

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Diplomová práce

OLMOUC 2018

Bc. Kateřina Kolářová

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Světlem regulovaná signalizace brassinosteroidů během
fotomorfogeneze hypokotylu rajčete**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Kolářová
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2018

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Kateřina Kolářová
Název práce	Světlem regulovaná signalizace brassinosteroidů během fotomorfogeneze hypokotylu rajčete
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	<p>Předkládaná magisterská práce se věnuje interakci brassinosteroidní signální dráhy a modrého světla v růstu a vývoji rostlin. V teoretické části jsou popsány rostlinné hormony brassinosteroidy, fotoreceptory, interakce brassinosteroidní a světelné signální dráhy a mutantní rostliny rajčete. Experimentální část zahrnuje analýzu exprese genu pro brassinosteroidový receptor <i>BRI1</i> v hypokotylech fotomorfogenních mutantů <i>cry1-1</i>, <i>cry1-2</i>, <i>hpl</i> v závislosti na světelných podmínkách. K expresní analýze byla použita metoda qRT-PCR. Výsledky experimentů vedou k závěru, že modré světlo pravděpodobně snižuje expresi genu <i>BRI1</i> v hypokotylech rajčete cv. MM, a to prostřednictvím fotoreceptoru <i>CRY1a</i>, a že i ve tmě, neaktivovaný <i>CRY1a</i>, expresi <i>BRI1</i> redukuje.</p>
Klíčová slova	brassinosteroidy, <i>BRI1</i> , <i>cry1-1</i> , <i>cry1-2</i> , exprese genů, <i>hpl</i> , modré světlo, qRT-PCR, <i>Solanum lycopersicum</i>
Počet stran	52
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Kateřina Kolářová
Title of thesis	Light-regulated brassinosteroid signaling during tomato hypocotyl photomorphogenesis
Type of thesis	Master
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	<p>Presented Master's thesis studies interaction between brassinosteroid and blue light signalling during growth and development of plants. Theoretical part of thesis consists of literature review about hormones brassinosteroids, photoreceptors, interactions between blue light and brassinosteroid signalling pathways and tomato mutants. Experimental part presents expression analysis of gene for brassinosteroid receptor <i>BRI1</i> in hypocotyls of photomorphogenic mutants <i>cry1-1</i>, <i>cry1-2</i>, <i>hp1</i> as a function of light conditions. For the analysis, qRT-PCR method was used. The results of experiments led to the conclusion that blue light probably reduces <i>BRI1</i> expression in tomato hypocotyls cv. MM via CRY1a photoreceptor, and that in the dark, e.g. inactivated CRY1a, reduces <i>BRI1</i> expression as well.</p>
Keywords	blue light, brassinosteroid, <i>BRI1</i> expression, <i>cry1-1</i> , <i>cry1-2</i> , <i>hp1</i> , tomato, signalling pathways, qRT-PCR
Number of pages	52
Number of appendices	0
Language	Czech

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

V Olomouci dne

Podpis

Poděkování:

Tímto bych chtěla poděkovat prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady a zkušenosti, trpělivost a čas, který věnoval konečnému revidování diplomové práce.

Dále bych chtěla poděkovat ostatním členům Laboratoře molekulární fyziologie, Mgr. Marcele Žaludové a Mgr. Pavle Pokorné, za pomoc při experimentech a přínosné rady.

Obsah

Seznam zkratk	8
1. Úvod	10
2. Brassinosteroidy	11
2.1 Fyziologická aktivita brassinosteroidů	12
2.2 Biosyntéza brassinosteroidů	14
2.3 Brassinosteroidní signální dráha	16
3. Světlo	19
3.1 Fytochromy	19
4. Materiál a metody	25
4.1 Rostlinný materiál	25
4.2 Pracovní postupy	27
4.2.1 Příprava média	27
4.2.2 Výsev semen a přenos rostlin	27
4.2.3 Izolace a purifikace RNA	28
4.2.4. Syntéza cDNA	31
4.2.5 Exprese genu <i>BR11</i>	32
5. Výsledky	34
5.1 Exprese genu <i>BR11</i> u mutantů <i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i>	34
5.2 Exprese genu <i>BR11</i> u mutantu <i>hpl</i>	35
6. Diskuze	37
7. Závěr	39
8. Citace	40

Seznam zkratek

BAK1	BRI1 KINASE 1
BES1	BRI1-EMS Suppressor 1
BIN	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 2
BKI1	BRI1 KINASE INHIBITOR 1
BKK1	BAK1-LIKE
BL	blue light
BRI1	BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1
BRs	brassinosteroidy
BSK1	BR SIGNALLING KINASE 1
bZIP	transkripční regulátor
BZR1,2	BRASSINAZOLE-RESISTANT 1,2
CD	cytoplazmatická kinázová doména
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENESIS 1
<i>cpd</i>	constitutive photomorphogenesis and dwarfism
CRY1,2	krytochrom 1, 2
CS	kastasteron
cv. MM	kultivar MoneyMaker
DDB1	UV-damaged DNA binding protein 1
<i>det2</i>	de-etiolated 2
FLIM	Fluorescence Lifetime Imaging
FMN	flavinmononukleotid
FR	dlouhovlnné červené světlo
FRET	Förstrův rezonanční přenos energie
FSL	flagellin sensing
HIR	reakce k vysoké ozáření (high irradiance response)
<i>hpl</i>	high pigment 1
HY4,5	elongated hypocotyl 4,5
LFR	reakce k nízké ozáření (low-fluence response)

LRR	leucin-rich repeat
MAX2	MORE AXILLARY GROWTH LOCUS 2
MES	Morpholinoethane sulfonic acid
MS	Murashige-Skoog médium
Pfr	aktivní forma monomeru fytochromů
PHOT1,2	phototropin 1,2
PHR	DNA fotolyáza
PHYA-E	členové rodiny fytochromů
PIF	PHYTOCHROME INTERAKTIVE FACTOR
Pr	inaktivní forma monomeru fytochromů
R	červené světlo
RLKs	receptor leucin-rich repeat
RTKs	receptor tyrosine kinases
SERK1-4	SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASES 1-4
SINAT	<i>SINA</i> of <i>Arabidopsis thaliana</i>
TGF- β	transformující růstový faktor
UV-A	ultrafialové světlo 420 – 320 nm
UV-B	ultrafialové světlo 320 – 280 nm
VLFR	reakce k velmi nízké ozáření (very low-fluence response)
WT	wild-type

1. Úvod

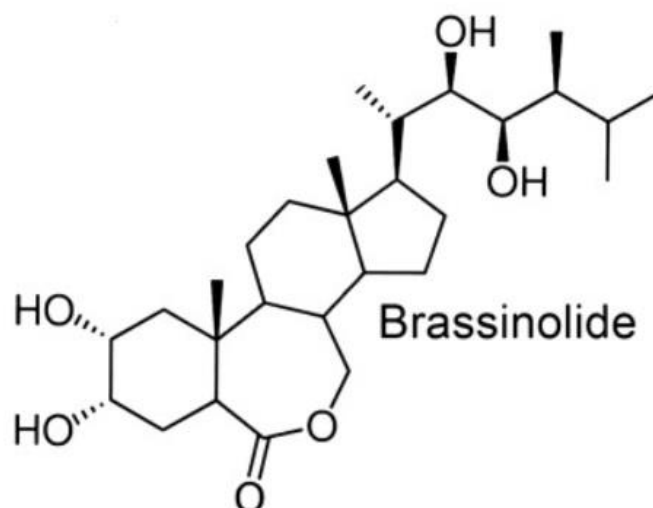
Předložená diplomová práce se věnuje studiu interakcí mezi signálními drahami modrého světla a rostlinných hormonů brassinosteroidů ve vývoji a růstu rostlin. Brassinosteroidy ovlivňují biologické procesy v rostlinách již při velmi nízkých koncentracích. Působí stimulačně na prodlužování buněk, růst pylové láčky, buněčné dělení a regeneraci buněčné stěny (Singh and Savaldi-Goldstein, 2015). V předchozích pracích bylo zjištěno, že modré světlo snižuje endogenní hladinu brassinosteroidů a intenzitu exprese genu *BRI1* v hypokotylu rajčete kultivaru Rutgers. Modré světlo také snižuje citlivost rostlin k exogenním brassinosteroidům, čímž zastavuje prodlužování buněk (Pilařová, 2014). Je tedy zřejmé, že světelné a brassinosteroidové signální dráhy spolu interagují. Cílem experimentální části této diplomové práce bylo zjistit, prostřednictvím kterých fotoreceptorů a signálních drah modré světlo na úrovni RNA ovlivňuje expresi receptorů *BRI1* v hypokotylu rajčete. K experimentům byl použit genetický přístup spočívající v analýze mutantů. Byli proto zvoleni fotomorfogenní mutanti *cry1-1* a *cry1-2*, s defektem ve fotoreceptoru modrého světla *CRY1a* a vyznačující se redukovanou citlivostí k modrému světlu (Weller *et al.*, 2001; Facella *et al.*, 2012). Dále byl také použit mutant *hpl* s defektem v genu *DDB1*, který má naopak zvýšenou reakci fytochromů ke světlu a současně ukazuje zesílenou fototropickou reakci (Kendrick *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004). Výsledky experimentů naznačují, že u kontrolního kultivaru Money Maker nebyla hladina exprese *BRI1* významně ovlivněna modrým světlem, i když bylo na modrém světle pozorováno mírné zvýšení hladiny *BRI1* mRNA. Výsledky experimentů dále ukázaly, že v rostlinách mutanta *cry1-1* rostoucích ve tmě byla exprese *BRI1* 4-krát vyšší než u cv. MM, kdežto na modrém světle byla exprese pouze 2-krát vyšší než u cv. MM. U mutanta *cry1-2* byla exprese *BRI1* ve tmě srovnatelná s cv. MM, kdežto na modrém světle bylo pozorováno opět snížení. Z těchto výsledků vyplývá, že modré světlo pravděpodobně snižuje expresi *BRI1* v hypokotylech rajčete cv. MM, a to prostřednictvím fotoreceptoru *CRY1a*. Tento závěr bude muset být potvrzen dalšími experimenty. Z provedených experimentů také vyplývá, že neaktivovaný *CRY1a* ve tmě expresi *BRI1* snižuje.

Předkládaná diplomová práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí pracoviště Laboratoře růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

2. Brassinosteroidy

Brassinosteroidy (BRs) jsou skupina polyhydroxylovaných steroidních fytohormonů, které mají podobnou strukturu jako živočišné steroidy. Brassinosteroidy regulují širokou škálu fyziologických procesů včetně růstu, vývoje a imunity rostlin (Tang *et al.*, 2016). Také se podílejí na regulaci metabolismu v oxidaci radikálů u rostlin, syntéze ethylenu a gravitropické odpovědi kořenů. Důležitou úlohu hrají pro odpovědi rostliny na stres, jako mraz, sucho, salinita, choroby, nedostatek tepla a živin (Krishna, 2003; Ashraf *et al.*, 2010; Bajguz *et al.*, 2009).

Brassinosteroidy byly poprvé izolovány z pylu brukve řepky (*Brassica napus L.*) (Mitchell *et al.*, 1970). Pomocí rentgenové krystalografie se zjistilo, že se jedná o steroidní látku podobnou živočišným steroidním hormonům a sloučenina s nejvyšší biologickou aktivitou byla pojmenována brassinolid (Obr.1) (Grove *et al.*, 1979).



Obr. 1: Chemická struktura brassinolidu (Kutschera and Wang, 2012)

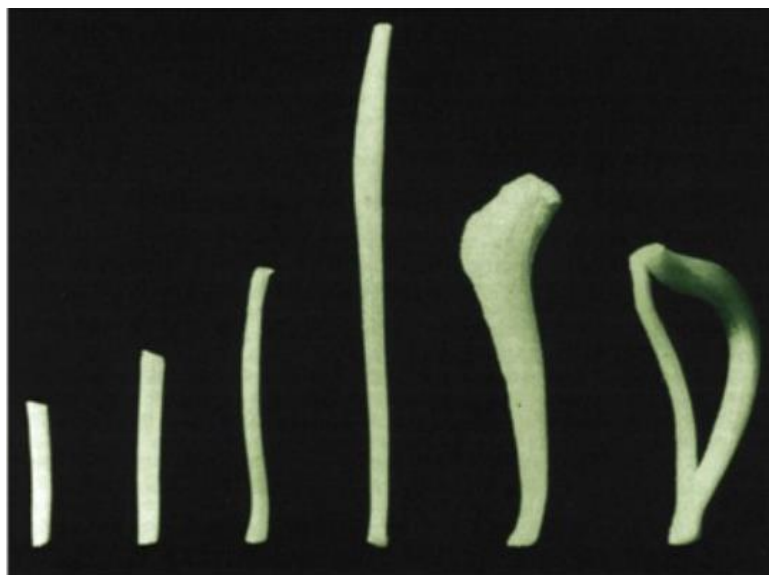
V roce 1991 byly publikovány první zprávy o experimentech týkajících se exogenní aplikace BRs na rostliny následovanou růstovou reakcí (Clouse and Zurek, 1991). Díky mutantům *Arabidopsis thaliana* se později zjistilo, že se jedná o esenciální endogenní rostlinný hormon. Defektní fenotyp, který měl například potlačenou etiolizaci (*det2*) nebo zakrslý růst (*cpd*), byl exogenní aplikací BRs eliminován (Obr. 2). Byly tedy poskytnuty přesvědčivé genetické a biochemické důkazy, že BRs jsou nezbytné pro normální růst a vývoj rostlin. Brassinosteroidy byly většinou vědců přijaty za novou třídu rostlinného hormonu (Clouse *et al.*, 1996).



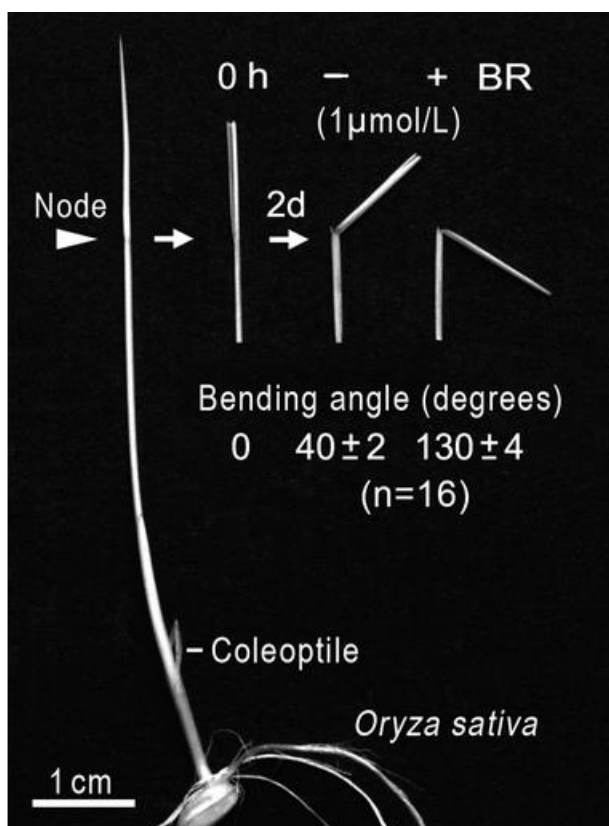
Obr. 2: Fenotyp BR-mutantních rostlin *Arabidopsis thaliana* a standartního genotypu (WT) rostoucích na světle (Clouse, 2011).

2.1 Fyziologická aktivita brassinosteroidů

Fyziologická aktivita brassinosteroidů nastává již při velmi nízkých koncentracích. Tato aktivita byla studována díky BR-deficientním a BR-insenzitivním mutantům *Arabidopsis thaliana* (Clouse *et al.*, 1996; Li *et al.*, 1996; Szekeres *et al.*, 1996). BR-deficientní mutant (*det2*) a mutant *cpd* vykazovali jisté a podobné fenotypy, a to fotomorfogenický vývoj ve tmě a extrémní zakrslý vzrůst. Z těchto výsledků bylo zjištěno, že BRs hrají důležitou roli ve světelně regulovaném růstu, prodlužování buněk, klíčení semen, tvorbě průduchů, kvetení a fertilitě (Wang *et al.*, 2012). Pro oddělení aktivních BRs a neaktivních prekurzorů nebo metabolitů, bylo provedeno několik biotestů jako prodlužování druhého internodia fazole (Thomson *et al.*, 1981) (Obr. 3), ale i test odchylky jazýčku rýže (Wada *et al.*, 1981) (Obr. 4).



Obr. 3: Biotest prodlužování druhého internodia fazole. Internodia byla ponořena do koncentrace BRs. Při nízké koncentraci se internodia prodlužovala a při vyšších koncentracích měla kyjovitý tvar až se rozdujovala (Taiz and Zeiger, 2006).



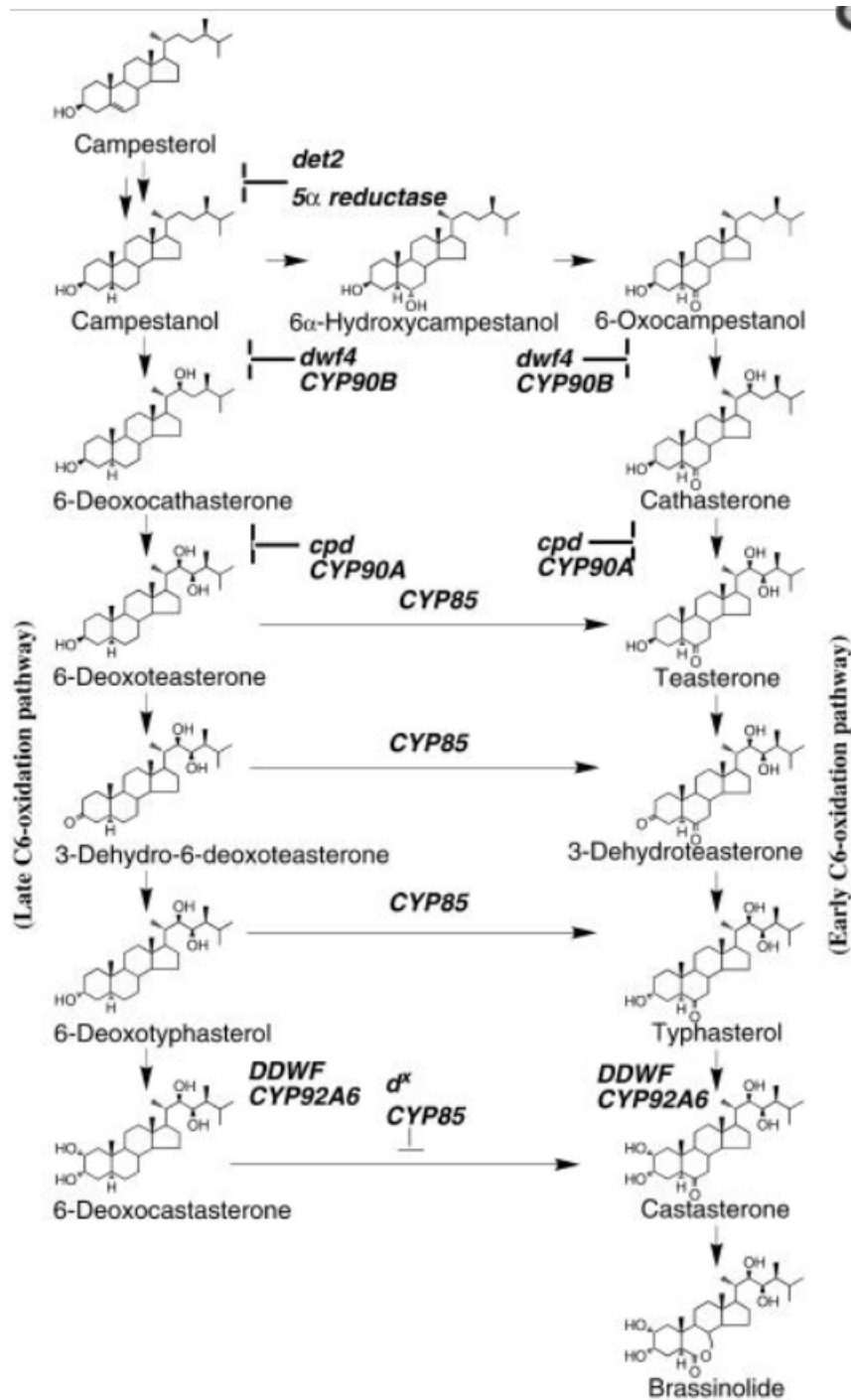
Obr. 4: Biotest odchytky jazýčku rýže (*Oryza sativa* L.) (Kutschera and Wang, 2012).

Mezi aktivní přírodní BRs se řadí i kastasteron (CS), který je prekurzorem brassinolidu. Nynější studie ukazují, že BL má vysokou aktivitu v rýži a předpokládá se, že CS by mohl být konečným produktem BRs (Nakamura *et al.*, 2017).

Také byly syntetizovány analogy brasinosteroidů, 6a-carbaBL a 6-deoxo-6a-oxo-6a-carbaBL, s různými aktivitami u *Arabidopsis*, mutanta *det2*. Byl proveden test elongace hypokotyly u *Arabidopsis* a text odchylek jazýčků rýže (Seto *et al.*, 2002). Na základě tohoto výzkumu byly pak provedeny analýzy dalších analogů, iso-carbaBL a 6-deoxybrassinolidu, založené na vazebné analýze BRI1 u *Arabidopsis* a rýže a porovnávání hladin exprese u markerových genů BR. Bylo zjištěno, že iso-carbaBL je neaktivní v celém těle rostlin rýže, avšak 6-deoxoBL zajistil normální růst mutanta *det2* a jeho aktivita byla srovnatelná s aktivitou BL, nejaktivnějšího přírodního BR. Bylo potvrzeno, že brassinosteroidní aktivita těchto analogů je zprostředkována BRI1, hlavním receptorem BR v *Arabidopsis*. Byly provedeny testy elongace hypokotyly u deficientního mutanta BRI1 (*bri1-5*), který se vykazuje nízkou hladinou BR receptoru. Protažení hypokotylů stimulované iso-carbaBL bylo téměř potlačeno u *bri1-5* a při vysokých koncentracích BL a 6-deoxoBL bylo prodloužení hypokotyly indukováno dokonce i u mutanta *bri1-5* (Nakamura *et al.*, 2017).

2.2 Biosyntéza brassinosteroidů

Je známo více než 70 druhů přirozeně se vyskytujících BRs. Tyto sloučeniny nesou kyslíkovou skupinu v poloze C-3, ale mohou být i na jiných pozicích jako C-2, C-6, C-22 nebo C-23 (Bishop and Yokota, 2001). Na základě struktury postranního řetězce a stereochemie, široké distribuce v rostlinné říši a relativní biologické aktivity v biologických testech bylo zjištěno, že rostlinný sterol campesterol je konvertován na brassinolid prostřednictvím teasteronu, typhasterolu a kastasteronu (Yokota *et al.*, 1991) (Obr. 5). Kromě toho bylo zjištěno, že oxidace C-6 se může vyskytovat před (časná oxidační dráha) nebo po (pozdní oxidační dráha) hydroxylaci postranního řetězce (Fujioka and Yokota, 2003).



Obr. 5: Průběh biosyntézy brassinolidu s časnou a pozdní fází (Noguchi et al., 2000; Shimada et al., 2001)

2.3 Brassinosteroidní signální dráha

Brassinosteroidy jsou součástí mnoha vývojových procesů a signálních drah, jež jsou i nadále intenzivně zkoumány a jejich výzkum rapidně stoupl od objevení BR receptoru. BR receptorové kinázy na povrchu buněk aktivují transkripční faktory, které regulují expresi více než tisíce genů (Clouse *et al.*, 2011).

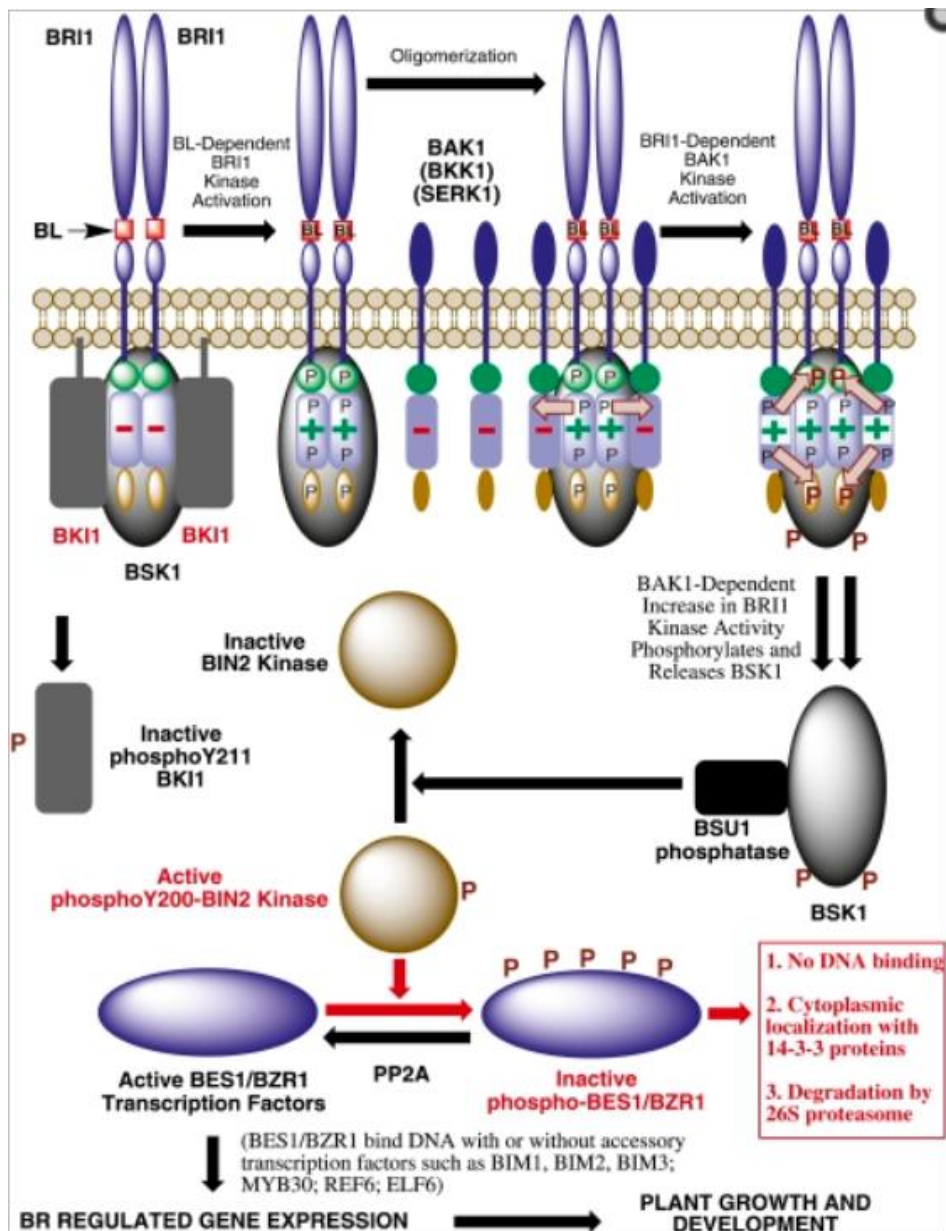
BRs jsou vázány na povrchový receptor BRI1 (BRASSINOSTEROID INSENSITIVE1), který je členem skupiny proteinů zvaných leucin-rich repeat receptorové kinázy LRR RLKs (Shiu *et al.*, 2004; Belkhadir and Chory, 2006). BRI1, stejně jako ostatní rostlinné LRR RLKs, má podobnou organizaci funkčních domén jako savčí receptorové kinázy (RTKs) a kinázy transformující růstový faktor β (TGF- β) (Pawson, 2004; Hubbard and Miller, 2007), které mají extracelulární doménu vázající ligand, oligomer, transmembránovou sekvenci s jedním průchodem a cytoplazmatickou kinázovou doménu (CD). CD má katalytickou doménu a další regulační sekvence: juxtamembránovou oblast a C-terminální doménu (Vert *et al.*, 2005). BRs iniciují signální dráhu tím, že se přímo vážou na motiv v extracelulární doméně BRI1, což vede k fosforylaci a aktivaci BRI1-CD a transdukcii signálu pomocí fosforylace intracelulární kinázy a přenosu do jádra, kde transkripční faktory reagující na BRs modifikují expresi genu, které podporují prodloužení, rozdělení a diferenciaci buněk (Li and Nam, 2002; He *et al.*, 2005; Kinoshita *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005; Vert and Chory, 2006).

BRI1 existuje v rostlinných membránách i jako homodimer nezávislý na ligandu a je stabilizován a aktivován vazbou na BRs (Russeinova *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2005a; Hink *et al.*, 2008). Pro úplnou expresi je nutná heterooligomerizace BRI1 s členy subrodiny SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE (SERK) LRR RLKs (Hecht *et al.*, 2001). Do této rodiny patří také receptor BRI1 KINASE1 (BAK1), známý jako SERK3 a interaguje *in vivo* i *in vitro* s BRI1 (Li *et al.*, 2002; Nam and Li, 2002; Russeinova *et al.*, 2004). SERK4, nazvaný BAK1-LIKE (BKK1), také interaguje s BRI1 *in vivo* a to způsobem závislým na BRs (He *et al.*, 2007). BAK1 interaguje i s jinými LRR RLKs, včetně FLS2, a podporuje reakce na obranu rostliny (Heese *et al.*, 2007; Chinchilla *et al.*, 2009; Bar *et al.*, 2010; Postel *et al.*, 2010; Schulze *et al.*, 2010). Navíc SERK1, o němž je známo, že se podílí na embryogenezi, také heterodimerizuje s BRI1 a zvyšuje tak BRs signalizaci (Karlova *et al.*, 2006), což naznačuje, že SERK jsou obecně koreceptory, které regulují více nezávislých cest sdružením s různými LRR-RLKs (Li, 2010).

Řada *in vitro* testů ukázala, že BAK1 stimuluje aktivitu BRI1 a oba se mohou navzájem fosforylovat na specifických zbytcích (Wang *et al.*, 2008). Byly objeveny fosforylační místa pro BAK1 i BRI1 a kinázové aktivační smyčky, které jsou nezbytné pro funkci a BRs signalizaci v rostlině (Wang *et al.*, 2005b). Vytvořil se model sekvenční fosforylační interakce BRI1/BAK1 (Obr. 6), který ukazuje, že rostlinné receptorové kinázy mají některé vlastnosti RTK a TGF- β (Wang *et al.*, 2008). BRI1 i BAK1 autofosforylace tyrosinových zbytků mutační analýzou prokázala, že Tyr fosforylace reguluje funkci BAK1 *in vivo* (Oh *et al.*, 2010).

Jedním z hlavních efektů BR signální dráhy je inaktivace kinázy BRASSINOSTEROID INSENSITIVE2 (BIN2), identifikovaný jako negativní regulátor transkripce (Li and Nam, 2002). Inaktivace BIN2 vede k aktivaci dvou transkripčních faktorů BRASSINAZOLE-RESISTANT1 (BZR1) (Wang *et al.*, 2002; He *et al.*, 2005) a BRI1-EMS SUPPRESSOR1 (BES1) (Yin *et al.*, 2002; Yin *et al.*, 2005), také známý jako BZR2 (Wang *et al.*, 2002).

Mezi další negativní regulátory se řadí BRI1 KINASE INHIBITOR1 (BKII). BKII inaktivuje kinázovou doménu BRI1 vazbou na C-terminální segment, mimo katalytické místo. Tento segment je důležitý ke snížení schopnosti BRI1 asociovat se s BAK1 *in vivo*, dokonce i v nadbytku ligandu (Jaillais *et al.*, 2011). Původně se zdálo, že vazba BKII na tento konec inhibuje interakci BRI1 a BAK1. Nyní se spíše prokazuje, že BKII negativně reguluje BR signalizaci tím, že znemožňuje vazbu BAK1 na BRI1. Nestrukturované proteiny, jako je BKII jsou tak považovány za silné a všestranné regulátory proteinové funkce (Wang *et al.*, 2005a, b; Oh *et al.*, 2009, 2010, 2012, 2014). Interakce mezi BRI1 a BAK1 byly studovány pomocí metod FRET a FLIM (Bucherl *et al.*, 2013). Tyto přístupy ukázaly, že „off-ligandové“ hetero-oligomery BRI1 – BAK1 existují ve velkém množství na povrchu buněk. Takže při nepřítomnosti BRs se BRI1 snadno spojuje s BAK1, případně s BKII.



Obr. 6: Model BR signální dráhy – brassinolid se váže na extracelulární doménu receptoru BRI1, která fosforyluje negativní regulátor BKI1 na Y211, čímž ho uvolňuje z membrány a umožňuje asociaci BRI1 s BAK1 nebo jeho homology BKK1 a SERK1. BRI1 a BAK1 se fosforylují navzájem na specifických zbytcích, což zvyšuje signalizační schopnost BRI1 a vede k fosforylaci BSK1 a jeho uvolnění z komplexu. Aktivovaný BSK1 se spojuje a aktivuje BSU1, který defosforyluje BIN2 na Tyr-200 a deaktivuje ji. Nefosforylované formy transkripčních faktorů BES1 a BZR1 se akumulují a váží se na promotory BR-regulovaných cílových genů a vyvolají specifickou fyziologickou odpověď. Pozitivní regulátory jsou značeny černě, negativní červeně (Clouse et al., 2011).

3. Světlo

Světlo je důležitým faktorem, který ovlivňuje vývoj a růst rostlin. Je to viditelné elektromagnetické záření, které má vlnovou délku 380 – 740 nm (Pavlová, 2005). Rostlinám dodává energii a je důležité pro fotosyntézu. Působí však i jako signál a kontroluje růst, vývoj a diferenciaci rostlin (fotomorfogeneze) (Schäfer and Nagy, 2006).

Oblast spektra, která má nejvýznamnější vliv na růst a vývoj rostlin, je oblast modrého světla (BL). Jeho vlnové délky jsou v rozmezí 400 – 500 nm. Dále se zde řadí oblast červeného světla (R) s vlnovou délkou 650 – 680 nm a oblast dlouhovlnného červeného světla (FR) s vlnovou délkou v rozmezí 710 – 740 nm (Russell *et al.*, 2013). Fotoreceptory, zaznamenávající červené krátkovlnné a dlouhovlnné světlo, se nazývají fytochromy a ty jsou také schopny absorbovat i světlo modré. Mezi další receptory, které jsou specifické pro modré světlo, se řadí např. kryptochromy, fototropiny a zeaxantin. Modré světlo ovlivňuje rychlé reakce u rostlin, např. změny v membránovém potenciálu, ale i méně nebo více pomalé reakce jako je inhibice prodlužování hypokotylu, fototropismus, pohyb chloroplastů, otevírání průduchů a další (Russell *et al.*, 2013). Receptory modrého světla mohou kromě vlnových délek 400-500 nm pohlcovat i UV záření. Jde především o UV-A o vlnové délce 400 - 320 nm a UV-B o vlnové délce 320 - 280 nm.

Modré světlo, jak bylo zjištěno, může v závislosti na druhu rostliny stimulovat (např. u *Acacica catechu*) nebo inhibovat (např. u *Amaranthus caudatus*) klíčení semen (Agrawal and Prakash, 1978; Nowak *et al.*, 1978). Také se zjistilo, že modré světlo inhibuje klíčení semen rajčete (Piterková *et al.*, 2012).

Do regulace růstu rostlin jsou zapojeny fotoreceptory, a to fytochromy, které absorbují oblast červeného spektra, fototropiny a kryptochromy absorbující modré světlo a UV-A (Russell *et al.*, 2013).

3.1 Fytochromy

Fytochromy absorbují červenou (R) a dlouhovlnnou červenou (FR) složku světla a jejich chromoforem je lineární tetrapyrrol (Lagarias *and* Rapoport, 1980). Fytochromy jsou syntetizovány ve tmě v biologicky neaktivní formě (Pr) absorbující R. Biologická aktivita fytochromu se získává při fotokonverzi fytochromu Pr na formu absorbující FR (Pfr).

Po přechodu na formu Pfr se fytochromy přemístí do jádra (Sakamoto and Nagatani, 1996; Nagatani, 2004; Kircher *et al.*, 1999, 2002) a regulují genovou expresi. Malá část zůstává v cytoplazmě a uplatňuje se při regulaci membránového potenciálu. Fytochromy absorbují i modré světlo a podílejí se na zprostředkování reakcí k modrému světlu (Russell *et al.*, 2013).

U modelového druhu *Arabidopsis thaliana* bylo sekvenováno a charakterizováno pět genů (*PHYA-E*) kódující fytochromy. PHYB protein vykazuje největší sekvenční podobnost s PHYD (přibližně 80%) a tvoří s PHYE evolučně odlišnou podskupinu (Goosey *et al.*, 1997). Protein PHYA je nejvíce příbuzný s PHYC a přesto vykazuje receptor phyA jedinečné vlastnosti. Na rozdíl od jiných fytochromů, phyA je na světle labilní a je zodpovědný za vnímání FR a zprostředkování VLFR (velmi nízká ozářenost) (Franklin *et al.*, 2010). Je převládajícím fytochromem u etiolizovaných semenáčků, ale po přenesení na světlo se rychle degraduje a je ho mnohem méně (Clough and Vierstra, 1997). PhyA je citlivý na světlo a umožňuje rychlou de-etiolizaci. Fytochromy jsou zodpovědné za řadu odpovědí na základě intenzity světla a vlnové délky, které jsou potřebné pro aktivaci odpovědí. Jsou rozděleny na: reakce k vysoké ozářenosti (HIR), reakce k nízké ozářenosti (LFR) a reakce k velmi nízké ozářenosti (VLFR) (Franklin and Quail, 2010). Pro HIR je nutná účast i jiných receptorů než jen fytochromů a intenzita pro maximální HIR je 100-krát vyšší než u LFR. Dělí se na odpovědi k blízkému a k dalekému červenému světlu a tato odpověď zahrnuje např. elongaci hypokotylu a kvetení. VLFR jsou regulovány primárně phyA a LFR jsou regulovány phyB. LFR se podílí na klíčení a pohybu rostlin a jsou typické velkou fotoreverzibilitou R/FR oproti VLFR, které ji nevykazují a podílí se na regulaci klíčení semen (Taiz and Zeiger, 2006; Franklin *et al.*, 2005).

3.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou receptory pro modré a ultrafialové světlo. Jedná se o flavoproteiny regulující například elongaci, klíčení a fotoperiodicitu vyšších rostlin. Nachází se i u živočichů, kde jsou důležité pro vznik a udržování cirkadiálních rytmů. Kryptochromy byly identifikovány díky mutantní rostlině *hy4* u *Arabidopsis thaliana*, u které nebylo prodlužování hypokotylu inhibováno modrým světlem (Ahmad and Cashmore, 1993).

Krytochromy jsou velmi podobné DNA fotolyázám (PHR), které mají schopnost reparace poškozené DNA, ale krytochromy tuto schopnost nemají (Banerjee and Batschauer, 2005). Genom *Arabidopsis* kóduje tři krytochromové geny, *CRY1*, *CRY2* a *CRY3*. *CRY1* a *CRY2* působí primárně v jádře (Wu, 2007), zatímco *CRY3* má pravděpodobně funkci v chloroplastech a mitochondriích (Kleine *et al.*, 2003). *CRY1* i *CRY2* jsou rozpustné proteiny nacházející se v jádře. *CRY1* byl také detekován v cytosolu v semenáčcích rostoucích na světle i ve tmě bez změny koncentrace. *CRY1* nukleární je však zodpovědný za modro-světelnou inhibici prodlužování hypokotylu, zatímco cytosolický zprostředkovává stimulaci růstu děloh a prodlužování kořenů na modrém světle (Wu and Spalding, 2007).

Kromě toho, tyto dva fotoreceptory regulují růst a vývoj rostlin, zahrnující cirkadiánní rytmy, vývoj buněk, otevírání průduchů, růst kořenů, velikost plodů a semen, programovanou buněčnou smrt, reakce na bakteriální a virové patogeny atd. (Somers *et al.*, 1998; Devlin and Kay, 2000; Yanovski *et al.*, 2001; Kang *et al.*, 2009; Mao *et al.*, 2005; Canamero *et al.*, 2006; Usami *et al.*, 2004; Weller *et al.*, 2001; Wu and Yang, 2010). *CRY3* patří do skupiny CRY-DASH, která je součástí rodiny fotolyáz. U některých organismů bylo popsáno, že mají jak enzymovou aktivitu, tak i fotosenzorickou (Brudler *et al.*, 2003; Bayram *et al.*, 2008; Coesel *et al.*, 2009).

V signalizaci CRY hraje důležitou roli světlem regulovaná proteinová degradace, ve které COP1 protein interaguje s C-terminální doménou *CRY1* a *CRY2* za tmy a za světla (Yu *et al.*, 2009). COP1 protein je nezbytný pro světlem regulující degradaci několika transkripčních faktorů např. bZIP protein HY5. Degradace je závislá na světle, kdy dochází k modifikaci (aktivaci) *CRY1*. *CRY1* pak interaguje s COP1. COP1 tak nemůže degradovat transkripční faktor HY5 a tím dojde k aktivaci příslušných genů. Ve tmě naopak COP1 degraduje HY5 a další transkripční faktory (např. HFR1, LAF1) zapojené v indukci fotomorfogenních genů.

3.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory modrého světla, které kontrolují některé reakce, které se účastní fotosyntézy. Je to například fototropismus, otevírání průduchů, pohyb chloroplastů v reakci na intenzitu světla. Od izolace genu *PHOT1* u *Arabidopsis* v roce 1997 (Salomon *et al.*, 1997) byly fototropiny identifikovány v kapradinách a mechách a bylo zjištěno, že jejich

funkce je v těchto rostlinách zachována. *Arabidopsis* obsahuje dva fototropiny, PHOT1 a PHOT2, které mají překrývající se funkce, ale i jedinečné fyziologické role. PHOT1 má za následek rychlou inhibici růstu hypokotylu po přenosu rostlin ze tmy na světlo a PHOT2 způsobuje vyhýbavou reakci chloroplastů za vysoké intenzity světla a zahrnuje jejich akumulaci na bázi buněk ve tmě. Oba fototropiny se nachází v cytoplazmě a skládají se z C-terminální oblasti, která zahrnuje serin/threonin kinázu a N-terminální oblast, která nese dvě LOV domény. Každou z těchto domén tvoří 110 aminokyselin a označují se LOV1 a LOV2. Domény mají obdobnou sekvenci jako proteiny savců a bakterií a mají funkci napět'ových, kyslíkových a světelných senzorů. Na N-terminální konce se váže flavinmononukleotid (FMN), který je autofosforylován v závislosti na modrém světle. Ve tmě se molekula FMN kovalentně váže na LOV doménu a po působení modrého světla FMN vytváří kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem molekuly fototropinu (Banerjee and Batschauer, 2005).

3.4. Interakce brassinosteroidů a světla

Brassinosteroidy ovlivňují v rostlině mnoho pochodů, stejně tak jako světlo a lze předpokládat, že signální dráhy světla a biosyntetické dráhy brassinosteroidů se mohou vzájemně ovlivňovat. Zatímco světlo je důležitým signálem ovlivňující přechod z etiolizačního do de-etiolizačního stavu, rostlinné hormony také hrají důležitou roli při regulaci růstu buněk, avšak molekulární mechanismy zahrnující tyto signály nejsou dosud jasné. Několik de-etiolovaných mutantů, které rostou ve tmě jako by byly na světle, ukázalo, že se jedná o mutace genů kódující BR biosyntetické enzymy (Li *et al.*, 1996; Szekeres *et al.*, 1996).

Arabidopsis bas1 mutant, inaktivující brassinolid prostřednictvím nadměrné exprese C-26 BL hydroxylázy, je schopen potlačit délku hypokotylu u mutantů fytochromu B, což poukazuje na možnou vazbu mezi metabolismem BR a fytochemickou signalizací (Neff *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2003, 2005). CHIP-chip a mikroarray analýza *Arabidopsis* také naznačila, že regulace BRs světelnou signalizací je možným mechanismem interakce mezi těmito faktory (Sun *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011).

BRs jsou nutné pro prodlužování buněk, ale také pro světlem indukované geny ve tmě (Sun *et al.*, 2010). Bylo zjištěno, že BRs zřejmě působí prostřednictvím BZR1, a to tak, že moduluje světelnou signalizaci na několika úrovních (Wang *et al.*, 2012). BZR1 potlačuje úroveň exprese mnoha pozitivních regulátorů a aktivuje negativní regulátory světelné signalizace (Fan *et al.*, 2012). Pak také přímo interaguje s PIF pro ko-regulaci velkého počtu cílových genů reagujících na světlo a brassinosteroidy (Oh *et al.*, 2012). PIF jsou negativními regulátory fotomorfogeneze a při interakci se světlem aktivovanými fytochromy se degradují. Hladina PIF se však zvyšuje ve tmě nebo ve stínu, stejně tak zvýšenou teplotou (Leivar and Quail, 2011). PIF a BZR1 přímo vzájemně interagují a regulují velké množství přímých cílových genů, z nichž mnohé kódují transkripční faktory a proteiny, které mají funkci v buněčné stěně a chloroplastech. Mnoho genů, které kódují faktory světelné dráhy, jsou cílem BZR1 a jsou regulovány BRs. Jedná se např. o protein PIF4 (Oh *et al.*, 2012). Ve studii byl navržen model, kde heterodimer BZR1-PIF4 společně reguluje jadernou transkripční síť pro koordinaci růstu rostlin v reakci na endogenní a environmentální podněty. Dále bylo zjištěno, že existují přímé interakce mezi BZR1 a dvěma E3 ubiquitin ligázami, COP1 a MAX2, které objasňují mechanismy degradace BZR1 (Kim *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2013).

Luo *et al.* (2010) prokázali, že transkripční faktor BZR1 v signální dráze brassinosteroidů může interagovat s GATA2 a regulovat prodloužení hypokotylu u semenáčků. GATA2 řídí expresi genů, které reagují na světlo a BRs. U etiolizovaných rostlin brassinosteroidy potlačují expresi GATA2 prostřednictvím BZR1. GATA2 protein je současně degradován COP1 a důsledkem jsou de-etiolizované rostliny. Na světle je, zatím neznámým způsobem, vazba transkripčního faktoru BZR1 na GATA2 potlačena. GATA2 indukuje geny zapojené v de-etiolizaci, ale zpětnou vazbou potlačuje vlastní expresi (Luo *et al.*, 2010; Gudesblat and Russinova, 2011).

Světlo a brassinosteroidy hrají klíčovou roli v regulaci růstu a vývoji rostlin a proto byly za účelem zkoumání základních mechanismů provedeny analýzy na úrovni genových expresí u ve tmě rostoucího WT a mutantu *det2* za přítomnosti světla a brasinolidu. Bylo prokázáno, že nedostatek BRs stimuluje expresi genů odpovídajících na světlo a zapojených ve fotomorfogenezi i přesto, že byl přítomen brasinolid. To potvrzuje negativní účinek BRs na fotomorfogenezi (Song *et al.*, 2009).

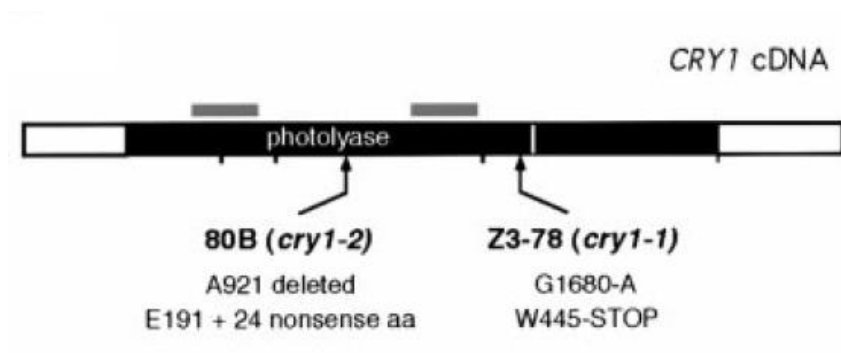
Aktivní brasinosteroidová signalizace je nezbytná pro GA (gibereliny), které podporují růst hypokotylu a potlačují trpasličí fenotyp u GA mutantů. Prokázalo se, že světlem regulovaný PIF4 faktor je fosforylačním cílem BR kinázy BIN2, která tento transkripční regulátor označuje pro degradaci v proteazomu. Exprese mutovaného PIF41A proteinu, který postrádá BIN2, způsobuje silně prodloužený fenotyp a silně zvýšenou expresi cílových genů. Nicméně, PIF41A není schopen potlačit trpasličí fenotyp mutantu *bin2-1* s aktivovanou kinázou BIN2. PIFs jsou nutné pro konstitutivní odpověď mutantů *bes1-D* a *bzrl-1D* k brasinosteroidům. Tyto faktory se navzájem ovlivňují při stimulaci prodlužování buněk. Ukázalo se, že růst semenáčků *bes1-D* je potlačován inhibitorem BZR na světle a že exprese proteinu PIF41A činí tohoto mutantu necitlivým vůči brassinazolu. Tyto výsledky objasňují hlavní roli BRs při antagoismu světelné inhibice BIN2 zprostředkované destabilizací faktoru PIF4 (Bernardo-García *et al.*, 2014).

Nejnovější studie ukazují, že hlavní transkripční faktor v brasinosteroidové signalizační dráze BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1 (BES1), je do značné míry závislý na fosforylačním stavu a proteinové stabilitě. SINA z *Arabidopsis thaliana* (SINAT) zvláště interaguje s defosforylovaným BES1 a zprostředkovává jeho ubiquitinaci a degradaci. Genetické analýzy ukázaly, že SINAT inhibují BR signalizaci způsobem závislým na BES1. Bylo zjištěno, že hladiny proteinů SINAT byly sníženy ve tmě a zvyšovaly se na světle, což podle toho změnilo hladiny proteinu BES1. Tato studie odhalila mechanismus degradace BES1 a poskytla poznatky o tom, že světlo reguluje růst rostlin prostřednictvím akumulace různých forem BES1 (Yang *et al.*, 2017).

4. Materiál a metody

4.1 Rostlinný materiál

Pro pokusy byla použita semena genotypů rajčete *Solanum lycopersicum* L. kultivaru Money Maker (WT) a od něj odvození mutanti *cry1-1* (Z3-78) a *cry1-2* (80B) (Weller *et al.*, 2001). Mutace *cry1-1* i *cry1-2* byly indukovány γ -zářením a oba mutanti vykazují defekt ve stejném genu *CRY1*, ale jeho jiné části (Obr. 7). *CRY1* kóduje fotoreceptor modrého světla, který byl později identifikován jako *CRY1a* (Facella *et al.*, 2012). Oba tyto monogenní mutanti vykazují sníženou de-etiolizaci při působení modrého světla (Obr. 8) (Weller *et al.*, 2001).



Obr. 7: Diagram ukazující místo mutace *cry1-1* a *cry1-2* (Weller *et al.*, 2000)



Obr. 8: Růst hypokotylu WT a mutanta rajčete *cry1-2* na modrém světle po 12 dnech (Weller *et al.*, 2001).

Další experimentální rostlinou byl mutant *hp1* odvozený od cv. Rutgers LA3004 (Kendrick *et al.* 1994). Mutant *hp1* se vyznačuje hypersenzitivní reakcí na modré a červené světlo. Fyziologické analýzy naznačují, že HP1 funguje jako negativní regulátor dráhy fototropní signální transdukce (Srinivas *et al.*, 2004), která je odstraněna působením fytochromu A. Mutant *hp1* nevykazuje fenotyp u rostlin rostoucích ve tmě, ale pouze u rostlin rostoucích na světle (Weller *et al.*, 2000). Je pravděpodobné, že HP1 se akumuluje ve tmě a při vystavení rostlin na světlo podléhá degradaci zprostředkované fytochromem.

Mutace *hp1* se nachází v genu *DDB1* (UV-damaged DNA binding protein 1) v centromerické oblasti chromozomu 2 (Lieberman *et al.*, 2004). *HP1* kóduje protein homologní s lidským DDB1 a proteinem DDB1A u *Arabidopsis*, u nichž bylo prokázáno, že produkty reagují s DET1 (Schroeder *et al.*, 2002). Bylo prokázáno, že rostliny s touto mutací obsahují vyšší hladinu karotenoidů, čímž mohou ovlivňovat barvu a kvalitu rostliny a plodů.

Semena mutantů *cry1-1*, *cry1-2* a cv. MM byly laskavě poskytnuty R. E. Kendrickem, University of Wageningen, Nizozemí. Semena mutantu *hp1* a cv. Rutgers LA3004 byla laskavě poskytnuta C. M. Rickem, University of California, Davis.

4.2 Pracovní postupy

4.2.1 Příprava média

Pro přípravu agarového kultivačního média Murashige-Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) o objemu 2 l, bylo použito 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (kat. č. MSP01-50LT, Caison Labs, USA) a 0,3904 g pufru MES. Sacharóza, MS médium a MES pufr byly postupně a za stálého míchání rozpuštěny v Erlenmeyerově baňce v 1 l destilované vody. Po rozpuštění všech látek byl objem doplněn na 2 l a bylo upraveno pH na 6,1 pomocí 1M KOH.

Do pěti termolahví o objemu 500 ml byl navážen fytoagar po 2,8 g a do každé láhve bylo nalito 400 ml média. Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu a po vychladnutí byly termoláhve s médiem skladovány v lednici.

Před použitím muselo být médium rozeřháto do tekuté podoby v mikrovlnné troubě.

4.2.2 Výsev semen a přenos rostlin

Pro každý experiment byl napočítán požadovaný počet semen od každého genotypu a sterilizován v plastových zkumavkách (objem 50 ml) za občasného protřepání po dobu 30 minut ve zředěném roztoku Savo (2,8% hypochlorid sodný, Bochemie a.s.). Semena byla šestkrát promyta sterilní destilovanou vodou pomocí 10ml pipety. Všechny tyto kroky byly prováděny ve flow-boxu za sterilních podmínek.

Poté byla semena vyseta pinzetou sterilizovanou v 96% ethanolu a ožehnutou nad plamenem na MS médium umístěné v hranatých plastových Petriho miskách. Vždy bylo vyséváno 100 semen na jednu Petriho misku a po výsevu byly misky oblepeny dokola třemi vrstvami pásky z netkané textilie SoftPore (Batist s.r.o.). Misky byly zabaleny do alobalu pro kultivaci ve tmě a byly umístěny vertikálně do růstové kultivační komory Microclima 1000 (Snijders Scientific, Nizozemsko), ve které byla stálá teplota 23 °C, po dobu 3 dnů.

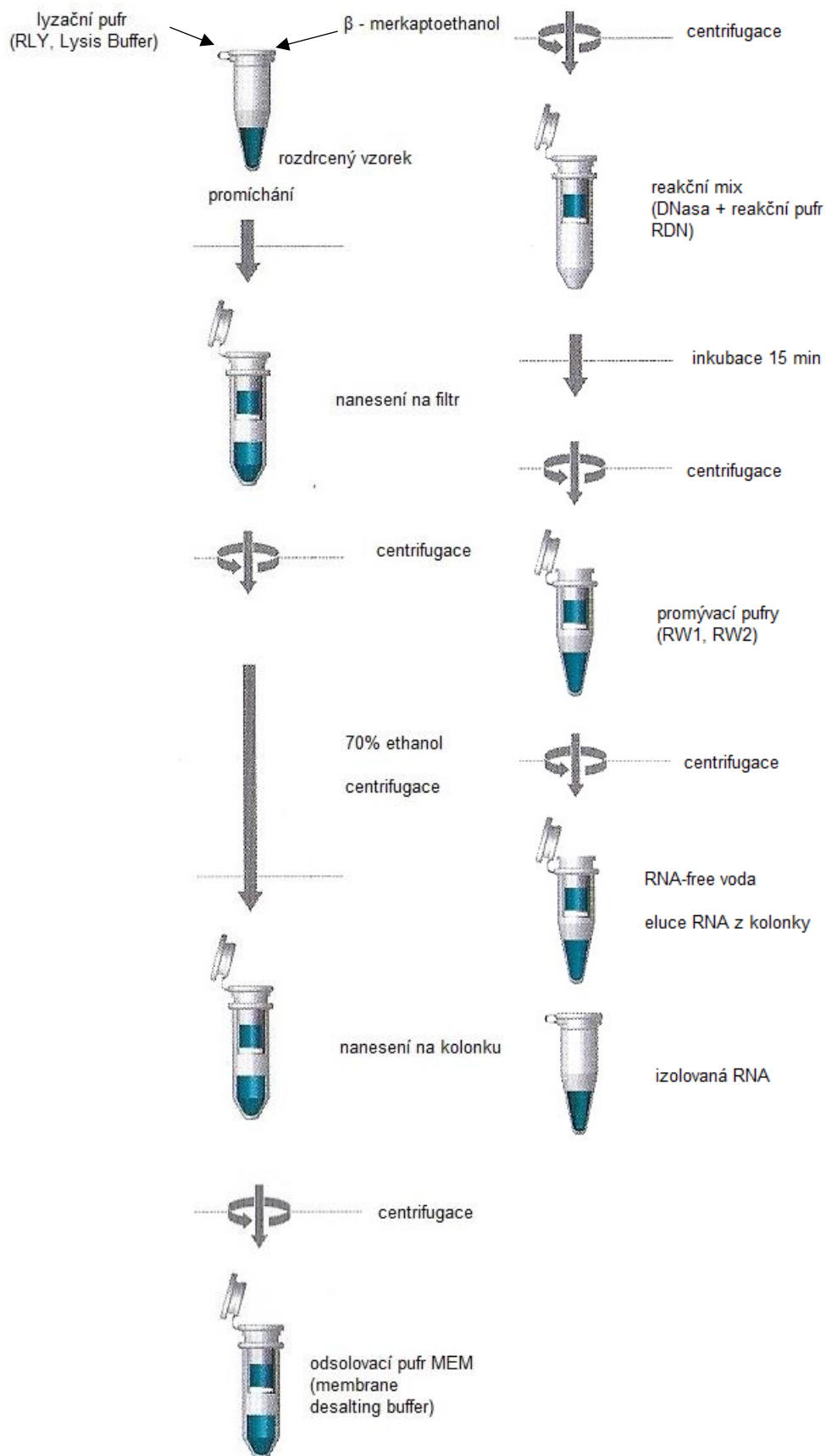
Po vyklíčení potřebného množství semen, byla semena přenesena, za sterilních podmínek, na hranaté Petriho misky s médiem o objemu 40 ml. Na každou misku bylo umístěno 20 – 25 rostlin a do experimentu byla zahrnuta i kontrola. Misky byly opět oblepeny třemi vrstvami pásky z netkané textilie a umístěny v růstové komoře o stálé teplotě 23 °C. Rostliny byly kultivovány pod kontinuálním modrým osvětlením a ve tmě (zabalené

do alobalu) po dobu 4 dnů. Zdrojem modrého světla byla trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 440 nm.

Po 4 dnech byla rostlinám odebrána apikální část hypokotylu v temné komoře za různých světelných podmínek. Pro rostliny pěstované na modrém světle bylo použito osvětlení modrou zářivkou, pro rostliny rostoucí ve tmě, byla použita zářivka zelená. Bylo odebráno přibližně 200 mg vzorku, který byl zabalen do alobalu a okamžitě schlazen v kapalném dusíku. Vzorky byly uchovávány v mrazáku při teplotě $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ pro následné použití.

4.2.3 Izolace a purifikace RNA

Každý genotyp byl zvlášť rozdrcen pomocí tloučku ve vychlazené třecí misce s dusíkem. Takto rozdrcené hypokotylu byly přemístěny do zkumavek a dále izolace probíhala dle schématu (Obr. 9) za použití kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie).



Obr. 9: Schéma izolace pomocí kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Velká Británie)

Po izolaci byla změřena koncentrace celkové RNA pomocí spektrofotometru Nanodrop (Thermo Scientific, USA). Pro kontrolu případné kontaminace byla provedena amplifikace pomocí PCR, kde byla použita směs obsahující 4 µl 5x My Taq buffer (Bioline), 0,5 µl specifických primerů, 0,1 µl My Taq Polymerase (Bioline), 2 µl templátu a objem byl doplněn nuclease free-water na 20 µl. Byla uskutečněna amplifikace genu kódující glycerinaldehyd-3-fosfátdehydrogenázu (*LeGAPDH*, U97257, Chen, 1997), která měla 45 cyklů a primery pro tento gen mají následující sekvenci:

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

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

PCR byla provedena pomocí termocykléru C1000 Thermal cycler (Biorad) podle Tabulky č. 1. Templát byl nejprve denaturován při teplotě 94 °C po dobu 3 min. Následně proběhl 45-krát následující cyklus: 94 °C po dobu 30 s, 55 °C 30 s, 72 °C po dobu 5 min. Poté proběhla konečná syntéza při teplotě 72 °C po dobu 5 min a jako poslední krok 15 °C pro zchlazení směsi. Pro rozdělení PCR produktů, byla použita elektroforéza na 1,5% agarosovém gelu, který byl obarven barvivem GelRed (Nucleic Acid Stain, Biotinum). PCR produkty byly smíchány s barvivem 6x loading Dye (Biogen), vždy 20 µl vzorku a 1 µl barviva, a nanoseny do jamek spolu s kontrolními vzorky. Následně proběhla elektroforéza při stálém napětí 80 V po dobu 40 min a pak vizualizace gelu pomocí InGenius 3 Gel Documentation Systém (Syngene).

Tab. 1: Program PCR pro amplifikaci genu *LeGAPDH*

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

V případě, že byl vzorek kontaminován, byla provedena opět purifikace RNA s použitím roztoků z kitu Isolate II RNA Plant Kit (Bioline) a přidáním DNasy I a reakčního RDN pufru. Poté proběhla inkubace při 37 °C po dobu 30 minut. Do vzorku se přidal octan sodný a 96% ethanol a přes noc v – 80 °C probíhala precipitace. Následující den byl vzorek

centrifugován 10 min při 4 °C, tak aby se pelet zachytil na dně mikrozkušavky. Supernatant se odstraní vylitím ze zkumavky, byl přidán 70% ethanol, opět byla provedena centrifugace a odstranění supernatantu. Poté byl přidán 96% ethanol, proběhla centrifugace, odstranění supernatantu, odpipetování posledních zbytků supernatantu a mikrozkušavka se nechala dnem vzhůru na filtračním papíře po dobu maximálně 5 minut, dokud se neodpařil všechen ethanol. Přechištěná RNA byla rozpuštěna v RNA-free vodě, jež je součástí kitu.

4.2.4. Syntéza cDNA

Syntéza cDNA proběhla z čistě vyizolované RNA za pomoci kitu PrimeScript 1st strand cDNA synthesis kit (Takara, Kat. č. 6110A) následovně: k 8 µl vzorku RNA, které byly naředěny tak, aby obsahovaly 2 µg celkové RNA, byl přidán 1 µl 50 µM oligo dT primeru a 1 µl 10 mM dNTP a následovala inkubace po dobu 5 min při 65 °C v termocykleru DNA engine Thermal Cycler (Biorad) a zchlazení v ledu. Pak se přidaly 4 µl 5x PrimeScript pufru, 0,5 µl Rnase inhibitoru, 1 µl PrimeScript Rtasu a 4,5 µl RNA-free vody. Celkový objem vzorku byl 20 µl a tato reakční směs byla inkubována v termocykleru nejprve po dobu 60 min při 42 °C a poté 15 minut při 70 °C. Po tomto kroku bylo do vzorku přidáno 0,5 µl Rnasy H (Takara, kat. č. 2150A) a vzorky byly inkubovány v termocykleru po dobu 15 min při 37 °C.

Pro zjištění správné syntézy cDNA byla provedena PCR pomocí termocykleru C1000 Thermal Cycler (Biorad), jejíž směs obsahovala 4 µl 5x My Taq buffer, 0,5 µl specifických primerů, 0,1 µl My Taq Polymerase a 2 µl cDNA 1/5. Byly použity primery genu *EF1α* s následujícími sekvencemi:

EF1α - F primer: 5' - CCC AAG AGG CCA TCA GAC AA - 3'

EF1α - R primer 5' - CAA CAG GGA CAG TTC CAA TAC CA - 3'

Program PCR pro amplifikaci genu *EF1α* znázorňuje Tabulka č. 2.

Tab. 2: Program PCR pro amplifikaci genu *EF1a*

94 °C	3 min	
94 °C	30 s	35 cyklů
60 °C	30 s	
72 °C	30 s	
72 °C	5 min	
15 °C	∞	

Produkty PCR byly nanесeny na 1,5% agarosový gel společně s barvivem a kontrolními vzorky a proběhla elektroforéza při konstantním napětí 80 V po dobu 40 min. Opět proběhla vizualizace, kde při správně nasyntetizované cDNA byly vidět 100 bp fragmenty.

4.2.5 Exprese genu *BRI1*

Pro porovnání exprese genu pro brassinosteroidní receptor *BRI1* byl jako referenční gen použit *Tip41-like*. Pro každý vzorek cDNA byly v PCR použity primery pro *Tip41-like*:

Tip41-like - F: 5' - GGT TCC TAT TGC TGC GTT - 3'

Tip41-like - R: 5' - CGA AGA CAA GGC CTG AAA - 3'

a primery pro *BRI1*:

BRI1 - F: 5' - AGT TGA AGG ATG GGA GTG TTG - 3'

BRI1 - R: 5' - GGT GCT TGA TCT TCC CTA TGG - 3'

Reakční směs byla složena z 10 µl Xceed qRT-PCR SG Mixu (IAB), 0,8 µl F-primeru, 0,8 µl R-primeru, 4 µl cDNA a 4,4 µl nuclease-free vody. Následně proběhla kvantitativní PCR v termocykleru Mx 3000P System (Stratagene). Program pro PCR je znázorněn v tabulce č. 3.

Tab. 3: Program qPCR pro amplifikaci genu *Tip41-like* a *BRI1*

95 °C	2 min	
95 °C	5 s	40 cyklů
60 °C	20 s	
95 °C	1 min	
55 °C	30 s	
95 °C	30 s	

Výsledky byly dále vyhodnocovány pomocí programu Rest 2009 (Pfaffl *et al.*, 2002, REST 2009 Software User Guide. 2009) a zpracovány v programu Microsoft Excel 2016.

5. Výsledky

Cílem diplomové práce bylo zjistit, jak modré světlo na úrovni RNA ovlivňuje expresi genu kódující receptor *BRI1* pro rostlinné hormony brassinosteroidy a které fotoreceptory modrého světla jsou v tomto procesu zapojeny. Proto byly pro tyto experimenty použity fotomorfogenní mutanti *cry1-1* a *cry1-2*, vyznačující se sníženou citlivostí k modrému světlu (Weller *et al.*, 2001). Jako třetí mutant byl zvolen *hpl*, který má zvýšenou reakci fytochromů ke světlu a současně ukazuje zesílenou fototropickou reakci (Srinivas *et al.*, 2004).

Experimenty s těmito mutanty rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) byly zvoleny v důsledku předchozích studií, kde bylo zjištěno, že modré světlo významně snižuje expresi genu *BRI1* u kultivaru Rutgers (Pilařová, 2016).

Apikální část hypokotylu byla použita na základě zjištění, že se v hypokotylu nachází nejvyšší koncentrace brassinolidu. U etiolizovaných rostlin standardního genotypu byla pozorována endogenní hladinu brassinolidu až pětikrát vyšší než u mutantu *7B-1* (Pilařová, 2014).

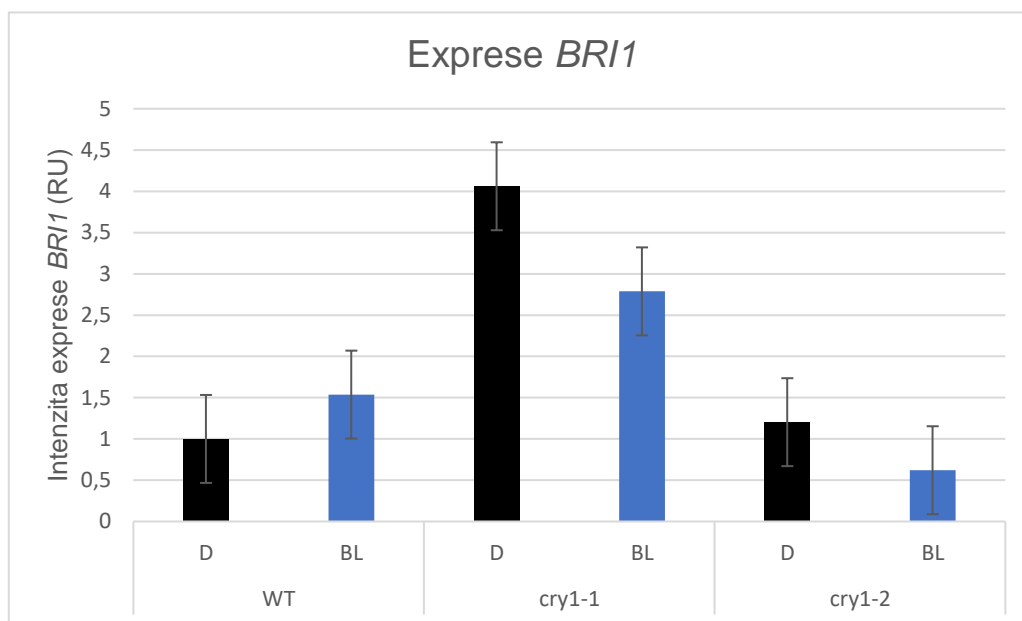
Všechny tyto experimenty byly provedeny podle metodiky nacházející se v předchozí kapitole.

5.1 Exprese genu *BRI1* u mutantů *cry1-1* a *cry1-2*

Byly provedeny dva až čtyři nezávislé experimenty, u kterých byla izolována celková RNA z hypokotylu rostlin cv. MM (WT), *cry1-1*, *cry1-2*, které byly kultivovány ve tmě a na modrém světle. Poté byla provedena syntéza cDNA a následovala qRT-PCR pro analýzu exprese *BRI1* ve srovnání s housekeeping genem *Tip41-like*. Získané hodnoty po kvantifikaci byly vždy vztahovány k hodnotě hladiny exprese WT u hypokotylu rostoucím ve tmě.

Jak ukazuje Obr. 10, exprese *BRI1* v hypokotylech cv. MM byla mírně, nikoliv však signifikantně ovlivněna modrým světlem. Ve srovnání s kultivarem MM, exprese *BRI1* v etiolizovaných hypokotylech mutantu *cry1-1* byla výrazně (asi 4-krát) zvýšena, výsledky zpracované v programu REST 2009 ukazovaly ve dvou nezávislých opakováních hodnotu 4,061. Modré světlo expresi *BRI1* u mutantu *cry1-1* snižovalo asi o 25%.

U mutanta *cry1-2* byla exprese genu *BRI1* v etiolizovaných hypokotylech stejná jako u cv. MM a modré světlo mírně, nikoliv však významně hladinu mRNA *BRI1* snižovalo. (Obr. č. 10).

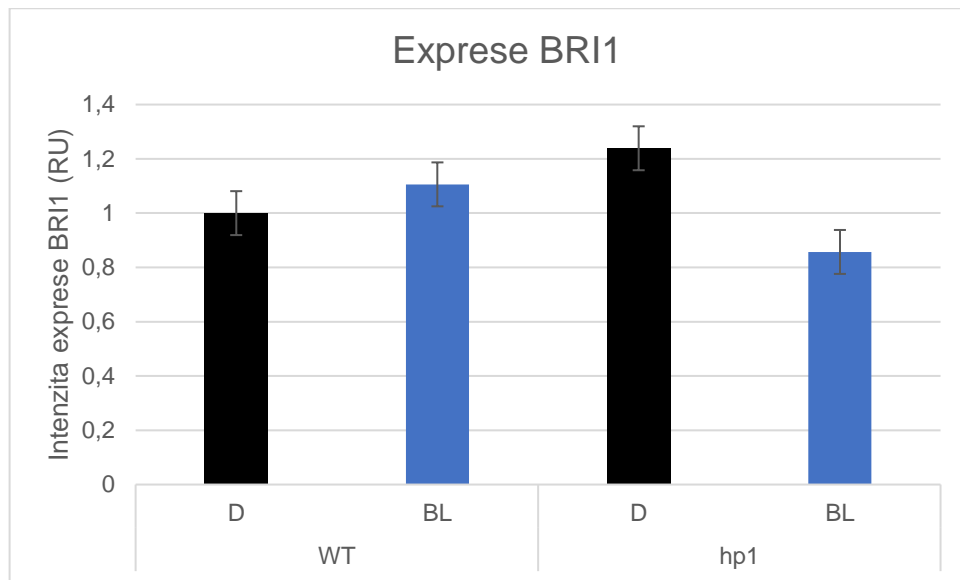


Obr. 10: qRT-PCR analýza exprese genu *BRI1* v hypokotylu rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Money Maker (WT), mutanta *cry1-1* a *cry1-2* za světelných podmínek tma (D) a modré světlo (BL). Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze čtyř nezávislých experimentů, v případě cv. Money Maker a ze dvou nezávislých experimentů u každého z mutantů *cry1-1* a *cry1-2*.

5.2 Expresse genu *BRI1* u mutanta *hp1*

U tohoto mutanta byly provedeny dva nezávislé experimenty. Z hypokotylů mutanta *hp1* a jeho příslušného WT cv. Rutgers LA3004 byla opět izolována celková RNA, provedena syntéza cDNA a qRT-PCR pro zjištění hladin exprese genu *BRI1*. Rostliny byly pěstovány ve tmě a na modrém světle a výsledky byly vztahovány k WT rostoucímu ve tmě. Jako housekeeping gen byl použit *Tip41-like*.

Výsledky experimentů s mutantem *hp1* jsou ukázány na Obr. 11. Jak graf ukazuje, exprese genu *BRI1* v hypokotylech WT nebyla výrazně ovlivněna modrým světlem. Dále bylo zjištěno, že ve tmě i na modrém světle neměla mutace *hp1* na expresi *BRI1* významný vliv.



Obr. 11: *qRT-PCR* analýza exprese genu *BRI1* v hypocotylu rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) cv. Rutgers LA3004 (WT) a mutantu *hp1* za světelných podmínek tma (D) a modré světlo (BL). Výsledky ukazují průměrné hodnoty \pm SE, získané ze dvou nezávislých experimentů.

6. Diskuze

Je známo, že brassinosteroidy ovlivňují biologické procesy v rostlině i při velmi nízkých koncentracích. Jsou stimulantem při prodlužování buněk, růstu pylové láčky, buněčném dělení (Singh and Savaldi-Goldstein, 2015). Brassinosteroidy i světlo ovlivňují mnoho stejných procesů, a to například prodlužování buněk, kvetení, únik ze stínu (Wang *et al.*, 2012). Je tedy zřejmé, že světelné a brassinosteroidové signální dráhy spolu interagují a mohou mít v této signální dráze i společné elementy. V řadě prací bylo zjištěno propojení mezi světelnou signalizací a metabolismem brassinosteroidů, v nichž například cytochrom P450 katalyzuje inaktivaci či degradaci BRs (Neff *et al.*, 1999; Turk *et al.*, 2005; Kang *et al.*, 2001). Nedávné studie ukazují, že modré světlo snižuje endogenní hladinu brassinosteroidů a intenzitu exprese genu *BRI1* v hypokotylu rajčete. Modré světlo dále snižuje citlivost k brassinosteroidům, čímž zastavuje prodlužování buněk (Pilařová, 2014). Výsledky práce by mohly přispět ke znalostem interakce BRs a modrého světla jež regulují růst hypokotylu.

V experimentální části této diplomové práce bylo úkolem zjistit, prostřednictvím kterých fotoreceptorů a signálních drah modré světlo ovlivňuje expresi genů pro receptor *BRI1* v hypokotylu rajčete. Byl využit genetický přístup spočívající v analýze mutantů, a proto byli zvoleni fotomorfogenní mutanti *cry1-1* a *cry1-2* s defektem ve fotoreceptoru modrého světla *CRY1a* a vyznačující se redukovanou citlivostí k modrému světlu (Weller *et al.*, 2001; Facella *et al.*, 2012). Analýzy ukázaly, že mutant *cry1-1* obsahuje nesmyslnou mutaci, protože u něj došlo k záměně aminokyseliny G za A v pozici 1680, čímž vznikl předčasný stop kodon a výsledný protein *CRY1a* je zkrácený. Mutant *cry1-2* obsahuje jednu deletovanou bázi. Došlo tak u něj k posunové mutaci a předčasnému ukončení transkripce. Předpokládá se, že konečný produkt *CRY1a* u těchto mutantů je nefunkční (Weller *et al.*, 2001). Dále byl použit mutant *hpl* s defektem v genu *DDB1*, který má zvýšenou reakci fytochromů ke světlu a současně ukazuje zesílenou fototropickou reakci (Kendrick *et al.*, 1997; Liu *et al.*, 2004).

Nejprve byly provedeny experimenty sledující hladinu exprese *BRI1* u mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a jejich příslušného WT, cv. MM, pomocí kvantitativní qRT-PCR na modrém světle a ve tmě. Výsledky experimentů ukázaly, že u kontrolní rostliny cv. MM nebyla hladina exprese *BRI1* významně ovlivněna modrým světlem, i když bylo na modrém světle pozorováno mírné zvýšení hladiny *BRI1* mRNA.

Experimenty provedené v této diplomové práci ukázaly, že modré světlo zvyšovalo expresi *BR11* u mutanta *cry1-1* asi dvakrát ve srovnání s cv. MM. Tyto výsledky naznačují, že modré světlo prostřednictvím CRY1a redukuje expresi *BR11*. Fakt, že exprese *BR11* u mutanta *cry1-2* byla srovnatelná s expresí *BR11* u cv. MM demonstruje, že region proteinu CRY1a s mutací *cry1-2* není v expresi *BR11* významný, a naopak že region s mutací *cry1-1* je pro expresi *BR11* podstatný.

Dalším zjištěným faktem bylo, že ve tmě byla u mutanta *cry1-1* zvýšena exprese *BR11* ve srovnání s cv. MM asi 4-krát. Je tedy zřejmé, že i ve tmě, kdy je CRY1a neaktivovaný, nějakým způsobem redukuje expresi *BR11*, a tedy jak se zdá, více než CRY1a aktivovaný modrým světlem. To může vysvětlovat mírné zvýšení exprese *BR11* na modrém světle u kultivaru cv. MM. Zdá se tedy, že závěry získané v této diplomové práci podporují závěry formulované v dřívější studii (Pilařová 2014).

Dále byly experimenty provedeny u mutanta *hpl* a jeho WT cv. Rutgers LA3004, kdy byla opět pozorována hladina exprese *BR11* ve tmě a na modrém světle. Výsledky ukázaly, že hladina exprese *BR11* byla stejná u WT i u mutanta *hpl*. Tyto výsledky naznačují, že protein DDB1, zapojený ve složité mašinerii přenosu světelného signálu nehraje významnou úlohu v signalizaci brassinosteroidů.

Pokud je nám známo, tak výsledky experimentů týkající se vlivu modrého světla na aktivitu receptorů BR11 nebyly dosud publikovány. Je známo, že signální dráha modrého světla prostřednictvím CRY1 je využívána jinými signálními drahami, a to například u jasmonátů, které jsou přirozenými regulátory růstu rostlin (Chen *et al.*, 2018). Dá se tedy předpokládat, že signální dráha světla je součástí mnoha jiných drah, ve kterých dochází k interakcím, a proto je důležité se mu nadále věnovat.

7. Závěr

Cílem této diplomové práce bylo zjistit, prostřednictvím kterých fotoreceptorů a signálních drah modré světlo na úrovni RNA ovlivňuje expresi *BRI1* v hypokotylu rajčete. Pomocí kvantitativní PCR byly provedeny experimenty studující expresi *BRI1* v apikální části hypokotylů *cry1-1*, *cry1-2*, *hp1* a jejich odpovídajících kultivarů, jež byly pěstovány ve tmě a na modrém světle. Výsledky ukázaly, že mutace *cry1-1* vedla ke zvýšení exprese *BRI1* na modrém světle a paradoxně ještě více ve tmě. Výsledky těchto experimentů tedy vedou k závěru, že modré světlo pravděpodobně redukuje expresi *BRI1* prostřednictvím fotoreceptoru CRY1a. Výsledky vedou také k závěru, že i neaktivovaný CRY1a (tedy ve tmě) expresi *BRI1* redukuje. Výsledky tedy podporují závěry, že signální dráhy brassinosteroidů a modrého světla zapojené v růstu hypokotylu spolu interagují. Budoucí experimenty by měly vyšetřovat, jakými mechanismy může CRY1a expresi *BRI1* ovlivňovat.

8. Citace

Agrawal PK., Prakash G. Control on seed germination in some indian trees. *Tropical Ecology* 19:174-177. 1978.

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

Ashraf M, Akram NA, Arteca RN, Foolad MR. The physiological, biochemical and molecular roles of brassinosteroids and salicylic acid in plant processes and salt tolerance. *Critical Reviews in Plant Sciences* 29:162–190. 2010.

Bajguz A, Hayat S. Effects of brassinosteroids on the plant responses to environmental stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* 47(1): 1-8. 2009.

Banerjee R, Batschauer A. Plant blue-light receptors. *Planta* 220:498-502. 2005.

Bar M, Sharfman M, Ron M, Avni A. BAK1 is required for the attenuation of ethylene-inducing xylanase (Eix)-induced defense responses by the decoy receptor LeEix1. *Plant Journal* 63:791–800. 2010.

Bayram O, Biesmann Ch, Ktrappmann S, Galland P, Braus GH. More than a repair enzyme: *Aspergillus nidulans* photolyase-like CryA is a regulator of sexual development. *Molecular Biology of the Cell* 19:3254–3262. 2008.

Belkhadir Y, Chory J. Brassinosteroid signaling: a paradigm for steroid hormone signaling from the cell surface. *Science* 314: 1410–1411. 2006.

Bernardo-García S, de Lucas M, Martínez C, Espinosa-Ruiz A, Daviere JM, Prat S. BR-dependent phosphorylation modulates PIF4 transcriptional activity and shapes diurnal hypocotyl growth. *Genes and Development* 28, 1681–1694. 2014.

Bishop GJ, Yokota T. Plants steroid hormones, brassinosteroids: current highlights of molecular aspects on their synthesis/metabolism, transport, perception and response. *Plant Cell Physiology* 42:114–20. 2001.

Brudler R, Hitomi K, Daiyasu H, Toh H, Kucho K, Ischiura M, Kanehisa M, Roberts VA, Todo T, Tainer JA, Getzoff ED. Identification of a new cryptochrome class. Structure, function, and evolution. *Molecular Cell* 11:59–67. 2003.

Bucherl CA, van Esse GW, Kruis A, Luchtenberg J, Westphal AH, Aker J, van Hoek A, Albrecht C, Borst JW, de Vries SC. Visualization of BRI1 and BAK1(SERK3) membrane receptor heterooligomers during brassinosteroid signaling. *Plant Physiology* 162:1911-1925. 2013.

Canamero RC, Bakrim N, Bouly JP, Garay A, Dudkin EE, Habricot Y, Ahmad M. Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* 224:995–1003. 2006.

Clough RC, Vierstra R. Phytochrome degradation. *Plant, Cell and Environment* 20:713-721. 1997.

Clouse SD, Zurek D. Molecular analysis of brassinolide action in plant growth and development. In: Cutler H.G., Yokota T., Adam G., editors. *Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity, & Applications*. Washington, D.C.: American Chemical Society; pp. 122–140. 1991.

Clouse SD, Langford M, McMorris TC. A brassinosteroid-insensitive mutant in *Arabidopsis thaliana* exhibits multiple defects in growth and development. *Plant Physiology* 111:671–678. 1996.

Clouse SD. Brassinosteroid signal transduction: from receptor kinase activation to transcriptional networks regulating plant development. *The Plant Cell* 23:1219–1230.2011.

Coesel S, Mangogna M, Ishikawa T, HEijde M, Rogato A, Finazzi G, Todo T, Bowler Ch, Falciatore A. Diatom PtCPF1 is a new cryptochrome/photolyase family member with DNA repair and transcription regulation activity. *EMBO Reports* 10:655–661. 2009.

Chen HJ, Fu TY, Yang SL, Hsieh HL. FIN219/JAR1 and cryptochrome1 antagonize each other to modulate photomorphogenesis under blue light in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics*. 14(3): e10072248. 2018.

Devlin PF, Kay SA. Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. *Plant Cell*. 12:2499–2510. 2000.

Facella P, Daddiego L, Giuliano G, Perrotta G. Gibberellin and auxin influence the diurnal transcription pattern of photoreceptor genes via *CRY1a* in tomato. *Plos ONE* 7: e30121. 2012.

Fan JH, Chen J, Sze SH. Identifying complexes from protein interaction networks according to different types of neighborhood density. *Journal of Computational Biology* 19(12): 1284-1294. 2012.

Franklin KA, Larner VS, Whitelam GC. The signal transducing photoreceptors of plants. *The International Journal of Developmental Biology* 49: 653-664. 2005.

Franklin KA, Quail PH. Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal Experimental Botany* 61(1): 11–24. 2010.

Fujioka S, Yokota T. Biosynthesis and metabolism of brassinosteroids. *Annual Review of Plant Biology* 54:137–164. 2003.

Goosey L, Palecanda L, Sharrock RA. Differential patterns of expression of the *Arabidopsis* *PHYB*, *PHYD* and *PHYE* phytochrome genes. *Plant Physiology* 115:959–969. 1997.

Grove MD, Spencer GF, Rohwedder WK, Mandava N, Worley JF, Warthen JD, Steffens GL, Flippen-Anderson JL, Cook JC. Brassinolide, a plant growth-promoting steroid isolated from *Brassica napus* pollen. *Nature* 281:216–7. 1979.

Gudesblat GE, Russinova E. Plants grow on brassinosteroids. *Current Opinion in Plant Biology* 14:530–7. 2011.

He JX, Gendron JM, Sun Y, Gampala SS, Gendron N, Sun CQ, Wang ZY. BZR1 is a transcriptional repressor with dual roles in brassinosteroid homeostasis and growth responses. *Science* 307:1634–1638. 2005.

He K, Gou X, Yuan T, Lin H, Asami T, Yoshida S, Russell SD, Li J. BAK1 and BKK1 regulate brassinosteroid-dependent growth and brassinosteroid-independent cell-death pathways. *Current Biology* 17:1109–1115. 2007.

Heese A, Hann DR, Gimenez-Ibanez S, Jones AM, He K, Li J, Schroeder JI, Peck SC, Rathjen JP. The receptorlike kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA.* 104:12217-12222. 2007.

Hecht V, Vielle-Calzada JP, Hartog MV, Schmidt ED, Boutilier K, Grossniklaus U, de Vries SC. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR KINASE 1 gene is expressed in developing ovules and embryos and enhances embryogenic competence in culture. *Plant Physiology* 127:803–816. 2001.

Hink MA, Shah K, Rissinova E, de Vries SC, Visser AJWG. Fluorescence fluctuation analysis of Arabidopsis thaliana somatic embryogenesis Receptor-Like kinase and Brassinosteroid Insensitive 1 receptor oligomerization. *Biophysical Journal*, 94(3): 1052-1062. 2008.

Hubbard SR, Miller WT. Receptor tyrosine kinases: mechanisms of activation and signaling. *Current Opinion in Cell Biology*, 19(2): 117-123. 2007.

Chinchilla D, Shan L, He P, de Vries S, Kemmerling B. One for all: the receptor-associated kinase BAK1. *Trends in Plant Science* 14:535–541. 2009.

Jailais Y, Hothorn M, Belkhadir Y, Dabi T, Nimchuk ZL, Meyerowitz EM, Chory J. Tyrosine phosphorylation controls brassinosteroid receptor activation by triggering membrane release of its kinase inhibitor. *Genes & Development* 25:232–237. 2011.

Kang CY, Lian HL, Wang FF, Huang JR, Yang HQ. Cryptochromes, phytochromes, and COP1 regulate light-controlled stomatal development in Arabidopsis. *Plant Cell* 21:2624-2641. 2009.

Kang J-G, Yun J, Kim DH, Chung KS, Fujioka S, Kim JI, Dae HW, Yoshida S, Takatsuo S, Song PS, Park CM. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth. *Cell*. **105**: 625–628. 2001.

Karlova R, Boeren S, Russinova E, Aker J, Vervoort J, de Vries S. The Arabidopsis SOMATIC EMBRYOGENESIS RECEPTOR-LIKE KINASE1 protein complex includes BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1. *Plant Cell* 18:626–638. 2006.

Kendrick RE, Kerckhoffs LHJ, Pundsnes AS, van Tuinen A, Koornneef M, Nagatani A, Terry MJ, Tretyan A, Cordonnier-Pratt, MM, Hauser B, Pratt LH. Photomorphogenic mutants of tomato. *Euphytica* 79: 227-234, 1994.

Kendrick P, Crane R. The origin and early evolution of plants on land. *Nature* 389(1):33-39. 1997.

Kim B, Jeong, YJ, Corvalan, C, Fujioka, S, Cho S, Park T, Choe S. Darkness and *gulliver2/phyB* mutation decrease the abundance of phosphorylated BZR1 to activate brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*; *Plant Journal* 77:737–747. 2014.

Kinoshita T, Cano-Delgado A, Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Yoshida S. Binding of brassinosteroids to the extracellular domain of plant receptor kinase BRI1. *Nature* 433:167-171. 2005.

Kircher S, Kozma-Bognar L, Kim L, Adam E, Harter K, Schäfer E, Nagy F. Light quality-dependent nuclear import of the plant photoreceptors phytochrome A and B. *The Plant Cell* 11:1445–1456. 1999.

Kircher S, Kozma-Bognar L, Fejes E, Speth V, Husselstein-Muller T, Bauer D, Adam E, Schäfer E, Nagy F. Nucleo-cytoplasmic partitioning of plant photoreceptors phytochromes A, B, C, D, and E is differentially regulated by light and exhibits a diurnal rhythm. *The Plant Cell* 14:1514–1544. 2002.

Kleine T, Lockhart P, Batschauer A. An Arabidopsis protein closely related to synechocystis cryptochrome is targeted to organelles. *Plant Journal* 35:93–103. 2003.

Krishna P. Brassinosteroid-mediated stress responses. *Journal of Plant Growth Regulation* 22:289–97. 2003.

Kutschera U, Wang ZY. Brassinosteroid action in flowering plants: a Darwinian perspective. *Journal of the Experimental Botany* 63:3511–22. 2012.

Lagarias, JC, Rapoport H. Chromopeptides from phytochrome. The structure and linkage of the Pr form of the phytochrome chromophore. *Journal of American Chemical Society* 102:4821–4828. 1980.

Leivar P, Quail PH. PIFs: pivotal components in a cellular signaling hub. *Trends Plant Science*. 16, 19–28. 2011.

Li JM, Nagpal P, Vitart V, McMorris TC, Chory J. A role for brassinosteroids in light-dependent development of *Arabidopsis*. *Science* 272:398–401. 1996.

Li J, Wen J, Lease KA, Doke JT, Tax FE, Walker JC. BAK1, an Arabidopsis LRR receptor-like protein kinase, interacts with BRI1 and modulates brassinosteroid signaling. *Cell* 110:213–222. 2002.

Li, JM, Nam, KH. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-like kinase. *Science* 295:1299–1301. 2002.

Li J. Regulation of the nuclear activities of brassinosteroid signaling. *Current Opinion of the Plant Biology* 13:540–547. 2010.

Lieberman M, Segev O, Gilboa N, Lalazar A, Levin I. The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics* 108:1574-1581. 2004.

Liu YS, Roof S, Ye ZB, Barry C, van Tuinen A, Vrebalov J, Bowler C, Giovannoni J. Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA* 101:9897–9902. 2004.

Luo XM, Lin WH, Zhu S, Zhu JY, Sun Y. Integration of light- and brassinosteroid signaling pathways by a GATA transcription factor in *Arabidopsis*. *Developmental Cell*. 19:872–83. 2010.

Mao J, Zhang YCH, Sang Y, Li QH, Yang HQ. A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA102:12270–12275. 2005.

Mitchell J, Mandava N, Worley J, Plimmer J, Smith M. Brassins—a new family of plant hormones from rape pollen. *Nature* 225:1065–6. 1970.

Murashige T, Skoog F. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*. 15: 473–497. 1962.

Nakamura A, Tochio N, Fujioka S, Ito S, Kigawa T, Shimada Y, Matsuoka M, Yoshida S, Kinoshita T, Asami T, Seto H, Nakano T. Molecular actions of two synthetic brassinosteroids, iso-carbaBL and 6-deoxoBL, which cause altered physiological activities between *Arabidopsis* and rice. *PLoS One*. 12(4): e0174015. 2017.

Nagatani A. Light-regulated nuclear localization of phytochromes. *Current Opinion in Plant Biology* 7:1–4. 2004.

Nam KH, Li J. BRI1/BAK1, a receptor kinase pair mediating brassinosteroid signaling. *Cell* 110:203–212. 2002.

Neff MM, Nguyen SM, Malancharuvil EJ, Fujioka S, Noguchi T, Seto H, Tsubuki M, Honda T, Takatsuto S, Yoshida S, Chory J. *BASI*: A gene regulating brassinosteroid levels and light responsiveness in *Arabidopsis*. *Proceeding of the National Academy of Sciences*. USA. 96:15316–15323. 1999.

Noguchi T, Fujioka S, Choe S, Takatsuto S, Tax FE, Yoshida S, Feldmann KA. Biosynthetic pathways of brassinolide in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 124:201–209. 2000.

Nowak J, Rudnicki RM, Grzesik M. Effect of light quality on seed germination, seedling growth and pigment content in *Amaranthus caudatus* and *Celosia cristata nana*. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 4:179-185. 1996.

Oh E, Hao YQ, Choi G, Liang ZS, Wang ZY. Interactions between HLH and bHLH factors modulate light-regulated plant development. *Molecular Plant* 5:688– 697. 2012.

Oh MH, Wang X, Kota U, Goshe MB, Clouse SD, Huber SC. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase emerges as a component of brassinosteroid signaling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 106: 658–663. 2009.

Oh MH, Wang X, Wu X, Zhao Y, Clouse SD, Huber SC. Autophosphorylation of Tyr-610 in the receptor kinase BAK1 plays a role in brassinosteroid signaling and basal defense gene expression. *Proceeding of the National Academy of Sciences, USA.* 107:17827–17832. 2010.

Oh MH, Clouse SD, Huber SC. Tyrosine phosphorylation of the BRI1 receptor kinase occurs via a post-translational modification and is activated by the juxtamembrane domain. *Frontiers in Plant Science* 3:175. 2012.

Oh MH, Wang X, Kim SY, Wu X, Clouse SD, Huber SC. The Carboxy-terminus of BAK1 regulates kinase activity and is required for normal growth of *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science* 5: 16. 2014.

Pawson T. Specificity in signal transduction: from phosphotyrosine-SH2 domain interactions to complex cellular systems. *Cell* 116(2):191-203. 2004.

Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L. Relative expression software tool (REST©) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in realtime PCR. *Nucleic Acids Research.* 30 (9). 2002.

Pilařová L. Růstové reakce mutanta *7B-1* k barssinosteroidům v závislosti nasvětelných podmínkách. Bachelor's Thesis. Palacký University Olomouc. Faculty of Science. 2014.

Pilařová L. Interaction of blue light and brassinosteroid signalling in plant growth. Master's Thesis. Palacký University Olomouc. Faculty of Science. 2016.

Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany* 110:767-776. 2012.

Postel S, Kufner I, Beuter C, Mazzotta S, Schwedt A, Borlotti A, Halter T, Kemmerling B, Nurnberger T. The multifunctional leucine-rich repeat receptor kinase BAK1 is implicated in Arabidopsis development and immunity. *European Journal of Cell Biology* 89:169–174. 2010.

Russell J, Ougham H, Thomas H, Waaland S. The molecular life of plants. American Society of Plant Biologists 742p. 2013.

Russinova E, Borst JW, Kwaaitaal M, Cano-Delgado A, Yin Y, Chory J, de Vries SC. Heterodimerization and endocytosis of Arabidopsis brassinosteroid receptors BRI1 and AtSERK3 (BAK1). *Plant Cell*. 16:3216–3229. 2004.

Srinivas A, Behera RK, Kagawa T, Wada M, Sharma R. *High Pigment1* mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. *Plant Physiology* 134: 790–800, 2004

Taiz L, Zeiger E. *Plant Physiol.* 5. Sunderland: Sinauer Associates; 2006.

Tang J, Han Z, Chai J. Q&A: what are brassinosteroids and how do they act in plants? *BMC Biology* 14:113. 2016.

Sakamoto K, Nagatani A. Nuclear localization activity of phytochrome B. *The Plant Journal* 10:859–868.1996.

Salomon M, Zacherl M, Ruediger W. Phototropism and protein phosphorylation in higher plants: Unilateral blue light irradiation generates a directional gradient of protein phosphorylation across the oat coleoptile. *Botanica Acta* 110: (3) 214-216. 1997.

Seto H, Hiranuma S, Fujioka S, Koshino H, Suenaga T, Yoshida S. Preparation, conformational analysis, and biological evaluation of 6 α -carbabrassinolide and related compounds. *Tetrahedron* 58: 9741–9749. 2002.

Schäfer E, Nagy F. Photomorphogenesis in plants and bacteria. 3rd edn. Dordrecht, The Netherlands: Springer 662: 407–437. 2006.

Shimada Y, Fujioka S, Miyauchi N, Kushiro M, Takatsuto S, Nomura T, Yokota T, Kamiya Y, Bishop GJ, Yoshida S. Brassinosteroid-6-oxidases from *Arabidopsis* and tomato catalyze multiple C-6 oxidations in brassinosteroid biosynthesis. *Plant Physiology* 126:770–779. 2001.

Shiu SH, Karlowski WM, Pan R, Tzeng YH, Mayer KF, Li WH. Comparative analysis of the receptor-like kinase family in *Arabidopsis* and rice. *Plant Cell* 16:1220–1234. 2004.

Schroeder DF, Gahrtz M, Maxwell BB, Cook RK, Kan JM, Alonso JM, Ecker JR, Chory J Deetiolated1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Current Biology* 12:1462–1472. 2002.

Schulze B, Mentzel T, Jehle AK, Mueller K, Beeler S, Boller T, Felix G, Chinchilla D. Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(13): 9 444-9 451. 2010.

Singh AP, Savaldi-Goldstein S. Growth control: brassinosteroid activity gets context. *Journal of Experimental Botany* 66:1123–1132. 2015.

Somers DE, Devlin PF, Kay SA. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the *Arabidopsis* circadian clock. *Science*. 282:1488–1490. 1998.

Song L, Zhou XY, Li L, Xue LJ, Yang X, Xue HW. Genome-wide analysis revealed the complex regulatory network of brassinosteroid effects in photomorphogenesis. *Molecular Plant* 2:755-772. 2009.

Sun Y, Fan XY, Cao DM. Integration of brassinosteroid signal transduction with the transcription network for plant growth regulation in Arabidopsis. *Developmental Cell* 19:765–777. 2010.

Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, Mathur J, Kauschmann A, Altmann T, Redei GP, Nagy F, Schell J, Koncz C. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etiolation in Arabidopsis. *Cell* 85:171–182. 1996.

Thomson ID, Brassell SC, Comet PA, Eglinton G, Isaacson PJ, McEvoy J, Maxwell JR. Preliminary lipid analyses of Cores 49, 54, and 59 from Hole 462. *In: Larson, RL; Schlanger, SO; et al. (eds.), Initial Reports of the Deep Sea Drilling Project (U.S. Govt. Printing Office),* 61:613-618. 1981.

Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Denzel MA, Torres QI, Neff MM. CYP72B1 inactivates brassinosteroid hormones: An intersection between photomorphogenesis and plant steroid signal transduction. *Plant Physiology.* 133:1643-1653. 2003.

Turk EM, Fujioka S, Seto H, Shimada Y, Takatsuto S, Yoshida S, Wang H, Torres Q, Ward JM, Murthy G, Zhang J, Walker JC, Neff MM. *BAS1* and *SOB7* act redundantly to modulate Arabidopsis photomorphogenesis via unique brassinosteroid inactivation mechanisms. *Plant Journal.* 42:23-34. 2005.

Usami T, Mochizuki N, Kondo M, Nishimura M, Nagatani A. Cryptochromes and phytochromes synergistically regulate Arabidopsis root greening under blue light. *Plant Cell Physiology* 45:1798–1808. 2004.

Vert G, Nemhauser JL, Geldner N, Hong F, Chory J. Molecular mechanism of steroid hormone signaling in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology,* 21:177-201. 2005.

Vert G, Chory J. Downstream nuclear events in brassinosteroid signalling. *Nature* 441:96-100. 2006.

Wada K, Marumo S, Ikekawa N. Brassinolide and homobrassinolide promotion of lamina inclination of rice seedlings. *Plant and Cell Physiology* 22:323-325. 1981.

Wang ZY, Nakano T, Gendron J, He J, Chen M, Vafeados D, Yang Y, Fujioka S, Yoshida S, Asami T, Chory J. Nuclear-localized BZR1 mediates brassinosteroid-induced growth and feedback suppression of brassinosteroid biosynthesis. *Developmental Cell* 2:505–513. 2002.

Wang X, Li X, Meisenhelder J, Hunter T, Yoshida S, Asami T, Chory J. Autoregulation and homodimerization are involved in the activation of the plant steroid receptor BRI1. *Developmental Cell* 8:855–865. 2005a.

Wang X, Goshe MB, Soderblom EJ, Phinney BS, Kuchar JA, Li J, Asami T, Yoshida S, Huber SC, Clouse SD. Identification and functional analysis of in vivo phosphorylation sites of the Arabidopsis BRASSINOSTEROID-INSENSITIVE1 receptor kinase. *Plant Cell* 17:1685–1703. 2005b.

Wang X, Kota U, He K, Blackburn K, Li J, Goshe MB, Huber SC, Clouse SD. Sequential transphosphorylation of the BRI1/BAK1 receptor kinase complex impacts early events in brassinosteroid signaling. *Developmental Cell* 15:220–235. 2008.

Wang ZY. Brassinosteroids modulate plant immunity at multiple levels. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA.* 109:7–8. 2012.

Weller JL, Schreuder ME, Smith H, Koornneef M, Kendrick RE. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. *Plant Journal* 24: 345–356. 2000

Weller JL, Perrotta G, Schreuder MEL, van Tuinen A, Koornneef M, Giuliano G, Kendrick RE. Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant Journal* 25:427–440. 2001.

Wu G, Spalding EP. Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA.* 104:18813–18818. 2007.

Wu L, Yang H. CRYPTOCHROME 1 is implicated in promoting R protein-mediated plant resistance to *Pseudomonas syringae* in *Arabidopsis*. *Molecular Plant* 3:539–548. 2010.

Yang M, Li C, Cai Z, Hu Y, Nolan T, Yu F, Yin Y, Xie Q, Tang G, Wang X. SINAT E3 Ligases Control the Light-Mediated Stability of the Brassinosteroid-Activated Transcription Factor BES1 in *Arabidopsis*; *Developmental Cell* 41: 47-58. 2017.

Yanovsky MJ, Mazzella MA, Whitelam GC, Casal JJ. Resetting of the circadian clock by phytochromes and cryptochromes in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Rhythms* 168(1):523–530. 2001.

Yin Y, Wang ZY, Mora-Garcia S, Li J, Yoshida S, Asami T, Chory J. BES1 accumulates in the nucleus in response to brassinosteroids to regulate gene expression and promote stem elongation. *Cell* 109:181–191. 2002.

Yin Y, Vafeados D, Tao Y, Yoshida S, Asami T, Chory J. A new class of transcription factors mediates brassinosteroid-regulated gene expression in *Arabidopsis*. *Cell*. 120:249-259. 2005.

Yokota T, Ogino Y, Suzuki H, Takahashi N, Saimoto H, Fujioka S, Sakurai A. Metabolism and biosynthesis of brassinosteroids. In: Cutler H, Yokota T, Adam G, editors. *Brassinosteroids Chemistry, Bioactivity, & Applications*. Washington, D.C.: American Chemical Society pp. 86–96. 1991.

Yu X, Sayegh R, Maymon M, Warpeha K, Klejnot J, Yang H, Huang J, Lee J, Kaufman L, Lin Ch. Formation of nuclear bodies of *Arabidopsis* CRY2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *Plant Cell* 21:118–130. 2009.

Yu X, Li L, Zola J. A brassinosteroid transcriptional network revealed by genome-wide identification of BES1 target genes in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 65:634–646. 2011.