



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI  
Přírodovědecká fakulta  
Laboratoř růstových regulátorů

**Zapojení kyseliny abscisové ve fototropických  
reakcích rostlin**

**DIPLOMOVÁ PRÁCE**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Autor:                  | <b>Bc. Martin Hřivňacký</b>              |
| Studijní program:       | N1501 Experimentální biologie rostlin    |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie rostlin          |
| Forma studia:           | Prezenční                                |
| Vedoucí práce:          | <b>prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2022                                     |

## Bibliografická identifikace

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Jméno a příjmení autora | Bc. Martin Hřivňacký   |
| Název práce             | Zapojení kyseliny abscisové ve fototropických reakcích rostlin   |
| Typ práce               | Diplomová  |
| Pracoviště              | Laboratoř růstových regulátorů   |
| Vedoucí práce           | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  |
| Rok obhajoby práce      | 2022   |
| Abstrakt                | <p>Předkládaná diplomová práce se snaží objasnit vliv kyseliny abscisové (ABA) na fototropismus hypokotylů zprostředkovaný signalizací fototropinů. Zároveň zkoumá, jestli je inhibiční účinek stresu ze zasolení na fototropismus taktéž způsoben ABA, a zároveň jestli endogenní ABA negativně reguluje fototropismus i při nestresových podmínkách. Pro ověření těchto otázek je experimentální část věnována analýze fototropického ohybu hypokotylů u rostlin ovlivněných ABA, NaCl a/nebo inhibitorem syntézy ABA, a tyto výsledky se snaží podpořit HPLC analýzou endogenních koncentrací auxinu a ABA a zároveň qPCR analýzou exprese genů fototropinů. Experimenty probíhaly s deetiolovanými rostlinami huseníčku rolního (<i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh) v podmínkách <i>in vitro</i>. Výsledky této práce vedou k závěrům, že exogenní ABA inhibuje fototropismus, ovšem slaběji než NaCl. Aplikace fluridonu – inhibitoru fytoen desaturasy, která se účastní syntézy ABA, fototropismus u nestresovaných rostlin zesiluje, ale nemá prokazatelný vliv na rostliny zasolené. Výsledky HPLC analýzy naznačily, že sledované změny fototropismu nejsou přímo závislé na koncentraci endogenní ABA, která má v hypokotylech na rozdíl od auxinu spíše modulační roli. Výsledky qPCR analýzy naznačily, že ani změny transkripce <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> nehrají ve fototropismu důležitou úlohu, ale mohou mít roli modulační.</p> |
| Klíčová slova           | fototropin, fototropismus, kyselina abscisová, fytoen desaturasa, stres ze zasolení  |
| Počet stran             | 91   |
| Počet příloh            | 6  |
| Jazyk                   | Český  |

## Bibliographical identification

|                                 |  |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Bc. Martin Hřivňacký   |
| Title of thesis                 | Involvement of abscisic acid in plant phototropic responses  |
| Type of thesis                  | Master   |
| Department                      | Laboratory of Growth Regulators  |
| Supervisor                      | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  |
| The year of presentation        | 2022   |
| Abstract                        | <p>This master thesis tries to clarify the effect of abscisic acid (ABA) on hypocotyl phototropism mediated by phototropin signaling. It also examines whether the salt stress-induced inhibition of phototropism is also caused by ABA and at the same time examines whether endogenous ABA negatively regulates phototropism under non-stress conditions. To answer these questions, the experimental part is devoted to analysis of phototropic bending of hypocotyl in plants treated by ABA, NaCl and/or inhibitor of ABA biosynthesis. Obtained results are supported by the HPLC analysis of endogenous auxin and ABA and qPCR analysis of phototropin genes expressions. Experiments were performed with <i>Arabidopsis thaliana</i> (L) Heynh in conditions <i>in vitro</i>. The results of this thesis lead to the conclusion that exogenous ABA inhibits phototropism but weaker than NaCl salinity. Application of fluridone – an inhibitor of phytoene desaturase, which is involved in ABA synthesis, enhances phototropism in unstressed plants but has no significant effect on salt-stressed plants. The results of the HPLC analysis indicated that the observed changes in phototropism are not directly dependent on endogenous ABA concentrations, which in contrast to auxin, has a more modulatory role. The results of the qPCR analysis indicated that changes in <i>PHOT1</i> and <i>PHOT2</i> transcription also do not have important role in phototropism but may have a modulatory role.</p> |
| Keywords                        | phototropin, phototropism, abscisic acid, phytoene desaturase, salt stress   |
| Number of pages                 | 91   |
| Number of appendices            | 6  |
| Language                        | Czech  |

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracoval samostatně za použití citované literatury.

.....

V Olomouci dne

.....

Podpis

## **Poděkování**

Chtěl bych poděkovat svému vedoucímu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., za odborné vedení, pomoc a cenné rady při zpracování této diplomové práce. Taky bych chtěl poděkovat Pharm.Dr. Jitce Široké, Ph.D., za provedení vlastní HPLC analýzy koncentrace fytohormonů a za veškeré její rady a konzultace. Dále bych chtěl poděkovat Mgr. Tereze Miksteinové a Mgr. Tereze Trávníčkové za jejich pomoc při seznamování se s použitými metodami i za pomoc při řešení mnohých technických problémů v experimentech. Taktéž bych chtěl poděkovat Nurii De Diego Sanchez, Ph.D., Mgr. Janě Jakšové a Mgr. Lukáši Spíchalovi, Ph.D., za cenné rady při zpracovávání výsledků. Nakonec bych chtěl poděkovat panu Pavlu Sedláčkovi za zkompletování použitého zdroje jednosměrného horizontálního modrého světla a prof. RNDr. Janu Naušovi, CSc., za změření světelného spektra tohoto zdroje.



# Obsah

|   |    |
|---|----|
| Seznam použitých zkratk.....  | 9  |
| 1 Úvod a cíle práce .....   | 13 |
| 2 Teoretická část.....  | 14 |
| 2.1 Fototropismus .....   | 14 |
| 2.1.1 Fototropiny .....   | 15 |
| 2.1.2 Signální dráha fototropismu indukovaného modrým světlem.....    | 17 |
| 2.1.3 Auxin a jeho role ve fototropismu .....                         | 20 |
| 2.2 Kyselina abscisová.....   | 26 |
| 2.2.1 Syntéza ABA.....  | 27 |
| 2.2.2 Transport ABA .....   | 29 |
| 2.2.3 Signalizace ABA .....   | 30 |
| 2.2.4 ABA při stresu ze zasolení .....                                | 31 |
| 2.2.5 Interakce ABA v prodlužování hypokotylu a ve fototropismu ..... | 34 |
| 3 Materiál a metody.....  | 36 |
| 3.1 Rostlinný materiál.....   | 36 |
| 3.2 Příprava kultivačního média .....                                 | 36 |
| 3.3 Růstové experimenty .....   | 36 |
| 3.3.1 Stratifikace semen.....   | 36 |
| 3.3.2 Výsev semen .....   | 37 |
| 3.3.3 Transfer rostlin na médium s testovanými látkami.....           | 37 |
| 3.3.4 Měření rostlin a zpracování výsledků .....                      | 39 |
| 3.4 Fototropické experimenty .....                                    | 39 |
| 3.4.1 Výsev semen .....   | 39 |
| 3.4.2 Transfer rostlin na médium s testovanými látkami.....           | 40 |
| 3.4.3 Měření a zpracovávání výsledků .....                            | 42 |
| 3.4.4 Sklizeň, homogenizace a rozvažování vzorků.....                 | 43 |
| 3.5 Analýza endogenní ABA a IAA.....                                  | 44 |
| 3.5.1 Extrakce a purifikace ABA a IAA .....                           | 44 |

|       |  |    |
|-------|--|----|
| 3.5.2 | HPLC-ESI-MS/MS analýza ABA a IAA.....                            | 45 |
| 3.6   | Analýza exprese <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> .....                | 46 |
| 3.6.1 | Extrakce a izolace RNA.....                                      | 46 |
| 3.6.2 | Přečištění izolované RNA.....                                    | 47 |
| 3.6.3 | Syntéza cDNA.....  | 50 |
| 3.6.4 | Analýza exprese <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> pomocí qPCR .....    | 51 |
| 4     | Výsledky.....  | 55 |
| 4.1   | Růstové experimenty .....  | 55 |
| 4.2   | Fototropické experimenty .....                                   | 57 |
| 4.2.1 | Fototropické experimenty s testováním NaCl a abaminu.....        | 57 |
| 4.2.2 | Fototropické experimenty s testováním NaCl, fluridonu a ABA..... | 59 |
| 4.3   | Analýza endogenní ABA a IAA.....                                 | 62 |
| 4.4   | Analýza exprese <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> .....                | 65 |
| 5     | Diskuze .....  | 67 |
| 5.1   | Účinek zasolení NaCl.....  | 67 |
| 5.2   | Experimenty s testováním NaCl a abaminu.....                     | 68 |
| 5.3   | Experimenty s testováním NaCl, fluridonu a ABA.....              | 69 |
| 5.4   | Optimalizace fototropického experimentu.....                     | 72 |
| 6     | Závěr.....   | 74 |
| 7     | Citová literatura .....  | 76 |
|       | Přílohy.....   | 83 |



## Seznam použitých zkratk

|                               |   |
|-------------------------------|---|
| 4-Cl-IAA                      | kyselina 4-chlorindol-3-octová                          |
| AAO                           | ABA-aldehyd oxidasa                                     |
| ABA                           | kyselina abscisová                                      |
| ABA2, 4                       | ABA-DEFICIENT 2, 4                                      |
| ABCB                          | ATP-BINDING CASSETTE B                                  |
| ABCG                          | ATP-BINDING CASSETTE G                                  |
| ABI                           | ABA-INSENSITIVE   |
| ABP1                          | AUXIN BINDING PROTEIN 1                                 |
| ANOVA                         | analýza rozptylu  |
| AP2                           | APETALA 2   |
| AREB/ABF                      | ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR                   |
| ARF                           | AUXIN RESPONSIVE FACTOR                                 |
| Aux/IAA                       | AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID                              |
| AUX1/LAX                      | AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1                             |
| AWPM19                        | ABA-INDUCED WHEAT PLASMA MEMBRANE 19                    |
| BCH                           | $\beta$ -karoten hydroxylasa                            |
| BLUS1                         | BLUE LIGHT SIGNALLING 1                                 |
| bZIP                          | basic leucine ZIPper                                    |
| CBC1                          | CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO1                       |
| CCD                           | CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE                         |
| cDNA                          | komplementární DNA                                      |
| CRL                           | CUL3 RING E3 UBIQUITIN LIGASE 3                         |
| D6PK                          | D6 PROTEIN KINASE                                       |
| DAO                           | DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION                         |
| dH <sub>2</sub> O             | destilovaná voda  |
| DMSO                          | dimethylsulfoxid  |
| dNTP                          | deoxyribonukleosid trifosfáty                           |
| DREB                          | DEHYDRATION RESPONSIVE ELEMENT BINDING                  |
| EDTA                          | kyselina ethylendiamintetraoctová                       |
| <i>EF1<math>\alpha</math></i> | <i>ALPHA SUBUNIT OF THE ELONGATION FACTOR-1 COMPLEX</i> |

|                 |  |
|-----------------|--|
| ESI             | ionizace elektrosprejem  |
| EtOH            | ethanol  |
| FMN             | flavinmononukleotid  |
| GA <sub>3</sub> | kyselina gibberelová   |
| GH3             | GRETCHEN HAGEN 3   |
| <i>gl1</i>      | mutantní genotyp v genu <i>GLABRA1</i>                                   |
| GORK            | GATED OUTWARDLY-RECTIFYING K <sup>+</sup> CHANNEL                        |
| GPCR            | receptory spřažené s G proteinem, typ G                                  |
| <i>GSPDH</i>    | <i>GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE</i>                          |
| HPLC            | vysokoúčinná kapalinová chromatografie                                   |
| IAA             | kyselina indol-3-octová  |
| IBA             | kyselina indol-3-máselná   |
| IBR5            | INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSES 5  |
| IPyA            | kyselina indol-3-pyrohroznová  |
| IS              | interní standard   |
| KAT1            | draselný kanál KAT1  |
| LCYb            | lykopen β-cyklasa  |
| LEA             | LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT  |
| LOV1,2          | doména LIGHT OXYGEN VOLTAGE 1,2  |
| MAPK            | mitogenem aktivované kinasy  |
| MATE/DTX        | MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND<br>EXTRUSION/DETOXIFICATION EFFLUX CARRIERS |
| MEM             | Membrane Desalting Buffer  |
| MeOH            | methanol   |
| MES             | kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová                                  |
| MRM             | multiple reaction monitoring   |
| MS              | Murashige & Skoog medium   |
| MS/MS           | tandemová hmotnostní spektroskopie                                       |
| MYC/MYB         | MYELOCYTOMATOSIS/MYELOBLASTOSIS  |
| NAC             | transkripční faktor NAM, ATAF, CUC                                       |
| NCED            | 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenasa  |

|              |   |
|--------------|---|
| NF-Y         | NUCLEAR FACTOR Y  |
| NPH3         | NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3   |
| NRL          | NPH3/RPT2-like  |
| NRT1/PTR     | NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER   |
| Obr.         | obrázek   |
| OST1         | OPEN STOMATA 1  |
| PAA          | kyselina fenylactová  |
| PAS          | Per-ARNT-Sim skupina proteinových domén   |
| PCR          | polymerázová řetězová reakce  |
| PDS          | fytoen desaturasa   |
| phot1, 2     | fototropin 1,2  |
| PID          | PINOID  |
| PIN          | PIN-FORMED  |
| PKD          | protein kinasová doména   |
| PKS          | PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE  |
| PP2C.A       | 2C protein fosfatasy, podskupina A  |
| PP2C.D       | 2C protein fosfatasy, podskupina D  |
| PSY          | fytoen syntasa  |
| PYR/PYL/RCAR | PYRABACTIN<br>RESISTANCE/PYRABACTIN<br>1-LIKE/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR |
| qPCR         | Kvantitativní PCR   |
| QUAC1        | QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1  |
| RDN          | Reaction Buffer fo DNase I  |
| RLY          | Lysis Buffer  |
| RNA          | ribonukleová kyselina   |
| ROS          | reaktivní formy kyslíku   |
| Rov.         | rovnice   |
| RPK1         | RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1  |
| RPT2         | ROOT PHOTOTROPISM 2   |
| RRI          | Recombinant Ribonuclease Inhibitor  |
| RW1,2        | Wash Buffer RW1,2   |

|            |   |
|------------|---|
| SAUR       | SMALL AUXIN UP RNA                                  |
| SCF        | SKP, CULLIN, F-BOX                                  |
| SD         | standardní odchylka                                 |
| SE         | standardní chyba                                    |
| SKP2A      | S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 2 A               |
| SLAC1      | S-type ANION CHANNEL 1                              |
| SnRK2      | SUCROSE NON-FERMENTING 1-RELATED PROTEIN KINASE 2   |
| SOS        | SALT OVERLAY SENSITIVE                              |
| SPE        | extrakce na pevné fázi                              |
| TAA        | tryptofan aminotransferasa                          |
| Tab.       | tabulka   |
| TBE        | tris-borát-EDTA                                     |
| TIR1/AFB   | TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1/AUXIN BINDING F-BOX |
| <i>UBC</i> | <i>UBIQUITIN CARRIER PROTEIN</i>                    |
| UV-A       | ultrafialové záření A                               |
| UV-B       | ultrafialové záření B                               |
| UVR8       | UV RESISTANCE LOCUS 8                               |
| VDE        | violaxantin de-epoxidasa                            |
| VIS        | viditelné světlo                                    |
| ZDS        | karoten desaturasa                                  |
| ZEP/ABA1   | zeaxantin epoxidasa/ABA-DEFICIENT 1                 |

# 1 Úvod a cíle práce

Navzdory své zdánlivé pasivitě jsou rostliny schopné se velmi účinně přizpůsobovat podmínkám svého okolí. Jedním z klasických mechanismů, kterým se rostliny přizpůsobují světelným podmínkám a optimalizují tak svůj příjem energie, vody a minerálů jsou fototropické reakce. Fototropismus představuje usměrněný rostlinný růst v reakci na směr příchozího světla, kdy prýtové části rostlin obvykle rostou směrem za světelným stimulem a kořenové části směrem opačným. Ačkoliv se vědci snažili pochopit tento mechanismus již od starověku, tak stále nejsou všechny jeho aspekty spolehlivě vysvětleny. Jako zásadní pro vznik fototropické reakce se jeví modrá a UV-A část světelného spektra, která je vnímána pomocí rostlinných fotoreceptorů fototropinů. Fototropiny následně spouštějí složitou signální kaskádu, na jejímž konci dochází neznámým mechanismem k ustavení gradientu růstového hormonu auxinu mezi ozářenou a neozářenou stranou rostliny. Rozdílné koncentrace auxinu způsobují rozdílný růst ozářené a neozářené strany rostliny v důsledku čehož vzniká ohyb.

Kyselina abscisová (ABA) je důležitým rostlinným hormonem, známá především pro svou roli v reakcích ke stresům, při kterých dochází k její akumulaci. Zároveň má však také celou řadu důležitých rolí ve vývoji a růstu rostlin. Spolupodílí se tak například na regulaci dormance a klíčení semen, zavírání průduchů nebo indukci kvetení. Některé výzkumy posledních let naznačily, že fototropické reakce i samotné fototropiny mohou být inhibovány účinkem abiotických stresů, konkrétně zasolením a stejně tak účinkem ABA. A jelikož jsou abiotické stresy jedním z nejpalčivějších problémů dnešní zemědělské produkce, tak je objasnění jejich komplexních účinků, na vnímání světla skrze fototropiny nevyjímaje, více než žádoucí.

Tato práce si klade za cíl potvrdit inhibiční účinek exogenní ABA na fototropické reakce k modrému světlu u hypokotylů huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L) Heynh., dále jen *Arabidopsis*). Dále se snaží určit, zdali je prokázán inhibiční účinek zasolení NaCl způsoben právě zvýšenou akumulací ABA, a nakonec jestli se endogenní ABA chová jako negativní regulátor fototropické reakce i při nestresových podmínkách. Zároveň se snaží nastínit i možné molekulární mechanismy těchto působení.

Pro dosažení jmenovaných cílů se experimentální část této práce věnuje měření změn fototropické reakce kontrolního genotypu *gl-1* v závislosti na testovaných podmínkách společně s HPLC analýzou endogenních koncentrací kyseliny abscisové a auxinu a qPCR analýzou exprese genů fototropinů. Experimenty byly prováděny v rámci pracovní skupiny molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů UP Olomouc a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

## 2 Teoretická část

### 2.1 Fototropismus

Během evoluce se rostliny od živočichů oddělily již před více než miliardou let a za tu dobu se u nich vytvořily zcela unikátní mechanismy přežití. Jedním z důležitých faktorů, kterým se většina vyšších rostlin liší od většiny živočichů je přisedlý způsob života. Na rozdíl od živočichů, kteří jsou tak často volně pohybliví a mohou se přesunovat do míst s lepšími podmínkami pro život, rostliny zůstávají celý život na jednom místě a měnícím se podmínkám prostředí se musí umět přizpůsobit.

Jelikož rostliny získávají energii pro svůj metabolismus ze světla v procesu fotosyntézy, je pro ně dostupnost světla naprosto zásadní. Jedním z mechanismů, který pomáhá rostlinám přizpůsobit se světelným podmínkám a optimalizovat svůj příjem světelné energie je fototropismus (Obr. 1). Fototropismus lze popsat jako rozdílnou míru růstu rostlinného orgánu v závislosti na světelném gradientu (Liscum et al., 2020). Zatímco nadzemní části rostlin vykazují převážně pozitivní fototropické reakce a rostou směrem ke zdroji světla, tak rostlinné kořeny mají obvykle fototropismus negativní a rostou směrem od zdroje světla. Fototropismus tak rostlinám slouží nejen pro optimalizaci fototropické výtěžnosti, ale také pro maximální zisk vody a živin z půdy.



**Obr. 1. Fototropismus.** Fototropismus se typicky vyskytuje u pokojových rostlin pěstovaných u okna.

Světlo tedy rostlinám neslouží pouze jako zdroj energie, ale v případě fototropismu a mnoha dalších fyziologických pochodů má funkci signálu poskytující informaci o jejím okolí. V případě fototropismu je pak nejdůležitější vnímání modrého světla (380—500 nm), zčásti také ultrafialového A (UV-A, 315—380 nm) a ultrafialového B (UV-B, 280—315 nm). Jako modulující světlo může sloužit také světlo červené (620—700 nm) (Fankhauser & Christie, 2015; Legris & Boccaccini, 2020). UV-B je v rostlinách vnímáno pomocí fotoreceptoru UV RESISTANCE LOCUS 8 (UVR8) a červené světlo pomocí fytochromů. Ačkoliv modré světlo v rostlinách je vnímáno více typy fotoreceptorů, tak pro fototropismus je zásadní vnímání modrého světla skrze fototropiny. Ty získaly svůj název právě podle fototropismu, a kromě modrého světla jejich akční spektrum zasahuje také do zmiňovaného UV-A. A právě fototropinům se bude tato práce nejvíce věnovat.

Světlem aktivované fototropiny spouštějí složitou signální kaskádu, na konci které dochází ke vzniku fototropického ohybu. Ten vzniká jako důsledek nerovnoměrného

přerozdělení fytohormonu auxinu, zodpovědného za prodlužování buněk, mezi ozářenými a neozářenými buňkami (Liscum et al., 2014). V důsledku vzniklého gradientu auxinu dochází k silnějšímu prodlužování buněk pouze na jedné straně rostlinného orgánu a vniku ohybu.

### 2.1.1 Fototropiny

Jak již bylo zmíněno výše, fototropiny jsou rostlinné fotoreceptory modrého světla a UV-A a nalezneme je jak u vyšších rostlin, tak u zelených řas (Hart & Gardner, 2021). Fototropiny kontrolují celou řadu fyziologických procesů, které rostlinám pomáhají optimalizovat jejich fotosyntetickou výtěžnost. Kromě fototropismu jsou fototropiny zodpovědné také za pohyby chloroplastů v reakci na intenzitu ozáření, modelují polohu listů a šířku listové plochy a jsou také zodpovědné za rychlou inhibici prodlužování etiolovaného hypokotylu v reakci na ozáření modrým světlem (Christie, 2007). Fototropiny jsou také zapojeny do modulačních reakcí kořenů k suchu (Galen et al., 2007). Další proces, na kterém se fototropiny v rostlinách podílejí, a který je nejlépe popsán a je dodnes intenzivně studován, je modrým světlem indukované otevírání průduchů (Christie, 2007).

#### 2.1.1.1 Izoformy a lokalizace fototropinů

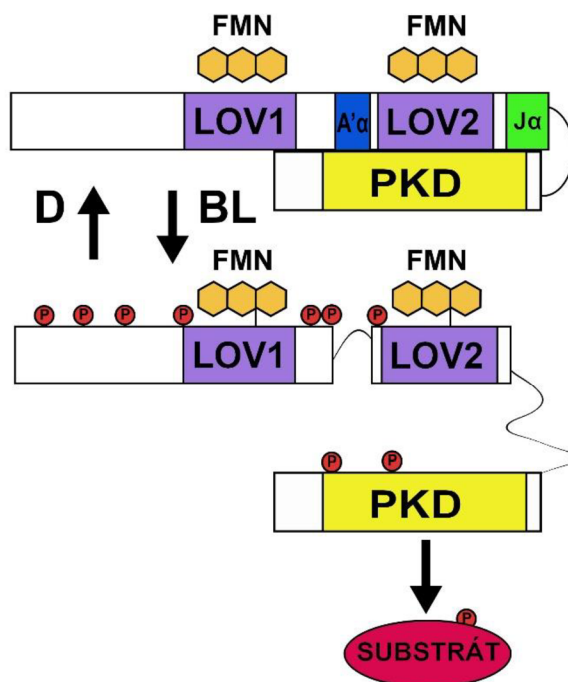
U vyšších rostlin rozeznáváme dvě izoformy fototropinů, a to phot1 a phot2. Ty mají podobnou strukturu a jejich funkce se částečně překrývají (Christie, 2007). V regulaci fototropismu je phot1 aktivní při nízkých ( $0,01\text{--}1\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ) i vysokých intenzitách záření ( $>1\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ ), zatímco phot2 je aktivní pouze při vysokých intenzitách. Také je známo, že phot1 je na světle labilní a oproti tomu se četnost phot2 na světle zvyšuje (Legris & Boccaccini, 2020). Některé práce pak naznačují, že phot1 a phot2 se mohou vzájemně negativně regulovat (Zhao et al., 2018).

Je známo, že se fototropiny ve tmě vyskytují na vnitřní straně cytoplazmatické membrány, ovšem přesný mechanismus této asociace doposud nebyl popsán, i když jako důležitá pro tuto asociaci se jeví přítomnost některých residuí na C-terminálním konci (Kong et al., 2013; Legris & Boccaccini, 2020). Po ozáření se část phot1 shlukuje do membránových mikrodomén a následně se uvolňuje do cytoplazmy. Zatímco shlukování phot1 do membránových mikrodomén má význam pro fototropickou reakci, tak následné uvolnění do cytoplazmy již vznik fototropické reakce neovlivňuje. V případě phot2 je také jistá část receptorů přemístěna do cytoplazmy v reakci na ozáření, ovšem větší část se přesouvá ke Golgiho aparátu. Oba fototropiny se také v reakci na modré světlo v malé míře asociují s vnější membránou chloroplastů. Přesné funkce těchto přemístění dosud nebyly popsány (Liscum, 2016).

### 2.1.1.2 Struktura fototropinů a percepce modrého světla

Strukturně se fototropiny skládají z přibližně 900—1000 aminokyselin velkého apoproteinu a navázaného kofaktoru (Obr. 2). Protein se strukturně dělí na N-terminální fotosenzitivní část a C-terminální část se serin/threonin protein-kinasovou doménou (PKD) (Legris & Boccaccini, 2020; Liscum et al., 2014). Podle PKD domény se fototropiny řadí do AGCVIII skupiny kinas. Na N-terminální fotosenzitivní části se nachází dvě velmi podobné domény LIGHT OXYGEN VOLTAGE 1 a 2 (LOV1, LOV2). LOV domény jsou součástí skupiny Per-ARNT-Sim (PAS) a v různých variacích se nacházejí i u jiných typů organismů, kde jsou obvykle spojovány s vazbou různých kofaktorů a signalizací nejen světla. Ve fototropinech jsou LOV domény přibližně 110 aminokyselin velké a jako kofaktor mají navázanou molekulu flavinmononukleotidu (FMN), která slouží jako chromofor.

I když jsou obě LOV domény schopny absorbovat modré světlo, tak skutečná funkce LOV1 zatím zůstává nejasná a za klíčovou pro aktivitu fototropinů je považována LOV2 doména (Hart & Gardner, 2021). Ve tmě je FMN k LOV vázán nekovalentně pomocí vodíkového můstku (Obr. 2). Tato konformace způsobuje, že struktury A'α helix a Jα helix po stranách LOV2 blokuje PKD a fototropin je neaktivní. Absorpce modrého světla na FMN způsobí vznik kovalentní vazby mezi FMN a LOV2. Vzniklá vazba způsobí změnu konformace, během které dojde k rozvolnění A'α a Jα helixů a uvolnění PKD. Po aktivaci PKD dochází k autofosforylaci a aktivaci fototropinu a následnému spuštění signalizační kaskády. Kovalentní vazba mezi FMN a LOV2 ve tmě samovolně zaniká a opět dochází ke vzniku nekovalentní vazby (Kasahara et al., 2002).



**Obr. 2. Schematické znázornění doménové struktury fototropinu a jeho fotoaktivace.** Přijetím světelného kvanta modrého světla (BL) molekulou flavinmononukleotidu (FMN) dochází ke vzniku kovalentní vazby mezi FMN a LOV doménami. Vznik těchto vazeb způsobí rozvolnění A'α a Jα šroubovic po stranách LOV2 domény, čímž dojde k uvolnění a aktivaci protein kinasové domény (PKD). PKD doména autofosforyluje fototropin i další substráty, čímž vzniká signál fototropinů. Ve tmě (D) dochází k samovolné reverzi do původního stavu. Podle Inoue et al., 2010.



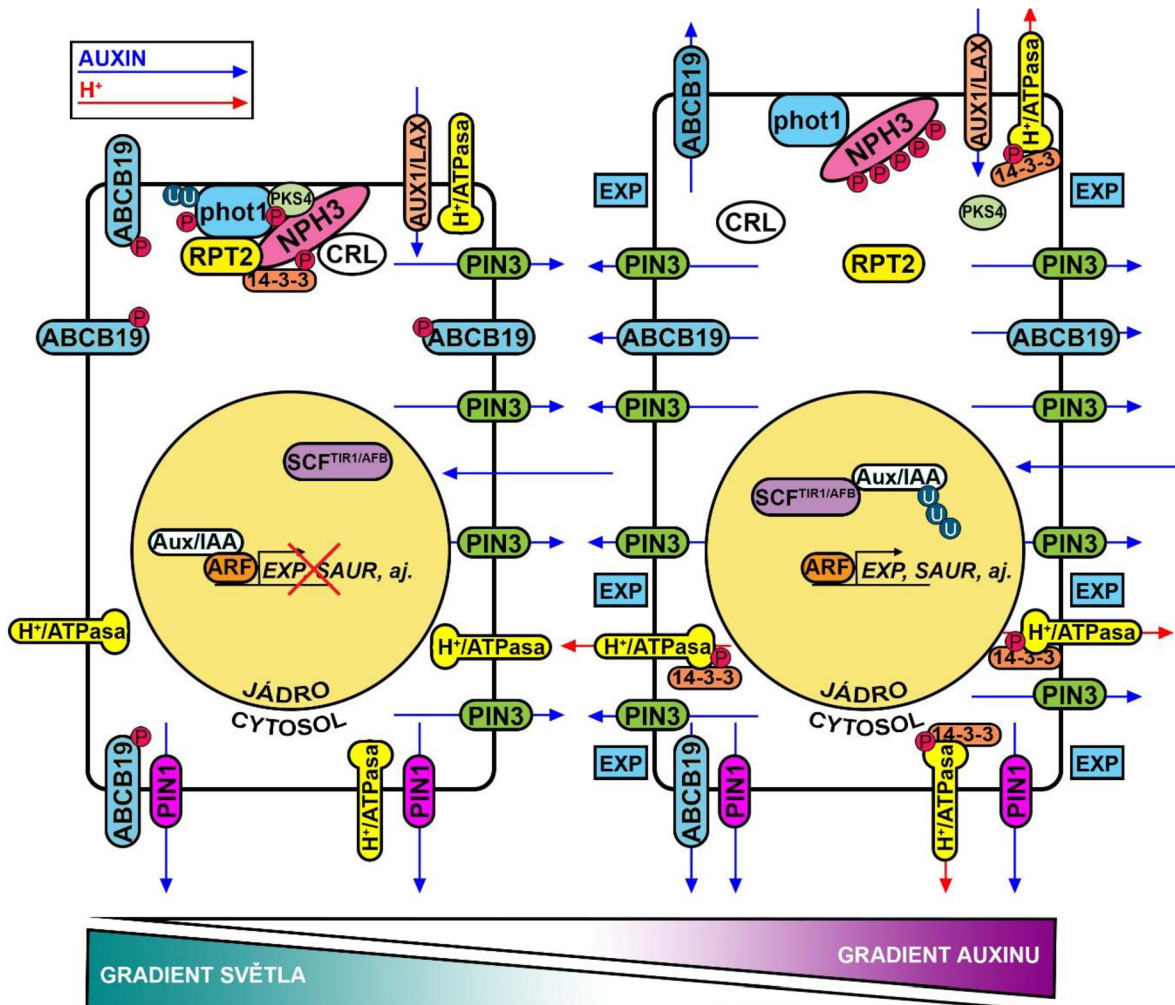
## 2.1.2 Signální dráha fototropismu indukovaného modrým světlem

Ačkoliv fototropická reakce může vzniknout i vlivem UV-B prostřednictvím UVR8 receptorů a jejich specifické signální dráhy, tak tato práce se zaměřuje primárně na signální dráhu fototropinů. I když signalizační dráha fototropické reakce indukované modrým světlem není dodnes zcela objasněná, tak některé její dílčí kroky již jsou známy. Po jednosměrném ozáření rostliny modrým světlem vzniká v pletivech stonku gradient světla, který indukuje vznik gradientu aktivovaných fototropinů (Liscum et al., 2014). Tento gradient aktivovaných fotoreceptorů byl zatím přímo popsán u ovesa a kukuřice, kde byla detekována rozdílná míra fosforylace fototropinů mezi ozářenou a neozářenou stranou koleoptile (Suzuki et al., 2019). U *Arabidopsis* se tento gradient podařilo sledovat nepřímo vizualizací změn v množství a lokalizaci následujících členů signální kaskády (Legris & Boccaccini, 2020).

### 2.1.2.1 Časné události v signalizaci fototropismu

Jednou z prvních signalizačních událostí po aktivaci fototropinů je interakce fototropinu s NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 (NPH3) (Liscum et al., 2014). Tento protein ze skupiny NPH3/RPT2-like (NRL) se ve tmě nachází v silně fosforylovaném stavu, kdy se prostřednictvím C-terminálního konce pojí k plazmatické membráně a N-terminálním koncem interaguje s phot1 (Obr. 3). Několik minut po ozáření modrým světlem je NPH3 defosforylován a přestává interagovat s phot1, odpoutává se od plazmatické membrány a vytváří shluky v cytoplazmě (Haga et al., 2015). Ačkoliv přesný význam těchto cytoplazmatických agregátů nebyl popsán, tak konstantní umístění NPH3 při plazmatické membráně nebo v agregátu blokuje fototropické reakce (Reuter et al., 2021).

V nedávné době bylo objeveno, že NPH3 je po ozáření modrým světlem také specificky fosforylován na C-konci pomocí phot1 a touto fosforylací vzniká vazebné místo pro protein 14-3-3 (Obr. 3) (Sullivan et al., 2021). 14-3-3 interaguje mimo jiné také s fototropiny, ale i s mnoha dalšími proteiny a účastní se regulace enzymatické aktivity, určování lokalizace, proteinové stability nebo protein-protein interakcí. Zatímco phot1 aktivuje disociaci NPH3 od plazmatické membrány při ozáření slabým i silným modrým světlem, tak phot2 při slabém modrém světle vůbec nefunguje a při silném modrém světle funguje jako stabilizátor NPH3 při plazmatické membráně (Zhao et al., 2018). Ve tmě nebo po delším ozařování je NPH3 opět silně fosforylován, specifická místa na jeho C-terminálním konci jsou defosforylována a protein se vrací k plazmatické membráně. Fosfatasy a kiny, které se podílejí na udržování fosforylačního stavu NPH3 i fototropinů však zůstávají neznámé (Sullivan et al., 2021).



**Obr. 3. Schéma základních buněčných pochodů vedoucích ke vzniku fototropické reakce vůči modrému světlu v hypocotylech.** V neozářené buňce (buňka vpravo) se fototropin (*phot1*) nachází defosforylovaný a neaktivní při plazmatické membráně. S fototropinem i s plazmatickou membránou interaguje fosforylovaný NPH3 protein. Transportéry auxinu (PIN1, PIN3, ABCB19, AUX/LAX1) jsou aktivní a do buňky se tak dostává auxin (modré šipky). Auxin se do buňky dostává i volně difúzí. Auxin se v jádře váže na SCF<sup>TIR1/AFB</sup> E3 ubiquitinační komplex, který se tím aktivuje a indukuje vazbou ubiquitinů (U) degradaci transkripčních represorů Aux/IAA, čímž se uvolní transkripční faktory ARF a dochází k expresi auxinem indukovaných genů jako jsou geny pro expansiny (*EXP*) nebo pro SAUR proteiny a mnoho dalších. SAUR proteiny udržují protonové pumpu (H<sup>+</sup>/ATPasa) ve fosforylovaném stavu (P), což je společně s vazbou proteinu 14-3-3 aktivuje. Okyselení apoplastu způsobené aktivací protonových pump rozvolňuje buněčnou stěnu a aktivuje řadu enzymů v protoplastu, jako jsou například expansiny (*EXP*), které se také podílejí na rozvolnění buněčné stěny. Tok protonů je vyznačen červenými šipkami. V reakci na auxin také dochází k zesílení toku iontů a vody do cytosolu (nevyznačeno) čímž se zvedá tlak na rozvolněnou buněčnou stěnu a buňka roste. V ozářené buňce (buňka vlevo) je fototropin aktivován modrým světlem a fosforylován. Protein NPH3 je z většiny defosforylován, ale specifickém místě C-konce je fosforylován čímž vzniká místo pro vazbu 14-3-3. Protein RPT2 se při ozáření váže ke komplexu *phot1*-NPH3 a udržuje je aktivní při plazmatické membráně. NPH3 se váže k CRL E3 ubiquitinačnímu komplexu, který ubiquitinuje *phot1*. Fototropin fosforyluje cytoplazmatický protein PKS4 auxinový transportér ABCB19. ABCB19 je fosforylací deaktivován. V reakci na ozáření dochází neznámým mechanismem k přemístění auxinových exportérů PIN3 na neozářenou část buňky čímž se zesiluje proud auxinu na neozářenou stranu rostliny. Koncentrace auxinu v buňce se snižuje a s ní i aktivita auxinem indukovaných genů a protonových pump. Buněčný růst je redukován. Podle Sakai & Hago, 2012.

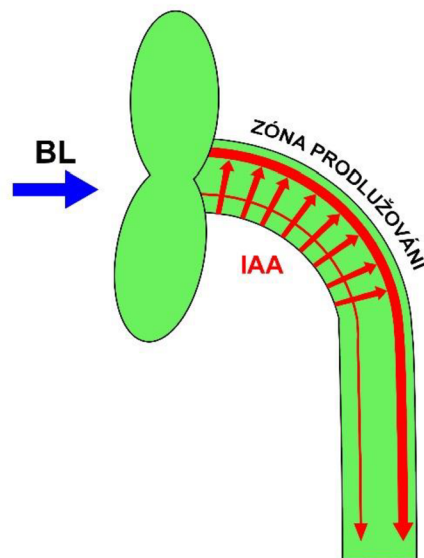
Mimo výše popsané vlastnosti bylo také prokázáno, že NPH3 slouží jako substrátový adaptér v CUL3 RING E3 UBIQUITIN LIGASE 3 (CRL) ubiquitinačním komplexu (Roberts et al., 2011). CRL s navázaným NPH3 po ozáření modrým světlem ubiquitínuje phot1 (Obr. 3). Ten může být mono i polyubiquitinován s tím, že menší množství ubiquitinové značky vede k disociaci phot1 od plazmatické membrány a větší množství zase k degradaci ve 26S proteasomu. Důležitost těchto procesů pro signalizaci fototropinů ovšem zůstává neznámá (Sullivan et al., 2021).

Jelikož zánikem komplexu phot1-NPH3 dochází ke znecitlivění phot1, tak hromadný přesun NPH3 do cytosolických agregátů po ozáření modrým světlem způsobuje oslabení fototropické reakce (Liscum et al., 2014). Pro zachování fototropické reakce ke světelnému stimulu je tak potřeba rychlého návratu NPH3 do fosforylační úrovně před ozářením, asociace s plazmatickou membránou a tvorba phot-NPH3 komplexu. Na tomto procesu se podílí další protein ze skupiny NRL: ROOT PHOTOTROPISM 2 (RPT2). Tento protein je taktéž přítomen u plazmatické membrány a interaguje s phot1, NPH3 i 14-3-3 (Obr. 3). Rostliny s mutací tohoto proteinu mají poškozené fototropické reakce k vyšším intenzitám modrého světla (Haga et al., 2015). RPT2 se akumuluje při ozáření a je zodpovědný za obnovení fosforylace NPH3 a jeho asociace s plazmatickou membránou a phot1 po dlouhotrvajícím ozařování modrým světlem, čímž umožňuje udržení fototropické reakce.

Zásadní pro fototropickou signalizaci je kinasová aktivita PKD domény fototropinu. Kromě autofosforylace však při aktivaci fototropinu dochází i k fosforylaci dalších proteinů. Kromě výše zmíněného NPH3 však bylo objeveno jen několik dalších substrátů PKD (Sullivan et al., 2021). Mimo jiné proteinové kinyasy BLUE LIGHT SIGNALLING 1 (BLUS1) a CONVERGENCE OF BLUE LIGHT AND CO<sub>2</sub> 1 (CBC1), které jsou zapojené v otevírání průduchů. Dalšími substráty, u kterých však byla prokázána spojitost s fototropismem jsou ATP-BINDING CASSETTE B 19 (ABCB19) a PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 4 (PKS4). ABCB19 je transportní protein, který přenáší auxin přes plazmatickou membránu (Christie et al., 2011). Fosforylací ABCB19 dochází k jeho inhibici. Studie *abcb19* mutantů naznačily, že je tento transportér spíše negativním regulátorem fototropické reakce, nejedná se ovšem o přímého účastníka signalizace fototropinů. PKS4 je spolu s dalšími (PKS1-3) zapojen do mnoha reakcí spojených s fototropiny, ale jak název napovídá tak také s fytochromy (Legris & Boccaccini, 2020). Jejich funkce je stále neznámá, ale pravděpodobně souvisí s transportem nebo signalizací auxinu. PKS4 se nachází u plazmatické membrány a interaguje s phot1 i NPH3 (Obr. 3). Zatímco ve tmě se nachází defosforylovaný a funguje jako zesilovač fototropické reakce, tak po ozáření modrým světlem a fosforylací pomocí phot1 se PKS4 stává inhibitorem fototropismu (Schumacher et al., 2018).

### 2.1.2.2 Pozdní události v signalizaci fototropismu

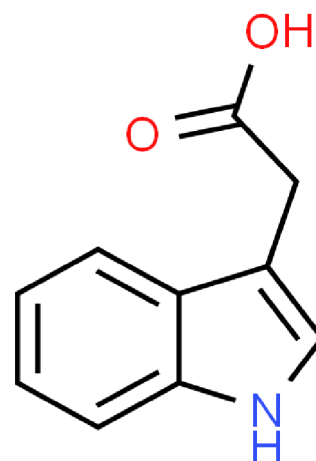
Vznik fototropické reakce pak souvisí s vytvořením gradientu auxinu mezi ozářenou a neozářenou stranou rostliny (Obr. 4). Akumulace auxinu na neozářené straně způsobí, že se buňky v této části prodlužují více, než na straně ozářené, čímž vznikne ohyb (Liscum et al., 2014). Auxin se vytváří ve stonkovém vzrostném vrcholu nebo v mladých listech a následně je jednosměrně transportován skrze buňky i floémem směrem ke kořeni. Podle dnes všeobecně přijímaného Cholodny-Went modelu (Went & Thimann, 1937) fototropismu a pozdějších prací Winslowa Briggse je jednosměrné ozáření modrým světlem vnímáno ve špičce prýtu a gradient auxinu se vytváří až v nižších částech prýtu. Tento gradient není způsoben změnami syntézy nebo degradace auxinu, ale jeho laterální redistribucí (Christie & Murphy, 2013). Způsob, jakým signalizace fototropinů řídí redistribuci auxinu mezi ozářenou a neozářenou stranou rostliny není dosud přesně znám (viz níže).



**Obr. 4. Schéma fototropického ohybu hypokotylu.** Modré světlo (BL) skrze signalizaci fototropinů způsobuje změny v proudění růstového hormonu auxinu (červené šipky), který následně způsobuje větší prodlužování buněk na neozářené straně. Podle Liscum et al., 2014).

### 2.1.3 Auxin a jeho role ve fototropismu

Auxin je jedním z nejdůležitějších rostlinných hormonů, který je zodpovědný za téměř všechny aspekty rostlinného růstu a vývoje (Whippo & Hangarter, 2006). Zároveň se jedná o nejdéle známý rostlinný hormon, jelikož jeho existenci předpovídal ve své práci již Darwin (Darwin & Darwin, 1880), aby jej nakonec identifikovali Kögl s Haagen-Smitem (Kögl & Haagen-Smit, 1931). Mezi hlavní účinky auxinu patří udržování apikální dominance, tvorba adventivních kořenů, tvorba vodivých pletiv, vývoj květů a plodů a v neposlední řadě tropické reakce. Obecně však lze tvrdit, že se auxin podílí na všech rostlinných pochodech.



**Obr. 5. Kyselina indol-3-octová (IAA).**

Ačkoliv v širším slova smyslu existuje celá řada přirozených i syntetických auxinů, tak nejdůležitější roli zabírá přirozeně se vyskytující, aktivní auxin – kyselina indol-3-octová (IAA) (Obr. 5) (Cao et al., 2019). K dalším přirozeným, aktivním auxinům patří dále kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylactová (PAA). Mezi další známé přirozené

auxiny patří i kyselina indol-3-máselná (IBA), ta ovšem slouží pouze jako prekurzor IAA. Kromě přirozených auxinů existuje i celá řada syntetických, které mají podobnou strukturu a podobné účinky a běžně se využívají jako hnojiva, ale i jako herbicidy. Navzdory všem zmíněným auxinům zůstává IAA tím nejlépe popsáním a nejvíce zapojeným do rostlinných pochodů, a většina studií auxinů, stejně jako tato práce se zabývá pouze IAA.

### 2.1.3.1 Syntéza IAA

U *Arabidopsis* existují dva způsoby syntézy IAA podle zapojení tryptofanu (Cao et al., 2019). Syntéza závislá na tryptofanu je dnes lépe charakterizovaná a zahrnuje čtyři syntetické dráhy využívající různé substráty odvozené z metabolismu tryptofanu: indol-3-acetaldoxim, indol-3-acetamid, kyselina indol-3-pyrohroznová (IPyA) a tryptamin. Syntetická dráha přes IPyA je u rostlin nejvíce rozšířená a jako jediná je i přesně popsána. V prvním kroku je tryptofan reverzibilně přeměněn na IPyA pomocí tryptofan aminotransferasy (TAA). Ve druhém kroku je IPyA dekarboxylována na aktivní IAA pomocí monooxygenasy YUCCA. IAA může být dále reverzibilně deaktivována pomocí GRETCHEN HAGEN 3 (GH3) za vzniku konjugátů s aminokyselinami nebo ireverzibilně deaktivován oxidací pomocí dioxygenasy DIOXYGENASE FOR AUXIN OXIDATION (DAO).

### 2.1.3.2 Transport auxinu

Syntéza auxinu probíhá v prýtových vzrostných vrcholech a listových primordiích a do míst účinku je auxin transportován. Tento transport probíhá asimilačním tokem skrze floém nebo přes jednotlivé buňky pomocí tzv. polárního transportu auxinu (Swarup & Bhosale, 2019).

Jelikož je pH apoplastu lehce kyselé ( $\pm 5.5$ ), tak zde auxin existuje zároveň v hydrogenované formě IAAH, která může volně procházet plazmatickou membránou do buněk, a zároveň v aniontové formě  $\text{IAA}^-$ , která membránou volně procházet nemůže (Swarup & Bhosale, 2019). V cytosolu je pH neutrální a auxin zde existuje pouze ve formě aniontu, který membránou neprochází. Jelikož i v apoplastu za normálních podmínek převládá aniontová forma, tak jsou pro transport auxinu mezi buňkami zcela zásadní transportní proteiny. Ty jsou v rámci plazmatické membrány systematicky polárně rozmístěny, takže na jedné straně buňky dochází k importu auxinu a na druhé k exportu. Zároveň může být pozice i aktivita těchto transportních proteinů regulována v reakci na různé stimuly. Transportní proteiny schopné přenášet auxin se dělí do 3 skupin: ATP-BINDING CASSETTE B (ABCB), AUXIN RESISTANT 1/LIKE AUX1 (AUX1/LAX) a PIN-FORMED (PIN) (Fankhauser & Christie, 2015).

### *ABCB*

Jak název napovídá, jedná se o podskupinu membránových pump, které přenášejí auxin s využitím energie z ATP a podílejí se na importu i exportu auxinu z buněk (Zwiewka et al., 2019). ABC transportérů je u rostlin celá řada a mnoho skupin se specializuje na transport různých typů fytohormonů. Z podskupiny B se na auxinovém transportu podílí ABCB1, 4, 14, 15, a 19 s tím, že 1 a 19 jsou důležité pro správnou funkci polárního transportu auxinu (Hellsberg et al., 2015). Jak již bylo zmíněno výše, tak konkrétně ABCB19 je navíc fosforylačním substrátem pro aktivovaný phot1 a fosforylací dochází k jeho zablokování (Obr. 3) (Liscum et al., 2014).

### *AUX1/LAX*

AUX1/LAX představují hlavní skupinu importních přenašečů auxinu u *Arabidopsis* (Liscum et al., 2014). Jedná se o skupinu H<sup>+</sup> symportérů, které jsou velmi podobné transportérům aminokyselin. U AUX/LAX byla prokázána polární lokalizace na opačné straně buňky než u exportních proteinů PIN. Ačkoliv jsou AUX1/LAX zodpovědné za celou řadu rostlinných pochodů souvisejících s transportem auxinu, jako jsou vývoj kořenů, gravitropismus, klíčení nebo morfogeneze listů, tak jejich role ve fototropismu zatím nebyla objevena (Swarup & Bhosale, 2019).

### *PIN*

PIN jsou hlavní skupinou exportérů auxinu u rostlin (Liscum et al., 2014). Skupina obsahuje několik typů proteinů, které se dělí na skupiny asociované spíše s plazmatickou membránou a na ty spojené více s endoplazmatickým retikulem. Na plazmatické membráně se PIN proteiny často vyskytují ve striktně stanovených směrech. Zatímco PIN1 a PIN2, které jsou hlavními exportéry auxinu z buňky, jsou stabilně lokalizovány na jedné (nejčastěji spodní) straně plazmatické membrány, tak oproti tomu PIN3, 4 nebo 7 jsou exprimovány a lokalizovány v závislosti na podmínkách (Obr. 3).

Exportéry PIN jsou zásadní pro rostlinné reakce závislé na změnách transportu auxinu včetně řady tropických reakcí (Han et al., 2021). Konkrétně PIN3 je pak hlavním zprostředkovatelem laterálního toku auxinu při fototropismu (Ding et al., 2011). U etiolovaných rostlin se PIN3 vyskytuje volně na plazmatické membráně, ale po ozáření dochází k ustálení polární lokalizace PIN3 na neozářené straně buněk, což umožňuje přesun auxinu směrem do neozářené strany rostliny. Na druhou stranu tato změna pozice PIN3 vzniká později než samotná fototropická reakce, a tak jí nelze chápat jako hlavní mechanismus ustavení fototropického ohybu (Han et al., 2021).

Dalším zajímavým spojníkem mezi fototropismem a PIN je skutečnost, že PIN jsou regulovány fosforylací pomocí některých kinas ze skupiny AGCVIII, do které náleží i fototropiny (Haga et al., 2018). Jedná se např. o D6 PROTEIN KINASE (D6PK), které fosforylací aktivují PIN transportéry. Tato aktivace fosforylací je nutná pro vznik fototropické reakce, i když neovlivňuje samotný růst hypokotylu. Dále zde patří také kinasy AGC1-12, jejichž fosforylace PIN je potřebná specificky pro fototropismus při pulzech modrého světla (Haga et al., 2018). Další skupinou AGCVIII kinas jsou také PINOID (PID), které byly také dlouho považovány za regulátory PIN a fototropismu, což ovšem bylo v nedávné době vyvráceno studiem jejich mutantů (Haga et al., 2018).

V neposlední řadě může mít roli ve fototropismu také ubiquitinace PIN (Korbei & Luschnig, 2013). Ta sice u fototropismu zatím nebyla popsána, ale bylo prokázáno, že má důležitou roli v gravitropismu kořene. PIN2 při gravitropismu v kořenech taktéž polárně mění svou lokalizaci, a to se děje z části jeho redistribucí, ale z části také jeho degradací závislou na značení ubiquitinem.

### 2.1.3.3 Signalizace auxinu

#### *ABP1*

Auxin je vnímán třemi typy receptorů. V apoplastu při plazmatické membráně a v endoplazmatickém retikulu se nachází AUXIN BINDING PROTEIN 1 (ABP1), který byl dlouho považován za jeden z klíčových zprostředkovatelů auxinových reakcí, včetně procesů zapojených do tropismů (Strader & Zhao, 2016). Ovšem většina poznatků o tomto receptoru byla vyvrácena po zjištění, že studované mutantní rostliny *abp1-1* měly ve skutečnosti mutaci ve vedlejším genu (Dai et al., 2015). Role receptoru ABP1, který je u rostlinných pletiv všudypřítomný, tak zůstává nejasná (Gelová et al., 2021; Napier, 2021).

#### *SKP2A*

Druhým receptorem auxinu je jaderný S-PHASE KINASE ASSOCIATED PROTEIN 2 A (SKP2A) (Jurado et al., 2010). Jedná se o F-box protein, který reguluje transkripční faktory buněčného cyklu. Po navázání auxinu indukuje ubiquitinaci a následnou degradaci těchto transkripčních faktorů. Sám je ovšem po navázání auxinu ubiquitinován a degradován. Doposud ovšem nebyly objeveny důkazy o zapojení tohoto receptoru v růstových reakcích rostlin.

#### *TIR1/AFB*

Nejdůležitější skupinou auxinových receptorů jsou jaderné proteiny TRANSPORT INHIBITOR RESISTANT 1/AUXIN BINDING F-BOX (TIR1/AFB) (Strader & Zhao, 2016).

Tento F-box protein je součástí E3 ubiquitinačního komplexu SKP, CULLIN, F-BOX (SCF<sup>TIR1/AFB</sup>). SCF<sup>TIR1/AFB</sup> po vazbě auxinu ubiquitínují, a tím značí k degradaci AUXIN/INDOLE-3-ACETIC ACID (Aux/IAA) (Obr. 3). Aux/IAA za nepřítomnosti auxinu slouží jako represory AUXIN RESPONSIVE FACTOR (ARF), což jsou transkripční faktory zodpovědné za expresi auxinem indukovaných genů.

Signalizace auxinu skrze TIR1/AFB má zásadní vliv na fototropické reakce. Mezi ostatními se jako nejdůležitější pro fototropismus jeví antagonistické role IAA19 a ARF7 (známé také jako NPH4) (Sun et al., 2013; Tatematsu et al., 2004). Exprese *IAA19* je regulována modrým světlem a vzniklý protein svou vazbou inhibuje transkripční faktor ARF7. ARF7 je nutný pro spuštění exprese genů souvisejících s fototropickou reakcí. Mezi další faktory důležité ve fototropismu vůči modrému světlu patří prokazatelně i *IAA29* nebo *ARF19* (Sun et al., 2013; Wang et al., 2020).

### *IBR5*

Za zmínku ještě určitě stojí objev fosfatázy INDOLE-3-BUTYRIC ACID RESPONSES 5 (*IBR5*), která spouští auxinové reakce nezávisle na interakci TIR1/AFB a Aux/IAA (Strader et al., 2008). *IBR5* patří mezi protein fosfatasy s dvojitou specifitou, které obvykle regulují mitogenem aktivované kinasy (MAPK). MAPK regulovaná *IBR5* však zatím nebyla objevena.

### *Auxinem indukované geny*

Auxinem indukované geny lze dělit na rané a pozdní (Lee et al., 2009). Zatímco rané neboli primární geny jsou aktivované přímo signalizací skrze TIR1/AFB, a to v řádu minut, tak pozdní neboli sekundární geny se aktivují až po několika hodinách a až v návaznosti na události primární auxinové reakce. Mezi rané auxinem indukované geny patří např. geny pro Aux/IAA transkripční represory nebo pro konjugační enzym GH3 (Singla et al., 2006). Signalizace auxinu pomocí SCF<sup>TIR1/AFB</sup> tedy zahrnuje zpětnovazebnou inaktivaci. Dále jsou mezi ranými geny některé geny kódující expansiny, což jsou enzymy potřebné pro buněčný růst (viz níže) (Obr. 3) (Sakai & Haga, 2012). Asi nejzajímavějšími ranými geny auxinové reakce jsou však SMALL AUXIN UP RNA (*SAUR*), kterým se tato práce věnuje v další části.

#### 2.1.3.4 Teorie kyselého růstu

Jak již bylo řečeno, tak auxin stimuluje prodlužování buněk, což mimo jiné zprostředkovává fototropické reakce. Jelikož mají rostlinné buňky pevnou buněčnou stěnu, je k tomuto procesu nutná změna struktury buněčné stěny společně se zvýšením buněčného turgoru. Tento proces je dnes vysvětlován tzv. teorií kyselého růstu (Rayle & Cleland, 1977). Podle



ní auxin aktivuje plazmamembránové  $H^+$ /ATPasy (Obr. 3). Vzniklý proud protonů okyseluje oblast apoplastu, což stimuluje aktivitu zde přítomných enzymů modifikujících buněčnou stěnu jako jsou expansiny, xyloglukan endotransglykosylasy/hydrosylasy a pektin methyltransferasy, jejichž aktivita narušuje strukturu buněčné stěny a činí jí tak roztažitelnou. Zároveň aktivace  $H^+$ /ATPas způsobuje hyperpolarizaci plazmatické membrány, což ústí v zesílený příjem iontů (především draslíkových) do cytosolu. V reakci na to dochází k osmotickému příjmu vody do cytosolu a zvýšení turgoru. Tento tlak zevnitř na rozvolněnou buněčnou stěnu poté způsobuje její roztažení a celkový růst buňky (Du et al., 2020).

Způsob, jakým auxin aktivuje plazmamembránové  $H^+$ /ATPasy byl dlouhou dobu předmětem zkoumání. Mimo jiné bylo prokázáno, že auxin zvyšuje množství  $H^+$ /ATPas na plazmatické membráně tím, že zesiluje jejich exocytózu a naopak inhibuje endocytózu (Hager et al., 1991; Paciorek et al., 2005).  $H^+$ /ATPasy také pro svou aktivaci vyžadují fosforylaci a navázání regulačního proteinu 14-3-3 a právě fosforylace  $H^+$ /ATPas je stimulována auxinem (Obr. 3) (Takahashi et al., 2012). K této fosforylaci dochází účinkem zatím neznámých kinas, důležitou roli zde ovšem mají zmiňované SAUR proteiny.

U *Arabidopsis* bylo dosud objeveno 76 genů *SAUR*. Část SAUR proteinů se vyskytuje při plazmatické membráně, ale většina má lokalizaci v cytosolu nebo v jádře (Du et al., 2020). Skrze jejich velké množství a nepřítomnost známých strukturních motivů, byla jejich funkce dlouho předmětem diskusí. Studium mutantů s nadměrnou expresí fúzních proteinů SAUR19 nebo SAUR63, kteří mají fenotypy se zvýšeným prodlužováním buněk, prokázalo souvislost SAUR s kyselým růstem (Chae et al., 2012; Spartz et al., 2012). V dalších výzkumech se ukázalo, že celá řada *SAUR* genů má zvýšenou expresi v rostoucích orgánech (Du et al., 2020). Většina *SAUR* genů má také zesílenou expresi nejen vlivem auxinu, ale také vlivem dalších růst stimulačních faktorů jako jsou fytohormony brasinosteroidy nebo zastínění. Oproti tomu kyselina abscisová, kyselina jasmonová nebo abiotické stresy snižují expresi *SAUR* (Du et al., 2020).

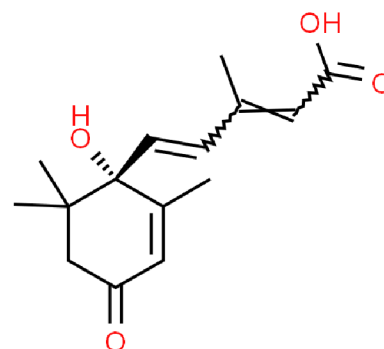
Dosud nejlépe byla prozkoumána role SAUR19. Ty jsou přirozeně lokalizovány u plazmatické membrány a bylo prokázáno, že se podílejí na regulaci plazmamembránových  $H^+$ /ATPas (Du et al., 2020). Tato regulace probíhá skrze 2C protein fosfoatasy z podskupiny D (PP2C.D), které defosforylují  $H^+$ /ATPasy. SAUR19 se váží na PP2C.D a tím inhibují jejich enzymovou aktivitu (Sun et al., 2016). Vznik komplexu SAUR19-PP2C.D je tak zásadní pro udržení fosforylovaného stavu plazmamembránových  $H^+$ /ATPas a pro vznik buněčného prodlužování a s tím spojenou fototropickou reakcí. Tato skutečnost je podpořena i výsledky od Hohm et al. (2014), které ukazují že fototropická reakce je závislá na fototropiny regulované rozdílné fosforylaci  $H^+$ /ATPas mezi ozářenou

a neozářenou stranou hypokotylu. A dále výzkum od Wang et al. (2020) ukázal, že exprese *SAUR19* je při fototropismu asymetricky rozložena mezi ozářenou a neozářenou stranou hypokotylu a že mutace nebo ektopická exprese *SAUR19* vede k defektům fototropismu. Exprese *SAUR19* je pak pravděpodobně indukována pomocí ARF7 (Wang et al., 2020). A ačkoliv takové interakce ještě nebyly prokázány, je vysoce pravděpodobné, že další SAUR-PP2C.D komplexy se budou podílet i na regulaci jiných pochodů souvisejících s buněčným prodlužováním, jako je např. zvýšená tvorba stavebních složek buněčné stěny apod. (Du et al., 2020).

Zajímavostí je, že aktivace plazmamembránových H<sup>+</sup>/ATPas pomocí fosforylace probíhá i ve svěřacích buňkách při otevírání průduchů v reakci na ozáření modrým světlem (Legris & Boccaccini, 2020). K této fosforylaci však dochází nezávisle na auxinu signální kaskádou od aktivovaných fototropinů se zapojením kinasy BLUS1. Tato signální dráha je specifická pro svěřací buňky a podobný mechanismus nebyl u fototropismu zaznamenán.

## 2.2 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je rostlinný hormon, který je nejvíce známý pro svou majoritní úlohu v rostlinných odpovědích ke stresům (Obr. 6). V 60. letech minulého století byla popsána nezávisle na sobě ve dvou pracovních skupinách a podle svých účinků (indukce dormance a abscise) dostala názvy dormin respektive abscisin II (Eagles & Wareing, 1963; Ohkuma et al., 1963). Za několik let se ukázalo, že se jedná o stejnou látku, která nakonec dostala současný název.



Obr. 6. Kyselina abscisová.

ABA je extrémně důležitým fytohormonem a má celou řadu fyziologických funkcí. Kromě úlohy v rostlinných reakcích ke stresům reguluje i rostlinný růst a vývoj (Chen et al., 2020). Je zásadní pro zrání embryí, dormanci a klíčení semen, zavírání průduchů, senescenci listů, dormanci pupenů, indukci kvetení, osmotickou regulaci nebo dělení a prodlužování buněk. Z reakcí ke stresům se nejvíce podílí na obraně před suchem, zasolením, chladem, patogeny nebo UV zářením (Finkelstein, 2013).

Za normálních okolností je koncentrace ABA udržována na bazální hladině pro udržení optimálního růstu a vývoje (Chen et al., 2020). V reakci na mnohé stresy, hlavně abiotické jako zasolení nebo dehydratace pak dochází k rychlé akumulaci ABA, což indukuje příslušné stresové odpovědi. Rovnováha obsahu ABA v jednotlivých pletivech je zásadní pro správnou vyváženost rostlinné obrany a růstu. Hladiny ABA jsou kontrolovány její syntézou, degradací, de/konjugací nebo transportem.

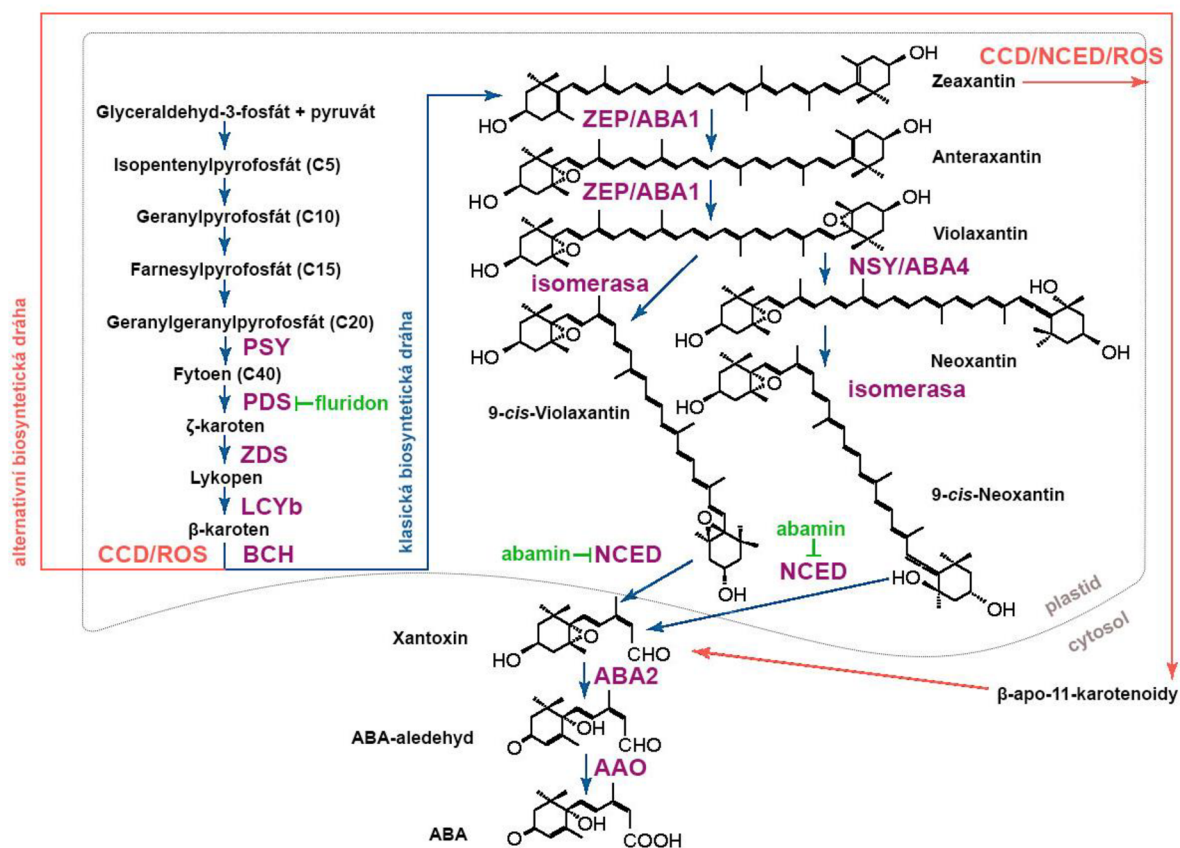
### 2.2.1 Syntéza ABA

Z chemického hlediska se jedná o seskviterpenoid, obsahuje patnáct uhlíkových atomů a je syntetizován u rostlin a některých hub pomocí odlišných biosyntetických drah (Chen et al., 2020). Zatímco u hub existuje přímá dráha z farnesylpyrofosfátu, tak rostliny využívají biosyntetickou dráhu karotenoidů (Obr. 7). Kromě ABA z úvodu této syntetické dráhy vychází i další rostlinné hormony – např. cytokininy a gibereliny.

Syntéza ABA probíhá u rostlin z velké části v plastidech. Jako první vzniká z pyruvátu a glycerinaldehydu isopentenylpyrosforát (C5), který je základním kamenem isoprenoidů (Ruiz-Sola & Rodríguez-Concepción, 2012). Isoprenoidní jednotky jsou k sobě postupně připojovány za vzniku geranylpyrofosfátu (C10), farnesylpyrofosfátu (C15) a geranylgeranylpyrofosfátu (C20) (Finkelstein, 2013). Následně jsou dva geranylgeranylpyrofosfáty spojeny fytoen syntasou (PSY) za vzniku fytoenu (C40) (Obr. 7).

Fytoen dále prochází několika desaturacemi skrze fytoen desaturasu (PDS) a karoten desaturasu (ZDS) za vzniku lykopenu (Finkelstein, 2013). Lykopen může být dále zacyklen za vzniku  $\alpha$  nebo  $\beta$ -karotenu pomocí lykopen  $\beta$ -cyklasy (LCYb). Zatímco  $\alpha$ -karoten vede ke vzniku luteinu, tak  $\beta$ -karoten směřuje i ke vzniku ABA. Velké množství  $\beta$ -karotenu je potřebné pro správnou funkci fotosyntetických aparátů a na ABA se přeměňuje pouze jeho malá část. K tomu je potřeba oxidace  $\beta$ -karotenu pomocí  $\beta$ -karoten hydroxylasy (BCH) za vzniku zeaxantinu. Zeaxantin je poté přeměněn na violaxantin pomocí zeaxantin epoxidasy (ZEP) popsané také jako ABA-DEFICIENT 1 (ABA1). Účinek ZEP/ABA1 je reverzibilní vlivem violaxantin de-epoxidasy (VDE) a tento proces známý jako xantofylový cyklus je součástí ochranné reakce fotosyntetických aparátů před nadměrným ozářením (Obr. 7).

V poslední části je violaxantin buďto převeden pomocí neoxantin syntasy známé jako ABA-DEFICIENT 4 (NSY/ABA4) a pomocí neznámé isomerasy na 9'-cis-neoxantin nebo je violaxantin neznámou isomerasou přeměněn na 9'-cis-violaxantin (Chen et al., 2020). Oba tyto produkty jsou poté oxidativně štěpeny na xantoxin pomocí 9-cis-epoxykarotenoid dioxygenasy (NCED). Reakce katalyzovaná NCED je pro syntézu ABA limitní. Xantoxin je transportován do cytosolu, kde je oxidován pomocí oxidasy ABA-DEFICIENT 2 (ABA2) za vzniku ABA-aldehydu. Ten je následně oxidován pomocí ABA-aldehyd oxidasy (AAO) za vzniku ABA (Obr. 7).



**Obr. 7. Biosyntéza ABA.** Schéma klasické biosyntetické dráhy ABA (modré šipky) s vyznačenými názvy nejdůležitějších enzymů a s místy účinku chemických inhibitorů biosyntézy ABA fluridonu a abaminu. Červené šipky značí alternativní biosyntetickou dráhu. Podle Seo & Koshiba, 2002.

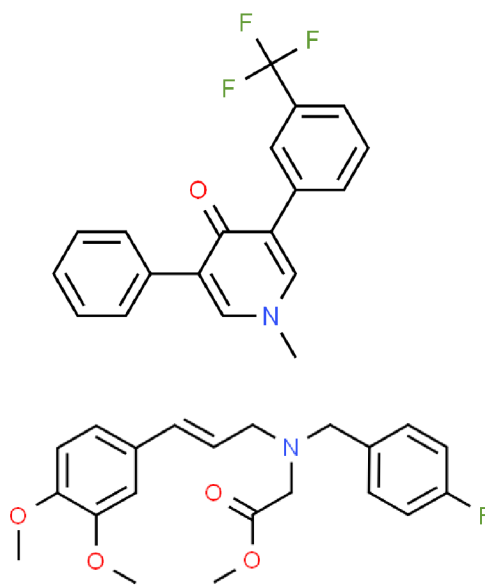
V nedávné době byla u rostlin objevena také alternativní dráha syntézy ABA, která je nezávislá na ZEP/ABA1 (Jia et al., 2022). Štěpením  $\beta$ -karotenu nebo zeaxantinu enzymaticky pomocí CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE (CCD) nebo pomocí již zmiňované NCED anebo neenzymatickým oxidačním štěpením pomocí reaktivních forem kyslíku (ROS) vznikají (C15)  $\beta$ -apo-11-karotenoidy. Ty jsou následně v cytoplazmě enzymaticky upravovány přes neznámý počet reakcí až k finální epoxidaci za vzniku xantoxinu. Od xantoxinu již syntéza probíhá klasickou cestou (Obr. 7).

Deaktivace ABA může probíhat reverzibilně glykosylací UDP-glukosyltransferasou nebo ireverzibilně oxidací pomocí cytochromu P450 (Chen et al., 2020). Oxidací vzniká kyselina faseová, která může být jinými enzymy dále přeměňována na kyselinu dihydrofaseovou a DPA-4-O- $\beta$ -glukosid.

Za zmínku potom stojí skutečnost, že biosyntéza ABA může být regulována světlem. Bylo tak prokázáno, že např. gen *PSY* je v klíčících rostlinách *Arabidopsis* zvýšeně exprimován vlivem signalizace fytochromů se zapojením transkripčních faktorů PIF (Toledo-Ortiz et al., 2010). V semenech ječmene bylo popsáno, že exprese genu *NCED1* je na modrém světle stimulována signalizací kryptochromů (Barrero et al., 2014), které se

na potlačení biosyntézy ABA podílejí také regulací transkripčních faktorů HY5, COP1 nebo PIF4 (D'Amico-Damião & Carvalho, 2018; Yadukrishnan et al., 2020). Naopak Humplík et al. (2015b) popsali u rajčat, že exprese *NCED1* se v hypokotylech etiolovaných rostlin po ozáření snižuje.

Ke studiu účinků ABA se běžně používají mutanti s defekty v biosyntéze, signalizaci nebo inaktivaci ABA. Pro studium účinků ABA v konkrétní vývojové fázi je ovšem vhodnější využití chemických činitelů. Mezi takto používané látky indukující ABA-deficientní fenotypy patří fluridon (1-methyl-3-fenyl-5-[3-(trifluoromethyl)fenyl]pyridin-4-on) a abamin (methyl-[[3-(3,4-dimethoxyfenyl)allyl]-(4-fluorobenzyl)amino]acetát) (Obr. 8) (National Center for Biotechnology Information, 2005, 2006). Fluridon je inhibitor PDS, která katalyzuje první krok přeměny fytoenu na lykopen a inhibuje tak biosyntézu ABA v rámci inhibice celé biosyntézy karotenoidů (Obr. 7) (Gamble & Mullet, 1986). Ačkoliv je fluridon ve výzkumu ABA často používaný, tak jeho využití má své limity při výzkumech na světlech s vyšší intenzitou, jelikož karotenoidy chrání rostliny před fotooxidativním poškozením (Han et al., 2004). Oproti tomu je abamin výrazně specifitějším inhibitorem ABA biosyntézy, jelikož blokuje funkci NCED, který přeměňuje 9'-cis-neoxantin a 9'-cis-violaxantin na xantoxin a jedná se již o specifickou a limitní reakci biosyntézy ABA (Obr. 7).



**Obr. 8. Fluridon a abamin.** Chemická struktura fluridonu (nahore) a abaminu (dole), které se využívají jako inhibitory biosyntézy ABA.

## 2.2.2 Transport ABA

ABA je primárně syntetizována ve vodivých pletivech a následně transportována do cílových pletiv (Finkelstein, 2013). Tento transport probíhá skrze xylém i skrze floém a zajišťuje tak přesuny ABA v obou směrech mezi kořenem a prýtem. ABA se stejně jako auxin vyskytuje vně buněk v hydrogenované nebo aniontové podobě a podle toho je schopná procházet plazmatickou membránou. Po průchodu do cytosolu je hydrogenovaná forma v místním neutrálním pH disociována a již nemůže volně procházet. Za normálních okolností je pH xylémového roztoku mírně kyselé a ABA v hydrogenované formě je zachycována v okolních buňkách. Naopak při osmotických stresech dochází k alkalizaci xylémového roztoku a disociovaná ABA se v něm začíná akumulovat, čímž se zesiluje její transport z kořenů na dlouhé vzdálenosti skrz celé rostlinné tělo.

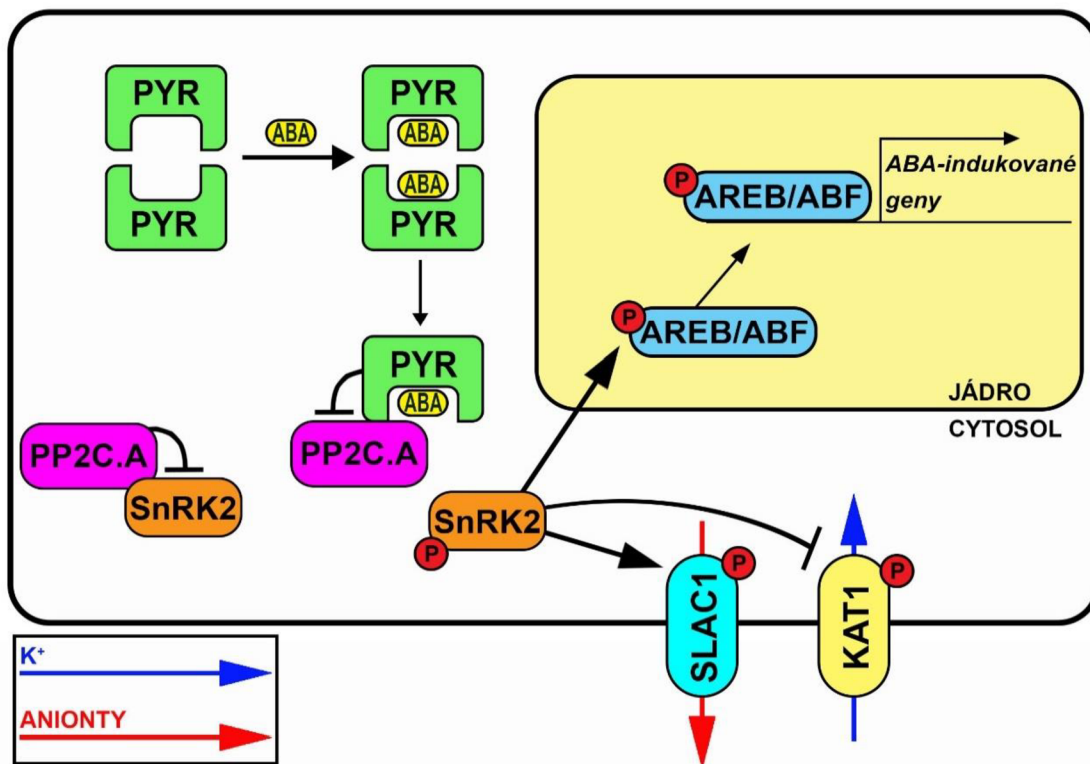
Aktivní transport ABA mezi buňkami zprostředkovává několik typů membránových proteinů. Některé ATP-BINDING CASSETTE G (ABCG) slouží jako exportéry a jiné jako importéry ABA (Chen et al., 2020). Dále některé NITRATE TRANSPORTER 1/PEPTIDE TRANSPORTER (NRT1/PTR) slouží jako importéry ABA a u rýže jako importéry fungují také ABA-INDUCED WHEAT PLASMA MEMBRANE 19 (AWPM19). Jako exportéry naopak fungují některé MULTIDRUG AND TOXIC COMPOUND EXTRUSION/DETOXIFICATION EFFLUX CARRIERS (MATE/DTX) (Kang et al., 2020).

### 2.2.3 Signalizace ABA

Navzdory velkému poli působení ABA byly její receptory dlouho neznámé. Až dvě na sobě nezávislé práce z prvního desetiletí nového tisíciletí přišly s objevem intracelulárních receptorů ABA – PYRABACTIN RESISTANCE/PYRABACTIN 1-LIKE/REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR (PYR/PYL/RCAR) (Obr. 9) (Ma et al., 2009; Park et al., 2009). Ty se vyskytují v cytoplazmě i v jádře a po navázání ABA inhibují 2C protein fosfatasy z podskupiny A (PP2C.A). Fosfatasy PP2C.A za nepřítomnosti ABA inhibují defosforylací funkci kinas SUCROSE NON-FERMENTING 1-RELATED PROTEIN KINASE 2 (SnRK2), které jsou potřebné pro aktivaci transkripčních faktorů, iontových kanálů a dalších zprostředkovatelů ABA reakce (Finkelstein, 2013). Existuje celá řada typů PYR/PYL/RCAR stejně tak PP2C.A nebo SnRK2, které mají různou časoprostorovou lokalizaci a rozdílnou afinitu, což způsobuje širokou škálu reakcí k ABA napříč rostlinnými pletivy a vývojovými stádii (Chen et al., 2020).

Mezi transkripční faktory, které jsou aktivovány fosforylací SnRK2 kinasami patří bZIP transkripční faktory – ABA-RESPONSIVE ELEMENT BINDING FACTOR (AREB/ABF) (Obr. 9) (Chen et al., 2020). Dále je do této signalizace zapojen i B3 transkripční faktor ABA-INSENSITIVE 3 (ABI3). Další transkripční faktor zapojený do regulace ABA reakce je AP2 transkripční faktor ABI4, který ovšem není regulován fosforylací SnRK2, ale neznámou kinasou regulovanou SnRK2 či navazujícími kinasami (Chandrasekaran et al., 2020). Aktivované transkripční faktory následně spouštějí syntézu ABA-indukovaných genů.

Krom základní signalizace ABA existují i jiné signální dráhy. ABA totiž nepůsobí pouze jako intracelulární, ale také jako extracelulární signál. Jako možné membránové receptory ABA se jeví např. RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 1 (RPK1) (Shang et al., 2020) nebo receptory spřažené s G-proteinem typu G (GPCR) (Pandey et al., 2009). V chloroplastech se pak vyskytuje poslední známý receptor ABA – Mg chelataza (Shen et al., 2006).



**Obr. 9. Základní signalizace ABA.** ABA se váže na PYR/PYL/RCAR (PYR) receptory a tím je aktivuje. Aktivované PYR/PYL/RCAR následně váží a inhibují fosfatasy PP2C.A a tím je blokuje. Zablokování PP2C.A uvolňuje kinasy SnRK2, které se následně autofosforylují a tím aktivují. Aktivované kinasy SnRK2 následně fosforylují regulují iontové kanály a aktivují expresi ABA-indukovaných genů skrze aktivaci transkripčních faktorů AREB/ABF. Podle Hubbard et al., 2010.

## 2.2.4 ABA při stresu ze zasolení

### 2.2.4.1 Stres ze zasolení

Zasolení půd zesilované změnami klimatu, znečišťováním životního prostředí a neekologickým zemědělstvím je v dnešní době jeden z velkých celosvětových problémů, který velmi nepříznivě postihuje nejen rostlinnou produkci. Podle některých odhadů je dnes až 6 % veškeré orné půdy na světě znehodnoceno vysokými obsahy solí a v příštích pětadvaceti letech by toto číslo mohlo stoupnout až na 25 % (Hao et al., 2021). Vzhledem ke zvyšující se celosvětové populaci a její závislosti na rostlinné stravě je tak otázka pochopení rostlinných reakcí k zasolení a následná tvorba odolných odrůd nesmírně aktuální.

Ačkoliv si v přírodě některé rostliny vyvinuly přirozené mechanismy tolerance k zasolení (halofyty), tak většina rostlin včetně těch hospodářsky důležitých je k zasolení velmi citlivá a jejich růst a výnos bývají negativně ovlivněny již při milimolárních koncentracích rozpuštěných solí v půdě (glykofyty) (Hao et al., 2021). Nejtypičtější solí rozpuštěnou v půdě je NaCl. Stres ze zasolení na rostliny působí ve třech rovinách. Tou první je osmotický stres, který na rostlinu působí skrze sníženou schopnost rostliny

absorbovat vodu kořenovým systémem v zasoleném prostředí. Druhým prvkem stresu ze zasolení je samotná toxicita rozpuštěných iontů, a to hlavně iontu sodného a chloridového, jejichž akumulace v rostlinných buňkách silně narušuje rovnováhu ostatních iontů a s tím spojenou celou řadu fyziologických procesů. Společné působení těchto stresů nakonec vede i ke stresu oxidativnímu.

Osmotický stres na rostliny dopadá ve formě vodního deficitu a snížením buněčného turgoru. V reakci na to rostliny mění složení plazmatické membrány a spouští signalizaci vápenatých iontů a inositol-3,4,5-trifosfátu, které aktivují MAPK kinasy, čímž ovlivňují specifickou genovou expresi (Park et al., 2016). Rostliny taktéž v reakci na osmotický stres akumulují kompatibilní osmolyty, pomocí kterých zabraňují ztrátám vody z buněk a ochraňují své makromolekulární struktury před denaturací. Na nedostatek vody rostlinné buňky reagují také změnou aktivity aquaporinů, což jsou plazmamembránové kanály, které umožňují průchod molekulám vody přes hydrofilní membránu. Na vyšší úrovni rostlina reaguje k osmotickému stresu uzavřením průduchů, čímž taktéž zabraňuje ztrátám vody. Tím ovšem také nepříznivě zvyšuje svou teplotu, omezuje fotosyntézu a zvyšuje produkci ROS.

Sodné ionty se do buněk dostávají skrze transportéry draselných iontů, neselektivní kationtové kanály nebo aquaporiny (Park et al., 2016). Vlivem akumulace sodných iontů se snižuje cytosolická koncentrace draselných iontů, což obecně narušuje iontovou homeostázu, integritu membrán nebo funkčnost mnoha proteinů. V reakci na akumulaci sodných iontů tak rostlina zvyšuje aktivitu svých vysokoafinitních importérů draselných iontů a spouští SALT OVERLAY SENSITIVE (SOS) systém. Ten reaguje na signalizaci vápenatých iontů a skrze signální kaskádu spouští specifické plazmamembránové a tonoplastické  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiportéry, které odvádí sodné ionty z buněk nebo je převádí do vakuol.

#### 2.2.4.2 ABA v reakci k zasolení

Stres ze zasolení indukuje akumulaci ABA. Ta se v první řadě akumuluje díky pozitivní regulaci jejích biosyntetických enzymů signalizací vápenatých iontů, jejichž přítok do cytosolu je zpětnovazebně zesilován vlivem zvýšené koncentrace ABA (Hao et al., 2021). V reakci na zasolení se zvyšuje také exprese genů pro enzymy biosyntézy ABA: *NCED* a *ZEP/ABA1* (Zhao et al., 2021). Dále je ABA také uvolňována z neaktivních konjugátů pomocí glykosidas a také se při stresu snižuje exprese ABA-deaktivních enzymů (Sah et al., 2016). Při stresu zasolením se ABA primárně akumuluje v kořenech, ale také v mnoha dalších orgánech odkud je transportována pomocí vodivých pletiv do celé rostliny. Poté co stres ustupuje, je rychlé snížení a deaktivace ABA dalším důležitým faktorem.



Jak již bylo řečeno výše, mezi účinky ABA signalizace patří indukce zavírání průduchů v reakci na dehydrataci z osmotického stresu. Signalizace ABA se zapojením proteinových kinas, druhých poslů, protonových pump, aquaporinů, iontových kanálů a transportérů způsobuje snížení turgoru ve svěracích buňkách průduchů a tím je uzavírá (Bharath et al., 2021). Mezi druhé posly patří mimo jiné ROS, oxid dusnatý i vápenaté ionty. Typické transportéry iontů ovlivňované ABA skrze antagonistické působení PP2C.A fosfatasy ABI1 a SnRK2 kinasy OPEN STOMATA 1 (OST1) jsou například K<sup>+</sup> importní kanál KAT1 (inhibován ABA) a K<sup>+</sup> exportní kanál GORK a aniontové exportní kanály SLAC1 a QUAC1 (stimulované ABA) (Planes et al., 2015).

Další obecný účinek ABA při zasolení je její zapojení do odstraňování toxických iontů z cytosolu (Ohta et al., 2003). Výše zmiňované Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiportery SOS systému jsou totiž při nestresových podmínkách inhibovány účinkem PP2C.A fosfatasy ABI2. ABI2 je při stresu zablokována účinkem ABA a tím se uvolňuje i SOS systém. Souběžně s tím ABA ovlivňuje i funkci protonových pump, aquaporinů a dalších iontových kanálů, čímž také ovlivňuje iontovou homeostázu.

V reakci na stres zasolením signalizace ABA spouští i expresi celé řady genů, skrze základní signalizaci ABA. Geny aktivované ABA signalizací při zasolení lze rozdělit do dvou skupin (Ma & Qin, 2014). První skupina zahrnuje proteiny nutné k ochraně buněk a celých pletiv před negativními vlivy stresu. Patří sem enzymy pro biosyntézu osmolytů, detoxifikační enzymy, aquaporiny, enzymy metabolismu kyselin, membránové transportní proteiny a proteiny pro ochranu buněčných makromolekul (chaperony), nejvíce ze skupiny LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA). Do druhé skupiny genů aktivovaných ABA patří geny pro různé regulační proteiny zapojené v reakci ke stresu jako jsou kinasy, fosfatasy a jiné transkripční faktory. Krom základní signalizace ABA se na regulaci genové exprese genů zapojených v reakci ke stresům podílí ABA závislé transkripční faktory MYC/MYB, NF-Y nebo WRKY a ABA nezávislé transkripční faktory DREB a NAC (Singh & Laxmi, 2015).

Z pohledu této práce je pak nejvíce zajímavý účinek zasolení na prodlužování hypokotylu. Na rozdíl od kořenových buněk, které se při zasolení skrze antagonistické působení ABA a ethylenu prodlužují, čímž zvyšují schopnost rostliny do jisté míry uniknout stresu a zvýšit svůj příjem vody (Sah et al., 2016), je prodlužování buněk hypokotylu při zasolení inhibováno, a to z velké části účinkem ABA (Planes et al., 2015). Mechanismy zapojené v této inhibici si popíšeme v další kapitole.

## 2.2.5 Interakce ABA v prodlužování hypokotylu a ve fototropismu

Podobně jako mnoho dalších fytohormonů v mnoha fyziologických reakcích rostlin má i ABA v prodlužování hypokotylu účinek závislý na dávce. Jak ukázal výzkum od Humplík et al. (2015a) u rajčat nebo Barrero et al. (2008) u *Arabidopsis*, tak bazální koncentrace ABA jsou nutné pro prodlužování hypokotylů. Vysoké koncentrace ABA, tedy i ty indukované stresem ze zasolení mají ovšem na prodlužování hypokotylů inhibiční efekt.

Inhibice prodlužování probíhá na několika úrovních. Jednou z nich je regulace plazmamembránových H<sup>+</sup>/ATPas, které jsou podle teorie kyselého růstu nutné pro prodlužování buněk, zároveň jsou nutné i pro fototropickou reakci (viz výše). Plazmamembránové H<sup>+</sup>/ATPasy jsou aktivovány fosforylací pomocí neznámých kinas a deaktivovány defosforylací pomocí PP2C.D fosfatas, které jsou naopak negativně regulovány SAUR19 ze signalizace auxinu. Na rozdíl od PP2C.A nejsou PP2C.D regulovány přímou interakcí s ABA, ovšem ABA-signalizace skrze zapojení kinas OST1, taktéž indukuje defosforylací H<sup>+</sup>/ATPas a tím inhibici prodlužování i fototropických reakcí (Hayashi et al., 2014; Planes et al., 2015). Přesná podoba interakce ABA a PP2C.D ovšem zůstává neznámá.

Další úroveň, na které ABA reguluje prodlužování buněk a fototropickou reakci hypokotylu je potlačování transportu, signalizace a redistribuce auxinu. Zde dochází k interakci se signálními drahami dalších fytohormonů. Vlivem exogenní ABA např. dochází ke snížení koncentrace giberelinů, které indukují prodlužování a naopak také dochází ke stabilizaci proteinů DELLA, které jsou normálně inhibovány gibereliny, a které jsou naopak zodpovědné za inhibici prodlužování (Davière & Achard, 2016; Lorrain et al., 2018). Kromě giberelinů a ABA jsou DELLA proteiny v regulaci prodlužování hypokotylu regulovány i signalizací brassinosteroidů, které zde účinkují antagonisticky k ABA (de Lucas & Prat, 2014). Hlavním účinkem proteinů DELLA je, že potlačují proteiny PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR (PIF), což jsou transkripční faktory negativně regulované mimo jiné signalizací fototropinů (Sun et al., 2013), ale také fytochromů, kryptochromů nebo UVR8 (Pham et al., 2018; Tavridou et al., 2020). Proteinů PIF je celá řada, regulují mnoho rostlinných procesů a některé se podílejí právě na regulaci auxinové signalizace, a tedy prodlužování a fototropismu hypokotylů. Například PIF1, 3, 4 a 5 stimulují expresi genů biosyntézy auxinu *YUCCA* čímž stimulují prodlužování buněk (Lorrain et al., 2018). Na druhou stranu výzkum od Sun et al. (2013) naznačil, že konkrétně PIF4 a PIF5 u etiolovaných rostlin *Arabidopsis* potlačují fototropickou reakci mimo jiné přímou aktivací transkripce genů *IAA19* a *IAA29*, jejichž produkty fungují jako negativní regulátory fototropismu inhibicí transkripčních faktorů ARF7 a ARF19. Výzkum od Qi et al. (2020) do situace vnesl další informace, když ukázal, že u etiolovaných rostlin může ABA stimulovat

expresi *PIF3*, 4 a 5 a je tedy jasné, že ABA za jistých okolností, alespoň některé PIF potlačuje a za jiných stimuluje, a že samotné PIF mohou prodlužování i fototropismus do jisté míry inhibovat i stimlovat. Z těchto poznatků se systém ABA-indukované regulace DELLA a PIF jeví jako možný regulátor prodlužování a fototropismu hypokotylu, jedná se ovšem o velmi komplexní problém, který bude potřebovat další výzkumy.

Role ABA ve fototropismu byla v nedávné době přiblížena výzkumem od Zhu et al. (2021). Podle výsledků této práce je fototropická reakce etiolovaných hypokotylů různých druhů bavlíku závislá na endogenní koncentraci ABA. Rostliny se silnější fototropickou reakcí mají v hypokotylech vyšší koncentraci IAA, kyseliny giberelové ( $GA_3$ ) a zčásti i kyseliny jasmonové a tyto hormony jsou při ozáření více koncentrovány na neozářené straně. Naopak rostliny se slabší fototropickou reakcí měly vyšší koncentraci ABA v celém hypokotylu a redukovanou distribuci výše zmíněných fytohormonů mezi ozářenou a neozářenou stranou. Tyto rozdíly v koncentracích fytohormonů jsou podpořeny i expresí příslušných genů, takže rostliny se silnější fototropickou reakcí mají vyšší expresi genů pro syntézu auxinu (*YUCCA8*) a giberelinů (*GIBBERELLIN 3-BETA-DIOXYGENASE1,2*), stejně jako pro transport a asymetrickou distribuci auxinu (*PIN1*, *ABCB1,4,19*, *ARF7* a *SAUR76*) a naopak mají výrazně nižší expresi genů pro syntézu ABA (*ABA2*, *AAO3*). Na druhou stranu v rostlinách se silnější fototropickou reakcí byla naměřena vyšší exprese i u genů negativního regulátoru fototropické reakce *IAA19* a u transkripčního faktoru *PIF4*. Taktéž tento výzkum ukázal, že aplikací exogenní ABA lze fototropismus etiolovaných hypokotylů inhibovat, což bylo testováno na bavlíku i *Arabidopsis*, a že je tato inhibice, alespoň částečně způsobena potlačením redistribuce auxinu. Naopak aplikace exogenní  $GA_3$  fototropickou reakci zesilovala.

Podle některých prací ovšem ABA neovlivňuje fototropismus pouze regulací auxinové signalizace, ale má také přímý účinek na fototropiny. Podle výsledků od Eckstein et al. (2016) snižuje aplikace exogenní ABA v listech *Arabidopsis* množství fototropinů na úrovni proteinů a u rostlin ve tmě inhibuje i transkripci *PHOT1*. Podle výsledků diplomové práce od Jarošová (2019), podpořených nepublikovanými výsledky pracovní skupiny od Fellner (2020) inhibuje zasolení transkripci *PHOT1* i *PHOT2* v semenech rajčete a je možné, že tato inhibice je také způsobena účinkem ABA. V bakalářské práci od Hřivňacký (2020) bylo prokázáno, že u *Arabidopsis* zasolení vlivem NaCl inhibuje fototropickou reakci hypokotylů. Zároveň tato práce v některých výsledcích naznačila, že tato inhibice může být potlačena aplikací nesespecifického inhibitoru syntézy ABA fluridonu a že fluridon může zesilovat fototropickou reakci u nestresovaných rostlin, v obou případech nezávisle na inhibici prodlužování hypokotylu. Tyto výsledky taktéž naznačují, že by se ABA mohla podílet na regulaci fototropismu i regulací fototropinů a jejich signální dráhy.

## 3 Materiál a metody

### 3.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část této diplomové práce byla použita modelová rostlina *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., konkrétně pak genotyp *glabra1 (gl1)*, který je odvozen od ekotypu Col-0. Gen *GLABRA1* kóduje MYB-like transkripční faktor, který je u rostlin zodpovědný za indukci tvorby trichomů (The Arabidopsis Information Resource — AT3G27920(GL1), 2003). Rostliny *gl1* byly použity, protože nemají žádné defekty fototropismu, ABA nebo auxinu a zároveň z tohoto genotypu byla odvozena celá řada mutantů sloužících ke studiu fototropinů a fototropismu (*phot1*, *phot2*, *phot1phot2*). Semena *gl1* laskavě poskytl prof. Winslow Briggs (Carneige Institution for Science, Stanford, Kalifornie, USA).

### 3.2 Příprava kultivačního média

Všechny experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro* a rostliny byly pěstovány na agarovém kultivačním médiu Murashige & Skoog (MS) (Murashige & Skoog, 1962). Pro přípravu základního média o objemu 2 l byl do velké Erlenmeyerovy baňky nalit 1 l destilované H<sub>2</sub>O (dH<sub>2</sub>O) a za stálého míchání pomocí magnetické míchačky (Arex-6 Digital PRO, Velp Scientifica, Itálie) bylo následně přidáno 20 g sacharosy (10 g l<sup>-1</sup>) (Lach-Ner, Česká republika, Cat. No. 40135-AP0-G1000-1), 8,66 g MS média (4,33 g l<sup>-1</sup>) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. M0221.0100) a 390,4 mg pufru MES (195,2 mg l<sup>-1</sup>) (kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová, Serva, Německo, Cat. No. 2983402). Následně byl objem doplněn dH<sub>2</sub>O do 2 l a pomocí roztoku KOH o koncentrací 1 mol l<sup>-1</sup> bylo upraveno pH média na 6,1. Takto připravené médium bylo pomocí odměrného válce přelito po 500 ml do 4 lahví s předem naváženými 3,5 g fytoagaru (7 g l<sup>-1</sup>) (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. P1003.1000). Lahve byly uzavřeny, víčka obalena hliníkovou folií a přelepena sterilizační páskou. Takto připravené lahve s médiem byly sterilizovány pomocí parního autoklávu (Labo Autoclave MLS-3751, Panasonic, Německo). Sterilizací v autoklávu se pH média snižuje na pro rostliny optimální hodnotu 5,7. Sterilní lahve se základním MS médiem byly skladovány v chladničce při 4 °C.

### 3.3 Růstové experimenty

#### 3.3.1 Stratifikace semen

Do plastové mikrozkušavky bylo naváženo přibližně 800 semen (100 semen = přibližně 2 mg). Semena byla zalita 1,5 ml dH<sub>2</sub>O, mikrozkušavka uzavřena, obalena alobalem a přenesena do lednice do 5 °C. Takto byla semena stratifikována po dobu 3 dnů.

### 3.3.2 Výsev semen

Další práce pak probíhala v laminárním boxu (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Fisher Scientific, USA). Z mikrozkušky se semeny byla pomocí automatické pipety odebrána voda a následně byl přidán 1 ml roztoku NaClO obsahující 1,5 % aktivního chloru (přípravek Savo zředěný na požadovanou koncentraci) a semena byla ponechána 25 minut sterilizovat. Následně byl roztok NaClO odstraněn pomocí automatické pipety a semena byla 6x promyta sterilní dH<sub>2</sub>O. Nakonec byla mikrozkuška se semeny naplněna sterilní dH<sub>2</sub>O.

Výsev probíhal pomocí automatické pipety se sterilní špičkou seříznutou pomocí sterilního skalpelu na požadovaný průměr výtokového otvoru. Takto byla semena přenášena z mikrozkušky se sterilní dH<sub>2</sub>O na povrch tuhého kultivačního agarového MS média ve sterilních plastových kulatých Petriho miskách (průměr 90 mm; 20 ml média na misku). Do jedné Petriho misky bylo umístěno přibližně 56 semen (8 řádků, 7 sloupců). Uzavřené misky byly posléze dvakrát oblepeny páskou z netkané textilie (Softpore, Česká republika), popsány a zabaleny v alobalu. Petriho misky se semeny byly následně vertikálně umístěny do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). V růstové komoře byla semena inkubována ve tmě po dobu 3 dnů a při teplotě 23 °C.

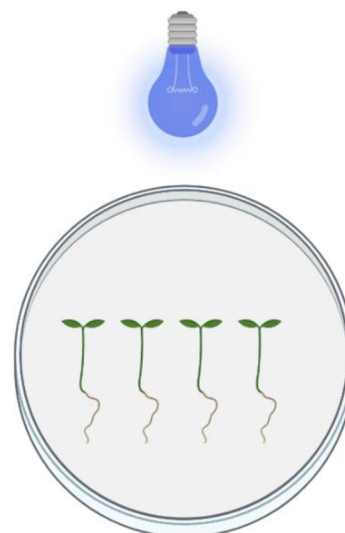
### 3.3.3 Transfer rostlin na médium s testovanými látkami

V laminárním boxu byly připraveny sterilní plastové kulaté Petriho misky (průměr 90 mm) s agarovým MS médiem (20 ml media na misku) s obsahem vybraných koncentrací abaminu (Olchemim, Česká republika, Cat. No. 207632) nebo NaCl. Médium s testovanými látkami bylo připraveno rozehrátím zásobního MS média v mikrovlnné troubě a následným smícháním se zásobními roztoky testovaných látek v Erlenmeyerově baňce za pomoci magnetické míchačky (Arex-6 Digital PRO, Velp Scientifica, Itálie) (Tab. 1). Abamin v zásobním roztoku byl rozpuštěn pomocí dimethylsulfoxidu (DMSO), který může mít při vyšších koncentracích sám o sobě inhibiční účinky na růst rostlin (Zhang et al., 2016; Foltýnová & Fellner 2017, nepublikované výsledky). V růstových experimentech výsledná koncentrace DMSO v médiu nepřesáhla 0,2 %<sub>(v/v)</sub>.

**Tab. 1.** Objemy zásobních roztoků testovaných látek přidávané k 20 ml MS média (1 Petriho miska) při testování abaminu a NaCl.

| látká  | koncentrace zásobního roztoku [mol l <sup>-1</sup> ] | požadovaná koncentrace v MS mediu | objem přidání k 20 ml media [ml] |
|--------|--|-----------------------------------|----------------------------------|
| NaCl   | 5  | 50 mmol l <sup>-1</sup>           | 0,2                              |
|        |  | 100 mmol l <sup>-1</sup>          | 0,4                              |
|        |  | 150 mmol l <sup>-1</sup>          | 0,6                              |
| abamin | 0,01   | 50 μmol l <sup>-1</sup>           | 0,1                              |
|        |  | 75 μmol l <sup>-1</sup>           | 0,15                             |
|        |  | 100 μmol l <sup>-1</sup>          | 0,2                              |

Petriho misky s naklíčenými semeny byly přeneseny do laminárního boxu a rostliny byly pomocí sterilní pinzety přenášeny na předem připravené MS médium s testovanými látkami v nových Petriho miskách. Celkově byly testovány 3 koncentrace NaCl, 3 koncentrace abaminu a kontrola, a to pod modrým světlem, červeným světlem i na tmě. Na každou podmínku při daném typu světla připadala jedna miska. Množství rostlin na jednu misku se odvíjelo od jejich klíčivosti, ale vždy to byly minimálně 3 rostliny. Rostliny byly na medium skládány vedle sebe tak, aby jejich hranice kořene a hypokotylu ležela v jedné přímce (Obr. 10). Misky byly následně uzavřeny, oblepeny páskou z netkané textilie (Softpore, Česká republika) a popsány. Rostlinám byla přidělena čísla a jednotlivým rostlinám byly pomocí pravítka změřeny hypokotyls s přesností na 1 mm. Misky s rostlinami pro testování na modrém a červeném světle byly umístěny do stojanů a misky s rostlinami pro testování ve tmě byly zabaleny do alobalu. Následně byly přeneseny do automatických růstových komor (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko), kde byly rostliny kultivovány ve vertikální poloze po dobu 7 dnů a při teplotě 23 °C. V růstových komorách byla zdrojem modrého světla zářivka TL-D 36W/18-Blue (Philips Company, Nizozemsko) s maximální intenzitou záření 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při vlnové délce 440 nm a zdrojem červeného světla byla zářivka TL-D 36W/15-Red (Philips Company, Nizozemsko) s maximální intenzitou záření 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při vlnové délce 660 nm.



**Obr. 10.** Rozložení rostlin na agarovém MS mediu v kulatých Petriho miskách při růstových experimentech.

Kromě 3 experimentů provedených podle výše popsaného schématu byl navíc proveden jeden kontrolní experiment, kde byla testována pouze jedna koncentrace NaCl ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ), jedna koncentrace abaminu ( $50 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ) a jejich společné působení. Zbylé parametry zůstaly nezměněny.

### 3.3.4 Měření rostlin a zpracování výsledků

Po 7 dnech kultivace byly rostliny v miskách přeneseny z růstových komor a pomocí pravítka byly rostlinám změřeny délky kořenů a hypokotylů s přesností na jeden milimetr. Zpracování výsledků a statistická analýza byly provedeny pomocí programů OriginPro 2022 (OriginLab corporation, USA) a Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, USA). Z provedených experimentů byly získány absolutní hodnoty délky kořene a hypokotylu a přírůstek hypokotylu pro sedmidenní kultivaci na testovaných podmínkách i s vypočtenou procentuální inhibicí a jejich průměrnými hodnotami. Statistická analýza byla provedena pomocí studentova t-testu a jednofaktorového ANOVA testu.

## 3.4 Fototropické experimenty

### 3.4.1 Výsev semen

Pro účely testování fototropických reakcí nebyla nutná stratifikace, jelikož klíčení probíhalo pod modrým světlem, při kterém je klíčivost *Arabidopsis* obecně vyšší. Klíčení pod modrým světlem ve fototropických experimentech má význam z důvodu separace reakcí fototropismu od fotomorfogeneze indukované modrým světlem, které se mohou překrývat při testování fototropismu na etiolovaných rostlinách.

Do sterilní mikrozkušavky bylo naváženo potřebné množství semen podle přepočtu uvedeného v kapitole 3.3.1 (celkové množství vysévaných rostlin se velmi lišilo mezi jednotlivými experimenty z důvodu optimalizování návaznosti dalších analýz; viz výsledky). Stejným způsobem jako v kapitole 3.3.2 byla následně semena sterilizována a vyseta na tuhé agarové MS médium ve sterilních plastových kulatých Petriho miskách (průměr 90 mm, 56 semen / miska). Misky byly následně zalepeny páskou z netkané textilie (Softpore, ČR), popsány a vertikálně umístěny do stojánků, které byly přeneseny do růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). V růstové komoře byla semena ponechána klíčit po dobu 3 dnů při teplotě  $23 \text{ } ^\circ\text{C}$  pod modrým světlem. Zdrojem modrého světla byla zářivka TL-D 36W/18-Blue (Philips Company, Nizozemsko) s maximální intenzitou záření  $10 \text{ } \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  při vlnové délce 440 nm.

Po 3 dnech kultivace semen pod modrým světlem byly misky s vyklíčenými semeny přeneseny do automatické růstové komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) se světlem červeným. Zdrojem světla byla zářivka TL-D 36W/15-Red (Philips Company, Nizozemsko) s maximální intenzitou záření  $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při vlnové délce 660 nm. V růstové komoře s červeným světlem byly misky s rostlinami ponechány 4 dny při teplotě 23 °C.

### 3.4.2 Transfer rostlin na médium s testovanými látkami

V laminárním boxu byly připraveny sterilní plastové velké čtvercové Petriho misky (120 x 120 mm) s agarovým MS médiem s obsahem testovaných látek (60 ml media na misku). To bylo připraveno rozehrátím zásobního MS média v mikrovlnné troubě a následným smícháním se zásobními roztoky testovaných látek v Erlenmeyerově baňce za pomoci magnetické míchačky (Arex-6 Digital PRO, Velp Scientifica, Itálie).

V prvních 6 experimentech byly testovány různé koncentrace abaminu, jedna koncentrace NaCl ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ), společné působení dané koncentrace abaminu a NaCl a účinek DMSO (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. D4540-100) o koncentraci odpovídající jeho množství v médiu s abaminem (Tab. 2). DMSO byl testován v několika experimentech pro kontrolu jeho možných inhibičních účinků, jelikož bylo obsaženo v zásobních roztocích abaminu. Zásobních roztoků abaminu bylo připraveno více s různými koncentracemi DMSO.

V následujících 5 experimentech byla testována jedna koncentrace fluridonu (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. 59756-60-4), jedna koncentrace NaCl, společné působení dané koncentrace fluridonu a NaCl a jedna koncentrace exogenní ABA (Alfa Aesar, Německo, Cat. No. 10166026) (Tab. 3). Dané koncentrace NaCl a fluridonu byly vybrány na základě výsledků v bakalářské práci od Hřivňacký (2020) a koncentrace ABA byla zvolena na základě výsledků předchozích prací (Fellner, nepublikované výsledky; Lorrai et al., 2018).



**Tab. 2.** Objemy zásobních roztoků testovaných látek přidávané k 60 ml MS media (1 velká čtvercová Petriho miska) při experimentech s abaminem, NaCl a DMSO.

| látka                             | koncentrace zásobního roztoku [mol l <sup>-1</sup> ] | požadovaná koncentrace   | výsledná koncentrace DMSO [% <sub>(v/v)</sub> ] | objem přidávaný k 60 ml media [ml] |
|-----------------------------------|--|--------------------------|---|------------------------------------|
| NaCl                              | 5  | 100 mmol l <sup>-1</sup> |   | 1,2                                |
| abamin                            | 0,01 (7 % <sub>(v/v)</sub> DMSO)                     | 50 μmol l <sup>-1</sup>  | 0,035   | 0,3                                |
|                                   |  | 150 μmol l <sup>-1</sup> | 0,105   | 0,9                                |
|                                   | 0,01 (20 % <sub>(v/v)</sub> DMSO)                    | 25 μmol l <sup>-1</sup>  | 0,05  | 0,15                               |
|                                   |  | 50 μmol l <sup>-1</sup>  | 0,1   | 0,3                                |
|                                   |  | 100 μmol l <sup>-1</sup> | 0,2   | 0,6                                |
|                                   |  | 150 μmol l <sup>-1</sup> | 0,3   | 0,9                                |
|                                   | 200 μmol l <sup>-1</sup>                             | 0,4                      | 1,2   |                                    |
| 0,01 (99 % <sub>(v/v)</sub> DMSO) | 100 μmol l <sup>-1</sup>                             | 1                        | 0,6   |                                    |
| DMSO                              | 99 % <sub>(v/v)</sub>                                |                          | 0,05  | 0,03                               |
|                                   |  |                          | 0,1   | 0,06                               |
|                                   |  |                          | 0,2   | 0,12                               |
|                                   |  |                          | 0,3   | 0,18                               |
|                                   |  |                          | 0,4   | 0,24                               |

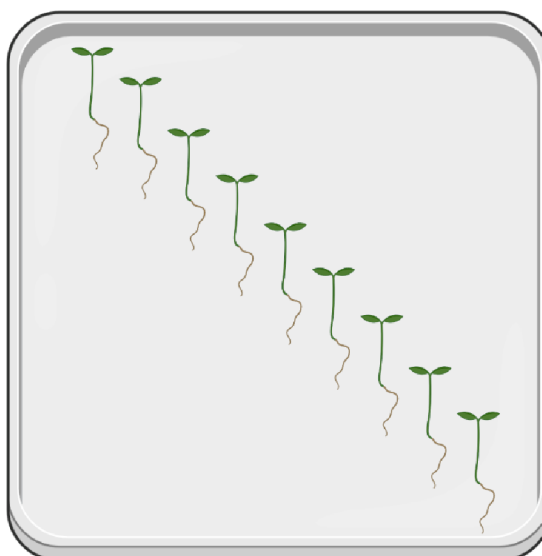
**Tab. 3.** Objemy zásobních roztoků testovaných látek přidávané k 60 ml MS media (1 velká čtvercová Petriho miska) při experimentech s fluridonem, NaCl a ABA.

| látka    | koncentrace zásobního roztoku [mol l <sup>-1</sup> ] | požadovaná koncentrace   | objem přidávaný k 60 ml media [ml] |
|----------|--|--------------------------|------------------------------------|
| NaCl     | 5  | 100 mmol l <sup>-1</sup> | 1,2                                |
| fluridon | 0,1  | 30 μmol l <sup>-1</sup>  | 0,018                              |
| ABA      | 0,01   | 5 μmol l <sup>-1</sup>   | 0,03                               |

Petriho misky s rostlinami kultivovanými pod červeným světlem byly přeneseny do laminárního boxu. Rostliny byly pomocí sterilní pinzety přeneseny na médium do velkých čtvercových Petriho misek. Na médium byly rostliny pokládány rovnoběžně svými hypokotylly a podle uhlopříčky od levého dolního k pravému hornímu rohu, tak aby při ozáření zleva žádná z rostlin nestínila kotyledony a horní třetinu hypokotylu rostliny následující (Obr. 11). Na základě zkušeností z bakalářské práce Hřivňacký (2020), bylo původně na misku pokládáno 8 rostlin. V pozdějších experimentech s testováním fluridonu se z důvodu lepší návaznosti dalších analýz zvýšil počet rostlin v misce na 9 a dále až na 10 (statisticky ověřeno, viz Přílohy). Stejně jako počet rostlin na misku, se kvůli potřebě většího množství rostlin v dalších analýzách měnil i počet misek s jednotlivými podmínkami.

Místo původních dvou misek na podmínku tak bylo v některých experimentech připraveno 10 a v dalších 20 misek s danou testovanou látkou.

Misky s přenesenými rostlinami byly následně uzavřeny, zalepeny z ozářené strany parafilmem (PM-996, Amcor, USA) a po zbylých třech stranách oblepeny páskou z netkané textilie



**Obr. 11. Rozložení rostlin na agarovém MS médiu v hranatých Petriho miskách při fototropických experimentech.**

(Softpore, Česká republika). Misky byly poté popsány a rostliny očíslovány. Pro získání výsledků s větší přesností nebyly v tomto typu experimentů rostliny měřeny pravítkem, ale celé misky byly vyfoceny digitálním fotoaparátem se stativem a jednotlivé parametry rostlin měřeny až z fotografií v počítači pomocí programu ImageJ/Fiji (National Institute of Health, USA) (viz kapitola 3.4.3). Misky s rostlinami byly poté vertikálně umístěny do stojanů v zatemněné místnosti. Zde byly po dobu 24 h vystaveny jednosměrnému horizontálnímu modrému světlu při 23 °C. Jako zdroj jednosměrného horizontálního modrého světla byl použit pás modře svítících LED diod. Světelné spektrum těchto LED diod bylo změřeno prof. RNDr. Janem Naušem, CSc. (Katedra biofyziky, PŘF UPOL) v oblasti vlnových délek 326 až 790 nm a maximální kvantum ozáření bylo zjištěno při 460 nm a vypočítaná celková ozáření byla stanovena jako  $0,55 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

### 3.4.3 Měření a zpracování výsledků

Po 24 hodinách na jednosměrném horizontálním modrém světle a testovaných látkách byly rostliny v miskách přeneseny pod digitální fotoaparát se stativem a vyfoceny s přisvětlením bílým světlem s maximální intenzitou osvětlení  $40 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , kdy focení jedné misky trvalo přibližně 10 s. V případě, že následovala sklizeň rostlinného materiálu pro účely dalších analýz (HPLC a qPCR) (Obr. 12), tak byly misky po vyfotografování umístěny zpátky do stojanů a ponechány dalších 30 minut při jednosměrném horizontálním modrém světle, při kterém probíhala i následná sklizeň (viz 3.4.4).

Ze získaných fotografií byly následně v počítači pomocí programu ImageJ/Fiji (National Institute of Health, USA), změřeny délky hypokotyly před a po 24h kultivaci a úhel fototropického ohybu hypokotyly po 24h kultivaci. Zpracování výsledků a statistická analýza

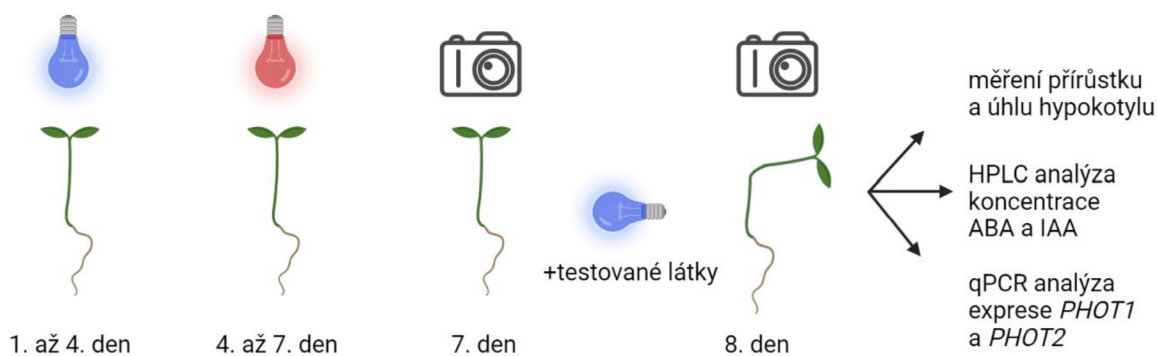
byly provedeny pomocí programů OriginPro 2022 (OriginLab corporation, USA) a Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, USA). Z provedených experimentů byly získány hodnoty přírůstku a fototropického úhlu hypokotyly po 24h kultivaci na testovaných podmínkách i s vypočtenou procentuální inhibicí a jejich průměrnými hodnotami. Pro ověření míry lineární závislosti fototropického ohybu a prodlužování hypokotyly byla provedena Pearsonova korelační analýza mezi průměrným přírůstkem a průměrným fototropickým ohybem hypokotyly. Pro zjištění účinků jednotlivých látek na sledované parametry byla provedena statistická analýza pomocí studentova t-testu a jednofaktorového ANOVA testu.

#### 3.4.4 Sklizeň, homogenizace a rozvažování vzorků

Po vyfotografování a dalších 30 minutách v původní poloze při jednosměrném horizontálním modrém světle byly misky otevřeny pomocí sterilního skalpelu a s pomocí sterilních nůžek byly rostlinám odděleny analyzované části od zbytku těla. Ve dvou experimentech tak byly rostlinám oddělovány kořeny i kotyledony a k dalším analýzám byly používány pouze hypokotyly. Z důvodu velmi nízkých koncentrací RNA v hypokotylech, nedostatečných pro analýzu genové exprese pomocí qPCR, byly ve zbylých 3 experimentech sklizeny celé nadzemní části, tedy hypokotyly i s kotyledony (viz Výsledky, Diskuze).

Sklizené části rostlin byly poté pomocí sterilní pinzety přeneseny do předem zvážené sterilní plastové 2ml mikrozkušavky. Z rostlin ovlivněných stejnou látkou byly vytvořeny směsné vzorky do dvou mikrozkušavek, kdy do jedné bylo naváženo cca 100 až 150 mg pro účely qPCR analýzy a do druhé bylo umístěno zbylé množství pro účely HPLC analýzy. Váha rostlinného materiálu v obou mikrozkušavkách byla zaznamenána a mikrozkušavky byly řádně popsány. Rostlinný materiál v mikrozkušavkách byl následně zmrazen v tekutém dusíku a poté uložen do mrazicího boxu při teplotě -80 °C.

Rostlinný materiál byl homogenizován ve sterilní vychlazené třecí misce s tloučkem při teplotě -196 °C za pomoci tekutého dusíku. Práce probíhala rychle, aby nedošlo k roztání a znehodnocení vzorků. Materiál byl rozdrcen na jemný prášek a pomocí sterilní, vychlazené špachtle přenesen do popsaných a předem zvážených 2ml plastových mikrozkušavek. V případě rostlinného materiálu pro qPCR analýzu, který byl již při sklizni navážen na dostatečnou hmotnost, bylo celé množství homogenizovaného materiálu přeneseno do nové mikrozkušavky a znovu zváženo pomocí analytických vah. V případě materiálu pro HPLC analýzu byl homogenizovaný materiál přenesen do 4 nových mikrozkušavek a do každé bylo pomocí analytických vah naváženo 5 až 10 mg vzorku. Materiál v mikrozkušavkách byl opět zmrazen v tekutém dusíku a uložen do mrazicího boxu při teplotě -80 °C.



**Obr. 12. Schéma průběhu fototropického experimentu s následnými analýzami.**

## 3.5 Analýza endogenní ABA a IAA

### 3.5.1 Extrakce a purifikace ABA a IAA

Mikrozkumavky s homogenizovanými vzorky byly umístěny do stolního chladicího boxu. Ke každému vzorku byl pomocí automatické pipety přidán 1 ml chlazeného 10%<sub>(v/v)</sub> vodného roztoku methanolu (MeOH) a 10 µl isotopicky značeného interního standardu (IS) s obsahem [<sup>13</sup>C<sub>6</sub>]-IAA a [<sup>2</sup>H<sub>6</sub>]-ABA o koncentracích 10<sup>-6</sup> mol l<sup>-1</sup> (Olchemim, Česká republika). Do tří mikrozkumavek bez vzorků byl také přidán 1 ml 10%<sub>(v/v)</sub> MeOH s 10 µl IS a do jedné zkumavky pouze 1 ml 10%<sub>(v/v)</sub> MeOH – obsahy těchto zkumavek sloužily jako pozitivní a negativní kontrola. Do každé zkumavky byly dále přidány čtyři 2mm kuličky z oxidu zirkoničitého stabilizovaného cerem (Retsch GmbH & Co. KG, Německo) a následně byly vzorky homogenizovány ve vychlazeném vibračním mlýnku (MM 400, Retsch GmbH & Co. KG, Německo) po dobu 5 minut při frekvenci 27 Hz. Dále byly zkumavky se vzorky na 3 minuty přeneseny do vychlazené ultrazvukové lázně (Sonorex, Bandelin electronic GmbH & Co. KG, Německo) a následně byly vzorky promíchávány na chlazeném laboratorním rotátoru (Stuart SB3, Bibby Scientific Limited, UK) po dobu 30 minut při otáčkách 15 rpm. Z rotátoru byly zkumavky se vzorky přeneseny do vychlazené centrifugy (Alegra 64R, Beckman Coulter, USA) a centrifugovány 15 minut při 20 000 rpm.

Následovalo přečištění vzorků pomocí extrakce na pevné fázi (SPE). Kolonky s reverzní fází (Oasis HLB1 cc Vac Cartridge, 30 mg sorbentu, objem 1 ml, Waters, USA) byly nasazeny na vakuové zařízení (Visiprep 24, Supelco, USA) a aktivovány postupným přidáním dvakrát 1 ml 100% MeOH a 1 ml dH<sub>2</sub>O pomocí automatické pipety. Následně byl na kolonky přenesen supernatant z centrifugovaných vzorků. Poté byly kolonky promyty 1 ml 10%<sub>(v/v)</sub> vodného roztoku MeOH. Pod kolonky pak byly umístěny skleněné zkumavky a byla provedena eluce zachycených látek pomocí třikrát 1 ml 80%<sub>(v/v)</sub> vodného roztoku MeOH. Eluát byl poté za sucha odpařen ve vakuové odparce při 40 °C (CentriVap Concentrator, Labconco, USA) a následně skladován v mrazicím boxu při -20 °C.

### 3.5.2 HPLC-ESI-MS/MS analýza ABA a IAA

Odpařené vzorky byly rozpouštěny ve 40  $\mu\text{l}$  20%<sub>(v/v)</sub> vodného roztoku acetonitrilu. Po promíchání na vortexu (Wizard vortex, Velp Scientifica, Itálie) byly zkumavky se vzorky na 5 minut umístěny do ultrazvukové lázně (Transsonic 310, Elma Schmidbauer GmbH, Německo) a znovu promíchány na vortexu. Následně byl celý objem přenesen automatickou pipetou na filtrační kolonky se sběrnými zkumavkami (NanoSpin 0,2  $\mu\text{m}$ , Ciro Manufacturing Corporation, USA) a centrifugovány 5 minut při 8000 rpm a 24 °C (Micro Star 12, VWR, USA). Přefiltrované vzorky byly pomocí automatické pipety přeneseny do mikroinžertů (0,1 ml, 5,7 x 29 mm), které byly umístěny do skleněných vialek a uzavřeny víčkem. Takto byly vzorky připraveny na samotnou HPLC analýzu koncentrace endogenní IAA a ABA. Ta byla provedena PharmDr. Jitkou Šírokovou, Ph.D. podle modifikované metody publikované ve Floková et al. (2014).

HPLC analýza byla prováděna na přístroji Agilent 1290 Infinity LC systém (Agilent technologies, Německo) ve spojení s tandemovou hmotnostní spektroskopií (MS/MS) na trojitém kvadrupólu pomocí přístroje Agilent 6490 Triple Quadrupole systém (Agilent technologies, Německo). Hmotnostní spektrometr byl vybaven elektrosprejovou ionizací (ESI). Vzorky byly umístěny do autosampleru chlazeného na 4 °C a postupně injektovány po 10  $\mu\text{l}$  do reverzní HPLC kolony (Kinetex Evo C18; 2,1 x 150 mm, 2,6  $\mu\text{m}$ , Phenomenex, USA). Jako mobilní fáze byly použity vodný roztok kyseliny mravenčí o koncentraci 10 mmol l<sup>-1</sup> a 100% MeOH při průtokové rychlosti 0,3 ml min<sup>-1</sup> a teplotě 60 °C. Gradientová eluce započala ve 2 minutě při 20 %<sub>(v/v)</sub> MeOH a skončila po 13,5 minutách při 90 %<sub>(v/v)</sub> MeOH. Během následujících 30 s byla koncentrace MeOH zvýšena na 100 % a kolona byla takto promývána po dobu 1 minuty. Během dalších 30 s byla koncentrace MeOH snížena na původních 20 %<sub>(v/v)</sub> a kolona byla ekvilibrována po dobu 3,5 minut. Následovala analýza dalších vzorků.

Následná hmotnostní spektrometrie byla prováděna v režimu multiple reaction monitoring (MRM) za pomoci simultánní ionizace elektrosprejem v pozitivním i negativním módu. Nastavení hmotnostní spektrometrie, MRM přechody a kolizní energie byly optimalizovány pomocí standardů. Napětí na trysce bylo nastaveno na 0 V, napětí na kapiláře bylo 2800 V pro pozitivní mód a 3000 V pro negativní mód. Teplota sušícího plynu byla 130 °C a jeho průtok 14 l min<sup>-1</sup> a teplota krycího plynu byla 400 °C a jeho průtok 12 l min<sup>-1</sup>. Parametry kvantifikace IAA a ABA viz Tab. 4.

**Tab. 4.** Parametry kvantifikace IAA a ABA pomocí MS/MS v MRM módu.

| analyt | MRM přechod | kolizní energie [eV] | skenovací mód | interní standard                     |
|--------|-------------|----------------------|---------------|--------------------------------------|
| IAA    | 176,1—130,1 | 24                   | +             | [ <sup>13</sup> C <sub>6</sub> ]-IAA |
| ABA    | 263,2—153,1 | 8                    | -             | [ <sup>2</sup> H <sub>6</sub> ]-ABA  |

Všechna data byla zpracována pomocí programu MassHunter Quantitative software (verze B.09.00, Agilent technologies, Německo). Výsledkem analýzy byly hodnoty koncentrace ABA a IAA v pmol na gram čerstvé hmoty (pmol g<sup>-1</sup><sub>FW</sub>). Následná statistická analýza jednotlivých experimentů byla provedena pomocí programů OriginPro 2022 (OriginLab corporation, USA) a Microsoft Excel 2019 (Microsoft Corporation, USA).

### 3.6 Analýza exprese *PHOT1* a *PHOT2*

#### 3.6.1 Extrakce a izolace RNA

Postup sklizení a homogenizace vzorků pro qPCR analýzu popsán v kapitole 3.4.4. Celková RNA byla z homogenizovaných vzorků izolována s pomocí kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, UK, Cat. No. BIO-52 077). Mikrozkušavky obsahující zmražené homogenizované vzorky byly přeneseny do digestoře, kde bylo před jejich rozmrznutím do každého vzorku pomocí automatické pipety přidáno 350 µl lyzačního pufru RLY (Lysis buffer), který je součástí kitu a 3,5 µl β-merkptoethanolu (Sigma-Aldrich, USA, Cat. No. M3148-100ML). Následně byly vzorky za pokojové teploty promíchány pomocí vortexu (Wizard vortex, Velp Scientifica, Itálie) a centrifugovány 5 minut při 13 000 rpm a 24 °C (otáčky a teplota se po zbytek této části postupu neměnily) (MIKRO 200, Hettich, Německo). Následně byl pomocí automatické pipety supernatant přenesen na filtrační kolonky se sběrnými zkumavkami ISOLATE II Filter, které jsou součástí kitu a kolonky byly i s nasazenými sběrnými zkumavkami centrifugovány 2 minuty. Poté byl filtrát ze sběrných zkumavek přenesen automatickou pipetou do 1,5ml mikrozkušavek, kde byl smíchán s 350 µl 70%<sub>(v/v)</sub> ethanolu (EtOH). Přefiltrované vzorky smíchané se 70%<sub>(v/v)</sub> EtOH byly posléze promíchány na vortexu a přeneseny do druhého typu filtračních kolonek z kitu ISOLATE II RNA Plant Column. Kolonky i s novými sběrnými zkumavkami byly následně 3 minuty centrifugovány. Poté byly kolonky s RNA zachycenou na filtru přeneseny na nové sběrné zkumavky a na filtr kolonek bylo automatickou pipetou přidáno 350 µl pufru MEM (Membrane Desalting Buffer), který je součástí kitu a poté byly kolonky i s novými vzorky umístěny do centrifugy na 2 minuty. Obsah sběrných zkumavek byl následně vylit do odpadu a sběrné zkumavky byly vráceny pod stejné kolonky.

Dále již práce pokračovala mimo digestoř. Na filtr kolonek bylo automatickou pipetou přidáno 100 µl z reakční směsi s DNase I z kitu (Tab. 5), která štěpí DNA ve vzorku. Vzorky s reakční směsí byly takto inkubovány 15 minut při pokojové teplotě. Následně bylo ke vzorkům pomocí automatické pipety přidáno 200 µl promývacího roztoku Wash Buffer RW1, který je součástí kitu, a kterým se inaktivuje DNase I. Kolonky se vzorky byly centrifugovány 1 minutu a pak byly přeneseny na nové sběrné zkumavky. Do kolonky bylo přidáno 600 µl promývacího roztoku Wash Buffer RW2 z kitu, který z filtru kolonky odstraňuje proteiny. Po 1 minutě centrifugování byl obsah sběrných zkumavek vylit do odpadu a sběrné zkumavky byly navraceny pod stejné kolonky, do kterých bylo přidáno 250 µl Wash Buffer RW2 s následným centrifugováním na 1 minutu. Poté byly kolonky ještě jednou promyty 250 µl Wash Buffer RW2 a centrifugovány po dobu 2 minut. Následně byly kolonky přeneseny na nové 1,5ml mikrozkušavky pro eluci RNA pomocí RNase-free H<sub>2</sub>O, která je součástí kitu. Vzorky byly nejprve 5 minut inkubovány v RNase-free H<sub>2</sub>O při pokojové teplotě a následně 1 minutu centrifugovány. Obsah sběrné zkumavky byl následně přenesen pomocí automatické pipety zpátky na filtr kolonky a po 5 minutách inkubace byl vzorek 1 minutu centrifugován. Tímto způsobem bylo získáno 40 µl celkové RNA z každého vzorku.

**Tab. 5.** Reakční směs pro DNase I.

| látka                                  | objem pro 1 vzorek [µl] |
|--|-------------------------|
| RDN (Reaction Buffer for DNase I)      | 90                      |
| Rnase-free DNase I (deoxyribonukleasa) | 10                      |
| celkem                                 | 100                     |

### 3.6.2 Přečištění izolované RNA

Přečištění RNA se provádělo ihned po izolaci. Na ledu byla připravena reakční směs s rekombinantní DNase I a puřem 10x DNase I buffer (společné balení, Takara Bio, Japonsko, Cat. No. 2270A) a inhibitorem ribonukleas Recombinant Ribonuclease Inhibitor (RRI, Takara Bio, Japonsko Cat. No. 2313A) (Tab. 6). Na ledu bylo z reakční směsi přidáno 10 µl do mikrozkušavky ke každému vzorku. Vzorky s reakční směsí byly promíchány pomocí automatické pipety a stočeny na stolní centrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA). Následně byly mikrozkušavky se vzorky umístěny do předehřátého termostatu (Bio TBD-100, Biosan, Litva), kde byly ohřívány na teplotu 37 °C po dobu 1 hodiny. Vzorky byly poté přeneseny na led a do každého byly přidány 2 µl kyseliny ethylendiamintetraoctové (EDTA). Následně byly mikrozkušavky se vzorky opět umístěny do předehřátého termostatu, tentokrát ale nastaveného na teplotu 80 °C a čas 2 minuty. Po této době byly vzorky opět přeneseny na led a do každého bylo přidáno 48 µl dH<sub>2</sub>O,

10  $\mu\text{l}$  octanu sodného o koncentraci  $3 \text{ mol l}^{-1}$ , 250  $\mu\text{l}$  vychlazeného 96%<sub>(v/v)</sub> EtOH a nakonec 2  $\mu\text{l}$  glykogenu (Molecular Biology Grade, Thermo Fisher Scientific, USA, Cat. No. R0561). Vzorky byly promíchány proklepáním nebo automatickou pipetou, stočeny pomocí stolní centrifugy a následně umístěny do mrazicího boxu do teploty  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$  do následujícího dne.

**Tab. 6.** Reakční směs pro přečištění RNA.

| látko                              | objem pro 1 vzorek [ $\mu\text{l}$ ] |
|------------------------------------|--------------------------------------|
| 10x DNase I buffer                 | 4                                    |
| Recombinant DNase I                | 4                                    |
| Recombinant Ribonuclease Inhibitor | 0,5                                  |
| nuclease-free $\text{H}_2\text{O}$ | 1,5                                  |
| celkem                             | 10                                   |

Druhý den byly vzorky přeneseny na led a ponechány roztát. Následně byly centrifugovány 30 minut, při teplotě  $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$  a 13 000 rpm (stejná teplota a otáčky byly použity i ve zbytku této části) (MIKRO 200, Hettich, Německo). Supernatant byl odstraněn a ke každému vzorku bylo automatickou pipetou přidáno 500  $\mu\text{l}$  vychlazeného 70%<sub>(v/v)</sub> EtOH a vzorky byly 5 minut centrifugovány. Supernatant byl odstraněn a ke vzorkům bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  vychlazeného 90%<sub>(v/v)</sub> EtOH a vzorky byly znovu centrifugovány po dobu 5 minut. Po odstranění supernatantu byly zkumavky znovu centrifugovány se zbytky supernatantu po dobu 2 minut. Pomocí automatické pipety byl opatrně odstraněn zbytek supernatantu a zkumavky byly ponechány otevřené vyschnout na ubrousku po dobu minimálně 5 minut, tak aby se ze zkumavek odstranil veškerý EtOH. Zaschlý pelet na stěnách zkumavky byl posléze rozpuštěn v 15 až 20  $\mu\text{l}$  (podle předpokládaného množství RNA) RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ , která je součástí kitu. Vzorky RNA byly následně jemně promíchány poklepáním a stočeny na stolní centrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA). Následně byly vzorky umístěny na led. Pomocí mikroobjemového UV-VIS spektrofotometru (NanoDrop™ One/One c Thermo Fisher Scientific, USA) byla změřena koncentrace a čistota získané RNA. Následně byly vzorky umístěny do mrazicího boxu do  $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Pro kontrolu čistoty získané RNA byla provedena PCR s využitím primerů pro kontrolní gen *GAPDH* (*GLYCERALDEHYDE-3-PHOSPHATE DEHYDROGENASE*, East Port Praha, Česká republika) se sekvencemi forward primeru: 5'-ATCCATTTATTTCCACTGATTACA-3' a reverse primeru 5'-CATGGGAGCATCTTTGCT-3' (podle Czechowski et al., 2005). První byla do mikrozkušavky připravena reakční směs z DNA polymerasy My Taq Polymerase a pufru 5x My Taq Buffer (společné balení, Bionline, UK, Cat. No. BIO-21106), z primerů a z nuclease-free  $\text{H}_2\text{O}$  (Tab. 7). Termocyklér (C1000™ Thermal Cycler, BioRad



Laboratories, USA) byl nastaven na příslušný program (Tab. 8). Do 0,2ml mikrozkušavek bylo automatickou pipetou přidáno vždy 2  $\mu$ l daného vzorku RNA a 18  $\mu$ l reakční směsi. Do zkumavky s negativní kontrolou byly k reakční směsi místo vzorků přidány 2  $\mu$ l nuclease-free H<sub>2</sub>O a do zkumavky s pozitivní kontrolou byly k reakční směsi přidány 2  $\mu$ l kontrolního vzorku cDNA. Po promíchání pomocí automatické pipety a následném stočení na stolní centrifuze byly zkumavky se vzorky vloženy do termocykléru a byla provedena PCR. Výsledek byl následně zobrazen na agarosové elektroforéze.

**Tab. 7.** Reakční směs pro PCR přečištěné RNA.

| látko  | objem pro 1 vzorek [ $\mu$ l] |
|--|-------------------------------|
| 5x My Taq Buffer                                     | 4                             |
| forward primer GAPDH (10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) | 0,5                           |
| reverse primer GAPDH (10 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) | 0,5                           |
| nuclease-free H <sub>2</sub> O                       | 13                            |
| My Taq Polymerase                                    | 0,1                           |
| celkem   | 10                            |

**Tab. 8.** Program termocykléru pro PCR přečištěné RNA.

| teplota [ $^{\circ}$ C] | čas    |
|-------------------------|--------|
| 94                      | 3 min  |
| 94                      | 30 s   |
| 55                      | 30 s   |
| 72                      | 1 min  |
| 72                      | 5 min  |
| 4                       | const. |

40 cyklů

Agarosový gel byl připraven rozpuštěním 1,2 g agarosy (Invitrogen, USA, Cat. No. 16500-100) v 80 ml pufru 0,5x Tris-borát-EDTA (TBE) v Erlenmeyerově baňce pomocí mikrovlnné trouby. Po úplném rozpuštění agarosy v pufru a po zchlazení bylo přidáno ještě 5  $\mu$ l barviva 10000x GelRed (Nucleic Acid Stain, Biotium, USA, Cat. No. 41003). Tekutý gel byl následně přelit do nalévací vany s instalovaným hřebínkem a tuhnul přibližně 30 minut. Gel byl poté přenesen do elektroforetické komůrky, byl z něj odebrán hřebínek a byl zalit 0,5x TBE puftrem. Do zkumavek s produkty PCR bylo přidáno po 1  $\mu$ l nanášecího pufru (6x Loading Dye, Thermo Fisher Scientific, USA, Cat. No. R0611), stejně jako do zkumavek s pozitivní i s negativní kontrolou. Pomocí automatické pipety byly vzorky/kontroly

s nanášecím pufrům přeneseny do jamek v agarosovém gelu (celý objem). Do krajní jamky pak bylo pomocí automatické pipety nanášeno 6  $\mu\text{l}$  velikostního markeru (GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder, Thermo Fisher Scientific, USA, Cat. No. SM0322). Horizontální elektroforéza následně probíhala při konstantním napětí 80 V po dobu 45 minut. Výsledek elektroforézy byl vizualizován pomocí UV transiluminátoru InGenius3 a počítačového programu InGenius 3 Syngene Gel Documentation System (Syngene, Indie).

### 3.6.3 Syntéza cDNA

Pro syntézu cDNA z izolované RNA byl použit PrimeScript 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara Bio, Japonsko, Cat. No. 6110A). Byl připraven termocyklér na příslušný program (Tab. 9). Při práci na ledu byla v 1,5ml mikrozkušavce připravena reakční směs z deoxyribonukleosid trifosfátů (dNTP) z kitu o koncentraci 10  $\text{mmol l}^{-1}$  a oligo dT primeru z kitu o koncentraci 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Tab. 10). Reakční směs byla promíchána proklepáním a stočena na stolní centrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA). Podle koncentrace RNA ve vzorcích byl spočítán potřebný objem RNA a RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ , tak aby v jedné reakci byl 1  $\mu\text{g}$  RNA. Do 0,2ml mikrozkušavek byly pomocí automatické pipety přidány vypočtené objemy vzorků RNA a RNase-free  $\text{H}_2\text{O}$ , tak aby jejich společný objem ve zkumavce tvořil 8  $\mu\text{l}$ . Následně byly do každé zkumavky přidány 2  $\mu\text{l}$  reakční směsi. Obsahy zkumavek byly promíchány proklepáním a stočeny na stolní centrifuze. Po nachystání zkumavek se vzorky byly spuštěny termocyklér a po nahřátí víčka na 105  $^{\circ}\text{C}$  a nahřátí desky na 65  $^{\circ}\text{C}$  byl cyklus zastaven a do termocykléru byly vloženy mikrozkušavky. Cyklus byl spuštěn na 5 minut a po 5 minutách byl zastaven a vzorky byly opět umístěny na led. Poté byla připravena druhá reakční směs obsahující reversní transkriptasu PrimeScript Reverse Transcriptase, inhibitor RNas a pufr 5x Prime Script Buffer (vše z kitu) podle Tab. 11. Z nové reakční směsi bylo ke každému vzorku přidáno 10  $\mu\text{l}$ , obsahy zkumavek byly promíchány proklepáním a následně stočeny na stolní centrifuze. Dále byly zkumavky vloženy zpět do termocykléru a byl znovu spuštěn program na 75 minut. Poté byl program opět zastaven, vzorky byly umístěny do stojánků s ledem a ke každému vzorku bylo přidáno 0,5  $\mu\text{l}$  ribonukleasy RNasa H (Takara Bio, Japonsko, Cat. No. 2150A). Vzorky, nyní již s RNasou H byly navraceny do termocykléru a následovalo posledních 15 minut programu. Tímto bylo získáno 20  $\mu\text{l}$  cDNA. Ta byla ve zkumavkách uchována v mrazicím boxu při teplotě -20  $^{\circ}\text{C}$ . Koncentrace a kvalita získané cDNA byly posléze analyzovány pomocí mikroobjemového UV-VIS spektrofotometru (NanoDrop™ One/One c, Thermo Fisher Scientific, USA).

**Tab. 9.** Program termocykléru pro syntézu cDNA.

| teplota [°C] | čas    |
|--------------|--------|
| 65           | 5 min  |
| 42           | 60 min |
| 70           | 15 min |
| 37           | 15 min |
| 4            | const. |

**Tab. 10.** První reakční směs pro syntézu cDNA.

| látka   | objem pro 1 vzorek [ $\mu$ l] |
|---|-------------------------------|
| dNTP (10 mmol l <sup>-1</sup> )                 | 1                             |
| Oligo dT Primer (50 $\mu$ mol l <sup>-1</sup> ) | 1                             |
| celkem  | 2                             |

**Tab. 11.** Druhá reakční směs pro syntézu cDNA.

| látka                             | objem pro 1 vzorek [ $\mu$ l] |
|-----------------------------------|-------------------------------|
| nuclease-free H <sub>2</sub> O    | 4,5                           |
| 5x Prime Script Buffer            | 4                             |
| RNase Inhibitor                   | 0,5                           |
| PrimeScript Reverse Transcriptase | 1                             |
| celkem                            | 10,0                          |

### 3.6.4 Analýza exprese *PHOT1* a *PHOT2* pomocí qPCR

Samotná analýza exprese *PHOT1* a *PHOT2* vůči kontrolním tzv. housekeeping genům *UBC* (*UBIQUITIN CARRIER PROTEIN*) (Czechowski et al., 2005) a *EF1 $\alpha$*  (*ALPHA SUBUNIT OF THE ELONGATION FACTOR-1 COMPLEX*) (Shiota et al., 2006) byla provedena s drobnými úpravami podle Labuz et al., 2012. Primery studovaných genů i kontrolních housekeeping genů byly objednány u East Port Praha (Česká republika) na základě sekvencí uvedených v Labuz et al., 2012 (Tab. 12). Primery doručené v lyofilizovaném stavu byly podle látkového množství uvedeného na obalu výrobcem naředěny nuclease-free H<sub>2</sub>O na koncentraci 100  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>. Takto byl získán zásobní roztok, který byl následně promíchán na vortexu (Wizard vortex, Velp Scientifica, Itálie) a poté zředěn do nové mikrozkušavky pomocí nuclease-free H<sub>2</sub>O na pracovní roztok o koncentraci 10  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>. Pracovní i zásobní roztoky byly skladovány v mrazicím boxu při -20 °C.

**Tab. 12.** Sekvence primerů pro geny *PHOT1*, *PHOT2*, *UBC* a *EF1α*.

| gen          | primer   | sekvence 5'-3'           |
|--------------|----------|--------------------------|
| <i>PHOT1</i> | forward: | CACTGATCCTAGGCTTCCCG     |
|              | reverse: | GTGGTTAGATCAGTCTCTGGACC  |
| <i>PHOT2</i> | forward: | GCTACCACTCTTGAGCGCATAGAG |
|              | reverse: | CCTCGCGTGAATACTCTGTC     |
| <i>UBC</i>   | forward: | CTGCGACTCAGGGAATCTTCTAA  |
|              | reverse: | TTGTGCCATTGAATTGAACCC    |
| <i>EF1α</i>  | forward: | TGAGCACGCTCTTCTTGCTTTCA  |
|              | reverse: | GGTGGTGGCATCCATCTTGTTACA |

#### 3.6.4.1 Optimalizační experiment

Jelikož byly použité primery úspěšně optimalizovány již v práci Labuz et al. (2012), tak byla pro tyto experimenty jejich účinnost definována jako 100 %. Optimalizační experiment v této práci sloužil pouze pro ověření funkčnosti a specifity primerů a pro zvolení vhodného ředění analyzované cDNA. Byly provedeny dva optimalizační experimenty, ve kterých byly testovány ředící řady  $1/7$ ,  $1/14$ ,  $1/28$ ,  $1/56$  a  $1/2$ ,  $1/4$ ,  $1/8$ ,  $1/16$ .

Veškerá práce se vzorky probíhala na ledu. Do 1,5ml mikrozkušavek byly připraveny reakční směsi pro jednotlivé geny z příslušných primerů, nuclease-free H<sub>2</sub>O a fluorescenčního barviva SYBR Green (SensiFAST™ SYBR® No-ROX Kit, Bioline, UK, Cat. No. BIO-94005) (Tab. 13) a do 0,2ml mikrozkušavek byly pomocí automatické pipety připraveny ředící řady roztoků vzorku cDNA. Obsahy všech zkumavek byly promíchány proklepáním a stočeny na stolní centrifuze (D1008 Mini-Centrifuges, Scilogex, USA). Do 96 jamkové destičky (Bio-Rad Laboratories, USA) byly následně automatickou pipetou přidávány vzorky společně s reakční směsí, vždy 4 µl vzorku cDNA a 16 µl reakční směsi podle schématu na Obr. 13. Vzorky se na 96 jamkovou destičku nanášejí v triplicátech s tím, že výsledná odchylka mezi C<sub>t</sub> hodnotami nesmí přesáhnout 0,5. Kromě vzorků byly na 96 jamkovou destičku nanášeny také negativní kontroly (16 µl reakční směsi a 4 µl nuclease-free H<sub>2</sub>O). Na připravenou destičku byla následně přilepena průhledná folie. Vzorky byly dále stočeny pomocí speciální centrifugy na 96 jamkové destičky (PCR Plate Spinner, VWR, USA), proklepáním byly odstraněny bubliny z jednotlivých jamek a destička byla umístěna do termocykléru pro qPCR (CFX96™ Touch Real-Time PCR Detection Systém, Bio-Rad Laboratories, USA) s dopředu zvoleným programem (Tab. 14). Výsledky optimalizačního experimentu byly vyhodnoceny pomocí programu CFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA).

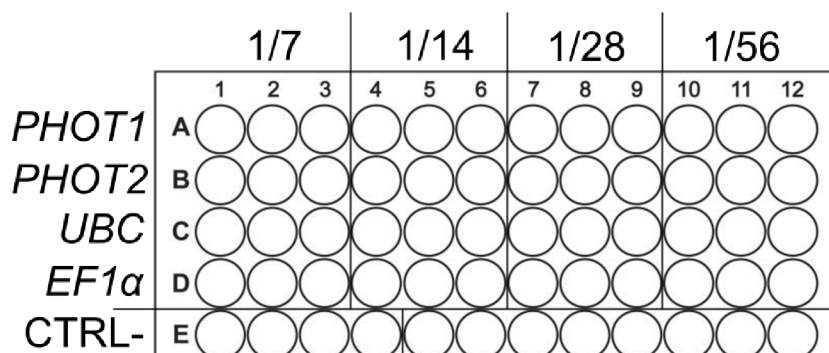
**Tab. 13.** Reakční směs s primery pro qPCR.

| látka   | 1 jamka [ $\mu$ l] |
|---|--------------------|
| SYBR Green  | 10                 |
| forward primer ( <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i> , <i>UBC</i> , <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) | 0,8                |
| reverse primer ( <i>PHOT1</i> , <i>PHOT2</i> , <i>UBC</i> , <i>EF1<math>\alpha</math></i> ) | 0,8                |
| nuclease-free H <sub>2</sub> O  | 4,4                |
| celkem  | 16                 |

**Tab. 14.** Program kvantitativní PCR pro optimalizaci primerů a studium exprese studovaných genů. \*V optimalizačním experimentu a v první analýze exprese studovaných genů byla v této části cyklu použita jednotná teplota 53,5 °C pro všechny geny – na základě odchylných hodnot křivky tání genu *UBC* v těchto experimentech byl v následujících experimentech gen *UBC* analyzován zvlášť při aplikaci 51 °C.

| teplota [°C] | čas    |
|--------------|--------|
| 95,0         | 10 min |
| 95,0         | 15 s   |
| 53,5 / 51 *  | 15 s   |
| 72,0         | 20 s   |
| 95,0         | 2 s    |

40 cyklů



**Obr. 13.** Schéma nanášení vzorků na 96 jamkovou destičku při optimalizačním experimentu. Nevyužitá část destičky není zobrazena. Stejně byly vzorky nanášeny i při testování ředící řady 1/2, 1/4, 1/8, 1/16.

### 3.6.4.2 Exprese studovaných genů pomocí qPCR

Následovala samotná analýza exprese studovaných genů pomocí qPCR. Z ředící řady v optimalizačním experimentu bylo zvoleno optimální ředění vzorků získané cDNA jako 1/4. Práce se vzorky opět probíhala na ledu. Pro jednotlivé geny byly do 1,5ml mikrozkmavek připraveny reakční směsi podle Tab. 13 a do 2ml mikrozkmavek byly pomocí nuclease-free H<sub>2</sub>O připraveny vzorky cDNA naředěné na 1/4. Po promíchání poklepáním a stočením reakčních směsí i vzorků pomocí stolní centrifugy (D1008 Mini-Centrifuges,

Scilogex, USA) byly do jamek 96 jamkové destičky přidány vždy 4 µl ředěného vzorku cDNA a 16 µl reakční směsi podle schématu na Obr. 14. Vzorky byly nanášeny na destičku v triplikátech (Obr. 14) a odchylka Ct hodnot v rámci triplikátu nesměla překročit 0,5. Ke každému studovanému genu byla na destičku připravena i negativní kontrola (16 µl reakční směsi + 4 µl nuclease-free H<sub>2</sub>O). Připravená 96 jamková destička byla přelepena průhlednou fólií, stočena na speciální centrifuze (PCR Plate Spinner, VWR, USA) a klepáním byly odstraněny bubliny v jednotlivých jamkách. Následně byla destička umístěna na termocykléru pro qPCR s programem použitým v optimalizačním experimentu (Tab. 14).

|          | <i>PHOT1</i> |   |   | <i>PHOT2</i> |   |   | <i>UBC</i> |   |   | <i>EF1α</i> |    |    |   |
|----------|--------------|---|---|--------------|---|---|------------|---|---|-------------|----|----|---|
|          | 1            | 2 | 3 | 4            | 5 | 6 | 7          | 8 | 9 | 10          | 11 | 12 |   |
| vzorek 1 | A            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |
| vzorek 2 | B            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |
| vzorek 3 | C            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |
| vzorek 4 | D            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |
| vzorek 5 | E            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |
| CTRL-    | F            | ○ | ○ | ○            | ○ | ○ | ○          | ○ | ○ | ○           | ○  | ○  | ○ |

**Obr. 14. Schéma nanášení vzorků na 96 jamkovou destičku při analýze exprese genů.** Nevyužitá část destičky není zobrazena. Gen *UBC* byl v pozdějších experimentech analyzován v samostatné destičce kvůli rozdílnému programu PCR (viz Tab. 14).

Po skončení programu byly pomocí počítačového programu SFX Maestro™ Software (Bio-Rad Laboratories, USA) získány výsledky Ct hodnot a křivek tání jednotlivých genů. Poté byly pomocí počítačových programů Origin (OriginPro 2022, OriginLab corporation, USA) a Excel (Microsoft Excel 2019, Microsoft Corporation, USA) vypočítány a statisticky zanalyzovány výsledky relativní exprese. Pro výpočet relativní exprese genů byl použit výpočet Rov. 1.

**Rov. 1. Výpočet relativní exprese z qPCR analýzy.** RE = relativní exprese, E = účinnost (definována u všech jako 1), Ct = průměrná hodnota Ct (cycle of threshold) ze 3 technických replikátů, target = cílový gen, reference = kontrolní gen, sample = vzorek s testovanou podmínkou, calibrator = kontrolní vzorek.

$$RE = (1 + E_{\text{target}})^{-\Delta Ct_{\text{target}}} / (1 + E_{\text{reference}})^{-\Delta Ct_{\text{reference}}}$$

$$\Delta Ct_{\text{target}} = Ct_{\text{target sample}} - Ct_{\text{target calibrator}}$$

$$\Delta Ct_{\text{reference}} = Ct_{\text{reference sample}} - Ct_{\text{reference calibrator}}$$

## 4 Výsledky

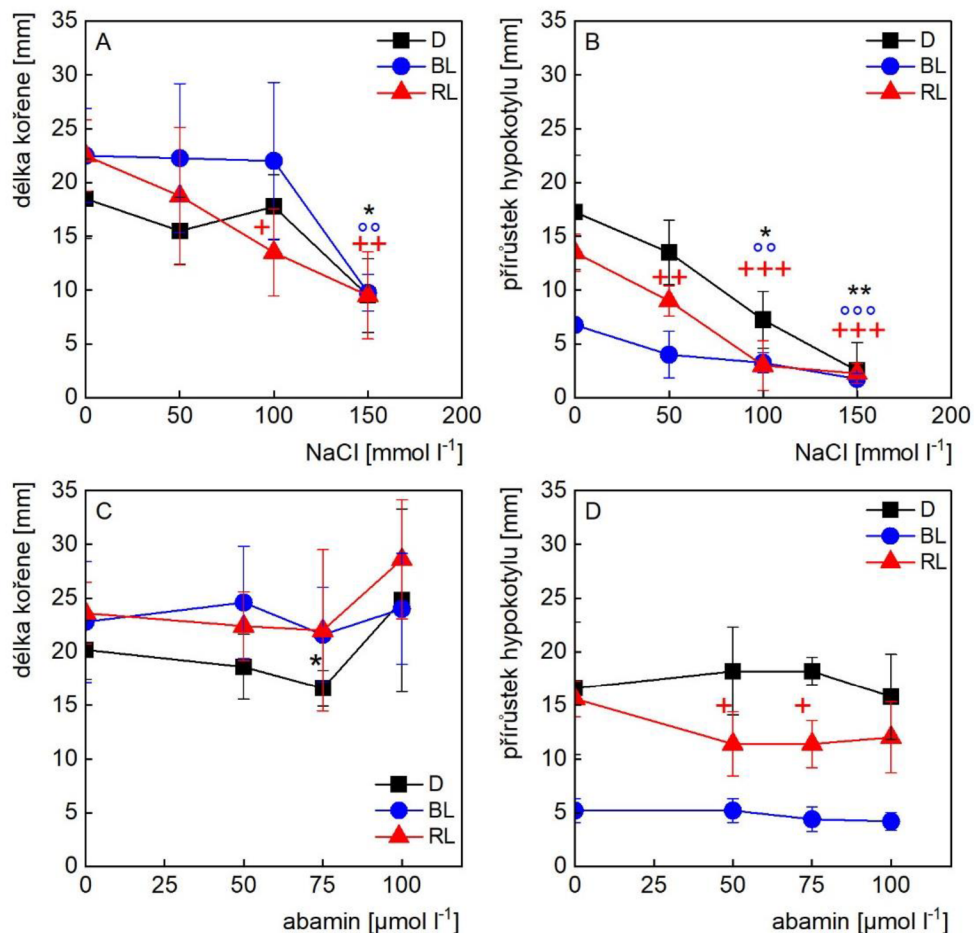
### 4.1 Růstové experimenty

Aby bylo možné testovat účinek inhibitoru biosyntézy ABA na fototropickou reakci hypokotylů, bylo nejprve nutné ověřit jakým způsobem abamin ovlivňuje běžný růst hypokotylů i kořene testovaných rostlin. V první části experimentů byl proto testován účinek abaminu o různých koncentracích (50, 75, 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) na růst hypokotylu a kořene ve tmě, na modrém světle a červeném světle. Zároveň byl kromě abaminu otestován také účinek různých koncentrací NaCl (50, 100, 150  $\text{mmol l}^{-1}$ ) a v samostatném experimentu také společné působení abaminu (50  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ) a NaCl (100  $\text{mmol l}^{-1}$ ).

Z důvodů nízké klíčivosti semen *gl-1* na tmě a s tím spojeným malým množstvím použitelných rostlin nebyly u všech 3 experimentů otestovány podmínky červeného světla nebo zasolení NaCl. Z technických důvodů nebyly v jednom experimentu získány hodnoty přírůstku hypokotylu po sedmidenní kultivaci, ale pouze absolutní hodnoty délky hypokotylu, které se na základě zkušeností z bakalářské práce Hřivňacký (2020) ukázaly jako méně průkazné.

Ve všech třech experimentech byl testován účinek abaminu na délku kořene a přírůstek/celkovou délku hypokotylu na modrém světle a ve tmě. V jednom z těchto experimentů byl naměřen statisticky průkazně nižší přírůstek hypokotylu po ovlivnění abaminem o koncentracích 50 a 75  $\mu\text{mol l}^{-1}$  na modrém světle, přičemž rostliny ve stejném experimentu na koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  již inhibici nevykazovaly (Příloha 1: Obr. 23). Ve zbylých experimentech nedošlo na modrém světle k žádnému statisticky průkaznému ovlivnění růstu kořene ani hypokotylu vlivem abaminu (Obr. 15 a Příloha 1: Obr. 23).

Ve tmě byla pouze v jednom ze tří experimentů naměřena statisticky významně nižší celková délka kořene, a to u rostlin ovlivněných abaminem o koncentraci 75  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (Obr. 15). Ve zbylých experimentech již ve tmě účinek abaminu na růst kořene nebo hypokotylu nebyl zaznamenán (Obr. 15. a Příloha 1: Obr. 23).



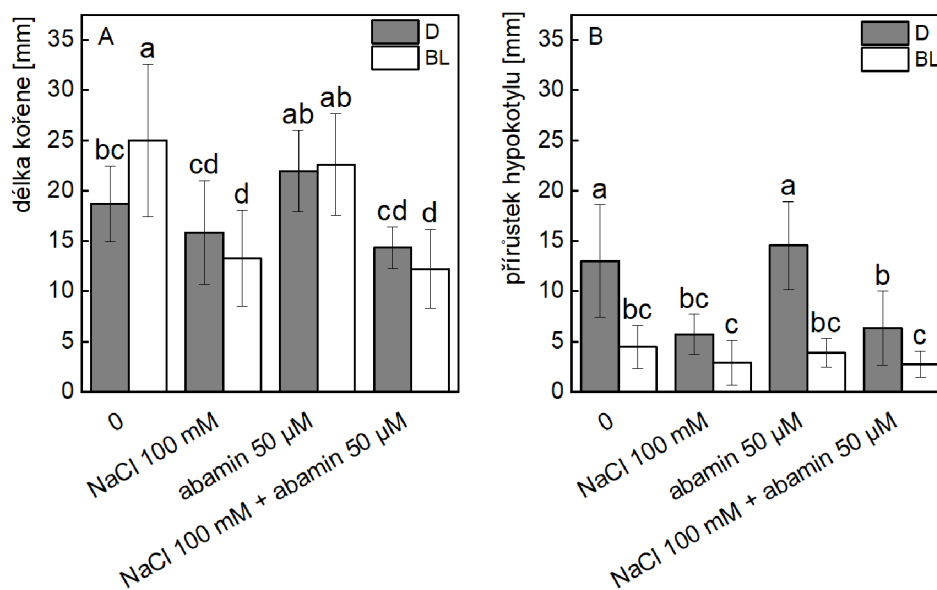
**Obr. 15. Délky kořenů [mm] (A, C) a přírůstků hypocotylů [mm] (B, D)** desetidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po sedmi dnech kultivace ve tmě (D), na modrém světle (BL) nebo červeném světle (RL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentracích 0, 50, 100 a 150 mmol l<sup>-1</sup> (A, B) nebo abaminu o koncentracích 0, 50, 75 a 100 μmol l<sup>-1</sup> (C, D). Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot reprezentativního experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 4–5 rostlin. Symboly \*, °, + značí statisticky významný rozdíl naměřených délek oproti kontrolním rostlinám bez ovlivnění testovanou látkou (p ≤ 0,05; \*\*, °°, ++ pro p ≤ 0,01; studentův t-test), kde \* značí statisticky významný rozdíl u rostlin kultivovaných ve D, ° u rostlin kultivovaných na BL a + u rostlin na RL.

Ve dvou provedených experimentech s testováním červeného světla nebylo prokázáno, že by měl abamin o testovaných koncentracích, při těchto podmínkách vliv na růst kořene (Obr. 15 a Příloha 1: Obr. 23). V jednom ze dvou provedených experimentů s červeným světlem byl ovšem pozorován inhibiční efekt abaminu o koncentracích 50 a 75 μmol l<sup>-1</sup> na přírůstek hypocotylu (Obr. 15).

Jediný experiment, ve kterém byly testovány účinky zasolení různými koncentracemi NaCl ukázal, že zasolení podle očekávání inhibovalo prodlužování kořene a hypocotylu, a to ve tmě, na modrém i červeném světle (Obr. 15). Míra inhibice se zvyšovala se zvyšující se koncentrací NaCl v médiu. Rostliny na modrém světle měly obecně kratší hypocotylu než rostliny na světle červeném nebo ve tmě a zasolení u nich způsobovalo nižší procentuální inhibici.



Ve čtvrtém růstovém experimentu, ve kterém byl jako v jediném testován také společný vliv abaminu ( $50 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) a NaCl ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) na délku kořene a přírůstek hypokotylu ve tmě a pod modrým světlem nebyl pozorován statisticky významný vliv abaminu na nezasolené rostliny (Obr. 16). Samotné zasolení NaCl mělo inhibiční účinek na růst kořene na modrém světle, ale ne ve tmě, a naopak inhibovalo růst hypokotylu ve tmě, ale ne na modrém světle (Obr. 16). Ve tmě ani na modrém světle u kořene ani hypokotylu nebyl pozorován statisticky významný rozdíl mezi rostlinami zasolenými NaCl a rostlinami zasolenými NaCl a zároveň ovlivněnými abaminem (Obr. 16).



**Obr. 16. Délky kořenů [mm] (A) a přírůstků hypokotylů [mm] (B) desetidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po sedmi dnech kultivace ve tmě (D) nebo na modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ , abaminu o koncentraci  $50 \mu\text{mol l}^{-1}$  nebo jejich kombinaci. Výsledky představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin reprezentativního experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 18 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřenými parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**

## 4.2 Fototropické experimenty

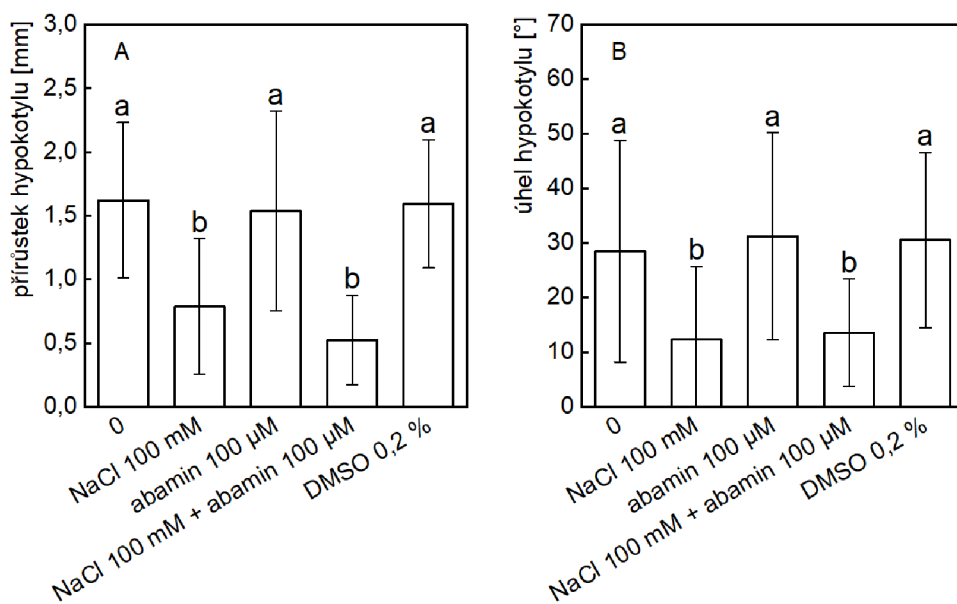
Samotný účinek ABA na fototropické reakce hypokotylu byl zkoumán ve fototropických experimentech. Fototropická reakce byla testována v podmínkách stresu zasolením NaCl, který indukuje akumulaci ABA, dále při aplikaci inhibitorů biosyntézy ABA a při exogenní aplikaci ABA.

### 4.2.1 Fototropické experimenty s testováním NaCl a abaminu

V 6 experimentech byl testován vliv inhibitoru syntézy ABA abaminu na prodlužování a fototropickou reakci hypokotylů při 24h kultivaci na jednosměrném horizontálním modrém

světla. V různých experimentech byl testován účinek různých koncentrací abaminu (25, 50, 100, 150, 200  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ). Zároveň byl testován i účinek NaCl o koncentraci 100  $\text{mmol l}^{-1}$  a společný účinek NaCl se všemi testovanými koncentracemi abaminu. Taktéž byl v některých experimentech testován účinek čistého DMSO (0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4  $\%_{(v/v)}$ ). Průměrný přírůstek kontrolních rostlin dosahoval přibližně 1,7 mm a průměrný úhel přibližně 34° (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25, 26, 27, 28).

Výsledek prvního z této série experimentů naznačoval, že DMSO obsažené v zásobních roztocích abaminu (viz Tab. 2) může vyrušovat účinek abaminu, jelikož zasolené rostliny na abaminu o koncentraci 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (0,035  $\%_{(v/v)}$  DMSO) měly průkazně větší fototropický ohyb než zasolené rostliny se stejnou koncentrací abaminu, ale s vyšší koncentrací DMSO (0,1  $\%_{(v/v)}$ ) (Příloha 2: Obr. 24). Z toho důvodu byl v následujících 3 experimentech testován také účinek čistého DMSO v MS médiu. V žádném z následujících experimentů se ovšem účinek DMSO na prodlužování či fototropický ohyb hypokotylu nepodařilo prokázat (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 25, 26).



**Obr. 17. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypokotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100  $\text{mmol l}^{-1}$ , abaminu o koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  s výslednou koncentrací DMSO 0,2  $\%_{(v/v)}$ , kombinace NaCl a abaminu (stejné koncentrace jako při samostatné aplikaci) nebo čistého 0,2  $\%_{(v/v)}$  DMSO. Výsledky představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin reprezentativního experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 16 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřenými parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**

Zasolení NaCl inhibovalo prodlužování hypokotylu, kdy tento jev byl statisticky významný v 5 ze 6 experimentů a průměrná inhibice byla 56 %. Stejně tak zasolení inhibovalo fototropický ohyb, a to statisticky významně ve všech 6 experimentech s průměrnou inhibicí 67 % (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25, 26, 27, 28).

Samotný abamin měl statisticky významný vliv na prodlužování hypokotylu ve 2 případech, ve kterých byl zaznamenán jeho inhibiční účinek. Jednalo se koncentrace 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (1 %<sub>(v/v)</sub> DMSO) (Příloha 2: Obr. 28) a 150  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (0,1 %<sub>(v/v)</sub> DMSO) (Příloha 2: Obr. 27) a procentuální inhibice byla mezi 25 a 50 %. V jednom případě bylo prodlužování hypokotylu u rostlin ovlivněných abaminem (200  $\mu\text{mol l}^{-1}$ ; 0,4 %<sub>(v/v)</sub> DMSO) statisticky nerozlišitelné od kontrolních i zasolených rostlin (Příloha 2: Obr. 26). U testované koncentrace abaminu 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  s vyšší koncentrací DMSO (1 %<sub>(v/v)</sub>) v MS mediu, bylo zaznamenáno také statisticky významné snížení fototropického ohybu (snížení o 58 %) (Příloha 2: Obr. 28). U zbylých testovaných koncentrací abaminu nebyl naměřen statisticky významný rozdíl prodlužování hypokotylu (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25) respektive fototropického ohybu oproti kontrolním rostlinám (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25, 26, 27).

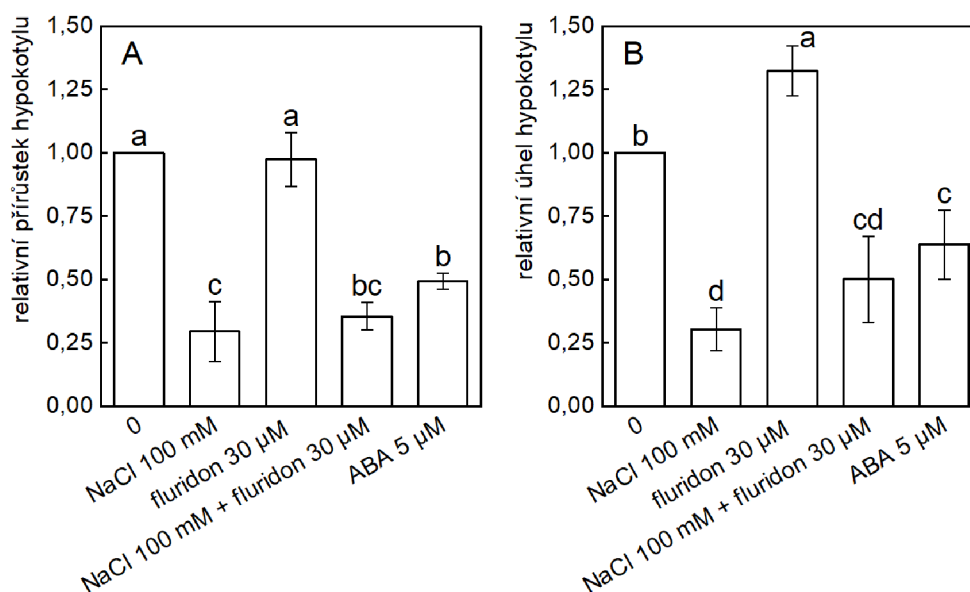
U rostlin kultivovaných na MS mediu obsahujícím NaCl a zároveň abamin nebyl naměřen statisticky významný rozdíl v prodlužování hypokotylu oproti rostlinám ovlivněných pouze NaCl u žádné z použitých koncentrací abaminu (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25, 26, 27, 28). Oproti tomu byl u dvou testovaných koncentrací abaminu při zasolení naměřen statisticky významný rozdíl ve fototropickém ohybu oproti rostlinám ovlivněných pouze NaCl. Zatímco v jednom experimentu měly zasolené rostliny ovlivněné abaminem o koncentraci 50  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (0,1 %<sub>(v/v)</sub> DMSO) větší fototropický ohyb oproti zasoleným rostlinám (statisticky významně nerozlišitelné od kontrolních rostlin) (Příloha 2: Obr. 24), tak zasolené rostliny ovlivněné abaminem o koncentraci 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$  (1 %<sub>(v/v)</sub> DMSO) měly fototropický ohyb ještě menší než rostliny zasolené (100% inhibice) (Příloha 2: Obr. 28). U zbylých testovaných koncentrací abaminu na zasolených rostlinách nebyl naměřen statisticky významný rozdíl fototropického ohybu oproti zasoleným rostlinám (Obr. 17 a Příloha 2: Obr. 24, 25, 26, 27).

#### 4.2.2 Fototropické experimenty s testováním NaCl, fluridonu a ABA

Jelikož abamin ve většině provedených experimentů nevykazoval významný vliv na prodlužování či fototropickou reakci, a to při aplikaci bez i se zasolením NaCl, byl v následujících experimentech místo něj využit fluridon o koncentraci 30  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Společně se zasolením NaCl o koncentraci 100  $\text{mmol l}^{-1}$  byla v této části experimentů otestována také exogenní ABA o koncentraci 5  $\mu\text{mol l}^{-1}$ .

Celkově bylo provedeno 5 experimentů se stejnými koncentracemi testovaných látek. Rozdíly mezi experimenty spočívaly pouze v množství rostlin na Petriho misku (v jednom 9, v ostatních 10) a v množství misek se stejnou testovanou látkou (3, 20, 20, 10 a 10). Statisticky ovšem nebylo prokázáno, že by tyto změny v množství testovaných rostlin měly vliv na výsledné hodnoty (viz Příloha 3: Obr. 29). U jednoho experimentu byly získané hodnoty velmi nestandardní (stimulační účinky zasolení apod.) a experiment byl tudíž vyřazen z výsledných hodnot této části experimentů (viz Příloha 4: Obr. 30). Z důvodu dostatečného množství experimentů a pro lepší orientaci ve výsledcích jsou v této kapitole uvedeny průměrné hodnoty relativních hodnot přírůstku a fototropického úhlu hypokotylu. Hodnoty přírůstků a fototropických úhlů, popřípadě jejich procentuální inhibice byly podle očekávání u kontrolních a zasolených rostlin velmi podobné jako v předchozí části fototropických experimentů.

Účinek samotného fluridonu ( $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ ) na přírůstek hypokotylu nebyl prokázán (Obr. 18), ačkoliv v jednom experimentu byla naměřena slabá statisticky významná inhibice. Naopak u fototropického úhlu byla u rostlin ovlivněných fluridonom naměřena statisticky významná stimulace (průměrně navýšení o přibližně 30 %).

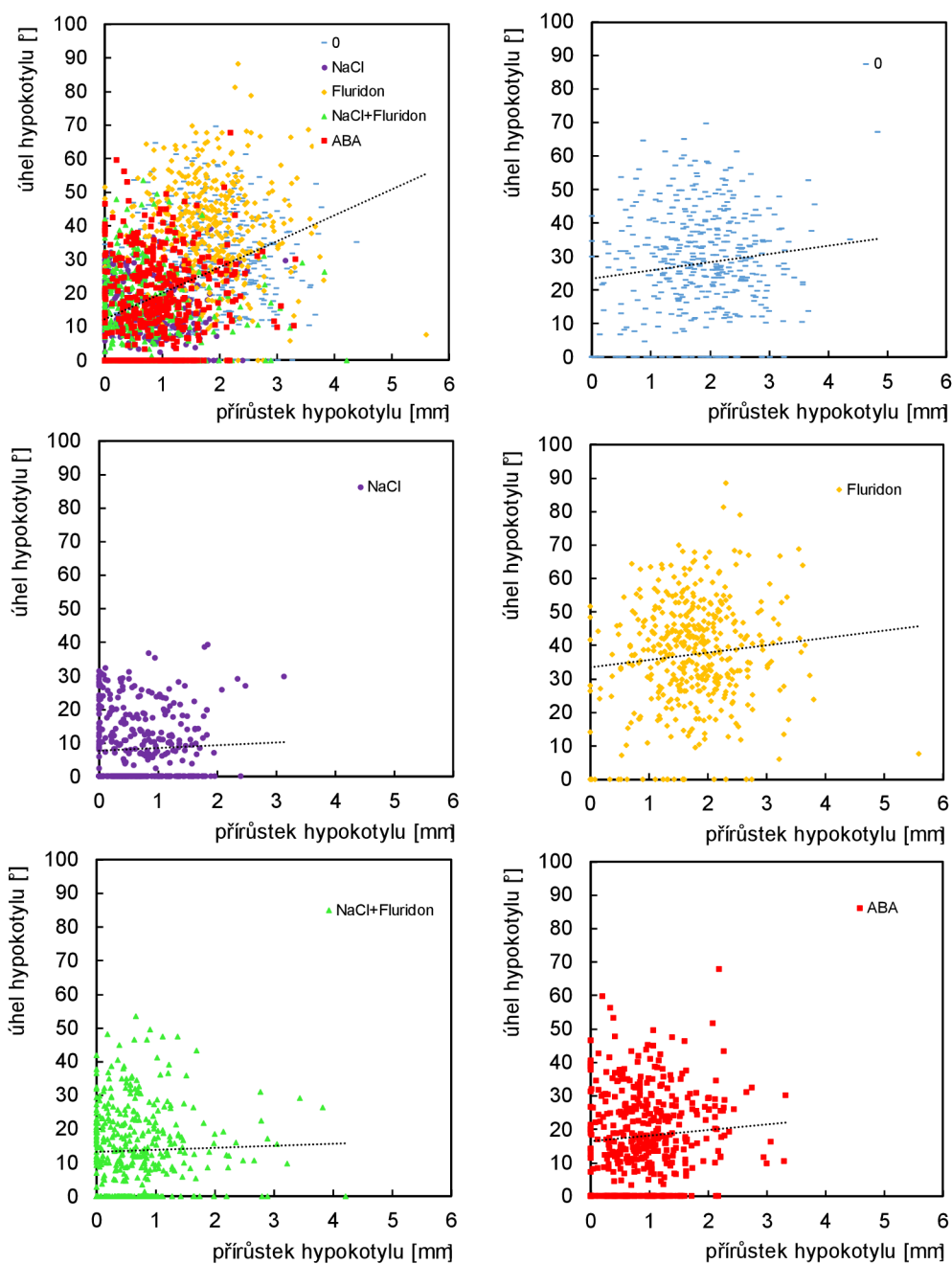


**Obr. 18. Hodnoty relativního přírůstku (A) a relativního fototropického úhlu (B) hypokotylů** (kontrolní rostliny = 1) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci  $100 \text{ mmol l}^{-1}$ , fluridonu o koncentraci  $30 \mu\text{mol l}^{-1}$ , kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci  $5 \mu\text{mol l}^{-1}$ . Výsledky představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD relativních hodnot ze 4 samostatných experimentů (EXP1, 2, 3, 4). V experimentech bylo na jedné podmínce testováno 27 (EXP1), 100 (EXP3 a EXP4) nebo 200 rostlin (EXP2). Statisticky významné rozdíly mezi měřenými parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).

Při kombinaci účinků zasolení NaCl ( $100 \text{ mmol l}^{-1}$ ) a fluridonu ( $30 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$ ) byly relativní hodnoty přírůstků statisticky neodlišitelné od rostlin pouze zasolených (Obr. 18), přičemž výsledky jednotlivých experimentů nevykazovaly žádný trend. U fototropického ohybu byly relativní hodnoty taktéž statisticky neodlišitelné od rostlin ovlivněných čistě NaCl (Obr. 18). Na druhou stranu byly ve všech experimentech hodnoty fototropického úhlu vyšší oproti zasoleným rostlinám a ve 2 experimentech dokonce statisticky významně (nepublikované výsledky). Nicméně rozdíly v těchto hodnotách mezi jednotlivými experimenty měly poměrně velkou odchylku a nelze tak hovořit o pozorovatelném trendu.

Rostliny ovlivněné exogenní ABA o koncentraci  $5 \text{ } \mu\text{mol l}^{-1}$  měly statisticky významnou inhibici přírůstku hypokotylu oproti kontrolním rostlinám, přírůstek však byl statisticky významně vyšší než u rostlin zasolených NaCl (Obr. 18). Tento výsledek se opakovale také při měření fototropického úhlu. Výsledky průměrných relativních hodnot obou měřených parametrů navíc zcela korelují s výsledky jednotlivých experimentů.

Pro ověření míry lineární závislosti fototropického úhlu na prodloužení hypokotylu byla s výsledky jednotlivých rostlin ze 4 fototropických experimentů s NaCl, fluridonem a ABA provedena korelační analýza. Po vyřazení chybných hodnot byl z celkových 2094 rostlin vypočítán Pearsonův korelační koeficient jako  $R = 0,39$  a hodnota významnosti byla  $F = 4,5 \cdot 10^{-78}$ . V rámci jednotlivých testovaných podmínek byl korelační koeficient i hodnota významnosti obecně nižší a nejnižší pak u zasolených rostlin bez ohledu na přítomnost fluridonu (nepublikované výsledky). Grafy závislosti fototropického úhlu na přírůstku hypokotylu pro všechny rostliny i pro jednotlivé testované podmínky jsou zobrazeny na Obr. 19.



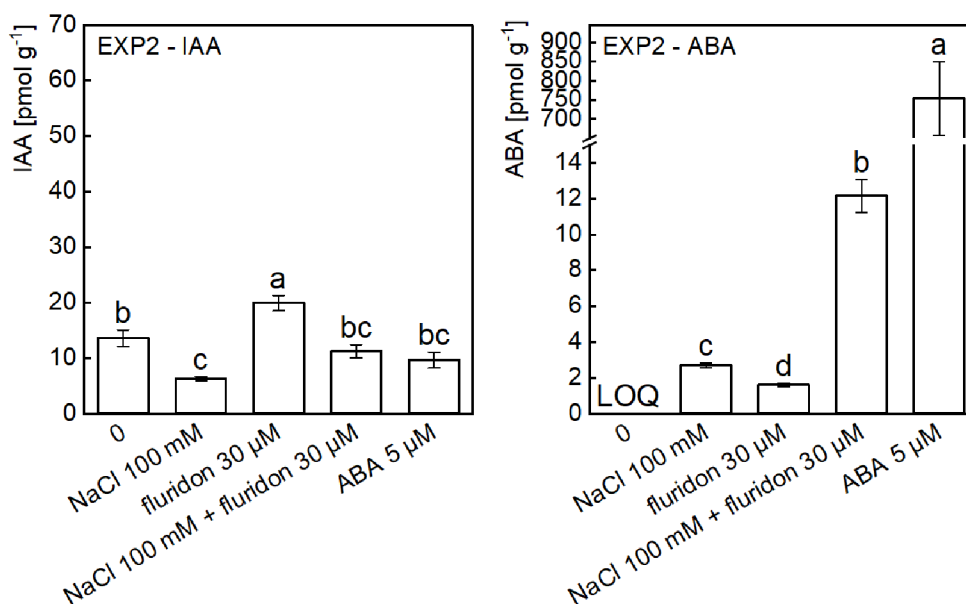
**Obr. 19. Grafy závislosti fototropického úhlu [°] (osa y) na přírůstku [mm] (osa x) hypokotylu osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 μmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 μmol l<sup>-1</sup>. Celkový koeficient korelace R = 0,39, hodnota významnosti F = 4,5 · 10<sup>-78</sup>. Data představují hodnoty jednotlivých rostlin ze 4 samostatných experimentů a celkově z 2094 rostlin.**

### 4.3 Analýza endogenní ABA a IAA

To, jakým způsobem testované látky nebo jejich kombinace ovlivňují endogenní koncentrace fytohormonů ABA a IAA, a to, jak změny v koncentracích těchto fytohormonů odrážejí sílu fototropické reakce, bylo ověřeno pomocí HPLC-ESI-MS/MS analýzy (finální část této analýzy byla provedena PharmDr. Jitkou Šírokovou, Ph.D.). Z důvodů nejasných

účinků abaminu na fototropickou reakci byly pro HPLC analýzu zpracovávány pouze rostliny z fototropických experimentů, ve kterých byl použit fluridon. Z důvodu nedostatečného množství rostlinného materiálu pro HPLC analýzu se souběžnou qPCR analýzou byla HPLC analýza provedena pouze u dvou experimentů. V jednom z těchto experimentů byly hladiny endogenních fytohormonů analyzovány pouze z hypokotylů, kdežto v dalším, kvůli efektivnější qPCR analýze, z celých prýtových částí (kotyledony a hypokotily). V každém experimentu byly analyzovány směsné vzorky z každé testované podmínky (0, NaCl, fluridon, NaCl+fluridon, ABA) rozdělené do 4 technických replikátů, ze kterých byla získána průměrná hodnota látkového množství analyzované látky na gram čerstvé hmoty.

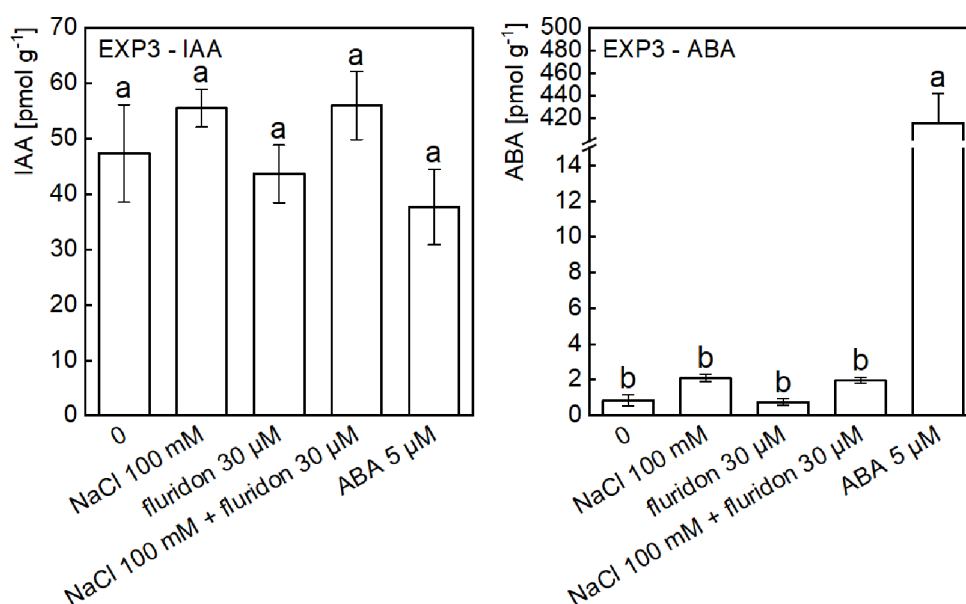
Podle výsledků prvního z experimentů, ve kterých byla provedena HPLC analýza (EXP2) byla v hypokotylech kontrolních rostlin koncentrace IAA 13,6 pmol g<sup>-1</sup>. U rostlin zasolených NaCl byla koncentrace IAA statisticky významně nižší přibližně o polovinu. Oproti tomu v hypokotylech rostlin ovlivněných fluridonom byla koncentrace IAA statisticky významně téměř o polovinu vyšší než u kontroly. V hypokotylech rostlin na kombinaci zasolení NaCl a fluridonu a stejně tak rostlin na exogenní ABA byla naměřená koncentrace IAA nižší než u kontroly a vyšší než u zasolení NaCl, ale ani od jedné podmínky statisticky významně odlišitelná (Obr. 20).



**Obr. 20. Koncentrace IAA a ABA [pmol g<sup>-1</sup>] v hypokotylech** osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 μmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 μmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují průměrné hodnoty ± SE z naměřených hodnot 4 technických replikátů z dané testované podmínky z jednoho provedení experimentu (EXP2). Statisticky významné rozdíly mezi měřenými parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).

Koncentrace endogenní ABA v hypokotylech kontrolních rostlin byla v prvním z těchto experimentů (EXP2) pod limitem kvantifikace (LOQ). U rostlin zasolených NaCl byla výsledná koncentrace 2,7 pmol g<sup>-1</sup>. V hypokotylech rostlin ovlivněných fluridonem byla koncentrace ABA statisticky významně nižší přibližně o 40 % než u rostlin zasolených NaCl. Nečekaným výsledkem byla koncentrace endogenní ABA u rostlin ovlivněných zároveň NaCl a fluridonem, která byla 4,6krát vyšší než u rostlin ovlivněných pouze NaCl. U rostlin ovlivněných exogenní ABA byla naměřená koncentrace exogenní ABA několiksetkrát vyšší než u zbylých testovaných podmínek (Obr. 20).

Druhý experiment, ve kterém byla provedena HPLC analýza, a ve kterém byly testovány endogenní koncentrace IAA a ABA v celých prýtech (EXP3), přinesl poměrně odlišné výsledky. Koncentrace IAA se v prýtech testovaných rostlin pohybovala mezi přibližně 38 až 56 pmol g<sup>-1</sup>, přičemž na žádné podmínce nebyl rozdíl v koncentraci statisticky významný od zbylých podmínek. Nejvyšší koncentrace IAA ovšem byly naměřeny u zasolených rostlin, a to bez i za přítomností fluridonu (Obr. 21).



**Obr. 21. Koncentrace IAA a ABA [pmol g<sup>-1</sup>] v prýtech (hypokotylech a kotyledonech) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 μmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 μmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují průměrné hodnoty ± SE z naměřených hodnot 4 technických replikátů z dané testované podmínky z jednoho provedeného experimentu (EXP3). Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**

Endogenní ABA v prýtech kontrolních rostlin byla naměřena jako 0,83 pmol g<sup>-1</sup>. U rostlin zasolených NaCl i u rostlin zasolených NaCl s fluridonem byla koncentrace přibližně 2krát vyšší. V prýtech rostlin ovlivněných čistě fluridonem byla koncentrace ABA podobná jako



u kontrolních rostlin a u rostlin ovlivněných exogenní ABA byla koncentrace opět několiksetkrát vyšší než u zbylých rostlin. Kromě rostlin ovlivněných ABA ovšem nebyla žádná hodnota statisticky významně odlišná (Obr. 21).

#### 4.4 Analýza exprese *PHOT1* a *PHOT2*

Jednou z navrhovaných možností, jak může ABA působit jako regulátor fototropické reakce byla regulace exprese genů pro fototropiny *PHOT1* a *PHOT2*. Ta byla v této práci studována qPCR analýzou relativní koncentrace jejich mRNA.

Z důvodů nejasných účinků abaminu na fototropickou reakci byly pro qPCR analýzu podobně jako pro HPLC zpracovávány pouze rostliny z fototropických experimentů s fluridonem. Pro qPCR analýzu byly rostliny ze stejné podmínky (0, NaCl, fluridon, NaCl + fluridon, ABA) sklizeny do směsných vzorků a analyzovány jako jeden technický replikát.

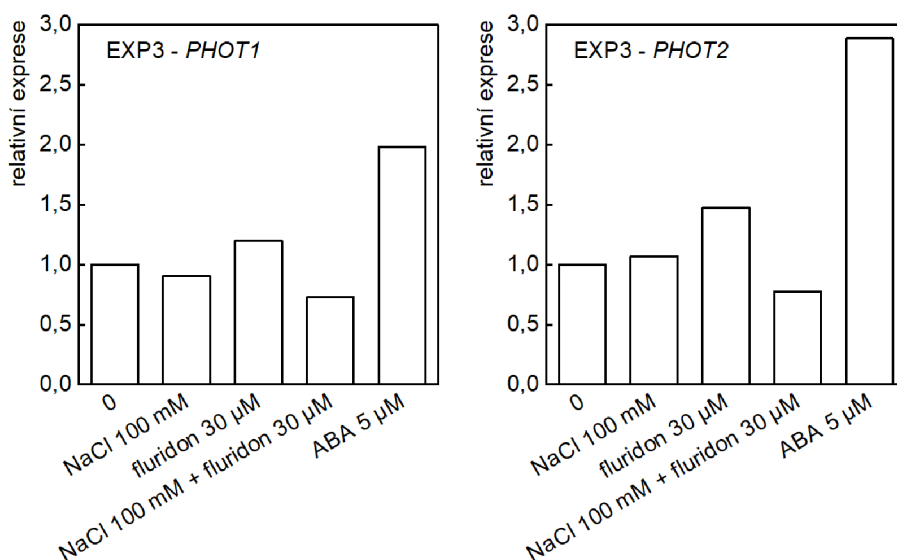
V prvním z této série experimentů (EXP1) bylo na jedné podmínce pěstováno a do směsného vzorku sklíženo 27 rostlin, což se ukázalo, jako velmi nedostatečné množství pro izolaci RNA z hypokotylů (a stejně tak pro HPLC analýzu). Ve druhém experimentu (EXP2) bylo množství rostlin na jedné podmínce navýšeno na 200 a hmotnost sklizených hypokotylů ve směsném vzorku již byla dostatečná pro izolaci RNA (i souběžnou HPLC analýzu). Bohužel se při následné spektrometrické kontrole izolovaných vzorků ukázalo, že hypokotyly obsahovaly extrémně nízké koncentrace celkové RNA a qPCR analýza ani tak nebyla proveditelná. Jelikož navýšení počtu rostlin již nebylo možné z technických důvodů (limitované množství rostlin, které se vejde na misku, limitované množství misek, které se vejde ke stojanu s jednosměrným horizontálním modrým světlem a časová náročnost sklizně) byly v následujících experimentech (EXP3, EXP4 a vyřazený experiment viz Příloha 4) sklizeny celé prýty (hypokotyly s kotyledony) a nikoliv pouze hypokotyly. Z celých prýtů již byl získán dostatek materiálu pro izolaci RNA, a zároveň se významně zvýšila koncentrace celkové RNA na gram čerstvé hmoty, takže ve dvou ze tří provedených experimentů již mohlo být množství rostlin pěstovaných na jedné podmínce sníženo na 100 (EXP3 a EXP4). Celkově tak byly úspěšně dokončeny 3 qPCR analýzy exprese *PHOT1* a *PHOT2*. Kvůli extrémně odlišným hodnotám přírůstků a fototropického úhlu (viz Příloha 4), byl ale jeden z těchto experimentů nakonec vyřazen (výsledky qPCR analýzy vyřazeného experimentu viz Příloha 4: Obr. 31) a ve výsledcích jsou tak uvedeny hodnoty pouze ze dvou experimentů.

Na základě výsledků Ct hodnot z optimalizačního experimentu, ve kterém byly analyzovány směsné vzorky z kontrolních rostlin pod neusměrněným modrým světlem,

a ve kterém byla potvrzena funkčnost zakoupených primerů pro *PHOT1* a *PHOT2*, bylo určeno ideální zředění analyzovaných vzorků cDNA jako 1/4.

Výsledky optimalizačního experimentu a následných dvou experimentů ukázaly, že kontrolní housekeeping gen *UBC* udává testovaným genům oproti kontrolnímu housekeeping genu *EF1α* velmi odlišné hodnoty relativní exprese, a zároveň má vůči všem analyzovaným genům gen *UBC* nižší teplotu tání. Z toho důvodu bylo pro poslední experiment rozhodnuto o qPCR analýze genu *UBC* na samostatné 96 jamkové destičce při teplotě 51 °C namísto původních 53,5 °C ve třetí části programu (viz Tab. 14). I po této změně teploty se výsledky genu *UBC* nezměnily a bylo proto rozhodnuto o jejich nezařazení do celkových výsledků (výsledky *UBC* viz Příloha 5: Obr. 32).

V konečných výsledcích jsou tak uvedeny pouze výsledky ze dvou experimentů (EXP3 a EXP4) s hodnotami relativní exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* pouze vůči housekeeping genu *EF1α*. Výsledky obou experimentů byly velmi podobné. Zatímco stres ze zasolení NaCl relativní expresi *PHOT1* i *PHOT2* oproti kontrole lehce snižoval nebo neměnil, a to i při společném působení s fluridonem, tak samotný fluridon relativní expresi *PHOT1* i *PHOT2* lehce zvyšoval (Obr. 22 a Příloha 6: Obr. 33). Oproti tomu kultivace rostlin na exogenní ABA způsobila u *PHOT1* i *PHOT2* silnější zvýšení relativní exprese oproti kontrole. U *PHOT1* se tak jednalo o zvýšení relativní exprese přibližně 1,5krát (Příloha 6: Obr. 33) respektive 2krát (Obr. 22) a u *PHOT2* byla relativní exprese v obou experimentech téměř 3krát silnější oproti kontrole (Obr. 22 a Příloha 6: Obr. 33).



**Obr. 22. Relativní exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v prýtech (hypokotylech a kotyledonech) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 μmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 μmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují hodnoty relativní exprese (vztahované k housekeeping genu *EF1α*) z reprezentativního experimentu (EXP3) vypočítané z průměru Ct hodnot ze 3 technických replikátů z dané testované podmínky. Statistická analýza nebyla provedena z důvodu nízkého počtu experimentů.**

## 5 Diskuze

Fototropické reakce jsou pro rostliny důležitým mechanismem, který jim pomáhá optimalizovat využití dostupné světelné energie s tím, že největší podíl na fototropických reakcích má percepce modrého světla skrze fototropiny. Přesný mechanismus signalizace fototropinů a ustavení fototropické reakce není stále zcela objasněn. Stejně jako většina ostatních rostlinných pochodů, jsou i fototropické reakce regulovány signalizací fytohormonů, a stejně tak signalizaci fytohormonů dále ovlivňují (především auxinu). Jedním z fytohormonů, který se pravděpodobně podílí na regulaci fototropické reakce je ABA, která byla v nedávné době popsána jako možný negativní regulátor fototropismu (Zhu et al., 2021) a podle výsledků dalších prací se může jednat o negativní regulátor samotných fototropinů (Eckstein et al., 2016). Diplomová práce si tak kladla za cíl ověřit, jestli ABA negativně ovlivňuje fototropické reakce indukované modrým světlem skrze signalizaci fototropinů v hypokotylech *Arabidopsis*. Dále jestli je účinek ABA shodný s negativním efektem stresu ze zasolení NaCl, který byl v nedávné době taktéž pozorován (Hřivňacký, 2020), a naopak jestli lze docílit opačného efektu na fototropismus aplikací inhibitorů syntézy ABA, což bylo ve stejné práci Hřivňacký (2020), taktéž naznačeno. Kromě měření fototropického úhlu hypokotylů si proto tato práce dala za cíl porovnat i koncentrace fytohormonů IAA a ABA v hypokotylech testovaných rostlin, a dále koncentraci transkriptů genů pro fototropiny *PHOT1* a *PHOT2* a určit jejich souvislost s mírou fototropické reakce.

### 5.1 Účinek zasolení NaCl

Zasolení NaCl podle očekávání inhibovalo růst *Arabidopsis*. Růst kořene byl na všech světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo) statisticky významně inhibován až při nejvyšší testované koncentraci NaCl, tedy 150 mmol l<sup>-1</sup>, kdežto hypokotyl byl statisticky významně inhibován na všech světelných podmínkách již při koncentraci NaCl 100 mmol l<sup>-1</sup>. Hypokotily na modrém světle měly obecně kratší délky než na zbylých světelných podmínkách a zároveň vykazovaly nižší procentuální inhibici při stresu ze zasolení. To lze vysvětlit inhibičním efektem modrého světla na růst hypokotylu, skrze signalizaci fototropinů a kryptochromů (Folta & Spalding, 2001), díky kterému se již následný inhibiční efekt zasolení tolik neprojeví. Zasolení NaCl mělo podle očekávání inhibiční efekt také ve fototropických experimentech, kde statisticky významně inhibovalo jak přírůstek hypokotylu, tak jeho fototropický ohyb po 24 hodinách působení jednosměrného horizontálního modrého světla. Účinek zasolení na přírůstek i ohyb hypokotylu je potvrzením předchozích prací (Hřivňacký, 2020).

## 5.2 Experimenty s testováním NaCl a abaminu

Inhibitor enzymu NCED z biosyntetické dráhy ABA – abamin oproti očekávání neměl prokazatelný vliv na prodlužování ani fototropismus hypokotylu. Na základě výsledků 4 růstových a 6 fototropických experimentů, ve kterých bylo testováno celkem 6 koncentrací abaminu nelze tvrdit, že by použitý abamin měl vliv na sledované parametry, a to při samotné aplikaci ani při společné aplikaci se zasolením. Statisticky významně odlišné hodnoty měřených parametrů oproti kontrole/zasoleným rostlinám se sice vyskytly v několika případech, jednalo se však spíše o nahodilé výsledky bez závislosti na světelné podmínce nebo testované koncentraci (výjimkou je poslední fototropický experiment, ve kterém se ale jednalo spíše o účinek DMSO; viz níže a Přílohy).

Jelikož použité koncentrace abaminu byly stejné nebo vyšší, než běžně používané (Han et al., 2004; Kitahata et al., 2006), a inhibice syntézy ABA v jiných pracích způsobovala změny v růstu hypokotylu (Humplík et al., 2015b), je málo pravděpodobné, že by abamin neúčinkoval kvůli nízké koncentraci. Vyloučit tuto variantu, stejně jako možnost, že se ABA na měřených parametrech jednoduše nepodílí takovou mírou však s jistotou nelze. Dalším možným vysvětlením je varianta, že abamin v experimentech účinkoval na NCED podle očekávání, ovšem zablokování NCED způsobilo aktivaci/zesílení alternativní dráhy syntézy ABA, která by NCED obcházela (viz alternativní apokarotenoidová dráha) (Jia et al., 2022) nebo že rostliny namísto zvýšené syntézy ABA pouze zesílily uvolňování ABA ze zásobních forem a snížily její degradaci. Jako možné jednodušší vysvětlení se dále jeví špatné rozpouštění abaminu v zásobním roztoku nebo jeho možná degradace při přípravě zásobního roztoku.

Vzhledem k tomu, že abamin byl v zásobním roztoku rozpouštěn v DMSO, u kterého byl v předchozích pracích prokázán inhibiční účinek na růst rostlin (Zhang et al., 2016; Foltýnová & Fellner 2017, nepublikované výsledky), byl v části fototropických experimentů testován i účinek čistého DMSO. Z testovaných koncentrací DMSO (0,05—0,4 %<sub>(v/v)</sub>) se u žádné neprokázal účinek na přírůstek nebo fototropický úhel hypokotylu, a je tudíž nepravděpodobné, že by ojedinělé statisticky odlišné výsledky abaminu byly způsobeny přítomným DMSO o těchto koncentracích. Oproti tomu výsledek posledního fototropického experimentu s abaminem (viz Přílohy), ve kterém abamin inhiboval růst i fototropický ohyb samostatně i společně se zasolením, byl nejspíše způsobem DMSO, jehož výsledná koncentrace v MS mediu byla 1 %<sub>(v/v)</sub>, což je již velmi vysoká koncentrace. Z technických důvodů bohužel nebyly z tohoto experimentu získány výsledky rostlin na čistém 1%<sub>(v/v)</sub> DMSO.

Je jasné, že abamin v těchto typech experimentů bude potřebovat další testování. V případě zachování rozpouštění v roztoku s obsahem DMSO by bylo vhodnější zachovat

ve výsledném MS médiu vždy stejné výsledné koncentrace DMSO a u každého experimentu získat i výsledky testování samostatného DMSO. Další možností by bylo rozpouštění abaminu v alternativním rozpouštědle. V neposlední řadě by bylo přínosné spojit tyto experimenty s analýzou koncentrace ABA v testovaných rostlinách a se souběžným testováním abaminu v pokusech s klíčením na stresových podmínkách.

### 5.3 Experimenty s testováním NaCl, fluridonu a ABA

Kvůli nejasným výsledkům abaminu byl v dalších fototropických experimentech použit jiný inhibitor biosyntézy ABA – fluridon, který inhibuje funkci enzymu PDS a jeho účinek je tak méně specifický. V těchto experimentech byl testován také účinek exogenní ABA a zároveň byly ze směsných vzorků rostlin ve dvou experimentech (EXP2, EXP3) analyzovány koncentrace IAA, ABA a exprese genů fototropinů (EXP3, EXP4).

Aby bylo možné lépe stanovit, jestli naměřené změny fototropického ohybu souvisí pouze se změnami v prodlužování hypokotylu nebo jestli jsou způsobeny také změnami v signalizaci fototropismu, byla z těchto provedených experimentů provedena analýza korelace fototropického ohybu na přírůstku hypokotylu. Získané hodnoty naznačují, že ačkoliv zde existuje statisticky významná korelace, tak se nejedná o absolutní závislost a míra fototropického ohybu bude pravděpodobně závislá i na jiných faktorech, než je prodlužování hypokotylu, a to např. na změnách v signální dráze fototropinů, na laterální distribuci auxinu nebo na změnách exprese příslušných genů.

Z průměrných hodnot relativního fototropického úhlu vyplývá, že aplikace fluridonu, stimuluje fototropickou reakci hypokotylů. Tento trend ovšem nebyl pozorován u přírůstku hypokotylu, což podporuje předchozí tvrzení, že míra fototropického ohybu není absolutně závislá na míře prodlužování hypokotylu. Ačkoliv byla v některých experimentech naměřena statisticky významná stimulace fototropického ohybu i u rostlin ovlivněných NaCl společně s fluridonem oproti rostlinám ovlivněných pouze NaCl, tak z těchto výsledků nelze potvrdit, že by inhibice enzymu PDS obnovovala fototropickou reakci zasolených rostlin.

V této části experimentů bylo taktéž potvrzeno, že aplikace exogenní ABA má inhibiční účinek na fototropický ohyb i přírůstek hypokotylu. Tyto výsledky potvrzují, že výsledky Zhu et al. (2021) jsou platné i u deetiolovalých rostlin. Inhibice vlivem ABA ovšem nebyla tak silná jako u NaCl a vzhledem k výsledkům analýzy koncentrace endogenní ABA nelze tvrdit, že by byl tento rozdíl způsoben nízkou koncentrací aplikované exogenní ABA. Ačkoliv se výsledky HPLC analýzy mírně lišily podle toho, zdali směsné vzorky obsahovaly pouze hypokotyly nebo celé prýty, tak výsledná koncentrace endogenní ABA v rostlinách ovlivněných exogenní ABA v obou případech mnohonásobně převyšovala koncentraci endogenní ABA u rostlin ovlivněných NaCl. Navíc u rostlin ovlivněných fluridonem nebyl

naměřen statisticky významný rozdíl v koncentraci endogenní ABA oproti kontrolním rostlinám a stejně tak nebyl takový rozdíl naměřen ani mezi zasolenými rostlinami ovlivněnými a neovlivněnými fluridonem. Ačkoliv platí, že rostliny s větším fototropickým úhlem měly obecně nižší koncentraci endogenní ABA a naopak, tak tyto výsledky naznačují, že míra fototropické reakce, ani přírůstku hypokotylu není přímo závislá na koncentraci endogenní ABA, a že od jisté koncentrace ABA se již její inhibiční účinek nezesiluje. Rozdíly ve fototropické reakci mezi rostlinami pěstovanými na NaCl a na exogenní ABA tak pravděpodobně nebudou způsobeny rozdílnou koncentrací endogenní ABA, ale jinými účinky způsobenými zasolením. Mezi další efekty zasolení lze uvést např. iontovou toxicitu a s ní spojené výkyvy iontové homeostázy, změny membránového napětí, narušení funkce různých enzymů, změny exprese zapojených genů, a v neposlední řadě změny v signalizaci dalších fytohormonů a transkripčních faktorů.

Stejně tak budou rozdíly mezi rostlinami kontrolními a rostlinami ovlivněnými fluridonem (respektive mezi rostlinami zasolenými a rostlinami zasolenými a zároveň ovlivněnými fluridonem) způsobeny jinými účinky fluridonu, než je inhibice syntézy ABA. Výsledky obou experimentů totiž naznačují, že fluridon pravděpodobně není schopen během 24h působení dostatečně snížit množství ABA. Dokonce v experimentu, ve kterém bylo analyzováno množství ABA pouze z hypokotylů byla koncentrace endogenní ABA v zasolených rostlinách ovlivněných fluridonem větší než u čistě zasolených rostlin. Vzhledem k nízkému počtu opakování je samozřejmě nutné brát výsledky s rezervou. Pokud by se ale tyto výsledky aplikace fluridonu potvrdily, možným vysvětlením by bylo, že vyřazení enzymu PDS na 24 hodin není dostatečně dlouhá doba proto, aby se projevil nedostatek ABA, kterou si rostlina v počáteční fázi stresu bere více ze zásobních konjugátů, popřípadě snižuje její degradaci. Další variantou by mohla být také existence alternativní biosyntetické dráhy podobné té od Jia et al. (2022), která by obcházela enzym PDS. Důvodem proč v hypokotylech kombinace zasolení NaCl a fluridonu zvýšila koncentraci ABA oproti čistě zasoleným rostlinám by krom odchylné hodnoty mohly být taktéž změny v transportu, konjugaci či degradaci ABA specificky v hypokotylech po vystavení stresu a zablokování funkce PDS. V případě, že by se potvrdilo, že aplikace fluridonu nesnižovala koncentraci ABA, tak by stimulační účinek fluridonu na fototropickou reakci mohl být způsoben změnami v koncentraci karotenoidů, které jsou součástí stejné syntetické dráhy jako ABA. Ačkoliv bylo přímé zapojení karotenoidů do fototropismu zavrhnuto již v 90. letech minulého století na základě experimentů s kukuřicí (Palmer et al., 1996), nelze vyloučit, že by v mladých de-etiolovaných rostlinách *Arabidopsis* mohly karotenoidy, které taktéž absorbují v modré části světelného spektra, sloužit jako modulátory fototropické reakce. Jistou spojitost by zde mohly naznačovat i výsledky nedávné práce od Kilambi et al. (2020) na plodech rajčete, podle kterých je koncentrace karotenoidů regulována *PHOT1*.

Kromě endogenní ABA byla v této části experimentů analyzována i koncentrace IAA. Výsledky byly stejně jako u endogenní ABA získány pouze ze dvou experimentů. Za zajímavý se dá určitě označit rozdíl koncentrace IAA mezi hypokotyly a celými prýty. Na rozdíl od analýzy ABA byla totiž v prýtech rostlin na všech testovaných podmínkách naměřena 2krát až 3krát vyšší koncentrace IAA než v samotných hypokotylech. Navíc byl mezi experimenty naměřen také rozdíl v tom, na které podmínce je IAA více, na které méně. Koncentrace IAA v hypokotylech tak docela přesně korelovala s fototropickou reakcí (nejvyšší u rostlin s fluridonem, nejnižší u zasolených atd.), kdežto při analýze celých prýtů nebyly naměřeny statisticky významné rozdíly mezi jednotlivými podmínkami, a navíc při pomnutí statistické významnosti by bylo více IAA v zasolených rostlinách (bez i s aplikací fluridonu). Ačkoliv nelze vyloučit ani variantu, že jeden z experimentů poskytoval odchylné hodnoty, tak vzhledem k relativně stejným hodnotám ABA z obou experimentů, je možné, že koncentrace IAA se v rostlinách velmi liší mezi hypokotyly a kotyledony, což způsobilo naměřené rozdíly mezi hypokotyly a prýty. Možným vysvětlením výše popsaných jevů by mohla být varianta, že jednotlivé testované podmínky ovlivňovaly jiným způsobem celkové množství IAA a jiným zase její transport z místa syntézy do hypokotylů. To by bylo v souladu s výsledky od Zhu et al. (2021), podle kterých mají rostliny s vyšší fototropickou reakcí vyšší koncentraci IAA v hypokotylech oproti rostlinám se slabou fototropickou reakcí a stejně tak by to potvrzovalo např. výsledky nedávné práce od Cackett et al. (2022), podle které specificky stres ze zasolení zvyšuje celkovou koncentraci IAA v rostlinách. Aplikace exogenní ABA, podle výše zmíněných prací tento efekt na celkovou koncentraci IAA nemá, naopak ale snižuje IAA v hypokotylech. To by značilo, že toxicita iontů spouští separátní procesy oproti ABA a signalizaci osmotického stresu a vysvětlovalo by to, proč bylo v prýtech rostlin ovlivněných ABA naměřeno méně IAA než u obou vzorků rostlin na NaCl. Naopak v hypokotylech, kam je IAA již pouze transportována, má hlavní úlohu při zasolení spíše signalizace ABA, která zde blokuje transport i signalizaci IAA.

Analýza exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* pomocí qPCR byla nakonec úspěšně provedena pouze ve dvou experimentech a v obou případech se jednalo o analýzu směsných vzorků celých prýtových částí rostlin a nebylo tak možné provést statistickou analýzu. V obou případech jsou navíc uváděny výsledky relativní exprese pouze vůči kontrolnímu genu *EF1 $\alpha$* , jelikož kontrolní gen *UBC* vykazoval velmi odchylné Ct hodnoty a zároveň měl odlišnou teplotu tání oproti ostatním primerům. Podle očekávání a v souladu s výsledky od Jarošová (2019) a nepublikovaných výsledků pracovní skupiny od Fellner (2020) byla transkripce obou genů pro fototropiny slabě inhibována zasolením. Oproti očekávání ovšem aplikace exogenní ABA transkripci obou genů neinhibovala, ale naopak stimulovala. Tyto výsledky je nutné brát s rezervou nejen z důvodu nízkého počtu experimentů a absence statistické analýzy, ale také protože některé předchozí práce

naznačily, že exprese genu *EF1α* není na světle stabilní (Labuz et al., 2012; Løvdal & Lillo, 2009). Ačkoliv se v citovaných pracích jednalo o světlo s větším spektrem vlnových délek a o větší intenzitě, tak nelze vyloučit ani možnost ovlivnění exprese tohoto genu světlem použitým v našem experimentu. Pokud by byly tyto výsledky potvrzeny, mohly by částečně taktéž vysvětlovat proč měly rostliny pěstované na NaCl menší fototropický úhel než rostliny na ABA. Dále by se částečně jednalo o potvrzení závěrů práce Eckstein et al. (2016), podle které ABA snižuje koncentraci fototropinů až posttranskripčně. Na druhou stranu výsledky práce od Eckstein et al. (2016) naznačují, že ABA na světle neovlivňuje transkripci genů pro fototropiny a pouze ve tmě inhibuje *PHOT1*, což je v rozporu s výsledky této diplomové práce. Stres ze zasolení NaCl by na základě výsledků této diplomové práce ovlivňoval koncentraci fototropinů na dvou úrovních, jelikož samotný stres ze zasolení pravděpodobně inhibuje transkripci fototropinů a akumulace ABA v reakci na zasolení snižuje koncentraci fototropinů posttranskripčně. Důvod proč by ABA zesilovala transkripci genů obou fototropinů a zároveň snižovala množství jejich proteinů natolik, že by výsledná koncentrace fototropinů byla nižší, než u kontroly ovšem zůstává nejasný. Na druhou stranu výzkum Eckstein et al. (2016) probíhal na listech dospělých rostlin *Arabidopsis* a je možné, že v hypokotylech a kotyledonech 8 denních rostlin na slabém modrém světle má ABA jiný účinek. Skutečnost, že u rostlin ovlivněných pouze fluridonem byla transkripce *PHOT1* a *PHOT2* slabě zvýšená oproti kontrolním rostlinám opět podporuje závěr, že fluridon aplikovaný podle metodiky této práce není schopen dostatečně snížit koncentraci ABA.

## 5.4 Optimalizace fototropického experimentu

Experimenty v této práci narážely na velké množství technických limitací a z toho důvodu velká část experimentů nepřinesla očekávané výsledky a pokud ano, tak často s nízkou nebo žádnou statistickou průkazností. Zároveň se část výsledků ukázala jako nedostatečná bez znalosti jiných faktorů. Dále jsou z těchto důvodů uvedeny doporučené změny metodiky pro budoucí práce. V těch by bylo vhodné použít inhibitory syntézy kyseliny abscisové s ověřenou účinností a ideálně zároveň jeden specifický a jeden méně specifický, aby bylo možné získat lepší přehled o důsledcích vyřazení biosyntézy karotenoidů. Kromě testovaných podmínek (0, NaCl, inhibitor syntézy ABA, NaCl + inhibitor syntézy ABA, exogenní ABA) by zároveň bylo vhodné otestovat také kombinace NaCl + ABA a ABA + inhibitor syntézy ABA pro dvojité ověření účinku testovaných látek. Ke každému experimentu provést také analýzu koncentrace IAA, ABA, s tím, že rostliny pěstované na exogenní ABA by bylo vhodnější před sklizní ještě omýt vodou, aby exogenní ABA zachycená na povrchu rostlin nezkreslovala výsledky endogenní ABA. Zároveň by byly výsledky průkaznější, kdyby byly replikáty pro analýzu hormonů vytvářeny z konkrétních



rostlin již při sklizni, a ne až při rozvažování ze směsného vzorku, aby výsledné odchylky více zohledňovaly biologickou, a ne pouze technickou variabilitu. Zároveň by bylo vhodné získat dostatek hodnot koncentrace endogenních hormonů jak z hypokotylů, tak z kotyledonů nebo celých prýtů, aby bylo možné určit, jestli sledované změny souvisí se změnami celkové koncentrace nebo např. pouze transportu těchto hormonů. Stejně tak by bylo do budoucna průkaznější získat hodnoty exprese *PHOT1* a *PHOT2* z hypokotylů i kotyledonů/celých prýtů.

Nad rámec parametrů studovaných v této práci by k lepšímu objasnění této problematiky mohla pomoci také analýza koncentrace samotných fototropinů případně paralelní analýza jejich lokalizace a míry fosforylace v reprezentativních rostlinách. Stejně tak by prospěšné informace mohla přinést analýza koncentrace giberelinů a koncentrace důležitých regulačních proteinů spojených s fototropismem jako SAUR19, ARF7, IAA19 nebo PIF4.

Jak bylo uvedeno dříve, tak experiment v této práci dosahoval limitů svých technických možností, skrze velikost dostupných stojanů s LED zdroji horizontálního jednosměrného světla a zároveň skrze časovou náročnost sklizně, protože všechny testované rostliny musí být vyfoceny a sklizeny v co nejkratším časovém úseku, aby během časového okna mezi sklizením první a poslední rostliny nedošlo k dodatečným změnám měřených parametrů. Aby bylo možné z jednoho experimentu získat materiál pro HPLC analýzu hormonů a zároveň pro qPCR analýzu genové exprese podle metodiky uvedené v této práci je nutné podle získaných hodnot vypěstovat na jedné podmínce přibližně 100 rostlin pro analýzu z celých prýtů. Pro souběžnou HPLC a qPCR analýzu pouze z hypokotylů by ovšem z důvodů nízké hmotnosti hypokotylů a nízké obsažené koncentraci RNA v nich bylo potřeba vypěstovat na jedné podmínce přibližně 350 rostlin. V takovém případě by už ale teoretická navážka materiálu potřebného pro qPCR analýzu pravděpodobně překračovala technické možnosti použitých kolonek na izolaci celkové RNA a ty by tak bylo potřeba nahradit nějakou alternativou. Pro qPCR analýzu by zároveň bylo vhodné v budoucnu otestovat vliv použitého světla na aktivitu kontrolního genu *EF1α* a zároveň použít jiný kontrolní gen místo *UBC* např. geny *SAND* nebo *PDF2* úspěšně použité v Labuz et al. (2012). V neposlední řadě by v budoucích experimentech bylo vhodné otestovat, jak světelný pulz světla používaný při fotografování rostlin před sklizní ovlivňuje koncentrace hormonů a transkriptů a popřípadě podle toho dále také upravit metodiku.

## 6 Závěr

Tato diplomová práce si kladla za cíl objasnit úlohu ABA ve fototropických reakcích rostlin. Konkrétně pak bylo cílem potvrdit inhibiční efekt exogenní i endogenní ABA na fototropismus hypokotylů *Arabidopsis* vůči modrému světlu a dále objasnit, zdali je inhibiční efekt zasolení NaCl na fototropismus taktéž způsoben ABA, která se při stresech zvýšeně akumuluje. Kromě měření změn v prodlužování a fototropickém ohybu v rostlinách ovlivněných testovanými látkami (NaCl, NaCl + inhibitor syntézy ABA, ABA) byly pro nastínění možných mechanismů analyzovány také koncentrace endogenní ABA a IAA pomocí HPLC analýzy a qPCR analýza exprese genů fototropinů *PHOT1* a *PHOT2*. Všechny experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro* na *Arabidopsis* na kontrolním genotypu *gl-1*.

Získané výsledky ukázaly, že ačkoliv je míra fototropické reakce závislá na míře prodlužování hypokotylu, tak se nejedná o absolutní závislost. Pozorované účinky testovaných látek tak nejsou pouhým odrazem změn v prodlužování hypokotylu, ale také specifických změn v signalizaci fototropismu.

Výsledky této práce potvrdily, že aplikace exogenní ABA i stres ze zasolení NaCl inhibují fototropické reakce hypokotylů s tím, že inhibiční účinek NaCl je silnější. Dále pak výsledky této práce prokázaly, že aplikace fluridonu – inhibitoru enzymu PDS, který se účastní biosyntézy karotenoidů a ABA, zesiluje fototropickou reakci u nestresovaných rostlin. Naopak se nepodařilo prokázat, že by aplikace fluridonu obnovovala fototropickou reakci u zasolených rostlin, ačkoliv v některých jednotlivých experimentech byl tento účinek zaznamenán. U druhého testovaného inhibitoru biosyntézy ABA abaminu, který inhibuje enzym NCED a je tedy výrazně specifičtější, se v této práci nepodařilo získat žádné průkazné výsledky.

Výsledky HPLC analýzy byly nakonec získány jen z malého množství experimentů a je třeba je brát s rezervou. Nicméně tyto výsledky naznačily, že testované látky účinkují rozdílně na koncentrace analyzovaných hormonů v kotyledonech a hypokotylech, kdy tento rozdíl byl zjevnější u analýzy IAA. Koncentrace IAA v hypokotylech poměrně přesně korelovaly s fototropickou reakcí a je tak pravděpodobné, že změny fototropické reakce jsou ovlivněny spíše změnami transportu IAA do hypokotylu než změnami syntézy IAA v kotyledonech. Výsledky koncentrace endogenní ABA nepřinesly jednoznačné výsledky. Na jednu stranu se potvrdilo, že zasolené rostliny měly oproti kontrolním zvýšenou koncentraci ABA. Na druhou stranu rozdíl v endogenní ABA mezi dalšími testovanými podmínkami (NaCl vs ABA, NaCl vs NaCl + fluridon, kontrola vs fluridon) neodpovídaly rozdílům ve fototropické reakci. Navíc výsledky této práce ani nepotvrdily, že by fluridon v testovaných rostlinách snižoval hladinu endogenní ABA. Tyto výsledky by tak znamenaly,

že silnější inhibiční účinek NaCl a stimulační účinek fluridonu na fototropickou reakci nejsou způsobeny změnami v koncentraci ABA, ale jinými mechanismy.

Výsledky qPCR analýzy byly nakonec taktéž získány jen z omezeného množství experimentů, a navíc z důvodů technických problémů s primery jednoho z kontrolních housekeeping genů byly pouze vůči jednomu kontrolnímu housekeeping genu a výsledky je proto opět nutné brát s rezervou. Tyto výsledky nicméně naznačují, že ačkoliv u rostlin ovlivněných NaCl nebo fluridonem mohou změny fototropické reakce z malé části souviset se změnami transkripce genů fototropinů, tak u rostlin ovlivněných ABA byl trend naprosto opačný. Podle těchto výsledků, tak změna transkripce *PHOT1* a *PHOT2* nebude hlavním mechanismem účinku ABA, stresu ze zasolení ani fluridonu, ale v některých případech může mít modulační efekt.

Pro plné objasnění studovaných jevů a získání komplexní představy o probíhajících procesech bude ještě potřeba mnohé experimenty zopakovat, modifikovat a zároveň některé další přidat. I tak výsledky předkládané práce mohou do jisté míry pomoci s odkrýváním vzájemné propojenosti vnímání světla, stresů a signalizace fytohormonů a jejich komplexních účinků v rostlinném růstu a vývoji a přispět tak svým dílem k odhalení složitého, ale nádherného světa rostlinné fyziologie.

## 7 Citová literatura

- Barrero, J. M., Downie, A. B., Xu, Q., & Gubler, F. (2014). A Role for Barley CRYPTOCHROME1 in Light Regulation of Grain Dormancy and Germination. *The Plant Cell*, 26(3), 1094. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.121830>
- Barrero, J. M., Rodríguez, P. L., Quesada, V., Alabadí, D., Blázquez, M. A., Boutin, J. P., Marion-Poll, A., Ponce, M. R., & Micol, J. L. (2008). The ABA1 Gene and Carotenoid Biosynthesis Are Required for Late Skotomorphogenic Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Plant, Cell & Environment*, 31(2), 227–234. <https://doi.org/10.1111/J.1365-3040.2007.01759.X>
- Bharath, P., Gahir, S., & Raghavendra, A. S. (2021). Abscisic Acid-Induced Stomatal Closure: An Important Component of Plant Defense Against Abiotic and Biotic Stress. *Frontiers in Plant Science*, 12, 324. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2021.615114/BIBTEX>
- Cackett, L., Cannistraci, C. V., Meier, S., Ferrandi, P., Pěnčík, A., Gehring, C., Novák, O., Ingle, R. A., & Donaldson, L. (2022). Salt-Specific Gene Expression Reveals Elevated Auxin Levels in *Arabidopsis thaliana* Plants Grown Under Saline Conditions. *Frontiers in Plant Science*, 13, 15. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2022.804716/BIBTEX>
- Cao, X., Yang, H., Shang, C., Ma, S., Liu, L., & Cheng, J. (2019). The Roles of Auxin Biosynthesis YUCCA Gene Family in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 6343. <https://doi.org/10.3390/IJMS20246343>
- Chae, K., Isaacs, C. G., Reeves, P. H., Maloney, G. S., Muday, G. K., Nagpal, P., & Reed, J. W. (2012). *Arabidopsis* SMALL AUXIN UP RNA63 Promotes Hypocotyl and Stamen Filament Elongation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, 71(4), 684–697. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.05024.X>
- Chandrasekaran, U., Luo, X., Zhou, W., & Shu, K. (2020). Multifaceted Signaling Networks Mediated by Abscisic Acid Insensitive 4. *Plant Communications*, 1(3), 100040. <https://doi.org/10.1016/J.XPLC.2020.100040>
- Chen, K., Li, G. J., Bressan, R. A., Song, C. P., Zhu, J. K., & Zhao, Y. (2020). Abscisic Acid Dynamics, Signaling, and Functions in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(1), 25–54. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12899>
- Christie, J. M. (2007). Phototropin Blue-light Receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 21–45. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV.ARPLANT.58.032806.103951>
- Christie, J. M., & Murphy, A. S. (2013). Shoot Phototropism in Higher Plants: New Light Through Old Concepts. *American Journal of Botany*, 100(1), 35–46. <https://doi.org/10.3732/ajb.1200340>
- Christie, J. M., Yang, H., Richter, G. L., Sullivan, S., & Thomson, C. E. (2011). phot1 Inhibition of ABCB19 Primes Lateral Auxin Fluxes in the Shoot Apex Required For Phototropism. *PLoS Biology*, 9(6), e1001076. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001076>
- Czechowski, T., Stitt, M., Altmann, T., Udvardi, M. K., & Scheible, W.-R. (2005). Genome-Wide Identification and Testing of Superior Reference Genes for Transcript Normalization in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 139, 5–17. <https://doi:10.1104/pp.105.063743>
- D'Amico-Damião, V., & Carvalho, R. F. (2018). Cryptochrome-Related Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2018.01897>
- Dai, X., Zhang, Y., Zhang, D., Chen, J., Gao, X., Estelle, M., & Zhao, Y. (2015). Embryonic Lethality of *Arabidopsis* *abp1-1* Is Caused by Deletion of the Adjacent *BSM* Gene. *Nature Plants*, 1. <https://doi.org/10.1038/NPLANTS.2015.183>
- Darwin, C., & Darwin, F. (1880). The Power of Movement in Plants. In *The Power of Movement in Plants*. John Murray, London.
- Davière, J. M., & Achard, P. (2016). A Pivotal Role of DELLAs in Regulating Multiple Hormone Signals. *Molecular Plant*, 9(1), 10–20. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2015.09.011>
- de Lucas, M., & Prat, S. (2014). PIFs Get BRight: PHYTOCHROME INTERACTING FACTORs as Integrators of Light and Hormonal Signals. *New Phytologist*, 202(4), 1126–1141. <https://doi.org/10.1111/NPH.12725>
- Ding, Z., Galván-Ampudia, C. S., Demarsy, E., Łangowski, Ł., Kleine-Vehn, J., Fan, Y., Morita, M. T., Tasaka, M., Fankhauser, C., Offringa, R., & Friml, J. (2011). Light-mediated Polarization of the PIN3 Auxin Transporter for the Phototropic Response in *Arabidopsis*. *Nature Cell Biology*, 13(4), 447–453. <https://doi.org/10.1038/NCB2208>

- Du, M., Spalding, E. P., & Gray, W. M. (2020). Rapid Auxin-Mediated Cell Expansion. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 379–402. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-ARPLANT-073019-025907>
- Eagles, C. F., & Wareing, P. F. (1963). Dormancy Regulators in Woody Plants: Experimental Induction of Dormancy in *Betula pubescens*. *Nature*, *199*, 874–875. <https://doi.org/10.1038/199874a0>
- Eckstein, A., Krzeszowiec, W., Katarzyna Banaś, A., Janowiak, F., & Gabryś, H. (2016). Abscisic Acid and Blue Light Signaling Pathways in Chloroplast Movements in *Arabidopsis* Mesophyll. *Acta Biochimica Polonica*, *63*(3), 449–458. [https://doi.org/10.18388/abp.2016\\_1382](https://doi.org/10.18388/abp.2016_1382)
- Fankhauser, C., & Christie, J. M. (2015). Plant Phototropic Growth. *Current Biology*, *25*(9), R384–R389. <https://doi.org/10.1016/J.CUB.2015.03.020>
- Finkelstein, R. (2013). Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book*, *11*, e0166. <https://doi.org/10.1199/TAB.0166>
- Floková, K., Tarkowská, D., Miersch, O., Strnad, M., Wasternack, C., & Novák, O. (2014). UHPLC-MS/MS Based Target Profiling of Stress-induced Phytohormones. *Phytochemistry*, *105*, 147–157. <https://doi.org/10.1016/J.PHYTOCHEM.2014.05.015>
- Folta, K. M., & Spalding, E. P. (2001). Unexpected Roles for Cryptochrome 2 and Phototropin Revealed by High-resolution Analysis of Blue Light-mediated Hypocotyl Growth Inhibition. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*, *26*(5), 471–478. <https://doi.org/10.1046/J.1365-313X.2001.01038.X>
- Galen, C., Rabenold, J. J., & Liscum, E. (2007). Functional Ecology of a Blue Light Photoreceptor: Effects of Phototropin-1 on Root Growth Enhance Drought Tolerance in *Arabidopsis Thaliana*. *New Phytologist*, *173*(1), 91–99. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2006.01893.x>
- Gamble, P. E., & Mullet, J. E. (1986). Inhibition of Carotenoid Accumulation and Abscisic Acid Biosynthesis in Fluridone-treated Dark-grown Barley. *European Journal of Biochemistry*, *160*(1), 117–121. <https://doi.org/10.1111/J.1432-1033.1986.TB09947.X>
- Gelová, Z., Gallej, M., Pernisová, M., Brunoud, G., Zhang, X., Glanc, M., Li, L., Michalko, J., Pavlovičová, Z., Verstraeten, I., Han, H., Hajný, J., Hauschild, R., Čovanová, M., Zwiewka, M., Hoermayer, L., Fendrych, M., Xu, T., Vernoux, T., & Friml, J. (2021). Developmental Roles of Auxin Binding Protein 1 in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant Science*, *303*. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2020.110750>
- Haga, K., Frank, L., Kimura, T., Schwechheimer, C., & Sakai, T. (2018). Roles of AGCVIII Kinases in the Hypocotyl Phototropism of *Arabidopsis* Seedlings. *Plant and Cell Physiology*, *59*(5), 1060–1071. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCY048>
- Haga, K., Tsuchida-Mayama, T., Yamada, M., & Sakai, T. (2015). *Arabidopsis* ROOT PHOTOTROPISM2 Contributes to the Adaptation to High-Intensity Light in Phototropic Responses. *The Plant Cell*, *27*(4), 1098–1112. <https://doi.org/10.1105/tpc.15.00178>
- Hager, A., Debus, G., Edel, H. G., Stransky, H., & Serrano, R. (1991). Auxin Induces Exocytosis and the Rapid Synthesis of a High-turnover Pool of Plasma-membrane H(+)-ATPase. *Planta*, *185*(4), 527–537. <https://doi.org/10.1007/BF00202963>
- Han, H., Adamowski, M., Qi, L., Alotaibi, S. S., & Friml, J. (2021). PIN-mediated Polar Auxin Transport Regulations in Plant Tropic Responses. *New Phytologist*, *232*(2), 510–522. <https://doi.org/10.1111/NPH.17617>
- Han, S. Y., Kitahata, N., Sekimata, K., Saito, T., Kobayashi, M., Nakashima, K., Yamaguchi-Shinozaki, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., & Asami, T. (2004). A Novel Inhibitor of 9-cis-Epoxycarotenoid Dioxygenase in Abscisic Acid Biosynthesis in Higher Plants. *Plant Physiology*, *135*(3), 1574. <https://doi.org/10.1104/PP.104.039511>
- Hao, S., Wang, Y., Yan, Y., Liu, Y., Wang, J., & Chen, S. (2021). A Review on Plant Responses to Salt Stress and Their Mechanisms of Salt Resistance. *Horticulturae*, *Vol. 7*, Page 132, 7(6), 132. <https://doi.org/10.3390/HORTICULTURAE7060132>
- Hart, J. E., & Gardner, K. H. (2021). Lighting the way: Recent Insights into the Structure and Regulation of Phototropin Blue Light Receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, *296*, 100594. <https://doi.org/10.1016/J.JBC.2021.100594>
- Hayashi, Y., Takahashi, K., Inoue, S. I., & Kinoshita, T. (2014). Abscisic Acid Suppresses Hypocotyl Elongation by Dephosphorylating Plasma Membrane H(+)-ATPase in *Arabidopsis Thaliana*. *Plant & Cell Physiology*, *55*(4), 845–853. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCU028>

- Hellsberg, E., Montanari, F., & Ecker, G. F. (2015). The ABC of Phytohormone Translocation. *Planta Medica*, 81(6), 474–487. <https://doi.org/10.1055/s-0035-1545880>
- Hohm, T., Demarsy, E., Quan, C., Petrolati, L. A., Preuten, T., Vernoux, T., Bergmann, S., & Fankhauser, C. (2014). Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase Regulation Is Required for Auxin Gradient Formation Preceding Phototropic Growth. *Molecular Systems Biology*, 10(9), 751. <https://doi.org/10.15252/MSB.20145247>
- Hřivňáček, M. (2020). Vliv Abiotických Stresů na Fototropické Reakce Rostlin. Bakalářská práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
- Hubbard K., Nishimura N., Hitomi K., Getzoff E., & Schroeder J. (2010). Early Abscisic Acid Signal Transduction Mechanisms: Newly Discovered Components and Newly Emerging Questions. *Genes & Development* 24, 1695-1708. <https://doi.org/10.1101/gad.1953910>
- Humplík, J. F., Bergougnoux, V., Jandová, M., Šimura, J., Pěňčík, A., Tomanec, O., Rolčík, J., Novák, O., & Fellner, M. (2015a). Endogenous Abscisic Acid Promotes Hypocotyl Growth and Affects Endoreduplication During Dark-induced Growth in Tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *PloS One*, 10(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0117793>
- Humplík, J. F., Turečková, V., Fellner, M., & Bergougnoux, V. (2015b). Spatio-temporal Changes in Endogenous Abscisic Acid Contents During Etiolated Growth and Photomorphogenesis in Tomato Seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, 10(8). <https://doi.org/10.1080/15592324.2015.1039213>
- Inoue S. I., Takemiva A., & Shimazaki K. I. (2010). Phototropin Signaling and Stomatal Opening as a Model Case. *Current Opinion in Plants Biology*, 13, 587-593. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2010.09.002>
- Jarošová, K. (2019). Regulace Expresce Genů PHOT1 a PHOT2 v Semenech Rajčete Vlivem Světla a Abiotických Stresů. Diplomová práce. Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci
- Jia, K. P., Mi, J., Ali, S., Ohyanagi, H., Moreno, J. C., Ablazov, A., Balakrishna, A., Berqdar, L., Fiore, A., Diretto, G., Martínez, C., de Lera, A. R., Gojobori, T., & Al-Babili, S. (2022). An Alternative, Zeaxanthin Epoxidase-independent Abscisic Acid Biosynthetic Pathway in Plants. *Molecular Plant*, 15(1), 151–166. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2021.09.008>
- Jurado, S., Abraham, Z., Manzano, C., López-Torrejón, G., Pacios, L. F., & del Pozo, J. C. (2010). The Arabidopsis Cell Cycle F-box Protein SKP2A Binds to Auxin. *The Plant Cell*, 22(12), 3891–3904. <https://doi.org/10.1105/TPC.110.078972>
- Kang, J., Lee, Y., & Martinoia, E. (2020). How Can We Interpret the Large Number and Diversity of ABA Transporters? *Progress in Botany*, 82, 233–257. [https://doi.org/10.1007/124\\_2020\\_43](https://doi.org/10.1007/124_2020_43)
- Kasahara, M., Swartz, T. E., Olney, M. A., Onodera, A., Mochizuki, N., Fukuzawa, H., Asamizu, E., Tabata, S., Kanegae, H., Takano, M., Christie, J. M., Nagatani, A., & Briggs, W. R. (2002). Photochemical Properties of the Flavin Mononucleotide-Binding Domains of the Phototropins from Arabidopsis, Rice, and Chlamydomonas Reinhardtii. *Plant Physiology*, 129(2), 762. <https://doi.org/10.1104/PP.002410>
- Kilambi, H. V., Dindu, A., Sharma, K., Nizampatnam, N. R., Gupta, N., Thazath, N. P., Dhanya, A. J., Tyagi, K., Sharma, S., Kumar, S., Sharma, R., & Sreelakshmi, Y. (2020). The New Kid on the Block: A Dominant-negative Mutation of phototropin1 Enhances Carotenoid Content in Tomato Fruits. *BioRxiv*, 2020.09.13.295121. <https://doi.org/10.1101/2020.09.13.295121>
- Kitahata, N., Han, S. Y., Noji, N., Saito, T., Kobayashi, M., Nakano, T., Kuchitsu, K., Shinozaki, K., Yoshida, S., Matsumoto, S., Tsujimoto, M., & Asami, T. (2006). A 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase Inhibitor for Use in the Elucidation of Abscisic Acid Action Mechanisms. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 14(16), 5555–5561. <https://doi.org/10.1016/J.BMC.2006.04.025>
- Kögl, F., & Haagen-Smit, A. J. (1931). Mitteilung über pflanzliche wachstumsstoffe. Über die vhemie des euchsstoffs. *Proceedings Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen*, 4, 1411– 1416.
- Kong, S. G., Suetsugu, N., Kikuchi, S., Nakai, M., Nagatani, A., & Wada, M. (2013). Both phototropin 1 and 2 Localize on the Chloroplast Outer Membrane with Distinct Localization Activity. *Plant & Cell Physiology*, 54(1), 80–92. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCS151>
- Korbei, B., & Luschnig, C. (2013). Plasma Membrane Protein Ubiquitylation and Degradation as Determinants of Positional Growth in Plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 55(9), 809–823. <https://doi.org/10.1111/JIPB.12059>

- Labuz, J., Sztatelman, O., Katarzyna, A., Banasánd, B., & Gabrys', H. (2012). The Expression of Phototropins in Arabidopsis Leaves: Developmental and Light Regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1763–1771. <https://doi.org/10.1093/jxb/ers061>
- Lee, D. J., Park, J. W., Lee, H. W., & Kim, J. (2009). Genome-wide Analysis of the Auxin-responsive Transcriptome Downstream of *iaa1* and its Expression Analysis Reveal the Diversity and Complexity of Auxin-regulated Gene Expression. *Journal of Experimental Botany*, 60(13), 3935. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERP230>
- Legrís, M., & Boccaccini, A. (2020). Stem Phototropism toward Blue and Ultraviolet Light. *Physiologia Plantarum*, 169(3), 357–368. <https://doi.org/10.1111/PPL.13098>
- Liscum, E. (2016). Blue Light-Induced Intracellular Movement of Phototropins: Functional Relevance or Red Herring? *Frontiers in Plant Science*, 7(827). <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00827>
- Liscum, E., Askinosie, S. K., Leuchtman, D. L., Morrow, J., Willenburg, K. T., & Roberts Coats, D. (2014). Phototropism: Growing towards an Understanding of Plant Movement. *The Plant Cell*, 26(1), 38–55. <https://doi.org/10.1105/tpc.113.119727>
- Liscum, E., Nittler, P., & Koskie, K. (2020). The Continuing Arc toward Phototropic Enlightenment. *Journal of Experimental Botany*, 71(5), 1652–1658. <https://doi.org/10.1093/jxb/eraa005>
- Lorrai, R., Boccaccini, A., Ruta, V., Possenti, M., Costantino, P., & Paola, V. (2018). Abscisic Acid Inhibits Hypocotyl Elongation Acting on Gibberellins, DELLA Proteins and Auxin. *AoB PLANTS*, 10(5). <https://doi.org/10.1093/AOBPLA/PLY061>
- Løvdaal, T., & Lillo, C. (2009). Reference Gene Selection for Quantitative Real-time PCR Normalization in Tomato Subjected to Nitrogen, Cold, and Light Stress. *Analytical Biochemistry*, 387(2), 238–242. <https://doi.org/10.1016/J.AB.2009.01.024>
- Ma, Yue, Szostkiewicz, I., Korte, A., Moes, D., Yang, Y., Christmann, A., & Grill, E. (2009). Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science (New York, N.Y.)*, 324(5930), 1064–1068. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1172408>
- Ma, Yun, & Qin, F. (2014). ABA Regulation of Plant Responses to Drought and Salt Stresses. *Abscisic Acid: Metabolism, Transport and Signaling*, 315–336. [https://doi.org/10.1007/978-94-017-9424-4\\_16](https://doi.org/10.1007/978-94-017-9424-4_16)
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3), 473–497. <https://doi.org/10.1111/J.1399-3054.1962.TB08052.X>
- Napier, R. (2021). The Story of Auxin-Binding Protein 1 (ABP1). *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 13(12), a039909. <https://doi.org/10.1101/CSHPERSPECT.A039909>
- National Center for Biotechnology Information. (2005). PubChem Compound Summary for CID 43079, Fluridone. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Fluridone>
- National Center for Biotechnology Information. (2006). PubChem Compound Summary for CID 11628491, Abamine. PubChem. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/11628491>
- Ohkuma, K., Lyon, J. L., Addicott, F. T., & Smith, O. E. (1963). Abscisin II, an Abscission-Accelerating Substance from Young Cotton Fruit. *Science*, 142(3599), 1592–1593. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.142.3599.1592>
- Ohta, M., Guo, Y., Halfter, U., & Zhu, J. K. (2003). A Novel Domain in the Protein Kinase SOS2 Mediates Interaction with the Protein Phosphatase 2C ABI2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11771–11776. <https://doi.org/10.1073/PNAS.2034853100/ASSET/C3157DA2-B828-47EC-992E-B64E38D7EAB7/ASSETS/GRAPHIC/PQ2034853008.JPEG>
- Paciorek, T., Zažímalová, E., Ruthardt, N., Petrášek, J., Stierhof, Y. D., Kleine-Vehn, J., Morris, D. A., Emans, N., Jürgens, G., Geldner, N., & Friml, J. (2005). Auxin Inhibits Endocytosis and Promotes its Own Efflux From Cells. *Nature* 2005 435:7046, 435(7046), 1251–1256. <https://doi.org/10.1038/nature03633>
- Palmer, J. M., Warpeha, K. M. F., & Briggs, W. R. (1996). Evidence That Zeaxanthin Is Not the Photoreceptor for Phototropism in Maize Coleoptiles. *Plant Physiology*, 110(4), 1323–1328. <https://doi.org/10.1104/PP.110.4.1323>
- Pandey, S., Nelson, D. C., & Assmann, S. M. (2009). Two Novel GPCR-type G Proteins Are Abscisic Acid Receptors in Arabidopsis. *Cell*, 136(1), 136–148. <https://doi.org/10.1016/J.CELL.2008.12.026>

- Park, H. J., Kim, W. Y., & Yun, D. J. (2016). A New Insight of Salt Stress Signaling in Plant. *Molecules and Cells*, 39(6), 447. <https://doi.org/10.14348/MOLCELLS.2016.0083>
- Park, S. Y., Fung, P., Nishimura, N., Jensen, D. R., Fujii, H., Zhao, Y., Lumba, S., Santiago, J., Rodrigues, A., Chow, T. F. F., Alfred, S. E., Bonetta, D., Finkelstein, R., Provart, N. J., Desveaux, D., Rodriguez, P. L., McCourt, P., Zhu, J. K., Schroeder, J. I., ... Cutler, S. R. (2009). Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases Via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science*, 324(5930), 1068–1071. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1173041>
- Pham, V. N., Kathare, P. K., & Huq, E. (2018). Phytochromes and Phytochrome Interacting Factors. *Plant Physiology*, 176(2), 1025–1038. <https://doi.org/10.1104/PP.17.01384>
- Planes, M. D., Niñoles, R., Rubio, L., Bissoli, G., Bueso, E., García-Sánchez, M. J., Alejandro, S., Gonzalez-Guzmán, M., Hedrich, R., Rodriguez, P. L., Fernández, J. A., & Serrano, R. (2015). A Mechanism of Growth Inhibition by Abscisic Acid in Germinating Seeds of Arabidopsis Thaliana Based on Inhibition of Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase and Decreased Cytosolic pH, K<sup>+</sup>, and Anions. *Journal of Experimental Botany*, 66(3), 813–825. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERU442>
- Qi, L., Liu, S., Li, C., Fu, J., Jing, Y., Cheng, J., Li, H., Zhang, D., Wang, X., Dong, X., Han, R., Li, B., Zhang, Y., Li, Z., Terzaghi, W., Song, C. P., Lin, R., Gong, Z., & Li, J. (2020). PHYTOCHROME-INTERACTING FACTORS Interact with the ABA Receptors PYL8 and PYL9 to Orchestrate ABA Signaling in Darkness. *Molecular Plant*, 13(3), 414–430. <https://doi.org/10.1016/J.MOLP.2020.02.001>
- Rayle, D. L., & Cleland, R. (1977). Control of Plant Cell Enlargement By Hydrogen Ions. *Current Topics in Developmental Biology*, 11(C), 187–214. [https://doi.org/10.1016/S0070-2153\(08\)60746-2](https://doi.org/10.1016/S0070-2153(08)60746-2)
- Reuter, L., Schmidt, T., Manishankar, P., Throm, C., Keicher, J., Bock, A., Droste-Borel, I., & Oecking, C. (2021). Light-Triggered and Phosphorylation-Dependent 14-3-3 Association with NON-PHOTOTROPIC HYPOCOTYL 3 Is Required for Hypocotyl Phototropism. *Nature Communications*, 12(1), 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26332-6>
- Roberts, D., Pedmale, U. V., Morrow, J., Sachdev, S., Lechner, E., Tang, X., Zheng, N., Hannink, M., Genschik, P., & Liscum, E. (2011). Modulation of Phototropic Responsiveness in Arabidopsis Through Ubiquitination of Phototropin 1 by the CUL3-Ring E3 Ubiquitin Ligase CRL3(NPH3). *The Plant Cell*, 23(10), 3627–3640. <https://doi.org/10.1105/TPC.111.087999>
- Ruiz-Sola, M. Á., & Rodríguez-Concepción, M. (2012). Carotenoid Biosynthesis in Arabidopsis: A Colorful Pathway. *The Arabidopsis Book*, 10, e0158. <https://doi.org/10.1199/TAB.0158>
- Sah, S. K., Reddy, K. R., & Li, J. (2016). Abscisic Acid and Abiotic Stress Tolerance in Crop Plants. *Frontiers in Plant Science*, 7, 571. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2016.00571/BIBTEX>
- Sakai, T., & Haga, K. (2012). Molecular Genetic Analysis of Phototropism in Arabidopsis. *Plant and Cell Physiology*, 53(9), 1517–1534. <https://doi.org/10.1093/PCP/PCS111>
- Schumacher, P., Demarsy, E., Waridel, P., Petrolati, L. A., Trevisan, M., & Fankhauser, C. (2018). A Phosphorylation Switch Turns a Positive Regulator of Phototropism into an Inhibitor of the Process. *Nature Communications*, 9(1), 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04752-1>
- Seo M., & Koshiba T. (2002). Complex Regulation of ABA Biosynthesis in Plants. *Trends in Plant Science*, 7(1), 41-48. [https://doi.org/10.1016/s1360-1385\(01\)02187-2](https://doi.org/10.1016/s1360-1385(01)02187-2)
- Shang, Y., Yang, D., Ha, Y., Shin, H. Y., & Nam, K. H. (2020). Receptor-Like Protein Kinases RPK1 and BAK1 Sequentially Form Complexes with the Cytoplasmic Kinase OST1 to Regulate ABA-Induced Stomatal Closure. *Journal of Experimental Botany*, 71(4), 1491–1502. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ489>
- Shen, Y. Y., Wang, X. F., Wu, F. Q., Du, S. Y., Cao, Z., Shang, Y., Wang, X. L., Peng, C. C., Yu, X. C., Zhu, S. Y., Fan, R. C., Xu, Y. H., & Zhang, D. P. (2006). The Mg-Chelatase H Subunit Is an Abscisic Acid Receptor. *Nature*, 443(7113), 823–826. <https://doi.org/10.1038/NATURE05176>
- Shiota, H., Sudoh, T., & Tanaka, I. (2006). Expression Analysis of Genes Encoding Plasma Membrane Aquaporins During Seed and Fruit Development in Tomato. *Plant Science*, 171(2), 277-285. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2006.03.021>
- Singh, D., & Laxmi, A. (2015). Transcriptional Regulation of Drought Response: A Tortuous Network of Transcriptional Factors. *Frontiers in Plant Science*, 6, 895. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2015.00895/BIBTEX>



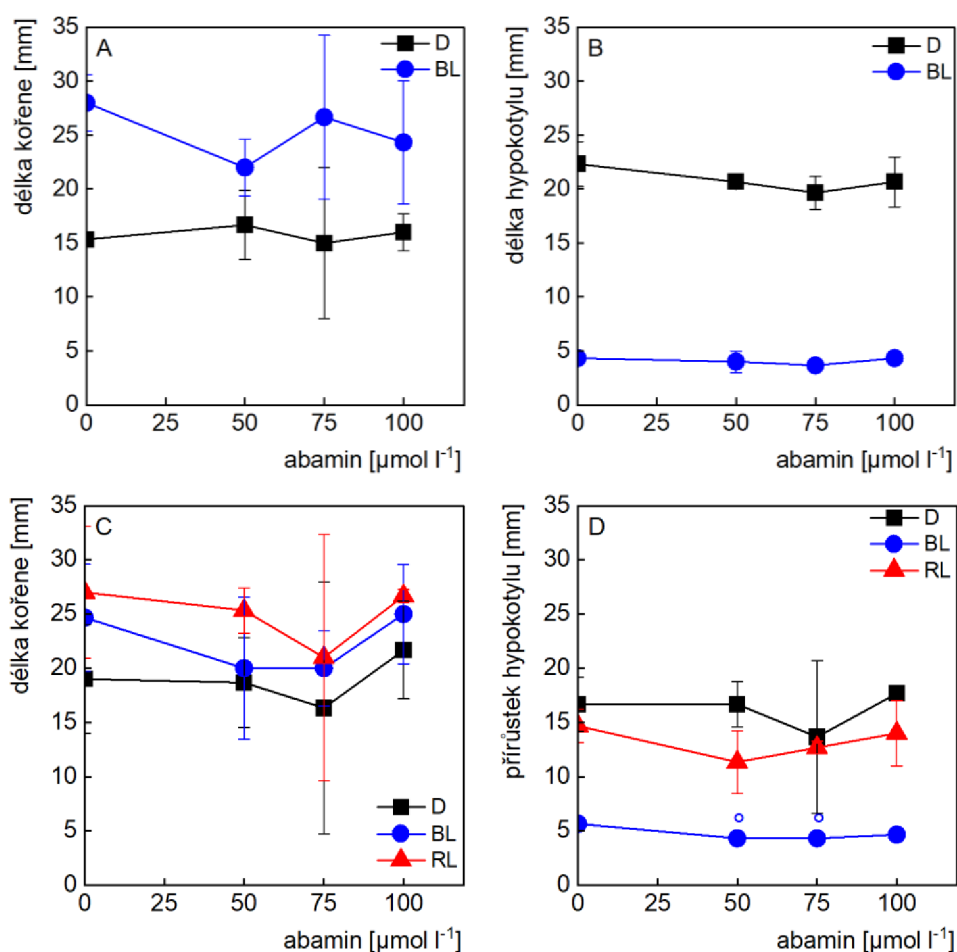
- Singla, B., Chugh, A., Khurana, J. P., & Khurana, P. (2006). An Early Auxin-Responsive Aux/IAA Gene from Wheat (*Triticum aestivum*) Is Induced by Epibrassinolide and Differentially Regulated by Light and Calcium. *Journal of Experimental Botany*, *57*(15), 4059–4070. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERL182>
- Spartz, A. K., Lee, S. H., Wenger, J. P., Gonzalez, N., Itoh, H., Inzé, D., Peer, W. A., Murphy, A. S., Overvoorde, P. J., & Gray, W. M. (2012). The SAUR19 Subfamily of SMALL AUXIN UP RNA Genes Promote Cell Expansion. *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, *70*(6), 978–990. <https://doi.org/10.1111/J.1365-313X.2012.04946.X>
- Strader, L. C., Monroe-Augustus, M., & Bartel, B. (2008). The IBR5 Phosphatase Promotes Arabidopsis Auxin Responses through a Novel Mechanism Distinct from TIR1-Mediated Repressor Degradation. *BMC Plant Biology*, *8*(1), 1–15. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-8-41/FIGURES/8>
- Strader, L. C., & Zhao, Y. (2016). Auxin Perception and Downstream Events. *Current Opinion in Plant Biology*, *33*, 8–14. <https://doi.org/10.1016/J.PBI.2016.04.004>
- Sullivan, S., Waksman, T., Paliogianni, D., Henderson, L., Lütkemeyer, M., Suetsugu, N., & Christie, J. M. (2021). Regulation of Plant Phototropic Growth by NPH3/RPT2-like Substrate Phosphorylation and 14-3-3 Binding. *Nature*, *12*(1), 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26333-5>
- Sun, J., Qi, L., Li, Y., Zhai, Q., & Li, C. (2013). PIF4 and PIF5 Transcription Factors Link Blue Light and Auxin to Regulate the Phototropic Response in Arabidopsis. *The Plant Cell*, *25*(6), 2102. <https://doi.org/10.1105/TPC.113.112417>
- Sun, N., Wang, J., Gao, Z., Dong, J., He, H., Terzaghi, W., Wei, N., Wang, X., & Chen, H. (2016). Arabidopsis SAURs Are Critical for Differential Light Regulation of the Development of Various Organs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(21), 6071–6076. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1604782113>
- Suzuki, H., Koshiba, T., Fujita, C., Yamauchi, Y., Kimura, T., Isobe, T., Sakai, T., Taoka, M., & Okamoto, T. (2019). Low-Fluence Blue Light-Induced Phosphorylation of Zmphot1 Mediates the First Positive Phototropism. *Journal of Experimental Botany*, *70*(20), 5929. <https://doi.org/10.1093/JXB/ERZ344>
- Swarup, R., & Bhosale, R. (2019). Developmental Roles of AUX1/LAX Auxin Influx Carriers in Plants. *Fro*, *10*, 1036. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01306>
- Takahashi, K., Hayashi, K. I., & Kinoshita, T. (2012). Auxin Activates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by Phosphorylation during Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*, *159*(2), 632–641. <https://doi.org/10.1104/PP.112.196428>
- Tatematsu, K., Kumagai, S., Muto, H., Sato, A., Watahiki, M. K., Harper, R. M., Liscum, E., & Yamamoto, K. T. (2004). MASSUGU2 Encodes Aux/IAA19, an Auxin-Regulated Protein That Functions Together with the Transcriptional Activator NPH4/ARF7 to Regulate Differential Growth Responses of Hypocotyl and Formation of Lateral Roots in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell*, *16*(2), 379. <https://doi.org/10.1105/TPC.018630>
- Tavidou, E., Pireyre, M., & Ulm, R. (2020). Degradation of the Transcription Factors PIF4 and PIF5 Under UV-B Promotes UVR8-Mediated Inhibition of Hypocotyl Growth in Arabidopsis. *The Plant Journal*, *101*(3), 507. <https://doi.org/10.1111/TPJ.14556>
- The Arabidopsis Information Resource (TAIR). (2003). AT3G27920(GL1). TAIR. <https://www.arabidopsis.org/servlets/TairObject?name=At3g27920&type=locus>
- Toledo-Ortiz, G., Huq, E., & Rodríguez-Concepción, M. (2010). Direct Regulation of Phytoene Synthase Gene Expression and Carotenoid Biosynthesis by Phytochrome-Interacting Factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(25), 11626–11631. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0914428107/-/DCSUPPLEMENTAL>
- Wang, X., Yu, R., Wang, J., Lin, Z., Han, X., Deng, Z., Fan, L., He, H., Deng, X. W., & Chen, H. (2020). The Asymmetric Expression of SAUR Genes Mediated by ARF7/19 Promotes the Gravitropism and Phototropism of Plant Hypocotyls. *Cell Reports*, *31*(3). <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2020.107529>
- Went, F. W., & Thimann, K. V. (1937). *Phytohormones*. The Macmillan Company. <https://doi.org/https://doi.org/10.5962/bhl.title.5695>
- Whippo, C. W., & Hangarter, R. P. (2006). Phototropism: Bending towards Enlightenment. *Plant Biotechnology*, *18*(5), 1110–1119. <https://doi.org/10.1105/tpc.105.039669>

- Yadukrishnan, P., Rahul, P. V., & Datta, S. (2020). HY5 Suppresses, Rather than Promotes, Abscisic Acid-Mediated Inhibition of Postgermination Seedling Development. *Plant Physiology*, *184*(2), 574–578. <https://doi.org/10.1104/PP.20.00783>
- Zhang, X. H., Yu, X. Z., & Yue, D. M. (2016). Phytotoxicity of Dimethyl Sulfoxide (DMSO) to Rice Seedlings. *International Journal of Environmental Science and Technology*, *13*(2), 607–614. <https://doi.org/10.1007/S13762-015-0899-6/FIGURES/3>
- Zhao, S., Zhang, Q., Liu, M., Zhou, H., Ma, C., & Wang, P. (2021). Regulation of Plant Responses to Salt Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, *22*(9), 4609. <https://doi.org/10.3390/IJMS22094609>
- Zhao, X., Zhao, Q., Xu, C., Wang, J., Zhu, J., Shang, B., Zhang, X., & Jiang, L. (2018). Phot2-Regulated Relocation of NPH3 Mediates Phototropic Response to High-Intensity Blue Light in *Arabidopsis Thaliana* FA. *Journal of Integrative Plant Biology*, *60*(7), 562–577. <https://doi.org/10.1111/jipb.12639>
- Zhu, J.-D., Wang, J., Guo, X.-N., Shang, B.-S., Yan, H.-R., Zhang, X., & Zhao, X. (2021). A High Concentration of Abscisic Acid Inhibits Hypocotyl Phototropism in *Gossypium Arboreum* by Reducing Accumulation and Asymmetric Distribution of Auxin. *Journal of Experimental Botany*, *72*(18), 6365–6381. <https://doi.org/10.1093/jxb/erab298>
- Zwiewka, M., Bilanovičová, V., Seifu, Y. W., & Nodzyński, T. (2019). The Nuts and Bolts of PIN Auxin Efflux Carriers. *Frontiers in Plant Science*, *10*, 985. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2019.00985/BIBTEX>

## Přílohy

### Příloha 1: Výsledky dvou růstových experimentů

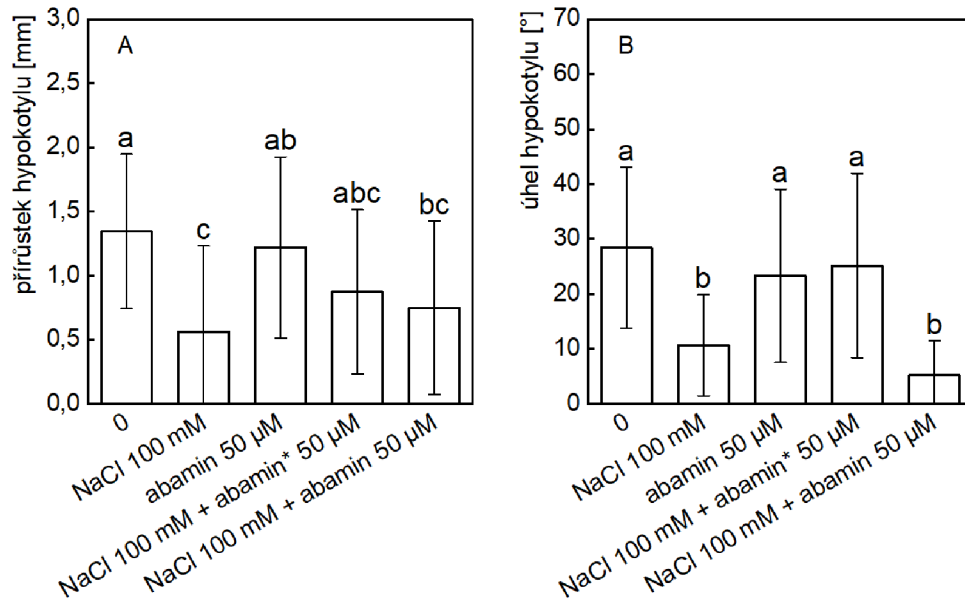
V grafech Obr. 23 jsou zobrazeny výsledky dvou zbylých růstových experimentů, ve kterých byl testován vliv abaminu na růst kořene a hypokotylu v podmínkách tmy, modrého světla a červeného světla. Hodnoty byly okomentovány v kapitole Výsledky. Z důvodů nízkého počtu rostlin nebyly u těchto dvou experimentů otestovány vždy všechny světelné podmínky a zároveň zde nebylo otestováno zasolení NaCl, proto je v kapitole Výsledky uveden pouze graf reprezentativního experimentu, ve kterém byly otestovány všechny tyto podmínky.



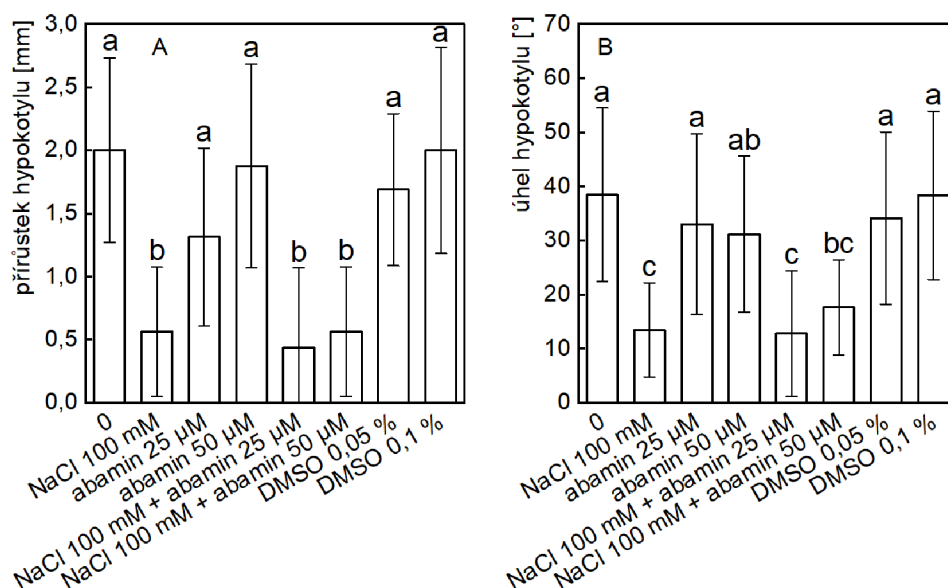
**Obr. 23.** Délky kořenů [mm] (A,C), délky hypokotylů [mm] (B) a přírůstků hypokotylů [mm] (D) desetidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po sedmi dnech kultivace ve tmě (D), na modrém světle (BL) nebo červeném světle (RL) na agarovém MS médiu s obsahem abaminu o koncentracích 0, 50, 75 a 100  $\mu\text{mol l}^{-1}$ . Zobrazeny výsledky z prvního (A,B) a třetího (C,D) růstového experimentu. Výsledky představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD z naměřených hodnot jednoho experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 3–5 rostlin. Symboly \*, °, + značí statisticky významný rozdíl naměřených délek oproti kontrolním rostlinám bez ovlivnění testovanou látkou ( $p \leq 0,05$ ; \*\*, °, ++ pro  $p \leq 0,01$ ; studentův t-test), kde \* značí statisticky významný rozdíl u rostlin kultivovaných ve D, ° u rostlin kultivovaných na BL a + u rostlin na RL.

## Příloha 2: Výsledky pěti fototropických experimentů s testováním abaminu

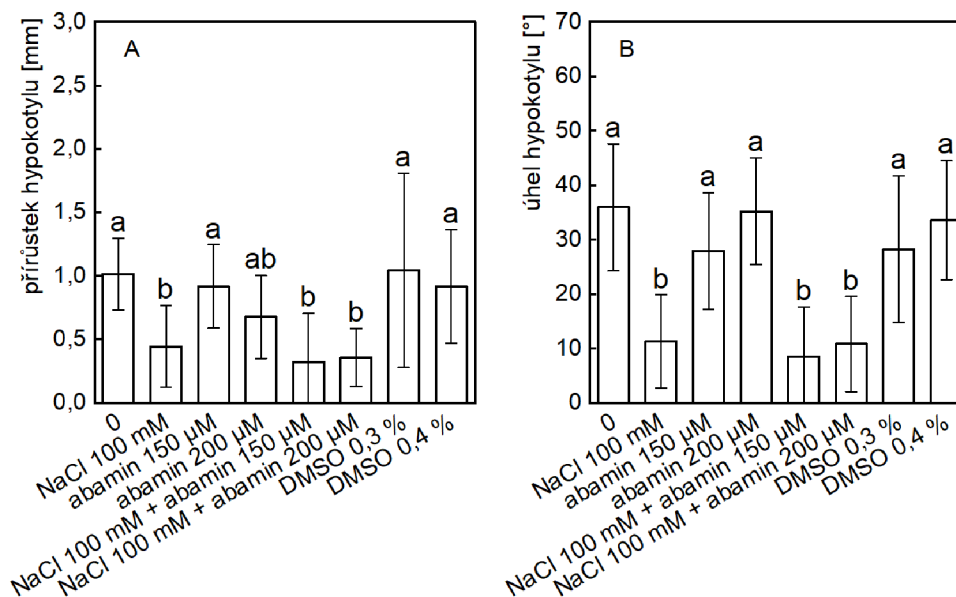
V grafech (Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27, Obr. 28) jsou uvedeny výsledky pěti zbylých fototropických experimentů, ve kterých byl testován vliv abaminu, NaCl, jejich kombinace a čistého DMSO na přírůstek a fototropický úhel hypokotyly v podmínkách jednosměrného horizontálního modrého světla. Hodnoty byly okomentovány v kapitole Výsledky, ve které je uveden pouze graf reprezentativního experimentu.



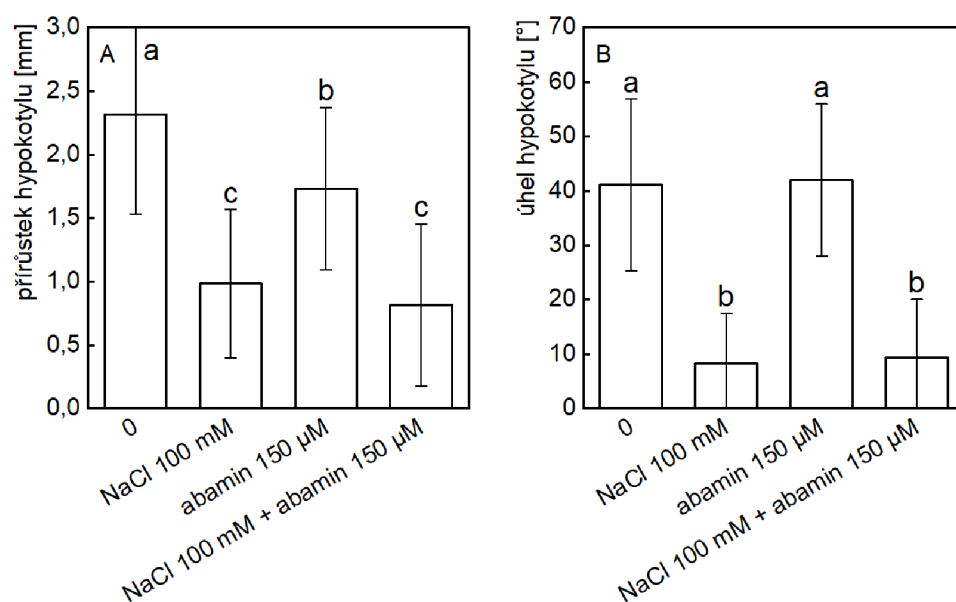
**Obr. 24. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypokotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, abaminu o koncentraci 50 µmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,1 %<sub>(v/v)</sub> a kombinace NaCl a abaminu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) s výslednou koncentrací DMSO 0,1 %<sub>(v/v)</sub> nebo 0,035 %<sub>(v/v)</sub> (označeno \*). Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin samostatného experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 32 rostlin (u kombinace NaCl + abamin 16 rostlin a NaCl + abamin\* 8 rostlin). Statisticky významné rozdíly mezi měřenými parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**



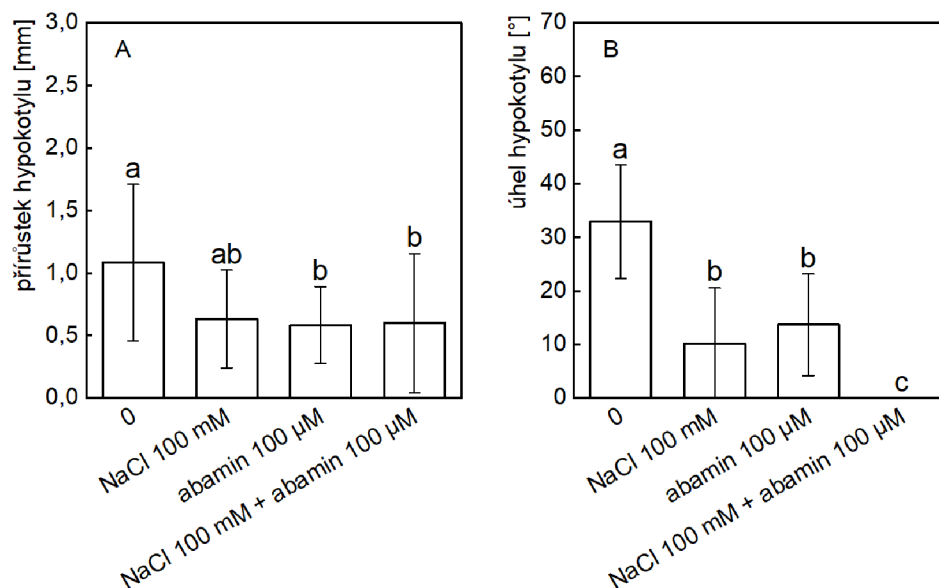
**Obr. 25. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypocotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, abaminu o koncentraci 25 µmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,05 %<sub>(v/v)</sub> nebo o koncentraci 50 µmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,1 %<sub>(v/v)</sub> a kombinace NaCl a abaminu (stejné koncentrace jako při samostatné aplikaci) nebo čistého 0,05%<sub>(v/v)</sub> a 0,1%<sub>(v/v)</sub> DMSO. Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin samostatného experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 16 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**



**Obr. 26. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypocotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, abaminu o koncentraci 150 µmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,3 %<sub>(v/v)</sub> nebo o koncentraci 200 µmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,4 %<sub>(v/v)</sub> a kombinace NaCl a abaminu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) nebo čistého 0,3%<sub>(v/v)</sub> a 0,4%<sub>(v/v)</sub> DMSO. Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin samostatného experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 16 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**



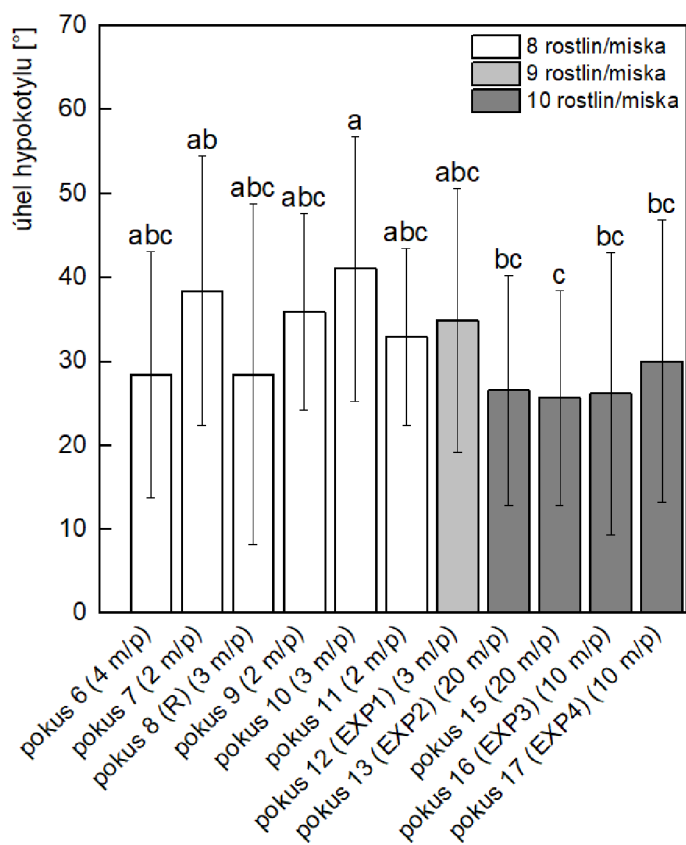
**Obr. 27. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypocotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, abaminu o koncentraci 150 μmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 0,1 %<sub>(v/v)</sub> a kombinace NaCl a abaminu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci). Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin samostatného experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 24 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**



**Obr. 28. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypocotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, abaminu o koncentraci 100 μmol l<sup>-1</sup> s výslednou koncentrací DMSO 1 %<sub>(v/v)</sub> a kombinace NaCl a abaminu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci). Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin samostatného experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 24 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**

**Příloha 3: Statistická analýza vlivu počtu rostlin v misce a počtu misek na testovanou podmínku na fototropický úhel hypokotylu.**

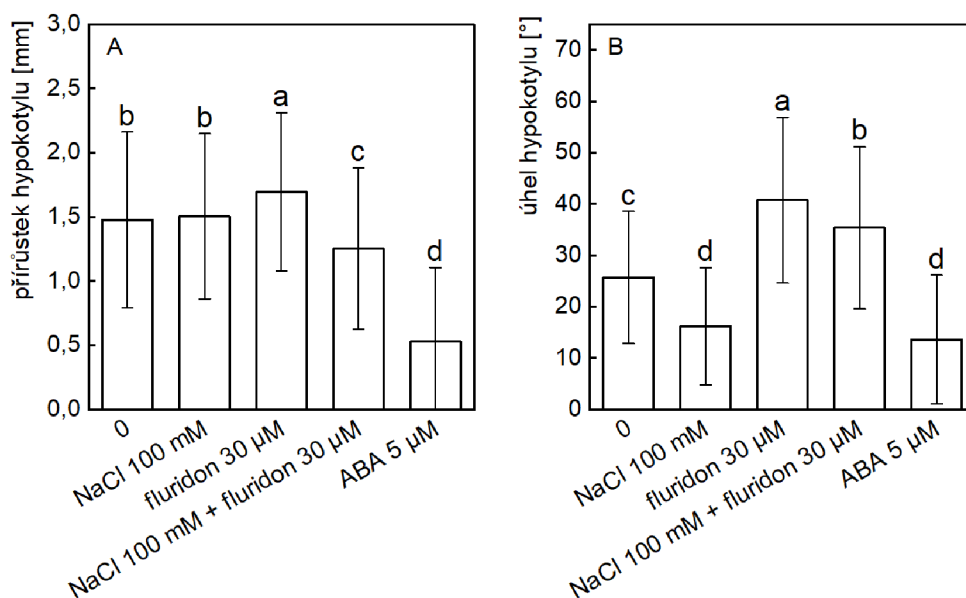
V grafu Obr. 29 je uvedena statistická analýza (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test) závislosti fototropického ohybu na množství rostlin umístěných ve velké hranaté plastové Petriho misce a na počtu Petriho misek s testovanou podmínkou celkově. Tyto parametry se mezi experimenty průběžně měnily a bylo nutné ověřit, zdali se mohou promítnout do studovaných hodnot fototropického ohybu. Pro tuto analýzu byly testovány hodnoty kontrolních rostlin ze všech fototropických experimentů a nebylo potvrzeno, že by naměřené rozdíly souvisely množstvím rostlin v misce a množstvím misek s testovanou podmínkou.



**Obr. 29. Závislost fototropického úhlu [°] hypokotylů na množství testovaných rostlin v rámci jedné Petriho misky (rostliny/miska) a na množství použitých misek na jednu podmínku (misky/podmínka; m/p) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednoměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu. Výsledky představují průměrné hodnoty  $\pm$  SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin z výsledků 11 samostatných experimentů. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test). R značí reprezentativní experiment uvedený ve výsledcích Fototropické experimenty s testováním NaCl a abaminu a EXP1–4 značí experimenty uvedené ve výsledcích fototropických experimentů s testováním NaCl, fluridonu a ABA a následných HPLC a qPCR analýz.**

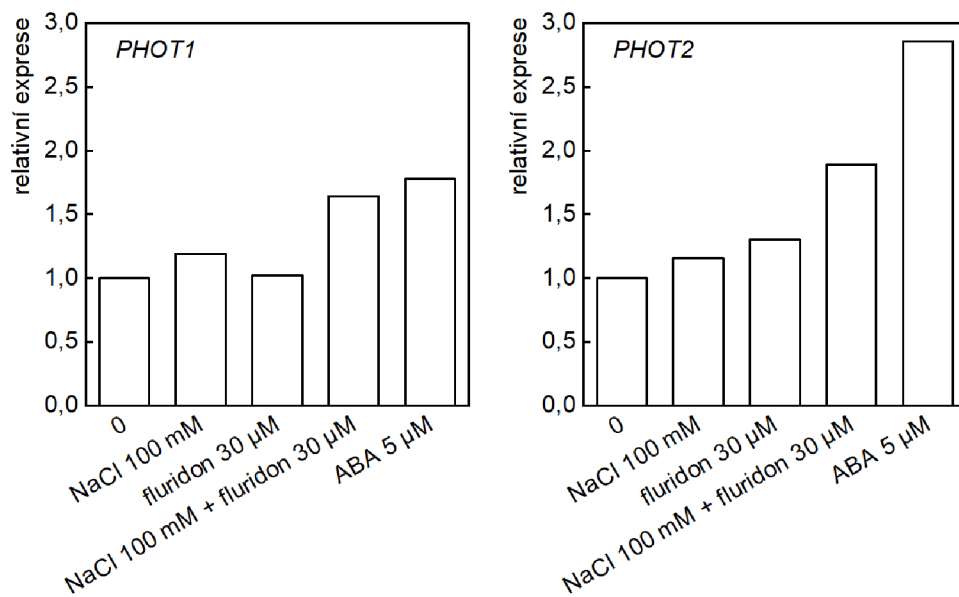
#### Příloha 4: Výsledky vyřazeného fototropického experimentu s testováním fluridonu a příslušné výsledky qPCR analýzy

V grafu Obr. 30 jsou uvedeny výsledky vyřazeného fototropického experimentu, ve kterém byl testován vliv fluridonu, NaCl, jejich kombinace a exogenní ABA na přírůstek a fototropický úhel hypokotylu v podmínkách jednosměrného horizontálního modrého světla. Data nebyla použita k hodnocení, jelikož se zde vyskytovaly některé velmi odlišné hodnoty oproti hodnotám pozorovaným v typických fototropických experimentech (slabá nebo žádná inhibice přírůstku zasolených rostlin nebo větší fototropický úhel rostlin ovlivněných NaCl společně s fluridonom oproti kontrolním rostlinám). V grafu Obr. 31 jsou poté uvedeny výsledky qPCR analýzy exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* ze směsných vzorků z hypokotylů rostlin z tohoto experimentu.



**Obr. 30. Přírůstky [mm] (A) a fototropické úhly [°] (B) hypokotylů osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 µmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 µmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují průměrné hodnoty ± SD z naměřených hodnot jednotlivých rostlin v samostatném experimentu. V experimentu bylo na jedné podmínce testováno 200 rostlin. Statisticky významné rozdíly mezi měřeními parametry jsou označeny pomocí abc systému – hodnoty, které nesdílí společné písmeno jsou statisticky významně odlišné (jednofaktorová ANOVA + Tukeyho test).**

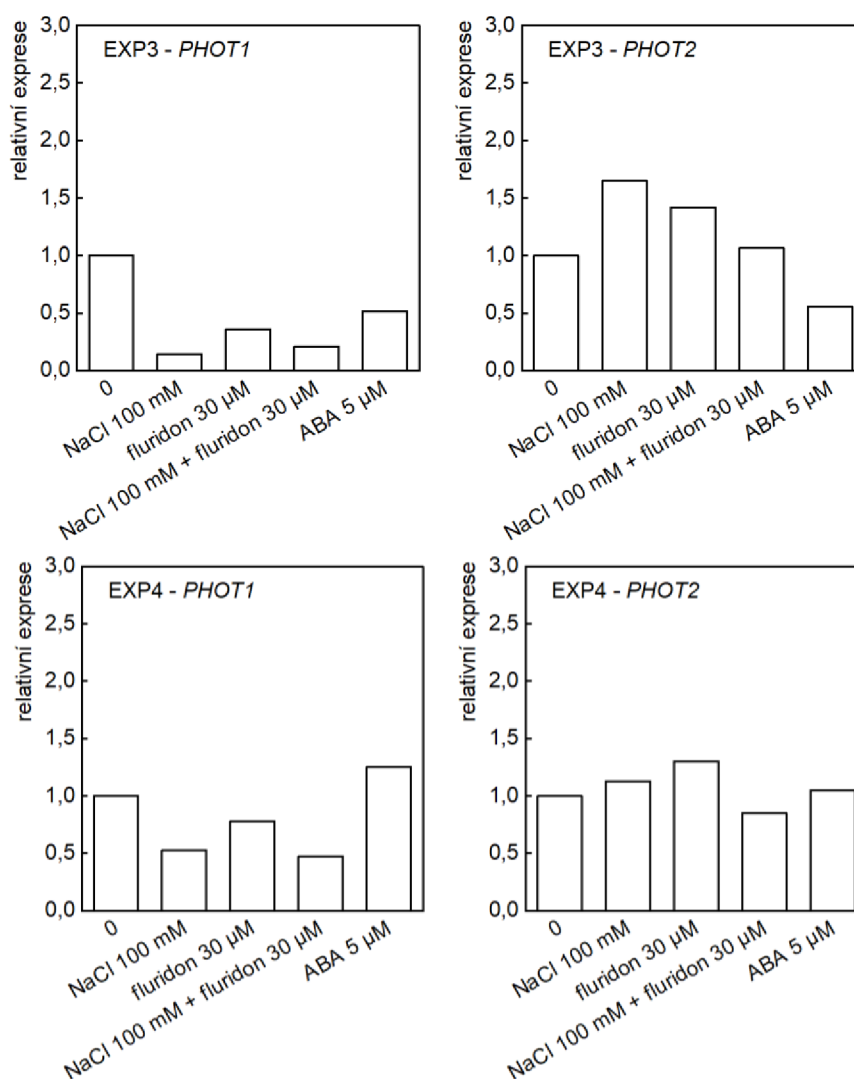




**Obr. 31. Relativní exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v prýtech (hypokotylech a kotyledonech) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 µmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 µmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují hodnoty relativní exprese (vztážené k housekeeping genu *EF1α*) z jednoho samostatného experimentu vypočítané z průměrných Ct hodnot ze 3 technických replikátů z dané testované podmínky. Statistická analýza nebyla provedena z důvodu nízkého počtu experimentů.**

## Příloha 5: Výsledky qPCR analýzy s kontrolním genem *UBC*

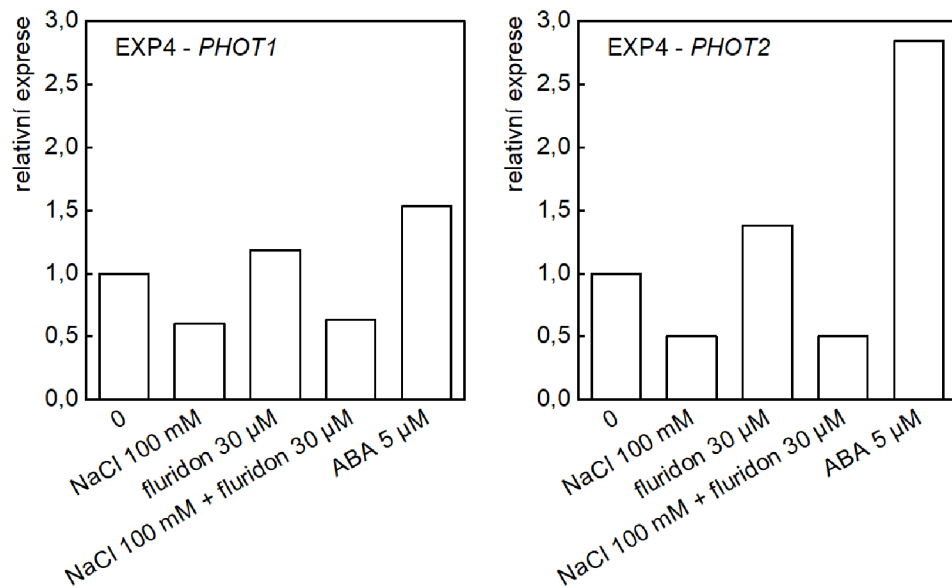
V grafech na Obr. 32 jsou uvedeny vyřazené výsledky qPCR analýzy dvou experimentů, ve kterých byl testován vliv fluridonu, NaCl, jejich kombinace a exogenní ABA na relativní expresi *PHOT1* a *PHOT2* vůči kontrolnímu housekeeping genu *UBC* v prýtech a její spojitost s přírůstkem a fototropickým úhlem hypokotylu v podmínkách jednosměrného horizontálního modrého světla. Data nebyla použita k výslednému hodnocení, jelikož se hodnoty mezi jednotlivými experimenty velmi lišily, zároveň byly hodnoty odlišné od relativní exprese vůči genu *EF1 $\alpha$* , a také protože měl primer genu *UBC* nižší teplotu tání. V kapitole Výsledky jsou proto uvedeny pouze hodnoty relativní exprese vůči genu *EF1 $\alpha$* .



**Obr. 32. Relativní exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v prýtech (hypokotylech a kotyledonech) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejné koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5  $\mu$ mol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují hodnoty relativní exprese (vztahované k housekeeping genu *UBC*) ze dvou samostatných experimentů (EXP3 a EXP4) vypočítané z průměrných Ct hodnot ze 3 technických replikátů z dané testované podmínky. Mezi EXP3 a EXP4 došlo ke změně teploty v jedné části programu qPCR pro gen *UBC* (Viz 3.6.4.2). Statistická analýza nebyla provedena z důvodu nízkého počtu experimentů.**

## Příloha 6: Výsledky qPCR analýzy s kontrolním genem *EF1α*

V grafu Obr. 33 jsou uvedeny výsledky qPCR analýzy jednoho z fototropických experimentů (EXP4), ve kterém byl testován vliv fluridonu, NaCl, jejich kombinace a exogenní ABA na relativní expresi *PHOT1* a *PHOT2* vůči kontrolnímu housekeeping genu *EF1α* v prýtech a její spojitost s přírůstkem a fototropickým úhlem hypokotyly v podmínkách jednosměrného horizontálního, modrého světla. Hodnoty byly okomentovány v kapitole Výsledky, ve které je uveden pouze graf reprezentativního experimentu (EXP3).



**Obr. 33. Relativní exprese genů *PHOT1* a *PHOT2* v prýtech (hypokotylech a kotyledonech) osmidenních rostlin *Arabidopsis*, genotypu *gl-1* po 24 hodinách kultivace na jednosměrném horizontálním modrém světle (BL) na agarovém MS médiu s obsahem NaCl o koncentraci 100 mmol l<sup>-1</sup>, fluridonu o koncentraci 30 μmol l<sup>-1</sup>, kombinace NaCl a fluridonu (stejně koncentrace jako při samostatné aplikaci) a exogenní ABA o koncentraci 5 μmol l<sup>-1</sup>. Výsledky představují hodnoty relativní exprese (vztažené k housekeeping genu *EF1α*) z reprezentativního experimentu (EXP4) vypočítané z průměru Ct hodnot ze 3 technických replikátů z dané testované podmínky. Statistická analýza nebyla provedena z důvodu nízkého počtu experimentů.**