

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Charakterizace loss-of-function mutanta *nph3* u
*Arabidopsis thaliana***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Šárka Škrobánková
Studijní program:	N0512A130009 – Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok:	2023

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byla jsem seznámena s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

Chtěla bych poděkovat Mgr. Márii Škrabišové, PhD. za vedení mé práce, všechnen čas, který mi věnovala a cenné rady, které byly a dále budou uplatňovány. Také bych ráda poděkovala Mgr. Janě Slivkové, která mi předala své zkušenosti při řešení experimentální části. Poslední díky patří mému vedoucímu při absolvování zahraniční stáže na Univerzitě v Utrechtu, kterým byl Dr. Andrés Romanowski za to, že se mě ujal a předal mi své hodnotné vědomosti.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Šárka Škrobánková
Název práce	Charakterizace loss-of-function mutantu <i>nph3</i> u <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023

Abstrakt

Diplomová práce je věnována charakterizaci mutantu *Arabidopsis thaliana*, který má z funkce vyřazen gen kódující protein z NPH3 (non-phototropic hypocotyl 3) rodiny. Tento gen je kandidátem pro polozakrslé vysokoplodící variety sóji luštinaté (*Glycine max*). V teoretické části práce jsou popsány nejen tyto specifické variety, ale také elitní linie sóji a divoký předek *Glycine soja*. Dále je rešerše zaměřena na rostliny a jejich vnímání světla, fotoreceptory a mechanismy reakce na stinné podmínky. Jedna z kapitol je věnována funkci NPH3 proteinu. V praktické části bylo nejprve ověřeno, zda semena loss-of-function *nph3* mutantu *A. thaliana* (SALK_023877C), která byla získána z NASC (Nottinghamský inventář semen *Arabidopsis*), mají ve svém genomu T-DNA inserci. K tomu byly využity bioinformatické nástroje a molekulárně biologické metody. Následně byla zkoumána odpověď rostlin divokého typu, *nph3* mutantu a dalších loss-of function mutantů jednotlivých fotoreceptorů při různých světelných podmínkách. Byly provedeny dva experimenty, kdy byla sledována odpověď rostlin při ošetření modrým světlem. Při prvním z nich byl sledován růst *Arabidopsis* při různé intenzitě modrého světla. Druhý experiment se zaměřoval na test fototropismu rostlin. Při obou experimentech se *nph3* mutant choval stejně, jako divoký typ. Těmito experimenty nebyl potvrzen kandidátní gen pro polozakrslé vysokoplodící variety sóji luštinaté.

Klíčová slova	Sója, fototropismus, rostlinné stínění, <i>Arabidopsis thaliana</i> , mutant, modré světlo
Počet stran	74
Počet příloh	3
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Šárka Škrobánková
Title	Characterization of a loss-of-function <i>nph3</i> mutant in <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Type of thesis	Master
Department	Biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
The year of presentation	2023

Abstract

This master's thesis is devoted to the characterization an *Arabidopsis thaliana* mutant with loss-of-function gene, that codes a protein of NPH3 (non-phototropic hypocotyl 3) family. This gene is a candidate of semidwarf high-yielding varieties of soybean (*Glycine max*). In the theoretical part are described these unusual varieties, elite soybean lines and the wild ancestor *Glycine soja*. The research is then focused on plant light perception, photoreceptors, and mechanisms, that enable plants to react to shady environment. One chapter is devoted to the function of the *nph3* gene. In experimental part is at fist verified, that the seeds of loss-of-function *nph3* mutant of *A. thaliana* (SALK_0235877C), which were obtained from NASC (Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre), have a T-DNA insertion in their genotype. Bioinformatical tools and methods of molecular biology were used to do so. Reaction of wild type plants, the *nph3* mutant and another loss-of-function mutants of different photoreceptors were examined in different light conditions. Two light experiments were performed. The first one was blue light treatment, when *Arabidopsis* plants were grown in various intensities of blue light. The second experiment was about testing phototropic response of the plants. Both experiments showed no significant difference between behavior of the wild type plants and the *nph3* mutant. These experiments did not confirm the candidate gene of the semidwarf high-yielding varieties of soybean.

Keywords	Soybean, phototropism, plant shading, <i>Arabidopsis thaliana</i> , mutant, blue light
Number of pages	74
Number of appendices	3
Language	Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 Polozakrslé vysokoplodící variety sóji	3
2.1.1 Architektura stonku	5
2.1.1.1 Ukončený růst apikálního stonku	7
2.1.2 Elitní variety s vysokým výnosem	8
2.1.2.1 <i>E</i> geny (lokusy)	10
2.1.3 Hledání kandidátních genů pro Polozakrslé vysokoplodící variety sóji	11
2.1.4 Studium předpovězených funkcí proteinů	13
2.2 Rostliny a jejich vnímání světla	15
2.3 Fotoreceptory	16
2.3.1 Fototropiny	17
2.3.2 Kryptochromy	18
2.3.3 Fytochromy	20
2.4 Rostliny a jejich vnímání stínu	22
2.4.1 Fototropismus	23
2.4.2 NPH3 (non-phototropic hypocotyl 3)	26
2.4.3 Vnímání světla u sóji	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	30
3.1 Biologický materiál	30
3.2 Chemikálie	30
3.3 Přístroje a vybavení	31
3.4 Roztoky	31
3.5 Reagencie pro molekulární biologii	31
3.6 Použité primery	32
3.7 Experimentální metody	32
3.7.1 Podmínky růstu rostlin	32
3.7.2 Katalog alel	33
3.7.2 BLAST	33
3.7.3 Analýza nukleotidových a proteinových sekvencí	33
3.7.3 Fylogenetická analýza	34

3.7.4 Izolace gDNA (genomové DNA)	34
3.7.5 Izolace RNA	35
3.7.6 Přepis do cDNA	35
3.7.7 End-point PCR	36
3.7.8 Agarosová elektroforéza	37
3.7.9 Sangerova sekvenace	37
3.7.10 Ošetření rostlin světlem	38
3.7.10.1 Sterilizace a stratifikace semen	38
3.7.10.2 Růst <i>Arabidopsis</i> při různé intenzitě modrého světla a fenotypová analýza	38
3.7.10.3 Fototropický experiment	39
3.7.11 Statistická analýza	41
4 VÝSLEDKY	42
4.1 Katalog alel	43
4.2 Výběr vhodného mutantu <i>Arabidopsis thaliana</i>	45
4.2.1 Fylogenetický strom příbuznosti genů NRL rodiny	47
4.2.2 Ověření <i>nph3</i> mutantu	49
4.3 Ověření funkčnosti T-DNA insertu	51
4.4 Vliv modrého světla na rostliny	53
4.4.1 Výsledky fenotypové analýzy růstu <i>Arabidopsis</i> pod modrým světlem	53
4.4.2 Fototropický experiment	55
4.5 Statistická analýza	56
5 DISKUZE	58
6. ZÁVĚR	61
7 LITERATURA	62
8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	71
9 PŘÍLOHY	74

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

Teoretická část je věnována rešerši na téma polozakrslé vysokoplodící variety a elitní linie sóji luštinaté. Je zmíněna architektura stonku, doba kvetení a dozrávání a příprava nových kultivarů sóji. Zabývá se rostlinami a jejich vnímáním světla, rostlinnými fotoreceptory a chováním rostlin ve stinných podmínkách. Dále je zaměřena na funkci NPH3 proteinu, který je potenciálně kódován kandidátním genem pro polozakrslé vysokoplodící variety.

Praktická část:

Praktická část se týká analýzy distribuce alel v genu *Glyma.13g221200* v celosvětové populaci 1066 genotypů sóji. Je věnována identifikaci a charakterizaci loss-of-function mutanta homologního genu *NPH3* sóji u *Arabidopsis thaliana*. Nejprve je určen homologní gen a následuje výběr vhodného mutanta. Mutantní semena jsou nejprve ověřena a poté jsou podrobena experimentům s modrým světlem, kdy je sledována délka hypokotylu a fototropická odpověď v porovnání s divokým typem (Col-0) a jinými kontrolními mutanty.

1 ÚVOD

Sója luštinatá je považována za jednu z nejdůležitějších hospodářských plodin na světě díky svému vysokému obsahu proteinů a oleje (Mathieu *et al.*, 2009). Tato práce je zaměřená na polozakrslé vysokoplodící variety sóji, kterých je pouze 25 z celkových 21 tisíc variet uvedených v databázi GRIN – The USDA Soybean Germplasm Collection (Urbana, IL, USA). Variety s těmito specifickými vlastnostmi mají nesmyslnou (missense) mutaci v jednom z nejdůležitějších genů architektury stonku *Dt1* (*Glyma.19g194300*), která předčasně ukončuje jejich růst (Cooper, 1981). Rostliny následkem mutace dosahují přibližně poloviny výšky elitních variet sóji s ukončenou architekturou stonku. Výhodou těchto variet je nižší náchylnost k poničení úrody vlivem špatných povětrnostních podmínek, jako je silný vítr, či déšť, které vedou k poléhavosti rostlin se standardní výškou (Cooper, 1985). Také vyžadují menší plochu pro pěstování, jelikož upřednostňují menší rozestupy mezi jednotlivými rostlinami pro dosažení vyššího výnosu (Li *et al.*, 2018). Jejich výnos může být v porovnání s elitními liniemi dokonce vyšší.

Pro odhalení genetického pozadí byla provedena GWAS (Genome-wide association study) analýza speciálně pro tyto variety (Škrabišová, nepublikováno). Nejsilnější signál byl pozorován na chromosomu 19 a skutečně příslušel genu *Dt1* (Cooper, 1981). Slabší, ale stále významné signály byly sledovány na chromosomech 13, 16 a 20. Pomocí online bioinformatických nástrojů (AccuTool; soykb.org/AccuTool/index.php; Škrabišová *et al.*, 2022) byl signál na chromozomu 13 přiřazen genu *Glyma.13g221200* s významnou přesností a bylo zjištěno, že kóduje protein z NPH3 rodiny. Cílem diplomové práce je zjistit, zda je role tohoto specifického proteinu v polozakrslých vysokoplodících varietách důležitá. Hypotéza je taková, že pěstování nahusto, které způsobuje stínění může významně ovlivnit vnímání modrého světla a následnou odezvu u rostlin s deficiencí NPH3.

Existují tři hlavní rodiny rostlinných fotoreceptorů lišících se podle absorbance vlnové délky světla, které ovlivňují chování rostlin. Fytochromy absorbují světlo v červené a vzdálené červené oblasti. Kryptochromy absorbují UV-A a modré světlo a jsou významné v procesu deetiolace a indukce kvetení. Fototropiny také absorbují modré světlo, ovlivňují fototropismus, otevírání a zavírání průduchů a pohyb chloroplastů (Frankhauser & Casal, 2004). Fototropismus je proces, při kterém dochází k reorientaci růstu rostlinných orgánů rostlin tak, aby byly ideálně vystaveny světlu a byl tak maximalizován

jejich potenciál. Právě v procesu fototropické odpovědi na modré světlo reaguje přímo na fototropin 1 NPH3 protein a dále ovlivňuje biosyntézu auxinu (Goyal *et al.*, 2016).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Polozakrslé vysokoplodící variety sóji

R. L. Cooper roku 1985 ve své knize s názvem *Plant Breeding Reviews* zmínil, že vliv pěstování polozakrslé rýže a pšenice již dokázal svou důležitost a také podle něj právě tyto plodiny stojí za úspěšností Zelené revoluce (Green Revolution). V této knize věnuje jednu kapitolu šlechtění polozakrslé sóji, jelikož je jedním z prvních, kdo se tomuto neobvyklému fenotypu ve spojených státech věnoval a uvádí, že by bylo vhodné maximalizovat jeho potenciál (Cooper, 1985). Sója (*Glycine max*) ve všech svých podobách je velmi důležitou agronomickou plodinou, která má vysoký obsah bílkovin a oleje. Své využití nachází mimo jiné hlavně jako krmivo pro hospodářská zvířata, potravina a surovina pro lisování oleje (Mathieu *et al.*, 2009).

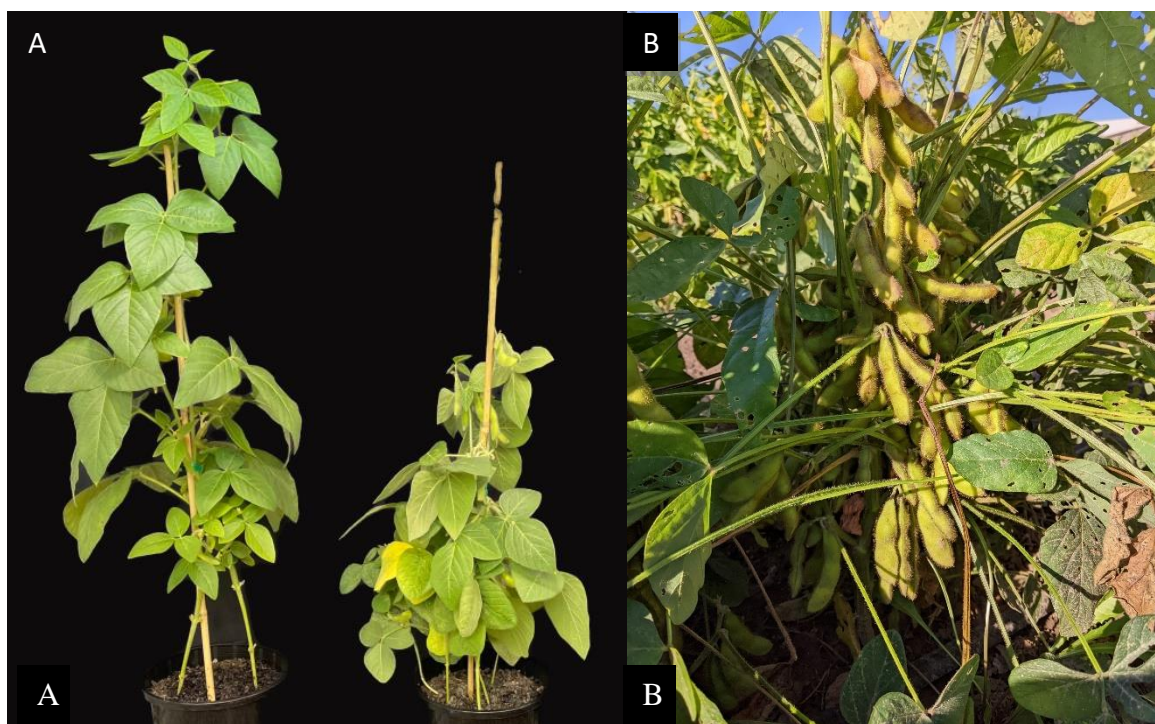
Výška rostlin je dána komplexní sítí genů, které ve většině případů ovlivňují syntézu fytohormonů a následně přenos jejich signálu. Gibereliny a brassinosteroidy jsou hlavními hormony, které ovlivňují výšku rostlin. Mutace genů v biosyntetické dráze právě těchto dvou hormonů má vždy za následek redukcí výšky (Cheng *et al.*, 2016).

Vedle hormonální regulace výšky rostliny hrají roli také geny zralosti a geny ovlivňující architekturu stonku. Jedním z nich je *E1*, který má vliv na dobu počátku kvetení a dozrávání. Funkční gen zpožďuje začátek kvetení a recesivní alela je zodpovědná za brzké kvetení (Miranda *et al.*, 2020). Gen *Dt1* má vliv na architekturu stonku rostlin. Recesivní alela předčasně ukončuje růst apikálního stonku, což má za následek nižší vzrůst a počet nodů (Liu *et al.*, 2010). Dr. Cooper zkřížil severní vysoký popínavý typ sóji s genetickým pozadím *Dt1e1* s jižním nepopínavým typem, který nesl genotyp *dt1E1*. Také se snažil zakomponovat vlastnost raného kvetení. Následně vyseletoval jedince s recesivními alelami *dt1e1*, kteří byli asi o 30 centimetrů nižší než nejlépe komerčně prodávané odrůdy. Polozakrslé variety ale neprosperují nejlépe ve stejných podmínkách, jako variety elitní. Zjistil, že tyto linie dosahují maximálního výnosu, pokud jsou zasety před 15. květnem a jednotlivé rostliny jsou sázeny v bližším uspořádání s mezerami asi 18 cm (www.ilsoyadvisor.com).

V 60. letech minulého století se přístup k pěstování sóji začal měnit. Bylo požadováno, aby rostlina sice vyrostla do určité výšky, ale nepřekonalala hranici, kdy je náchylná k poničení vlivem nepříznivého počasí. Právě výška sóji je jednou ze zásadních bariér v efektivním pěstování. Vysoké variety sice mají větší množství větví a tím pádem také

plodí vyšší počet lusků, ale často poléhají vlivem silného větru a deště, a nezáleží na tom, že mají více semen, když se jejich stonek zlomí a sója nedozraje. Polozakrslé fenotypy (Obr. 1) jsou tedy pěstители sóji vyžadované nejen kvůli nižšímu vzrůstu, ale také kvůli vyššímu výnosu, když se pěstují v užším uspořádání, než je obvyklé (www.ojc.com).

V poslední řadě je také důležité se zamyslet nad tím, zda má polozakrslá rostlina stejný počet větví, jako klasická sója. Logicky se může zdát, že čím má rostlina nižší vzrůst, tím bude mít také méně větvení a méně lusků. Dong *et al.* (2020) ale ve svém výzkumu uvádějí, že počet uzlin neboli nodů, které následně udávají počet větví, byl na hlavním stonku sóji u polozakrslých variet 16-18 a u vysokých variet 18-20, což nepředstavuje takový rozdíl vzhledem k tomu, že polozakrslá sója dorůstá asi do 50–75 % výšky typické dospělé rostliny. Polozakrslá sója má totiž zkrácená internodia a nebyla tak nalezena korelace mezi výškou rostliny a počtem nodů.



Obr. 1 A. Rostlina polozakrslé variety (vpravo) s výškou dosahující asi 50% výšky divokého typu (vlevo). Obě rostliny ale mají vzhledem k rozdílu ve výšce stejný výnos. Převzato a upraveno z pursuit.unimelb.edu.au. B. Polozakrslá vysokoplodící varieta sóji luštinaté (*Glycine max*). Foto: Mária Škrabišová.

Spielmeier *et al.* (2002) ukázali, že hlavní alelou, která podmiňuje zakrslý vzrůst rýže je *sd-1*. Tento fenotyp je významně spojen se zakrslými odrůdami a nedostatkem růstových hormonů giberelinů. V případě genotypu *sd-1* se totiž nachází mutace v genu GA20-oxidasy (giberilin20-oxidasa), jež se uplatňuje při syntéze giberelinů. Nedostatek giberelinů, který je způsoben sníženou aktivitou GA20-oxidasy (EC:1.14.11.-) způsobuje zakrslý vzrůst a zvýšený výnos rýže (Spielmeier *et al.*, 2002).

Zakrslé variety pšenice se také vyznačují vyšším výnosem a nižší náchylností k poničení vlivem větru a deště. Tyto rostliny totiž abnormálně reagují na hormon giberelin. Mutantní alely se nachází na lokusech *Reduced height-1 (Rht-B1 a Rht-D1)*. Tyto geny se podobají jaderným transkripčním faktorům a uplatňují se v signalizaci giberelinu, která je u zakrslých odrůd narušená (Peng *et al.*, 1999).

Na rozdíl od těchto dvou zemědělských plodin, rostlinný hormon auxin sice ovlivňuje výšku rostliny, ale výnos sóji není přímo ovlivněn zvýšením transportu či biosyntézy auxinu (Li & Chen, 2023). Z toho tedy vyplývá, že architektura sóji podmíněna hormonální regulací není pro výnos přínosná.

2.1.1 Architektura stonku

U sóji je rozlišováno několik znaků architektury stonku, kde hlavním je znak mající vliv na výšku rostliny v době dozrávání. Tomuto znaku se říká terminace apikálního stonku a v závislosti na tom, kdy u sóji dochází k terminaci růstu nadzemní části, rozlišujeme dva základní typy stonků: ukončený a popínavý (Obr. 2) (Ting, 1946). Některé publikace také zmiňují rostliny s polopopínavým stonkem, které mají určité vlastnosti každého z fenotypů (Liu *et al.*, 2016). Apikální meristém na vrcholku stonku a větví popínavého fenotypu je aktivní do té doby, než začnou být produkty fotosyntézy využívány zejména zrajícími semeny a zastaví se tak rozvoj vegetativních orgánů. Do té doby jsou vzrostlé vrcholy prodlužovány do výšky a stonek roste i laterálně. Vzniká stonek, jehož tloušťka se zužuje od základny ke špičce. Na rozdíl od toho je aktivita apikálních meristémů ukončeného fenotypu zastavena krátce po zahájení kvetení a z meristémů se stávají reprodukční květenství. To obecně vytváří tlustý stonek, jelikož u tohoto typu pokračuje růst do šířky i po ukončení růstu délkového (Tian *et al.*, 2010; Ping *et al.*, 2014).



Obr. 2 Rozdíl ve fenotypu *G. Max* s ukončeným stonkem (A) a *G. Soja* s popínavým stonkem (B). Převzato z Kofsky *et al.*, 2018.

Za typ stonku jsou u sóji zodpovědné dva geny *Dt1* a *Dt2*, které ovlivňují předčasné ukončení růstu apikálního stonku, což má za následek nižší vzrůst a počet uzlů (Bernard, 1972). Fenotyp popínavého stonku je dán recesivními alelami *dt2dt2* a dominantními alelami *Dt1Dt1* a polopopínavý fenotyp má ve svém genetickém pozadí pouze dominantní alely *Dt2Dt2*, *Dt1Dt1*. Tyto dva fenotypy jsou dány jasnou a jedinou kombinací alel, kdežto u fenotypu ukončeného stonku to není tak jednoznačné, jelikož je podmíněn kombinací *Dt2Dt2*, *dt1dt1* i *dt2dt2*, *dt1dt1*. Tato skutečnost může naznačovat recesivní epistatický efekt genu *dt1* na *Dt2/dt2* lokus (Liu *et al.*, 2016).

Fenotyp ukončeného stonku je u divokého předka Sójí luštinaté (*Glycine max*) *Glycine soja* neexistující nebo velmi vzácný, tedy typicky je *G. soja* popínavá. Ukončený stoněk je charakteristický pro domestikované variety *Glycine max* (Tian *et al.*, 2010).

2.1.1.1 Ukončený růst apikálního stonku

Zdá se, že nefunkční *dt1* spolu s *e1* je hlavní determinantou polozakrslých vysokoplodících variet sóji. Alela *Dt1*, která se vyskytuje u rostlin s fenotypem popínavého stonku má čtyři exony a kóduje homolog proteinu TFL1 (terminal flower 1) z *Arabidopsis*. Když je alela *Dt1* funkční, je podporován pokračující růst stonku do výšky i po nasazení květů, kdežto nefunkční alela *dt1* podmiňuje náhlé ukončení růstu stonku po začátku kvetení. Tian *et al.* (2010) a Liu *et al.* (2010) identifikovali čtyři missense alely: *dt1* (R62S), *dt1* (P113L), *dt1* (R130K) a *dt1* (R166W) (Obr. 3), které jsou zodpovědné za ukončený fenotyp architektury stonku sóji, jelikož mají kauzální SNP (single nucleotide polymorphism = jednonukleotidový polymorfismus) mutaci, kde je jeden nukleotid vyměněn za druhý v oblasti kódujícího regionu (Langewisch *et al.*, 2014).

Alela	Polymorfismus s porovnáním vůči Williams 82	Změna proteinu
<i>dt1</i> (R62S)	SNP: C/A (Gm19: 44981190)	R62S
<i>dt1</i> (P113L)	SNP: G/A (Gm19: 44980245)	P113L
<u><i>dt1</i> (R130K)</u>	SNP: C/T (Gm19: 44980194)	R130K
<i>dt1</i> (R166W)	SNP: T/A (Gm19: 44980087)	R166W

Obr. 3 Funkční *Dt1* alela podmiňuje pokračující růst stonku i po zahájení kvetení, kdežto alela *dt1* je typická pro ukončený fenotyp stonku, kdy je růst zastaven po zahájení kvetení. Byly charakterizovány čtyři nesmyslné (missense) alely zodpovědné za ukončený fenotyp stonku. Převzato a upraveno z Langewisch *et al.* (2014).

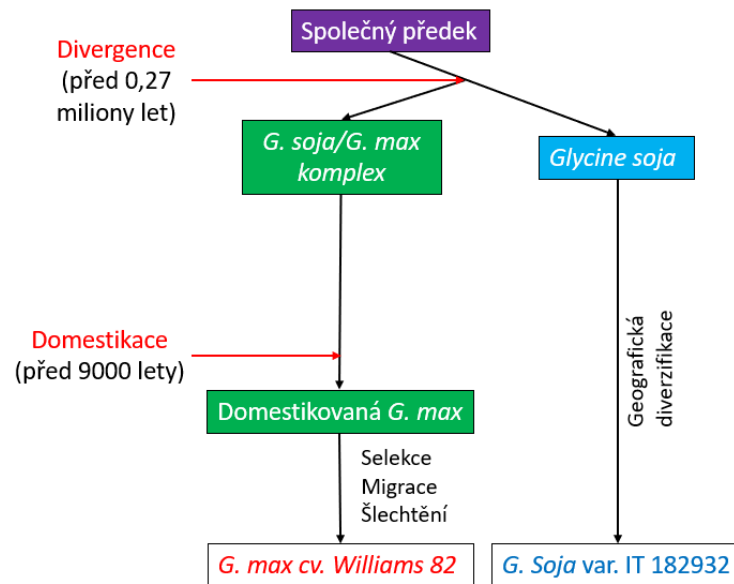
V genomu *G. Soja* nejsou na lokusu *Dt1* žádné mutace přítomné. Při procesu domestikace bylo eliminováno více než 80 % vzácných alel, což musí být výsledkem záměrného umělého výběru (Tian *et al.*, 2010). Podle hypotézy se začala sója domestikovat v Číně, ale nebylo jasné kde. Hymowitz (1970) uvedl, že se tak mohlo stát v oblasti severo-východu Číny. Nedávná studie, kde byla analyzována genetická struktura a diverzita sbírky čínské sóji však přinesla poznatek, že odrůdy získané z regionu okolo středního a dolního toku Žluté řeky poskytly vysokou genetickou diverzitu. Je tedy zřejmé, že alely *Dt1* a *dt1* se rapidně šířily, fixovaly a adaptovaly na lokální regiony. Čína tedy byla rozdělena na severní region, kde převládaly variety s *Dt1* (82 %), střední region, kde byla distribuce alel 50/50 a jižní region s převládající alelou *dt1* (81 %) (Tian *et al.*, 2010).

Kim *et al.* (2022) ve své studii provedli analýzu genotypu, kde sledovali shodu mezi čtyřmi různými typy *dt1* alel a pozorovanými fenotypy. Tyto alely vznikly nezávisle na sobě v geograficky izolovaných oblastech (Tian *et al.*, 2010). Jako nejsilnější se v alele *dt1* jevila mutace R166W, jelikož z 528 vstupů *G. Max*, které byly zadány do analýzy, byl ukončený fenotyp stonku pozorován u 84 % z nich.

2.1.2 Elitní variety s vysokým výnosem

Jedním z nejdůležitějších úkolů šlechtění sóji je vytvářet variety, které budou mít co nejvyšší výnos. Většina šlechtitelských programů vyvíjí elitní genotypy, které jsou adaptovány na normální rozsah podmínek v cílové oblasti. Tyto elitní linie mají podobné základní alely, které zajišťují požadované vlastnosti rostlin, jako je rezistence vůči patogenům a přizpůsobení podmínkám v cílových regionech, kde jsou pěstovány. Jejich genetická výbava je složitá a křížením těchto elitních linií vznikají nové variety prostřednictvím rekombinace s minimálním rizikem zavedení vlastností, které jsou nežádoucí (Falk, 2010). Na druhou stranu se objevují hypotézy, že se elitní linie stále více podobají, což má za následek genomové oblasti s fixními geny. Fixací se rozumí změna v genovém fondu sóji, kde jedna z alel vymizí, zůstane pouze ta druhá a snižuje se tak diverzita (Li *et al.*, 2014). Aby k tomu nedošlo, je nutné vytvářet nové elitní linie, do kterých budou zavedeny exotické alely jak z *G. Max*, tak z *G. Soja*, které mohou potencionálně elitní kultivary vylepšit (Viana *et al.*, 2022).

Divoká sója (*G. soja*), která pochází z východní Asie má mnoho lusků, vysoký obsah proteinů a také se skvěle adaptuje ve stresových podmínkách. *G. soja* byla poprvé domestikována v Číně, a právě z tohoto předka byla vyšlechtěna dnes hojně používaná *Glycine max* a všechny její elitní kultivary (Obr. 4) (Wang *et al.*, 2013; Wen *et al.*, 2015).



Obr. 4 Schéma, které zaznamenává historický průběh domestikace Sójí luštinaté (*Glycine max*). Převzato a upraveno z Kim *et al.* 2010

Mimo *G. soja* a elitních kultivarů *G. max* existuje velké množství různých odrůd sóji, kdy každá má své specifické genetické pozadí a fenotyp. Zejména pro rozšíření diverzity sóji jsou tyto odrůdy se specifickými vlastnostmi zaznamenávány pod příslušnými PI (Plant Introduction) čísly. O toto začleňování se stará pracoviště U.S. National Plant Germplasm System, které spadá pod Ministerstvo zemědělství v USA a stará se o udržení genetické diverzity významných hospodářských plodin (<https://www.ars-grin.gov/npgs>). PI odrůdy mohou obsahovat některé požadované vlastnosti, které však většinou bývají v genomu v malé frekvenci a mohou být provázané s nežádoucími geny vlivem vazebné nerovnováhy (linkage disequilibrium) (Smalley, 2004).

Šlechtění sóji se kromě země původu rozvíjelo zejména v Severní Americe a Kanadě, kde začalo být standardem rozlišovat sójové odrůdy podle jejich odpovědi na fotoperiodu a adaptaci na místo pěstování, jelikož je sója krátkodenní rostlina. Byly proto vytvořeny třídy zralosti (MG = maturity groups, Caldwell & Howell, 1973). Je rozlišováno 13 MG, kde do skupiny označované jako první, MG 000 spadají odrůdy s brzkou zralostí, které jsou adaptované na dlouhé dny a krátká léta, tedy na podmínky, které se vyskytují více na severu. Na druhé straně škály je skupina X přizpůsobená krátkým dnům v tropických regionech (Poehlman, 1987).

Většina elitních linií pěstovaných v USA se řadí do MG 0-V. Vhodná volba MG však záleží na zeměpisné šířce, tedy na konkrétní geografické lokalitě, kde je právě sója pěstovaná (Langewisch *et al.*, 2017). V České republice, podobně jako v Kanadě, Polsku a Švýcarsku, je pěstována sója MG 000 – II, jelikož se tyto země nachází v podobné zeměpisné šířce. Byla studována odolnost určitých odrůd vůči chladu, kde nejlépe uspěly rostliny tříd zralosti 00 a 0 (Yamaguchi *et al.*, 2018). Song *et al.* (2019) ve svém článku zmiňují také MG 0000. Variety, které se řadí do této MG prosperují i při podmínkách velmi dlouhých dnů v severních oblastech zeměpisné šířky.

2.1.2.1 *E* geny (lokusy)

Jak již bylo zmíněno, sója je krátkodenní rostlina, která je citlivá na fotoperiodu a kvetení rostlin je indukováno podmínkami dlouhého dne (Watanabe *et al.*, 2012). *E* geny jsou těmi nejdůležitějšími, které ovlivňují kvetení a dozrávání. Bylo identifikováno 11 hlavních lokusů, ve kterých se nachází geny *E1* – *E10* a gen *J*, kde většina z nich byla identifikována jako orthology známých genů kvetení *Arabidopsis* (Cao *et al.*, 2017; Dietz *et al.*, 2022). Dominantní alely *E* genů až na výjimky způsobují pozdější kvetení a

dozrávání. U *E6*, *E9* a *J* naproti tomu citlivost vůči fotoperiodě klesá s přibývajícím počtem recesivních alel (Miladinović *et al.*, 2018).

Hlavním genem, který ovlivňuje kvetení a dozrávání sóji je *E1*, který je transkripčním faktorem a potlačuje expresi klíčových hormonů, jež jsou nutné pro zahájení kvetení. Dominantní funkční alela *E1* může zpozdít kvetení o 18 dní a dozrávání až o 23 dní ve srovnání s částečně funkční alelou *e1-as*, která je nejčastější. Nefunkční alely *e1-fs* a *e1-nl* podmiňují ještě dřívější kvetení a mohou přispívat k nízké citlivosti vůči fotoperiodě (Dietz *et al.*, 2021).

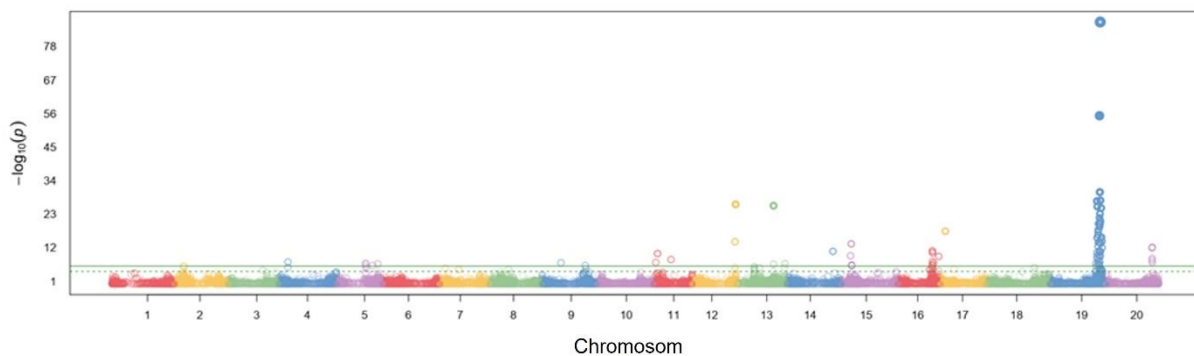
2.1.3 Hledání kandidátních genů pro Polozakrslé vysokoplodící variety sóji

Z celkových 21 tisíc variet sóji, které jsou uvedeny v genobance GRIN, existuje pouze 25 variet (MG II až IV) s polozakrslým vysokoplodícím fenotypem (Obr. 5), který se projevuje při pěstování v blízkém uspořádání. Tyto variety mají nesmyslnou (missense) mutaci R166W v genu *Dt1*, který, jak již bylo zmíněno výše, zodpovídá za architekturu stonku a právě tato mutace předčasně ukončuje jeho růst (Liu *et al.*, 2010). Vzhledem k vysokému potenciálu těchto variet pro budoucí křížení je snahou identifikovat další geny, které vedle *Dt1*, *E1* a *FT2b* způsobují tento fenotyp.



Obr. 5 Některé z polozakrslých vysokoplodících variet sóji luštinaté. Na obrázku můžeme vidět také referenční varietu Williams 82 a kontrolní varietu Young, která má mutantní alelu *dt1*. Přiložený metr ukazuje výšku rostlin v cm. Foto: Kristin Bilyeu.

Aby byly odhaleny dodatečné geny podmiňující významný fenotyp těchto 25 polozakrslých variet, byla provedena analýza asociace genotypu na fenotyp metodou GWAS (Obr. 6). Do této analýzy bylo jako mutantní genotyp zahrnuto těchto 25 polozakrslých variet MG II, III a IV s ukončeným fenotypem stonku. Divoký typ zastupovalo 2315 genotypů s popínavým fenotypem stonku MG III a IV (homogenní pozadí zajistila mutantní alela *el-as* (Dietz *et al.*, 2021)). Pro genotypizaci byl použit SoySNP50K Illumina bead chip (Song *et al.*, 2015). Nejsilnější signál byl logicky pozorován na chromosomu 19, který náleží genu *Dt1* – jde o alelu R166W, která je v kombinaci s *El* zodpovědná za polozakrslý vysokoplodící fenotyp. Byly sledovány i další signály na chromosomech 13, 16 a 20 s nižší mírou statistické významnosti. Signál na chromosomu 16 byl přiřazen genu *FT2b*, který propaguje kvetení za podmínek dlouhého dne (Li *et al.*, 2020). S pomocí bioinformatického nástroje AccuTool (Škrabišová *et al.*, 2022; soykb.org/AccuTool/index.php) byly asociované oblasti podrobeny analýze přesnosti (Accuracy concept, Škrabišová *et al.*, 2022). Na základě výsledků analýzy přesnosti (nejsou součástí této práce), byl v asociované oblasti na chromosomu 13 identifikován jako kandidátní gen *Glyma.13g221200* s anotovanou funkcí proteinu, který se řadí do NPH3 rodiny s potenciální rolí při procesu fototropické odezvy rostlin (Wu *et al.*, 2017; Bu *et al.*, 2021).



Obr. 6. Manhattan plot jako výstup GWAS analýzy se smíšeným lineárním modelem (Mixed Linear Model, MLM). Je vyobrazena závislost $-\log_{10}P$ hodnoty na pozici SoySNP50 Illumina bead chip markeru u datasetu, kde je divoký typ je reprezentován 2315 vstupy z MG III a IV a mutantní genotyp zastupuje 25 vstupů polozakrslých variet MG II, III a IV. Výsledek zobrazuje asociované oblasti na všech dvaceti chromosomech sóji (Škrabišová, nepublikováno).

2.1.4 Studium předpovězených funkcí proteinů

S rozvojem metod sekvenování genomů je třeba anotovat stále více sekvencí, které zatím nebyly analyzovány. Jednou z důležitých rolí bioinformatiky je predikce, která se provádí pomocí výpočetních metod pro nalezení genů kódujících proteiny (Wang *et al.*, 2004).

Když je nový gen anotován, je dále nutné ověřit správnost anotace a následně i funkci proteinu, který kóduje. Jedním ze způsobů, jak lze ověřit předpokládanou funkci určitého proteinu, je umlčení exprese jeho genu, tzv. gene silencing. Je mnoho způsobů, kterými lze umlčení dosáhnout, ale právě u sóji jsou všechny tyto způsoby limitované efektivitou transformace sóji pomocí *Agrobacteria* (Trick & Finer, 1998). Různé druhy *Agrobacteria* mají schopnost přenést část DNA z plasmidu do genomu hostitelské buňky. Úsek přenášené genetické informace je T-DNA (transferová DNA), která narušuje čtecí rámec genu a tím způsobuje jeho umlčení (Amilia Pratiwi a Surya., 2020). Pro analýzu funkce genu je nejčastěji používáno posttranskripční umlčení genů. Dalšími běžně využívanými metodami je umlčení genů pomocí RNAi (RNA interference), umlčení vyvolané viry (VIGS) (Pandey *et al.*, 2015) nebo využití systému CRISPR/Cas (El-Sappah *et al.*, 2021).

Umlčení genů může být také indukováno chemickou mutagenezí, například ethyl methansulfonátem (EMS) (Jankowitz-Cieslak & Till, 2016). Jedná se o velmi efektivní a účinnou metodu zavedení mutací do genomu rostliny. EMS je alkylační činidlo, které působí na DNA při procesu replikace a poškozuje genetickou informaci (Kodym & Afza, 2003). Ve většině případů dochází k vytvoření jednonukleotidových polymorfismů (SNP), kdy dochází ke změně C → G a T → A (Kim *et al.*, 2006). Mezi nechemickou mutagenezí můžeme zařadit indukci delecí pomocí neutronů (fast neutron mutagenesis). Při této metodě jsou semena ostřelována proudem neutronů, což vytváří delece v genech. Po dozrání generace M1 je zasazena generace M2. Semena jsou propagována do další generace, jejíž materiál je následně využit pro ověření přítomnosti vnášených mutací a případné selekci individuálních mutantních genotypů (Li & Zhang, 2002).

Jak již bylo zmíněno, jedním ze způsobů studia této interakce, je inserční mutageneze, která je jednou z metod reverzní genetiky. Ukázalo se, že tato metoda je cenným nástrojem reverzní genetiky. Integrace T-DNA (transferové DNA) do rostlinného genomu vede ke stabilním mutacím, které narušují funkci studovaného genu vedoucí k vyřazení proteinu kódovaného nefunkčním genem z funkce, čímž je sledována změna ve fenotypu. Populární strategií, jak určit pozici T-DNA inserce je generování tzv.

flanking sequences (přilehlých sekvencí), což jsou kratší nukleotidové sekvence lemující insert v určitém genu. Pro vytvoření těchto sekvencí jsou používány metody na principu PCR, kdy jsou sekvence lemující T-DNA amplifikovány a sekvencovány, a insert je takto mapován v genomu (Kleinboelting *et al.*, 2012). Místo vložení T-DNA inserce však nemusí být úplně přesné, což se děje zejména v důsledku překrývajícího se sekvenčního čtení nukleotidů. Skutečné místo vložení insertu se tedy může lišit o 0-300 bp (<http://signal.salk.edu/>).

2.2 Rostliny a jejich vnímání světla

Světlo, tedy elektromagnetické spektrum viditelného světla, je pro rostliny jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů (Carvahlo *et al.*, 2011). Schopnost rostlin vnímat světlo můžeme přirovnat ke způsobilosti živočichů vidět (Smith, 2000). Změny světla mohou být rozhodující pro jejich konkurenci a přežití. Světelné podmínky se v přírodě neustále mění a rostlina zkrátka nemá tu možnost se jednoduše přesunout na jiné stanoviště. Během evoluce se proto vyvinuly mechanismy, které rostlinám dovolují se veškerým podmínkám přizpůsobit. Rostlinná buňka je vybavena sofistikovaným systémem, který je schopen vnímat světlo a přizpůsobit metabolismus organismu daným podmínkám (Karpinski *et al.*, 2003).

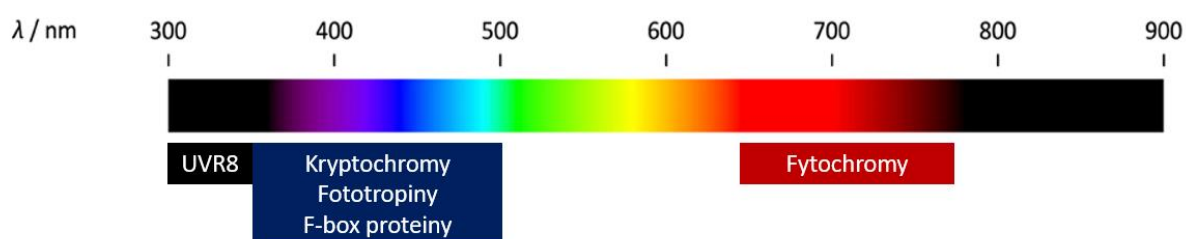
Potřebné fotony, které získávají rostliny ze slunečních paprsků jsou samozřejmě důležité pro fixaci oxidu uhličitého a tvorbu glukosy a energie při procesu fotosyntézy. Organismus je však schopen spotřebovat jen určité množství světelné energie. Přebytečné množství energie se dá vyjádřit jako přebytečná excitační energie (excess excitation energy = EEE) a když její mnoho, může docházet ke vzniku reaktivních forem kyslíku. Světlo však není pro rostliny důležité jen z tohoto důvodu.

Rostliny optimalizují svůj růst a vývoj během celého životního cyklu tím, že vnímají kvalitu, kvantitu, periodicitu a směr světla (Frankhauser & Casal, 2004). Jeho působení je důležité zejména při změně růstu rostliny ze stádia, kdy je pod zemí a světlo není vnímáno a nad zemí, kdy se ze semene stává sazenice. Rostlina takto přizpůsobuje svůj růst podmínkám v okolí (Batschauer, 1998). Je důležité zmínit, že rostliny modifikují svůj růst také podle toho, zda jsou obklopeny jinou vegetací. Ostatní rostlinné organismy v jejich blízkosti jsou pro ně konkurencí jak z hlediska využívání zdrojů z půdy, tak případného stínění. Když je vegetace pěstována v hustém uspořádání, což znamená, že jsou rostliny blízko u sebe, světelné podmínky jsou identifikovány tím, že je zmenšen poměr červeného/vzdáleného červeného světla (R/FR ratio = R/FR poměr), kdy je světlo absorbováno právě přilehlou vegetací. Rostlina takto vnímá stín a přizpůsobuje se podmínkám.

2.3 Fotoreceptory

Okolní světlo je monitorováno pomocí fotoreceptorů, což jsou světlo vnímající proteiny, které dohromady vytváří sofistikovaný systém. Jednotlivé fotoreceptory jsou specifické tím, kterou část viditelného spektra absorbují (Gyula *et al.*, 2003).

Existuje pět hlavních rodin fotoreceptorů (Obr. 7) vnímajících světlo o různé vlnové délce. Fytochromy absorbují červené a vzdálené červené světlo, kryptochromy vnímají světlo v modré a UV-A oblasti a fototropiny také absorbují světlo v modré oblasti. Co se týče paprsků, které jsou pro lidské oko neviditelné, UVR8 receptory vnímají zejména UV-B (Paik & Huq, 2019). Poslední je ZTL (ZEITLUPE) fotoreceptorová rodina, neboli rodina F-box proteinů. Tyto receptory obsahují LOV (light oxygen voltage) doménu. Jsou schopné vnímat světlo modrého spektra a ovlivňují chod cirkadiálních hodin rostlin (Demarsy & Frankhauser, 2009).



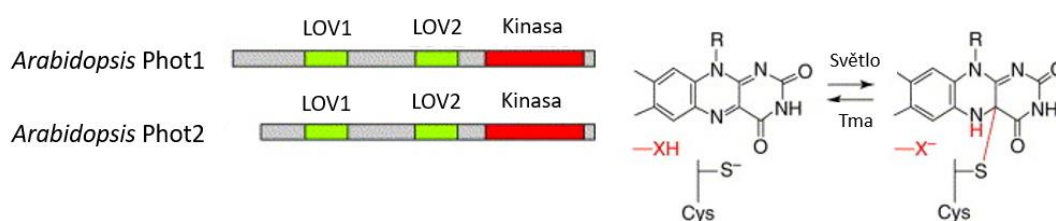
Obr. 7 Pět rodin rostlinných fotoreceptorů a jejich přiřazení ke světelnému spektru podle toho, jako vlnovou délku jsou schopné absorbovat. Převzato a upraveno z Kutschera & Briggs, 2013.

Fotoreceptory celkově vykazují aktivitu v širokém světelném spektru tak, že každý absorbuje určitou vlnovou délku. Odpověď rostliny však není dána tím, že by každý receptor pracoval samostatně, ale jedná se o velmi komplexní systém, kdy spolu jednotlivé fotoreceptory spolupracují a aktivují kaskádu na molekulární úrovni, která vyvolává reakci (Paik & Huq, 2019).

2.3.1 Fototropiny

Rodina fototropinů obsahuje dva proteiny fototropin 1 (phot1) a fototropin 2 (phot2), které absorbují světlo v modré oblasti (390 – 500 nm). Z molekulárního hlediska se jedná o kinyasy, které jsou právě aktivované světlem této vlnové délky.

Molekula fototropinu obsahuje dva flavinmononukleotidy (FMN) jako chromofory na LOV doménách, které se nachází na N-konci proteinu. Phot1 a phot2 obsahují C-terminální serin/threonin kinázovou aktivitu a mohou přímo fosforylovat mnoho substrátů i samy sebe. Díky své unikátní struktuře je umožněna fotochemická reakce, kdy dojde po absorpci modrého světla (BL = blue light) ke změně konformace proteinu, což způsobí autofosforylaci fotoreceptorového proteinu a je zahájena signalizace (Obr. 8) (Briggs a Christie, 2002). Phot1 interaguje s NPH3 (non-phototrophic hypocotyl) a PKS4 (phytochrome kinase substrate 4) proteinem, což dále ovlivňuje downstream signalizaci (Paik a Huq, 2019).



Obr. 8 Proteinové struktury fotoreceptorů *phot1* a *phot2*. Schéma ukazuje LOV (light oxygen voltage) a kinasové domény, které jsou nezbytné pro fosforylaci proteinů na serinu a threoninu. Převzato a upraveno z Briggs & Christie, 2002.

Odpověď rostlin je zprostředkována působením phot1 nebo phot2 nebo také kooperací obou receptorů. Jednou z viditelných odpovědí aktivity fototropinů je například růst nadzemní části mladých semenáčků směrem ke světlu a růst kořene opačným směrem, tedy od zdroje světla. Jak již název těchto receptorů napovídá, ovlivňují hlavně fototropismus způsobený vlivem modrého světla, kdy při nízké intenzitě dochází k ohýbání rostliny směrem ke světlu s vyšší intenzitou. Také se podílejí na migraci chloroplastů v buňce. Chloroplasty jsou při stinných podmínkách, kdy je detekována slabá intenzita modrého světla, orientovány tak, aby byly minimálně ve stínu a dochází k jejich akumulaci v orgánech, které jsou na přímém světle, aby bylo dosaženo maximální aktivity fotosyntézy. Při přílišné intenzitě světla jsou chloroplasty orientovány do zastíněných částí rostliny, aby nedošlo k jejich poničení (Sakamoto & Briggs, 2002; Takemiya *et al.*, 2005). Fototropiny také řídí otevírání a zavírání stomat, což umožňuje vstup CO₂ a vypařování vody vlivem transpiračního proudu (Inoue *et al.*, 2010).

Je nutné se ale také zaměřit na samostatnou odpověď phot1 a phot2, jelikož jak již bylo zmíněno, i když spolupracují, každý z nich funguje trochu jinak. Hlavním rozdílem je, že phot2 reaguje zejména na BL o vysoké intenzitě, kdežto phot1 zprostředkovává fototropickou odezvu při nízkých intenzitách BL. Phot1 také inhibuje růst stonku při vysokých intenzitách světla a uplatňuje se při procesu příjmu vápníku zprostředkovaném modrým světlem. Může mít i menší roli při depolarizaci membrány indukované opět modrým světlem (Briggs & Christie, 2002).

2.3.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou podobně jako fototropiny světelné receptory absorbující záření v modré a UV-A oblasti. Jedná se však o naprosto odlišnou rodinu tří proteinů – cry1, cry2 a cry3. Tyto fotoreceptory spolupracují s fytochromy (receptory červeného světla) při regulaci elongace buněk a kvetení rostlin. Zároveň také spolupracují s fototropiny na otevírání a zavírání průduchů (Li & Yang, 2007).

Hlavní role kryptochromů se uplatňuje při deetiolicaci semenáčků, což je proces, při kterém dochází k rapidnímu nárůstu hypokotylu, rozvoji děložních lístků, zvýšené pigmentaci a organizaci fotosyntetického aparátu. K tomuto procesu dochází při klíčení rostlin, kdy se zárodek hypokotylu dostává z půdy na světlo (Frankhauser & Casal, 2004).

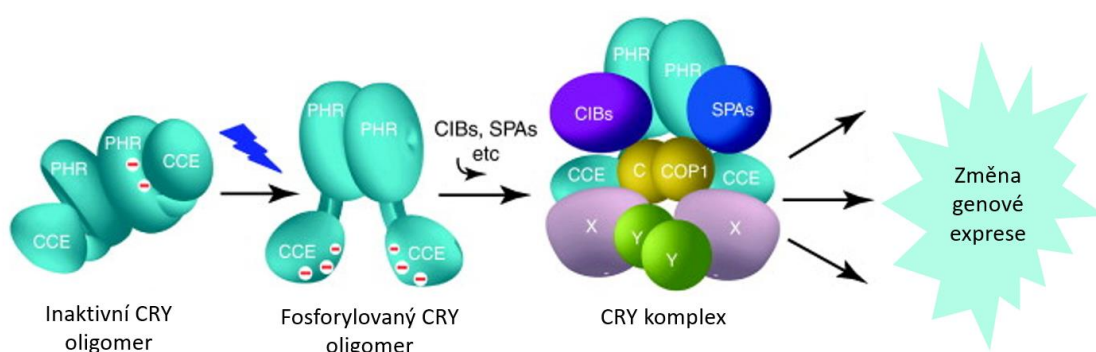
Kryptochromy byly nejprve charakterizovány u *A. thaliana*, kde byla sledována odpověď na modré a UV-A světlo. Li & Yang (2007) sledovali mutanta *Arabidopsis*, který měl T-DNA inserci v oblasti genu *long hypocotyl 4* (HY4), který byl později

přejmenován na *cry1*. Zanedlouho po tomto objevu byly kryptochromy popsány nejen v dalších rostlinách, ale také u hmyzu a savců, kde působí jako fotoreceptory, regulátory transkripce, nebo také jako součást systému, který se podílí na cirkadiálním rytmu organismů.

Sekvence HY4/CRY1 je vysoce homologní k sekvencím kódujícím fotolyázy, což jsou enzymy, které reagují na přítomnost světla a opravují poškozenou DNA, konkrétně 6-4 pyrimidin-pyrimidon dimer vznikající působením světla UV oblasti. CRY1 obsahuje ve své struktuře FAD (flavin adenin dinukleotid), který je primárním chromoforem fotolyázy a kryptochromů, ale postrádá DNA-opravnou funkci charakteristickou právě pro fotolyázy (Wang & Lin, 2020).

Ve vyšších rostlinách funguje mechanismus kryptochromů tak, že dochází k regulaci na úrovni genové exprese. *Cry1* a *cry2* uplatňují svou funkci zejména v jádře buňky. CRY apoprotein je složen ze dvou domén, kdy první doménou je N-terminální region (PHR), který je homologní s fotolyázami. Jako druhá se ve struktuře vyskytuje C-terminální prodloužená doména, která má různé délky a sekvence (CCE). PHR váže nekovalentní vazbou chromofor FAD a v určitých případech může také vázat chromofor MTHF (5,10-methylhydrofolát) (Liu *et al.*, 2011).

Fotoaktivace rostlinných kryptochromů začíná excitací světlem nebo absorpcí fotonu a redukcí FAD. Výsledkem je konformační změna, kterou je odpojení PHR a CCE domény a formace kryptochromových homooligomerů. Ty následně interagují s proteiny, které jsou schopné měnit expresi genů a vývoj rostlin (Obr. 9) (Wang & Lin, 2020).



Obr. 9 Transdukce signálu kryptochromů. U fotoexcitovaného kryptochromu dochází ke změně konformace, aby inicioval přenos signálu na signální proteiny. Podle tohoto modelu dochází k homodimerizaci cry prostřednictvím PHR domén a interakci s partnerskými proteiny. Převzato a upraveno z Liu *et al.*, 2011.

Cry3 není moc dobře prozkoumán a od cry1 a cry2 se liší. Pravděpodobně je uplatňován v chloroplastech a mitochondriích a má odlišnou funkci (Liu *et al.*, 2011).

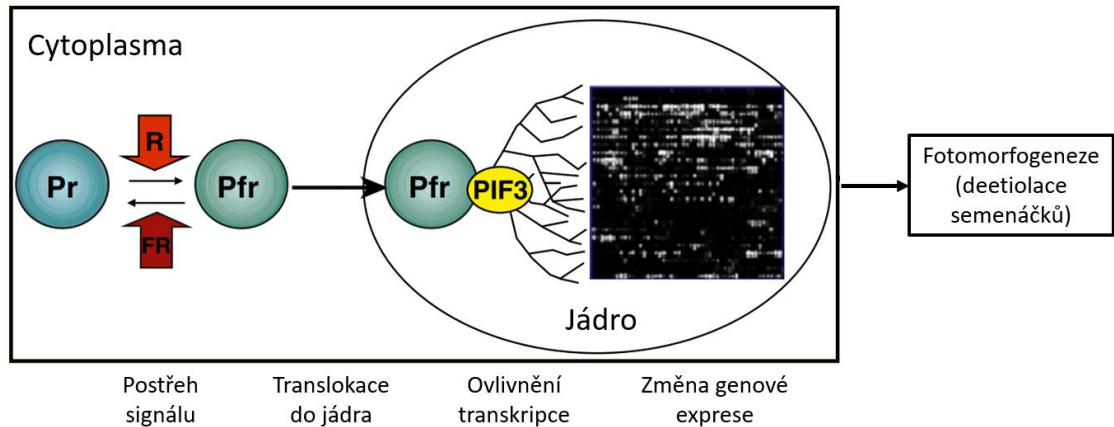
Ačkoli kryptochromy zprostředkovávají různé fotoreakce, inhibice prodlužování hypokotylu je nejrozšířenějším výstupem pro studium těchto fotoreceptorů. Mohou nezávisle regulovat fotomorfogenezii v nepřítomnosti fytochromů, ale tyto reakce jsou často redundantně, koordinovaně nebo antagonisticky regulovány společně dalšími fotoreceptory nebo jinými proteiny (Wang & Lin, 2020). Jak už tedy bylo zmíněno, jednotlivé fotoreceptory mohou pracovat samostatně, ale často se jedná o velmi komplexní proces, což bylo potvrzeno v experimentální části této práce, kde byla z funkce vždy vyřazena právě jedna nebo druhá rodina fotoreceptorů.

2.3.3 Fytochromy

Co se týče fytochromů, jedná se o poslední ze tří základních skupin fotoreceptorů, do které můžeme zařadit několik známých proteinů, kterými jsou fytochromy A – E (phyA–E). Je to rodina fotoreceptorů, které absorbují červené (R = red) a vzdálené červené světlo (FR = far red) a mají esenciální roli při různých morfogenetických a fyziologických odpovědích rostlin (Li *et al.*, 2015). Frankhauser & Casal (2004) ale uvádí, že tyto receptory absorbují světlo napříč celým spektrem viditelného světla a částečně se uplatňují i při vnímání modrého světla.

Funkce jednotlivých fytochromů byla stanovena zkoumáním loss-of-function mutantů *Arabidopsis*, tedy takových jedinců, u kterých je právě daný receptor vyřazen z funkce. Výsledkem těchto experimentů byl poznatek, že největší význam mají phyA a PhyB, dále phyD – phyE a do jisté míry i phyC, které mají spíše redundantní efekt (Frankhauser & Casal, 2004).

Molekula phy je dimer chromoproteinových podjednotek, které se skládají z polypeptidu s kovalentně navázaným bilinovým chromoforem (Quail, 2010). Fytochromy mohou existovat ve dvou formách. Prvním typem je R-absorbující forma, tedy ta, která přijímá červené světlo a označuje se Pr. Vzdálené červené světlo je přijímáno FR-absorbující formou, která se označuje Pfr (Casal *et al.*, 1998).



Obr. 10 Fyziologická fotorecepce rostlina přenos signálu při regulaci fotomorfogeneze semenáčků. Phy molekuly mohou reverzibilně přecházet z konformeru Pr na konformer Pfr vlivem absorpce fotonů červeného (R) či vzdáleného červeného (FR) světla. Po tvorbě Pfr dochází k rychlé translokaci do jádra, kde dochází k interakci s PIF faktory, jako např. PIF3, které iniciují změny v genové expresi a vlivem tohoto mechanismu dochází k přechodu ze skotomorfogeneze na fotomorfogenezi, dochází tedy k deetiologii. Převzato a upraveno z Quail, 2010.

Fytochrom má možnost změnit konformaci z jedné formy na druhou v řádu milisekund. Pr je biologicky neaktivní a nevyvolává další odpověď. V této formě je molekula také syntetizována. Po excitaci světlem se phy nachází v Pfr konformaci, dojde k translokaci do jádra, kde aktivovaná molekula interaguje s PIFs (Phytochrome-interacting transcription factors = transkripční faktory interagující s fytochromy), například PIF3, který vyvolá změnu v genové expresi (Obr. 10). Tento proces je zejména důležitý pro klíčící semena, která mají první kontakt se světlem. Změna genové exprese je kumulována při změně z procesu ze skotomorfogeneze na fotomorfogenezi, tedy kdy hypokotyl semenáčku roste a rozvíjí své vegetativní orgány (Quail, 2010).

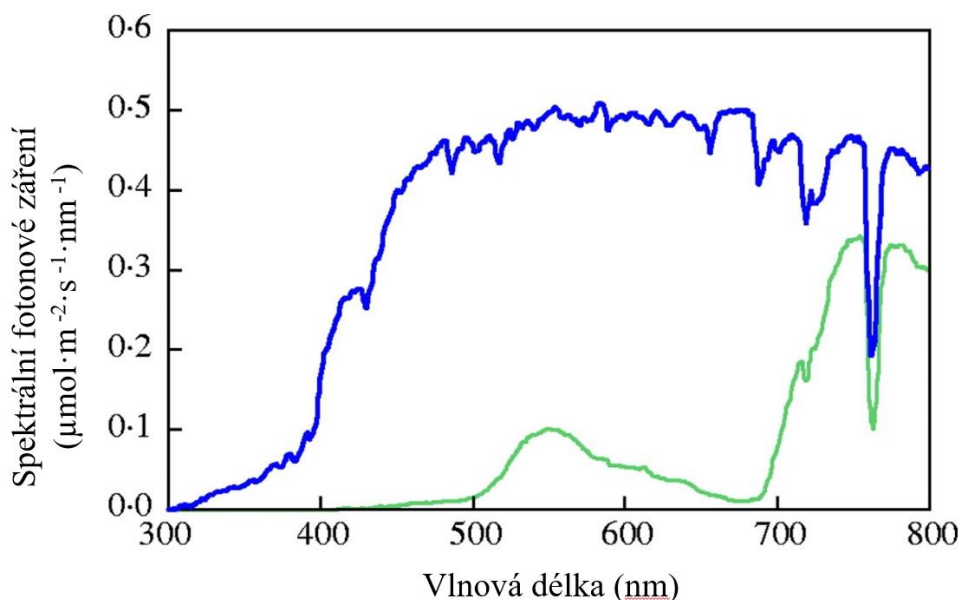
2.4 Rostliny a jejich vnímání stínu

Rostliny získávají svou energii ze světla, a proto je důležité umístění listů tak, aby mohly přijímat co nejvíce fotonů. Často však čelí podmínkám, kdy nemají dostatek světla vlivem stínu, který je způsoben okolní vegetací. V tomto případě má organismus dvě možnosti. Buď se stinným podmínkám přizpůsobí, maximalizuje využití světla v určitých částech i za stinných podmínek a sníží poměr chlorofylu a a b. Druhou možností je se stínu vyhnout, aby bylo možné co nejvíce světla přijímat (Vandenbussche *et al.*, 2005).

Je již delší dobu známo, že rostlina rozpozná stín tak, že se zmenší poměr R/FR světla. Když se organismus nachází ve stínu, vnímá dostatek FR, ale má nedostatek červeného světla (Obr. 11). Na přímém svitu absorbuje rostlina dostatek FR i R světla (Franklin & Whitelam, 2005).

$$R:FR \text{ poměr} = \frac{\text{záření fotonů mezi 655 a 665 nm}}{\text{záření fotonů mezi 725 a 735 nm}}$$

Pokud by rostlina vnímala stín pouze snížením R/FR poměru, hlavní roli v regulaci rostlinného růstu by měly fytochromy. Později ale bylo zjištěno, že je vnímáno také snížení absorpce modrého světla a v tomto procesu jsou zapojeny také kryptochromy (Keuskamp *et al.*, 2012).



Obr. 11 Distribuce spektrálních fotonů denního světla (modrá křivka) a světla, které bylo reflektováno od listů Křídlatky japonské (*Fallopia japonica*, zelená křivka). Můžeme sledovat pokles obou křivek v oblasti vzdáleného červeného světla, což znamená, že rostlinné buňky přijímají dostatek světla této vlnové délky i ve stinných podmínkách. Převzato a upraveno z Franklin & Whitelam, 2005.

Syndrom vyhýbání se stínu (SAS = shade avoidance syndrom) je proces, kterým rostlina dopovídá na stinné podmínky. SAS je charakterizován elongací hypokotylu, zmenšenou expanzí listů a sníženým větvením (Sorin *et al.*, 2009). Další viditelnou odpovědí bývá také orientace listů nahoru neboli hyponastie, kdy dojde ke zvýšení úhlu mezi povrchem a listy. Dlouhodobé vystavení stínu indukují předčasné kvetení a tvorbu semen. Toto chování je považováno za tzv. mechanismus úniku, kdy je celkově zkrácena doba růstu jedné generace za účelem vzniků generace druhé (Vandenbussche *et al.*, 2005).

Jak již bylo zmíněno, stín je zejména vnímán poklesem R/FR poměru. Je tedy jasné, že v biologické odpovědi rostlin na stín budou dominovat fytochromy, tedy fotoreceptory absorbující záření v oblasti červeného a vzdáleného červeného světla. Franklin & Quail (2010) uvádí, že převládajícím fytochromem řídícím SAS je phyB. Při použití *phyB* knock-down mutanta je však nějaká odpověď stále viditelná, a proto se předpokládá redundantní funkce phyD a phyE. Vysoký poměr R/FR, tedy nestinné podmínky, aktivují phyB do stavu Pfr. Dochází k translokaci do jádra, kde se protein váže na PIFs přes aktivní fytochromovou vazebnou doménu (APB), což způsobí změny PIF faktorů, jako fosforylaci, ubiquitinaci a degradaci. K odpovědi tedy nedochází, jelikož rostlina ve stínu není a nemá tedy proč na něj reagovat. Nízký poměr R/FR způsobuje konverzi Pfr na Pr, dojde k uvilnění PIFs, které jsou akumulovány a způsobí prodlužování hypokotylu (Fraser *et al.*, 2016).

Bylo by také vhodné zmínit, jaký má v tomto procesu roli PhyA. Tento fotoreceptor je na světle labilní, a proto jeho funkce není příliš uplatněna u dospělých plně deetiolovalých rostlin (Franklin & Quail, 2010). V mladých semenáčcích však antagonizuje prodlužování hypokotylu vlivem nízkého poměru R/FR. Je tedy negativním regulátorem skotomorfogeneze, kdežto na druhou stranu je PhyB pozitivním regulátorem fotomorfogeneze (Kazan & Manners, 2011).

2.4.1 Fototropismus

Světlo a gravitace se řadí k nejdůležitějším environmentálním parametrům, které mají vliv na růst a vývoj rostlin (Molas & Kiss, 2009). Fototropismus můžeme definovat jako asymetrický růst rostliny odpovídající na určité podmínky, který umožňuje organismu optimálně umístit jeho orgány (Goyal *et al.*, 2016). Dochází k tedy k fototropické reorientaci, aby se mohla rostlina přizpůsobit podmínkám. Obecně platí, že stonek nebo hypokotyl roste směrem ke světlu a pryč od gravitace (fototropismus), kdežto kořen roste směrem od světla, což můžeme označit jako negativní fototropismus, ale směrem ke

gravitaci (gravitropismus). V rostlinách tedy existuje určitá soutěživost mezi těmito dvěma silami a jejich odpověďmi. Již Charles Darwin ve svém díle *The Power of Movement in Plants* (1880) prohlásil, že mladé stonky umísťují své listy tak, aby mohly být dobře osvětlené, a popisuje záhladnou látku, která je přenášena z vrcholu semenáčku, kde je vnímáno světlo, do spodní části, kde lze pozorovat odezvu, při které dochází ke změně směru růstu.

U vyšších rostlin je vnímání směru světla zprostředkováno fotoreceptory absorbujícími modré světlo, jako jsou fototropiny (Phot1 a Phot2) a kryptochromy (Cry1 a Cry2) (Molas & Kiss, 2009).

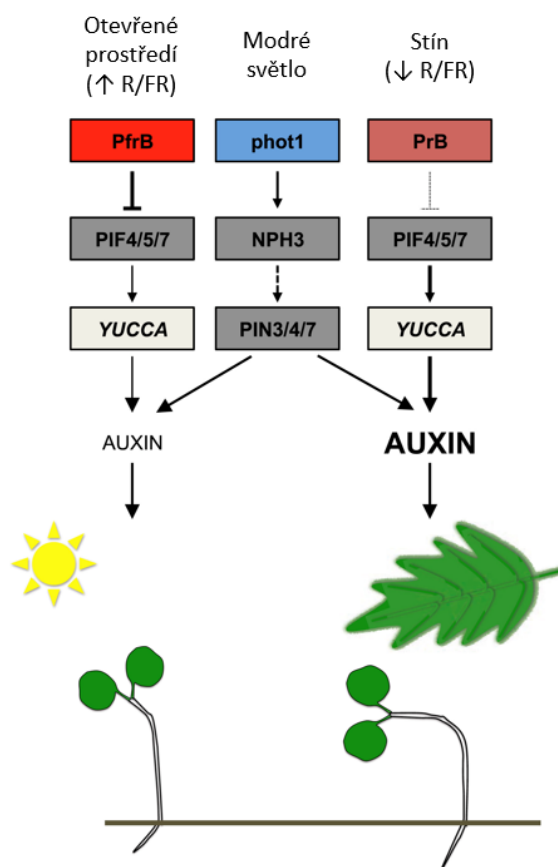
Sakai *et al.* (2001) provedli studii knock out mutantů *Arabidopsis*, tedy takových rostlin, které mají nefunkční gen *phot1*, dříve označovaný také jako *nph1* (nonphototropic hypocotyl 1) nebo *phot2*, dříve označovaný jako *npl1* (nonphototropic hypocotyl 1-like) anebo má rostlina vyřazený z funkce oba geny. Oba tyto receptory mají vliv nejen na fototropismus, ale také na pohyb vlivem akumulace chloroplastů. Bylo zjištěno, že Phot1 je primárním fotoreceptorem, jelikož *phot2* mutanti vykazují ohyb směrem k unilaterálnímu modrému světlu. U *phot1* mutanta byla pozorována fototropická odpověď pouze u vyšších intenzit modrého světla ($1-100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Funkce Phot1 a Phot2 se tedy překrývá pouze při vyšších intenzitách. Downstream od *phot1* se v kaskádě nachází gen *nph3*, který má rovněž vliv na fotoropismus. Goyal *et al.* (2016) zařadili do svého experimentu také *nph3* knock out mutanta a pozorovali, že při stinných podmínkách došlo k ohybu hypokotylu mutanta směrem k modrému světlu, kdežto při podmínkách na přímém svitu se hypokotyl neohnul. Tento gen zřejmě spolupracuje s PIN proteiny (PIN-formed = sekundární přenašeče auxinu), které ovlivňují gradient auxinu.

Vliv kryptochromů na fototropismus byl také zkoumán pomocí knock out mutantů. Výsledky ukázaly, že mutantní rostliny, které postrádají funkci kryptochromů vykazovaly zmenšenou schopnost ohybu k modrému světlu, kdežto nadexprimované rostliny byly vůči světlu hypersensitivní. Zhao *et al.*, (2019) také naznačují, že jsou kryptochromy pro fototropismus u *Arabidopsis* nezbytné, ale jejich odpověď závisí na podmínkách a je nezávislá na fototropinech. Jelikož bylo zjištěno, že degradaci Cry2 indukuje právě světlo, autoři navrhují, že při ohýbání hypokotylu za podmínek vysoké intenzity světla se při procesu zásadně uplatňuje Cry1.

Nenjen fotoreceptory absorbující modré světlo, ale i fytochromy, tedy receptory R/FR záření se výrazně podílejí na rostlinném fototropismu. Goyal *et al.* (2016) zkoumali vliv fytochromů na fototropismus u zelených (deetioloovaných) semenáčků. Jejich

experimenty, které byly provedeny jak v laboratorních, tak i terénních podmínkách odhalily, že phyB inhibuje fototropismus při vysokém poměru R/FR tím, že kontroluje aktivitu PIFs. Na druhou stranu zaházení fototropické odpovědi, je závislé na neaktivitě phyB při nízkém poměru R/FR, kdy je vyvolána indukce genu z *YUCCA* rodiny právě pomocí PIFs, což vede k produkci auxinu v děložních lístcích (Obr. 12).

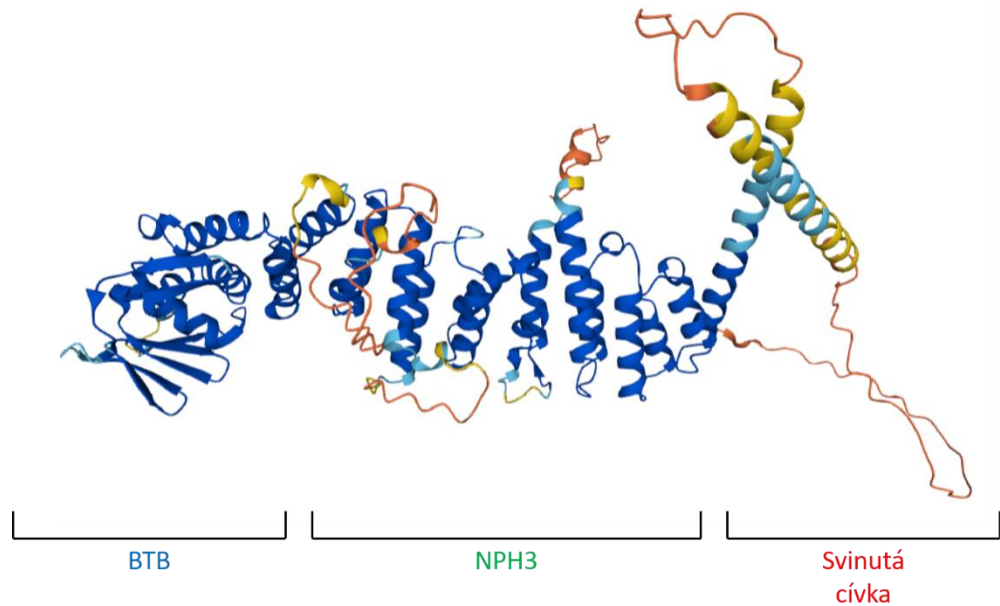
Finální molekulou, která „hýbe“ rostlinou je auxin a celá kaskáda již od fotoreceptorů až k samotné biosyntéze, transportu a signalizaci pomocí auxinu je velice spletitá. Auxin následně umožňuje asymetrický růst rostlin vedoucí k fototropické odpovědi. Je také důležité zmínit, že kaskáda vedoucí od receptoru ke změně genové exprese není přímočará a jednotlivé receptory, signální proteiny a transkripční faktory spolu spolupracují, aby bylo dosaženo právě té odpovědi, které je vyžadována (Goyal *et al.*, 2016).



Obr. 12 Schéma fototropické odpovědi na stinné podmínky. Na levé straně jsou popsána regulace na přímém světle, kdy je phyB ve své aktivní konformaci PrfB a inhibuje PIFs, což vede ke snížené expresi *YUCCA* genů a nízké produkci auxinu. Vpravo můžeme vidět neaktivní phyB, což vede ke zvýšené aktivitě PIFs, vysoké expresi *YUCCA* a produkci auxinu v deetiolovalých semenáčcích. Uprostřed vidíme zapojení phot1 vlivem modrého světla, kdy jsou produkovány PIN, které také ovlivňují biosyntézu auxinu. Převzato a upraveno z Goyal *et al.*, 2016.

2.4.2 NPH3 (non-phototropic hypocotyl 3)

NPH 3 protein se řadí do velké proteinové rodiny, která je specifická pro vyšší rostliny. Podle webu prosite (prosite.expasy.org) se tento protein skládá ze tří hlavních domén. Na N-konci proteinu se nachází BTB doména, uprostřed je NPH3 doména a protein zakončuje C-koncová doména svinuté cívkky (Obr. 13). BTB doména, také známá jako POZ doména je homodimer, který obsahuje několik kopií struktury zinkového prstu. Většina BTB proteinů má funkci regulátorů transkripce (prosite.expasy.org).



Obr. 13 Struktura NPH3 proteinu z *A. thaliana*. Schéma bylo získáno z databáze UniProt (<https://www.uniprot.org/>) a bylo upraveno.

Spojení BTB a NPH3 domény je také typické pro vyšší rostliny. BTB-NPH3 proteiny v *Arabidopsis* jsou asociovány s rostlinným fototropismem a jsou údajně adaptorovými proteiny spojujícími komponenty signální transdukční dráhy iniciované světlem, které aktivuje serin/threonin kinasovou doménu NPH1 (Stogios *et al.*, 2005). Doména svinuté cívky je běžným strukturálním motivem, který je složen ze dvou až pěti α -helixů, které dohromady formují levotočivý superhelix (Mason & Arndt, 2004).

NPH3 protein, stejně jako RPT2 (root phototropism 2) protein můžeme zařadit do stejné rodiny proteinů, která je po nich pojmenovaná a nese název NRL (NPH3/RPT2-like proteinová rodina). Tyto proteiny mají podobnou strukturu, ale uplatňují se v jiných částech rostliny. NPH3 je využíván v nadzemní části, kdežto RPT2 nachází své uplatnění v kořenech (Christie *et al.*, 2018). Také je důležité zmínit, že se v *Arabidopsis* nachází dalších 31 členů NRL rodiny proteinů a jedná se o NPH3/RPT2-like proteiny (Pedmale *et al.*, 2010).

Jak již název tohoto proteinu napovídá, má důležitou roli při fototropické odpovědi rostlin. NPH3 protein se uplatňuje v signalizační kaskádě, kterou iniciuje receptor fototropin 1. Po absorpci modrého světla pomocí phot1 senzoričké části dochází k aktivaci C-koncové kinasy proteinu. Tato specifická doména je spojená s fototropickou odpovědí. Dosud bylo identifikováno pět phot-1 interagujících proteinů, ale bylo zjištěno, že pouze jeden, a to právě NPH3 je nezbytný pro fototropickou odezvu rostlin (Pedmale & Liscum, 2007).

Pedmale a Liscum (2007) ve své studii zkoumali, zda je NPH3 fosfoprotein a zda je defosforylace NPH3 iniciovaná modrým světlem nezbytná pro fototropickou signalizaci závislou na phot1. Fosforylace je jednou z nejlépe pochopených posttranslačních modifikací, která ovlivňuje procesy v buňce. Jak již bylo zmíněno, fototropiny, stejně jako fytochromy a kryptochromy jsou kinasy a procesy fosforylace/defosforylace, které mohou v určitých případech fungovat jako on/off tlačítko, jsou spojené s jejich signálními dráhami. Výsledky ukazují, že je NPH3 protein potřebný pro fototropické odpovědi, které jsou zprostředkované fototropiny. Ukázalo se, že u *Arabidopsis* může NPH3 existovat ve fosforylované formě, která převažuje ve tmě a představuje nekompetentní stav. Nedochází tedy k fototropické odezvě. Když je modré světlo přítomno, NPH3 je rapidně defosforylován pravděpodobně působením PP1 (protein-fosfatasa 1, EC:3.1.3.16). Tato forma je schopna přenášet podněty způsobené vnímání modrého světla prostřednictvím phot1.

2.4.3 Vnímání světla u sóji

Sója je krátkodenní rostlina, která je citlivá na fotoperiodu, tedy délku dne, kdy má rostlina přístup ke světlu, a noci. Kvetení je iniciováno, když je perioda denního světla pod určitou hranicí (Zhang *et al.*, 2017). Ne z každého květu však vzejde lusk se semeny nebo je lusk sice vytvořen, ale již není naplněn semeny. Bylo zjištěno, že tento fenomén není způsoben nedostatkem pylu nebo nedostatečným oplodněním, ale zřejmě je tento proces regulován fotoasimiláty u vyvíjejících se květů a lusků, tedy opět dochází k regulaci vlivem dostatku nebo nedostatku světla (Heindl & Brun, 1983).

Regulace iniciace kvetení délkou fotoperiody byla detailně popsána u *Arabidopsis thaliana*, což je na rozdíl od sóji rostlina, která prosperuje při podmínkách dlouhého dne. To znamená, že jsou květy očekávány při těchto podmínkách dříve než u rostlin krátkodenních. Vnímání délky dne a kvetení je koordinováno zejména transkripčním faktorem *CO* (CONSTANS), jehož exprese je závislá na cirkadiálních hodinách. V krátkodenních podmínkách je exprimována mRNA *CO* ve tmě a nejvyšší koncentrace je 16 hodin po setmění, kdy pokud je stále tma, tak je *CO* degradován. Pokud je však vrchol exprese *CO* během dne, degradace je inhibována a je indukováno kvetení (Marcolino-Gomes *et al.*, 2017).

U krátkodenních rostlin, jako je sója nebo rýže není mechanismus kvetení a cirkadiálního rytmu tak dobře prostudován. Většina kultivarů kvete pouze v podmínkách krátkého dne, ale není to pravidlem. Odrůdy, které jsou pěstovány ve vyšších zeměpisných šířkách, tedy ty, které jsou zařazeny do MG s nižšími čísly nejsou tolik citlivé na fotoperiodu (Watanabe *et al.*, 2012).

U sóji bylo charakterizováno asi 10 *FT* genů, které stejně jako jejich homology v *Arabidopsis* či jiných rostlinách zodpovídají za indukci kvetení. Dále bylo identifikováno 26 genů, které jsou orthology *CO* genu z *Arabidopsis*. Analýza genové exprese těchto *CO*-like genů, kterými jsou *GmCOL1a* a *GmCOL1b* ukázala, že za podmínek krátkého dne se vrchol koncentrace jejich mRNA vyskytuje v dopoledních hodinách je synchronizován s vrcholem exprese *FT* orthologního genu *GmFT5a*. Na druhou stranu za podmínek dlouhého dne se vyskytuje exprese *GmCOL1a* a *GmCOL1b* v noci a upadá před rozbřeskem a za těchto podmínek není exprese *GmFT5a* zahájena (Marcolino-Gomes *et al.*, 2017).

Syndrom vyhýbání se stínu byl již zmíněn v jedné z předešlých kapitol, kde ale byla soustředěna pozornost na modelovou rostlinu *A. thaliana*. Sója však také vykazuje určitou

odpověď na stín způsobený okolním porostem (Green-Tracewicz *et al.*, 2011). Odpověď na stín je regulována fotoreceptory vlivem změny poměru R/FR světla a také vlivem fotosyntetické hustoty fotonového toku (PPFD = photosynthetic photon flux density). Tato hodnota vyjadřuje počet fotonů, které jsou přijaty metrem čtverečním růstového prostoru každou sekundu (www.secretjardin.com). Výsledky studie ukázaly, že odpověď sóji na nízké PPFD a nízký R/FR poměr je interaktivní, ale liší se podle orgánů. K nejmarkantnějšímu prodloužení internod dochází vlivem nízkého PPFD a aditivním vlivem nízkého R/FR, kdežto za prodlužování řapíku listu je zodpovědný zejména nízký poměr R/FR (Hitz *et al.*, 2019).

Co se týče rostlinných fotoreceptorů, Liu *et al.* (2008) charakterizovali čtyři homology genu *phyA* v genomu sóji, ale podařilo se jim izolovat pouze dva, kterými jsou *GmphyA1* a *GmphyA2*. Je nezvyklé, aby měla rostlina několik homologů genu *phyA*, jelikož jiné druhy luštěnin (např. *L. japonicus* a *M. truncatula*) mají obvykle pouze jeden. U sóji se homology zjevně objevily vlivem duplikace genomu. Výsledky této studie naznačují, že procesy, ve kterých je *phyA* zapojen (deetiolace, vyhýbání se stínu, kvetení atd.), a které jsou ovlivněny R/FR poměrem, nejsou v sóji zprostředkované pouze jedním, či dvěma geny, ale souhrou funkcí až čtyř genů.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Biologický materiál

V experimentální části diplomové práce bylo použito několik genotypů *Arabidopsis thaliana* pro srovnání odpovědí na specifické podmínky. Jako reference byl použit ekotyp Columbia-0 (Col-0), který byl z historického hlediska stanoven maďarským vědcem György P. Rédeiem. Rédei prováděl experimenty se čtyřmi liniemi semen *Arabidopsis*, které přirozeně rostly v Evropě. Zjistil však, že tato semena nejsou homologní, a proto vybral náhodného jedince jako referenci a pojmenoval ho podle Univerzity v Missouri, která se nachází v Columbi. Právě pod touto univerzitou působil Rédei ve své laboratoři. Z názvu tedy může vyplývat, že se jedná o americká semena, ale ve skutečnosti se jde o evropský ekotyp (Somssich, 2019).

Dále byl používán mutantní genotyp SALK_025877C (*nph3* mutant) a další genotypy *A. thaliana*, které měly z funkce vyřazeny fotoreceptorové proteiny. Co se týče mutantních linií, kde byl z funkce vyřazen vždy pouze jeden gen, byly použity *cry1* a *cry2* (krytochrom1 a krytochrom2). Dále byli použiti dva dvojité mutanti *phot1 phot2* (fototropin1 a 2) a *cry1 cry2* (krytochrom 1 a 2). Tato mutantní semena měla vždy nefunkční dva geny najednou. Všechny tyto mutantní linie byly odvozeny od ekotypu Columbia-0 a byly poskytnuty Univerzitou v Utrechtu.

3.2 Chemikálie

- Agarosa (Serva, Německo)
- Bělící přípravek (Zone, Nizozemí)
- Ethylendiamintetraoctová kyselina (Sigma-Aldrich, USA)
- Chlorid sodný (Lach-ner, Česká republika)
- Isopropanol (Penta, Česká Republika)
- Kyselina chlorovodíková (Fluka, Švýcarsko)
- Kyselina octová (Sigma-Aldrich, USA)
- Murashige & Skoog médium (Duchefa, Nizozemí)
- Rostlinný agar (Duchefa, Nizozemí)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Carl Roth, Německo)
- Triton X-100 (Sigma-Aldrich, USA)

3.3 Přístroje a vybavení

- Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
- Biometra TOne Thermal Cyclers (analytik jena, Německo)
- Digitální pH metr (InoLab, Německo)
- Elektromagnetická míchačka (Biosan, Lotyšsko)
- GelDocEZ systém (Bio-Rad, Německo)
- Mikrodestičkový spektrofotometrický reader Synergy H1 (Biotek, USA)
- Předvážky (KERN, Německo)
- Spektrometr Li-180 (LI-COR, USA)
- Stolní centrifuga 5424R (Eppendorf, Německo)
- Suchá lázeň TS-100 C (Biosan, Lotyšsko)
- T100 Thermal Cyclers (Bio-Rad, Německo)
- Termocyklér CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad)
- Vortex V-1 plus (Biosan, Lotyšsko)

3.4 Roztoky

- TAE (Tris-acetát-EDTA) pufr (0,04 M Tris-kyselina octová; 0,001 M EDTA; pH 8,3)
- TENT pufr (10 mM Tris-Cl; 1mM EDTA; 12 mM NaCl; 2,5% Triton X-100; pH 8)
- TE pufr (10 mM Tris-Cl; 0,1 mM EDTA; pH 8)
- 1% agarové médium
- 0,5x MS médium

3.5 Reagencie pro molekulární biologii

- 5mM dNTP (Thermo Scientific, USA)
- Barvivo GelRed® (Biotinum, USA)
- DNasa I (Top-Bio, Česká republika)
- GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder (Thermo Scientific, USA)
- HyperLadder™ 50 bp (Meridian Bioscience, USA)
- iScript cDNA Synthesis kit (BioRad)

- Magnetické kuličky AgenCourt RNAClean XP (Beckman Coulter, Česká republika)
- Monarch® DNA Gel Extraction Kit (NEB, USA)
- Nanášecí pufr – 6x DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA)
- NucleoSpin® RNA plus (Macherey Nagel, Německo)
- *Taq* DNA Polymerase (QIAGEN, Německo)

3.6 Použité primery

Tab. 1 Primery použité v end-point PCR reakcích, jejich sekvence, teploty tání, délky a obsah GC. Primery byly syntetizovány na zakázku u firmy Elisabeth Pharmacon, Brno Česká Republika a to v základní čistotě, tedy odsolené.

Název primeru	Sekvence (5' → 3')	T _m (°C)	Délka (NTP)	Obsah GC (%)
AtLBb1.3n	GGATTTTGCCGATTCGGAAC	57	21	48
At5g03250_int1_rev	AATTCGATCTCGAAACCGGAAACA	59	24	42
At5g03250_RP	ACGAGTCCTGTAGTGCAAAGC	59	21	52
ARAactfw	GCCATCCAAGCTGTTCTCTC	59	20	55
ARAactrev	GGTGGTGCAACGACCTTAAT	57	20	50

3.7 Experimentální metody

3.7.1 Podmínky růstu rostlin

Semena *nph3* mutanta a GK-290R09, která měla být použita jako pozitivní kontrola, byla objednána z databáze NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre). Semena byla zasazena do květináčů se zeminou, umístěna při laboratorní teplotě tak, aby měla dostatek přirozeného světla a byla pravidelně zalévána. Klíčivost semen však byla velmi špatná. Přesto se asi po měsíci od zasazení podařilo z listů rostlin odebrat genetický materiál na FTA karty.

Semena *nph3* mutanta a ekotypu Col-0 byly vysety také na misky s 1% agarem a následně rostly 14 dnů ve fytotronu při podmínkách dlouhého dne (12 h světlo, 12 h tma), intenzitě světla 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a teplotě 22 °C. Posbírané semenáčky byly zmrazeny a uchovány při -80 °C.

Při provádění experimentů, kdy byly rostliny ošetřovány světlem, byl také pozorován rozdíl v klíčivosti *nph3* mutanta a ostatních mutantních genotypů. I přesto, že byla prováděna týdenní stratifikace všech semen, klíčivost semen *nph3* mutanta byla velmi špatná a obvykle vyklíčila jen polovina semen. Překvapivě byl obdobný problém i se semeny ekotypu Col-0.

3.7.2 Katalog alel

Soybean Allele Catalog (<https://soykb.org/SoybeanAlleleCatalogTool/>; Chan *et al.*, 2023) je online nástroj, díky kterému mohou jeho uživatelé lépe porozumět funkční genetice sóji na úrovni genů a alel na základě analýzy data setu čítajícího 1066 genotypů celosvětové populace sóji (Soy1066). Je veřejně dostupný, jako webová aplikace hostovaná na SoyKB.org. Pomocí tohoto nástroje je možné vizualizovat alely zkoumaného genu, a zároveň porozumět funkčním efektům a aminokyselinovým změnám, které jsou způsobeny jednonukleotidovými polymorfismy, insercemi či delekcemi v genech (Chan *et al.*, 2023).

Nástroj nabízí prohledání alel na základě ID genu jednak v celém Soy1066, anebo specificky v části tohoto datasetu. V tomto případě byla provedena analýza alel pro gen *Glyma.13g221200* v celém Soy1066 data setu.

3.7.2 BLAST

BLAST neboli Basic Local Alignment Search Tool je počítačový algoritmus, který dokáže rychle porovnat dotazovanou DNA či aminokyselinovou sekvenci s databází (Mount, 2007). BLAST poskytuje na internetu několik webových stránek a v tomto případě byl využit nástroj, který se nachází na webových stránkách databáze TAIR (<https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp>). Aminokyselinová sekvence byla porovnána s referencí *Arabidopsis thaliana* (txid3702). V databázi TAIR byl následně vybrán mutantní genotyp, který byl vhodný pro provedení následujících experimentů. Výsledky této analýzy také posloužily jako vstupní informace o proteinech *Arabidopsis* pro konstrukci fylogenetického stromu. Podobnost aminokyselinových sekvencí sóji byla zjištěna pomocí BLASTu, který poskytuje web Soybase.org (<https://soybase.org/sequenceserver/>).

3.7.3 Analýza nukleotidových a proteinových sekvencí

BioEdit verze 7.2 (bioedit.software.informer.com) je software, který lze použít pro vizualizaci nukleotidových a aminokyselinových sekvencí, jejich přiložení a zjištění podobnosti dvou či více sekvencí neboli tzv. alignment (Hall, 1999). Ačkoliv byl program vytvořen v 90. letech, je stále poměrně dobře využitelný a je volně k použití. Poslední updatovaná verze je z roku 2007 a od této doby nebyl software nijak vylepšován.

S využitím nástroje ClustalW, který program nabízí, bylo přiřazeno několik aminokyselinových sekvencí a výsledek tohoto alignmentu byl následně využit pro

konstrukci fylogenetického stromu. Pomocí BioEditu byly také vyhodnoceny výsledky sekvenace. Data byla do programu nahrávána ve formátu fasta (.fas).

Dále byl pro analýzu sekvencí využit také SnapGene 6.1.0 (www.snapgene.com). Jedná se o sofistikovaný software, ve kterém je možné provádět bioinformatické a molekulárně biologické analýzy anebo například vizualizovat průběh plánovaných experimentů. Mimo jiné obsahuje také funkci alignment pro přiložení sekvencí a je možné provádět návrh primerů. Program byl využit zejména pro tyto dvě funkce a také pro celkovou vizualizaci sekvencí.

3.7.3 Fylogenetická analýza

Fylogenetická analýza poskytuje hodnoty, které dovolují porovnat podobnost sekvencí. Fylogenetický strom je formou vizualizace příbuznosti mezi druhy nebo sekvencemi a také ukazuje jejich hypotetického společného předka. Stromy jsou sestavovány s použitím jak nukleotidových, tak aminokyselinových sekvencí. Program MEGA11 (www.megasoftware.net) je vhodným a intuitivním nástrojem pro sestavení fylogenetického stromu, a právě pro tento účel byl využit. Program lze použít také pro přiložení (alignment) sekvencí, ale pro tuto funkci byl využit BioEdit či SnapGene.

Dříve vytvořený alignment aminokyselinových sekvencí byl otevřen v programu a byla zvolena funkce tvorby fylogenetického stromu statistickou metodou maximální věrohodnost (maximum likelihood). Bylo možno upravit další parametry, které ale byly ponechány v defaultním nastavení, kde byl přednastaven Jones-Taylor-Thornton model a heuristická metoda Nearest-Neighbor-Interchange (výměna nejbližšího souseda). Následně byly u zkonstruovaného stromu upraveny některé grafické nedostatky, aby byl strom přehledný a dobře čitelný.

3.7.4 Izolace gDNA (genomové DNA)

Pro izolaci gDNA byly použity FTA® (Flinders Technology Associates) odběrové karty (Whatman®). Čerstvé listy *Arabidopsis thaliana* byly položeny na filtrační papír v FTA kartě tak, aby spodní strana listu směřovala nahoru. Po zavření karty na ni bylo shora přitlačeno pomocí tloučku, aby se DNA z listu přenesla na filtrační papír. Zbytek listu byl následně odstraněn pinzetou. Z FTA karty bylo vždy vystřiženo kolečko, které bylo rozpůleno skalpelem a do PCR reakce byla použita pouze jedna polovina. Výstřižek FTA karty byl v mikrozkuhavce promyt 3x 100 µl TENT pufru a 2x 100 µl TE pufru, a následně byl sušen v termobloku, který byl vyhřátý na 50 °C po dobu 15 minut.

3.7.5 Izolace RNA

RNA byla izolována z čerstvého biologického materiálu. Pro tento účel byly použity semenáčky *A. thaliana* mutantního genotypu *nph3* a divoký typ (Col-0). Semenáčky rostly dva týdny na miskách s agarem ve fytotronu při teplotě 22 °C a podmínkách dlouhého dne (12 h světlo, 12 h tma).

Listy dva týdny starých semenáčků *Arabidopsis* byly ve vychlazené třecí misce zmrazeny pomocí tekutého dusíku a homogenizovány tlučkem. Homogenizovaný rostlinný materiál (50–100 mg) byl přenesen do předem zvážené a vychlazené mikrozkušavky. Následně bylo do zkumavky přidáno 500 µl LBP roztoku z NucleoSpin® RNA plus kitu a dále bylo postupováno podle manuálu výrobce (www.mn-net.com/nucleospin-rna-plus-mini-kit-for-rna-purification-with-dna-removal-column-740984.50), kde byly použity kolonky nejprve pro odstranění genomové DNA a následně pro zachycení RNA.

Aby byla odstraněna zbylá kontaminující DNA, byla ke vzorkům přidána DNAsa I (10 U·µl⁻¹). V mikrozkušavce bylo smícháno 54 µl vzorku RNA s 14 µl pufru (5x reakční pufr) a 1 µl DNasy I (EC:3.1.21.1). Následovala inkubace směsi po dobu 30 minut (37 °C). Do mikrozkušavek byl přidán 1 µl DNasy I a opět následovala 30minutová inkubace při stejné teplotě. Pro purifikaci vzorků byly použity magnetické kuličky AgenCourt RNAClean XP. K ošetřené RNA bylo napipetováno 35 µl kuliček v roztoku a bylo přidáno 28 µl 100% isopropanolu. Směs byla 10x promíchána pipetováním, inkubována 10 minut a následně mikrozkušavky byly přeneseny do magnetického stojánku, kde byly ponechány 5 minut. Díky magnetu se kuličky přichytily na stěnu mikrozkušavky a supernatant mohl být odpipetován do odpadu. Kuličky s navázanou RNA byly 3x promyty 200 µl 70% ethanolu a mezi jednotlivým pipetováním byly inkubovány vždy 1 minutu. Následně byly vzorky vysušeny, do mikrozkušavek bylo napipetováno 30 µl RNase-free vody, směs byla promíchána a proběhla inkubace 10 minut, během které se přečištěná RNA uvolnila do vody. Mikrozkušavky byly na dalších 5 minut vloženy na magnet a následně byla purifikovaná RNA přepipetována do čistých mikrozkušavek. Koncentrace získané RNA byla změřena pomocí mikrodestičkového readeru a vzorky byly uloženy v mrazáku s teplotou -80 °C.

3.7.6 Přepis do cDNA

RNA byla následně přepsána do cDNA s použitím kitu iScript™ Reverse Transcription Supermix. Vzorky RNA a 5x supermix z kitu byly rozmrazeny na ledu a byl připraven

premix smícháním příslušného množství 5x supermixu a reverzní transkriptasy podle protokolu (Tab. 2). Směs byla napipetována do předem označených zkumavek, do kterých byl následně přidán templát. Mikrozkušavky byly vloženy od termocykléru, kde byl nastaven program s příslušnými kroky (Tab. 3).

Po přepisu byly vzorky naředěny tak, aby byl finální objem 160 μl a následně byla proměřena koncentrace cDNA pomocí readeru stejně jako v případě RNA.

Tab. 2 Pipetované objemy pro přípravu reakčního mixu iScript.

Činidlo	Objem (μl)
5x iScript Reaction Mix	4
iScript Reverse Transcriptase	1
RNA (50 ng/ μl)	15
Celkový objem	20

Tab. 3 Reakční protokol iScript.

Fáze	Čas	Teplota ($^{\circ}\text{C}$)
Nasedání primerů	5 min	25
Reverzní transkripce	20 min	45
Inaktivace reverzní transkripce	1 min	95
Volitelný krok	∞	4

3.7.7 End-point PCR

Pro amplifikaci genů pomocí end-point PCR reakce byla používána *Taq* DNA polymeráza. Primery, které byly použity v reakcích v reakcích jsou uvedené v tabulce (Tab. 1). Všechny složky, které jsou potřebné do reakce byly pipetovány ve sterilním laminárním boxu.

Když byla prováděna amplifikace fragmentů genomové DNA, byly jako templáty do reakce použity výstřižky z FTA karet. V případě detekce fragmentu v cDNA byla jako templát do reakce pipetována RNA o koncentraci 50 ng/ μl , aby byla vyloučena kontaminace genomovou DNA, a cDNA o koncentraci 120 ng/ μl . Objem pipetované vody se lišil podle koncentrace templátu. Do mikrozkušavek byly napipetovány ostatní reagenty potřebné pro průběh PCR reakce (Tab. 4), byly vloženy do termocykléru a byly nastaveny podmínky viz. Tab. 5.

Tab. 4 Objemy jednotlivých složek použitých v reakční směsi pro end-point PCR reakci.

Činidlo	Objem (μl)	Výsledná koncentrace
10x PCR pufr (QIAGEN)	5	1x
dNTP (5 mM)	2	200 μM (každý dNTP)
FW primer (25 μM)	1	0,5 μM
REV primer (25 μM)	1	0,5 μM
Templát	x	x
<i>Taq</i> DNA polymerasa	0,25 μl	0,025 U/μl
ddH ₂ O	40,75 μl	
Celkový objem reakce	50 μl	

Tab. 5 Parametry pro nastavení end-point PCR reakce.

Fáze	Teplota (°C)	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	94	3 min	1
Denaturace	94	30 s	
Nasedání primerů	57,9	30 s	35
Elongace	72	1 min	
Finální elongace	72	10 min	1

3.7.8 Agarosová elektroforéza

Pro provedení agarosové elektroforézy bylo připravováno 40 ml 1% nebo 3% agarosového gelu (0,4/1,2 g agarosy, 40 ml 10x TAE pufru), který byl obarven 1,7 μl barviva GelRed. Po zatuhnutí byl odstraněn hřebínek a bylo napipetováno 6 μl markeru (HyperLadder™ 50 bp/ GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder). Následně bylo vždy 5 μl PCR produktu smícháno s 1 μl 6x TriTrack DNA Loading Dye. Směs byla promíchána pipetováním a nanášena na gel. Elektroforetická komůrka byla naplněna 1x TAE pufrém, uzavřena a připojena ke zdroji. Elektroforéza probíhala 75 minut při 90 V nebo 90 minut při 80 V. V případě použití 3% gelu byla elektroforetická komůrka po prvních 10 minutách přenesena do lednice z toho důvodu, aby se gel nepřehříval.

3.7.9 Sangerova sekvenace

Pro ověření správnosti některých PCR amplikonů byly vzorky poslány na sekvenaci, která byla provedena společností SEQme (SEQme s.r.o., Dobříš, Česká republika). Nejprve bylo nutné opět provést agarosovou elektroforézu. Band byl následně vyřezán z gelu pomocí skalpelu a přenesen do mikrozkuřavky, kde byl přidán rozpouštěcí roztok. Byla izolována DNA pomocí Monarch® DNA Gel Extraction Kitu (<https://international.neb.com/products/t1020-monarch-dna-gel-extraction->

kit#Product%20Information), kde bylo postupováno podle příslušného protokolu. Na sekvenaci byl odeslán produkt ve dvou provedeních s přímým a zpětným primerem.

3.7.10 Ošetření rostlin světlem

3.7.10.1 Sterilizace a stratifikace semen

Aby mohly být provedeny experimenty, kdy bylo na semena a semenáčky *Arabidopsis* působeno modrým světlem, či byly prováděny testy fototropismu, bylo nejprve nutné semena sterilizovat. Potřebné množství semen pro experiment bylo odsypáno do mikrozkuhavky, která byla otevřená a umístěná ve stojánku vložena do exsikátoru. V kádince bylo smícháno 25 ml bělicího přípravku se 3 ml kyseliny chlorovodíkové, byla vložena do exsikátoru a ten byl uzavřen. Reakcí těchto dvou složek se vytvářel chlor, který semena sterilizoval. Po 2 hodinách byly mikrozkuhavky přesunuty do laminárního boxu, kde byly ponechány asi 15 minut, aby se vyvětral zbytek chloru.

Pro experiment s ošetřením rostlin modrým světlem byly připraveny hlubší misky s 1% rostlinným agarem. Agar s destilovanou vodou byl rozpuštěn v mikrovlnce a nalit do misek. Při provedení fototropického experimentu byly nachystány čtvercové Petriho misky s 0,5x MS médiem a 1% agarem. Směs byla opět zahřáta v mikrovlnce a přelita do misek. Po zatuhnutí byla na misky nanášena sterilní semena, následně byly misky obaleny dvěma vrstvami alobalu a stratifikovány nejméně jeden týden při teplotě 4 °C.

3.7.10.2 Růst *Arabidopsis* při různé intenzitě modrého světla a fenotypová analýza

Po týdenní stratifikaci byly misky se semeny odbaleny, umístěny do papírových obalů tak, aby na ně působilo světlo pouze shora, a vloženy do růstové komory s bílým světlem na 4 až 6 hodin. Po této době byly opět obaleny alobalem a ponechány při laboratorní teplotě následujících 18–20 h. Mezitím byly s použitím spektrofotometru nastaveny pod LED zdrojem modrého světla tři různé intenzity o hodnotě 0,1; 1 a 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ tak, že byl sensor přístroje zakrýván různým počtem vrstev papíru a byl posouván blíž nebo dál od světelného zdroje (Obr. 14). Semena rostla v nastavených podmínkách 6 dnů



Obr. 14 Snímky obrazovky spektrofotometru při nastavení podmínek různé intenzity modrého světla. Hodnoty intenzity světla modrého spektra jsou zvýrazněny a uvedeny v jednotkách $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Experiment byl vyhodnocen tak, že byly vzrostlé hypokotylы *Arabidopsis* přeneseny na čtvercové Petriho misky s 1% agarem a vyfoceny pomocí skeneru. Fotografie byla vyhodnocena v programu ImageJ takovým způsobem, že byla pomocí nástroje pro měření délky určena výška každého hypokotylu.

Experiment byl celkem proveden dvakrát, kdy v prvním případě bylo použito 15 semen jednoho genotypu na světelnou podmínku, které představují tři různé intenzity modrého světla a jsou zmíněny výše. Při druhém provedení bylo vždy vyseto 16 semen daného genotypu na misku, kdy byly v jedné světelné podmínce tři misky, tedy 48 semen. Také byla přidána podmínka s maximální intenzitou světla $70\text{--}100 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

3.7.10.3 Fototropický experiment

Po ukončení stratifikace byly misky se semeny odbaleny a vloženy do růstové komory pod bílé světlo na 6 hodin, následně opět obaleny a ponechány při laboratorní teplotě následujících 66 hodin. Přesně tři dny po zahájení tohoto experimentu byly misky umístěny do speciálního zařízení, tzv. kostky, které bylo navrženo právě pro tento účel. Jedná se o krychli ze dřeva, do které byly nainstalovány LED světla a dva větráky kvůli proudění vzduchu. Toto zařízení je uzavíratelné, aby se dovnitř nedostalo žádné světlo

z okolí. Vně krychle byl připevněn přístroj umožňující měnit vlnovou délku světelného spektra, tedy jeho barvu a také intenzitu. Součástí jsou poličky vyrobené na míru, aby se do nich vešly čtvercové Petriho misky (Obr. 15).

Misky byly vloženy do poliček a kostka byla umístěna tak, aby *Arabidopsis* na miskách přijímaly pouze modré světlo o intenzitě $0,1 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ ze strany. Hypokotylы rostlin byly v té době vzrostlé asi 1 cm. Misky byly ponechány v těchto podmínkách 24 hodin, následně vyjmuty a oskenovány stejně jako v předešlém experimentu. Tentokrát ale nebyla sledována výška vzrostlých hypokotylů, nýbrž úhel ohybu směrem ke zdroji světla. Experiment byl taktéž nastaven dvakrát a na miskách bylo vždy 12 semen jednoho genotypu. V prvním případě se jednalo o tři misky a v druhém případě o osm. Naskenované misky byly opět vyhodnoceny pomocí programu ImageJ s použitím nástroje, který umožňuje měřit úhly.



Obr. 15 Zařízení „kostka“, které bylo použito pro provedení fototropických experimentů. Návrh zařízení provedl A. Romanowski (nepublikováno).

3.7.11 Statistická analýza

Hodnoty délek hypokotylů, jako výsledky experimentu, kdy byl sledován účinek modrého světla, byly zapisovány do excelu. Následně byl excel využit také pro výpočet průměru, směrodatné odchylky a střední chyby průměru. I přesto, že byla semena týden stratifikována, nemusely jednotlivé genotypy růst stejně rychle, a proto byly hodnoty délky hypokotylů normalizovány. Normalizovaná hodnota vyjadřuje podíl jedné hodnoty délky hypokotylu a hodnoty průměru délky hypokotylu daného genotypu při podmínkách ve tmě. Normalizované hodnoty byly následně kopírovány do programu GraphPad Prism 9 (<https://www.graphpad.com/>), kde byly vytvořeny grafy, které vizualizují výsledky.

V případě fototropického experimentu byly nejprve změřeny úhly hypokotylů před vložením do „kostky“, kdy se naměřené hodnoty pohybovaly okolo 180° , a také byl hypokotyl obtažen fixem na miskou. Poté, co byly misky vyňaty z kostky byl měřen úhel, v jakém byl hypokotyl ohnutý. Obě hodnoty byly zapsány do excelu a následně byl vypočítán rozdíl hodnoty úhlu před a po ohybu. Výsledkem je hodnota úhlu, o který se hypokotyl ohnul. Tyto výsledky byly kopírovány do GraphPadu (Prism 9) a byl vytvořen histogram frekvenční distribuce výsledků. Hodnoty z rozmezí, které byly obsazeny nejméně byly označeny jako odlehlé výsledky a byly vyřazeny z analýzy. Následně byly vytvořeny krabicové grafy pro vizualizaci těchto hodnot. Také byla provedena jednosměrná anova, v rámci které byl programem vypočítán Brown-Forsythe test a Barlettův test.

4 VÝSLEDKY

Celému projektu, který byl řešen v experimentální části této práce předcházely výsledky GWAS analýzy (viz. kapitola 2.1.3). Signál na chromosomu 13 byl již dříve s využitím bioinformatického nástroje AccuTool s vysokou mírou přesnosti přiřazen genu *Glyma.13g221200*, který spadá do rodiny genů non-phototropic responsive *NPH3*.

Pro zjištění funkce tohoto proteinu byl navržen postup reverzní genetiky, kdy je použit mutantní genotyp s umlčeným genem pro studovaný protein. Web SoyBase (SoyBase.org) nabízí databázi sójových mutantů, u kterých byla indukována delece pomocí neutronové mutagenese (fast neutron mutagenesis; Bolon *et al.*, 2011; <https://www.soybase.org/mutants/>) a databázi EMS mutantů, tedy takových genotypů, u kterých byla mutagenese způsobena účinkem ethyl methansulfonátu (Espina *et al.*, 2018; <https://www.soybase.org/projects/SoyBase.P2019.01.php>). Obě tyto databáze byly prohledány, ale mutant *nph3* nebyl dostupný. Navíc, transformované variety sóji mají diploidní genom, takže by mohl být v sóji efekt tohoto genu skryt expresí genu autologního nebo jiných podobných genů, které také spadají do této rodiny.

Pro ověření funkce zkoumaného proteinu je proto v tomto případě vhodné nejprve charakterizovat mutanta s umlčeným homologním genem v některé z modelových rostlin, kterých existuje hned několik. Pro studium buněčných kultur se využívá například tabák (*Nicotiana tabacum*) (Ganapathi *et al.*, 2004). Při zkoumání jednoděložných rostlin nachází své využití rýže (*Oryza sativa*) (Izawa & Shimamoto, 1996) a pro traviny je modelovou rostlinou *Brachypodium distachyon* (Brkljacic *et al.*, 2011). Co se týče luštěnin, lze jako model využít *Medicago truncatula*, zejména při studiu fixace dusíku (Cook, 1999). V tomto případě však byla pro experimenty vybrána modelová rostlina *Arabidopsis thaliana*, jelikož je u ní velmi dobře prozkoumána světelná signalizace.

4.1 Katalog alel

Výsledky prohledání katalogu alel odhalily existenci dvanácti alel v genu *Glyma.13g221200*. Na pozici 33423221 se v genu nachází mutace L545F (Obr. 16) způsobující jednonukleotidový polymorfismus G → A. Jedná se o missense (nesmyslnou) mutaci, kvůli které se v translatovaném proteinu na místě 545 nevyskytuje leucin, ale fenylalanin. Na obrázku můžeme vidět, že je tato mutace specifická pouze pro 42 z celkových 1066 vstupů v datasetu tohoto nástroje. Ostatní alely obsahují mutace, které zjevně se zkoumaným fenotypem nesouvisí. Jediná další mutace přicházející v úvahu, by mohla být na stejné pozici vedoucí k záměně leucinu za valin. Tato mutace se vyskytuje pouze u tří genotypů spadajících do kategorie *G. soja*, které jsou vždy popínavé, a tudíž nemohou být polozakrslé. Po rozkliknutí dané pozice, na které se zkoumaná mutace nachází byla po úpravě některých parametrů vytvořena tabulka (Tab. 6). V tabulce jsou zobrazeny pouze ty variety, u kterých je známý fenotyp stonku, který je u většiny z nich ukončený (D = determinate stem fenotype).

	Soja	Landrace	Elite	Total	Cultivar	Gene	Chromosome	33423079	33423081	33423221
<input type="checkbox"/>	34	241	166	461	31	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	19	182	155	444	90	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	T Ref	G Ref
<input type="checkbox"/>	48	31	22	101	0	Glyma.13G221200	Chr13	T S592N	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	0	6	36	42	19	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	A L545F
<input type="checkbox"/>	3	0	1	4	0	Glyma.13G221200	Chr13	T S592N	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	0	4	0	4	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	T Ref	G Ref
<input type="checkbox"/>	3	0	0	3	0	Glyma.13G221200	Chr13	T S592N	A K591N	C L545V
<input type="checkbox"/>	0	1	1	2	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	2	0	0	2	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	1	0	0	1	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	1	0	0	1	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref
<input type="checkbox"/>	0	1	0	1	0	Glyma.13G221200	Chr13	C Ref	A K591N	G Ref

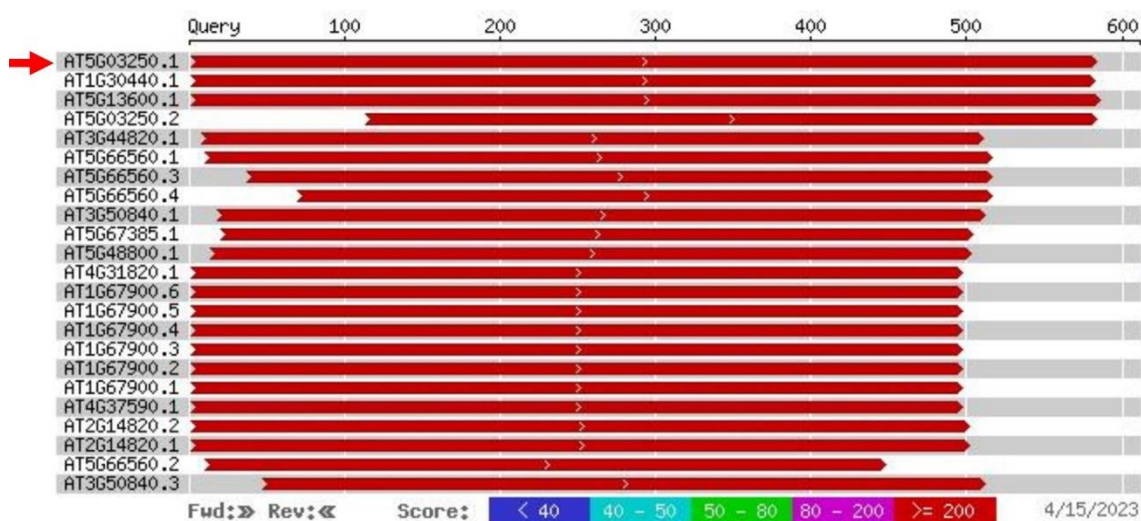
Obr. 16 Výsledek z Katalogu alel, pomocí kterého byl analyzován gen *Glyma.13g221200*. Na pozici 3342381 se nachází mutace L515F, která je způsobena jednonukleotidovým polymorfismem G → A, který způsobuje změnu aminokyseliny v proteinu na pozici 545. Tato mutace je specifická pouze pro 42 variet.

Tab. 6 20 variet z 42, jejichž genotyp obsahuje mutaci L545F vedoucí ke změně G → A, a je u nich uveden fenotyp architektury stonku. Pokud by byly u genotypu HN033 doplněny alely dt1 a e1, mohl by také vést k požadovanému fenotypu. Je nutné také zmínit, že u genotypu UN7_aka_Franklin je vysoká míra nejistoty. Ukončený fenotyp (D), popínavý fenotyp (N) a polopopínavý fenotyp (S). Data byla získána pomocí Katalogu alel.

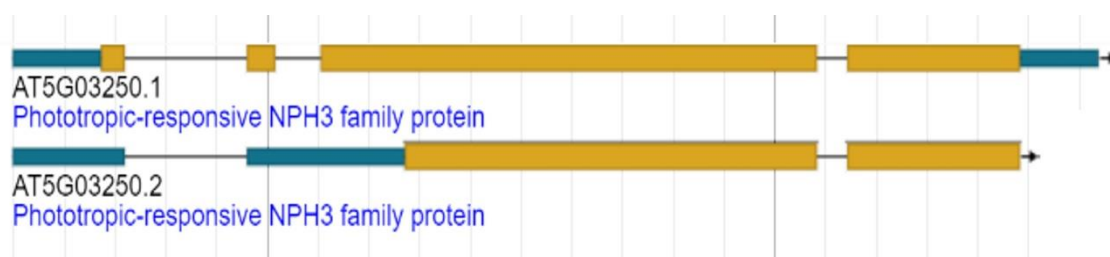
Chromosom	Pozice	ID genotypu	Název genotypu	GRIN ID genotypu	Odrůda	Klasifikace	Genotyp	Funkční efekt	Fenotyp stonku
		USB-078	USB-078_PI084637	PI84637	Tradiční	Ostatní			N
		HN033	HN033_PI087617	PI87617	Elitní	Ostatní			N
		SRR1533405	PI_508266	PI508266	Elitní	NA Kultivar			D
		SRR1533419	PI_533602	PI533602	Elitní	NA Kultivar			D
		SRR1533423	PI_536635	PI536635	Elitní	NA Kultivar			D
		CRR108770	Hobbit	PI540551	Elitní	NA Kultivar			D,D
		SRR1533373	PI_540552	PI540552	Elitní	Ostatní			D
		CRR108771	UN16_aka_Hoyt	PI540552	Elitní	NA Kultivar			D
		CRR108692	IL1	PI542045	Elitní	NA Kultivar			D
13	33423221	CRR108714	IL2	PI542046	Elitní	NA Kultivar	A	missense mutace	D
		CRR108772	UN41_aka_Sprite_No.87	PI546374	Elitní	NA Kultivar			D
		SRR1533442	PI_548477	PI548477	Tradiční	NA Předek			D
		CRR108718	UN7_aka_Franklin	PI548563	Elitní	NA Kultivar			N,N,N
		SRR1533402	PI_548565	PI548565	Elitní	NA Kultivar			D,D
		CRR108777	UN8_aka_Gnome	PI548565	Elitní	NA Kultivar			D,D
		HN071	HN071_PI548657	PI548657	Tradiční	NA Předek			D
		SRR1533441	PI_548985	PI548985	Elitní	NA Kultivar			D
		USB-038	USB-038_PI559932	PI559932	Elitní	NA Kultivar			D,D
		USB-411	USB-411_PI567788	PI567788	Elitní	NA Kultivar			D
		CRR108767	PI_583837	PI583837	Elitní	NA Kultivar			D

4.2 Výběr vhodného mutantu *Arabidopsis thaliana*

Aminokyselinová sekvence NPH3 proteinu, která byla získána z databáze SoyBase (soybase.org) byla analyzována pomocí bioinformatického nástroje BLAST (Basic local alignment search tool). Výsledek BLAST analýzy poukázal na NPH3 protein kódovaný genem *At5g03250*, který je homologem sójového genu *Glyma.13g221200* (Obr. 17, Tab. S1, S2).



Obr. 17 Grafické zobrazení výsledku z nástroje BLAST (www.arabidopsis.org), pomocí kterého byl určen homolog sójového proteinu *Glyma.13g221200* (NPH3), kterým je *At5g03250*.



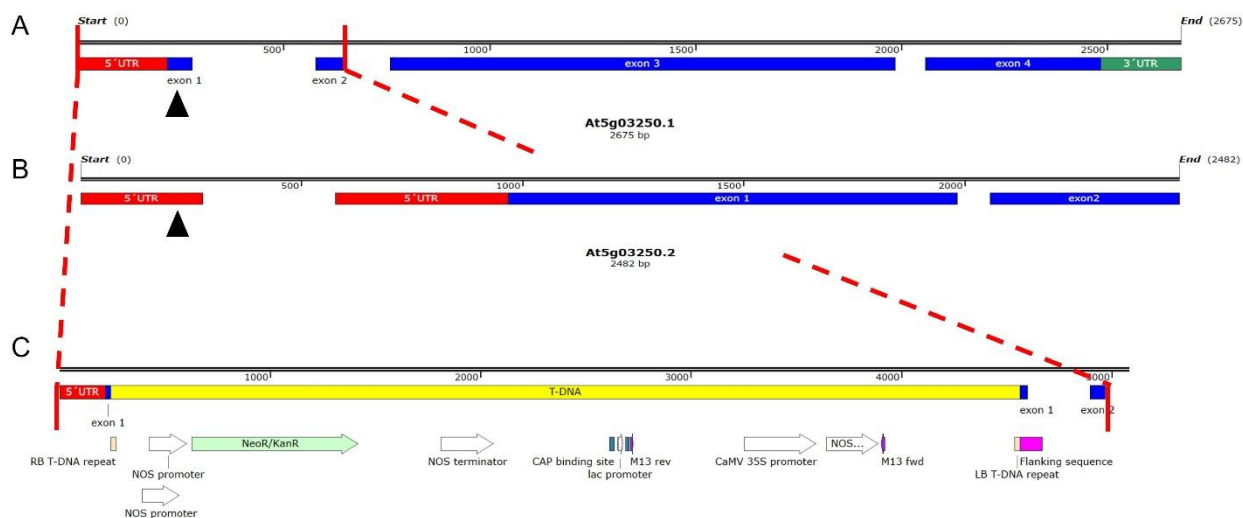
Obr. 18 Rozložení intronů, exonu (modře), a 5'UTR a 3'UTR oblastí (žlutě) genu *At5g03250* podle předpovězeného modelu 1 a 2. Převzato a upraveno z jbrowse.arabidopsis.org.

Efektivní reverzní genetika je u *Arabidopsis* umožněna dostupností velkých sbírek inserčních mutantů s indexovanými geny. Tyto sbírky dohromady zahrnují stovky tisíc insercí T-DNA či transposonových insercí, které jsou mapovány do referenčního genomu Columbia-0. Jednou z těchto sbírek je například Salk kolekce (<http://signal.salk.edu/>).

Pro účely této práce bylo rozhodnuto, že se bude dále pracovat s mutantem, který má T-DNA inserci v genu *At5g03250*. Na webu TAIR bylo uvedeno 10 mutantů s T-DNA insercí právě v tomto genu, který kóduje Phototropic-responsive NPH3 family protein. Byl vybrán mutantní genotyp SALK_025877C, ze zmíněné Salk kolekce, který se jevil jako nejvhodnější, jelikož by se T-DNA inserce měla podle prvního modelu genu nacházet v exonu a podle druhého modelu v 5'UTR konci. Při transformaci rostlin pro vytvoření tohoto mutantu, který je odvozený od Col-0, byl pro zanesení T-DNA inserce použit vektor pROK2 (Yang *et al.*, 1997), derivát vektoru pBIN19 (Bevan, 1984). Pozice T-DNA je známá podle flanking sequence, která byla zjištěna PCR analýzou a je uvedena na webových stránkách TAIR. Flanking sequence je 104 bp dlouhá a je uvedeno, že pozice nemusí být úplně přesná a může se lišit cca o 300 bp. Tento mutant byl vytvořen prostřednictvím laboratoře Salk institutu genomické analýzy (SIGnAL = Salk Institute Genomic Analysis Laboratory) (signal.salk.edu). Mutantní semena byla objednána z databáze NASC (Nottingham Arabidopsis Stock Centre = Nottinghamský inventář semen *Arabidopsis*) (arabidopsis.info).

Databáze TAIR na svých webových stránkách uvádí dva možné modely, které predikují strukturu genu *At5g03250*. Pro první model jsou predikovány čtyři exony, kdežto pro druhý model pouze dva a také prodloužený 5'UTR konec (Obr. 18). Pro účely tohoto projektu bylo dále pracováno s prvním modelem, který je pravděpodobnější.

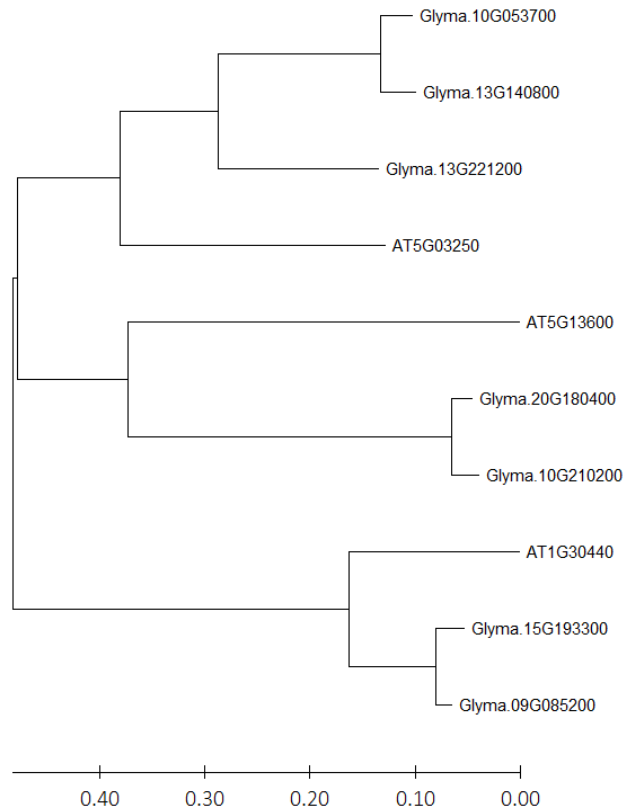
Podle informace o nukleotidové sekvenci flanking sequence byla vizualizována rekonstrukce genu tak, jak by mohla být T-DNA zakomponována. Webové stránky SIGnAL (signal.salk.edu) poskytly informaci, že je insert v genu vložen nejspíše v reverzní orientaci a měl by se nacházet v prvním exonu (Obr. 19). Podle Qin *et al.* (2003) se T-DNA inserty mohou v genomu vyskytovat statisticky stejně často v přímé i v reverzní orientaci.



Obr. 19 Schéma zobrazující gen *At5g03250* a jeho dva předpovězené genové modely. (A) Genový model 1, pro který jsou predikovány čtyři exony. (B) Genová model 2, pro který jsou předpovězeny pouze dva exony a prodloužená 5'UTR oblast. V obou případech je znázorněna pozice výskytu insertu. (C) Rekonstrukce modelu 1 s predikcí výskytu T-DNA insertu. Jsou zobrazeny také regulační sekvence v T-DNA inserci. Schéma bylo vytvořeno v programu SnapGene.

4.2 Fylogenetický strom příbuznosti genů NRL rodiny

Byl sestaven fylogenetický strom příbuznosti genů NRL rodiny *Arabidopsis* a příslušných homologů z genomu sóji (Obr. 20). Fylogenetický strom byl zkonstruován pro zobrazení příbuznosti NPH3 proteinů ze sóji a z *Arabidopsis*, a jejich sekvenčně příbuzných genů. Z výsledku analýzy je zřejmé, že je gen *At5g03250* sekvenčně nejvíce podobný sójovému homologu, což potvrzuje, že byl pro následující experimenty vybrán vhodný protein.

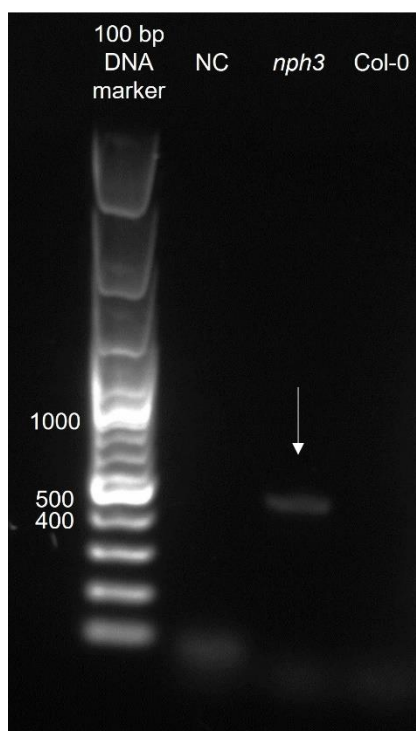


Obr. 20 Fylogenetický strom znázorňující příbuznost genů NRL rodiny v souvislosti s *nph3* genem v sóji a jeho příbuznými geny. Strom byl vytvořen z aminokyselinových (AMK) sekvencí, které byly získány s použitím nástroje BLAST z databáze TAIR a SoyBase. Geny, které byly do této analýzy zařazeny byly vybrány podle podobnosti sekvence až po hranici, kde již příbuznost sekvencí nebyla důležitá. (Přiřazení AMK sekvencí bylo provedeno v programu BioEdit (ClustalW) a grafická podoba stromu byla sestrojena v programu MEGA metodou maximální věrohodnosti (maximum likelihood). Osa znázorňuje počet AMK substitucí na místo, tedy počet změn anebo nahrazení aminokyselin dělený délkou sekvence.

4.2 Ověření *nph3* mutanta

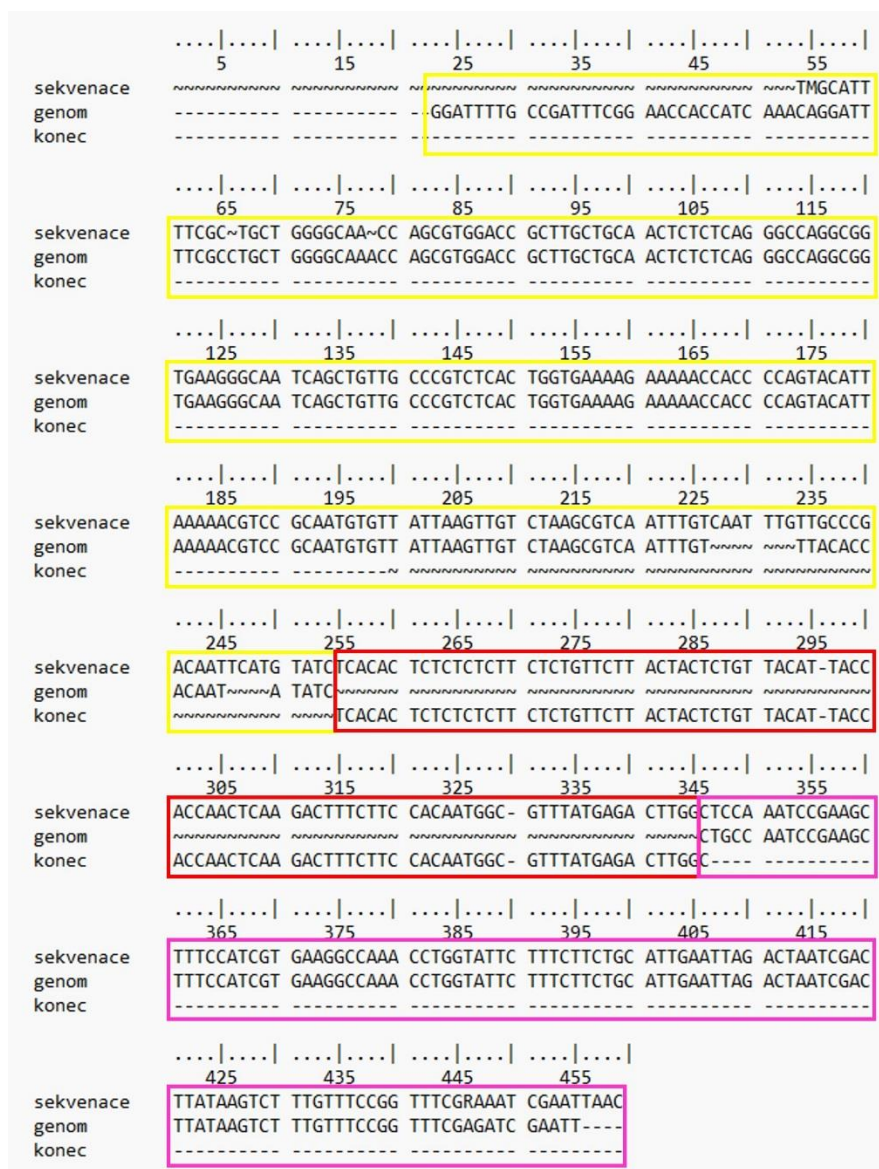
Nejprve bylo nutné ověřit, zda nedošlo k záměně a opravdu se jedná o požadovaný mutantní genotyp. Pro ověření bylo použito PCR a v programu SnapGene byly navrženy primery tak, aby amplicon částečně zasahoval do T-DNA sekvence a částečně do prvního intronu genu. Byl použit přímý primer AtLBb1.3n a zpětný At5g03250_int1_rev. Jako templáty byly do reakce použity FTA karty s dříve odebranou genomovou DNA z rostlin *Arabidopsis* divokého typu a *nph3* mutanta a byla aplikována *Taq* DNA polymerasa. Pro vizualizaci výsledku byla provedena agarosová elektroforéza (1% gel, 90 minut při 80 V) (Obr. 21).

Jak je vidět na obrázku, u *nph3* mutanta byl fragment amplifikován, kdežto u Col-0 ne. I když je fragment slabý, jedná se o pozitivní výsledek. Byl očekáván produkt o velikosti 331 bp, ale podle zvoleného žebříčku, kterým je GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder, je velikost ampliconu 400–500 bp. Negativní kontrola (NC), tedy reakce, která byla nastavena bez templátu potvrzuje, že žádný ze vzorků nebyl kontaminován cizí DNA.



Obr. 21 Vizualizace produktů end-point PCR reakce agarosovou elektroforézou. Pro referenci velikosti ampliconů byl použit marker GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder. Amplicon můžeme pozorovat pouze v případě, kdy byla použita gDNA *nph3* mutanta jako templát, kdežto v případě gDNA divokého typu nebyl fragment amplifikován. Byla potvrzena přítomnost T-DNA insertu. Velikosti fragmentů u markeru jsou uvedeny v bp.

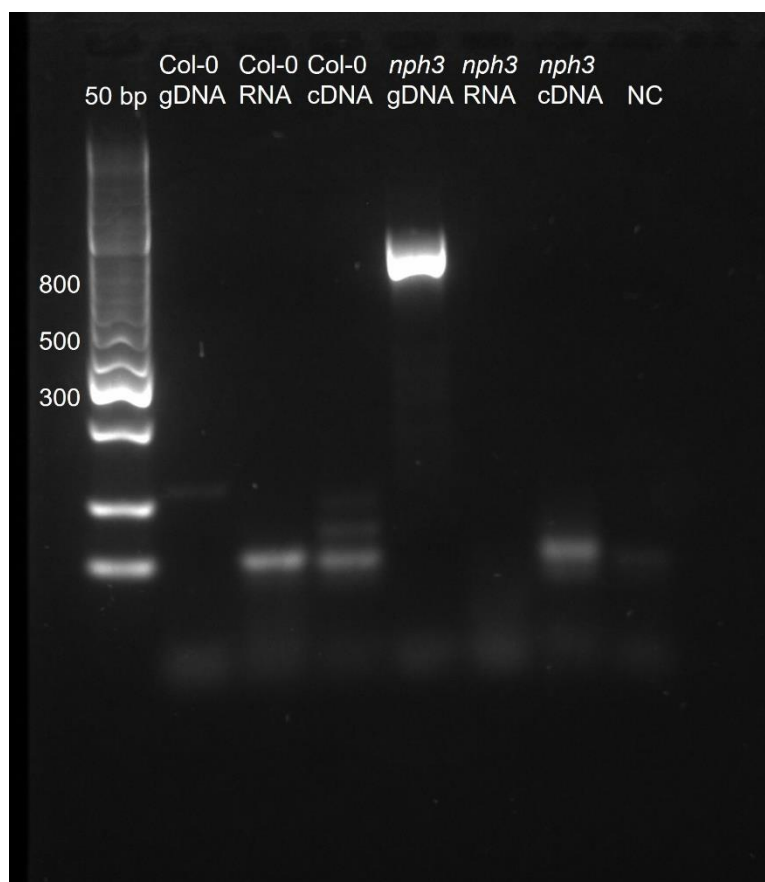
Jelikož byla velikost fragmentu větší, než bylo očekáváno, vzorek byl odeslán na sekvenaci s přímým i zpětným primerem. Výsledky byla potvrzena přítomnost T-DNA insertu v genomové DNA (Obr. 22, S1, S2). Bylo však také zjištěno, že se mezi T-DNA insertem a flanking sequence nachází úsek o velikosti 90 bp. Tento fragment byl následnou analýzou přiřazen úseku 5'UTR oblasti genu.



Obr. 22 Výsledek sekvenace podle přímého primeru AtLBb1.3n a jeho vizualizace, která byla provedena prostřednictvím programu BioEdit. Od 255 po 345 pozici nesouhlasí očekávaná sekvence ampliconu z genomu s výsledkem sekvenace. Bylo zjištěno, že nukleotidová sekvence této části souhlasí s oblastí v 5'UTR konci genu (červeně). Výsledek ale opět potvrzuje přítomnost T-DNA insertu v gDNA *nph3* mutanta. Část sekvence T-DNA inserce je znázorněna žlutou barvou a flanking sequence je ohraničena růžově.

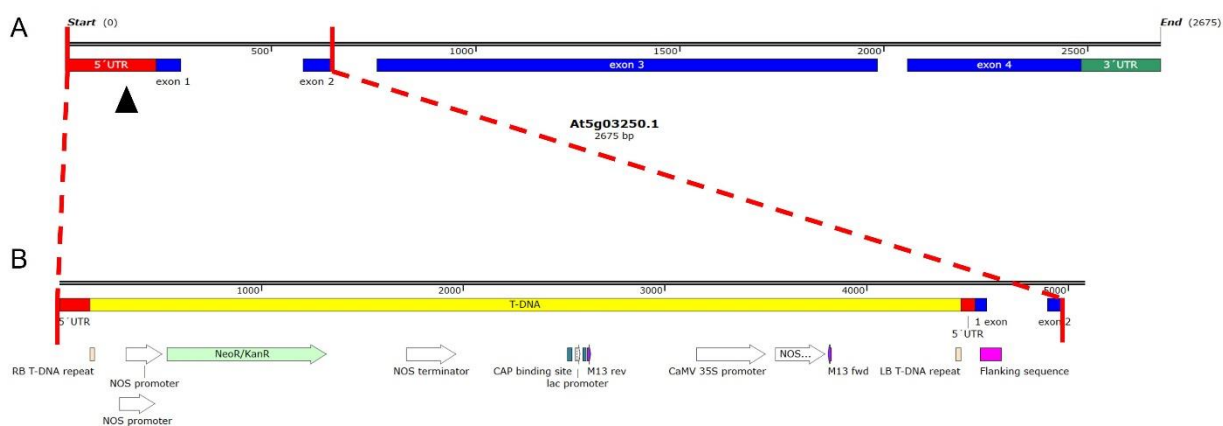
4.3 Ověření funkčnosti T-DNA insertu

Ze semenáčků *A. thaliana* divokého typu i *nph3* mutanta byla izolována RNA, která byla přečištěna a přepsána do cDNA. Dále byla nastavena end-point PCR reakce s těmito dvěma templáty a také s genomovou DNA z FTA karet. Byla opět použita *Taq* DNA polymerasa a výsledek byl vizualizován elektroforézou (3% gel, 75 minut při 90 V). Byl použit přímý primer AtLBb1.3n, který nasedal na T-DNA a zpětný primer At5g03250_RP nasedající v oblasti prvního exonu. Předpokládaná velikost ampliconu v gDNA byla 676 bp a v cDNA 376 bp (Obr. 23).



Obr. 23 Výsledek end-point PCR reakce a jeho vizualizace agarosovou elektroforézou. Pro referenci velikosti bandů byl použit HyperLadder™ 50 bp. Fragment byl amplifikován pouze u genomové DNA *nph3* mutanta, což znamená, že nebyl potvrzen výskyt T-DNA insertu v exonu. Velikosti bandů u markeru jsou uvedeny v bp.

Úspěšnost přepisu cDNA byla ověřena amplifikací s primery pro housekeeping gen aktin (přímý primer: ARAactfw, zpětný primer: ARAactrev) (není součástí práce). Fragment byl amplifikován pouze u genomové DNA *nph3* mutanta a jeho velikost byla 700–800 bp. U cDNA *nph3* mutanta ale fragment detekován nebyl, což naznačuje, že předpokládaný model výskytu T-DNA je chybný. Tato informace souhlasí také s výsledkem Sangerovy sekvenace, díky které bylo zjištěno, že se mezi sekvencí T-DNA a flanking sequence nachází úsek o velikosti 90 bp, který byl přiřazen sekvenci v 5'UTR oblasti genu. Bylo navrženo nové schéma, které ukazuje, že se insert nachází v oblasti 5'UTR konce (Obr. 24). Bylo také potvrzeno, že predikce prvního modelu genu je správná.



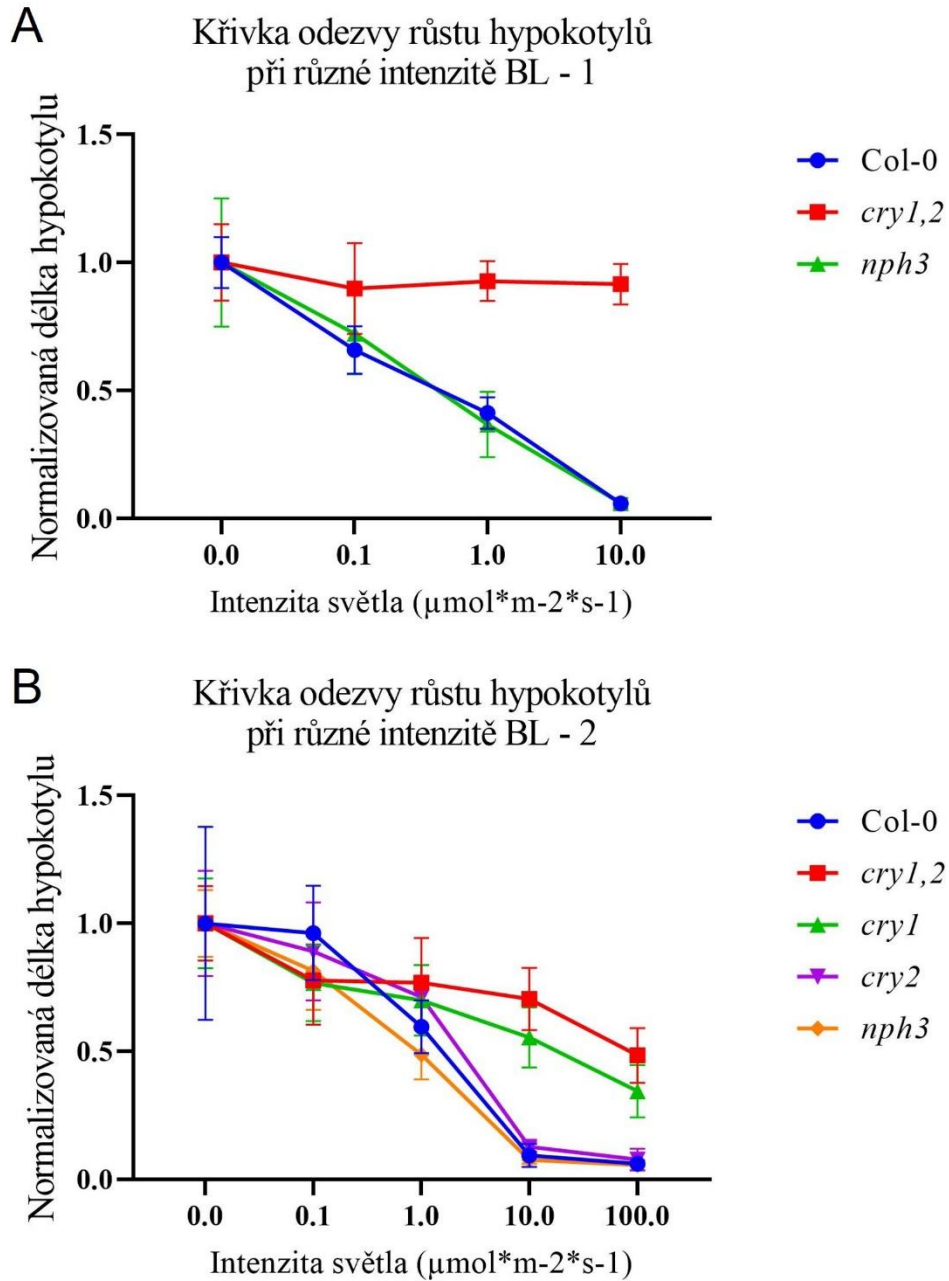
Obr. 24 Schéma znázorňující druhou predikci výskytu T-DNA insertu. (A) Bylo zjištěno, že se insert nevyskytuje v prvním exonu, ale mohl by být přítomen v 5'UTR oblasti. (B) Rekonstrukce modelu 1 s predikcí výskytu T-DNA insertu. T-DNA insert je ohraničen krátkými sekvencemi, které fungují jako levá a pravá hranice. Jsou také zobrazeny také regulační sekvence v T-DNA inserci. Schéma bylo vytvořeno v programu SnapGene.

4.4 Vliv modrého světla na rostliny

4.4.1 Výsledky fenotypové analýzy růstu *Arabidopsis* pod modrým světlem

První experiment (Obr. 25 A, Tab. S3, S4) byl proveden s mutantními semeny Col-0, *nph3* a dvojitým mutantem *cry1, cry2*. Při experimentu bylo na misky vyseto vždy 15 semen na každou podmínku, tedy míru intenzity modrého světla. Hypokotyly rostlin ekotypu Col-0 byly při podmínkách s nejnižší intenzitou modrého světla dlouhé a světlé. Byl u nich pozorován apikální háček a děložní lístky nebyly rozvinuté. V podmínkách s vysokou intenzitou byl hypokotyl krátký a děložní lístky byly rozvinuté a zelené. Podle Boyes *et al.* (2001), se tyto semenáčky nacházely ve vývojovém stádiu 0,7 nebo 1. Údaje, které jsou uvedeny v publikaci, také odpovídají době růstu rostlin. Pro *Arabidopsis*, které rostou ve tmě, zřejmě neexistuje popis jejich vývojových stádií. Rostliny *nph3* mutanta na světelné podmínky reagovaly stejně, jako divoký typ, tedy při nízkých intenzitách byly dlouhé a nezelené, a při nízké intenzitě byly krátké a zelené. Mutantní semena *cry1,2* měly stejný fenotypový projev ve všech podmínkách. Jejich hypokotyly byly prodloužené a světlé. Na miskách byla také semena genotypu GK-290E08. Jedná se o genotyp s knock-down mutací genu *At1g65480*. Tento gen ovlivňuje kvetení rostlin a měl být použit jako pozitivní kontrola podle Jing *et al.* (2017). Bohužel tato semena velmi špatně klíčila, a proto byla dále z experimentu vyloučena. Výsledky byly vyňaty z finálního hodnocení, jelikož jsou statisticky nevýznamné.

V případě druhého nastavení experimentu (Obr. 25 B, Tab. S5, S6) bylo použito více semen, byla nastavena ještě jedna světelná podmínka, kterou byla maximální intenzita BL. Také byla přidána semena single mutantů genů *cry1* a *cry2*. Rostliny Col-0, *nph3* a *cry1,2* se chovala stejně jako v případě prvního experimentu. Mutantní semena *cry1* sledovala stejný trend jako dvojitý mutant, kdežto rostliny *cry2* se chovaly podobně, jako divoký typ. Při nejvyšší intenzitě modrého světla byly také sledovány zkrácené hypokotyly mutanta *cry1* a dvojitého mutanta *cry1,2*. Při tomto druhém experimentu bylo vždy vyseto pro jednu světelnou podmínku 150 semen od genotypu.



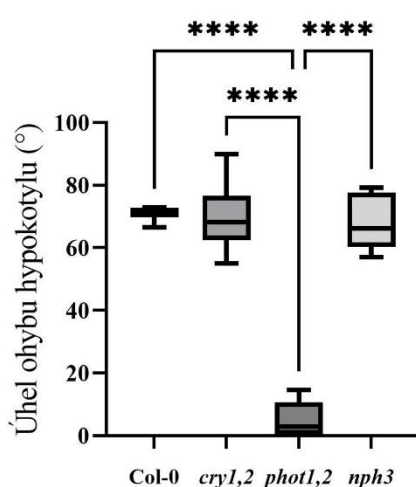
Obr. 25 Křivky zaznamenávající výsledky experimentů, kdy byly rostliny *Arabidopsis* vystaveny modrému světlu o různé intenzitě. A. První provedení experimentu, ve kterém bylo použito méně semen a pouze tři genotypy. B. U druhého provedení experimentu byly použity další dva genotypy, byla nastavena ještě jedna světelná podmínka a bylo použito více semen. Grafy byly sestaveny v programu Graphpad Prism 9.

4.4.2 Fototropický experiment

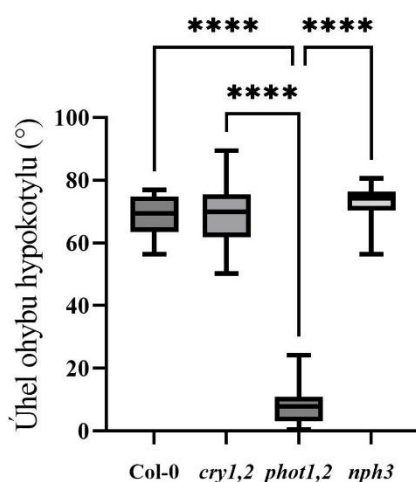
Pro experiment bylo použito 36 semen genotypu Col-0, *nph3*, *cry1,2* i *phot1,2*. Rostliny genotypů Col-0, *nph3* a *cry1,2* ohýbaly vrchní část hypokotylu směrem ke zdroji modrého světla. U rostlin dvojitého mutantu *phot1,2* nebyla tato odpověď pozorována. (Obr. 26 A, Tab. S7).

Druhý experiment byl nastaven obdobně a na misky bylo vyseto 120 semen každého genotypu. Rostliny se v daných podmínkách chovaly stejně jako v prvním provedení (Obr. 26 B, Tab. S8).

A Fototropická odpověď - 1



B Fototropická odpověď - 2



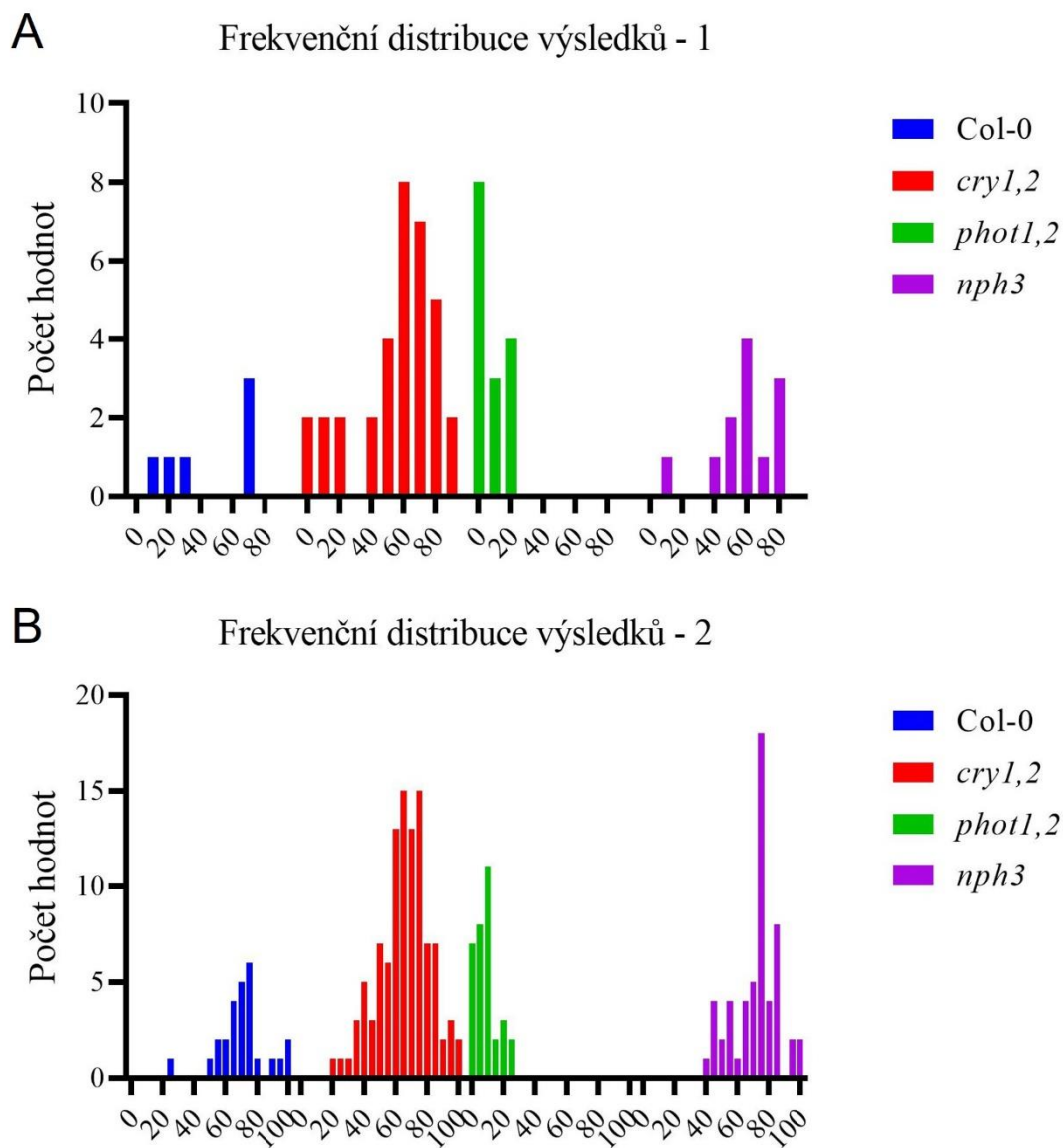
Obr. 26 Krabicové grafy znázorňující míru ohybu hypokotylů při fototropickém experimentu. A. První provedení experimentu s méně jedinci. B. Druhé provedení experimentu s více jedinci. Grafy byly sestaveny v programu Graphpad Prism 9.

4.5 Statistická analýza

Byla provedena statistická analýza výsledků fototropického experimentu, aby bylo zřejmé, zda je, či není signifikantní rozdíl mezi fototropickou odezvou rostlin jednotlivých genotypů. Některé rostliny již při růstu ve tmě po impulzu bílého světla nerostly přímo vzhůru. I když se následně ohýbaly za světlem, úhel ohybu byl již zkreslený, a proto byly hodnoty vyloučeny. Do analýzy také nebyly zahrnuty hodnoty úhlu ohybu rostlin, které byly nejvíce vzdálené od zdroje modrého světla. K těmto jedincům dosahovalo modré světlo o velmi nízké intenzitě a nedošlo k takovému ohybu, jako u těch, kteří byli blíže zdroji světla. Kostka, tedy zařízení, ve kterém byl experiment proveden, byla použita poprvé a metoda nebyla zcela optimalizována. Z tohoto důvodu experiment přinesl mnoho odlehlých výsledků.

Po změření úhlu ohybu hypokotylů byly výsledky analyzovány pomocí programu Graphpad Prism 9. Byly vytvořeny histogramy ukazující frekvenční distribuci výsledků (Obr. 27 A a B) a hodnoty toho rozmezí, které bylo obsazeno málo byly z analýzy vyloučeny.

Následně byla provedena jednosměrná anova, v rámci které byl programem vypočítán Brown-Forsythe test a Barlettův test. Výsledky jsou graficky znázorněny ve výsledných krabicových grafech (26 A a B).



Obr. 27 Frekvenční distribuce výsledků prvního (A) a druhého (B) provedení fototropického experimentu. Graf ukazuje zastoupení získaných hodnot v určitých rozmezích. Výsledky z málo zastoupených oblastí byly následně z experimentu vyřazeny. Osa X vyjadřuje hodnoty úhlu ohybu hypokotylů u jednotlivých genotypů. Graf byl sestaven v programu Graphpad Prism 9.

5 DISKUZE

Jedním z kandidátních genů pro polozakrslé vysokoplodící variety sóji luštinaté je gen *Glyma.13g221200*, který kóduje protein z NPH3 (non-phototropic hypocotyl 3) rodiny (Škrabišová, nepublikované výsledky). Pro ověření předpokládané funkce tohoto proteinu a jeho roli u polozakrslých vysokoplodících variet by bylo vhodné funkčně charakterizovat loss/gain-of-function mutantů tohoto genu v sóji. V dostupných kolekcích mutantů *Glycine max* (Bolon *et al.*, 2011, Espina *et al.*, 2018) však není *nph3* mutant k dispozici. Proto bylo ověření funkce NPH3 proteinu navrženo pro dostupného loss-of-function mutantů modelového organismu, v tomto případě *Arabidopsis thaliana* z kolekce Salk, která je dostupná v databázi SIGnAL (<http://signal.salk.edu/>). Byla provedena analýza aminokyselinové sekvence tohoto proteinu pomocí nástroje BLAST. Výsledky poukázaly na At5g03250, který měl nejvyšší hodnotu skóre a jehož E hodnota byla limitní nule. Tento protein je součástí NPH3 rodiny, jejíž zástupci jsou zapojeni v mechanismu fototropické odpovědi rostlin při působení modrého světla. Fototropismem se rozumí asymetrický růst, kdy rostliny umisťují své vegetativní orgány tak, aby nebyly ve stínu (Goyal *et al.*, 2016). Polozakrslé vysokoplodící variety jsou specifické právě tím, že prosperují nejlépe, když jsou sázeny v blízkém uspořádání, což ale znamená že na sebe jednotlivé rostliny stíní (Cooper, 1985).

Byla proto studována odpověď několika genotypů *Arabidopsis thaliana* na modré světlo. Nejprve byl zkoumán růst při různé intenzitě modrého světla, kde byly sledovány rozdíly délek hypocotylů. Hypokotyly ekotypu Columbia-0 měly ve tmě a při nízké intenzitě modrého světla prodloužené hypocotyly, kdežto se stoupající světelnou intenzitou byly zkracovány a také byly rozvíjeny děložní lístky. Tato odpověď je v *Arabidopsis* při působení pouze modrého světla zprostředkována kryptochromy (Lin *et al.*, 1998).

Proto byli do experimentu zařazeni také mutanti *cry1,2*, *cry1* a *cry2*. Mutanti *cry1,2* vykazovali stejný fenotyp ve všech podmínkách. Absence odpovědi těchto proteinů tedy potvrzuje, že žádný jiný fotoreceptor nemá přímý vliv na inhibici růstu hypocotylu při ozáření modrým světlem (Ahmad *et al.*, 2002). Efekt Cry1 a Cry2 ale musí být jiný, jelikož byl pozorován rozdíl ve fenotypové odezvě mutantů, kteří měli z funkce vyřazen pouze jeden z těchto proteinů. Při vysoké intenzitě modrého světla totiž způsobuje inhibici hypocotylu zejména Cry1 (Poppe *et al.*, 2001). Funkce Cry2 je na druhou stranu

při fotomorfogenezi mladých rostlin omezena pouze na nízkou intenzitu modrého světla (Lin *et al.*, 1998).

Hypokotyly *nph3* mutanta byly stejně, jako v případě Col-0 prodloužené ve tmě a při nízké intenzitě modrého světla, kdežto při intenzitách vyšších byly hypokotyly krátké. NPH3 je sice zapojen jako přenašeč signálu v odpovědi rostlin na modré světlo, ale interaguje zejména s fototropiny, specificky s Phot1 (Pedmale & Liscum, 2007). Fototropiny i kryptochromy jsou fotoreceptory, které absorbují modré světlo, ale jsou zapojeny v rozdílných mechanismech rostlin, které zajišťují jejich životaschopnost. Na základě získaných výsledků tedy můžeme usoudit, že NPH3 není zapojen v signální dráze kryptochromů, a proto v případě tohoto experimentu nebyl pozorován signifikantní rozdíl chování *nph3* mutanta oproti Col-0.

Dále byla zkoumána fototropická odpověď rostlin, kde byl sledován ohyb hypokotylů rostlin směrem ke zdroji modrého světla. Kryptochromy nejsou přímo zapojeny ve fototropickém mechanismu rostlin, proto u mutantů, kde byla jejich funkce vyřazena nebyl sledován rozdíl oproti odpovědi divokého typu, kdy se rostliny obou genotypů ohýbaly směrem k modrému světlu. Christie & Briggs (2002) ve svém výzkumu také sledovali ohyb hypokotylů směrem k modrému světlu u *cry1,2* mutantů a nepotvrdili účast kryptochromů při fototropické odezvě. Na druhou stranu bylo potvrzeno, že kryptochromy fyzicky interagují s fytochromy a mohou tak ovlivňovat fototropickou odezvu rostlin (Ahmad *et al.*, 1998).

U mutantů *phot1,2* pokračoval růst hypokotylů směrem vzhůru, i když byly vystaveny pouze modrému světlu ze strany, jelikož právě tyto fotoreceptory jsou zodpovědné za fototropickou odpověď (Briggs & Christie, 2002).

Mutantní rostliny, které postrádaly funkci proteinu NPH3 vykazovaly normální fototropickou odezvu stejně jako Col-0. Pedmale & Liscum (2007) však uvádí, že NPH3 je zapojen ve fototropické signalizaci prostřednictvím Phot1. NPH3 je ve tmě fosforylovaný a k jeho rapidní defosforylaci dochází vlivem fotoaktivace Phot1 (Pedmale & Liscum, 2007).

Jelikož nebyla pozorována odlišná odpověď *nph3* mutanta oproti rostlinám divokého typu u *Arabidopsis thaliana*, gen *Gylma.13g221200* nebyl těmito experimenty potvrzen jako kandidát pro polozakrslé vysokoplodící variety, na druhou stranu ale ani z možných kandidátů nebyl vyloučen. Jedním z důvodů, proč nebyl pozorován žádný statisticky významný odklon od fyziologických hodnot Col-0, může být vliv epistatického efektu podobných genů NRL rodiny, která zahrnuje celkem 33 *nph3*-like genů včetně *nph3*

(Pedmale *et al.*, 2010). Experimenty byly prováděny s mutantem, u kterého byl vyřazen z funkce pouze jeden gen této velké rodiny a je možné, že při jeho knock-downu mohou tuto funkci zastoupit jiné podobné geny (Kuusk *et al.*, 2006; Kafri *et al.*, 2009).

Experimenty v této práci byly prováděny s ranným vývojovým stadiem semenáčků kvůli úspoře času i materiálu který byl pro tyto experimenty potřebný, a je nutno vzít v potaz, že *nph3* gen v nich nemusí být exprimován. Je možné, že k expresi genu dochází až u vyvinutějších semenáčků, anebo je gen přepisován v jiných rostlinných orgánech, které se vyvíjí v pozdějším stádiu růstu *Arabidopsis*. Pro ověření této hypotézy by bylo vhodné změřit míru exprese *nph3*-like genů divokého typu v porovnání s *nph3* mutantem.

Je důležité se také zamyslet, zda je *Arabidopsis thaliana* vhodnou modelovou rostlinou pro sóju. Sója jako luštěnina má oproti *Arabidopsis* složitější duplikovaný genom, což samo o sobě může komplikovat reverzní genetické přístupy sloužící k pochopení funkce genů (Shoemaker *et al.*, 2006). Modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* byla zvolena, jelikož se jedná o jediný model, u kterého byl *nph3* mutant dostupný. U *Arabidopsis* je také velmi dobře prozkoumaná světelná signalizace, fototropické odpovědi a fotoreceptorové proteiny (Goyal *et al.*, 2016; Paik & Huq, 2019).

Alternativní metodu studia funkce NPH3 u sóji by bylo například umlčení genů pomocí RNAi či CRISPR, pomocí které by byl zajištěn knock-down či knock-out více genů najednou.

6. ZÁVĚR

V této práci byla vypracována literární rešerše zabývající se genetickým pozadím polozakrslých vysokoplodících variet sóji luštinaté v souvislosti s funkcí NPH3 proteinu, který je kódován kandidátním genem určeným pro tyto variety. Dále je teoretická část věnována mechanismům, pomocí kterých jsou rostliny schopné vnímat světlo a stinné podmínky.

V experimentální části byla pomocí bioinformatických nástrojů zkoumána missense mutace v genu *Glyma.13g221200*, která vede ke změně aminokyseliny v proteinu NPH3 a je pro polozakrslé vysokoplodící variety specifická. Byl také určen homolog v genomu *A. thaliana*, kterým je gen *At5g03250* kódující NPH3 protein. Následně byl vybrán vhodný mutantní genotyp s T-DNA insercí právě v tomto genu, díky které je NPH3 protein nefunkční. Molekulárně biologickými metodami byl u komerčně získaných semen *Arabidopsis* ověřen výskyt a funkčnost mutageneze.

Aby byla zjištěna funkce NPH3 proteinu, byly provedeny experimenty, kterými byla sledována odpověď rostlin na vliv modrého světla. Nejprve byla zkoumána inhibice růstu hypokotylů při různé intenzitě modrého světla. Dále byl proveden fototropický experiment, při kterém byl sledován ohyb rostlin směrem ke zdroji modrého světla. Odpověď rostlin *nph3* mutantu byla srovnána s divokým typem (Col-0) a dalšími loss-of-function mutanty rostlinných fotoreceptorů.

Provedenými experimenty na *nph3* mutantovi *Arabidopsis thaliana* nebyl potvrzen kandidátní gen pro polozakrslé vysokoplodící variety sóji luštinaté, ale nebyl z kandidátů ani vyloučen. Byly diskutovány budoucí experimenty pro dodatečnou charakterizaci mutantu *nph3* s vídí objasnit roli NPH3 u fenotypu polozakrslých vysokoplodících genotypů sóji i alternativní řešení mimo tohoto mutantu.

7 LITERATURA

- Ahmad, M., Jarillo, J. A., Smirnova, O., & Cashmore, A. R. (1998). Cryptochrome blue-light photoreceptors of Arabidopsis implicated in phototropism. *Nature*, 392(6677), 720-723. <https://doi.org/10.1038/33701>
- Ahmad, M., Grancher, N., Heil, M., Black, R. C., Giovani, B., Galland, P., & Lardemer, D. (2002). Action spectrum for cryptochrome-dependent hypocotyl growth inhibition in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 129(2), 774-785. <https://doi.org/10.1104/pp.010969>
- Amilia Pratiwi, R., Imam Surya, M. (2020). Agrobacterium-Mediated Transformation. In: Genetic Transformation in Crops (1. vydání). IntechOpen
- Batschauer, A. (1998). Photoreceptors of higher plants. *Planta*, 206(4), 479-492. <https://doi.org/10.1007/s004250050425>
- Bernard, R. L. (1972). Two genes affecting stem termination in soybeans. *Crop Science*, 12(2), 235-239. <https://doi.org/10.2135/cropsci1972.0011183X001200020028x>
- Bevan, M. (1984). Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic acids research*, 12(22), 8711-8721. <https://doi.org/10.1093/nar/12.22.8711>
- BioEdit*. <https://bioedit.software.informer.com/7.2/> (15. 2. 2023)
- Bolon, Y. T., Haun, W. J., Xu, W. W., Grant, D., Stacey, M. G., Nelson, R. T., Gerhardt, D. J., Jeddelloh J. A., Stacey, G., Muehlbauer G. J., Orf, J. H., Naeve S. L., Stupar, R. M. & Vance, C. P. (2011). Phenotypic and genomic analyses of a fast neutron mutant population resource in soybean. *Plant physiology*, 156(1), 240-253. <https://doi.org/10.1104/pp.110.170811>
- Boyes, D. C., Zayed, A. M., Ascenzi, R., McCaskill, A. J., Hoffman, N. E., Davis, K. R., & Grolach, J. (2001). Growth stage-based phenotypic analysis of Arabidopsis: a model for high throughput functional genomics in plants. *The Plant Cell*, 13(7), 1499-1510. <https://doi.org/10.1105/TPC.010011>
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in plant science*, 7(5), 204-210. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02245-8TF-8](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02245-8TF-8)
- Brkljacic, J., Grotewold, E., Scholl, R., Mockler, T., Garvin, D. F., Vain, P., T., Brutnell, R., Sibout, M., Bevan, H., Budak, A. L., Caicedo, C., Gao, Y., Gu, S. P., Hazen, B. F., Holt, S. Y., Hong, M., Jordan, A. J., Manzaneda, T., Mitchell-Olds, K. Mochida, L. A. J., Mur, Ch. M., Park, J., Sedbrook, M., Watt, S. J., Zheng & Vogel, J. P. (2011). Brachypodium as a model for the grasses: today and the future. *Plant Physiology*, 157(1), 3-13. <https://doi.org/10.1104/pp.111.179531>
- Bu, T., Lu, S., Wang, K., Dong, L., Li, S., Xie, Q., Xu, X., Cheng, Q., Chen, L., Fang, C., Li, H., Liu, B., Weller, J. L., & Kong, F. (2021). A critical role of the soybean evening complex in the control of photoperiod sensitivity and adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118(8), e2010241118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2010241118>
- Caldwell, B. E., & Howell, R. W. (1973). *Soybeans: Improvement, production, and uses* (Vol. 6). R. W. Judd, & H. W. Johnson (Eds.). Madison: American Society of Agronomy.
- Cao, D., Takeshima, R., Zhao, C., Liu, B., Jun, A., & Kong, F. (2017). Molecular mechanisms of flowering under long days and stem growth habit in soybean. *Journal of Experimental Botany*, 68(8), 1873-1884. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw394>

- Carvalho, R. F., Takaki, M., & Azevedo, R. A. (2011). Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33, 241-248. <https://doi.org/10.1007/s11738-010-0533-7>
- Casal, J. J., Sánchez, R. A., & Botto, J. F. (1998). Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany*, 49(319), 127-138. <https://doi.org/10.1093/jxb/49.319.127>
- Colorado State University Publishing. colostate.pressbooks.pub (19. 1. 2023)
- Cook, D. R. (1999). Medicago truncatula-a model in the making!. *Current opinion in plant biology*, 2(4), 301-304.
- Cooper, R. L. (1981). Development of Short-Statured Soybean Cultivars 1. *Crop Science*, 21(1), 127-131. <https://doi.org/10.2135/cropsci1981.0011183X002100010034x>
- Cooper, R. L. (1985). Breeding semidwarf soybeans. In Janick J. (Ed.), *Plant breeding reviews volume 3* (s. 289-310). The avi publishing company, INC.
- Darwin, Ch., Darwin, F. (1880) *The power of movement in plants* (1. vydání). William Clowes and sons, limited, Londýn.
- Demarsy, E., & Fankhauser, C. (2009). Higher plants use LOV to perceive blue light. *Current opinion in plant biology*, 12(1), 69-74. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.09.002>
- Dietz, N., Combs-Giroir, R., Cooper, G., Stacey, M., Miranda, C., & Bilyeu, K. (2021). Geographic distribution of the E1 family of genes and their effects on reproductive timing in soybean. *BMC Plant Biology*, 21(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-021-03197-x>
- Dietz, N., Chan, Y. O., Scaboo, A., Graef, G., Hyten, D., Happ, M., Diers, B., Lorenz, A., Wang, D., Joshi, T. & Bilyeu, K. (2022). Candidate genes modulating reproductive timing in elite us soybean lines identified in soybean alleles of Arabidopsis flowering orthologs with divergent latitude distribution. *Frontiers in Plant Science*, 13. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.889066>
- Dong, Z., Chen, L., Li, Z., Liu, N., Zhang, S., Liu, J., & Liu, B. (2020). Identification and molecular mapping of the semi-dwarf locus (sdf-1) in soybean by SLAF-seq method. *Euphytica*, 216, 1-13. <https://doi.org/10.1007/s10681-020-02633-7>
- El-Sappah, A. H., Yan, K., Huang, Q., Islam, M. M., Li, Q., Wang, Y., Khan, M. S., Zhao, X., Mir, R. R., Li, J., El-Tarabily, K. A. & Abbas, M. (2021). Comprehensive mechanism of gene silencing and its role in plant growth and development. *Frontiers in Plant Science*, 12, 705249. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.705249>
- Espina, M. J., Ahmed, C. S., Bernardini, A., Adeleke, E., Yadegari, Z., Arelli, P., Pantalone, V. & Taheri, A. (2018). Development and phenotypic screening of an ethyl methane sulfonate mutant population in soybean. *Frontiers in plant science*, 9, 394. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00394>
- Falk, D. E. (2010). Generating and maintaining diversity at the elite level in crop breeding. *Genome*, 53(11), 982-991. <https://doi.org/10.1139/G10-081>
- Fankhauser, C., & Casal, J. J. (2004). Phenotypic characterization of a photomorphogenic mutant. *The Plant Journal*, 39(5), 747-760. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2004.02148.x>
- Franklin, K. A., & Whitelam, G. C. (2005). Phytochromes and shade-avoidance responses in plants. *Annals of botany*, 96(2), 169-175. <https://doi.org/10.1093/aob/mci165>

- Franklin, K. A., & Quail, P. H. (2010). Phytochrome functions in Arabidopsis development. *Journal of experimental botany*, 61(1), 11-24. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp304>
- Fraser, D. P., Hayes, S., & Franklin, K. A. (2016). Photoreceptor crosstalk in shade avoidance. *Current opinion in plant biology*, 33, 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2016.03.008>
- Ganapathi, T. R., Suprasanna, P., Rao, P. S., & Bapat, V. A. (2004). Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)-A model system for tissue culture interventions and genetic engineering.
- Goyal, A., Karayekov, E., Galvão, V. C., Ren, H., Casal, J. J., & Fankhauser, C. (2016). Shade promotes phototropism through phytochrome B-controlled auxin production. *Current Biology*, 26(24), 3280-3287. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.10.001>
- Green-Tracewicz, E., Page, E. R., & Swanton, C. J. (2011). Shade avoidance in soybean reduces branching and increases plant-to-plant variability in biomass and yield per plant. *Weed Science*, 59(1), 43-49. [10.1614/WS-D-10-00081.1](https://doi.org/10.1614/WS-D-10-00081.1)
- Gyula, P., Schäfer, E., & Nagy, F. (2003). Light perception and signalling in higher plants. *Current opinion in plant biology*, 6(5), 446-452. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00082-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00082-7)
- Hall, T. A. (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic acids symposium series*, (41)41, 95-98.
- Heindl, J. C., & Brun, W. A. (1983). Light and shade effects on abscission and ¹⁴C-photoassimilate partitioning among reproductive structures in soybean. *Plant physiology*, 73(2), 434-439. <https://doi.org/10.1104/pp.73.2.434>
- Hitz, T., Hartung, J., Graeff-Hönninger, S., & Munz, S. (2019). Morphological response of soybean (*Glycine max* (L.) Merr.) cultivars to light intensity and red to far-red ratio. *Agronomy*, 9(8), 428. <https://doi.org/10.3390/agronomy9080428>
- Hymowitz, T. (1970). On the domestication of the soybean. *Economic botany*, 24(4), 408-421. <https://doi.org/10.1007/BF02860745>
- Chan, Y. O., Dietz, N., Zeng, S., Wang, J., Flint-Garcia, S., Salazar-Vidal, M. N., Škrabišová, M., Bilyeu, K & Joshi, T. (2023). The Allele Catalog Tool: a web-based interactive tool for allele discovery and analysis. *BMC genomics*, 24(1), 107. <https://doi.org/10.1186/s12864-023-09161-3>
- Cheng, W., Gao, J. S., Feng, X. X., Qun, S. H. A. O., Yang, S. X., & Feng, X. Z. (2016). Characterization of dwarf mutants and molecular mapping of a dwarf locus in soybean. *Journal of integrative agriculture*, 15(10), 2228-2236. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(15\)61312-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(15)61312-0)
- Christie, J. M., Suetsugu, N., Sullivan, S., & Wada, M. (2018). Shining light on the function of NPH3/RPT2-like proteins in phototropin signaling. *Plant physiology*, 176(2), 1015-1024. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00835>
- ILSoyAdvisor*. <https://www.ilsoyadvisor.com/> (18. 1. 2023)
- Inoue, S. I., Takemiya, A., & Shimazaki, K. I. (2010). Phototropin signaling and stomatal opening as a model case. *Current opinion in plant biology*, 13(5), 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.002>
- Izawa, T., & Shimamoto, K. (1996). Becoming a model plant: the importance of rice to plant science. *Trends in Plant Science*, 1(3), 95-99. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)80041-0](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)80041-0)

- Jankowicz-Cieslak, J., & Till, B. J. (2016). Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. *Current protocols in plant biology*, 1(4), 617-635. <https://doi/10.1002/cppb.20040>
- Kafri, R., Springer, M., & Pilpel, Y. (2009). Genetic redundancy: new tricks for old genes. *Cell*, 136(3), 389-392. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.01.027>
- Karpinski, S., Gabrys, H., Mateo, A., Karpinska, B., & Mullineaux, P. M. (2003). Light perception in plant disease defence signalling. *Current opinion in plant biology*, 6(4), 390-396. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00061-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00061-X)
- Kazan, K., & Manners, J. M. (2011). The interplay between light and jasmonate signalling during defence and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(12), 4087-4100. <https://doi.org/10.1093/jxb/err142>
- Keuskamp, D. H., Keller, M. M., Ballaré, C. L., & Pierik, R. (2012). Blue light regulated shade avoidance. *Plant signaling & behavior*, 7(4), 514-517. <https://doi.org/10.4161/psb.19340>
- Kim, J. H., Scaboo, A., Pantalone, V., Li, Z., & Bilyeu, K. (2022). Utilization of plant architecture genes in soybean to positively impact adaptation to high yield environments. *Frontiers in Plant Science*, 1492. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.891587>
- Kim, M. Y., Lee, S., Van, K., Kim, T. H., Jeong, S. C., Choi, I. Y., Kim, D. S., Lee, Y. S., Park, D., Ma, J., Kim, W. Y., Kim, B. C., Park, S., Lee, K. A., Kim, D. H., Kim, K. H., Shin, J. H., Jang, Y. E., Kim, K. D., Liu, W. X., Chaisan, T., Kang, Y. J., Lee, Y. H., Kim, K. H., Moon, J. K., Schmutz, J., Jackson, S. A., Bhak, J. & Lee, S. H. (2010). Whole-genome sequencing and intensive analysis of the undomesticated soybean (*Glycine soja* Sieb. and Zucc.) genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(51), 22032-22037. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009526107>
- Kim, Y., Schumaker, K.S., Zhu, JK. (2006). EMS Mutagenesis of Arabidopsis. In: Salinas, J., Sanchez-Serrano, J.J. (eds) Arabidopsis Protocols. *Methods in Molecular Biology*™, vol 323. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59745-003-0:101>
- Kleinboelting, N., Huep, G., Kloetgen, A., Viehoveer, P., & Weisshaar, B. (2012). GABI-Kat SimpleSearch: new features of the Arabidopsis thaliana T-DNA mutant database. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1211-D1215. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr1047>
- Kodym, A., Afza, R. (2003). Physical and Chemical Mutagenesis. In: Grotewold, E. (eds) Plant Functional Genomics. *Methods in Molecular Biology*™, vol 236. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-413-1:189>
- Kofsky, J., Zhang, H., & Song, B. H. (2018). The untapped genetic reservoir: the past, current, and future applications of the wild soybean (*Glycine soja*). *Frontiers in Plant Science*, 9, 949. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00949>
- Kutschera, U., & Briggs, W. R. (2013). Seedling development in buckwheat and the discovery of the photomorphogenic shade-avoidance response. *Plant biology*, 15(6), 931-940. <https://doi.org/10.1111/plb.12077>
- Kuusk, S., Sohlberg, J. J., Magnus Eklund, D., & Sundberg, E. (2006). Functionally redundant SHI family genes regulate Arabidopsis gynoecium development in a dose-dependent manner. *The Plant Journal*, 47(1), 99-111. <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-313X.2006.02774.x>
- Langewisch, T., Zhang, H., Vincent, R., Joshi, T., Xu, D., & Bilyeu, K. (2014). Major soybean maturity gene haplotypes revealed by SNPviz analysis of 72 sequenced

- soybean genomes. *PLoS one*, 9(4), e94150. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094150>
- Li, F. W., Melkonian, M., Rothfels, C. J., Villarreal, J. C., Stevenson, D. W., Graham, S. W., Graham, S. W., Wong, G. K. S., Pryer, K. M. & Mathews, S. (2015). Phytochrome diversity in green plants and the origin of canonical plant phytochromes. *Nature communications*, 6(1), 7852. <https://doi.org/10.1038/ncomms8852>
- Li, L., & Chen, X. (2023). Auxin regulation on crop: from mechanisms to opportunities in soybean breeding. *Molecular Breeding*, 43(3), 16. <https://doi.org/10.1007/s11032-023-01361-9>
- Li, Q. H., & Yang, H. Q. (2007). Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and Photobiology*, 83(1), 94-101. <https://doi.org/10.1562/2006-02-28-IR-826>
- Li, X., & Zhang, Y. (2002). Reverse genetics by fast neutron mutagenesis in higher plants. *Functional & integrative genomics*, 2, 254-258. <https://doi.org/10.1007/s10142-002-0076-0>
- Li, Y. H., Liu, Y. L., Reif, J. C., Liu, Z. X., Liu, B., Mette, M. F., Chang, R. Z. & Qiu, L. J. (2014). Biparental resequencing coupled with SNP genotyping of a segregating population offers insights into the landscape of recombination and fixed genomic regions in elite soybean. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(4), 553-560. <https://doi.org/10.1534/g3.113.009589>
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., & Cashmore, A. R. (1998). Enhancement of blue-light sensitivity of Arabidopsis seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 95(5), 2686-2690. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.5.268>
- Liu, B., Watanabe, S., Uchiyama, T., Kong, F., Kanazawa, A., Xia, Yamana, T., Z., Nagamastu, A., Arai, M., Kitamura, K., Chikara, M., Harada, K. & Abe, J. (2010). The soybean stem growth habit gene Dt1 is an ortholog of Arabidopsis TERMINAL FLOWER1. *Plant Physiology*, 153(1), 198-210. <https://doi.org/10.1104/pp.109.150607>
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., & Lin, C. (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in plant science*, 16(12), 684-691. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2011.09.002>
- Liu, Y., Zhang, D., Ping, J., Li, S., Chen, Z., & Ma, J. (2016). Innovation of a regulatory mechanism modulating semi-determinate stem growth through artificial selection in soybean. *PLoS Genetics*, 12(1), e1005818. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005818>
- Marcolino-Gomes, J., Nakayama, T. J., Molinari, H. B., Basso, M. F., Henning, L. M., Fuganti-Pagliarini, R., Hiron, F. G. & Nepomuceno, A. L. (2017). Functional characterization of a putative Glycine max ELF4 in transgenic Arabidopsis and its role during flowering control. *Frontiers in Plant Science*, 8, 618. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00618>
- Mason, J. M., & Arndt, K. M. (2004). Coiled coil domains: stability, specificity, and biological implications. *ChemBioChem*, 5(2), 170-176. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300781>
- Mathieu M., Winters E. K., Kong F., Wan J., Wang S., Eckert H., Luth D., Paz M., Donovan C., Zhang Z., Somers D., Wang K., Nguyen H., Shoemaker R. C., Stacey G., Clemente T. (2009): Establishment of soybean (*Glycine max* Merr. L) transposon-based mutagenesis repository. *Planta* 229, 279-289. <https://doi.org/10.1007/s00425-008-0827-9>
- MEGA. <https://www.megasoftware.net/> (22. 1. 2023)

- Miladinović, J., Čeran, M., Đorđević, V., Balešević-Tubić, S., Petrović, K., Đukić, V., & Miladinović, D. (2018). Allelic variation and distribution of the major maturity genes in different soybean collections. *Frontiers in plant science*, 9, 1286. <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.01286>
- Miranda, C., Scaboo, A., Cober, E., Denwar, N., & Bilyeu, K. (2020). The effects and interaction of soybean maturity gene alleles controlling flowering time, maturity, and adaptation in tropical environments. *BMC plant biology*, 20, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12870-020-2276-y>
- Mockler, T. C., Guo, H., Yang, H., Duong, H., & Lin, C. (1999). Antagonistic actions of Arabidopsis cryptochromes and phytochrome B in the regulation of floral induction. *Development*, 126(10), 2073-2082. [10.1242/dev.126.10.2073](https://doi.org/10.1242/dev.126.10.2073)
- Molas, M. L., & Kiss, J. Z. (2009). Phototropism and gravitropism in plants. *Advances in Botanical Research*, 49, 1-34. [https://doi.org/10.1016/S0065-2296\(08\)00601-0](https://doi.org/10.1016/S0065-2296(08)00601-0)
- Mount, D. W. (2007). Using the basic local alignment search tool (BLAST). *Cold Spring Harbor Protocols*, 2007(7). [10.1101/pdb.top17](https://doi.org/10.1101/pdb.top17)
- National Plant Germplasm System. <https://www.ars-grin.gov/npgs/> (13. 4. 2023)
- Ohio's Country Journal. <https://ocj.com/> (17. 1. 2023)
- Paik, I., & Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. In *Seminars in Cell & Developmental Biology* (Vol. 92, pp. 114-121). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2019.03.007>
- Pandey, P., Senthil-Kumar, M., Mysore, K.S. (2015). Advances in Plant Gene Silencing Methods. In: Mysore, K., Senthil-Kumar, M. (eds) Plant Gene Silencing. Methods in Molecular Biology, vol 1287. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2453-0_1
- Pedmale, U. V., & Liscum, E. (2007). Regulation of phototropic signaling in Arabidopsis via phosphorylation state changes in the phototropin 1-interacting protein NPH3. *Journal of Biological Chemistry*, 282(27), 19992-20001. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702551200>
- Pedmale, U. V., Celaya, R. B., & Liscum, E. (2010). Phototropism: mechanism and outcomes. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 8. [10.1199/tab.0125](https://doi.org/10.1199/tab.0125)
- Peng, J., Richards, D. E., Hartley, N. M., Murphy, G. P., Devos, K. M., Flintam, J. E., Beales, J., Fish, A. J., Worland, A. J., Pelica, F., Sudhakar, D., Christou, P., Snape, J. W., Gale, M. D. & Harberd, N. P. (1999). 'Green revolution' genes encode mutant gibberellin response modulators. *Nature*, 400(6741), 256-261. <https://doi.org/10.1038/22307>
- Ping, J., Liu, Y., Sun, L., Zhao, M., Li, Y., She, M., Sui, Y., Lin, F., Liu, X., Tang, Z., Nguyen, H., Tian, Z., Qiu L., Nelson R. L., Clemente, T. E., Specht, J. E. & Ma, J. (2014). Dt2 is a gain-of-function MADS-domain factor gene that specifies semideterminacy in soybean. *The Plant Cell*, 26(7), 2831-2842. <https://doi.org/10.1105/tpc.114.126938>
- Poehlman, J. M (1987). Breeding soybeans. In D. A. Sleper, *Breeding field crops* (3. vydání, 421-450). Van Nostrand Reinhold, New York.
- Poppe, C., Sweere, U., Drumm-Herrel, H., & Schäfer, E. (1998). The blue light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal*, 16(4), 465-471. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1998.00322.x>
- Prositate. prosite.expasy.org (6. 1. 2023)

- PURSUIT*. <https://pursuit.unimelb.edu.au/> (10. 1. 2023)
- Quail, P. H. (2010). Phytochromes. *Current Biology*, 20(12), R504-R507. [10.1016/j.cub.2010.04.014](https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.014)
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M. & Okada, K. (2001). Arabidopsis nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6969-6974. <https://doi.org/10.1073/pnas.101137598>
- Sakamoto, K., & Briggs, W. R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *The Plant Cell*, 14(8), 1723-1735. <https://doi.org/10.1105/tpc.003293>
- Secret Jardin*. <https://www.secretjardin.com/> (21. 1. 2023)
- Sequence Sever*. <https://soybase.org/sequenceserver/> (23. 6.2022)
- Shoemaker, R. C., Schlueter, J., & Doyle, J. J. (2006). Paleopolyploidy and gene duplication in soybean and other legumes. *Current opinion in plant biology*, 9(2), 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2006.01.007>
- SIGNAL*, Salk Institute Genomic Analysis Laboratory. <http://signal.salk.edu/> (15. 3. 2022)
- Smalley, M. D., Fehr, W. R., Cianzio, S. R., Han, F., Sebastian, S. A., & Streit, L. G. (2004). Quantitative trait loci for soybean seed yield in elite and plant introduction germplasm. *Crop science*, 44(2), 436-442. <https://doi.org/10.2135/cropsci2004.4360>
- Smith, H. (2000). Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature*, 407(6804), 585-591. <https://doi.org/10.1038/35036500>
- SnapGene*. <https://www.snapgene.com/> (16. 1. 2023)
- Somssich, M. (2019). A short history of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Columbia-0* (No. e26931v5). PeerJ Preprints. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.26931v5>
- Song Q., Hyten D. L., Jia G., Quigley C. V., Fickus E. W., Nelson R. L. & Cregan P. B. (2013). Development and evaluation of SoySNP50K, a high-density genotyping array for soybean. *PLoS one*, 8:54985. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0054985>
- Song, W., Sun, S., Ibrahim, S. E., Xu, Z., Wu, H., Hu, X., ... & Han, T. (2019). Standard cultivar selection and digital quantification for precise classification of maturity groups in soybean. *Crop Science*, 59(5), 1997-2006. <https://doi.org/10.2135/cropsci2019.02.0095>
- Sorin, C., Salla-Martret, M., Bou-Torrent, J., Roig-Villanova, I., & Martínez-García, J. F. (2009). ATHB4, a regulator of shade avoidance, modulates hormone response in *Arabidopsis* seedlings. *The Plant Journal*, 59(2), 266-277. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2009.03866.x>
- SoyBase: Development and Phenotypic Screening of an Ethyl Methane Sulfonate Mutant Population in Soybean*. <https://soybase.org/projects/SoyBase.P2019.01.php> (17. 4. 2023)
- SoyBase: Fast Neutron Mutants*. <https://www.soybase.org/mutants/> (17. 4. 2023)
- SoyKB – Soybean Knowledge Base*. <https://soykb.org/> (10. 2. 2023)
- SoyKB: Accu Tool*. <https://soykb.org/AccuTool/index.php> (15. 2. 2023)
- Spielmeyer, W., Ellis, M. H., & Chandler, P. M. (2002). Semidwarf (sd-1), “green revolution” rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 9043-9048. <https://doi.org/10.1073/pnas.132266399>
- Stogios, P. J., Downs, G. S., Jauhal, J. J., Nandra, S. K., & Privé, G. G. (2005). Sequence and structural analysis of BTB domain proteins. *Genome biology*, 6, 1-18. <https://doi.org/10.1186/gb-2005-6-10-r82>
- Škrabišová, M., Dietz, N., Zeng, S., Chan, Y. O., Wang, J., Liu, Y., Biová, J., Joshi, T. & Bilyeu, K. D. (2022). A novel Synthetic phenotype association study approach reveals

- the landscape of association for genomic variants and phenotypes. *Journal of Advanced Research*, 42, 117-133. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2022.04.004>
- Tair. <https://www.arabidopsis.org/> (13. 6. 2022)
- TAIR BLAST. <https://www.arabidopsis.org/Blast/index.jsp> (23. 6.2022)
- Takemiya, A., Inoue, S. I., Doi, M., Kinoshita, T., & Shimazaki, K. I. (2005). Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *The Plant Cell*, 17(4), 1120-1127. <https://doi.org/10.1105/tpc.104.030049>
- Tian, Z., Wang, X., Lee, R., Li, Y., Specht, J. E., Nelson, R. L., McClean, P. E., Qiu, L. & Ma, J. (2010). Artificial selection for determinate growth habit in soybean. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(19), 8563-8568. <https://doi.org/10.1073/pnas.1000088107>
- Ting, C. L. (1946). Genetic Studies on the Wild and Cultivated Soybeans. *Agronomy journal*, 38(5), 381-393. <https://doi.org/10.2134/agronj1946.00021962003800050001x>
- Trick, H. N., & Finer, J. J. (1998). Sonication-assisted Agrobacterium-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue. *Plant Cell Reports*, 17, 482-488. <https://doi.org/10.1007/s002990050429>
- Vandenbussche, F., Pierik, R., Millenaar, F. F., Voeselek, L. A., & Van Der Straeten, D. (2005). Reaching out of the shade. *Current opinion in plant biology*, 8(5), 462-468. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2005.07.007>
- Viana, J. P. G., Fang, Y., Avalos, A., Song, Q., Nelson, R., & Hudson, M. E. (2022). Impact of multiple selective breeding programs on genetic diversity in soybean germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(5), 1591-1602. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04056-5>
- Wang, Q., & Lin, C. (2020). A structural view of plant CRY2 photoactivation and inactivation. *Nature structural & molecular biology*, 27(5), 401-403. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0432-6>
- Wang, W., He, Q., Yang, H., Xiang, S., Zhao, T., & Gai, J. (2013). Development of a chromosome segment substitution line population with wild soybean (*Glycine soja* Sieb. et Zucc.) as donor parent. *Euphytica*, 189, 293-307.
- Wang, Y. H. (2008). How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*?. *Journal of Biochemical Technology*, 1(1), 11-20. <https://doi.org/10.1007/s10681-012-0817-7>
- Wang, Z., Chen, Y., & Li, Y. (2004). A brief review of computational gene prediction methods. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 2(4), 216-221. [https://doi.org/10.1016/S1672-0229\(04\)02028-5](https://doi.org/10.1016/S1672-0229(04)02028-5)
- Watanabe, S., Harada, K., & Abe, J. (2012). Genetic and molecular bases of photoperiod responses of flowering in soybean. *Breeding Science*, 61(5), 531-543. <https://doi.org/10.1270/jsbbs.61.531>
- Wen, Z., Boyse, J. F., Song, Q., Cregan, P. B., & Wang, D. (2015). Genomic consequences of selection and genome-wide association mapping in soybean. *Bmc Genomics*, 16, 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1872-y>
- Wu, F., Sedivy, E. J., Price, W. B., Haider, W., & Hanzawa, Y. (2017). Evolutionary trajectories of duplicated FT homologues and their roles in soybean domestication. *The Plant Journal*, 90(5), 941-953. <https://doi.org/10.1111/tpj.13521>

- Yamaguchi, N., Ohnishi, S., & Miyoshi, T. (2018). Screening for chilling-tolerant soybeans at the flowering stage using a seed yield-and maturity-based evaluation method. *Crop Science*, 58(1), 312-320. <https://doi.org/10.2135/cropsci2017.06.0392>
- Yang, X., Yie, Y., Zhu, F., Liu, Y., Kang, L., Wang, X., & Tien, P. (1997). Ribozyme-mediated high resistance against potato spindle tuber viroid in transgenic potatoes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(10), 4861-4865. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.10.4861>
- Zhang, S. R., Wang, H., Wang, Z., Ren, Y., Niu, L., Liu, J., & Liu, B. (2017). Photoperiodism dynamics during the domestication and improvement of soybean. *Science China Life Sciences*, 60, 1416-1427. <https://doi.org/10.1007/s11427-016-9154-x>
- Zhao, Q. P., Zhu, J. D., Li, N. N., Wang, X. N., Zhao, X., & Zhang, X. (2019). Cryptochrome-mediated hypocotyl phototropism was regulated antagonistically by gibberellic acid and sucrose in *Arabidopsis*. *Journal of integrative plant biology*, 62(5), 614-630. <https://doi.org/10.1111/jipb.12813>

8 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

5'UTR	5' untranslated region (5' netranslatovaná oblast)
AMK	aminokyselina
APB	Aktivní fytochromová vazebná doména
BL	Modré světlo
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool
bp	Base pair (párů bazí)
BTB	N-terminální doména se strukturami zinkového prstu
CCE	Kryptochromová C-terminální extenze
cDNA	Komplementární DNA
<i>CO</i>	Transkripční faktor CONSTANS
CO ₂	Oxid uhličitý
Col-0	Ekotyp <i>Arabidopsis</i> Colombia-0
CRISPR	segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetice
Cry1	Kryptochrom 1
Cry2	Kryptochrom 2
Cry3	Kryptochrom 3
D	Determinate stem = ukončený stonek
dNTP	Deoxyribonukleosidtrifosfát
<i>Dt1</i>	Determinate stem 1 (ukončený fenotyp stonku 1)
<i>E1</i>	Gen ovlivňující zralost 1
EEE	Excess excitation energy (přebytečná excitační energie)
EMS	Ethyl methansulfonát
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
FR	Vzdálené červené světlo
<i>FT</i>	Flowering locus T
FT2b	Flowering locus 2b (lokus kvetení 2b)
FTA	Flinders Technology Associates
FW	Forward (přímý primer)
gDNA	Genomová DNA
<i>GmCOL1</i>	Ortolog transkripčního faktoru CONSTANS u sóji

<i>GmFT5a</i>	Ortolog genu flowering locus T u sóji
GRIN	Germplasm Resources Information Network
GWAS	Genome-wide associaton study
<i>HY4</i>	Long hypocotyl 4 (dlouhý hypokotyl 4)
<i>J</i>	Juvenile
LED	Light-Emitting Diode
LOV	Light oxygen voltage doména (proteinová doména regulovaná světlem, kyslíkem a napětím)
MEGA	Molecular Evolutionary Genetic Analysis
MG	Maturity group (třída zralosti)
mRNA	Mediátorová RNA
MTHF	5,10-methylhydrofolát
N	Indeterminate stem = popínavý stonek
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Centre
NC	Negativní kontrola
<i>nph1</i>	Non-phototropic hypocotyl 1
NPH3	Non-phototropic hypocotyl 3
<i>npl1</i>	Non-phototropic hypocotyl-like 1
NRL	NPH3/RPT2-like proteinová rodina
PCR	Polymerase chain reaction (polymerasová řetězová reakce)
Pfr	FR-absorbující forma fytochromu
Phot1	Fototropin 1
Phot2	Fototropin 2
Phy A-E	Fytochrom A-E
PI	Plant introduction
PIF	Phytochrome-interacting trascription factors (transkripční faktory interagující s fytochromy)
PIN	Sekundární přenašeč auxinu
PKS4	Fytochrom kinasový substrát 4
POZ	Pox virus and zinc finger
PP1	Protein-fosfatasa 1
PPFD	fotosyntetická hustota fotonového toku
Pr	R-absorbující forma fytochromu

PRH	Photolyase homologous region (region homologní k sekvenci fotolyas)
R	Červené světlo
REV	Reverse (zpětný primer)
<i>Rht</i>	Reduced height-1
RNAi	RNA interference
RPT2	Root phototropism 2
S	Semideterminate stem = polopopínavý stonek
SAS	Shade avoidance syndrom (syndrom vyhýbání se stínu)
<i>sd-1</i>	Semi-dwarf 1
SIGNAL	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
SNP	Single nucleotide polymorphism = jednonukleotidový polymorfismus
TAIR	The <i>Arabidopsis</i> Information Resource
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
T-DNA	Transferová DNA
TFL1	Terminal flower 1 protein
USDA	United States Department of Agriculture = Americké ministerstvo zemědělství
UV-A	Ultrafialové záření A
UV-B	Ultrafialové záření B
UVR8	Receptor ultrafialového záření B
VIGS	Umlčení genů vyvolané viry

9 PŘÍLOHY

Příloha 1: Tabulka s výsledky analýz, které byly provedeny pomocí nástroje BLAST

Příloha 2: Výsledky Sangerovy sekvenace

Příloha 3: Tabulky s výsledky experimentů, kde byl zkoumán vliv modrého světla na růst rostlin