se na řízení růstu a vývoje rostlin. Fotoreceptor cry1 má hlavní roli v regulaci de-etiolizace sazenic a zprostředkovává inhibici prodlužovacího růstu indukovanou modrým světlem, zatímco cry2 se podílí na regulaci kvetení v závislosti na délce dne (Li et al., 2011). Fotoreceptor cry2 funguje především při slabém osvětlení, protože na modrém světle podléhá ubikvitinaci a degradaci (Zuo et al., 2012). Fotoreceptor cry3 spadá do skupiny enzymů CRY-DASH s fotolyázovou aktivitou. Nachází se v mitochondriích a chloroplastech (Kleine et al., 2003) a je zodpovědný za opravu lézí indukovaných UV-zářením v jednořetězcové DNA i ve smyčkových strukturách dvouřetězcové DNA (Selby and Sancar 2006; Pokorný et al., 2008).

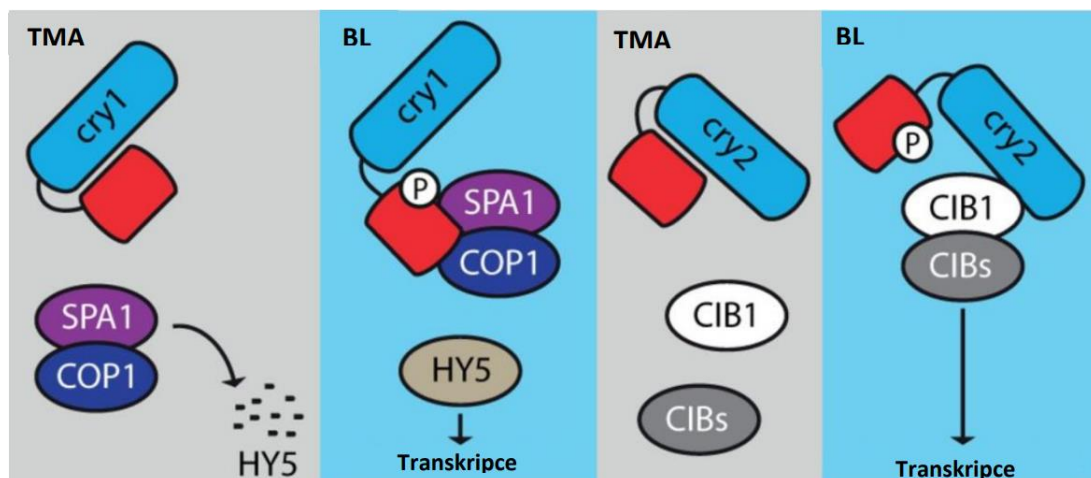
Kryptochromy obsahují fotosenzitivní N-terminální doménu PHR (PHotolyase-Related doména) a C-terminální doménu CCT (CRY C-Terminus), která je důležitá pro signalizaci kryptochromu. C-terminální doména se nachází pouze u cry1 a cry2, u cry3 chybí. Doména PHR na sebe váže dva chromofory: flavinadenin dinukleotid (FAD) a derivát pterinu methyltetrahydrofolát (MTHF). FAD funguje jako primární světelný senzor, zatímco úlohou MTHF je absorbovat a přenášet světelnou energii na chromofor FAD. Po ozáření domény PHR modrým světlem dochází k fotoredukci FAD a tvorbě částečně redukováného neutrálního FADH radikálu, čímž se změní konformace v CCT doméně a aktivuje se signální dráha fotoreceptoru (Chaves et al., 2011; Christie et al., 2015). Struktura kryptochromu je znázorněna na obrázku 1.



Obrázek 1: Struktura kryptochromu (schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word).

V rámci signalizační dráhy kryptochromů byly objasněny dva mechanismy, které regulují transkripci (Obrázek 2). První mechanismus fotoaktivace a nepřímé regulace transkripce byl popsán u cry1. Ve tmě dochází prostřednictvím komplexu COP1 (Constitutive Photomorphogenic 1) / SPA1 (Supresor komplex PhyA 1) k degradaci transkripčních faktorů potřebných pro de-etiolizaci, jako je například faktor HY5 (elongated HYpocotyl 5). Po ozáření modrým světlem se změní konformace cry1, která umožní navázání SPA1 na CCT doménu. Dojde k inaktivaci COP1/SPA1 komplexu, což vede k akumulaci HY5, podpoře genové exprese a inhibici růstu hypokotylů (Christie et al., 2015). Druhý mechanismus regulace transkripce byl prokázán u cry2, které přímo interagují a modulují aktivitu transkripčních faktorů zodpovědných za kontrolu kvetení. Po aktivaci modrým světlem se cry2 prostřednictvím PHR domény naváže na transkripční

faktor CIB1 (Cryptochrome-Interacting Basic-helix-loop-helix protein 1), který podporuje expresi genů iniciující kvetení (Liu et al., 2008).



Obrázek 2: Mechanismy fotoaktivace a regulace transkripce u cry1 a cry2 (převzato a upraveno z Christie et al., 2015).

2.2.1.2 Fototropiny

Fototropiny jsou jednou z hlavních tříd fotoreceptorů modrého světla, které byly pojmenovány podle jejich schopnosti zprostředkovávat fototropismus u rostlin (Christie et al., 1999). Mezi jejich další funkce patří například regulace pohybů chloroplastů, rozložení listů a otevírání průduchů. U *Arabidopsis thaliana* byly objeveny dva fototropiny mající překrývající se i odlišné funkce. Tyto receptory jsou lokalizovány převážně na plazmatické membráně a označují se jako fototropin 1 (phot1) a fototropin 2 (phot2). Fotoreceptor phot1 je schopen působit při regulaci kořenového a hypokotylového fototropismu v širokém rozsahu intenzit modrého světla, zatímco phot2 funguje pouze při vysoké intenzitě záření (Kong and Nagatani, 2008; Fankhauser and Christie, 2015). Při silném ozáření modrým světlem hraje phot2 roli ve vyhýbavé reakci chloroplastů a jádra (Kagawa et al. 2001, Higa et al. 2014). Mezi reakce specifické pouze pro phot1 patří například rychlá inhibice růstu hypokotylu (Folta and Spalding, 2001).

Fototropiny se skládají z N-terminální fotosenzorické části, obsahující dvě LOV (Light, Oxygen, Voltage) domény (LOV1 a LOV2) a regulační serin/threonin kinázovou doménou na C-konci (Kong and Nagatani, 2008). Domény LOV1 a LOV2 jsou vazebnými místy pro chromofor FMN (flavinmononukleotid), který absorbuje modré světlo. Ačkoliv mohou obě LOV domény fungovat jako světelné senzory, aktivita fototropinové kinázy je regulována primárně LOV2 doménou. Ve tmě vytváří N-terminální oblast fototropinu, konkrétně LOV2 doména, neaktivní konformaci s C-terminální oblastí a potlačuje aktivitu kinázové domény. Po ozáření modrým světlem dojde k proteinovým konformačním změnám LOV2 domény, což vede k autofosforylaci receptoru a zahájení fototropinové signalizace (Pfeifer et al., 2010; Fankhauser and Christie, 2015). Struktura fototropinu je znázorněna na obrázku 3.

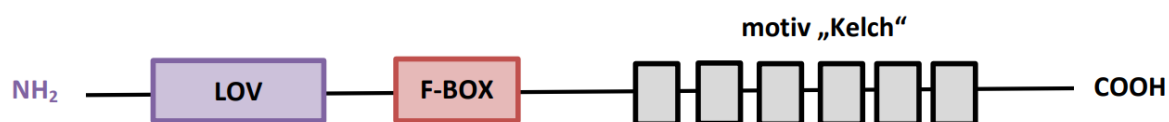


Obrázek 3: Struktura fototropinu (schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word).

Mezi jednu z nejlépe charakterizovaných signálních drah fototropinu patří otevírání průduchů. Po ozáření phot1 a phot2 modrým světlem dochází k aktivaci H^+ -ATPázy, která transportuje vodíkové protony a indukuje hyperpolarizaci plazmatické membrány svěřacích buněk průduchu. Hyperpolarizace způsobí absorpci K^+ iontů skrze napěťově řízené K^+ kanály a takto akumulovaný K^+ usnadňuje přítok vody do svěřacích buněk. Ve svěřacích buňkách se zvýší turgorový tlak, což vyvolá otevření průduchu. Tato signální dráha fototropinů je však inhibována kyselinou abscisovou (ABA), díky čemuž se rostliny brání nadměrným ztrátám vody v průběhu dne a usnadňují absorpci CO_2 pro fotosyntézu. Kyselina abscisová indukuje uzavírání průduchů prostřednictvím ABA receptorů PYR/PYL/RCAR s následnou produkcí peroxidu vodíku a oxidu dusnatého a aktivací aniontových kanálů. Dochází k depolarizaci membrány, odtoku K^+ iontů a vody ze svěřacích buněk, což vyvolá uzavření průduchu (Inoue et al., 2010). Kyselina abscisová vyvolává uzavření průduchů také inhibicí signalizace modrého světla mezi fototropiny a H^+ -ATPázou (Takemiya and Shimazaki, 2010).

2.2.1.3 Členové rodiny Zeitlupe

Skupina fotoreceptorů rodiny Zeitlupe se skládá ze tří členů: ZTL (ZeiTLupe), FKF1 (Flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1) a LKP2 (LOV Kelch Protein 2). Fotoreceptory ZTL/FKF1/LKP2 obsahují N-koncovou doménu LOV, F-box a C-konec s šesti repetitivními proteinovými motivy „Kelch“. Jedná se o fotoreceptory *Arabidopsis thaliana*, které mají LOV doménu podobnou vazebnému místu pro chromofor FMN jako je u fototropinů. Struktura receptoru Zeitlupe je znázorněna na obrázku 4. Funkce ZTL/FKF1/LKP2 receptorů se částečně překrývají. FKF1 převážně zprostředkovává fotoperiodickou kontrolu kvetení a ZTL/LKP2 primárně regulují cirkadiánní hodiny a nepřímo regulují dobu kvetení (Suetsugu and Wada, 2013).



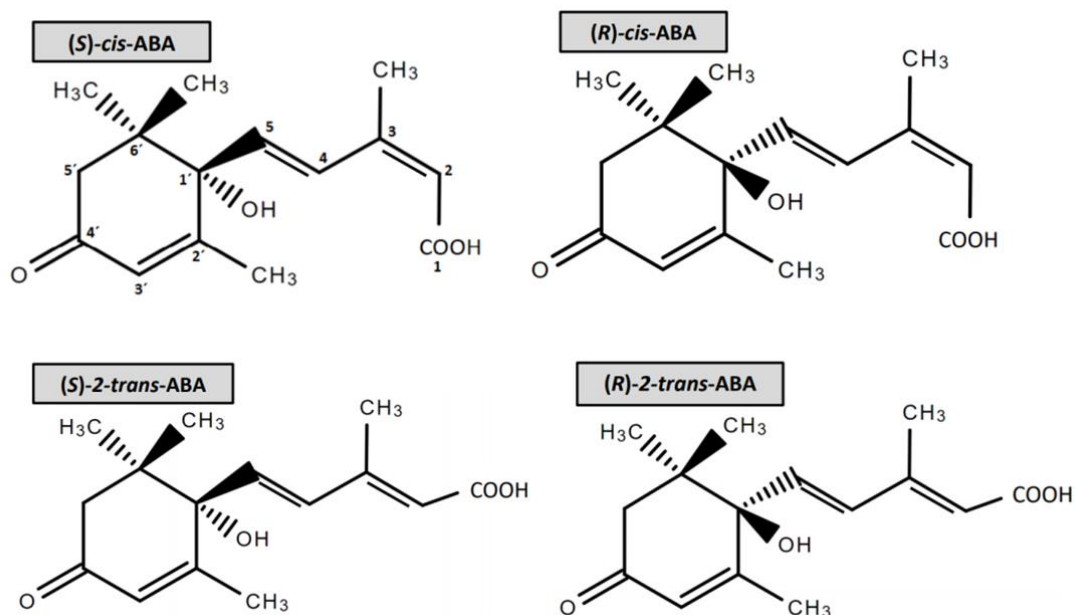
Obrázek 4: Struktura receptoru Zeitlupe (schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word).

2.3 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je důležitý hormon regulující růst, vývoj a stresové reakce rostlin. Hraje zásadní roli v mnoha rostlinných fyziologických procesech, jako je uzavírání průduchů, akumulace kutikulárního vosku, senescence listů, navození vegetačního klidu, klíčení semen a inhibice růstu (Chen et al., 2020). Kyselina abscisová zprostředkovává reakce rostlin na abiotické a biotické změny prostřednictvím transkripčních i posttranskripčních mechanismů. Při působení stresových faktorů, například při nedostatku vody, vysoké slanosti a extrémních teplotách, dochází ke zvýšení hladiny ABA v rostlinách, což stimuluje účinky tolerance vůči stresu, které pomáhají rostlinám se přizpůsobit a přežít tyto nepříznivé podmínky (Ng et al., 2014).

Kyselina abscisová byla objevena několika vědeckými skupinami nezávisle na sobě. V 60. letech byla z pupenů platanu izolována látka navozující dormanci, která byla pojmenována jako dormin (Eagles and Wareing, 1963). Ve stejném období byla z bavlny izolována sloučenina zodpovědná nejen za opad plodů bavlníku, ale také za opad listů. Tato látka byla nazvána jako abscisin II (Ohkuma et al., 1963). Chemické analýzy později prokázaly, že dormin a abscisin II představují stejnou sloučeninu, která byla nakonec přejmenována na kyselinu abscisovou. Její název odvozený od slova abscisin znamená v překladu opad (Cornforth et al., 1965; Addicott et al., 1968). Role ABA při podpoře opadu listů byla považována za nepřímý důsledek zvýšené hladiny ethylenu (Cracker and Abeles, 1969). Nedávné studie však prokázaly, že senescence a opad listů podporovaný ABA je na ethylen nezávislý (Zhao et al., 2017). Hormon ABA byl také následně dokumentován jako endogenní sloučenina u některých hub a různých zvířat (Chen et al., 2020).

Kyselina abscisová je seskviterpenoid obsahující 15 atomů uhlíku s chirálním centrem na atomu C-1'. Jeho molekulární struktura je tvořena z cyklohexanového kruhu s monomethylovou, dimethylovou, ketonovou a hydroxylovou skupinou a uhlovodíkovým postranním řetězcem konjugovaným se skupinou karboxylové kyseliny (Obrázek 5). Postranní řetězec ABA obsahuje na pozici 2 a 4 dvojně vazby, které se mohou vyskytovat v konfiguraci *cis* nebo *trans*. Po ozáření světlem dochází k reverzibilní izomerizaci ABA z biologicky aktivní formy *2-cis-4-trans* na neaktivní formu *2-trans-4-trans*. V přírodě se ABA vyskytuje pouze jako biologicky aktivní izomer (+)-*2-cis-4-trans*-ABA, také označovaný jako (S)-*cis*-enantiomer. Převrácením cyklohexanového kruhu kolem chirálního uhlíku vznikne nepřírozený (R)-*cis*-enantiomer, který vykazuje slabou biologickou aktivitu. Pokud je však ABA syntetizována chemicky, je tvořena racemickou směsí, neboli směsí S i R enantiomeru v poměru 1:1 (Lin et al., 2005; Cutler et al., 2010; Ng et al., 2014).



Obrázek 5: Struktura enantiomerů ABA (vytvoreno pomocí aplikace ChemSpider).

2.3.1 Biosyntéza kyseliny abscisové

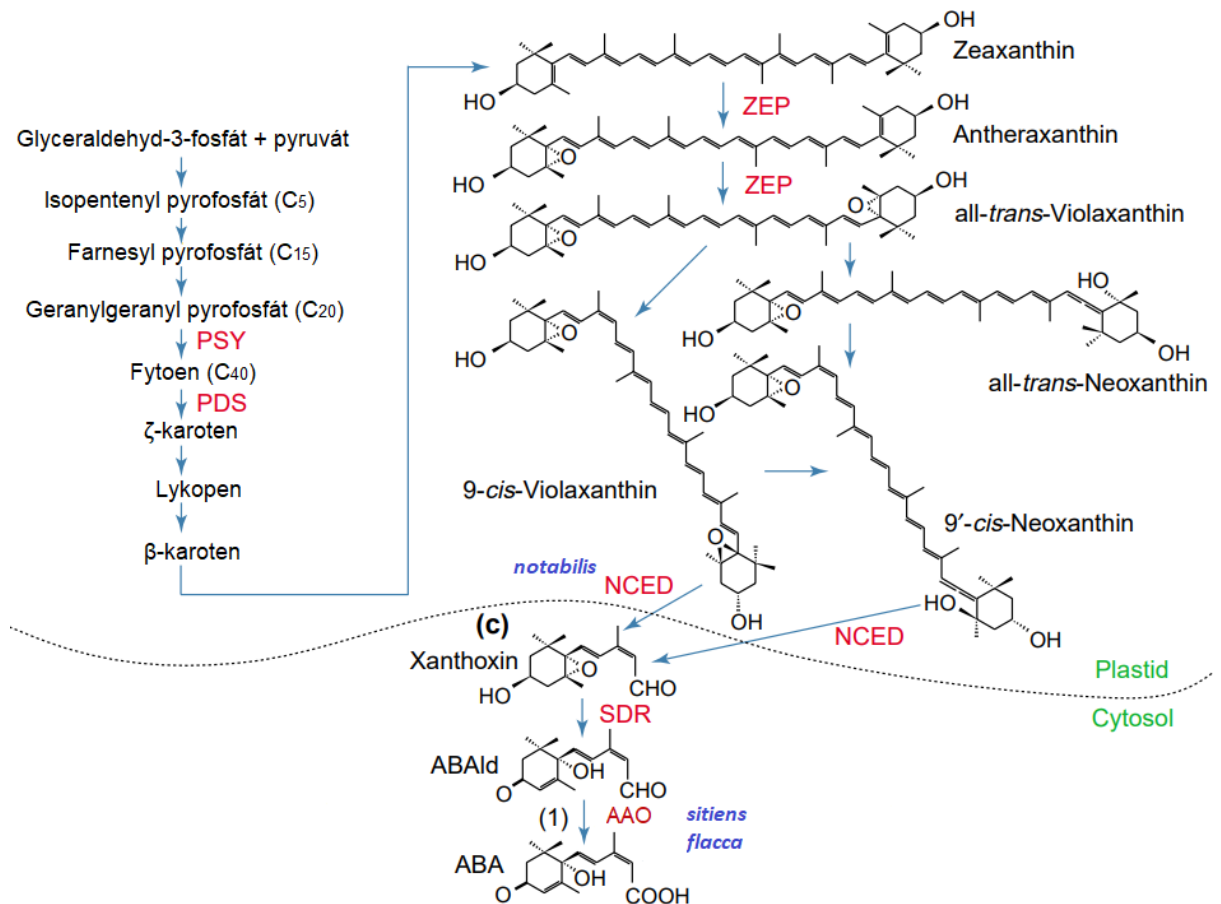
Endogenní koncentrace ABA je určena rovnováhou mezi její biosyntézou, katabolismem a rychlostí transportu do místa působení. Jednotlivé kroky syntézy ABA jsou řízeny enzymy, jejichž exprese je indukována působením stresových faktorů. Některé patogenní houby jsou schopny ABA syntetizovat přímo z farnesyl pyrofosfátu, zatímco rostliny si syntetizují ABA prostřednictvím nepřímé karotenoidové dráhy z C_{40} prekurzoru, známého jako β -karoten. Reakce této dráhy jsou lokalizovány jak v plastidech, tak i v cytosolu rostlinné buňky (Ng et al., 2014; Chen et al., 2020).

Karotenoidy jsou v raných fázích syntézy ABA tvořeny ze základního C_5 prekurzoru – isopentenyl pyrofosfátu (IPP), který je v plastidech syntetizován z glycerinaldehyd-3-fosfátu a pyruvátu. Isopentenyl pyrofosfát je dále přes farnesyl pyrofosfát (C_{15}) převeden na geranylgeranyl pyrofosfát (C_{20}). Kondenzací dvou geranylgeranyl pyrofosfátů prostřednictvím enzymu fytoen syntázy (PSY) dochází k tvorbě fytoenu (C_{40}), který je přeměněn fytoen desaturázou (PDS) na acyklický ζ -karoten a lykopen. Lykopen je následně cyklizován za vzniku β -karotenu, který je hydroxylován na zeaxanthin (Seo and Koshiba, 2002). Některé prekurzory β -karotenu, včetně isopentenyl pyrofosfátu (C_5), farnesyl pyrofosfátu (C_{15}) a geranylgeranyl pyrofosfátu (C_{20}), patří také mezi prekurzory fytohormonů cytokininů, brassinosteroidů a gibberelinů (Chen et al., 2020).

Prvním krokem ABA-specifické syntetické dráhy je konverze zeaxanthinu prostřednictvím dvou epoxidových reakcí, které jsou katalyzované enzymem zeaxanthin epoxidázou (ZEP). Enzym ZEP konvertuje zeaxanthin přes meziprodukt antheraxanthin na all-*trans*-violaxanthin, který je přeměněn na 9-*cis* izomery epoxykarotenoidu, konkrétně na 9'-*cis*-neoxanthin nebo

9-*cis*-violaxanthin. 9-*cis* izomery epoxykarotenoidu jsou následně oxidačně štěpeny na C₁₅ prekurzor ABA – xanthoxin. Syntéza xanthoxinu je katalyzována enzymem 9-*cis*-epoxykarotenoid dioxygenázou (NCED), která je považována za klíčový regulační krok v biosyntéze ABA. Enzym NCED je v rajčatech kódován genem *LeNCED1*, jehož defekt je možné sledovat u mutanta *notabilis* (Seo and Koshiba, 2002; Ng et al., 2014; Humplík et al., 2015).

Zatímco veškeré předchozí kroky biosyntézy ABA probíhají v plastidech, xanthoxin je transportován do cytosolu, kde je dehydrogenázou/reduktázou s krátkým řetězcem (SDR; Short-chain Dehydrogenase/Reductase) přeměněn na abscisový aldehyd. Abscisový aldehyd je ve finálním kroku oxidován pomocí abscisový aldehyd oxidázy (AAO) na kyselinu abscisovou. ABA-specifická aldehyd oxidáza vyžaduje pro svou katalytickou aktivitu molybdenový kofaktor aktivovaný sulfurázou, a proto mutace v genech zajišťující syntézu tohoto kofaktoru způsobí nedostatečnou produkci ABA. Mutace molybdenové sulfurázy se vyskytuje například u mutanta rajčete *flacca*. Dalším příkladem poškození biosyntetické dráhy v posledním oxidačním kroku ABA aldehydu je přímý defekt v enzymu AAO u ABA-deficientního mutanta rajčete *sitiens* (Seo and Koshiba, 2002; Nambara and Marion-Poll, 2005; Humplík et al., 2015). Biosyntéza ABA je naznačena na obrázku 6.



Obrázek 6: Biosyntéza kyseliny abscisové (převzato a upraveno z Seo and Koshiba, 2002).

2.3.2 Katabolismus kyseliny abscisové

Kyselina abscisová se metabolizuje na neaktivní produkty v případě zeslabení stresových signálů. Katabolismus ABA probíhá převážně hydroxylací jedné ze tří methylových skupin (C-7', C-8' a C-9') na cyklohexanovém kruhu nebo prostřednictvím konjugace ABA a jejich metabolitů (Ng et al., 2014).

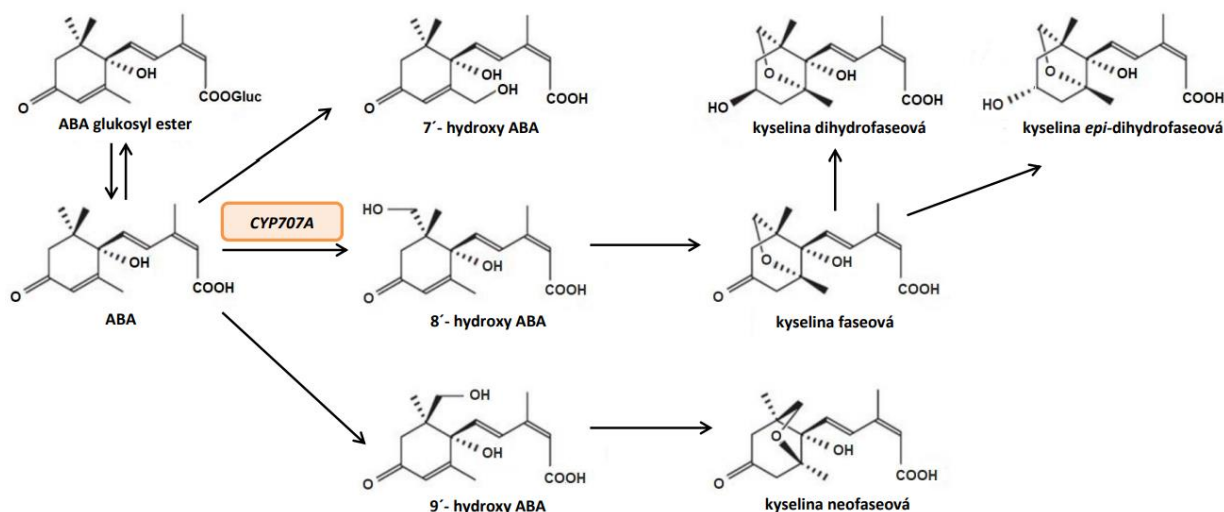
Za hlavní katabolickou dráhu ABA je ve vyšších rostlinách považována hydroxylace methylové skupiny na pozici C-8' (Cutler and Krochko, 1999). Kyselina abscisová je nejdříve na uhlíku C-8' hydroxylována enzymem 8'-hydroxylázou za vzniku 8'-hydroxy ABA. V následujícím kroku je 8'-hydroxy ABA spontánně cyklizována na kyselinu faseovou (PA), která je dále redukována na biologicky neaktivní kyselinu dihydrofaseovou (DPA). Při metabolismu PA vzniká kromě hlavního produktu DPA také minoritní *epi*-dihydrofaseová kyselina (*epi*-DPA). K výraznému snížení biologické aktivity dochází již při izomerizaci 8'-hydroxy ABA na PA (Gillard and Walton, 1976; Krochko et al., 1998; Cutler and Krochko, 1999; Zaharia et al., 2005). Katabolická dráha ABA je znázorněna na obrázku 7.

Enzym 8'-hydroxyláza je membránově vázaná monooxygenáza klasifikována jako cytochrom P450, který je kódovaný rodinou genů *CYP707A*. V genomu *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány čtyři členové rodiny *CYP707A* (*CYP707A1* - *CYP707A4*), jejichž hladiny transkriptů se během dehydratace a po ošetření kyseliny abscisové zvyšují (Kushiro et al., 2004; Saito et al., 2004). Studie prokázaly, že exprese *CYP707A3* je nejvíce indukována v reakci na dehydrataci i následnou rehydrataci (Umezawa et al., 2006), *CYP707A1* degraduje zásoby ABA uvnitř svěřacích buněk v reakci na vysokou vlhkost (Okamoto et al., 2009). Expresní analýzy také odhalily, že *CYP707A2* je zodpovědný za rychlý pokles hladiny ABA během imbibice semen (Kushiro et al., 2004). U rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) je enzym 8'-hydroxyláza kódován rodinou genů *SICYP707A1* - *SICYP707A4* (Nitsch et al., 2009).

Katabolismus ABA, který probíhá prostřednictvím hydroxylace methylové skupiny na pozici C-7' nebo C-9', je považován za minoritní oxidační dráhu. Při hydroxylaci ABA na uhlíku C-7' dochází ke vzniku 7'-hydroxy ABA, která se vyskytuje v řadě rostlinných druhů jako vedlejší katabolit (Nambara and Marion-Poll, 2005). V případě hydroxylace ABA na uhlíku C-9' dochází nejdříve ke vzniku nestabilního meziprojektu 9'-hydroxy ABA, který je dále cyklizován na stabilnější produkt, nazývaný jako neofaseová kyselina (neoPA) (Kepka et al., 2011). Meziprojekt 9'-hydroxy ABA a jeho izomer neoPA byly identifikovány jako hojné katabolity ABA v nezralém semenu *Brassica napus* (Zhou et al., 2004). Mimo jiné byla neoPA detekována také v *Arabidopsis thaliana*, cizrně a v plodech pomeranče a rajčete (Nambara and Marion-Poll, 2005).

Kromě hydroxylace může být ABA a její hydroxylované katabolity inaktivovány prostřednictvím konjugace s glukózou, která konjuguje s karboxylovou (na C-1') nebo hydroxylovou skupinou ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005). Jedním z hlavních biologicky

neaktivních konjugátů ABA je ABA glukosyl ester (ABA-GE), který může sloužit jako zásobní forma volné ABA (Dietz et al., 2000). Konjugát ABA-GE je syntetizován v cytosolu a pomocí protonového gradientu a ABC (ATP Binding Cassette) transportérů je přenesen do vakuoly, kde se uskládá. Při působení abiotického stresu je ABA-GE hydroxylován β -glukosidázami, čímž dochází k uvolnění aktivní ABA (Ng et al., 2014).



Obrázek 7: Katabolismus kyseliny abscisové (převzato a upraveno z Nambara and Marion-Poll, 2005).

2.3.3 Signalizační dráha kyseliny abscisové

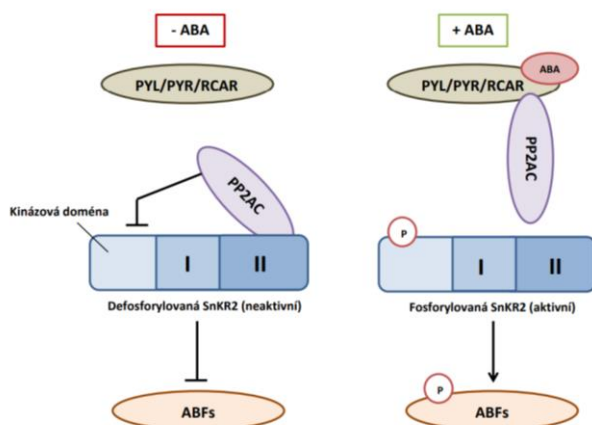
Kyselina abscisová reguluje u rostlin řadu vývojových procesů a adaptivních stresových reakcí, jejichž signální dráha je iniciována interakcí hormonu se specifickými ABA receptory lokalizovanými uvnitř buňky nebo na plazmatické membráně. Mezi identifikované třídy receptorů schopné vázat ABA patří receptory spřažené s G-proteinem (GPCR; G-Protein Coupled Receptor), konkrétně GTG1 a GTG2 (GPCR-Type G protein) proteiny umístěné na plazmatické membráně, dále Mg^{2+} Chelatáza (ChH, Mg-Chelatase H subunit) nacházející se v plastidech a rozpustné nukleocytoplazmatické PYR/PYL/RCAR receptory (PYrabactin Resistance 1/PYR1-Like/Regulatory Component of ABA Receptor) (Finkelstein, 2013).

Nejlépe charakterizovanými receptory ABA jsou rozpustné PYR/PYL/RCAR receptory, které se řadí do superrodiny vazebných proteinů START (STERoidogenic Acute Regulatory protein-related lipid-Transfer) (Finkelstein, 2013). Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje celkem 14 členů genové rodiny PYR/PYL/RCAR. Screening mutantů rezistentních na pyrabaktin, chemicky syntetizovanou látku s fyziologickými účinky podobným účinkům ABA, vedl nejdříve k identifikaci genu *PYR1* (*PYrabactin Resistant 1*). Porovnáním sekvencí bylo později stanoveno dalších 13 příbuzných genů s různou afinitou k ABA, označované jako *PYL 1 – PYL 13* (*PYR-Like*). Všechny tyto členy, výjimkou *PYL 13*, který si na rozdíl od ostatních členů nezachovává lysinový zbytek důležitý pro vazbu ABA, jsou schopny transdukovat signál ABA a aktivovat genovou expresi (Park et al., 2009; Miyakawa et al., 2013). Geny *PYR1*, *PYL1*, *PYL2*

a *PYL4* jsou exprimované ve svěřacích buňkách a podílejí se na regulaci zavírání průduchů. Gen *PYL5* se nejvíce exprimuje při zrání semen, zatímco geny *PYL8* a *PYL9*, exprimované v kořenech, inhibují růst primárních kořenů a stimulují růst laterálních kořenů (Xing et al., 2016; Sun et al., 2017). Nezávisle na tomto objevu byla identifikována rodina zastoupena 14 homologními proteiny, označenými jako RCAR1 – RCAR14, u kterých se později prokázalo, že jsou identické s již objevenými PYR/PYL členy (Ma et al., 2009).

Důležitou součástí buněčné signální transdukce je reverzibilní proteinová fosforylace zprostředkovaná proteinovými kinázami a fosfatázami. U rostlin se vyskytuje ABA-aktivovaná protein kináza SnRK2 (SNF1- Related protein Kinase 2), která je pozitivním mediátorem signální dráhy ABA. Protein kináza SnRK2 obsahuje konzervovanou kinázovou katalytickou doménu a C-koncovou regulační oblast, která se skládá ze dvou domén. Doména I je potřebná pro aktivitu kinázy, zatímco doména II je důležitá pro interakci s protein fosfatázou 2C (PP2C), která je hlavním negativním regulátorem ABA signalizace (Yoshida et al., 2002; Ng et al., 2014). V genomu *Arabidopsis thaliana* jsou PP2C fosfatázy geneticky shlukovány do 10 skupin (A – J). Do signalizační dráhy ABA je zapojeno celkem 6 členů ze skupiny PP2AC - A, z nichž jsou nejlépe charakterizovány ABI1 (ABA-Insensitive 1), ABI2 (ABA-Insensitive 2) a HAB1 (Hypersensitive to ABA 1) (Schweighofer et al., 2004).

Receptory PYR/PYL/RCAR obsahují hydrofobní kapsu, do které se může přes lysinový zbytek vázat hormon ABA. V přítomnosti ABA dochází ke změně konformace PYR/PYL/RCAR receptorů, což umožní jejich interakci s fosfatázou PP2AC. Navázaná PP2AC fosfatáza se inhibuje, což způsobí akumulaci fosforylované aktivní SnRK2 kinázy, která následně fosforyluje transkripční faktory zodpovědné za reakci na ABA (ABFs; ABA-responsive element Binding factors). V nepřítomnosti ABA nejsou schopny receptory PYR/PYL/RCAR vázat fosfatázu PP2AC. Fosfatáza interaguje s doménou II na C-konci protein kinázy SnRK2, čímž dochází k její defosforylaci a následné inaktivaci (Cutler et al., 2010; Taiz and Zeiger, 2015). Tato signalizační dráha je znázorněna na obrázku 8.



Obrázek 8: Signalizační dráha ABA zprostředkovaná receptory PYR/PYL/RCAR (schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word, inspirováno z Taiz and Zeiger, 2015).

2.3.4 Interakce kyseliny abscisové a světla

Světelná a ABA signální dráha spolu vzájemně interagují a podílejí se na regulaci klíčení, vývoje a adaptaci rostlin. Světlo je také důležitým faktorem, který ovlivňuje expresi genů zapojených do biosyntetické a katabolické dráhy ABA. Pro objasnění molekulárních mechanismů, kterými světlo ovlivňuje metabolismus ABA, byla ze semen *Lactuca sativa* a *Arabidopsis thaliana* izolována cDNA kódující geny biosyntetické dráhy (geny *NCED*) a katabolické dráhy ABA (geny *ABA 8'-hydroxylázy*). Bylo zjištěno, že hladina ABA je ovlivněna působením červeného světla především prostřednictvím fytochromu B. Vlivem červeného světla dochází ke snížení exprese genů *NCED*, zatímco exprese genů *ABA 8'-hydroxy oxidáz* je zvýšená. Dále bylo pozorováno, že po ošetření červeným světlem je pokles obsahu ABA úměrný zvýšené hladině kyseliny fasetové, která je neaktivním ABA metabolitem (Seo et al., 2006; Sawada et al., 2008).

Analýza genů zapojených do metabolismu ABA byla prováděna také u rajčete *Solanum lycopersicum* L. U kultivaru cv. Rutgers byla od vysetí až po časný vývoj sazenic sledována hladina endogenní ABA. Hladiny endogenní ABA dosahovaly nejvyšších hodnot v prvním analyzovaném bodě (6 hodin po vysetí) a poté rychle klesly až do okamžiku klíčení (72 hodin po vysetí). Za účelem stanovení důvodu rozdílných koncentrací ABA byl analyzován gen *LeNCED1*, zapojený do biosyntézy ABA a geny *ABA 8'-hydroxy oxidázy* (*SICYP707A1* - *SICYP707A4*), které regulují katabolismus ABA u rajčat. Exprese genu *LeNCED1* nebyla detekovaná před klíčením semen, ale postupně se zvyšovala během vývoje sazenic. Akumulace transkriptů *LeNCED1* byla u sazenic kultivovaných na modrém světle (BL) podstatně nižší než u etiolovaných sazenic, což korelovalo s jejich diferenciální akumulací endogenní ABA. Při studiu čtyř zmíněných katabolických genů vykazoval výrazný rozdíl exprese mezi hypokotyly sazenic pěstovaných na BL nebo ve tmě pouze gen *SICYP707A3*, což naznačuje, že tento gen hraje roli při nástupu fotomorfogeneze. Kontinuální expozice BL vedla ke snížení akumulace ABA v sazenicích díky snížení syntézy ABA a silnou, ale přechodnou stimulací ABA katabolismu. Výsledky této práce naznačují, že redukce nebo snížení endogenní ABA vyvolané BL je důležité v de-etiolizaci a nástupu fotomorfogeneze (Humplík et al., 2015).

Světlo o různé vlnové délce vykazuje schopnost regulovat hladinu endogenní ABA. Při studiu několika genů z *Lemna gibba* bylo zjištěno, že receptory červeného světla (fytochromy) negativně regulují expresi genů *NPR1* a *NPR2* (*Nonexpressor of Pathogenesis-Related 1, 2*), zatímco hormon ABA má na tyto geny pozitivní účinek. Kromě schopnosti červeného světla redukovat hladinu ABA u etiolované *Lemna gibba* bylo pozorováno, že umístění *Arabidopsis thaliana* a *Lemna gibba* na 24 hodin do tmy po předchozím růstu na světle vyvolá zvýšenou transkripci genů *NPR* a výraznou akumulaci ABA (Weatherwax et al., 1996). Další zjištění, že světlo hraje důležitou roli při regulaci ABA, bylo prokázáno na fytochrom-deficitním mutantu *Nicotiana plumbaginifolia* – *pew-1*, který měl v semenech a listech ve srovnání s jeho odpovídajícím kultivarem vyšší obsah endogenní ABA (Kraepiel et al., 1994). V etiolovaných

sazenicích hrachu byla také pozorována snížená hladina ABA po 4 hodinách expozice bílým světlem (Symons and Reid, 2003).

U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že fotoreceptory modrého světla - kryptochromy 2 (*cry2*) negativně regulují ABA-závislé klíčení semen. Toto zjištění bylo sledováno u mutantu *cry2*, který vykazuje defekt v genu *CRY2*. Mutant *cry2* klíčil v přítomnosti různých koncentrací ABA na světle i ve tmě a v porovnání s odpovídajícím kultivarem vykazoval sníženou expresi genů reagující na ABA a GA, které kódují inhibitory klíčení (Kim et al., 2014). Interakce mezi kryptochromy a ABA byla také zjištěna u transgenní linie *Arabidopsis thaliana*, která vykazuje nadměrnou expresi genu sladkého čiroku *SbCRY1b* (*Sorghum bicolor CRY1b*). Fotoreceptor *SbCRY1b* je hlavním regulátorem fotoperiodického kvetení a jeho funkce se více shoduje s úlohou fotoreceptorů *cry2* u *Arabidopsis thaliana*. Nadměrná exprese genu *SbCRY1b* u transgenní linie *Arabidopsis thaliana* způsobila zvýšenou citlivost na ABA během klíčení a vývoje kořenů, a kromě toho zde byla v porovnání s odpovídajícím kultivarem pozorována zvýšená exprese genů reagující na ABA, jako je například gen *ABF1* (*ABA-responsive element Binding Factor 1*), *SnRK2.3* (*Sucrose nonfermenting 1 Related protein Kinase 2.3*), *ABI4* a *ABI5* (*ABA-Insensitive 4, 5*). Tato data ukazují, že *SbCRY1b* se účastní signalizace ABA prostřednictvím změny exprese genů reagující na ABA (Zhou et al., 2018a).

Kvalita světla hraje zásadní roli v životním cyklu rostlin. U semen různých druhů určuje kvalita světla poměr hladiny GA a ABA, čímž podporuje nebo inhibuje klíčení semen (Seo et al., 2006). Fytochromy *phyA* a *phyB* regulují klíčení u *Arabidopsis thaliana* prostřednictvím transkripčního faktoru PIF1 (Phytochrome Interacting Factor 1) (Shen et al., 2005; Oh et al., 2006). Pokud jsou *phyA* a *phyB* neaktivní, PIF1 se akumuluje a reguluje expresi genů zajišťující nízký poměr GA/ABA, což inhibuje klíčení (Oh et al., 2004; Oh et al., 2007; Kim et al., 2016). Na druhou stranu, aktivace *phyA* a *phyB* a následná degradace PIF1 zvýší poměr GA/ABA, což klíčení semen podporuje. Fytochrom *phyB* je reverzibilně aktivován a deaktivován působením R (Red, 600-700 nm) a FR (Far Red, 700-750 nm) světla, zatímco *phyA* je R a FR světlem aktivován irreverzibilně. Je známo, že ABA působí prostřednictvím signálních faktorů *ABI3*, *ABI4* a *ABI5* (*ABA-Insensitive 3, 4, 5*). Exprese genu faktoru *ABI3* je při klíčení semen indukována za působení světelných podmínek deaktivujících *phyB*, zatímco faktor *ABI5* zastává sekundární roli s relativně mírným účinkem za světelných podmínek vedoucích k aktivaci *phyA* a deaktivaci *phyB* (Lee et al., 2012). U faktoru *ABI4* je však zajímavé, že dříve publikovaná transkriptomová analýza prokázala inhibici exprese genu *ABI4* působením FR světla, o němž je známo, že zvyšuje hladinu ABA (Oh et al., 2009; Vaistij et al., 2018). Následující analýzy zjistily, že *phyA*, který působí jako induktor klíčení, podporuje expresi genu *ABI4* pravděpodobně prostřednictvím faktoru PIF1. Výsledky také ukazují, že faktor *ABI4* se kromě akumulace ABA ve vývojových fázích po vyklíčení (Shu et al., 2016b) podílí také na inhibici hromadění ABA během klíčení semen závislém na *phyA* prostřednictvím snížené exprese biosyntetických genů ABA (*NCED6* a *NCED9*).

Evoluční procesy vedoucí k přepínání funkcí ABI4 z represoru na promotor klíčení semen závislé na environmentálních podmínkách nebyl zatím objasněn (Barros-Galvão et al., 2020).

Za stresových podmínek inhibuje ABA postgerminační vývoj a pomáhá sazenicím přidělovat dostupné omezené zdroje pro jejich přežití a růst (Brandizzi, 2020). Fytohormonem ABA zprostředkovaná postgerminační inhibice je ve tmě významně zvýšena ve srovnání se světelnými podmínkami (Yadukrishnan et al., 2020a). To je zajišťováno pomocí transkripčních faktorů PIFs (Phytochrome Interacting Factors) a COP1 (COnstitutively Photomorphogenic 1), které podporují signalizační dráhu ABA prostřednictvím modulace hladiny faktoru ABI5 (Yadukrishnan and Datta, 2020). Phytochrome Interacting Factors (PIFs) je skupina základních helix-loop-helix transkripčních faktorů, které interagují s fotoreceptory červeného (fytochromy) i modrého (krytochromy) světla. Bylo prokázáno, že faktory PIFs propojují různé fotosenzorické a hormonální dráhy zajišťující řízení růstu a vývoje rostlin. Faktory PIFs se akumulují ve tmě a potlačují fotomorfogenezi sazenic. Ve studii Qi et al., 2020 bylo ukázáno, že PIFs pozitivně regulují signalizační dráhu ABA během klíčení semen ve tmě. Faktory PIFs pozitivně regulují hladiny ABI5 transkriptů a proteinů ve tmě v reakci na exogenní ABA, a to prostřednictvím přímé vazby na G-box v promotoru genu *ABI5*. Faktory PIFs mohou také fyzicky interagovat s ABA receptory *PYL8* a *PYL9*, jejichž interakce není regulována ABA. Další analýzy ukázaly, že *PYL8* a *PYL9* podporují akumulaci proteinu *PIF4* ve tmě a zvyšují vazbu *PIF4* na promotor *ABI5*, zatímco negativně regulují *PIF4*-zprostředkovanou aktivaci *ABI5* (Qi et al., 2020). COnstitutively Photomorphogenic 1 (*COP1*) faktor podporuje ABA-zprostředkovanou inhibici postgerminálního vývoje sazenic usnadněním vazby *ABI5* na jeho cílové promotory. Tento mechanismus není však stále objasněn (Yadukrishnan et al., 2020a; Yadukrishnan and Datta; 2020).

Světelná a ABA signalizační dráha nepůsobí vůči sobě pouze antagonisticky. Bylo zjištěno, že pozitivní regulátory světelné signalizace, jako je *HY5* (elongated HYpocotyl 5), *FAR1* (FAR-red impaired Response 1) a *FHY3* (Far-red elongated HYpokotyl 3), podporují signalizaci ABA přímou aktivací *ABI5* (Chen et al., 2008; Tang et al., 2013). Protein *HY5* je klíčovým regulátorem fotomorfogeneze rostlin. Ve tmě je *HY5* ubikvitinován *COP1* a následně degradován prostřednictvím proteasomového systému, zatímco na světle je *HY5* vyžadován pro správnou expresi genů zapojených nejen do fotomorfogeneze, ale také do vývoje kořenů a různých signálních drah hormonů (Xu et al., 2016). Protein *HY5* se s vysokou aktivitou váže přímo na promotor genu transkripčního faktoru *ABI5* a aktivuje jeho expresi. Faktor *ABI5* je základní transkripční faktor leucinového zipu, který je zapojený do hlavní signalizační dráhy ABA. Hraje klíčovou roli v regulaci klíčení semen a raného růstu sazenic v přítomnosti ABA a abiotických stresů (Skubacz et al., 2016). Chromatinová imunoprecipitace ukázala, že vazba *HY5* na promotor *ABI5* je významně zvýšena pomocí ABA (Chen et al., 2008). Exprese *HY5* je na světle aktivována pozitivním světelným regulátorem *BBX21* (B-Box 21) podporujícím fotomorfogenezi, zatímco v ABA signalizaci *BBX21* interaguje s *HY5* a brání jeho vazbě na faktor

ABI5 (Xu et al., 2016; Bursch et al., 2020; Yadukrishnan et al., 2020b; Yadukrishnan and Datta, 2020).

Kyselina abscisová zastává důležitou roli jak při kontrole růstu rostlin ve stínu, tak i v adaptaci na podmínky vysokého světla (Galvez-Valdivieso et al., 2009). V nedávné studii bylo po zrušení vedlejších účinků zvýšené teploty zjištěno, že transkripce mnoha genů v ABA biosyntetické a signální dráze je modulována specificky v reakci na vysoké světlo (Huang et al., 2019). Expozice vysokého světla způsobuje u sazenic výrazné stabilní zvýšení hladin ABA, což naznačuje důležitou roli akumulace ABA v adaptaci na stres vyvolaný vysokým světlem. Kromě toho je akumulace ABA za těchto podmínek důležitá také pro uzavření průduchů (Devireddy et al., 2018; Yadukrishnan and Datta, 2020).

Je známo, že semena rajčat *Solanum lycopersicum* L. klíčí nejlépe ve tmě, zatímco na BL je klíčivost semen výrazně inhibována. Modré světlo snižuje klíčivost semen rajčete pravděpodobně pomocí fotoreceptoru CRY1a nebo fototropinem, protože mutanti defektní v těchto fotoreceptorech vykazují toleranci k inhibici klíčení indukovanou BL. Nedávno prováděná analýza ABA v semenech mutanta *7B-1* a k němu odpovídajícímu kultivaru cv. Rutgers, ukázala, že u semen *7B-1* dochází v porovnání se cv. Rutgers k rychlejšímu poklesu endogenní ABA během prvních 24 hodin inkubace pod BL. Expresní analýzy receptorů ABA také odhalily, že 6 hodin po vysetí na BL se významně zvyšuje úroveň transkriptu *PYL5* v semenech *7B-1*, ale ne u cv. Rutgers. Na druhou stranu byla exprese *PYL3* u semen *7B-1* výrazně nižší v porovnání se cv. Rutgers (Šimurová et al., 2018).

U rajčete *Solanum lycopersicum* L. byla provedena funkční analýza transkripčního faktoru *LeMYC2* (*Lycopersicum esculentum* MYeloCytomatosis2), jehož aminokyselinová sekvence vykazovala rozsáhlou homologii s transkripčním faktorem *ZBF1/MYC2bHLH* (Z-Box binding Factor1/MyeloCytomatosis2 Basic, Helix-Loop-Helix) u *Arabidopsis thaliana*. Faktor *ZBF1/MYC2bHLH* se řadí mezi *MYC2* faktory (*MYeloCytomatosis2*) s konzervovanou doménou *bHLH* (basic Helix-Loop-Helix), který je represorem fotomorfogeneze a reguluje interakci signální dráhy světla, kyseliny abscisové (ABA) a kyseliny jasmonové (JA). Exprese *LeMYC2* je indukována ABA a úroveň indukce se úměrně zvyšuje s vyšší koncentrací ABA. Bylo prokázáno, že *LeMYC2* funguje jako negativní regulátor fotomorfogeneze zprostředkované BL, podporuje odezvu ABA a JA a pozitivně reguluje ABA vyvolanou inhibici klíčení semen (Gupta et al., 2014).

2.4 Abiotický stres

Rostliny žijí v neustále se měnících prostředích, která jsou často nepříznivá nebo stresující pro jejich růst a vývoj. Abiotický stres vzniká vlivem nadbytku či deficitu fyzikálních nebo chemických vlivů. Mezi faktory abiotického stresu řadíme sucho, teplo, chlad, nedostatek živin nebo přebytek vody, solí a toxických kovů, jako je například hliník nebo kadmium v půdě. Stres spouští širokou škálu rostlinných reakcí, od změn genové exprese a buněčného metabolismu, až po změny rychlosti růstu a výnosu plodin. Změny v expresi genů zahrnují indukci signální dráhy, ve kterých jsou zapojeny hormony (kyselina abscisová, kyselina jasmonová a ethylen) a sekundární přenašeče (Ca^{2+}). Schopnost rostlin tolerovat stres závisí na genotypu rostlin, intenzitě a délce působení stresu a jeho rychlosti příchodu. Zvýšení tolerance rostlin vůči stresu je rozhodující jak pro produktivitu v zemědělství, tak pro ekologii životního prostředí (Buchanan et al., 2015; Zhu, 2016).

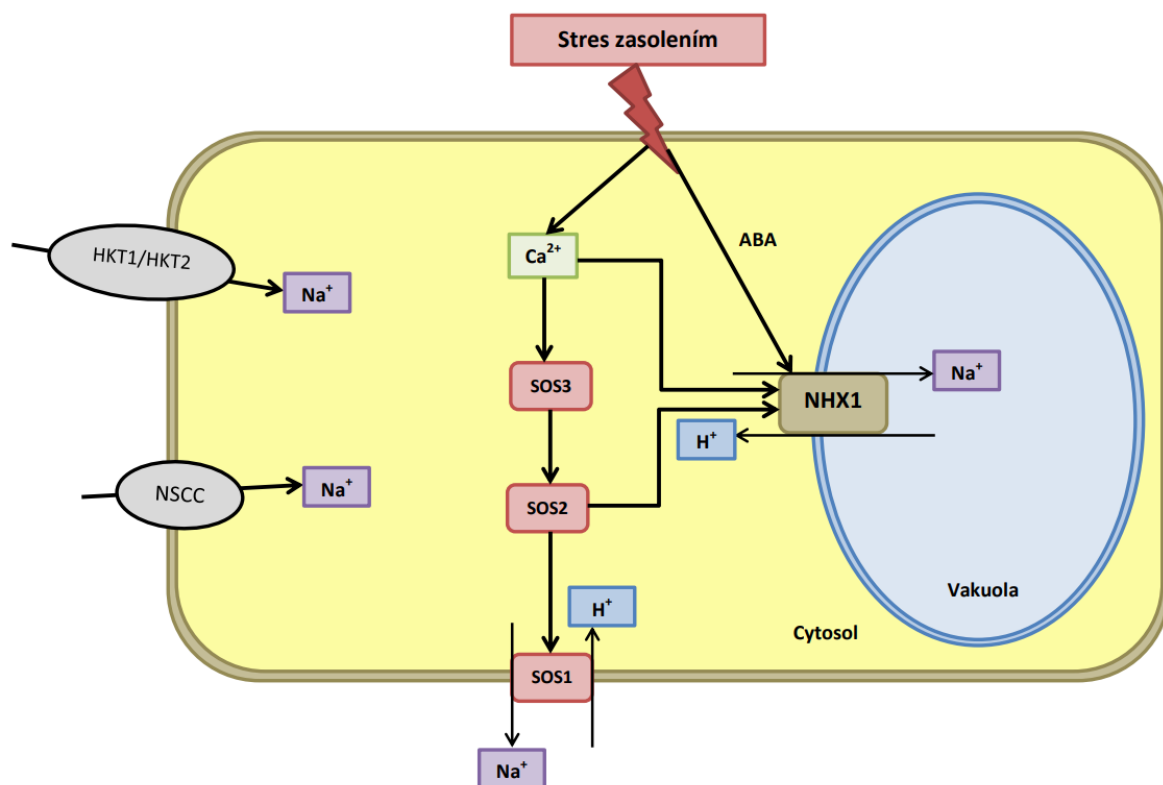
2.4.1 Stres zasolením

Zasolení půdy představuje vážný problém v zemědělství, protože drasticky snižuje výnos plodin. Vysoká koncentrace solí v apoplastu buněk generuje primární a sekundární efekty, které negativně ovlivňují přežití, růst a vývoj rostlin. Mezi primární účinky solí se řadí osmotický stres, kdy dochází ke snížení schopnosti absorbovat vodu kořenem a iontová toxicita, kdy se v buňkách kořene hromadí ionty. Hlavními sekundárními účinky solného stresu je narušení příjmu K^+ iontů, metabolická dysfunkce, poškození buněčných složek (membránových lipidů, proteinů a nukleových kyselin), porušení fotosyntézy a tvorba reaktivních forem kyslíku. Iontová nerovnováha je zvláště škodlivá v průběhu klíčení a růstu sazenic a méně během vegetativního růstu (Jenks and Hasegawa, 2005; Zhu, 2016; Munns and Tester, 2008; Park et al., 2016).

Rostliny mají schopnost tolerovat různé hladiny solí. Většina rostlin se řadí mezi glykofyty, které jsou k zasolení citlivé. Glykofyty vyžadují přítomnost sladké vody a jejich růst může být silně inhibován často nízkými, milimolárními, koncentracemi NaCl. Na druhou stranu existují rostliny, nazývané halofyty, které přirozeně rostou v prostředí se zvýšenou nebo vysokou hladinou NaCl (200 mM NaCl), nebo jsou na soli dokonce závislé (Park et al., 2016). K zajištění tolerance vůči osmotickému stresu je zásadní regulace koncentrace, složení a distribuce iontů v buňce. Intracelulární iontová homeostáza je při zasolení zajišťována kontrolou vstupu Na^+ a kompartmentalizací Na^+ a Cl^- do vakuoly prostřednictvím iontových kanálů a transportérů (Jenks and Hasegawa, 2005).

Rostliny vystavené vysokým koncentracím NaCl mají tendenci akumulovat Na^+ v důsledku jeho vysokého příjmu, například prostřednictvím neselektivních kationtových kanálů (NSCCs, NonSelective Cation Channels) nebo vysokoafinitivních HKT1/HKT2 transportérů (High-Affinity K^+ Transporter). Vysoká koncentrace Na^+ v buňkách inhibuje řadu biologických procesů, včetně absorpce K^+ . Draslík je hlavním buněčným kationtem, který je rozhodující pro udržení buněčného

turgoru, membránového potenciálu, integrity a funkce membrán a aktivity mnoha enzymů (Zhu et al., 1998). Z tohoto důvodu dochází u rostlin po ošetření solí ke zvýšení aktivity Na^+/H^+ antiporterů, které začnou přemísťovat Na^+ z buňky nebo do vakuoly. Při solném stresu dochází například k aktivaci signální dráhy SOS (Salt Overly Sensitive), která je spouštěna cytoplazmatickým signálem Ca^{2+} iontů. Signál Ca^{2+} generovaný stresem je vnímán SOS3, což umožňuje tvorbu protein-kinázového komplexu SOS3-SOS2, který dále fosforyluje a aktivuje transportní aktivitu SOS1. Plazmatický Na^+/H^+ transportér SOS1 zprostředkovává pasivní transport H^+ do buňky a aktivní transport Na^+ ven z buňky. Vápník, kináza SOS2 a změny hladiny kyseliny abscisové se podílejí také na regulaci vakuolárního Na^+/H^+ transportéru NHX1 (Na^+/H^+ Exchanger 1), který transportuje Na^+ do vakuol rostlin a tím chrání rostlinu před toxicitou Na^+ (Zhu, 2002; Buchanan et al., 2015; Park et al., 2016). Tento mechanismus je znázorněn na obrázku 9.



Obrázek 9: Mechanismus tolerance k zasolení prostřednictvím aktivace signální dráhy SOS a transportéru NHX1 (Schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word, inspirováno z Buchanan et al., 2015).

2.4.1.1 Modré světlo a zasolení

I když je o vnímání modrého světla (BL) semeny známo jen velmi málo (Goggin and Steadman, 2012), bylo prokázáno, že BL většinou redukuje klíčení semen u rajčat, a že semena rajčat pod osmotickým stresem klíčí lépe ve tmě než v BL (Fellner and Sawhney, 2002; Píterková et al., 2012). Počet informací popisujících přímý účinek BL snášet abiotický stres u rostlin je velmi nízký.

Jako nejvhodnější model pro studium možné interakce mezi BL a osmotickým stresem se jeví mutant *7B-1* (Balarynová et al., 2018).

Mutant rajčete *7B-1*, který produkuje nadbytek ABA a je defektní v signalizaci BL, vykazuje pod BL rezistenci vůči abiotickým a biotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002). Semena *7B-1* vykazují na světle vysokou rezistenci vůči osmotickému stresu vyvolanému mannitolem. Citlivost mutantu *7B-1* a k němu odpovídajícího kultivaru (cv. Rutgers, dále WT) byla také testována na různých koncentracích solí NaCl, KCl, Na₂SO₄ a K₂SO₄. Klíčení semen WT bylo silně inhibováno NaCl. Například na médiu s 50mM NaCl se pohybovala klíčivost semen WT na světle přibližně kolem 30 %, zatímco u mutantního semene byla klíčivost 70 %. Semena rajčete *7B-1* byla také v porovnání s WT méně citlivá na soli Na₂SO₄, KCl a K₂SO₄ (Fellner and Sawhney, 2001). Účinky vysokého zasolení a nízké teploty jsou částečně způsobeny zhoršenou absorpcí a transportem vody, proto je možné tyto stresové faktory částečně považovat za různé formy osmotického stresu (Ryu et al., 1995; Xiong et al., 1999). Mutant *7B-1* vykazuje zvýšenou rezistenci vůči abiotickým a biotickým stresům pouze při působení světla, obzvláště při působení vysokoenergetického modrého světla. Tolerance rostlinných tkání vůči abiotickým stresům u mutantu *7B-1* souvisí se zvýšenou hladinou endogenní ABA v některých systémech a také kvůli poruše vnímání BL nebo přenosu signálu (Fellner and Sawhney, 2002). Modré světlo zvyšuje u semen *7B-1* také rezistenci k exogenní ABA (Fellner and Sawhney, 2002) a k bakteriálnímu toxinu koronatinu, produkovanému *Pseudomonas syringae* (Bergougnoux et al., 2009). Mutace u *7B-1* narušuje i prvek signalizační dráhy BL, který je zapojen do otevírání průduchů. Předpokládá se, že porucha v otevírání průduchů u mutantu *7B-1* vzniká v důsledku inhibice funkce aniontových kanálů nebo kvůli zvýšené hladině endogenní ABA (Hlavinka et al., 2013).

Existence interakce mezi osmotickým stresem, signalizací BL a mutací u *7B-1* byla naznačena v práci se zaměřením na genovou expresi akvaporinů plazmatické membrány v semenech rajčat. Bylo zde předpokládáno, že tolerance semen *7B-1* na BL a osmotický stres může zahrnovat diferenciální expresi genů akvaporinů. Různé abiotické stresy indukující osmotický stres na rostlinných buňkách způsobí nerovnováhu v homeostáze vody, která je zachována akvaporiny. Geny rodiny akvaporinů plazmatické membrány (*PIP*, *aquaporin Plasma membrane Intrinsic Proteins*), konkrétně *PIP1;2*, *PIP1;3*, *PIP1;4*, *PIP1;5*, *PIP2;1*, *PIP2;2* a *PIP2;3*, se účastní vývoje semen rajčat a exprese některých z nich může být regulována abiotickým stresem. V této práci bylo zjištěno, že manitolem indukovaným osmotickým stresem a mutací *7B-1* (udělující nižší odezvu na osmotický stres a BL indukovaná inhibice klíčení semen) došlo ke snížení exprese genů *PIP1;3*, *PIP2;3* a *PIP1;2*; *PIP2;1*, kdy exprese genu *PIP1;3* byla inhibována nejen osmotickým stresem, ale také BL. Může se jednat o způsob, kterým si rostliny zadržují vodu pro prodloužení radikuly při klíčení semen za stresových podmínek (Balarynová et al., 2018).

Fotoreceptory modrého světla - kryptochromy (cry) zprostředkovávají aklimatizační odpověď na biotický a abiotický stres. Některé studie naznačují, že nadměrná exprese genů *CRY* snižuje rezistenci rostlin k osmotickým stresům a kyselině abscisové (ABA). U transgenní linie *Arabidopsis thaliana*, která vykazuje nadměrnou expresi genů *TaCRY1a* a *TaCRY2* (*Triticum aestivum* *CRY1a*, *CRY2*), byla sledována nižší tolerance na vysokou koncentraci NaCl, manitolu a exogenní ABA v porovnání s WT. Geny *TaCRY1a* a *TaCRY2*, jejichž exprese je indukována osmotickým stresem, byly popsány u pšenice (*Triticum aestivum*). Rostliny s nadměrnou expresí genu *TaCRY1a* vykazovaly vyšší citlivost k soli v porovnání s rostlinami nadměrně exprimujícími gen *TaCRY2* (Xu et al., 2009; D'Amico-Damião and Carvalho, 2018).

Význam fotoreceptorů cry v solných stresových reakcích byl prokázán také při analýze nadměrné exprese genu sladkého čiroku *SbCRY1b* (*Sorghum bicolor* *CRY1b*) u *Arabidopsis thaliana* při zasolení. Zatímco mutant *cry1* vykazoval vyšší toleranci k soli a ABA v porovnání s WT, transgenní linie *Arabidopsis thaliana* s nadměrnou expresí genů *SbCRY1b* byla na solný stres a ABA hypersenzitivní. Tyto mechanismy jsou pravděpodobně regulovány faktorem HY5-ABI5 (elongated HYpocotyl 5 - ABA-Insensitive 5), který spouští diferencovanou expresi transkriptů reagujících na ABA a stres (Zhou et al., 2018b). Dále bylo prokázáno, že *cry1* řídí reakce na stres zasolení pomocí ABA-závislých signálních drah (Sharma et al., 2014; D'Amico-Damião and Carvalho, 2018). U *Arabidopsis thaliana* bylo také při studiu cirkadiálních hodin zjištěno, že protein asociovaný s cirkadiálními hodinami LIP1 (Light Insensitive Period 1), který zprostředkovává inhibici fotomorfogeneze působením červeného a modrého světla, je také vyžadován při světle řízené inhibici endoreplikace a toleranci vůči solnému stresu (Terecskei et al., 2013).

U pšenice (*Triticum aestivum*) a *Arabidopsis thaliana* byla studována funkce G-box vazebných faktorů (GBFs, G-box Binding Factors) v reakcích na modré světlo a abiotický stres. Byl identifikován gen pšenice *TaGBF1* (*Triticum aestivum* *GBF1*), který zprostředkovává signální dráhy reagující jak na modré světlo, tak i na abiotický stres. Hladina transkriptů *TaGBF1* byla indukována modrým světlem, NaCl a ABA. Dále bylo zjištěno, že nadměrná exprese genu *TaGBF1* zvyšuje citlivost na zasolení a ABA u pšenice i *Arabidopsis thaliana*, zatímco snížená exprese genu *TaGBF1* vyvolala u pšenice rezistenci vůči vysokým hladinám NaCl a ABA. Zvýšená exprese genu *TaGBF1* zapříčiňuje zvýšení exprese *AtABI5* (*Arabidopsis thaliana* *ABI5*), který představuje klíčovou složku signální dráhy ABA u *Arabidopsis thaliana*, a jeho homologu *WABI5* (*Wheat* *ABI5*) u pšenice. U mutantů *abi5* nebyla pozorována zvýšená citlivost na sůl a ABA způsobená *TaGBF1*, což dokazuje, že faktor *ABI5* je mediátorem abiotických stresových odpovědí vyvolaných *TaGBF1* (Sun et al., 2015).

Další práce zabývající se studiem molekulárních mechanismů, kterými rostliny reagují na solný stres, byla prováděna na rostlině *Physcomitrella patens*. *Physcomitrella patens* je modelový organismus pro studium systematiky a evoluce rostlin, který vykazuje toleranci k vysoké

koncentraci solí. U *Physcomitrella patens* bylo zjištěno, že jednu z jejich reakcí na vysoké hladiny solí zprostředkovávají fotoreceptory modrého světla - fototropiny, které se podílejí na regulaci H⁺-ATPázy na plazmatické membráně a udržování iontové homeostázy slanosti (Wang et al., 2008).

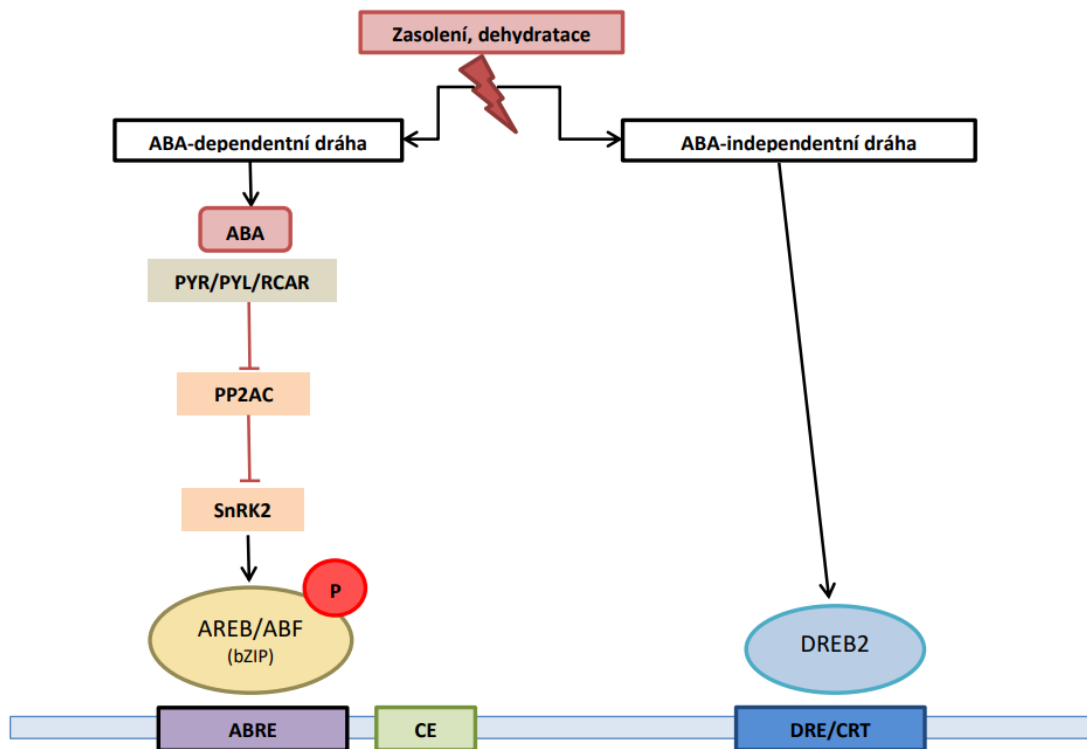
2.4.1.2 Kyselina abscisová a zasolení

Kyselina abscisová (ABA) je jeden z hlavních fytohormonů, který hraje důležitou roli v rozpoznávání stresu a vyvolání stresové reakce. Signální dráhy ABA regulují důležité reakce na abiotický stres, zejména vodní bilanci a toleranci osmotického stresu. Tohoto účinku rostliny dosáhnou za předpokladu rychlé a citlivé biosyntézy ABA během stresu, která inhibuje funkce rostlin za nepříznivých podmínek a naopak rychlou degradaci a deaktivaci ABA, jakmile je stres uvolněn. Jako okamžitá reakce ABA na iontovou nerovnováhu a nedostatek vody je uzavření průduchů v buňkách sloužící k udržení vody v rostlinách. Kyselina abscisová také reguluje expresi mnoha genů, jejichž produkty mohou fungovat při toleranci dehydratace a zasolení (Zhang et al., 2006; Nakashima and Yamaguchi-Shinozaki, 2013; Park et al., 2016).

Reakce rostlin na solný stres a nedostatek vody spolu úzce souvisí. Rostlina vystavená stresu zasolením indukuje úměrné zvýšení koncentrace ABA, která ve většině případů souvisí s listovým nebo půdním vodním potenciálem. To naznačuje, že solí indukovaná produkce endogenní ABA je způsobena spíše nedostatkem vody než konkrétním účinkem solí (Zhang et al., 2006). Některé studie ukázaly, že rostliny s nízkou hladinou ABA jsou více tolerantní ke stresu zasolením během klíčení. Například snášenlivost k vysoké koncentraci solí u *Brassica napus* je ve srovnání s *Brassica carinata*, která je k soli citlivá, způsobena díky nižší akumulaci ABA při stresu solí (He and Cramer, 1996). Zvýšená koncentrace ABA vyvolaná slaností také koreluje s inhibicí expanze listů u různých druhů (He and Cramer, 1996; Zhang et al., 2006).

Rostliny si zajišťují toleranci na osmotický stres prostřednictvím ABA-dependentní a ABA-independentní dráhy, jejichž mechanismus je vidět na obrázku 10. Při vysoké koncentraci solí nebo dehydrataci dochází ke spuštění signální kaskády ABA, která je zastoupena ABA receptory PYR/PYL/RCAR, fosfatázou PP2AC a protein-kinázou SnRK2. Aktivovaná proteinová kináza SnRK2 fosforyluje základní transkripční faktory leucinového zipu (bZIP, basic leucine ZIPper) - AREB/ABF (ABRE-Binding protein/ABRE-Binding Factor). Fosforylované faktory AREB/ABF se vážou na element ABRE (ABA-Responsive Element), což je hlavní *cis*-element zapojený v expresi genů citlivých na ABA vyvolané stresem. Element ABRE vyžaduje pro svou funkci přítomnost dalšího *cis*-elementu CE (Coupling Element). ABA-dependentní dráha při osmotickém stresu aktivuje kromě bZIP i další transkripční faktory, jako je například faktor MYC2 nebo MYB2. Při reakci na zasolení a dehydrataci prostřednictvím ABA-independentní dráhy dochází k indukci transkripčního faktoru DREB2 (Dehydration Responsive Element Binding protein 2). Tento faktor se následně váže na klíčový *cis*-element DRE/CRT (Dehydration-

Responsive Element/C-Repeat), který je zapojený v expresi genů nezávislých na ABA vyvolané stresem. ABA-independentní dráha reaguje také na stres vyvolaný teplem a chladem (Uno et al., 2000; Zhang et al., 2006; Buchanan et al., 2015).



Obrázek 10: Mechanismus tolerance k zasolení a dehydrataci prostřednictvím ABA-dependentní a ABA-independentní dráhy (Schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word, inspirováno z Buchanan et al., 2015).

3 MATERIÁL A METODY

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část byla zvolena semena rajčete *Solanum lycopersicum* L. Veškeré experimenty byly prováděny se semeny mutanta rajčete *7B-1* a k němu odpovídajícímu kultivaru cv. Rutgers. Mutant *7B-1*, který byl původně vyselektován pro svou samčí sterilitu závislou na fotoperiodě, obsahuje spontánní recesivní mutaci v jednom genu *7B-1*, jehož funkce není zcela známa (Sawhney, 1997). Nedávno byla, pomocí mezidruhových mapovacích populací a markerů spojených s geny třídy MADS-box skupiny, zjištěna signifikantní vazba mezi *7B-1* a genem *SIGLO2* (Pucci et al., 2017). Mutant *7B-1* produkuje nadbytek ABA a je defektní v signalizaci modrého světla. Specificky na modrém světle vykazuje rezistenci vůči abiotickým a biotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002; Bergougnoux et al., 2009). Semena *7B-1* jsou při klíčení v porovnání se cv. Rutgers méně citlivá na různé soli (včetně NaCl, KCl, Na₂SO₄ a K₂SO₄), osmotický stres a nízkou teplotu (Fellner and Sawhney, 2001). Mutant *7B-1* je ovlivněn v několika fototropinem zprostředkovaných odpovědích, jako je otevírání průduchů (Hlavinka et al., 2013), pohyb chloroplastů, fototropismus a rané prodlužování hypokotylů (Fellner, nepublikované výsledky). Semena mutanta *7B-1* a cv. Rutgers byla laskavě poskytnuta V. K. Sawhney z University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada.

3.2 Příprava 5M zásobního roztoku chloridu sodného (NaCl)

K přípravě 5M zásobního roztoku chloridu sodného (NaCl) o celkovém objemu 200 ml bylo naváženo 58,44 g NaCl. Dané množství NaCl bylo za stálého míchání na magnetické míchače (Arex-6 Digital PRO, Velp Scientifica, Itálie) rozpuštěno ve 110 ml destilované H₂O v kádince s vloženým magnetickým míchadlem. Po rozpuštění NaCl byl objem roztoku v odměrném válci doplněn destilovanou H₂O na 200 ml. Připravený roztok byl následně v laminárním flowboxu (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific, Německo) sterilizován filtrací pomocí jednorázového 0,22 μ m stříkačkového filtru (Sterile Syringe filter MCE) a 50ml stříkačky do sterilní láhve. Láhev s roztokem byla skladována v chladničce při teplotě 4 °C.

3.3 Příprava kultivačního média Murashige and Skoog

K přípravě základního kultivačního média Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) o celkovém objemu 2 litry bylo naváženo 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (kat. č. M5519-10L, Duchefa Biochemie, Nizozemsko) a 290,4 mg MES pufru (Morpholinoethane sulfonic acid pufr). Ve 3l Erlenmayerově baňce s vloženým magnetickým míchadlem byly navážené látky za stálého míchání na magnetické míchače (Arex-6 Digital PRO, Velp Scientifica, Itálie) rozpuštěny v 1 litru destilované H₂O. Po rozpuštění chemikálií byl objem média doplněn destilovanou H₂O na 2 litry a postupným přikapáváním 1M roztoku hydroxidu draselného (KOH) bylo upraveno pH na 6,1. Připravené médium bylo následně odměrným válcem rozděleno

po 400 ml do pěti 500ml skleněných termolahví, do kterých bylo přidáno 2,8 g Phyto agaru (kat. č. P1003.1000, Duchefa Biochemie, Nizozemsko). Byl tak získán 0,7% agar. Víčka lahví byla obalena hliníkovou folií a přelepena sterilizační páskou. Připravené láhve s médiem byly sterilizovány v parním autoklávu (Labo Autoclave MLS-3751, Panasonic, Německo) a poté skladovány v chladničce při teplotě 4 °C.

3.4 Kultivace semen rajčete

Pro jednotlivé experimenty byl napočítán požadovaný počet semen obou genotypů experimentálních rostlin (300 semen mutanta *7B-1* a 300 semen cv. Rutgers). Napočítaná semena byla sterilizována v plastových zkumavkách typu Falcon ve 40 ml ředěno roztoku hypochloridu sodného (SAVO) obsahujícího 2,8% aktivního chloru za občasného protřepání po dobu 30 minut. Po uplynutí 30 minut byla semena za sterilních podmínek v laminárním flowboxu (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Fisher Scientific, USA) pětikrát promyta sterilní destilovanou H₂O pomocí 10ml pipety. Po posledním propláchnutí bylo do plastové zkumavky nalito cca 5 ml sterilní destilované H₂O, aby nedošlo k vyschnutí semen.

Na jeden experiment (výsev semen na jednu zvolenou koncentraci NaCl) bylo potřeba 400 ml MS média, které bylo před použitím dokonale rozežráto v mikrovlnné troubě. Semena byla vysévána na médium s vybranými koncentracemi NaCl (0, 50 a 75 mmol/l). Přidaný příslušný objem zásobního 5M roztoku NaCl do 400 ml MS média je zaznamenán v tabulce 1. Připravené médium bylo rozlito po 20 ml do 20 sterilních kulatých plastových Petriho misek o průměru 90 mm. Po ztuhnutí média v Petriho miskách byl proveden výsev semen.

Tabulka 1: Požadovaná koncentrace NaCl v médiu a přidávané objemy NaCl ze zásobního 5M roztoku NaCl

požadovaná koncentrace NaCl v médiu [mmol/l]	objem 5M zásobního roztoku NaCl [ml/400 ml]
0	0
50	4
75	6

Výsev semen byl prováděn ve sterilních podmínkách v laminárním flowboxu (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Fisher Scientific, USA). Na každou Petriho misku bylo vyseto 30 semen. Vysterilizovaná semena byla na povrch ztuhlého agaru vysévána pomocí pinzety, která byla před použitím sterilizována v 96% ethanolu a vyžihána nad plamenem kahanu. Po výsevu byly uzavřené Petriho misky po svém obvodu dvakrát obmotány páskou z netkané textilie (Urgopore, Softpore; Batist Medical, a.s., Česká republika). Semena v miskách byla kultivována ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin při teplotě 23 °C. Sada misek určená pro kultivaci na modrém světle byla ve vertikální poloze umístěna do plastového stojanu a postavena do horní části automatické růstové komory (Microclima 1000E,

Snijders Scientific, Holandsko). Zdrojem modrého světla s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 440 nm byla zářivka Philips TLD36W/18-Blue. Sada misek určená pro kultivaci ve tmě byla obalena hliníkovou fólií a umístěna ve vertikální poloze do spodní části stejné růstové komory.

Výsev a kultivace semen určených pro experimenty zahrnující kvantifikaci endogenní ABA a analýzu exprese genů účastnících se metabolismu ABA byly prováděny dle výše uvedeného postupu na semenech mutanta rajčete *7B-1* a kultivaru cv. Rutgers. Celkem byla vyseta semena pro 2 biologické replikáty pro analýzu endogenní ABA a jedna série vzorků určená pro studium exprese genů. V případě optimalizace primerů byla za stejného postupu použita pouze semena cv. Rutgers kultivovaná ve tmě, na čistém MS médiu po dobu 24 a 48 hodin.

3.5 Sklizeň, homogenizace a rozvažování kultivovaných semen

Po uplynutí doby kultivace byla semena sklizena v temné místnosti pod zeleným světlem (v případě semen kultivovaných ve tmě) nebo pod modrým světlem (v případě semen kultivovaných pod modrým světlem). Petriho misky byly otevřeny sterilním skalpelem v místě obmotání páskou z netkané textilie a pomocí sterilní pinzety byla následně semena přenesena a zabalena do sterilní hliníkové fólie o rozměru cca 10 x 10 cm. Skalpel, pinzeta a nastříhané hliníkové fólie byly vždy předem sterilizovány 70% ethanolem. Semena z jednotlivých Petriho misek byla sklizena zvlášť do příslušných nadepsaných hliníkových fólií. V případě vzorků určených pro analýzu endogenní ABA byla sklizena všechna semena (30 semen z jedné Petriho misky), zatímco u vzorků určených pro analýzu exprese genů a optimalizaci primerů bylo sklizeno cca 130 mg čerstvé hmoty. Přesně navážené hmotnosti byly vždy zaznamenány. Semena zabalená v hliníkových fóliích byla ihned zmrazena v tekutém dusíku a uchovávána v mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Sklizený rostlinný materiál byl při teplotě $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ (pomocí tekutého dusíku) homogenizován ve sterilizované vychlazené třecí misce s tloučkem na jemný prášek. Rozdrcený materiál byl přenesen vychlazenou sterilní špachtlí do označených 2ml kónusových mikrozkušavek naplněné tekutým dusíkem. Po vypaření tekutého dusíku z mikrozkušavek byly vzorky uchovávány v mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V případě vzorků určených pro analýzu endogenní ABA byl zhomogenizovaný materiál na analytických vahách (HR-200 EC, A&D, Japonsko) rozvážen na triplikáty po 15 - 20 mg čerstvé hmoty, kdy přesně navážené hmotnosti byly vždy zaznamenány. Materiál byl rozvažován pomocí sterilní vychlazené špachtle do 2ml mikrozkušavek se „safe lock“ víčkem. Veškeré vzorky byly po celou dobu uchovávány v nádobách s tekutým dusíkem a samotná manipulace se vzorkem během rozvažování probíhala rychle, aby nedošlo k rozmrznutí vzorku. Mikrozkušavky s rozváženým rostlinným materiálem byly uchovávány v mrazicím boxu při teplotě $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

3.6 Analýza endogenní kyseliny abscisové

K analýze endogenní hladiny kyseliny abscisové (ABA) byla použita semena rajčete mutanta *7B-1* a kultivaru cv. Rutgers kultivována ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin. Semena byla kultivována na MS médiu s vybranými koncentracemi NaCl (0, 50 a 75 mmol/l). Pro analýzu endogenní ABA byly vysety 2 biologické replikáty, kdy z každého homogenizovaného vzorku byly naváženy alikvoty po 15 - 20 mg čerstvé hmoty ve třech opakováních. Vlastní kvantifikace fytohormonu ABA pomocí UHPLC-ESI(-)MS/MS byla provedena RNDr. Veronikou Turečkovou, Ph.D. dle dříve publikované metody (Turečková et al., 2009).

3.6.1 Extrakce a purifikace ABA

K rostlinnému materiálu (cca 15 - 20 mg) ve 2ml mikrozkušavkách byl přidán 1 ml chlazeného 10% methanolu (10:89:1, methanol (MeOH) : redestilovaná H₂O : kyselina octová (HAc); v/v), tři 2-mm kuličky z karbidu wolframu a 20 pmol značeného interního standardu (+)-3',5',5',7',7',7'-²H₆-ABA (Olchemim, Olomouc, Česká republika). Takto připravené vzorky byly homogenizovány ve vibračním mlýnku (MM 400, Retsch GmbH & Co. KG, Německo) při frekvenci 27 Hz po dobu 3 minut a následně byly promíchávány v lednici při 4 °C po dobu 1 hodiny pomocí laboratorního rotátoru (Stuart SB3, Bibby Scientific Limited, UK) nastaveného na 17 rpm. Po uplynutí stanovené doby byly homogenáty centrifugovány (Hermle Z 36 HK, Labortechnik GmbH, Německo) po dobu 10 minut při 20 000 rpm a 4 °C a následně byly supernatanty odděleny do čistých zkumavek. Zbylé pelety byly stejným způsobem re-extrahovány v 500 µl extrakčního činidla po dobu 30 minut, spojeny s primárním supernatantem a nakonec přečištěny pomocí SPE (extrakce na pevné fázi).

Každý vzorek (cca 1,5 ml) byl nanesen na aktivovanou Oasis[®] HLB kolonu (60 mg, 3 ml, Waters, USA). Aktivace kolony byla provedena 2 ml 100% methanolu a ekvilibrace 2 ml 10% methanolu (10:89:1, MeOH:H₂O:HAc; v/v). Po nanesení vzorku byla kolona promyta 1 ml 10% methanolu (10:89:1, MeOH:H₂O:HAc; v/v) a poté byla provedena eluce ABA 3 ml 80% methanolu (80:19:1, MeOH:H₂O:HAc; v/v). Eluát byl odpařen pod vakuem za sucha (CentriVap[®] Acid-Resistant, Labconco Corporation, USA) a uchováván v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

3.6.2 UHPLC-ESI(-)MS/MS analýza

Obsah endogenní ABA byl zjišťován pomocí ultra-vysoko účinné kapalinové chromatografie (UHPLC; Acquity UPLC[™] Systém, Waters, USA) v kombinaci s trojitým kvadrupólovým hmotnostním spektrometrem (Xevo[®] TQ MS, Waters MS Technologies, UK) vybaveným elektrosprejovou ionizací (ESI). Odpařené vzorky byly rozpuštěny v 50 µl mobilní fáze (30:70, A:B). Mobilní fázi A byl methanol a mobilní fázi B byla 10mM kyselina mravenčí, která byla připravována čerstvě před každým měřením v odměrné baňce. Roztok 10mM koncentrace kyseliny mravenčí byl získán tak, že 189 µl koncentrované kyseliny mravenčí bylo doplněno deionizovanou vodou (Milli-Q) do objemu 500 ml, kdy Milli-Q byla připravována přístrojem Simplicity 185

(Millipore, Bedford, USA). Vzorky byly následně promíchány na vortexu (Wizard vortex, Velp Scientifica, Itálie), vloženy na 10 minut do ultrazvukové lázně (Transsonic 310, Elma Schmidbauer GmbH, Německo), přefiltrovány pomocí 0,2 μ m mikrofiltru (Pall Corporation, USA) a zcentrifugovány na 8 000 rpm při 24 °C po dobu 5 minut (Micro Star 12, VWR, Korea). Takto připravené vzorky byly přendány do mikroinzertů (0,1 ml, 5,7 x 29 mm) umístěných ve skleněných vialkách, uzavřeny víčkem a připraveny pro analýzu pomocí LC-ESI(-)MS/MS.

Vzorky a kalibrační roztoky byly uloženy v autosampleru při 4 °C a postupně nastříkovány (15 μ l) na reverzní UPLC kolonu (AcquityTM BEH Shield RP C18, 130Å; 2,1 mm \times 150 mm, 1,7 μ m; Waters, USA), která byla termostatována na 40 °C. Celkový čas analýzy trval 13 minut. Lineární gradientová eluce byla provedena při průtoku 0,2 ml/min, kdy počáteční poměr mobilních fází gradientu byl 30 % A a 70 % B. V 7,00 minutě činil gradient 47,5 % A a 52,5 % B, a v 7,50 minutě 50 % A a 50 % B. Poté následovalo promytí kolony 1 ml 100% MeOH a nakonec ekvilibrace kolony na počáteční podmínky (30 % A a 70 % B) v délce trvání 3,5 minut. Na začátku i v průběhu analýz byla čistota systému ověřována nástřiky kontrolního roztoku odpovídajícího počátečnímu poměru mobilních fází z gradientu. Analýza vzorků byla prováděna pomocí MS v režimu MRM za pomoci ionizace elektrosprejem v negativním módu – ESI(-). Na kapiláru bylo přivedeno napětí 1 kV, na vstupní štěrbinu napětí 25 V a na extrakční štěrbinu 3 V. Teplota iontového zdroje byla 120 °C, průtok desolvatačního plynu byl 650 l/hod a průtok plynu na vstupní štěrbině byl 70 l/hod. Záznam dat probíhal za optimalizovaných podmínek napětí vloženého na vstupní štěrbině a kolizního napětí 10 V. Časové okno v rozsahu 8,4 – 9,75 minut obsahovalo dva MRM přechody, první pro ABA (263,1 > 153,1) a druhý pro interní standard $^2\text{H}^6$ -ABA (269,1 > 159,1).

Všechna data byla zpracovávána programem MassLynxTM (verze 4.2, Waters, USA). K porovnání výsledků obsahu endogenní ABA a relativní exprese genů byla vypočítána inhibice (I) obsahu ABA podle následujícího vzorce:

$$I [\%] = [(a - b) / a] \times 100, \text{ kde}$$

a = průměrná hodnota obsahu ABA po 6 hodinách kultivace u cv. Rutgers nebo mutanta *7B-1* za zvolených analyzovaných podmínek (D/BL, 0mM/50mM koncentrace NaCl),

b = průměrná hodnota obsahu ABA po 12, 24, 48 nebo 72 hodinách kultivace u cv. Rutgers nebo mutanta *7B-1* za zvolených analyzovaných podmínek (D/BL, 0mM/50mM koncentrace NaCl).

Dále byla provedena statistická analýza pomocí Student's T-testu.

3.7 Analýza exprese genů zapojených v metabolismu kyseliny abscisové

Ke studiu exprese genů zapojených do metabolismu kyseliny abscisové (ABA) byla použita metoda kvantitativní polymerázové řetězové reakce (qPCR, real-time PCR). Původním záměrem této diplomové práce bylo studium dvou vybraných zájmových genů – *LeNCED1* (*Lycopersicon esculentum 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase 1*, gen zapojený v biosyntetické dráze ABA) a *SICYP707A3* (*Solanum lycopersicum Cytochrome P450 707A3*, gen zapojený v katabolické dráze ABA). Primer genu *LeNCED1* se však nepodařilo kvůli příliš vysokým C_t hodnotám optimalizovat, a proto byl z dalšího studia vyřazen. Pro vnitřní kontrolu byly zvoleny dva referenční geny (housekeeping geny) – *Tip41Like* (*Type 2A-Interacting Protein 41 Like*) a *PP2Acs* (*Protein Phosphatase type 2A*). Exprese zkoumaných genů byla sledována v semenech mutanta rajčete *7B-1* a kultivaru cv. Rutgers, kultivovaných ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin. Exprese genu byla analyzována pouze u semen kultivovaných na médiu s koncentracemi NaCl 0 a 50 mmol/l, protože v semenech vysévaných na médiu s koncentrací NaCl 75 mmol/l byla izolována velice nízká koncentrace RNA.

3.7.1 Extrakce a izolace RNA

Z homogenizovaných vzorků byla izolována celková RNA za využití kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie). Mikrozkumavky s homogenizovanými vzorky byly přeneseny do digestoře a před rozmrznutím bylo do každého vzorku přidáno 350 μ l lyzačního pufru RLS (Lysis Buffer, 50 - 66% guanidin hydrochlorid; Bioline, Velká Británie) a 3,5 μ l β -mercaptoethanolu. Vzorky byly při pokojové teplotě důkladně promíchány na vortexu (Wizard vortex, Velp Scientifica, Itálie) a stočeny v centrifuze (MIKRO 200, Hettich, Německo) po dobu 5 minut. Centrifuga byla při izolaci celkové RNA vždy nastavena na 24 °C a 13 000 rpm. Supernatant byl přenesen na filtr fialových kolon se sběrnými zkumavkami (ISOLATE II Filter; Bioline, Velká Británie) a kolony byly centrifugovány po dobu 2 minut. Po centrifugaci byly fialové kolony zlikvidovány a přefiltrovaný obsah vzorků bez sedimentu byl přenesen do nových 1,5ml mikrozkumavek, do kterých bylo následně ke každému vzorku přidáno 350 μ l 70% ethanolu. Obsah v 1,5ml mikrozkumavkách byl po promíchání na vortexu (2 x 5 sekund) přenesen na modré kolony se sběrnými zkumavkami (ISOLATE II RNA Plant Column; Bioline, Velká Británie), které byly následně 60 sekund centrifugovány. Po centrifugaci byly kolony s navázanou RNA vzorku přeneseny na nové 2ml sběrné zkumavky. Na membránu kolony se vzorkem bylo přidáno 350 μ l odsolovacího pufru MEM (Membrane Desalting Buffer, 1% - 10% guanidin hydrochlorid; Bioline, Velká Británie) a kolony byly 2 minuty stočeny v centrifuze. Obsah ze sběrných zkumavek byl vyliť, kolony s navázanou RNA byly zpět nasazeny na stejné sběrné zkumavky a přeneseny na led.

Na ledu byla připravena DNase I reakční směs (Tabulka 2), ze které bylo na střed membrány modré kolony každého vzorku nanášeno 100 μ l této směsi. Vzorky s reakčním mixem byly inkubovány po dobu 15 minut při pokojové teplotě a po uplynutí této doby bylo ke vzorkům

přidáno 200 µl promývacího pufru RW1 (Wash Buffer RW1; Bioline, Velká Británie), který inaktivuje DNase I. Modré kolony se vzorky byly centrifugovány po dobu 1 minuty a po stočení byly přeneseny na nové 2ml sběrné zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 600 µl promývacího pufru RW2 (Wash Buffer RW2; Bioline, Velká Británie), který vyplachuje proteiny, a poté byly kolony vloženy do centrifugy na 1 minutu. Po vylití obsahu ze sběrných zkumavek byly membrány kolon se vzorkem ještě dvakrát promyty přidáním 250 µl RW2 pufru, kdy po prvním přidání RW2 pufru byly kolony centrifugovány po dobu 1 minuty, zatímco po druhém přidání RW2 pufru byly vzorky stočeny 2 minuty. Po centrifugaci byly kolony přeneseny na nové 1,5ml mikrozkušavky, do kterých byla eluována RNA.

Tabulka 2: DNase I reakční směs

	1 vzorek
RDN (Reaction Buffer for DNase I) (Bioline, Velká Británie)	90 µl
Rnase-free DNase I (enzym deoxyribonukleáza) (Bioline, Velká Británie)	10 µl
	100 µl

Eluce RNA byla provedena tak, že na membránu modré kolony každého vzorku bylo nanášeno 40 µl RNase-free H₂O. Vzorky byly při pokojové teplotě inkubovány po dobu 5 minut a centrifugovány 1 minutu. Membrány kolony byly následně prolity ještě jednou stejným profiltrovaným objemem, inkubovány po dobu 5 minut a centrifugovány 1 minutu. Celkově bylo získáno 40 µl celkové RNA každého vzorku.

3.7.2 Přečištění izolované RNA a PCR pro přečištěnou RNA

Po izolaci RNA byla ihned provedena první část přečištění izolované RNA, kdy veškerá práce se vzorky v mikrozkušavkách probíhala na ledě. Nejdříve byla připravena reakční směs (Tabulka 3), ze které bylo do každého vzorku přidáno 10 µl této směsi. Vzorky byly promíchány, stočeny v minicentrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA) a vloženy na 1 hodinu do termostatu (Bio TBD-100, Biosan, Litva) nastaveného na 37 °C. Po uplynutí 1 hodiny byly vzorky ihned přeneseny na led, do každého vzorku byly přidány 2 µl EDTA (kyselina ethylendiamintetraoctová) a poté byly vzorky opětovně vloženy do termostatu předehřátého na 80 °C na 2 minuty. Po uplynutí stanovené doby byly vzorky okamžitě vyndány a umístěny na led. Ke každému vzorku bylo následně přidáno 48 µl nuclease-free H₂O, 10 µl 3M octanu sodného, 250 µl vychlazeného 96% ethanolu a 2 µl glykogenu (Glycogen RNA Grade 20 mg/ml, Thermo Fisher Scientific, USA). Vzorky byly protřepány, stočeny v minicentrifuze a vloženy přes noc do mrazicího boxu při teplotě -80 °C.

Tabulka 3: Reakční směs pro přečištění RNA

	1 vzorek
10x DNase I buffer (Takara Bio, Japonsko)	4 µl
Recombinant DNase I (Takara Bio, Japonsko)	4 µl
Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Takara Bio, Japonsko)	0,5 µl
Nuclease-free H ₂ O	1,5 µl
	10 µl

Následující den byly vzorky z mrazicího boxu stočeny po dobu 30 minut ve vychlazené centrifuze (MIKRO 200, Hettich, Německo) nastavenou na 4 °C při 13 000 rpm. Po centrifugaci byl supernatant vylit do odpadu a do každého vzorku bylo přidáno 500 µl vychlazeného 70% ethanolu. Vzorky byly opět stočeny na 5 minut v centrifuze (4 °C, 13 000 rpm), supernatant byl vylit a do každého vzorku bylo přidáno 500 µl vychlazeného 96% ethanolu. Vzorky byly opět vloženy do centrifugy na 5 minut (4 °C, 13 000 rpm) a po vylití supernatantu byly „prázdné mikrozkušavky“ centrifugovány po dobu 2 minut (4 °C, 13 000 rpm). Po centrifugaci byl zbytek ethanolu odebrán pomocí pipety tak, aby nedošlo k narušení peletu a mikrozkušavky se vzorky RNA byly postaveny na ubrousek dnem vzhůru na dobu 5 minut, aby došlo k úplnému vyschnutí ethanolu na stěnách mikrozkušavek. Pelet byl následně rozpuštěn 10 µl RNase-free H₂O z kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie), která byla použita po stěnách mikrozkušavky a jemně pipetou promíchávána s peletem. Mikrozkušavky se vzorky byly krátce stočeny na minicentrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA) a dány na led. Pomocí spektrofotometru (NanoDrop™ One/One c, Thermo Fisher Scientific, USA) byla změřena koncentrace a čistota přečištěné vyizolované RNA. Vzorky přečištěné RNA byly skladovány v mrazicím boxu při teplotě -80 °C.

Ke kontrole přečištěné izolované RNA byla provedena PCR za využití 10µM primerů kontrolního genu *LeGAPDH* (*Lycopersicon esculentum glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase*) se sekvencemi F (Forward) primeru: 5'- ATC CAT TTA TTT CCA CTG ATT ACA A – 3' a R (Reverse) primeru: 5'- CAT GGG AGC ATC TTT GCT A – 3'. Nejprve byla připravena reakční směs (Tabulka 4) a byl nastaven termocycler (C1000™ Thermal Cycler, BioRad Laboratories, USA) dle programu uvedeného v tabulce 5. Následně bylo do 0,2ml mikrozkušavek přidáno 18 µl reakční směsi a 2 µl příslušného vzorku, neboli templátu RNA. Kromě takto připravených vzorků byla nachystána také pozitivní (18 µl reakční směsi + 2 µl cDNA) a negativní (18 µl reakční směsi + 2 µl nucleasa-free H₂O) kontrola. Vzorky byly promíchány, krátce stočeny v minicentrifuze a ihned vloženy do termocycleru. Výsledek PCR byl zobrazen na gelové agarózové elektroforéze.

Tabulka 4: Reakční směs pro PCR přečištěné RNA

	1 vzorek
Nuclease-free H ₂ O	13 µl
5x My Taq Buffer (Bioline, Velká Británie)	4 µl
10µM primer GAPDH- F	0,5 µl
10µM primer GAPDH- R	0,5 µl
My Taq Polymerase (Bioline, Velká Británie)	0,1 µl
	18,1 µl

Tabulka 5: Program termocycleru pro PCR přečištěné RNA

teplota	čas	
94 °C	3 minuty	45 cyklů
94 °C	30 sekund	
55 °C	30 sekund	
72 °C	1 minuta	
72 °C	5 minut	
4 °C	...	

Produkty PCR byly naneseny na 1,5% agarózový gel, který byl připraven rozpuštěním 1,2 g agarózy v 80 ml 0,5x TBE pufru (Tris-Borát-EDTA) v mikrovlnné troubě. Do média bylo následně přidáno 5 µl barviva GelRed (Nucleic Acid Stain, Biotium, USA), které bylo 1000x naředěno ve H₂O. Obarvené médium bylo nalito do nalévací vany s instalovaným hřebínkem, kde tuhlo po dobu cca 30 minut. Připravené produkty PCR (20 µl) včetně pozitivní a negativní kontroly byly smíchány s 1 µl 6x loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA) a pomocí pipety byly naneseny do jamek gelu (20 µl vzorku + 1 µl barviva). Do první jamky gelu bylo naneseno 6 µl velikostního markeru (GeneRuler 100 bp, Thermo Fisher Scientific, USA). Horizontální elektroforéza proběhla v 0,5x TBE pufru při konstantním napětím 80 voltů po dobu 45 minut. Vizualizace nukleových kyselin v gelu byla provedena pomocí softwaru InGenius 3 Syngene Gel Documentation System (GeneSys).

3.7.3 Syntéza cDNA a PCR pro cDNA

Syntéza cDNA byla provedena z vyzolované RNA pomocí kitu PrimeScriptTM 1st cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Japonsko). Nejdříve byl spočítán objem RNA a RNase-free H₂O, který byl použit pro syntézu cDNA, kdy do jedné reakce byl dáván 1 µg celkové RNA. Dále byl nachystán termocycler (C1000TM Thermal Cycler, BioRad Laboratories, USA) dle programu uvedeného v tabulce 6. Napočítané objemy RNA a RNase-free H₂O byly pomocí pipety dány do 0,2µl mikrozkušavek tak, aby celkový objem roztoku činil 8 µl. Do každého vzorku byl přidán 1 µl 10mM dNTP (deoxyribonukleosid trifosfát; Takara Bio, Japonsko) a 1 µl 50µM Oligo dT Primeru (Oligo deoxyThymine Primer; Takara Bio, Japonsko). Mikrozkušavky se vzorky byly

proklepány, stočeny v minicentrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA) a vloženy do předehřátého termocycleru (víčko bylo předehřáto na 105 °C a deska na 65 °C). Po uplynutí stanovené doby byl program termocycleru pozastaven a vzorky byly přendány na led. Do každého vzorku bylo přidáno 10 µl z připravené reakční směsi (Tabulka 7). Promíchané a stočené vzorky byly opětovně vloženy do termocycleru na dobu 75 minut. Po uplynutí tohoto časového intervalu byl program opět pozastaven, ke každému vzorku bylo přidáno 0,5 µl RnasyH (Takara Bio, Japonsko) a poté byly vzorky vráceny do termocycleru na 15 minut při 37 °C. Po skončení programu bylo získáno 20 µl nasyntetizované cDNA, která byla uchovávána v mrazicím boxu při teplotě -20 °C.

Tabulka 6: Program termocycleru pro syntézu cDNA

teplota	čas
65 °C	5 minut
42 °C	60 minut
70 °C	15 minut
37 °C	15 minut
4 °C	...

Tabulka 7: Reakční směs pro syntézu cDNA

	1 vzorek
RNase/DNase free-H ₂ O (Takara Bio, Japonsko)	4,5 µl
5x Prime Script Buffer (Takara Bio, Japonsko)	4 µl
RNase Inhibitor (Takara Bio, Japonsko)	0,5 µl
PrimeScript Reverse Transcriptase (Takara Bio, Japonsko)	1 µl
	10 µl

Za účelem zjištění správné syntézy cDNA byla provedena PCR při využití 10µM primerů kontrolního genu *PP2Acs* (*Protein Phosphatase type 2A*) se sekvencemi F (Forward) primeru: 5'-CGA TGT GTG ATC TCC TAT GGT C-3' a R (Reverse) primeru: 5'-AAG CTG ATG GGC TCT AGA AAT C-3'. Nejdříve byla připravena reakční směs (Tabulka 8) a byl nastaven termocycler (C1000TM Thermal Cycler, BioRad Laboratories, USA) dle programu uvedeného v tabulce 9. Následně bylo do 0,2ml mikrozkušavek přidáno 18 µl reakční směsi a 2 µl naředěné cDNA (1 µl cDNA + 1 µl nucleasa-free H₂O) příslušného vzorku. Kromě takto připravených vzorků byla nachystána také pozitivní (18 µl reakční směsi + 2 µl cDNA) a negativní (18 µl reakční směsi + 2 µl nucleasa-free H₂O) kontrola. Vzorky byly promíchány, krátce stočeny v minicentrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA) a ihned vloženy do termocycleru. Výsledek PCR byl zobrazen na agarózové elektroforéze dle postupu uvedeného v podkapitole 3.7.2 (Přečištění izolované RNA a PCR pro přečištěnou RNA).

Tabulka 8: Reakční směs pro PCR syntetizované cDNA

	1 vzorek
Nuclease-free H ₂ O	13 µl
5x My Taq Buffer (Bioline, Velká Británie)	4 µl
10µM primer PP2Acs - F (Forward)	0,5 µl
10µM primer PP2Acs – R (Reverse)	0,5 µl
My Taq Polymerase (Bioline, Velká Británie)	0,1 µl
	18,1 µl

Tabulka 9: Program termocycleru pro PCR nasyntetizované cDNA

teplota	čas	
94 °C	3 minuty	30 cyklů
94 °C	30 sekund	
60 °C	30 sekund	
72 °C	45 sekund	
72 °C	5 minut	
4 °C	...	

3.7.4 Příprava a optimalizace primerů

Nejdříve byly objednány primery genů (East Port, Česká republika) zapojených do metabolismu kyseliny abscisové (*LeNCED1* a *SICYP707A3*) a housekeeping genu (*Tip41Like*). Druhý využívaný primer housekeeping genu *PP2Acs* byl již objednán a optimalizován v předchozích výzkumných pracích. Sekvence používaných primerů jsou uvedeny v tabulce 10.

Tabulka 10: Sekvence primerů pro geny *LeNCED1*, *SICYP707A3*, *Tip41Like* a *PP2Acs*

název genu	sekvence 5' - 3'
<i>LeNCED1</i>	Forward: CTTATTTGGCTATCGCTGAACC Reverse: CCTCCAACCTCAAACCTCATTGC
<i>SICYP707A3</i>	Forward: GCTCCCAAACCCAATACCTAC Reverse: CAGTTTGGCGAGTTCATTTC
<i>Tip41Like</i>	Forward: GGTTCCATTGCTGCGTT Reverse: CGAAGACAAGGCCTGAAA
<i>PP2Acs</i>	Forward: CGATGTGTGATCTCCTATGGTC Reverse: AAGCTGATGGGCTCTAGAAATC

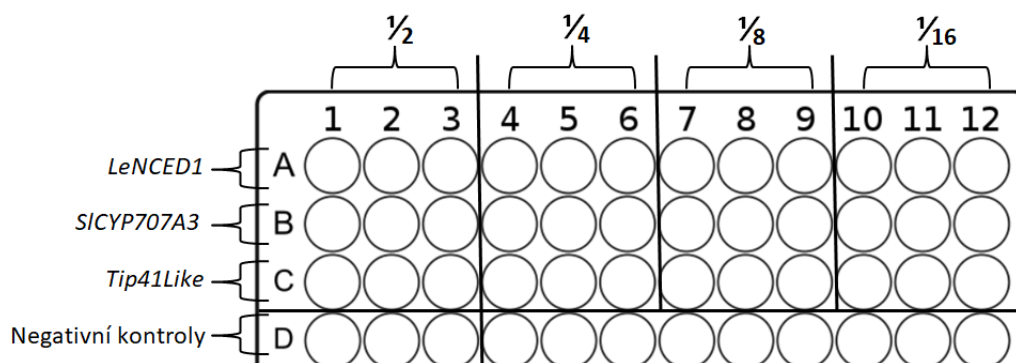
Objednané primery byly doručeny od výrobce v lyofilizovaném stavu, a z tohoto důvodu musely být nejdříve naředěny. Po krátké centrifugaci mikrozkušavek s primery byly primery naředěny na koncentraci 0,1 mM (100 pmol/µl). K ředění byla používána sterilní nuclease-free H₂O, jejíž přidání závisel na množství primeru, které bylo definováno množstvím molů v protokolu dodávaným výrobcem spolu s primerem. Po přidání H₂O byl zásobní 0,1mM roztok primeru důkladně promíchán na vortexu. Zásobní roztok primeru byl dále 10x ředěn tak,

že do 90 μl sterilní nuclease-free H_2O bylo přidáno 10 μl 0,1mM zásobního roztoku. Takto byl získán 10 μM (10 pmol/ μl) pracovní roztok primeru, který byl skladován v mrazicím boxu při teplotě $-20\text{ }^\circ\text{C}$.

Po nachystání pracovních roztoků primerů byla provedena samotná optimalizace, která je důležitá ke zjištění efektivity a specifity primerů a zvolení ředění cDNA, které bude při real-time PCR dále používáno. Veškerá práce se vzorky probíhala na ledu. Pro optimalizaci byla zvolena dvojková ředící řada, kdy vzorek nasyntetizované cDNA byl naředěn na $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$ a $\frac{1}{16}$. Vzorky cDNA byly syntetizovány ze semen rajčete kultivaru cv. Rutgers, kultivovaných ve tmě na čistém MS médiu po dobu 24 a 48 hodin. Uváděné časy kultivace byly zvoleny jako střední hodnoty kultivační časové řady, která byla testována. Výsledné C_t hodnoty po 24 a 48 hodinové kultivaci však byly po prvních měřeních téměř totožné, a z tohoto důvodu byla optimalizace dále zaměřena jen na semena kultivovaná po dobu 48 hodin. Po zvolení ředící řady cDNA byla připravena reakční směs pro každý primer studovaného genu (Tabulka 11). Po promíchání a stočení připravených roztoků a naředěné cDNA byly vzorky dávány do 96ti jamkové destičky (Bio-Rad Laboratories, USA) tak, že do jedné jamky bylo přidáno 16 μl reakční směsi a 4 μl naředěné cDNA dle schématu uvedeného na obrázku 11. Každý vzorek byl na 96ti jamkovou destičku dáván v triplicátu kvůli zamezení chybovosti, kdy odchylka mezi C_t hodnotami v rámci triplicátu nemohla být vyšší než 0,5. Pro každý studovaný gen byly na 96ti jamkovou destičku nanášeny také negativní kontroly, do kterých byly místo vzorku cDNA přidávány 4 μl nuclease-free H_2O . Připravená destička byla přelepena průhlednou folií, stočena a umístěna do termocycleru real-time PCR (CFX96TM Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, USA) s předem nastaveným programem (Tabulka 12).

Tabulka 11: Reakční směs pro primery studovaných genů

	1 vzorek
SYBR Green (SensiFAST TM SYBR Lo-ROX Kit, Bioline, Velká Británie)	10 μl
Forward primer (<i>LeNCED1</i> , <i>SICYP707A3</i> , <i>Tip41Like</i>)	0,8 μl
Reverse primer (<i>LeNCED1</i> , <i>SICYP707A3</i> , <i>Tip41Like</i>)	0,8 μl
Nuclease-free H_2O	4,4 μl
	16 μl



Obrázek 11: Schéma nanesení vzorků na 96ti jamkovou destičku při optimalizaci primerů (na obrázku není znázorněna celá 96ti jamková destička; schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word).

Tabulka 12: Program real-time PCR pro optimalizaci primerů studovaných genů a studium exprese genů

teplota	čas	
95 °C	10 sekund	45 cyklů
95 °C	5 sekund	
60 °C	20 sekund	
75 °C	10 sekund	
95 °C	2 sekundy	

Po ukončení programu byly výsledky vyhodnoceny pomocí softwaru CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) a v programu Microsoft Office Excel byla vypočítána účinnost primerů studovaných genů, která by měla vycházet v rozmezí 95 - 105 %. Účinnost primerů byla kalkulována ze sklonu standardní křivky, která vyjadřuje vztah C_t hodnot ke vstupní koncentraci cDNA. Účinnost (E) byla vypočítána dle vztahu:

$$E [\%] = [(10^{(-1/\text{Slope})} - 1) \times 100], \text{ kde}$$

Slope = vypočítaná hodnota sklonu standardní křivky.

Po úspěšné optimalizaci primerů mohlo být přistoupeno k samotné expresi genů.

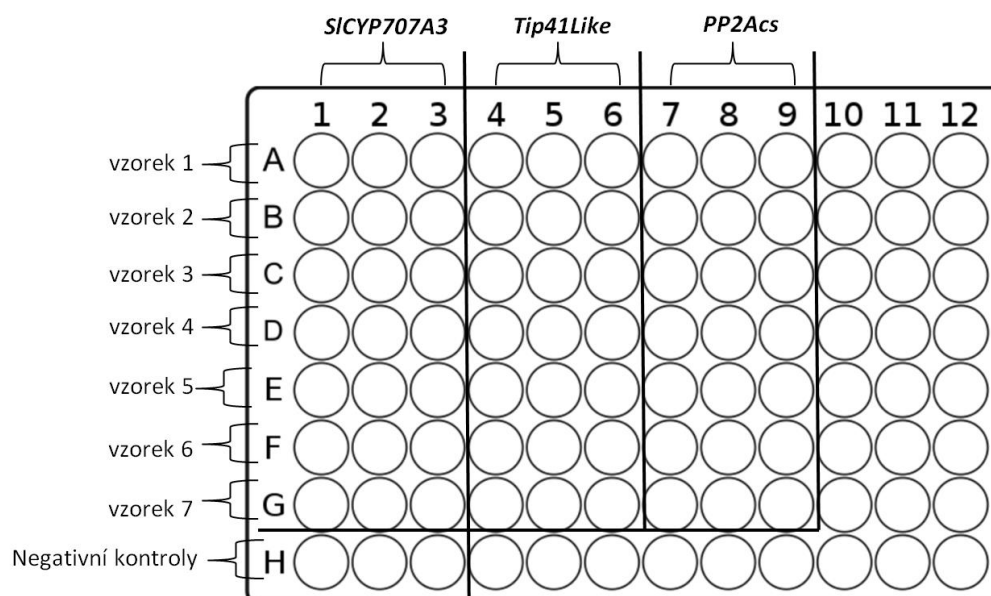
3.7.5 Exprese studovaných genů pomocí kvantitativní PCR

Ke studiu úrovně genové exprese byla použita metoda kvantitativní PCR (qPCR, real-time PCR). Kvůli několikrát neúspěšné optimalizaci primerů genu *LeNCED1* byla ve výsledku sledována pouze exprese zájmového genu *SICYP707A3* a dvou vybraných housekeeping (provozních) genů *Tip41Like* a *PP2CAcs*. Exprese genů byla analyzována u semen mutanta rajčete *7B-1* a cv. Rutgers, kultivovaných ve tmě a na modrém světle na MS médiu o koncentraci 0 a 50mM NaCl po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin. Veškerá práce se vzorky probíhala na ledu a samotná real-time PCR byla prováděna v termocyleru (CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection System, Bio-Rad Laboratories, USA) v 96ti jamkových destičkách (Bio-Rad Laboratories, USA).

Z ředící řady pro optimalizaci bylo zvoleno ředění vzorků nasyntetizované cDNA na $\frac{1}{4}$, které se ukázalo jako neoptimálnější pro všechny geny. Pro jednotlivé primery studovaných genů byla připravena reakční směs dle tabulky 13. Po promíchání a stočení připravených roztoků a naředěné cDNA bylo do jedné jamky 96ti jamkové destičky přidáno 16 μl reakční směsi a 4 μl naředěné cDNA dle schématu uvedeného na obrázku 12. Každý vzorek byl na 96ti jamkovou destičku opět dáván v triplikátu, kdy odchylka mezi C_t hodnotami v rámci triplikátu nemohla být vyšší než 0,5. Pro každý studovaný gen byly na 96ti jamkovou destičku nanесeny také negativní kontroly, do kterých byly místo vzorku cDNA přidány 4 μl nuclease-free H_2O . Připravená destička byla přelepena průhlednou folií, stočena v centrifuze a umístěna do termocycleru real-time PCR s nastaveným stejným programem jako u optimalizace primerů (Tabulka 12).

Tabulka 13: Reakční směs pro expresi studovaných genů

	1 vzorek
SYBR Green (SensiFAST™ SYBR Lo-ROX Kit, Bioline, Velká Británie)	10 μl
Forward primer (<i>SICYP707A3</i> , <i>Tip41Like</i> , <i>PP2Acs</i>)	0,8 μl
Reverse primer (<i>LeNCED1</i> , <i>SICYP707A3</i> , <i>PP2Acs</i>)	0,8 μl
Nuclease-free H_2O	4,4 μl
	16 μl



Obrázek 12: Schéma nanесení vzorků na 96ti jamkovou destičku při expresi genů (schéma vytvořeno v programu Microsoft Office Word).

Po ukončení programu byly pomocí softwaru CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) a programu Microsoft Office Excel vyhodnoceny výsledky. Relativní exprese (RE) genů byla vypočítána pomocí vztahu:

$$RE = [(1 + E_{\text{target gene}})^{\Delta C_{\text{t target gene}}}] / [(1 + E_{\text{normalizer}})^{\Delta C_{\text{t normalizer}}}], \text{ kde}$$

$E_{\text{target gene}}$ = hodnota účinnosti primerů cílového genu (genu zájmu),

$E_{\text{normalizer}}$ = hodnota účinnosti referenčního genu (housekeeping genu).

Pro výpočet $\Delta C_{\text{t target gene}}$ byl použitý vzorec:

$$\Delta C_{\text{t target gene}} = C_{\text{t GOI, S}} - C_{\text{t GOI, KAL}}, \text{ kde}$$

$C_{\text{t GOI, S}}$ = průměrná C_{t} hodnota cílového genu analyzovaného vzorku,

$C_{\text{t GOI, KAL}}$ = průměrná C_{t} hodnota cílového genu kalibrátoru (kontrola, vůči které byla provedena relativní kvantifikace genu).

Pro výpočet $\Delta C_{\text{t normalizer}}$ byl použitý vzorec:

$$\Delta C_{\text{t normalizer}} = C_{\text{t norm, S}} - C_{\text{t norm, KAL}}, \text{ kde}$$

$C_{\text{t norm, S}}$ = průměrná C_{t} hodnota housekeeping genu analyzovaného vzorku,

$C_{\text{t norm, KAL}}$ = průměrná C_{t} hodnota housekeeping genu kalibrátoru (kontrola, vůči které byla provedena relativní kvantifikace genu).

K porovnání výsledků relativní exprese genů a obsahu endogenní ABA byla vypočítána stimulace exprese genu (S) pomocí následujícího vzorce:

$$S [\%] = [(a - b) / a] \times (-1) \times 100, \text{ kde}$$

a = průměrná hodnota relativní exprese genu po 6 hodinách kultivace u cv. Rutgers nebo mutantu *7B-1* za zvolených analyzovaných podmínek (D/BL, 0mM/50mM koncentrace NaCl),

b = průměrná hodnota relativní exprese genu po 12, 24, 48 nebo 72 hodinách u cv. Rutgers nebo mutantu *7B-1* za zvolených analyzovaných podmínek (D/BL, 0mM/50mM koncentrace NaCl).

Statistická analýza zde nemohla být vypočítána, jelikož byl proveden pouze jeden experiment.

4 VÝSLEDKY

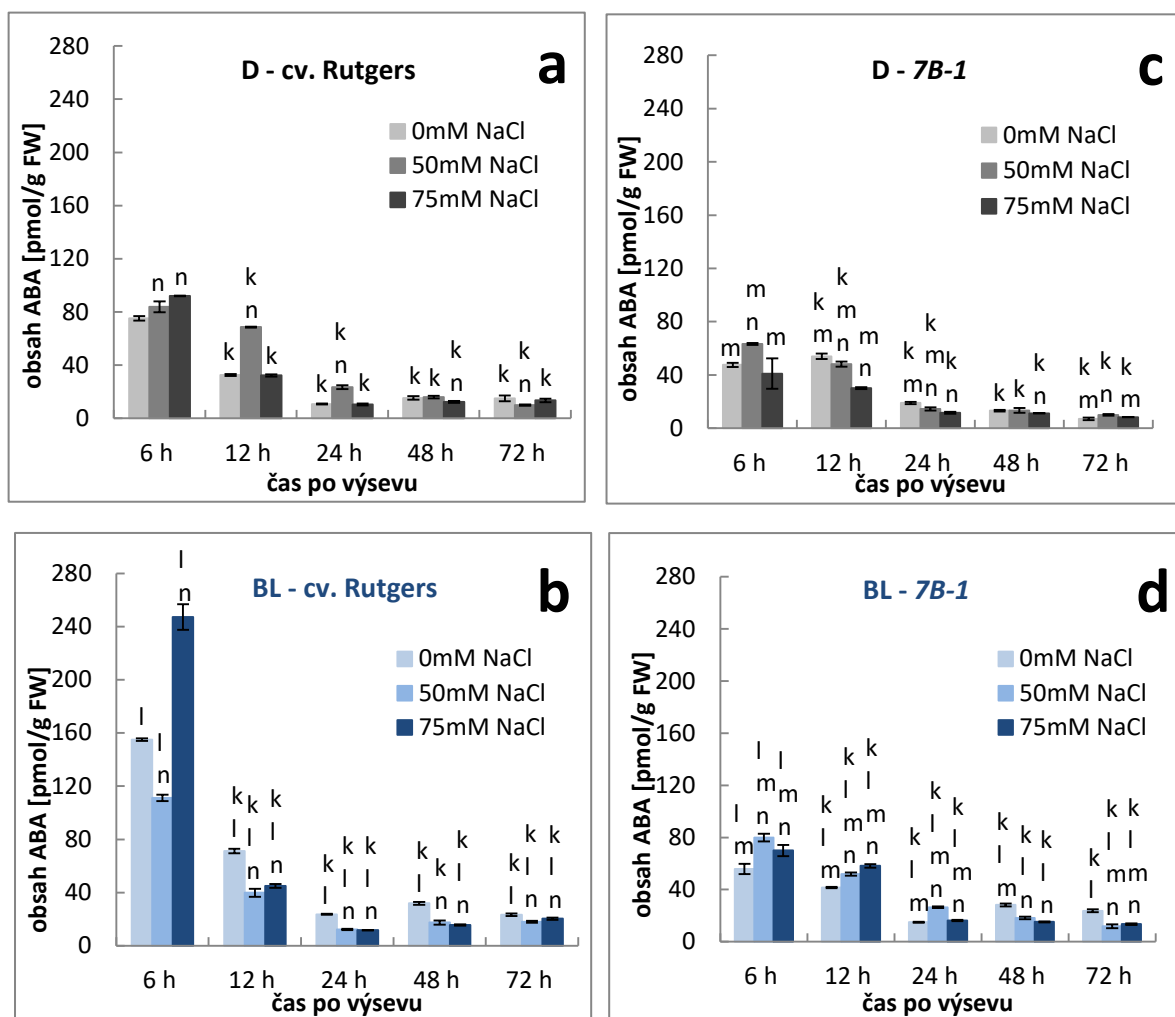
Cílem této diplomové práce bylo zkoumání interakce modrého světla a kyseliny abscisové (ABA) během klíčení semen modelové rostliny *Solanum lycopersicum* L., která jsou vystavena stresu zasolením. Ke stanovení tohoto cíle byly provedeny experimenty zabývající se analýzou hladiny endogenní ABA a následnou relativní kvantifikací genů zapojených v metabolismu ABA v semenech rajčete kultivovaných za podmínek solného stresu.

4.1 Analýza endogenní kyseliny abscisové

K analýze endogenní kyseliny abscisové (ABA) byla použita semena rajčete mutanta *7B-1* a k němu odpovídajícího kultivaru cv. Rutgers. Semena byla kultivována ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu s vybranými koncentracemi NaCl (0, 50 a 75 mmol/l). Celkem byly připraveny 2 biologické replikáty, kdy z každého vzorku byly připraveny tři technické replikáty. Výsledky těchto dvou analyzovaných biologických replikátů vyšly částečně odlišně, a proto je z tohoto důvodu nebylo možné zprůměrovat. Na základě teoretických znalostí uvedených v diskuzi a dříve provedených experimentů Šimurové et al., 2018, se v této práci přikláníme k hodnotám naměřeným v první řadě analýzy ABA (řada I), jelikož v druhé analyzované řadě vzorků (řada II) byly u některých vzorků naměřeny výrazné odchylky. Z časových důvodů nebyl proveden třetí ověřující experiment pro stanovení endogenní ABA. Výsledky druhé řady analýzy endogenní ABA jsou uvedeny v příloze této diplomové práce.

4.1.1 Porovnání množství ABA v semenech kultivovaných na médiu s koncentracemi NaCl 0, 50 a 75 mmol/l

Z výsledků měření vyplývá, že hladina endogenní ABA v semenech dosahuje u obou genotypů nejvyšších hodnot v čase 6 hodin a s časem inkubace se obsah ABA snižuje, a to jak ve tmě (D), tak i na modrém světle (BL) při všech zvolených koncentracích NaCl (Obrázek 13). U semen cv. Rutgers byl při inkubaci v D i na BL sledován signifikantní pokles hladiny ABA již ve 12 hodinách po výsevu (Obrázek 13a, 13b) s výjimkou naměřené hodnoty v D při 50mM koncentraci NaCl, kde nastal výrazný pokles hladiny ABA až po 24 hodinách (Obrázek 13a). Z analýzy také vyplývá, že BL u cv. Rutgers zvyšuje akumulaci ABA v semenech, kdy nejvyšší rozdíl byl naměřen v čase 6 hodin (Obrázek 13b versus 13a). U semen mutanta *7B-1* byl obsah endogenní ABA v porovnání se cv. Rutgers v čase 6 hodin nižší a s narůstajícím časem se ve srovnání s cv. Rutgers hladina ABA měnila pomaleji, a to jak v D, tak i na BL (Obrázek 13). U mutanta *7B-1* byl v porovnání s cv. Rutgers sledován méně výrazný vliv BL na hladinu endogenní ABA (Obrázek 13d versus 13c). Výrazný vliv NaCl na obsah endogenní ABA se projevil především při koncentraci NaCl 75 mmol/l u cv. Rutgers na BL po 6 hodinách, kde došlo k signifikantnímu nárůstu hladiny ABA (Obrázek 13b).



Obrázek 13: Obsah ABA v semenech cv. Rutgers (WT) kultivovaných ve tmě (D; **a**) a na modrém světle (BL; **b**) a v semenech mutanta *7B-1* kultivovaných ve tmě (D; **c**) a na modrém světle (BL; **d**). Semena byla kultivována po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu s koncentracemi NaCl 0, 50 a 75 mmol/l. Zobrazená data představují průměrnou hodnotu obsahu ABA ± SD vypočítanou z hodnot ABA 3 technických replikátů v rámci jednoho provedeního experimentu. Písmena k, l, m, n označují statistické rozdíly mezi naměřenými hodnotami obsahu ABA ($P \leq 0,05$; Student's T-test):

k = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (6 hod) v rámci stejné koncentrace a stejného genotypu,

l = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (D) v rámci stejného genotypu, stejného času kultivace a stejné koncentrace,

m = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (cv. Rutgers) v rámci stejného času kultivace, stejné koncentrace a stejné světelné podmínky,

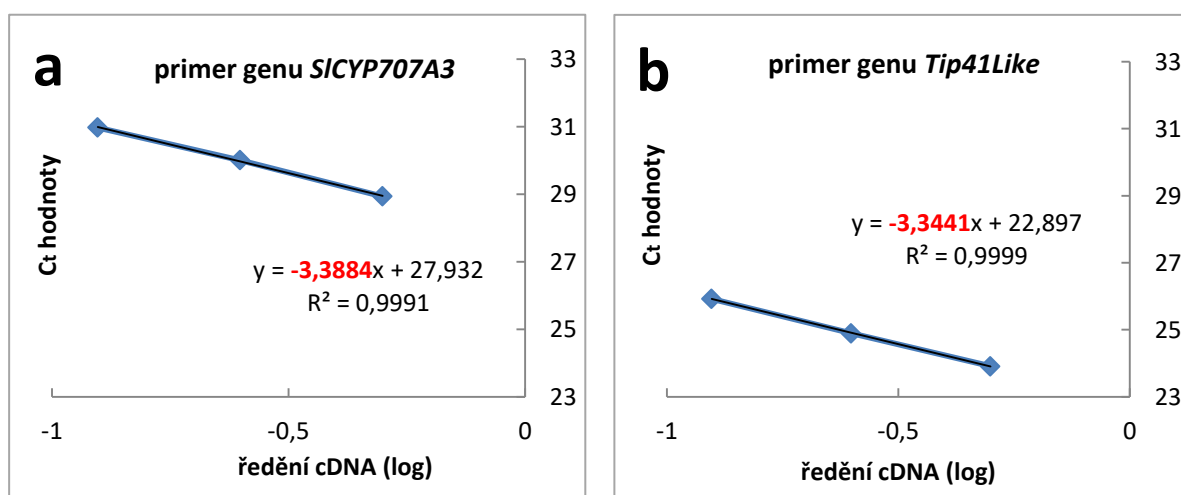
n = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (0mmol/l NaCl) v rámci stejného času kultivace, stejného genotypu a stejné světelné podmínky.

4.2 Analýza exprese genů zapojených v metabolismu kyseliny abscisové

K analýze exprese zkoumaných genů byla použita semena mutanta rajčete *7B-1* a kultivaru cv. Rutgers. Semena byla kultivována ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu s koncentracemi NaCl 0 a 50 mmol/l. Semena inkubována na médiu s 75mM koncentrací NaCl musela být vyřazena, jelikož se z těchto semen nepodařilo izolovat dostatečně vysokou koncentraci RNA. Původním plánem této diplomové práce bylo studium genu zapojeného v biosyntetické dráze ABA (*LeNCED1*) a genu zapojeného do katabolismu ABA (*SICYP707A3*). Ve výsledku byla však studována pouze exprese genu *SICYP707A3* a dvou zvolených housekeeping genů (*Tip41Like* a *PP2Acs*), jelikož se primery genu *LeNCED1* nepodařilo optimalizovat. Z důvodu pouze jednoho provedeného experimentu nebylo možné v rámci analýzy exprese genu provést statistickou analýzu.

4.2.1 Optimalizace primerů

V rámci této diplomové práce byly optimalizovány primery tří genů - *LeNCED1*, *SICYP707A3* a *Tip41Like*. Optimalizace primerů byla provedena dle postupu uvedeného v podkapitole 3.7.4 (Příprava a optimalizace primerů) se vzorky cDNA syntetizované ze semen rajčete cv. Rutgers, která byla kultivována ve tmě na základním MS médiu po dobu 48 hodin. Úspěšně se podařilo optimalizovat primer *SICYP707A3* s účinností 97,3 % a primer *Tip41Like* s účinností 99,1 %. Na obrázku 14 jsou znázorněny standardní křivky primerů genu *SICYP707A3* a *Tip41Like*, ze kterých byla dle vzorce uvedeného v podkapitole 3.7.4 vypočítána účinnost primerů. Účinnost primerů byla nakonec počítána pouze z C_t hodnot získaných při ředění cDNA na $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{8}$, jelikož při nejvyšším ředění na $\frac{1}{16}$ byly naměřeny vždy vychylující se hodnoty. Primer genu *LeNCED1* se však nepodařilo optimalizovat a z dalších analýz musel být proto vyřazen.



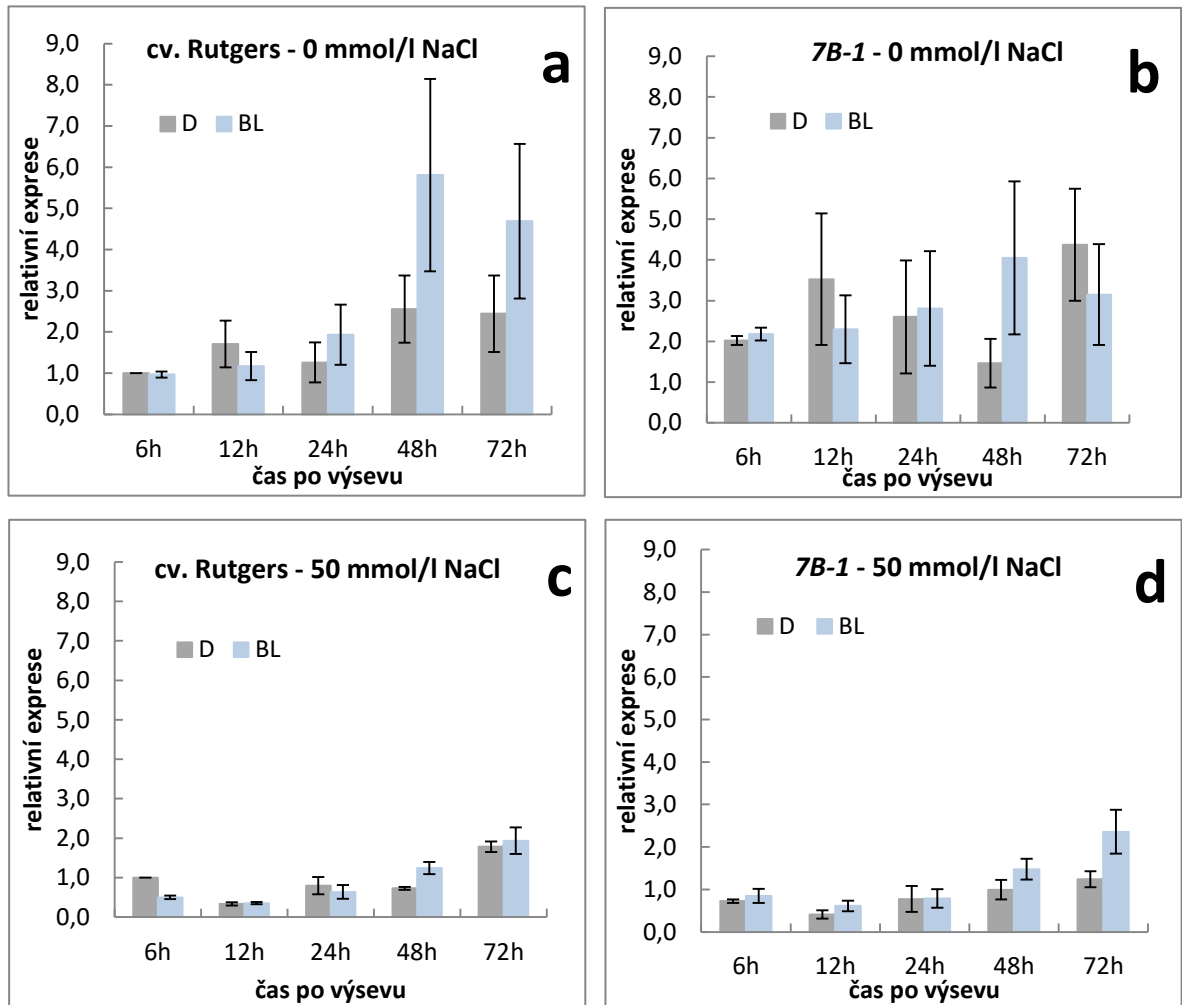
Obrázek 14: Závislost C_t hodnoty vzhledem na vstupní koncentraci cDNA s červeně vyznačeným sklonem standardní křivky pro primery genu *SICYP707A3* (a) a genu *Tip41Like* (b). Na ose x jsou zaznamenány zlogaritmované hodnoty zvoleného ředění.

Nezdařilá optimalizace primeru genu *LeNCEDI* je připisována problému na straně vzorku, jelikož daný navržený primer byl již úspěšně použit v dříve publikované práci (Humplík et al., 2015). Při optimalizaci primerů genu *LeNCEDI* vycházely příliš vysoké C_t hodnoty a odchylky C_t hodnot v rámci triplikátu byly častokrát vyšší než 0,5. Pro studium chování daného primeru za různých kultivačních podmínek byla provedena zkušební exprese genu *LeNCEDI* se semeny cv. Rutgers kultivovaných ve tmě a na modrém světle po dobu 6, 24 a 48 hodin na MS médiu s 0 a 50mM koncentrací NaCl. V rámci tohoto experimentu byly opět naměřeny vysoké C_t hodnoty a odchylky C_t hodnot v rámci triplikátu byly vždy vyšší než 0,5. Tento stav mohl být způsoben nedostatečným přečištěním vzorků, což zapříčinilo získání nízké koncentrace vstupní cDNA pro daný gen biosyntetické dráhy ABA.

4.2.2 Exprese genu *SICYP707A3* v semenech kultivovaných na médiu s koncentracemi NaCl 0 a 50 mmol/l

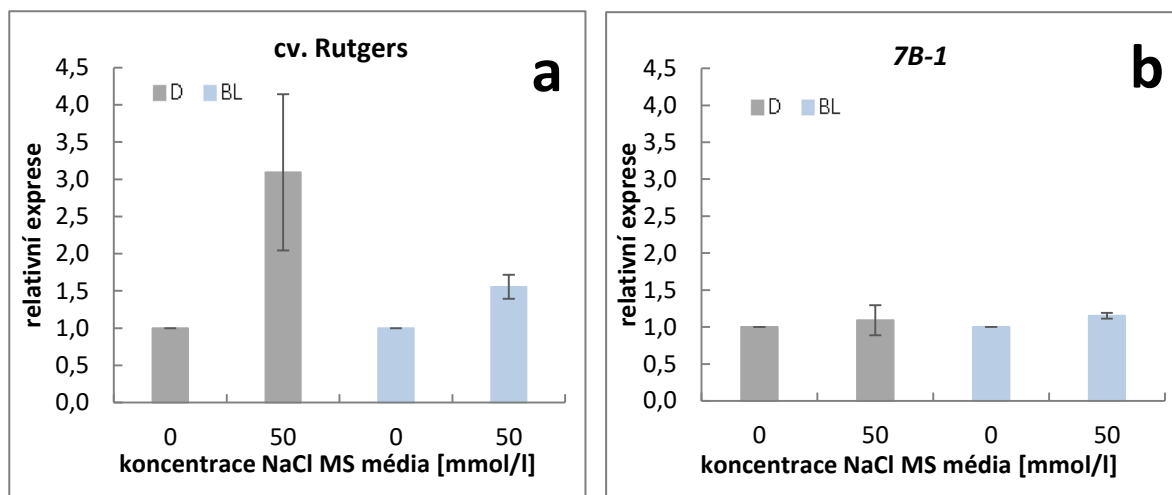
Při kultivaci semen na základním MS médiu (0 mmol/l NaCl) byla exprese genu *SICYP707A3* u cv. Rutgers nejnižší po 6 hodinách kultivace a s časem se zvyšovala, přičemž nejvyšší exprese byla naměřena v čase 48 hodin, a to jak ve tmě (D), tak i na modrém světle (BL) (Obrázek 15a). Na tomto obrázku je možné také pozorovat nápadně zvýšenou expresi genu při kultivaci na BL v časech 48 a 72 hodin. U mutanta *7B-1* vycházela exprese genu v D asymetricky, kdy v časech 24 a 48 hodin byly naměřeny nižší hodnoty (Obrázek 15b). Při kultivaci na BL se hodnoty exprese genu s časem postupně zvyšovaly, kdy však nejvyšší exprese byla naměřena v čase 48 hodin. Vliv BL na expresi genu u mutanta *7B-1* není jednoznačný. Na základě porovnání obrázků 15a a 15b můžeme říci, že u mutanta *7B-1* byla exprese genu oproti cv. Rutgers v čase 6 hodin vyšší a s časem se měnila mírně, zatímco u cv. Rutgers byla exprese genu zpočátku nižší, ale její růst byl prudší, a to v D i na BL. Vypočítané výrazné odchylky znázorňují rozdíl exprese genu mezi hodnotami vztaženými k housekeeping genu *Tip41Like* a *PP2Acs*, trend hodnot byl však pro jednotlivé housekeeping geny shodný.

Na obrázcích 15c a 15d lze vidět průběh exprese genu *SICYP707A3* při kultivaci na médiu obsahujícím 50 mmol/l NaCl. U obou genotypů se exprese genu s časem měnila mírně, přičemž výrazně vyšší hodnoty byly naměřeny v D i na BL až po 72 hodinách kultivace. Hodnoty exprese genu u obou genotypů dosahovaly podobných hodnot. Výraznější vliv BL na expresi katabolického genu byl pozorován pouze u mutanta *7B-1* v čase 72 hodin, kde BL expresi genu stimulovalo (Obrázek 15d).



Obrázek 15: Intenzita exprese genu *SICYP707A3* v semenech cv. Rutgers (WT; **a**, **c**) a mutantu *7B-1* (**b**, **d**) kultivovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin při na MS médiu v koncentraci 0 mmol/l NaCl (**a**, **b**) a 50 mmol/l NaCl (**c**, **d**). Zobrazená data představují průměrnou hodnotu relativní exprese genu *SICYP707A3* \pm SD vztaženou k housekeeping genům *Tip41Like* a *PP2Acs* v rámci jednoho provedeního experimentu. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi genu *SICYP707A3* v semenech cv. Rutgers kultivovaných v D po dobu 6 hodin na MS médiu v koncentraci NaCl 0 mmol/l (**a**, **b**) nebo 50 mmol/l (**c**, **d**). Z důvodu pouze jednoho provedeního experimentu nebylo možné provést statistickou analýzu.

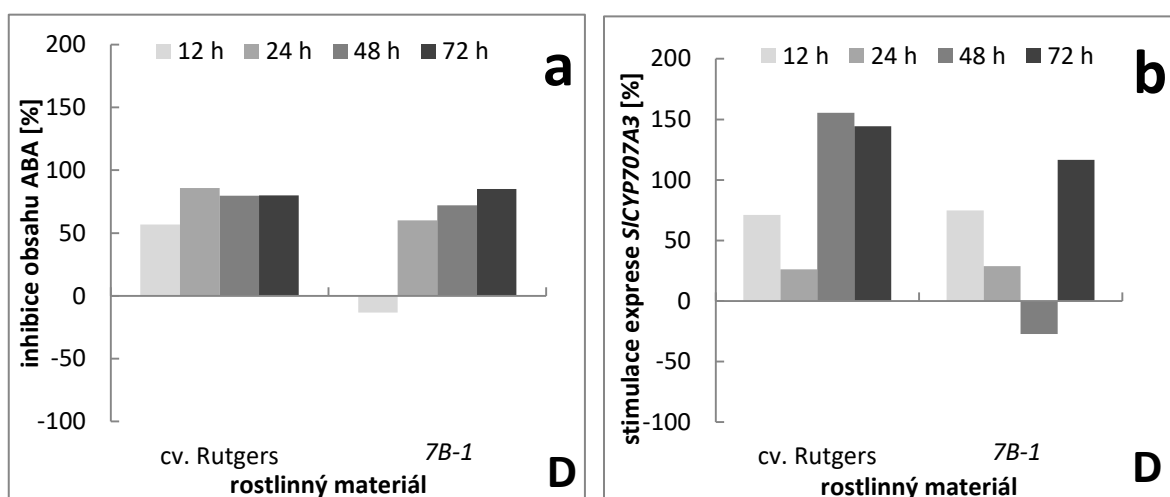
Na obrázku 16 lze pozorovat vliv NaCl v 50mM koncentraci na expresi genu *SICYP707A3* v rámci genotypů kultivovaných ve tmě (D) nebo na modrém světle (BL) po dobu 6 hodin. U semen cv. Rutgers byla sledována zvýšená exprese genu při 50mM koncentraci NaCl v D i na BL, přičemž výrazný rozdíl byl naměřen při kultivaci semen v D (Obrázek 16a). Je však nutno poukázat na přítomnost výrazné směrodatné odchylky naměřené v rámci hodnot vztažených k housekeeping genu *Tip41Like* nebo *PP2Acs*, a proto je z tohoto důvodu potřeba brát tento rozdíl s rezervou. U mutanta *7B-1* se hodnoty relativní exprese genu nelišily v závislosti na koncentraci MS média (Obrázek 16b).



Obrázek 16: Intenzita exprese genu *SICYP707A3* v semenech cv. Rutgers (WT; **a**) a mutanta *7B-1* (**b**) kultivovaných ve tmě (D) a na modrém světle (BL) po dobu 6 hodin na MS médiu bez NaCl nebo obsahujícím NaCl v koncentraci 50 mmol/l. Zobrazená data představují průměrnou hodnotu relativní exprese genu *SICYP707A3* \pm SD vztaženou k housekeeping genům *Tip41Like* a *PP2Acs* v rámci jednoho provedeného experimentu. Relativní kvantifikace byla provedena vůči expresi genu *SICYP707A3* v semenech cv. Rutgers (**a**) nebo mutanta *7B-1* (**b**) kultivovaných v D nebo BL po dobu 6 hodin na MS médiu bez NaCl. Z důvodu provedeného pouze jednoho experimentu nebylo možné provést statistickou analýzu.

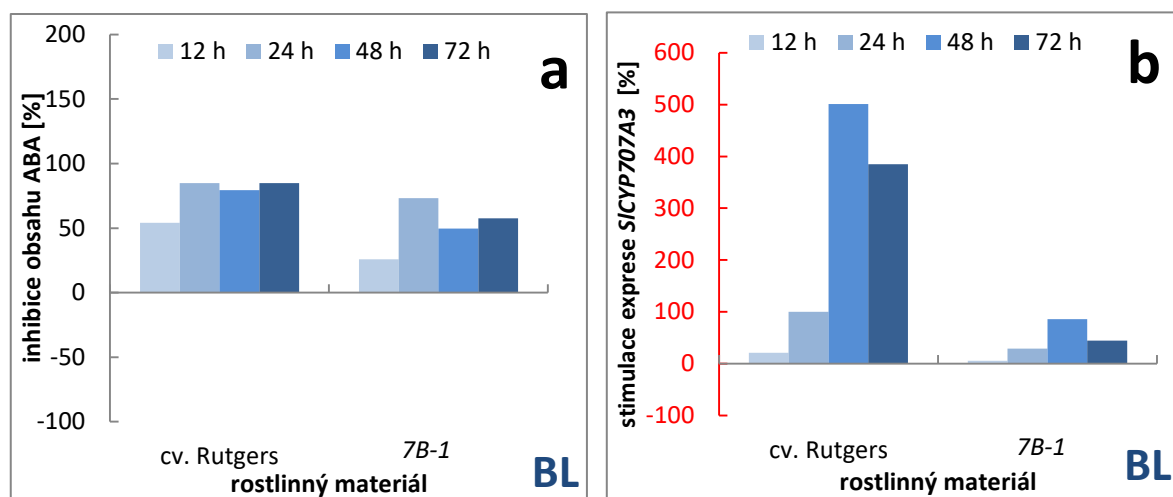
4.3 Porovnání množství ABA a exprese genu *SICYP707A3* v semenech vysévaných na MS médiu bez NaCl

Redukce (inhibice) obsahu ABA u semen kultivovaných ve tmě (D) na základním MS médiu byla během prvních 24 hodin inkubace rychlejší u semen cv. Rutgers než u mutanta *7B-1* (Obrázek 17a). U cv. Rutgers byla naměřena nejvyšší inhibice obsahu ABA po 24 hodinách od výsevu, zatímco v čase 48 a 72 hodin byla inhibice v porovnání s 24 hodinami jen velice mírně nižší. U mutanta *7B-1* byl sledován postupný nárůst inhibice obsahu ABA s pozdějšími časy kultivace. Významný rozdíl stimulace exprese genu mezi cv. Rutgers a mutantem *7B-1* byl naměřen v čase 48 hodin, kde u cv. Rutgers byla sledována stimulace, zatímco u mutanta *7B-1* inhibice exprese genu při porovnání s 6 hodinami (Obrázek 17b). U mutanta *7B-1* byla naměřena nejvyšší stimulace exprese genu v čase 72 hodin. U cv. Rutgers byla však stimulace v čase 48 hodin v porovnání se 72 hodinami mírně vyšší.



Obrázek 17: Inhibice obsahu ABA (a) a stimulace exprese genu *SICYP707A3* (b) v semenech cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* kultivovaných ve tmě (D) po dobu 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu bez NaCl. Výpočet inhibice a exprese byl vždy vztažen k hodnotě naměřené u cv. Rutgers nebo mutanta *7B-1* po 6 hodinové kultivaci v D. Zobrazená data představují hodnoty z jednoho provedeného experimentu.

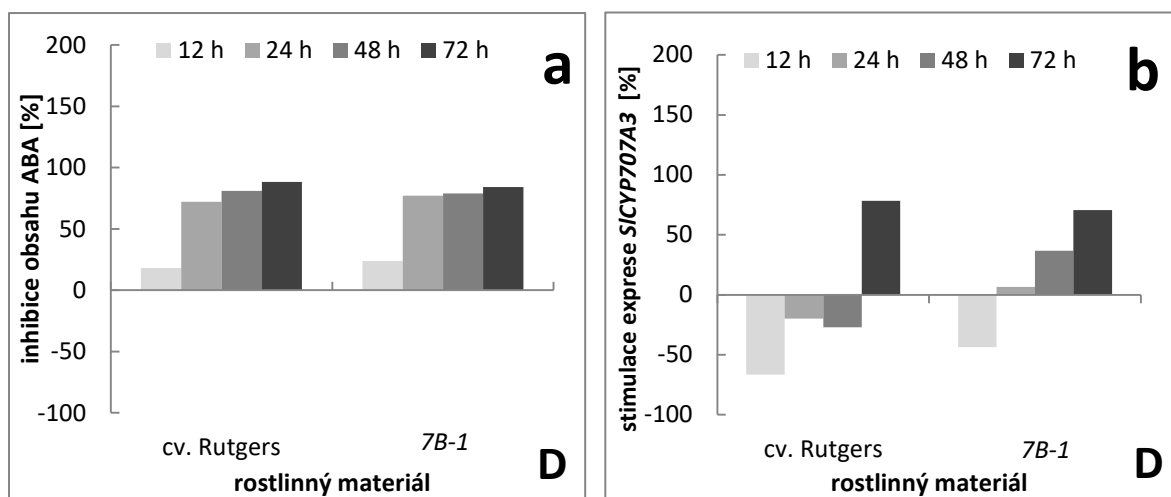
Na obrázku 18a lze pozorovat, že inhibice obsahu ABA u semen kultivovaných na modrém světle (BL) na základním MS médiu byla vyšší u cv. Rutgers v porovnání s mutantem *7B-1*. Rozdíl inhibice mezi cv. Rutgers a mutantem *7B-1* byl naměřen ve všech časech kultivace. Expresi genu při kultivaci na BL byla u obou genotypů stimulována s narůstajícím časem, přičemž nejvyšší hodnota byla naměřena v čase 48 hodin (Obrázek 18b). Z obrázku je možné také vysledovat, že BL signifikantně stimulovalo expresi genu u semen cv. Rutgers v porovnání s mutantem *7B-1*.



Obrázek 18: Inhibice obsahu ABA (a) a stimulační exprese genu *SICYP707A3* (b) v semenech cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* kultivovaných na modrém světle (BL) po dobu 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu bez NaCl. Výpočet inhibice a exprese byl vždy vztažen k hodnotě naměřené u cv. Rutgers nebo mutantu *7B-1* po 6 hodinové kultivaci na BL. Zobrazená data představují hodnoty z jednoho provedeního experimentu. Na obrázku 18b je červeně znázorněna odlišná stupnice v grafu na ose y.

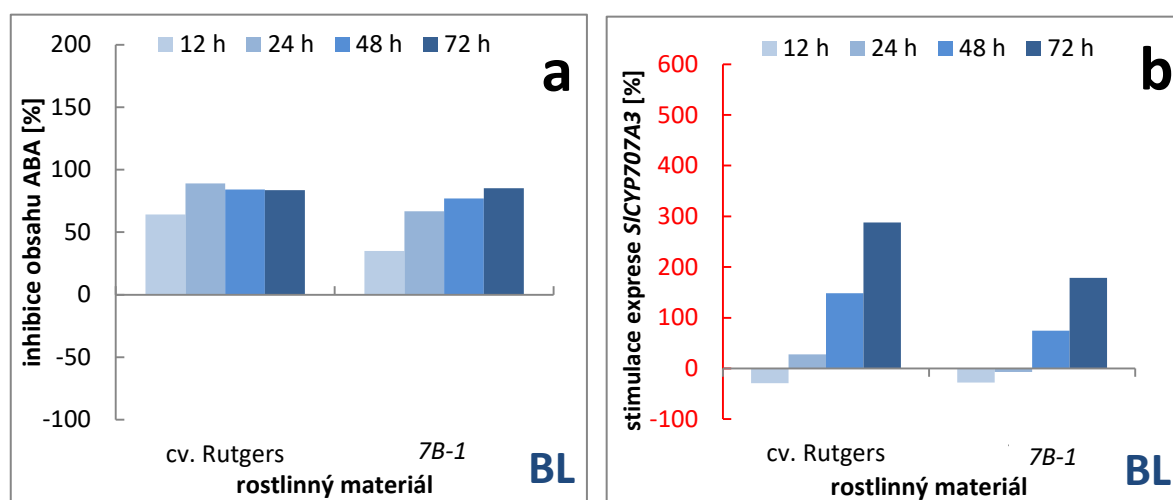
4.4 Porovnání množství ABA a exprese genu *SICYP707A3* v semenech vysévaných na MS médium obsahujícím NaCl v koncentraci 50 mmol/l

Inhibice obsahu ABA u semen kultivovaných ve tmě (D) při koncentraci 50 mmol/l NaCl v médiu byla v jednotlivých časech inkubace u mutanta *7B-1* a cv. Rutgers velmi podobná (Obrázek 19a). U obou genotypů lze pozorovat rychlý nárůst inhibice obsahu ABA po 24 hodinách kultivace. Nejvyšší inhibice hladiny ABA byla u cv. Rutgers i mutanta *7B-1* naměřena při sklizni po 72 hodinách. Ve stejném čase (72 hodin) byla také dosažena nejvyšší hodnota stimulace exprese genu u obou genotypů (Obrázek 19b). V ostatních časech kultivace (12, 24, 48 hodin) byla u cv. Rutgers pozorována inhibice exprese genu v porovnání s 6 hodinami. U mutanta *7B-1* byla inhibice exprese genu naměřena pouze v čase 12 hodin, zatímco v časech 24, 48, 72 hodin byla již sledována menší či větší stimulace exprese genu.



Obrázek 19: Inhibice obsahu ABA (a) a stimulace exprese genu *SICYP707A3* (b) v semenech cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* kultivovaných ve tmě (D) po dobu 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu obsahujícím NaCl v koncentraci 50 mmol/l NaCl. Výpočet inhibice a exprese byl vždy vztažen k hodnotě naměřené u cv. Rutgers nebo mutanta *7B-1* po 6 hodinové kultivaci v D. Zobrazená data představují hodnoty z jednoho provedeního experimentu.

Na obrázku 20a je možné pozorovat, že snížení obsahu ABA u semen kultivovaných na modrém světle (BL) při 50mM koncentraci NaCl byla během prvních 24 hodin inkubace vyšší u cv. Rutgers než u mutanta *7B-1*. U semen cv. Rutgers byla nejnižší hodnota inhibice koncentrace ABA naměřena po 12 hodinách, zatímco v dalších časech dosahovala inhibice podobných hodnot. U mutanta *7B-1* docházelo k postupnému zvyšování inhibice ABA s pozdějšími časy kultivace. Při kultivaci semen na BL byla sledována u obou genotypů postupně zvyšující se exprese genu s pozdějšími časy kultivace, kdy vyšší hodnoty byly naměřeny u cv. Rutgers v porovnání s mutantem *7B-1* (Obrázek 20b).



Obrázek 20: Inhibice obsahu ABA (a) a stimulace exprese genu *SICYP707A3* (b) v semenech cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* kultivovaných na modrém světle (BL) po dobu 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu obsahujícím NaCl v koncentraci 50 mmol/l. Výpočet inhibice a exprese byl vždy vztažen k hodnotě naměřené u cv. Rutgers nebo mutanta *7B-1* po 6 hodinové kultivaci na BL. Zobrazená data představují hodnoty z jednoho provedení experimentu. Na obrázku 20b je červeně znázorněna odlišná stupnice v grafu na ose y.

5 DISKUZE

Kyselina abscisová (ABA) a světlo zastávají klíčovou roli v řadě vývojových a fyziologických procesů u rostlin, kdy za účelem doladění těchto funkcí dochází k vzájemné interakci světla se signální dráhou ABA (Yadukrishnan and Datta, 2020). Konkrétním zaměřením této diplomové práce bylo studium interakce modrého světla (BL) a ABA během fáze klíčení semen rajčete, které byly vystaveny stresu zasolením. V předešlých výzkumech bylo zjištěno, že BL redukuje klíčení semen rajčete a zvyšuje citlivost těchto semen na osmotický stres (Fellner and Sawhney, 2002; Piterková et al., 2012). Kyselina abscisová působí na klíčení semen také inhibičně, kdy v případě nepříznivých podmínek se její koncentrace zvyšuje, což stimuluje účinky tolerance vůči stresu (Ng et al., 2014). Bylo také zjištěno, že při regulaci klíčení semen působením světla dochází k výrazným změnám v biosyntetické a signalizační dráze ABA (Wit et al., 2016).

Cílem experimentální části této diplomové práce bylo zjistit, jakými mechanismy inhibuje BL klíčení semen rajčete, zda je v těchto mechanismech zapojena ABA a určení toho, jak se mění koncentrace endogenní ABA v semenech rajčete během klíčení vlivem zasolení. Pro řešení daných cílů byl použit analytický přístup stanovující hladinu endogenní ABA v různých časech během fáze klíčení u semen rajčete *Solanum lycopersicum* L., konkrétně u mutanta *7B-1*, který je odvozený od kultivaru Rutgers (cv. Rutgers). Pro zjištění změny exprese genů zapojených v metabolismu ABA byla v druhé části této práce provedena analýza genu *SICYP707A3*, který je součástí katabolické dráhy ABA.

První otázkou, které byla v této práci věnována pozornost, bylo sledování změny hladiny ABA během fáze klíčení semen rajčete. Kyselina abscisová je považována za jeden z hlavních fytohormonů, který potlačuje klíčení semen a navozuje dormanci. Během časně embryogeneze semen jsou hladiny ABA nízké, zatímco v průběhu fáze zrání, při kterém si semena syntetizují zásoby, dochází k silnému nárůstu biosyntézy ABA. Aby však semena mohla vyklíčit, musí samotnému klíčení semen předcházet dramatický pokles ABA v důsledku inhibice biosyntézy a aktivace katabolismu ABA (Nambara and Marion-Poll, 2005). Tento fakt byl potvrzen výsledky naměřenými v této práci. Bylo zjištěno, že hladina endogenní ABA vykazovala u obou genotypů nejvyšších hodnot v prvním analyzovaném bodě (6 hodin po vysetí) a s časem inkubace se obsah ABA v semenech snižoval. Tento trend byl sledován jak ve tmě (D), tak i na modrém světle (BL) při všech zvolených koncentracích NaCl. Naměřená data tak potvrzují informace uvedené i v jiných publikacích, například ve výzkumné práci Humplík et al., 2015, která se však zabývala sledováním úrovně hladiny ABA u semen kultivaru cv. Rutgers pouze ve tmě na základním MS médiu. I v této práci byla naměřena nejvyšší hladina ABA po 6 hodinách od výsevu a poté následoval prudký pokles ABA až do momentu vyklíčení (72 hodin po výsevu). Změny množství ABA v semenech během klíčení za podmínek kultivace pod BL nebyly doposud publikovány.

Nicméně naměřená data provedených experimentů naznačují, že i za působení BL, stejně jako ve tmě, dochází se vzrůstajícím časem k poklesu ABA během klíčení semen.

Zajímavým zjištěním, které bylo v rámci měření hladiny endogenní ABA v semenech učiněno, byl fakt, že mutant *7B-1*, kterému se připisuje schopnost produkce nadbytku ABA, obsahoval po 6 hodinové kultivaci na všech zvolených koncentracích NaCl, a to jak ve tmě, tak i na BL, nižší množství endogenní ABA v porovnání s cv. Rutgers. Tento jev podporuje tvrzení, že mutant *7B-1* obsahuje vyšší hladinu ABA v hypokotylech (Fellner et al., 2001), zatímco v jeho semenech je obsah endogenní ABA podstatně nižší než u semen cv. Rutgers (Šimurová et al., 2018). U semen cv. Rutgers a mutantu *7B-1* byl rovněž sledován rozdílný trend v poklesu koncentrace endogenní ABA, a to výrazněji bez přítomnosti NaCl v médiu. Zatímco u semen mutantu *7B-1* se s narůstajícím časem měnil průběh endogenní ABA pomaleji, u semen cv. Rutgers byl sledován signifikantní pokles hladiny ABA již ve 12 hodinách po výsevu, popřípadě po 24 hodinách. Tento rozdíl byl zjevný z toho důvodu, že semena cv. Rutgers v době 6 hodin po výsevu obsahovala výrazně vyšší hladinu ABA než semena *7B-1*.

Pro bližší pochopení mechanismů změny hladiny endogenní ABA v semenech rajčete byla v rámci druhé části této diplomové práce analyzována exprese genu katabolické dráhy ABA – gen *SICYP707A3*. U obou zkoumaných genotypů bylo možné sledovat, že hodnoty exprese genu dosahovaly nižších hodnot v prvním analyzovaném bodě (6 hodin po výsevu) a s narůstajícím časem se tyto hodnoty zvyšovaly, a to jak ve tmě, tak i na BL. Výsledky tak odpovídají naměřeným koncentracím endogenní ABA, kde byl pozorován opačný trend průběhu naměřených hodnot. Z výše uvedeného vyplývá, že v odbourávání endogenní ABA během fáze klíčení semen rajčete zastává významnou roli katabolický gen *SICYP707A3*. V případě semen cv. Rutgers a mutantu *7B-1* kultivovaných na BL na médiu bez NaCl byla však naměřena nejvyšší hodnota exprese genu *SICYP707A3* již v čase 48 hodin po výsevu. Při porovnání inhibice obsahu endogenní ABA a stimulace exprese genu *SICYP707A3* nebyl u naměřených hodnot sledován vzájemný vztah. Bylo zde ale možné vyzorovat, že s narůstajícím časem dochází k postupnému zvyšování inhibice obsahu endogenní ABA, tak i stimulace exprese genu *SICYP707A3*. Je však třeba zdůraznit, že standartní odchylky naměřených hodnot jsou relativně vysoké, především u hodnot při 48 a 72 hodinách.

Druhým sledovaným faktorem bylo určení vlivu modrého světla (BL) na hladinu endogenní ABA během klíčení semen rajčete. Semena rajčete klíčí nejlépe ve tmě, zatímco BL klíčení semen rajčete snižuje (Piterková et al., 2012). Bylo také zjištěno, že BL zvyšuje citlivost semen k inhibičnímu efektu ABA během klíčení, a to buď kvůli jeho vysokoenergetické vlnové délce, nebo prostřednictvím kryptochromových či fototropinových signálních drah, jelikož mutanti v této signalizaci ukazují vyšší toleranci k inhibici klíčení indukované BL (Fellner et al., 2018). U semen cv. Rutgers byl sledován stimulační efekt BL na koncentraci endogenní ABA, kdy nejvyšší rozdíl byl naměřen v čase 6 hodin po výsevu. Toto zjištění potvrzuje výsledky nedávno prováděné

analýzy ABA, ve které bylo ukázáno, že působením BL dochází během klíčení semen rajčete k pomalejší degradaci ABA než ve tmě (Šimurová et al., 2018). U mutantu *7B-1* však výrazný vliv BL na hladinu endogenní ABA v porovnání se cv. Rutgers zjištěn nebyl. To může být vysvětleno tím, že mutant *7B-1* má defekt v signální dráze BL a na rozdíl od cv. Rutgers vykazuje vyšší toleranci klíčení semen k inhibici vyvolané působením BL (Fellner and Sawhney, 2002). Další příčinou menšího vlivu BL na hladinu endogenní ABA u mutantu *7B-1* by mohla být snížená exprese ABA receptorů. Tato myšlenka vychází z výzkumné práce Šimurová et al., 2018, kdy u mutantu *7B-1* byla v porovnání s cv. Rutgers naměřena během prvních 6 hodin inkubace pod BL signifikantně snížená exprese receptoru PYL3. Tato skutečnost by mohla taktéž přispívat k vyšší toleranci klíčení semen *7B-1* k inhibičnímu účinku BL (Šimurová et al., 2018).

Dalším cílem této práce bylo sledování změny koncentrace endogenní ABA v semenech rajčete během klíčení v závislosti na úrovni zasolení (NaCl). Předpokládalo se, že kultivace semen na médiích o vyšších koncentracích NaCl způsobí zvýšenou akumulaci endogenní ABA v semenech. Tento předpoklad vycházel z teoretických znalostí týkajících se ABA a z dříve provedených experimentů analyzujících klíčivost semen rajčete na MS médiu o zvolených koncentracích NaCl (50 a 75 mmol/l). Kyselina abscisová je hlavním stresovým hormonem, jehož koncentrace se zvyšuje v případě nepříznivých podmínek. Tím ABA navozuje u semen dormanci a zajišťuje toleranci rostlin vůči stresu (Ng et al., 2014). K zablokování klíčení u dormantních semen dochází obvykle prostřednictvím hromadění vysokých hladin ABA při imbibici, tj. během prvních 48 hodin (Ali-Rachedi et al., 2004). Při analýze klíčivosti semen rajčete bylo také zjištěno, že se zvyšující se koncentrací NaCl dochází k postupnému snižování klíčivosti semen (Fellner and Sawhney, 2001). Dle výsledků naměřených v této práci byl u semen cv. Rutgers kultivovaných ve tmě zjištěn určitý nárůst hladiny ABA po 6 hod kultivace při obou aplikovaných koncentracích NaCl. Výrazný vliv NaCl na změnu obsahu endogenní ABA byl pak zjištěn pouze při koncentraci 50 mmol/l, a to po 12 a 24 hodinové inkubaci. Na BL byl zaznamenán nárůst hladiny ABA v semenech cv. Rutgers pouze u 75mM koncentrace NaCl po 6 hodinách inkubace. Na tento nárůst hladiny ABA má tedy vedle NaCl zřetelný vliv i BL, které během klíčení semen rajčete zpomaluje degradaci ABA (Šimurová et al., 2018) a tím zpomaluje proces klíčení cv. Rutgers v raných fázích inkubace semen. Jelikož v ostatních případech zvýšená koncentrace NaCl výrazně neovlivnila změnu hladiny endogenní ABA, nabízí se zde možnost, že do inhibice klíčení mohou být zapojeny i jiné faktory než ABA. Například dříve provedená genetická analýza prokázala, že auxin, který se podílí téměř na všech aspektech vývoje rostlin, hraje roli v klíčení a přísně reguluje dormanci vedle působení ABA (Liu et al., 2013). V případě mutantu *7B-1* docházelo pouze k mírnému nárůstu hladiny ABA vlivem NaCl v obou použitých koncentracích, a to jak ve tmě, tak na BL. Tento fakt vysvětluje již dříve publikovanou informaci, že semena mutantu *7B-1* vykazují specificky na BL rezistenci vůči abiotickým a biotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002; Bergougnoux et al., 2009).

Hodnoty naměřené exprese katabolického genu *SICYP707A3* potvrzují, že NaCl na hladinu ABA vliv má. Při porovnání vlivu 50mM koncentrace NaCl na expresi genu *SICYP707A3* v rámci obou genotypů kultivovaných ve tmě nebo na BL při 6 hodinách po výsevu, byla u semen cv. Rutgers zjištěna zvýšená exprese genu při 50mM koncentraci NaCl. Ve tmě to bylo asi 3x, na BL asi 1,5 krát (Obrázek 16a). Naproti tomu u mutantu *7B-1* zvýšení exprese *SICYP707A3* vlivem NaCl pozorováno nebylo, ani ve tmě, ani na BL (Obrázek 16b). Výraznější vliv zasolení na expresi genu nastal u cv. Rutgers při kultivaci ve tmě a ne na BL. To koreluje s informací, že BL vyvolává během klíčení semen rajčete pomalejší degradaci ABA než ve tmě, proto je zřejmá také pomalejší exprese genu, který je zodpovědný za odbourávání ABA (Šimurová et al., 2018). Zvýšená exprese genu *SICYP707A3* u cv. Rutgers při 50mM koncentraci by se dala vysvětlit tak, že exprese tohoto genu může být za biosyntézou ABA vlivem stresu zpožděna nebo, že se exprese katabolického genu zvyšuje až po získání informací o množství syntetizované ABA. U mutantu *7B-1* se hodnoty relativní exprese genu nelišily v závislosti na koncentraci NaCl v MS médiu, což by mohlo vysvětlovat toleranci semen mutantu *7B-1* k abiotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002). Tím, že mutant *7B-1* má sníženou hladinu ABA, nemusí si rostlina syntetizovat gen, který by ABA degradoval.

I když se mi v rámci této práce nepodařilo kvůli nezdařilé optimalizaci primerů zjistit expresi ABA biosyntetického genu *LeNCEDI*, lze naše úvahy podpořit ostatními publikacemi zabývající se expresí *LeNCEDI* za působení stresových faktorů. Zvýšená exprese ABA biosyntetického genu *LeNCEDI* při působení stresových vlivů byla například potvrzena v listech a kořenech rajčete během sucha (Thompson et al., 2000). V publikaci Yang et al., 2014 bylo rovněž na základě výsledků qPCR zjištěno, že působením solného stresu dochází k indukci ABA biosyntetických genů - *SINCED1* a *SINCED2* v listech a kořenech rajčete u genotypů vykazujících toleranci anebo senzitivitu vůči zasolení.

Výsledky prezentované v této diplomové práci naznačují složitost interakcí mezi abiotickým stresem, fytohormonem ABA a světelným signálem zapojených do procesu klíčení semen. Pro lepší porozumění mechanismů klíčení semen rajčete vystavených zasolení a modrému světlu by bylo zapotřebí zopakovat uvedené experimenty a provést další měření zaměřené jednak na expresi genů kódujících elementy biosyntetické dráhy ABA. Bylo by rovněž nutné pokračovat v experimentech Šimurové et al., 2018 zaměřených na analýzu exprese receptorů ABA či jiných elementů, které jsou součástí signalizační dráhy ABA.

6 ZÁVĚR

Předložená diplomová práce byla zaměřena na interakci kyseliny abscisové (ABA) a modrého světla (BL) během klíčení semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), která byla kultivována za podmínek solného stresu. Pro pochopení mechanismů interakce mezi ABA a BL při klíčení semen, byla v rámci experimentální části provedena analýza endogenní ABA v semenech pomocí UHPLC-ESI(-)MS/MS a následná relativní kvantifikace genů zapojených v metabolismu ABA za využití qPCR. Původním plánem bylo studium genu zapojeného v biosyntetické (gen *LeNCEDI*) a katabolické (gen *SICYP707A3*) dráze ABA. Ve výsledku byla však analyzována pouze exprese genu *SICYP707A3*, jelikož primery genu *LeNCEDI* se nepodařilo optimalizovat.

Veškeré experimenty byly provedeny na kontrolním genotypu cv. Rutgers a od něho odvozeného mutantu *7B-1*. Mutant *7B-1* je známý především tím, že produkuje nadbytek ABA (Fellner et al., 2001), je defektní v signalizaci BL a specificky na BL vykazuje v porovnání s kultivarem toleranci vůči abiotickým a biotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002; Bergougnoux et al., 2009). Semena byla kultivována *in vitro* ve tmě a na BL po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu o zvolených koncentracích NaCl (0, 50 a 75 mmol/l). Při analýze relativní exprese genů však musela být nejvyšší koncentrace NaCl vyřazena, jelikož se z rostlinného materiálu nepodařilo izolovat dostatečné množství RNA.

Ze získaných výsledků analýzy endogenní ABA bylo zjištěno, že u obou testovaných genotypů dochází během klíčení semen ke snížení hladiny endogenní ABA, a to jak při kultivaci ve tmě, tak i na modrém světle (BL), při všech zvolených koncentracích NaCl (0, 50 a 75 mmol/l). Pokles hladiny ABA s narůstajícím časem během klíčení semen ve tmě byl již dříve publikován, situace na BL však nebyla doposud zveřejněna. Dále bylo pozorováno, že BL stimuluje zvýšení hladiny endogenní ABA u cv. Rutgers, zatímco u mutantu *7B-1* nebyl vliv BL výrazný. Vysvětlením by mohla být schopnost semen mutantu *7B-1* tolerovat modrým světlem indukovanou inhibici klíčení, popřípadě u mutantu zjištěná snížená exprese receptorů ABA (Fellner and Sawhney, 2002; Šimurová et al., 2018). Co se týče vlivu zasolení na obsah endogenní ABA, bylo zjištěno, že pouze v některých případech se v důsledku působení NaCl výrazně zvyšovala koncentrace ABA. Konkrétně u semen cv. Rutgers kultivovaných ve tmě při 50mM koncentraci NaCl po 12 a 24 hodinové inkubaci a na BL po 6 hodinách od výsevu při 75mM koncentraci NaCl. Získané výsledky tedy naznačují, že do inhibice klíčení semen by mohly být mimo ABA zapojeny i jiné faktory. Zajímavým zjištěním bylo rovněž to, že u mutantu *7B-1*, který je označován za nadproducenta ABA, byly naměřeny v rámci všech kultivačních podmínek nižší hodnoty ABA v porovnání s cv. Rutgers. Tyto výsledky doplňují předchozí publikovaná data, že v semenech mutantu *7B-1* je obsah endogenní ABA nízký a ke zvýšené produkci dochází až v hypokotylech rostoucích semenáčků (Fellner et al., 2001; Šimurová et al., 2018).

V rámci analýzy relativní exprese katabolického genu *SICYP707A3* bylo prokázáno, že daný gen je zapojený u obou testovaných genotypů do odbourávání endogenní hladiny ABA během fáze klíčení semen kultivovaných ve tmě i na BL a při zvolených koncentracích NaCl (0 a 50 mmol/l). Bylo zjištěno, že zasolení má vliv na zvýšení exprese genu *SICYP707A3* pouze u semen cv. Rutgers, a to při inkubaci ve tmě, nikoliv však na BL. To jednak potvrzuje informaci, že na BL dochází k pomalejší degradaci ABA než ve tmě (Šimurová et al., 2018), ale také to, že mutant *7B-1* vykazuje na rozdíl od cv. Rutgers rezistenci k abiotickým stresům (Fellner and Sawhney, 2002). Pro lepší vysvětlení a ověření prezentovaných expresních výsledků by však bylo zapotřebí uvedené experimenty zopakovat a provést expresní analýzu genů zapojených v biosyntetické dráze ABA.

7 SEZNAM CITOVANÉ LITERATURY

Addicott FT, Lyon JL, Ohkuma K, Thiessen WE, Carns HR, Smith OE, Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF; 1968. Abscisic acid: A new name for abscisin II (dormin). *Science*, 159 (3822): 1493.

Ahmad M, Cashmore AR; 1993. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366 (6451): 162-166.

Ali-Rachedi S, Bouinot D, Wagner MH, Bonnet M, Sotta B, Grappin P, Jullien M; 2004. Changes in endogenous abscisic acid levels during dormancy release and maintenance of mature seeds: studies with the Cape Verde Islands ecotype, the dormant model of *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 219 (3): 479-488.

Arc E, Sechet J, Corbineau F, Rajjou L, Marion-Poll A; 2013. ABA crosstalk with ethylene and nitric oxide in seed dormancy and germination. *Front Plant Science*, 4: 63.

Attucci S, Carde JP, Raymond P, Saint Gès V, Spiteri A, Pradet A; 1991. Oxidative phosphorylation by mitochondria extracted from dry sunflower seeds. *Plant Physiology*, 95(2): 390-398.

Balarynová J, Danihlík J, Fellner M; 2018. Changes in plasma membrane aquaporin gene expression under osmotic stress and blue light in *tomato*. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40: 27.

Barros-Galvão T, Dave A, Gilday AD, Harvey D, Vaistij FE, Graham IA; 2020. ABA INSENSITIVE4 promotes rather than represses PHYA-dependent seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist*, 226 (4): 953-956.

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

Bewley JD, Black M; 1994. *Seeds: Physiology of Development and Germination*. Second Edition, New York: Plenum Press, ISBN 0-306-44747-9

Bewley JD; 1997. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*, 9: 1055-1066.

Botha FC, Potgieter GP, Botha AM; 1992. Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11: 211-224.

Brandizzi F; 2020. To grow or not to grow.... *The Plant Journal*, 103 (2): 479-480.

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL; 2015. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. 2nd edition, Wiley-Blackwell, ISBN: 978-0-470-71421-8.

Bursch, K, Toledo-Ortiz G, Pireyre M, Lohr M, Braatz C, Johansson H; 2020. Identification of BBX proteins as rate-limiting cofactors of HY5. *Nature Plants*, 6: 921-928.

Cashmore AR, Jarillo JA, Wu YJ, Liu D; 1999. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science*, 284 (5415): 760-765.

Corbineau F, Xia Q, Bailly C, El-Maarouf-Bouteau H; 2014. Ethylene, a key factor in the regulation of seed dormancy. *Front Plant Science*, 5: 539.

Cornforth JW, Milborrow BV, Ryback G, Wareing PF; 1965. Chemistry and physiology of 'Dormins' in sycamore: Identity of sycamore 'Dormin' with abscisin II. *Nature*, 205 (4978): 1269-1270.

Cracker LE, Abeles FB; 1969. Abscission: Role of abscisic acid. *Plant Physiology*, 44 (8): 1144-1149.

- Cutler AJ, Krochko JE;** 1999. Formation and breakdown of ABA. *Trends in Plant Science*, 4 (12): 472-478.
- Cutler SR, Rodriguez PL, Finkelstein RR, Abrams SR;** 2010. Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annual Review of Plant Biology*, 61 (1): 651-679.
- D'Amico-Damião V, Carvalho RF;** 2018. Cryptochrome-Related Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9: 1897.
- Devireddy AR, Zandalinas SI, Gómez-Cadenas A, Blumwald E, Mittler R;** 2018. Coordinating the overall stomatal response of plants: Rapid leaf-to-leaf communication during light stress. *Science Signalling*, 11 (518): eaam9514.
- Dietz KJ, Sauter A, Wichert K, Messdaghi D, Hartung W;** 2000. Extracellular beta-glucosidase activity in barley involved in the hydrolysis of ABA glucose conjugate in leaves. *Journal of Experimental Botany*, 51 (346): 937-944.
- Eagles CF, Wareing PF;** 1963. Dormancy regulators in woody plants: Experimental induction of dormancy in *Betula pubescens*. *Nature*, 199 (4896): 874-875.
- Ehrenschaft M, Brambl R;** 1990. Respiration and mitochondrial biogenesis in germinating embryos of maize. *Plant Physiology*, 93 (1): 295-304.
- Fankhauser C, Christie JM;** 2015. Plant phototropic growth. *Current Biology*, 25 (9): R384-R389.
- 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 (2-3): 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 (5): 675-682.
- Fellner M;** 2018. Role of blue light receptors in tolerance of seed germination to salt and osmotic stress. *VISCEA, Plant Abiotic Stress Tolerance V*, July 5-6, 2018, Vienna, Austria.
- 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.
- Finch-Savage WE, Leubner-Metzger G;** 2006. Seed dormancy and the control of germination. *New Phytologist*, 171 (3): 501-523.
- Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C;** 2008. Molecular aspects of seed dormancy. *Plant Biology*, 59: 387-415.
- Finkelstein R;** 2013. Abscisic Acid synthesis and response. *The arabidopsis book*, 11: e0166.
- Folta KM, Spalding EP;** 2001. Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution hypocotyl growth analysis. *The Plant Journal*, 26 (5): 471-478.
- Frey A, Effroy D, Lefebvre V, Seo M, Perreau F, Berger A, Sechet J, To A, North HM, Marion-Poll A;** 2011. Epoxycarotenoid cleavage by NCED5 fine-tunes ABA accumulation and affects seed dormancy and drought tolerance with other NCED family members. *The Plant Journal*, 70 (3): 501-512.
- Galvez-Valdivieso G, Fryer MJ, Lawson T, Slattery K, Truman W, Smirnoff N, Asami T, Davies WJ, Jones AM, Baker NR, Mullineaux PM;** 2009. The high light response in *Arabidopsis* involves ABA signaling between vascular and bundle sheath cells. *Plant Cell*, 21 (7): 2143-2162.

- Gillard DF, Walton DC;** 1976. Abscisic acid metabolism by a cell-free preparation from *Echinocystis lobata* liquid endosperm. *Plant Physiology*, 58 (6): 790-795.
- Goggin DE, Steadman KJ;** 2012. Blue and green are frequently seen: responses of seeds to short- and mid-wavelength light. *Seed Science Research*, 22 (1): 27-35.
- Gupta N, Prasad VB, Chattopadhyay S;** 2014. LeMYC2 acts as a negative regulator of blue light mediated photomorphogenic growth, and promotes the growth of adult tomato plants. *BMC Plant Biology*, 14: 38.
- He T, Cramer GR;** 1996. Abscisic acid concentrations are correlated with leaf area reductions in two salt-stressed rapid-cycling *Brassica* species. *Plant Soil*, 179: 25-33.
- Heijde M, Ulm R;** 2012. UV-B photoreceptor-mediated signalling in plants. *Trends Plant Science*, 17 (4): 230-237.
- Higa T, Suetsugu N, Wada M;** 2014. Plant nuclear photorelocation movement. *Journal of Experimental Botany*, 65 (11): 2873-2881.
- Hlavinka J, Nauš J, Fellner M;** 2013. Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, 209: 75-80.
- Hogewoning SW, Trouwborst G, Maljaars H, Poorter H, Ieperen W, Harbinson J;** 2010. Blue light dose-responses of leaf photosynthesis, morphology, and chemical composition of *Cucumis sativus* grown under different combinations of red and blue light. *Journal of Experimental Botany*, 61 (11): 3107-3117.
- Holdsworth MJ, Bentsink L, Soppe WJ;** 2008. Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179 (1): 33-54.
- Huang J, Zhao X, Chory J;** 2019. The *Arabidopsis* transcriptome responds specifically and dynamically to high light stress. *Cell Reports*, 29 (12): 4186-4199.
- Humplík JF, Bergougnoux V, Jandová M, Šimura J, Pěňčík A, Tomanec O, Rolčík J, Novák O, Fellner M;** 2015. Endogenous abscisic acid promotes hypocotyl growth and affects endoreduplication during dark-induced growth in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PLoS ONE*, 10 (2): e0117793.
- Chaves I, Pokorný R, Byrdin M, Hoang N, Ritz T, Brettel K, Essen LO, van der Horst GT, Batschauer A, Ahmad M;** 2011. The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annual Review of Plant Biology*, 62: 335-364.
- Chen H, Zhang J, Neff MM, Hong SW, Zhang H, Deng XW, Xiong L;** 2008. Integration of light and abscisic acid signaling during seed germination and early seedling development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (11): 4495-4500.
- Chen K, Li GJ, Bressan RA, Song CP, Zhu JK, Zhao Y;** 2020. Abscisic acid dynamics, signaling, and functions in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62 (1): 25-54.
- Chen M, Chory J;** 2011. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends Cell Biology*, 21 (11): 664-671.
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S;** 2015. Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, 56 (3): 401-413.
- Christie JM, Salomon M, Nozue K, Wada M, Briggs WR;** 1999. LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (nph1): binding sites for the chromophore flavin

mononucleotide. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96 (15): 8779-8783.

Christie JM; 2007. Phototropin blue-light receptors. Annual Review of Plant Biology, 58: 21-45.

Inoue S, Takemiya A, Shimazaki K; 2010. Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. Current Opinion in Plant Biology, 13 (5): 587-593.

Jenks MA, Hasegawa PM; 2005. Blackwell Publishing, ISBN 1-4051-2238-2.

Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, Oikawa K, Ishiguro S, Kato T, Tabata S, Okada K, Wada M; 2001. Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. Science, 291 (5511): 2138-2141.

Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, Fankhauser C; 2010. Light-regulated plant growth and development. Plant Development, 29-66.

Kang J, Yim S, Choi H, Kim A, Lee KP, Lopez-Molina L, Martinoia E, Lee Y; 2015. Abscisic acid transporters cooperate to control seed germination. Nature communications, 6: 8113.

Kepka M, Benson CL, Gonugunta VK, Nelson KM, Christmann A, Grill E, Abrams SR; 2011. Action of natural abscisic acid precursors and catabolites on abscisic acid receptor complexes. Plant physiology, 157 (4): 2108-2119.

Kim J, Kang H, Park J, Kim W, Yoo J, Lee N, Kim J, Yoon TY, Choi G; 2016. PIF1-interacting transcription factors and their binding sequence elements determine the in vivo targeting sites of PIF1. Plant Cell, 28 (6): 1388-1405.

Kim SIL, Song SIK, Seo HS; 2014. Cryptochrome 2 negatively regulates ABA-dependent seed germination in *Arabidopsis*. Life Science Journal, 11 (9): 880-884.

Kleine T, Lockhart P, Batschauer A; 2003. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. The Plant Journal, 358 (1): 93-103.

Kleiner O, Kircher S, Harter K, Batschauer A; 1999. Nuclear localization of the *Arabidopsis* blue light receptor cryptochrome 2. The Plant Journal, 19 (3): 289-296.

Kong SG, Nagatani A; 2008. Where and how does phototropin transduce light signals in the cell?. Plant Signal Behavior, 3 (4): 275-277.

Koornneef M, Bentsink L, Hilhorst H; 2002. Seed dormancy and germination. Current Opinion in Plant Biology, 5 (1): 33-36.

Kraepiel Y, Rousselin P, Sotta B, Kerhoas L, Einhorn J, Caboche M, Miginiac E; 1994. Analysis of phytochrome- and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia*. The Plant Journal, 6 (5): 665-672.

Krochko JE, Abrams GD, Loewen MK, Abrams SR, Cutler AJ; 1998. (+)-Abscisic acid 8'-hydroxylase is a cytochrome P450 monooxygenase. Plant Physiology, 118 (3): 849-860.

Kushiro T, Okamoto M, Nakabayashi K, Yamagishi K, Kitamura S, Asami T, Hirai N, Koshiba T, Kamiya Y, Nambara E; 2004. The *Arabidopsis* cytochrome P450 CYP707A encodes ABA 8'-hydroxylases: key enzymes in ABA catabolism. EMBO Journal, 23 (7): 1647-1656.

Lee KP, Piskurewicz U, Turečková V, Carat S, Chappuis R, Strnad M, Fankhauser C, Lopez-Molina L; 2012. Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. Genes and Development, 26 (17): 1984-1996.

- Li X, Wang Q, Yu X, Liu H, Yang H, Zhao C, Liu X, Tan C, Klejnot J, Zhong D, Lin C;** 2011. *Arabidopsis* cryptochrome 2 (CRY2) functions by the photoactivation mechanism distinct from the tryptophan (trp) triad-dependent photoreduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108 (51): 20844-20849.
- Lin BL, Wang HJ, Wang JS, Zaharia LI, Abrams SR;** 2005. Abscisic acid regulation of heterophylly in *Marsilea quadrifolia* L.: effects of *R*-(-) and *S*-(+) isomers. *Journal of Experimental Botany*, 56 (421): 2935-2948.
- Liu H, Yu X, Li K, Klejnot J, Yang H, Lisiero D, Lin C;** 2008. Photoexcited CRY2 interacts with CIB1 to regulate transcription and floral initiation in *Arabidopsis*. *Science*, 322 (5907): 1535-1539.
- Liu X, Zhang H, Zhao Y, Feng Z, Li Q, Yang HQ, Luan S, Li J, He ZH;** 2013. Auxin controls seed dormancy through stimulation of abscisic acid signaling by inducing ARF-mediated ABI3 activation in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110 (38): 15485-15490.
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E;** 2009. Regulators of PP2C phosphatase activity function as abscisic acid sensors. *Science*, 324 (5930): 1064-1068.
- Matakiadis T, Alboresi A, Jikumar Y, Tatematsu K, Pichon O, Renou JP, Kamiya Y, Nambara E, Truong HN;** 2009. The *Arabidopsis* abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiology*, 149 (2): 949-960.
- Miyakawa T, Fujita Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Tanokura M;** 2013. Structure and function of abscisic acid receptors. *Trends in Plant Science*, 18 (5): 259-266.
- Munns R, Tester M;** 2008. Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59 (1): 651-681.
- Murashige T, Skoog A;** 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497.
- Nakashima K, Yamaguchi-Shinozaki K;** 2013. ABA signaling in stress-response and seed development. *Plant Cell Reports*, 32 (7): 959-970.
- Nambara E, Marion-Poll A;** 2005. Abscisic acid biosynthesis and catabolism. *Annual Review of Plant Biology*, 56 (1): 165-185.
- Ng LM, Melcher K, Teh BT, Xu HE;** 2014. Abscisic acid perception and signaling: structural mechanisms and applications. *Acta Pharmacologica Sinica*, 35 (5): 567-584.
- Nitsch LM, Oplaat C, Feron R, Ma Q, Wolters-Arts M, Hedden P, Mariani C, Vriezen WH;** 2009. Abscisic acid levels in tomato ovaries are regulated by *LeNCED1* and *SICYP707A1*. *Planta*, 229 (6): 1335-1346.
- Oh E, Kang H, Yamaguchi S, Park J, Lee D, Kamiya Y, Choi G;** 2009. Genomewide analysis of genes targeted by Phytochrome Interacting Factor 3-Like5 during seed germination in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21 (2): 403-419.
- Oh E, Kim J, Park E, Kim JI, Kang C, Choi G;** 2004. PIL5, a phytochrome-interacting basic helix-loop-helix protein, is a key negative regulator of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*, 16 (11): 3045-3058.
- Oh E, Yamaguchi S, Hu J, Yusuke J, Jung B, Paik I, Lee HS, Sun TP, Kamiya Y, Choi G;** 2007. PIL5, a Phytochrome-interacting bHLH protein, regulates gibberellin responsiveness by binding directly to the *GAI* and *RGA* promoters in *Arabidopsis* seeds. *The Plant Cell*, 19 (4): 1192-1208.

- Oh E, Yamaguchi S, Kamiya Y, Bae G, Chung WI, Choi G;** 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 47 (1): 124-139.
- Ohkuma K, Lyon JL, Addicott FT, Smith OE;** 1963. Abscisin II, an abscission-accelerating substance from young cotton fruit. *Science*, 142 (3599): 1592-1593.
- Okamoto M, Tanaka Y, Abrams SR, Kamiya Y, Seki M, Nambara E;** 2009. High humidity induces abscisic acid 8'-hydroxylase in stomata and vasculature to regulate local and systemic abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 149 (2): 825-834.
- Park HJ, Kim WY, Yun DJ;** 2016. A new insight of salt stress signaling in plant. *Molecules and Cells*, 39 (6): 447-459.
- Park SY, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TF, Alfred SE, Bonetta D, Finkelstein R, Provart NJ, Desveaux D, Rodriguez PL, McCourt P, Zhu JK, Schroeder JI, Volkman BF, Cutler SR;** 2009. Abscisic acid inhibits type 2C protein phosphatases via the PYR/PYL family of START proteins. *Science*, 324 (5930): 1068-1071.
- Pfeifer A, Mathes T, Lu Y, Hegemann P, Kottke T;** 2010. Blue light induces global and localized conformational changes in the kinase domain of full-length phototropin. *Biochemistry*, 49 (5): 1024-1032.
- Piskurewicz U, Jikumaru Y, Kinoshita N, Nambara E, Kamiya Y, Lopez-Molina L;** 2008. The gibberellic acid signaling repressor RGL2 inhibits *Arabidopsis* seed germination by stimulating abscisic acid synthesis and ABI5 activity. *Plant Cell*, 20 (10): 2729-2745.
- Piskurewicz U, Turecková V, Lacombe E, Lopez-Molina L;** 2009. Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *The EMBO Journal*, 28 (15): 2259-2271.
- Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M;** 2012. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany*, 110 (4): 767-776.
- Pokorny R, Klar T, Hennecke U, Carell T, Batschauer A, Essen LO;** 2008. Recognition and repair of UV lesions in loop structures of duplex DNA by DASH-type cryptochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105 (52): 21023-21027.
- Pucci A, Picarella ME, Mazzucato A;** 2017. Phenotypic, genetic and molecular characterization of *7B-1*, a conditional male-sterile mutant in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 130 (11): 2361-2374.
- Qi L, Liu S, Li C, Fu J, Jing Y, Cheng J, Li H, Zhang D, Wang X, Dong X, Han R, Li B, Zhang Y, Li Z, Terzaghi W, Song CP, Lin R, Gong Z, Li J;** 2020. Phytochrome-interacting factors interact with the ABA receptors PYL8 and PYL9 to orchestrate aba signaling in darkness. *Molecular Plant*, 13: 414-430.
- Robertson DS;** 1995. The genetics of vivipary in Maize. *Genetics*, 40 (5): 745-760.
- Ryu SB, Costa A, Xin X, Li PH;** 1995. Induction of cold hardiness by salt stress involves synthesis of cold- and abscisic acid response proteins in potato (*Solanum commersonii* Dun). *Plant Cell Physiology*, 36 (7): 1245-1251.
- Saito S, Hirai N, Matsumoto C, Ohigashi H, Ohta D, Sakata K, Mizutani M;** 2004. *Arabidopsis* CYP707As encode (+)-abscisic acid 8'-hydroxylase, a key enzyme in the oxidative catabolism of abscisic acid. *Plant Physiology*, 134 (4): 1439-1449.

- Sawada Y, Aoki M, Nakaminami K, Mitsuhashi W, Tatematsu K, Kushiro T, Koshihara T, Kamiya Y, Inoue Y, Nambara E, Toyomasu T;** 2008. Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiology*, 146 (3): 1386-1396.
- 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.
- Selby CP, Sancar A;** 2006. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103 (47): 17696-17700.
- Seo M, Hanada A, Kuwahara A, Endo A, Okamoto M, Yamauchi Y, North H, Marion-Poll A, Sun TP, Koshihara T, Kamiya Y, Yamaguchi S, Nambara E;** 2006. Regulation of hormone metabolism in *Arabidopsis* seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal*, 48 (3): 354-366.
- Seo M, Koshihara T;** 2002. Complex regulation of ABA biosynthesis in plants. *Trends in Plant Science*, 7 (1): 41-48.
- Sharma P, Chatterjee M, Burman N, Khurana JP;** 2014. Cryptochrome 1 regulates growth and development in *Brassica* through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant Cell Environment*, 37 (4): 961-977.
- Shen H, Moon J, Huq E;** 2005. PIF1 is regulated by light-mediated degradation through the ubiquitin-26S proteasome pathway to optimize seedling photomorphogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Journal*, 44 (6): 1023-1035.
- Shu K, Chen Q, Wu Y, Liu R, Zhang H, Wang P, Li Y, Wang S, Tang S, Liu C, Yang W, Cao X, Serino G, Xie Q;** 2016b. ABI4 mediates antagonistic effects of abscisic acid and gibberellins at transcript and protein levels. *The Plant Journal*, 85 (3): 348-361.
- Shu K, Liu XD, Xie Q, He ZH;** 2016a. Two faces of one seed: Hormonal regulation of dormancy and germination. *Molecular Plant*, 9 (1): 34-45.
- Schweighofer A, Hirt H, Meskiene I;** 2004. Plant PP2C phosphatases: emerging functions in stress signaling. *Trends in Plant Science*, 9 (5): 236-243.
- Skubacz A, Daszkowska-Golec A, Szarejko I;** 2016. The role and regulation of ABI5 (ABA-Insensitive 5) in plant development, abiotic stress responses and phytohormone crosstalk. *Frontiers in Plant Science*, 7: 1884.
- Stawska M, Oracz K;** 2019. phyB and HY5 are involved in the blue light-mediated alleviation of dormancy of *Arabidopsis* seeds possibly via the modulation of expression of genes related to light, GA, and ABA. *International journal of molecular sciences*, 20 (23): 5882.
- Suetsugu N, Wada M;** 2013. Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant Cell Physiology*, 54 (1): 8-23.
- Sun S, Fan W, Mu Z;** 2017. The spatio-temporal specificity of PYR1/PYL/RCAR ABA receptors in response to developmental and environmental cues. *Plant Signal Behavior*, 12 (11): e1214793.
- Sun Y, Xu W, Jia Y, Wang M, Xia G;** 2015. The wheat *TaGBF1* gene is involved in the blue-light response and salt tolerance. *The Plant Journal*, 84 (6): 1219-1230.

- Symons GM, Reid JB;** 2003. Hormone levels and response during de-etiolation in pea. *Planta*, 216 (3): 422-431.
- Šimurová P, Turečková V, Strnad M, Fellner M;** 2018. Effect of blue light signaling on ABA in germinating seeds. 30th International Symposium on the Chemistry of Natural Products, November 25-29, 2018, Athens, Greece.
- Taiz L, Zeiger E;** 2015. *Plant Physiology and development*, 6th ed. Sunderland, Massachusetts: Sinauer Associates, Inc., Publishers. ISBN 978-1605352558
- Takaki M;** 2001. New proposal of classification of seeds based on forms of phytochrome instead of photoblastism. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal*, 13 (1): 104-108.
- Takemiya A, Shimazaki K;** 2010. Phosphatidic acid inhibits blue light-induced stomatal opening via inhibition of protein phosphatase 1. *Plant Physiology*, 153 (4): 1555-1562.
- Tang W, Ji Q, Huang Y, Jiang Z, Bao M, Wang H, Lin R;** 2013. Far-red elongated hypocotyl3 and far-red impaired response1 transcription factors integrate light and abscisic acid signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 163 (2): 857-866.
- Terecskei K, Tóth R, Gyula P, Kevei E, Bindics J, Coupland G, Nagy F, Kozma-Bognár L;** 2013. The circadian clock-associated small GTPase Light insensitive period1 suppresses light-controlled endoreplication and affects tolerance to salt stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 161 (1): 278-90.
- Thompson AJ, Jackson AC, Parker RA, Morpeth DR, Burbidge A, Taylor IB;** 2000. Abscisic acid biosynthesis in tomato: regulation of zeaxanthin epoxidase and 9-cisepoxycarotenoid dioxygenase mRNAs by light/dark cycles, water stress and abscisic acid. *Plant Molecular Biology*, 42 (6): 833-845.
- Turečková V, Novák O, Strnad M;** 2009. Profiling ABA metabolites in *Nicotiana tabacum* L. leaves by ultra-performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry. *Talanta*, 80 (1): 390-399.
- Umezawa T, Okamoto M, Kushiro T, Nambara E, Oono Y, Seki M, Kobayashi M, Koshiba T, Kamiya Y, Shinozaki K;** 2006. CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 46 (2): 171-182.
- Uno Y, Furihata T, Abe H, Yoshida R, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K;** 2000. *Arabidopsis* basic leucine zipper transcription factors involved in an abscisic acid-dependent signal transduction pathway under drought and high-salinity conditions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97 (21): 11632-11637.
- Vaistij FE, Barros-Galvão T, Cole AF, Gilday AD, He Z, Li Y, Harvey D, Larson TR, Graham IA;** 2018. *MOTHER-OF-FT-AND-TFL1* represses seed germination under far-red light by modulating phytohormone responses in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 115 (33): 8442-8447.
- Vazquez-Yanes C, Orosco-Segovia A;** 1993. Patterns of seed longevity and germination in the tropical rainforest. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 24: 69-87.
- Wang X, Yang P, Gao Q, Liu X, Kuang T, Shen S, He Y;** 2008. Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta*, 228 (1): 167-177.
- Weatherwax SC, Ong MS, Degenhardt J, Bray EA, Tobin EM;** 1996. The interaction of light in the regulation of plant gene expression. *Plant Physiology*, 111 (2): 363-370.

- Wit M, Galvão VC, Fankhauser C;** 2016. Light-mediated hormonal regulation of plant growth and development. *Annual Review of Plant Biology*, 67: 513-537.
- Xing L, Zhao Y, Gao J, Xiang C, Zhu JK;** 2016. The ABA receptor PYL9 together with PYL8 plays an important role in regulating lateral root growth. *Scientific Reports*, 6: 27177.
- Xiong L, Ishitani M, Zhu JK;** 1999. Interaction of osmotic stress, temperature, and abscisic acid in the regulation of gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 119 (1): 205-211.
- Xu D, Jiang Y, Li J, Lin F, Holm M, Deng XW;** 2016. BBX21, an *Arabidopsis* B-box protein, directly activates HY5 and is targeted by COP1 for 26S proteasome-mediated degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113 (27): 7655-7660.
- Xu P, Xiang Y, Zhu H, Xu H, Zhang Z, Zhang C, Zhang L, Ma Z;** 2009. Wheat cryptochromes: subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress responses. *Plant Physiology*, 149 (2): 760-774.
- Yadukrishnan P, Datta S;** 2020. Light and abscisic acid interplay in early seedling development. *New Phytologist*, 229 (2): 763-769.
- Yadukrishnan P, Rahul PV, Datta S;** 2020b. HY5 Suppresses, Rather Than Promotes, Abscisic Acid-Mediated Inhibition of Postgermination Seedling Development. *Plant Physiology*, 184 (2): 574-578.
- Yadukrishnan P, Rahul PV, Ravindran N, Bursch K, Johansson H, Datta S;** 2020a. Constitutively photomorphogenic1 promotes ABA-mediated inhibition of post-germination seedling establishment. *The Plant Journal*, 103 (2): 481-496.
- Yang R, Yang T, Zhang H, Qi Y, Xing Y, Zhang N, Li R, Weeda S, Ren S, Ouyang B, Guo YD;** 2014. Hormone profiling and transcription analysis reveal a major role of ABA in tomato salt tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 77: 23-34.
- Yoshida R, Hobo T, Ichimura K, Mizoguchi T, Takahashi F, Aronso J, Ecker JR, Shinozaki K;** 2002. ABA-activated SnRK2 protein kinase is required for dehydration stress signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiology*, 43 (12): 1473-1483.
- Zaharia LI, Walker-Simmon MK, Rodriguez CN, Abrams SR;** 2005. Chemistry of abscisic acid, abscisic acid catabolite and analogs. *Journal of Plant Growth Regulation*, 24: 274-284.
- Zhang J, Jia W, Yang J, Ismail AM;** 2006. Role of ABA in integrating plant responses to drought and salt stresses. *Field Crops Research*, 97 (1): 111-119.
- Zhao Y, Gao J, Im Kim J, Chen K, Bressan RA, Zhu JK;** 2017. Control of plant water use by ABA induction of senescence and dormancy: An overlooked lesson from evolution. *Plant Cell Physiology*, 58 (8): 1319-1327.
- Zhou R, Cutler AJ, Ambrose SJ, Galka MM, Nelson KM, Squires TM, Abrams SR;** 2004. A new abscisic acid catabolic pathway. *Plant physiology*, 134 (1): 361-369.
- Zhou T, Meng L, Ma Y, Liu Q, Zhang Y, Yang Z, Yang D, Bian M;** 2018b. Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 37 (2): 251-264.
- Zhou T, Zhou L, Ma Y, Gao J, Li W, Piao M, Zeng B, Yang Z, Bian M;** 2018a. Cryptochrome 1b from sweet sorghum regulates photoperiodic flowering, photomorphogenesis, and ABA response in transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology Reporter*, 36: 13-22.

Zhu JK, Liu J, Xiong L; 1998. Genetic analysis of salt tolerance in arabidopsis. Evidence for a critical role of potassium nutrition. *Plant Cell*, 10 (7): 1181-1191.

Zhu JK; 2002. Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53: 247-73.

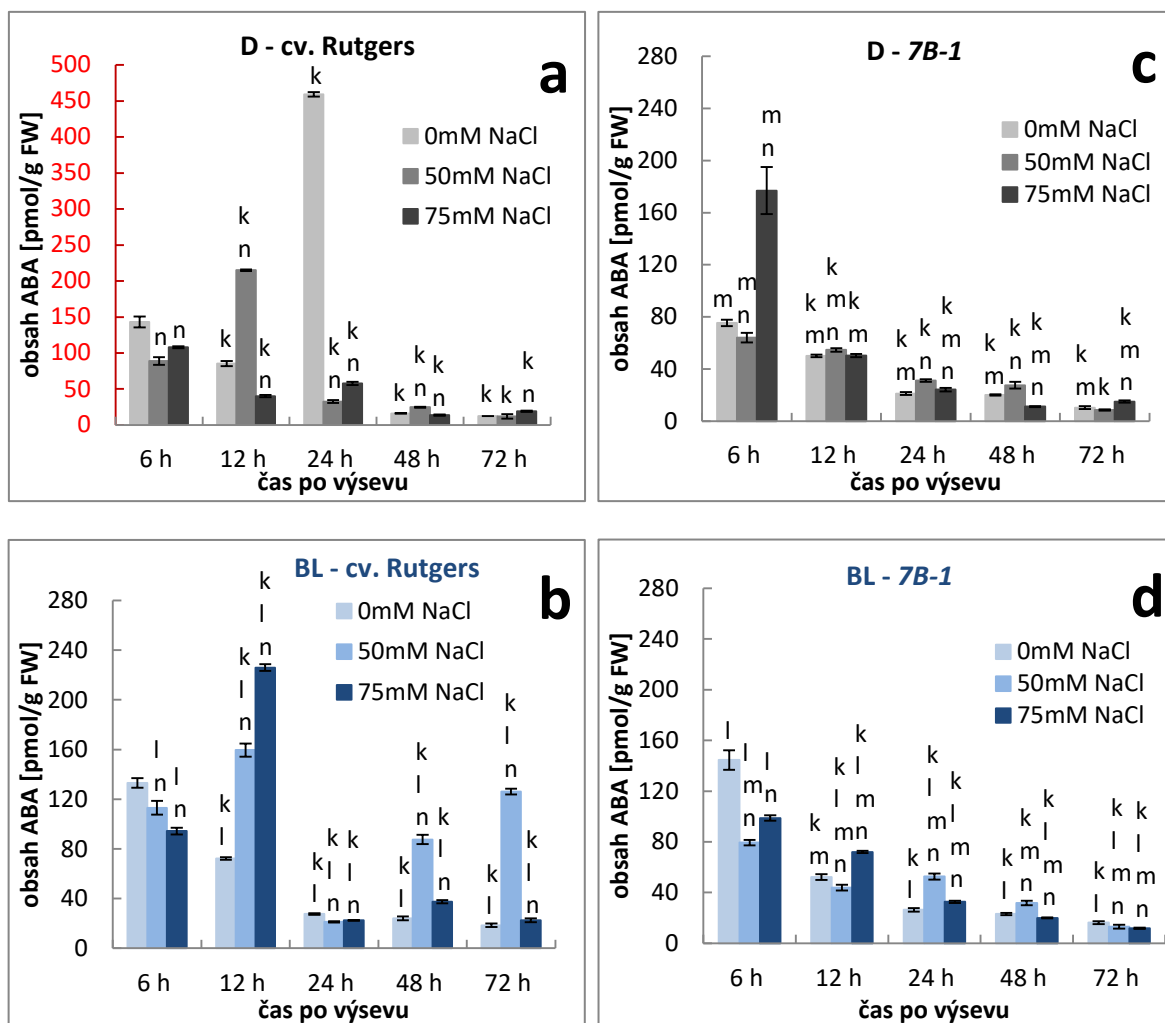
Zhu JK; 2016. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 167 (2): 313-324.

Zuo ZC, Meng YY, Yu XH, Zhang ZL, Feng DS, Sun SF, Liu B, Lin CT; 2012. A study of the blue-light-dependent phosphorylation, degradation, and photobody formation of Arabidopsis CRY2. *Molecular Plant*, 5 (3): 726-733.

Přílohy

Příloha 1: Výsledky analýzy endogenní hladiny ABA v semenech vysévaných na médiu s koncentracemi NaCl 0, 50 a 75 mmol/l druhé řady vzorků

Na obrázku 21 jsou zaznamenány výsledky obsahu endogenní hladiny ABA v rámci analýzy druhého biologického replikátu. Daná data nebyla použita k vyhodnocení, jelikož zde byly v několika případech mezi jednotlivými biologickými replikáty naměřeny příliš vysoké odchylky. Výsledky druhé řady jsou v této práci uváděny pouze pro informaci.



Obrázek 21: Obsah ABA v semenech cv. Rutgers (WT) kultivovaných ve tmě (D; **a**) a na modrém světle (BL; **b**) a v semenech mutanta *7B-1* kultivovaných ve tmě (D; **c**) a na modrém světle (BL; **d**). Semena byla kultivována po dobu 6, 12, 24, 48 a 72 hodin na MS médiu s koncentracemi NaCl 0, 50 a 75mmol/l. Zobrazená data představují průměrnou hodnotu obsahu ABA \pm SD vypočítanou z hodnot ABA 3 technických replikátů v rámci jednoho provedení experimentu. Písmena k, l, m, n označují statistické rozdíly mezi naměřenými hodnotami obsahu ABA ($P \leq 0,05$; Student's test):

k = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (6 hod) v rámci stejné koncentrace a stejného genotypu,

l = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (D) v rámci stejného genotypu, stejného času kultivace a stejné koncentrace,

m = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (cv. Rutgers) v rámci stejného času kultivace, stejné koncentrace a stejné světelné podmínky,

n = signifikantně odlišné ($P \leq 0,05$) od kontroly (0mmol/l NaCl) v rámci stejného času kultivace, stejného genotypu a stejné světelné podmínky.