

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**DIPLOMOVÁ PRÁCA**

**Olomouc 2021**

**Bc. Anna Repkovská**



**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Vplyv zasolenia na expresiu fototropínov v semenách rajčiaka**

## **DIPLOMOVÁ PRÁCA**

Autor:	<b>Bc. Anna Repková</b>
Štúdijný program:	N1501 Experimentální biologie
Štúdijný odbor:	Experimentální biologie
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúci práce:	<b>prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b>
Termín odovzdania práce:	2021

**Prehlásenie**

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne pod odborným vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s využitím citovanej literatúry.

V Olomouci dňa .....

.....

Podpis

## **Pod'akovanie**

Moje úprimné pod'akovanie patrí vedúcemu mojej práce prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, PhD. za jeho bezchybné vedenie, trpezlivosť a ochotu behom spracovania práce a predovšetkým čas, ktorý mi venoval. Tiež by som rada pod'akovala členom Skupiny molekulárnej fyziológie, obzvlášť Bc. Jane Glogarovej za jej prínosné rady a pomocnú ruku pri experimentoch.

## 1 Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko	Bc. Anna Repkovská
autora	
Názov práce	Vplyv zasolenia na expresiu fototropínov v semenách rajčiaka
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Laboratoň rústových regulátorů
Vedúci práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

Svetlo, ako exogénny faktor, je rastlinou vnímaný prostredníctvom fotoreceptorov a dokáže modulovať odpoveď rastliny na abiotický stres. Táto diplomová práca prináša informácie o vplyve modrého svetla na citlivosť rastlín k zasoleniu. Bola študovaná expresia génov pre fototropíny (*PHOT1* a *PHOT2*) v semenách rajčiaka a vplyv soli na expresiu týchto génov. Rovnako bola skúmaná klíčivosť týchto semien. K experimentom boli využité semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) kultivar Rutgers a semená mutanta *7B-1* odvodeného od tohto kultivaru. Semená oboch genotypov boli vystavené soľnému stresu a rôznym svetelným podmienkam. Experimenty klíčivosti semien prebiehali v tme, na modrom a červenom svetle. Semená, u ktorých bola študovaná expresia génov, boli kultivované v tme a na modrom svetle.

Výsledky klíčivosti semien potvrdili predošlé pozorovania, že modré svetlo zvyšuje inhibičný účinok soli na klíčenie semien rajčiaka a že semená mutanta *7B-1* sú tolerantnejšie k soľnému stresu, zvlášť na modrom svetle. Ukázalo sa, že u semien mutanta *7B-1* kultivovaných na BL zasolenie významne znížilo expresiu *PHOT1*, čo potvrdzuje hypotézu, že zasolenie môže spätnou väzbou ovplyvňovať signálne dráhy modrého svetla. V semenách mutanta *7B-1* bola expresia *PHOT1* redukovaná aj modrým svetlom, čo by mohlo vysvetľovať mechanizmus, ktorým mutant *7B-1* dokáže tolerovať zasolenie aj po ovplyvnení BL. Na expresiu *PHOT2* nemal soľný stres výrazný účinok. Ukázalo sa však, že expresia *PHOT2* je stimulovaná modrým svetlom a že funkčný produkt génu *7B-1* je pozitívne zapojený do signálnej dráhy BL.

Kľúčové slová                    expresia génov, fototropíny, modré svetlo, mutant *7B-1*, *Solanum lycopersicum L.*, soľný stres

Počet strán	66
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský (anglický)

## Bibliographical identification

Author's first name and surname Bc. Anna Repkovská  
Title of thesis Effect of salinity on the phototropin expression in tomato seeds  
Type of thesis Diploma  
Department Laboratory of Growth Regulators  
Supervisor prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  
The year of presentation 2021

### Abstract

Light is as an exogenous factor perceived by a plant through photoreceptors and may even modulate the response of the plant to abiotic stress. The present thesis presents information on the influence of blue light on sensitivity of the plant in terms of salinity. Expression of genes for phototropins (*PHOT1* and *PHOT2*) and the influence of salt on the expression of the genes were studied in tomato seeds. Germination of those seeds was investigated as well. For the experiments seeds of edible tomato (*Solanum lycopersicum L.*) of cultivar Rutgers and seeds of *7B-1* tomato mutant derived from this cultivar were used. The seeds of both genotypes were exposed to salt stress and different light conditions. Germination experiments were performed in darkness, blue light, and red light. Seeds used of gene expression studies were cultivated in darkness and blue light.

The results on seed germination confirmed previous observations that blue light increases the inhibition effect of salt on germination of the tomato seeds and that the seeds of the mutant *7B-1* were more tolerant to the salt stress, especially under blue light condition. The results have also shown that in seeds of *7B-1* mutant incubated in BL, the salinity stress also resulted in significantly lowered expression of *PHOT1*. This proves the hypothesis that salinity may influence signal pathways of blue light. In *7B-1* seeds, the expression of *PHOT1* was reduced by blue light as well, which might explain a mechanism through which *7B-1* may tolerate salinity even after being influenced by BL. Salt stress did not show any specific effect on the expression of *PHOT2* gene. However, it was shown that the expression of *PHOT2* was stimulated by blue light and that the functioning product of *7B-1* gene is positively connected with BL signaling.

Keywords gene expression, phototropins, blue light, mutant *7B-1*, *Solanum lycopersicum L.* salt stress

Number of pages 66  
Number of appendices 0  
Language Slovak (English)

## Obsah

1 Bibliografická identifikácia.....	5
2 Úvod a ciele.....	9
3 Súčasný stav riešenej problematiky .....	10
3.1. Klíčenie semien .....	10
3.2. Abiotický stres.....	13
3.2.1. Soľný stres .....	13
3.2.1.1. Klíčenie pri zasolení .....	16
3.3. Vnímanie svetla rastlinou .....	18
3.3.1. Fotoreceptory .....	18
3.3.2. Prenos svetelného signálu v rastline .....	19
3.3.2.1. Fototropíny 1 a 2.....	19
3.3.3. Vplyv svetla a schopnosti rastlín tolerovať soľný stres .....	25
4 Materiál a metódy.....	28
4.1. Rastlinný materiál.....	28
4.2. Pracovné postupy.....	28
4.2.1. Príprava kultivačného média (MS) .....	28
4.2.2. Postup pre štúdium klíčivosti semien.....	29
4.2.2.1. Povrchová sterilizácia a výsev semien.....	29
4.2.2.2. Vyhodnotenie klíčivosti semien.....	30
4.2.3. Postup pre štúdium expresie génov <i>PHOT1</i> a <i>PHOT2</i> .....	31
4.2.3.1. Výsev, zber a homogenizácia semien .....	31
4.2.3.2. Izolácia RNA a jej prečistenie .....	31
4.2.3.3. PCR pre prečistenú RNA .....	34
4.2.3.4. Syntéza cDNA a PCR pre nasyntetizovanú cDNA.....	35
4.2.3.5. Real-time PCR .....	38
5 Výsledky .....	41
5.1. Štúdium klíčivosti semien .....	42
5.2. Štúdium expresie génov.....	44
5.2.1. Expresia génu <i>PHOT1</i> .....	45
5.2.1.1. Vplyv NaCl na expresiu <i>PHOT1</i> .....	46
5.2.1.2. Vplyv modrého svetla na expresiu <i>PHOT1</i> .....	47
5.2.1.3. Vplyv mutácie <i>7B-1</i> na expresiu <i>PHOT1</i> .....	48
5.2.2. Expresia génu <i>PHOT2</i> .....	49
5.2.2.1. Vplyv NaCl na expresiu <i>PHOT2</i> .....	50
5.2.2.2. Vplyv modrého svetla na expresiu <i>PHOT2</i> .....	51
5.2.2.3. Vplyv mutácie <i>7B-1</i> na expresiu <i>PHOT2</i> .....	52

6 Diskusia.....	53
7 Záver .....	56
8 Citovaná literatúra .....	57
9 Skratky .....	65



## 2 Úvod a ciele

Rast a vývin rastliny významne ovplyvňuje okolité prostredie. Abiotický stres patrí medzi činitele, ktoré svojím pôsobením nepriaznivo zasahujú do existencie rastliny. Kvôli usadlému spôsobu života, je tvorba adaptačných mechanizmov jedinou možnosťou rastliny, ako sa vyhnúť negatívnym účinkom stresových faktorov. V prípade soľného stresu, pri ktorom je rastlina vystavená predovšetkým toxickému účinku iónov soli, spočíva adaptačný mechanizmus vo vylučovaní iónov sodíka von z bunky alebo ich ukladaním do vakuoly. Optimálny rast a vývin rastliny závisí aj od svetelných podmienok, v ktorých sa rastlina nachádza. Svetlo nie je len zdrojom energie pre rastlinu, ale podieľa sa aj na jej vývojových procesoch. Dokáže tiež modulovať odpoveď na okolitý stres. Rastlina vníma svetlo prostredníctvom fotoreceptorov. Tie možno rozdeliť podľa toho, na akú vlnovú dĺžku svetla sú citlivé.

Všeobecným cieľom práce bolo objasniť, či modré svetlo ovplyvňuje citlivosť rastlín k zasoleniu. Uskutočnené experimenty mali vyvrátiť alebo potvrdiť vzniknutú hypotézu o tom, že zasolenie môže spätnou väzbou ovplyvňovať signálne dráhy modrého svetla. Experimentálnym cieľom bolo štúdium expresie génov pre fototropíny (*PHOT1*, *PHOT2*) v semenách rajčiaka jedlého a to, ako zasolenie ovplyvňuje expresiu fototropínov v týchto semenách. K experimentom boli využité semená rajčiaka *Solanum lycopersicum L.* kultivaru Rutgers a od neho odvodeného mutanta *7B-1*. Použitý mutant je špecifický svojou samčou sterilitou pri fotoperióde dlhého dňa. Taktiež vykazuje toleranciu k abiotickým a biotickým stresom a to špecificky na modrom svetle. K štúdiu expresie fototropínov v tejto rastline viedlo zistenie, že mutácia *7B-1* spôsobuje redukciu reakcií vyvolaných modrým svetlom a sprostredkovaných fototropínami. Ďalším podnetom je tiež hypotéza, ktorá tvrdí, že abiotický stres môže zosilňovať fototropínovú signálnu dráhu.

Semená oboch genotypov boli kultivované *in vitro* na MS médiu s rôznou koncentráciou NaCl pri rôznych svetelných podmienkach. Následne bolo pozorované klíčenie semien a pomocou metódy kvantitatívnej RT-PCR bola u semien kultivovaných 72 hodín študovaná expresia génov *PHOT1* a *PHOT2*.

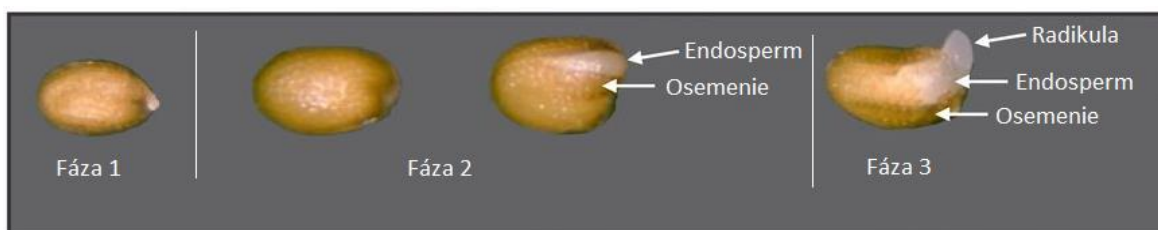
Prekladaná diplomová bola vypracovaná v Skupine molekulárnej fyziológie, v Laboratóriu rastových regulátorov, ktorá je spoločným pracoviskom Prírodovedeckej fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentálnej botaniky Akadémie vied Českej republiky.

### 3 Súčasný stav riešenej problematiky

#### 3.1. Klíčenie semien

Rastlina začína svoj nezávislý život vo forme semena. Nová rastlina je v semene uložená v podobe embrya. Semeno obsahuje zásoby živín, vďaka ktorým dokáže vyživovať embryo rastliny, až pokiaľ sa z neho stane sebestačný autotrofný organizmus. Keďže hlavnou úlohou každého semena je vyklíčiť, je zaujímavé, že existuje kľudový stav semena, ktorý tvorí akúsi vnútornú blokádu klíčenia. Tento stav predchádza klíčeniu a nazýva sa dormancia (Bonner 1984). Dormancia predstavuje adaptívnu vlastnosť, ktorá optimalizuje počiatok klíčenia v závislosti na čase. Doba, kedy je semeno v stave dormancie sa v jednotlivých rastlinách líši. Stav dormancie teda zabezpečuje, aby semeno nezačalo klíčiť už v materskej rastline alebo za nepriaznivých podmienok, čo by mohlo mať za následok záhubu rastliny.

V prípade, že sa semeno nachádza v priaznivých podmienkach začína klíčiť. Klíčenie začína imbibíciou suchého semena a je ukončené, keď časť embrya, ktorou je zvyčajne radikula, prerazí osemenie. Imbibíciou sa rozumie proces nasávania vody suchým semenom. Klíčenie je možno rozdeliť do troch fáz (Obr. č. 1). V prvej fáze dochádza k rýchlemu počiatočnému príjmu vody, po ktorom nastáva druhá fáza, takzvaná fáza plató. V tejto fáze sa nasávanie vody semenom spomalí alebo sa úplne zastaví. V tretej fáze sa absorpcia vody opäť zvyšuje, avšak tentoraz nasáva vodu radikula, ktorá prerazila semenné obaly a ukončila proces klíčenia (Bewley 1997).



Obr. č. 1: Fázy klíčenia semena (prevzaté a upravené od Dekkers et al. 2013)

Nasatie vody bunkami suchého semena počas prvej fázy vedie k dočasným štrukturálnym poruchám predovšetkým v bunkových membránach. Tieto poruchy vedú k okamžitému a rýchlemu úniku rozpustených látok a nízkomolekulárnych metabolitov do okolitého imbibovaného prostredia. Po krátkej dobe rehydratácie sa membrány stabilizujú a únik rozpustených látok sa obmedzí. Po imbibícií sa v dovtedy dormantnom semene obnoví jeho metabolická aktivita. Enzýmy a zlúčeniny potrebné k tomuto počiatočnému obnoveniu metabolickej aktivity sú prítomné aj v suchom semene, avšak ich aktivita je veľmi nízka alebo žiadna. Ich zvýšenú metabolickú aktivitu zapríčini až prítok vody, pričom k náhrade týchto zlúčenín dôjde až po niekoľkých hodinách, keď semeno dosiahne kompletne aktívny metabolický stav (Bewley 1997).

Bunky suchého semena obsahujú mitochondrie, ktoré sú kvôli predchádzajúcemu dozrievaniu a vysušovaniu semena menej diferencované. Napriek tomu tieto organely obsahujú dostatok

enzýmov, zúčastňujúcich sa Krebsovho cyklu, na zaistenie dostatočného množstva ATP na podporu metabolizmu po prvotnej imbibícii (Ehrenschaft and Brambl 1990). Jednou z prvých zmien po imbibícii je teda obnovenie respiračnej aktivity. Po prudkom počiatocnom zvýšení spotreby kyslíka jeho spotreba klesá až kým radikula neprerazí osemenie. Následne znova nastáva stav zvýšenej spotreby kyslíka radikulou (Botha et al. 1992). Glykolytické a oxidačné pentózové dráhy sa obnovia počas prvej fázy imbibície a dôjde tiež k aktivácii enzýmov Krebsovho cyklu (Nicolás and Aldasoro 1979).

Dormancia a klíčenie semien sú dva odlišné fyziologické procesy a prechod z dormantného štádia semena do štádia klíčenia je kritickým vývojovým krokom v životnom cykle rastliny. Tento proces je presne regulovaný endogénne - fytohormónmi a exogénne - faktormi životného prostredia, pričom tieto faktory (svetlo, teplo, voda a živiny v pôde) ovplyvňujú klíčenie semien hlavne prostredníctvom regulácie metabolizmu a signálnych dráh fytohormónov (Holdsworth et al. 2008).

Medzi hlavné endogénne regulačné fytohormóny patrí kyselina abscisová (ABA) a gibberelíny (GA). Tieto hormóny antagonisticky ovplyvňujú dormanciu semena (Holdsworth et al. 2008). Hlavným významom dormancie je predísť klíčeniu v nevhodnom časovom období alebo zabezpečiť prežitie rastliny v nepriaznivých a stresových podmienkach. Pri narušení optimálnych hladín spomenutých regulačných fytohormónov v semene môže dôjsť napríklad k viviparii, ktorá predstavuje proces rýchleho klíčenia práve vyzretých semien už v materskej rastline (Neill et al. 1987).

ABA je hlavným induktorom a udržiavateľom dormantného stavu semena (Vaistij et al. 2013). V dobe, keď semeno v materskej rastline dozrieva, je v ňom akumulovaná endogénna ABA, ktorá indukuje a udržuje vegetačný kľud semena a zabraňuje viviparii. Zistilo sa, že ABA sa tiež do istej miery podieľa na remodelácii chromatinu, čím sa určuje génová expresia v semene a sú tak regulované mnohopočetné vývojové procesy, čo má rovnako vplyv na dormanciu a klíčenie semien (Chinnusamy et al. 2008). Pred začiatkom klíčenia je endogénna hladina ABA v semene znížená a naopak, obsah GA je regulovaný imbibíciou a stratifikáciou. GA prerušuje vegetačný kľud a stimuluje klíčenie prostredníctvom antagonistického potlačenia dormancie, ktorá bola vyvolaná kyselinou abscisovou (Graeber et al. 2012). Vysoká hladina GA alebo signálna dráha GA spôsobuje napríklad uvoľňovanie hydrolytických enzýmov, či oslabenie osemenia, a tým podporuje klíčenie semien (Holdsworth et al. 2008).

Svetlo je jedným z exogénnych faktorov, ktoré vplyvajú na klíčenie semien. Klíčenie semien indukované svetlom sa nazýva fotoblastizmus. Táto vlastnosť niektorých semien vyšších rastlín spôsobuje, že v zemi uložené semená zostávajú v stave dormancie a neklíčia (Borthwick et al. 1952). Schopnosť regulovať klíčenie má predovšetkým červená a modrá časť svetelného spektra, pričom regulácia u jednotlivých spektier prebieha odlišne.

Červeným svetlom indukované klíčenie môže nastať u semien prostredníctvom fotoreceptorov zvaných fitochrómy. U fotoblastických rastlín, vrátane *Arabidopsis thaliana*, je pravdepodobnosť

vyklíčenia vyššia na priamom slnečnom svetle, ktoré je bohaté na vlnové dĺžky nachádzajúce sa v červenej oblasti absorpčného spektra. Naopak v tieni, kde sa vlnové dĺžky svetla pohybujú v oblasti far-red absorpčného spektra, tieto rastliny klíčia menej (Lee and Lopez-Molina 2012). Fytochrómy rozlišujú tieto časti svetla a reagujú na ne. Červené svetlo prostredníctvom aktivácie fytochrómu spôsobuje akumuláciu GA v semene, čím indukuje jeho klíčenie. Naopak far-red svetlo podporuje akumuláciu ABA a teda klíčenie blokuje (Oh et al. 2007, Piskurewicz et al. 2009). Zatiaľ čo fotoblastické rastliny regulujú klíčenie semien cez svetlom aktivované fytochrómy, nefotoblastické rastliny majú tieto fotoreceptory už aktivované dokážu klíčiť v tme, pričom svetlo túto hladinu aktivovaných fytochrómov znižuje a inhibuje tak klíčenie semena.

V prípade, že rastlina vyklíči v tme a nie je zatiaľ fotosynteticky aktívna, nastáva tzv. etiolovaný vývoj, kedy sú využívané zásoby zo semena. Tento vývoj je charakterizovaný rýchlym predĺžením hypokotylu v protismere gravitačného pôsobenia, inhibíciou predlžovania kotyledónov a inhibíciou expanzie listov. Cieľom takejto rastliny je dostať sa čo najskôr na svetlo a zahájiť tak deetiolizáciu. Procesu deetiolizácie sa zúčastňujú hlavne fotoreceptory citlivé na červené a modré svetlo (fytochrómy a kryptochrómy) a jeho cieľom je započat' fotosyntetickú aktivitu rastliny (Chen et al. 2004).

Modré svetlo má vplyv hlavne na ďalší vývoj vyklíčenej rastliny, akým je spomínané zahájenie fotosyntetickej aktivity rastliny. Avšak na základe experimentov bolo zistené, že modré svetlo u dormantných semien jačmeňa prostredníctvom kryptochrómu 1 (cry1) stimuluje tvorbu ABA, čím zabraňuje klíčeniu semena (Hofmann 2014, Barrero et al. 2014).

### 3.2. Abiotický stres

Abiotický stres u rastlín je definovaný ako negatívny vplyv neživých faktorov na živé organizmy ako sú napríklad rastliny. Najčastejším stresom pre rastliny sú sucho, slanosť pôdy, nízke a vysoké teploty a iné extrémne prostredia, ktoré sú príčinou nepriaznivého rastu rastlín a zníženia ich výnosu. Sucho postihuje približne 45% poľnohospodárskej pôdy vo svete a 19,5% zavlažovanej pôdy trpí zvýšeným obsahom solí (dos Reis et al. 2012).

Abiotické stresy v rastlinách vyvolávajú zvýšenú tvorbu reaktívnych foriem kyslíka (ROS), čo spôsobuje rozsiahle poškodenie buniek a inhibíciu fyziologických procesov prebiehajúcich v rastlinách. Na potlačenie tvorby ROS si rastliny dokázali vytvoriť endogénne antioxidačné mechanizmy. Avšak, ak je organizmus vystavený abiotickému stresu, zvyšuje sa intracelulárna koncentrácia ROS a s ňou sa zvyšuje aj poškodenie týchto antioxidačných mechanizmov. Rastlina preto nie je schopná odolávať pôsobeniu ROS. Na prežitie v takýchto podmienkach si rastliny vyvinuli zložité mechanizmy, vďaka ktorým sa rastlina dokáže adaptovať na stres alebo sa mu dokonca vyhnúť. Tieto reakcie sú regulované na všetkých úrovniach organizmu. Na bunkovej úrovni sú to procesy, ktoré sa podieľajú na úprave bunkových membrán, modifikácií stavby bunkovej steny, zapríčiňujú zmeny v bunkovom cykle a delení buniek. Taktiež sú zodpovedné za syntézu špecifických endogénnych nízkomolekulárných zlúčenín ako je kyselina salicylová, kyselina jasmónová, ethylén a kyselina abscisová (Fujita et al. 2006). Na úrovni genómu sa rastlina dokáže chrániť napríklad expresiou génov, ktoré sú zapojené do priamej ochrany pred stresom (Chinnusamy et al. 2004).

#### 3.2.1. Soľný stres

Zasolenie pôdy sa čoraz viac stáva hrozbou pre pestovanie rastlín vo svete. Soľný stres u rastlín vykazuje hlavne zníženie ich produktivity a kvality plodín. Dôvodom salinity je predovšetkým nevhodný režim zavlažovania a zavlažovanie pôdy brakickou vodou. Situácia je horšia prevažne na pobrežiach, kde dochádza k zvyšovaniu hladiny mora kvôli klimatickým zmenám. Ak sa v rastline vplyvom zasolenia hromadia soli, dochádza tiež k osmotickému stresu, nutričnej dysbalancii a k oxidatívne stresu (Volkov 2015). Dôsledkom toho je narušená homeostáza intracelulárnych iónov, funkcia membrány a metabolická aktivita (Hasegawa et al. 2000). Osmotický stres vyvolaný zasolením spôsobuje zníženie rýchlosti delenia a predlžovania koreňových buniek, znižuje primárny rast koreňov a v konečnom dôsledku inhibuje rast a vývoj rastliny (Jung and McCouch 2013).

Podľa adaptácie rastlín na zasolenie pôdy ich možno rozdeliť na halofyty a glykofyty (halofóbné rastliny). Halofyty sú charakterizované ako rastliny adaptované na podmienky zasolených pôd, naopak glykofyty vykazujú neznášanlivosť k zasoleniu a aj nízka koncentrácia solí je pre ne toxická. Napriek tomu obe skupiny rastlín disponujú určitými procesmi, vďaka ktorým sú schopné

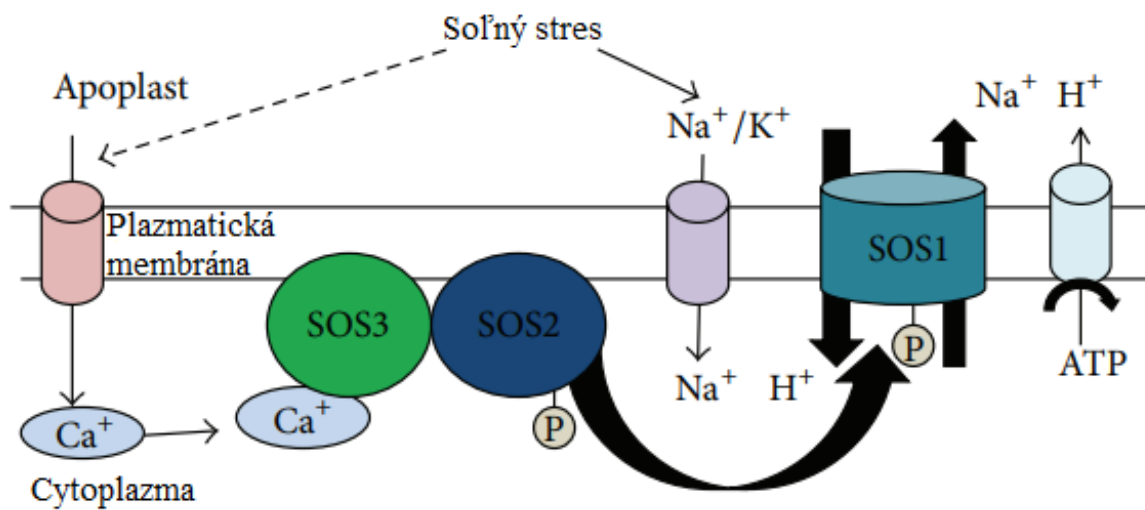
do istej miery zvýšené koncentrácie iónov solí v bunke tolerovať. Prebytočná soľ je buď transportovaná do vakuoly, alebo je extrudovaná von z bunky a ukladaná do starších pletív, ktoré neskôr odumierajú (Reddy et al. 1992, Zhu 2003).

Hlavnou formou soli, ktorá sa v pôde vyskytuje, je chlorid sodný (NaCl), a teda hlavnú rolu v tolerančných mechanizmoch zohráva kation sodíka ( $\text{Na}^+$ ) a jeho transport cez bunkové membrány. Vstup  $\text{Na}^+$  do cytosolu buniek prebieha pasívne prostredníctvom  $\text{K}^+$ - $\text{Na}^+$  transportného proteínu (HKT) uloženého v cytoplazmatickej membráne. Za normálnych podmienok tento transportér uprednostňuje  $\text{K}^+$  pre vstup do bunky. Avšak, ak je rastlina vystavená soľnému, je vstup  $\text{K}^+$  cez tento transportér inhibovaný práve iónmi  $\text{Na}^+$ , ktoré tak prioritne využívajú  $\text{K}^+$ / $\text{Na}^+$ -transportér pre svoj vstup do bunky (Liu and Zhu 1997).

V rastline postihnutej soľným stresom sa objavuje tiež rad reakcií, ktoré indukujú expresiu génov, zmeny v metabolizme alebo určité fyziologické procesy, vďaka ktorým organizmus bojuje proti stresu. Medzi proteíny, ktoré sú schopné detekovať zasolenie patria receptory sprážené s G-proteínom, iónové kanály, receptor-like kináza alebo histidínkináza. Tieto receptory prenášajú primárne signály, ktoré generujú sekundárne signály, akým sú napríklad vápenaté katióny ( $\text{Ca}^{2+}$ ), inozitol fosfáty, ROS, oxid dusnatý (NO) alebo ABA. Najdôležitejšia je signálna dráha spojená so zvýšenou koncentráciou cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  (Onaga and Wydra 2016).

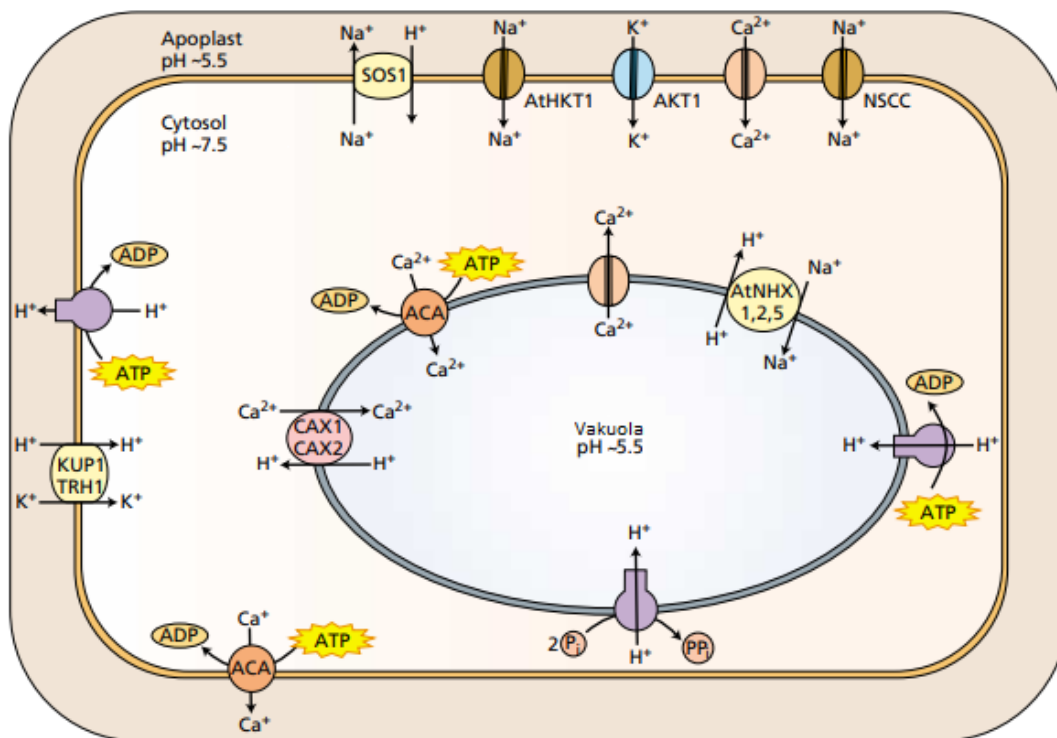
Vápenaté katióny v cytosole aktivujú  $\text{Ca}^{2+}$ -dependné proteíny, tzv. kalmodulíny, ktoré slúžia na ďalší prenos signálu v bunke, a ktorých cieľom je aktivovať transkripčné faktory a započat transkripciu (Deinlein et al. 2014). Takto aktivované transkripčné faktory spúšťajú transkripciu génov zapojených do adaptačných mechanizmov na soľný stres. Sú nimi napríklad gény kódujúce proteíny, ktoré vylučujú soľ z bunky (SOS1, skratka pre Salt Overly Sensitive), rodina génov pre kation:proton  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -antiporty alebo gény pre kompartmentalizáciu solí v bunke (napríklad vakuolárna  $\text{H}^+$ -pyrofosfatáza) (Chen et al. 2015).

Na soľ citlivý  $\text{Ca}^{2+}$  senzor (SOS) sa skladá z troch funkčne prepojených proteínov: SOS1, SOS2 a SOS3 (Obr. č. 2). Jeho regulačný mechanizmus spočíva vo väzbe  $\text{Ca}^{2+}$ , ktorého koncentrácia sa zvýši pri vysokých hodnotách  $\text{Na}^+$  v bunke. SOS3 detekuje a naväzuje  $\text{Ca}^{2+}$ , pričom u neho dochádza ku konformačnej zmene a viaže sa na SOS2, ktorý predstavuje serín/treonín proteínkinázu. Po naviazaní je kináza aktivovaná a komplex SOS3-SOS2 je uložený v plazmatickej membráne bunky. Aktivovaná proteínkináza fosforyluje  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -antiport (SOS1), ktorý sa tiež nachádza v plazmatickej membráne. Kinázou aktivovaný antiport extrúduje nadbytočný  $\text{Na}^+$  von a znižuje jeho toxicitu v bunke (Quintero et al. 2011). Dôležitú úlohu v popísanom adaptačnom mechanizme má aj  $\text{H}^+$ -ATPáza, ktorá generuje elektrochemický protónový gradient. Protónová pumpa pumpuje protóny vodíka von z bunky a tvorí tak gradient, ktorý napomáha  $\text{Na}^+$ / $\text{H}^+$ -antiportu vypudzovať prebytočné  $\text{Na}^+$  z bunky a udržiava optimálne pH v cytosole bunky (Hasegawa et al. 2000).



**Obr. č. 2:** Schéma SOS signálnej dráhy ako odpoveď na soľný stres (prevzaté a upravené od Gupta and Huang 2014)

Ďalším dôležitým mechanizmom, vďaka ktorému je rastlina schopná tolerovať soľný stres, je ukládanie iónov solí do vakuoly. Jeho fungovanie spočíva v aktivite  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -exchangerov (NHX), ktoré sú uložené v tonoplaste vakuoly (Obr. č. 3). Rovnako ako pri vypudzovaní  $\text{Na}^+$  von z bunky, ktoré je popísané v odstavci vyššie, je k správne fungovaniu NHX potrebná aktivita protónových púmp uložených v tonoplaste. Medzi tieto pumpy patrí V-ATPáza (vakuolárna  $\text{H}^+$ -ATPáza) a V-PPáza ( $\text{H}^+$ -pyrofosfatáza) (Rea and Sanders 1987). Ich funkcia pumpovania  $\text{H}^+$  do vakuoly spočíva jednak vo vytvorení protónového gradientu vo vakuole, ktorý napomáha správnej funkcii NHX, ale aj k držaniu optimálneho pH v cytosole bunky (Hasegawa et al. 2000).



**Obr. č. 3:** Schéma adaptačných procesov v rastlinnej bunke vystavenej soľnému stresu (prevzaté a upravené od Taiz and Zeiger 2002)

### 3.2.1.1. Klíčenie pri zasolení

Ak sa semená nachádzajú v zasolenej pôde, sú rovnako vystavené stresu. Zasolenie zvyšuje vonkajší osmotický potenciál, kvôli ktorému je následne znížená absorpcia vody semenom počas imbibície (Munns and Tester 2008). Zvýšená koncentrácia sodných kationov pôsobí v semene toxicky a ovplyvňuje tak jeho klíčenie a životaschopnosť embrya rastliny. Toxické účinky iónov spôsobujú hlavne poškodenie štruktúry a funkcie proteínov, bunkových organel, poškadzujú proces respirácie a fotosyntézy (Jahromi et al. 2008, Daszkowska-Golec 2011).

Osmotický stres má vplyv na klíčenie hlavne v jeho prvej fáze, kedy suché semeno imbibuje vodu. Naopak toxicita iónov sa prejavuje prevažne vo fáze dva, keď je bunkový metabolizmus v semene reaktivovaný. Spolupôsobenie oboch faktorov možno sledovať počas poslednej, tretej fázy klíčenia, počas ktorej dochádza k deleniu, rastu a predlžovaniu buniek za nepretržitého nasávania vody semenom. Soľný stres má za následok spomalenie alebo úplnú inhibíciu klíčenia (El-Hendawy et al. 2019). Zapríčiňuje tiež zníženie koncentrácie GA alebo naopak zvýšenie ABA a tým opäť negatívne ovplyvňuje klíčenie. Postihnutá môže byť aj permeabilita membrány a využitie vody semenom (Lee and Luan 2012). V dobe klíčenia je zvýšená transkripčná aktivita génu pre  $\alpha$ -amylázu, ktorá prestavuje hydrolytický enzým metabolizujúci škrob. Jej úloha počas klíčenia spočíva v rozklade zásobného škrobu na cukry, ktoré potom slúžia ako energia a výživa pre embryo a radikulu (Weiss and Ori 2007). Oneskorené klíčenie je dôsledkom práve poklesu aktivity



$\alpha$ -amylázy, ku ktorej došlo nedostatočným príjmom vody zo zasolenia. Málo aktívna  $\alpha$ -amyláza vedie k významnému deficitu sacharidov, ktoré sú nevyhnutné pre vývin embrya. Okrem toho znížená koncentrácia cukru mení osmotický potenciál buniek semena, čo má negatívny vplyv na absorpciu vody semenom (El-Hendawy et al. 2019). Semená halofytných rastlín sú prispôbené na klíčenie a rast v zasolených pôdach. Adaptačné procesy v semenách môžu odpovedať už spomínaným mechanizmom rastlín tolerovať stres, alebo odpoveďou môže byť napríklad zvýšená selektivita  $K^+/Na^+$ -transportéru, vďaka ktorému je semeno schopné udržiavať optimálnu kladinu  $K^+$  v cytosole, a tak odolávať stresovým faktorom (Guo et al. 2012).

### 3.3. Vnímanie svetla rastlinou

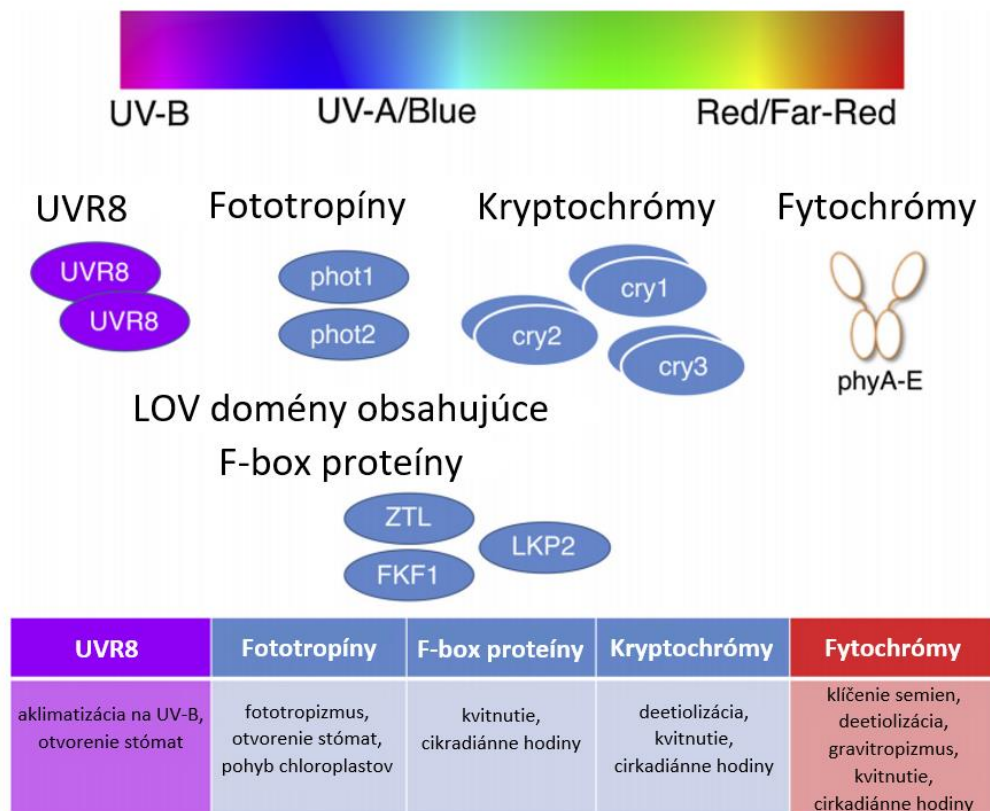
Rastliny sú schopné detekovať kvalitu, kvantitu a smer svetla a využiť ho ako vonkajší signál pre optimalizáciu svojho rastu a vývoja. Svetlo ovplyvňuje väčšinu vývojových procesov počas celého života rastliny. Medzi hlavné deje ovplyvňované svetlom patrí klíčenie semien, ich nasledujúci fotomorfogénny vývoj, fototropizmus a tiež kvitnutie. Energia zo svetla sa využíva hlavne na fixáciu oxidu uhličitého pri fotosyntéze. Vďaka usadenému spôsobu života si rastliny dokázali vytvoriť rôzne adaptačné mechanizmy, ktoré ich do istej miery dokážu ochrániť pred nepriaznivým okolitým prostredím. Aby sa rastliny dokázali adaptovať na meniaci sa svet okolo nich a prežiť v ňom, vyvinuli si sofistikovaný spôsob detekcie vonkajších signálov (napríklad svetlo) a prenos takýchto signálov do vnútorných signálnych dráh. Je preto nevyhnutné, aby rastliny správne interpretovali informácie o dopadajúcom svetle prostredníctvom rôznych druhov fotoreceptorov (Batschauer 1999; Paik and Huq 2019).

#### 3.3.1. Fotoreceptory

Fotoreceptory sú proteíny lokalizované v rôznych častiach rastlinnej bunky v závislosti od typu receptora (napríklad cytoplazmatická membrána alebo jadro bunky) a sú špeciálne určené na vnímanie svetla a signalizáciu určitých biologických pochodov v rastline.

Rastliny používajú na presné vymedzenie svetelného prostredia skupiny fotoreceptorov s rôznou vlnovou dĺžkou absorpčného spektra a rôznymi biochemickými vlastnosťami. Na získanie detailných informácií z rôznych vlnových dĺžok prichádzajúceho svetla majú rastliny najmenej päť tried fotoreceptorov.

Fytochrómy (PHYA-E v modelovej rastline *Arabidopsis thaliana*) vnímajú červené a dlhovlnné červené svetlo (far-red). Vlnová dĺžka takéhoto svetla je v rozmedzí 600 až 750 nm. Kryptochrómy (cry1, cry2, cry3), fototropíny (phot1, phot2) a F-box obsahujúci proteíny, ktoré viažu flavín (ZEITLUPE, FKF1/LKP2), absorbujú modré a UV-A svetlo v oblasti 320 až 500 nm svetelného spektra. Fotoreceptory UVR8 absorbujú UV-B žiarenie v oblasti 280 až 320 nm (Obr. č. 4). Nedávny pokrok vo výskume rastlinných fotoreceptorov odhalil nové úlohy fotoreceptorov. Jedná sa o zapojenie fotoreceptorov do priameho vnímania a modulácie reakcií na širokú škálu environmentálnych podnetov, čo naznačuje úlohu „multisenzora“ (Paik and Huq 2019).



**Obr. č. 4:** Rozdelenie rastlinných fotoreceptorov podľa ich absorpčného spektra a ich zapojenie v rastline (prevzaté a upravené od Paik and Huq 2019)

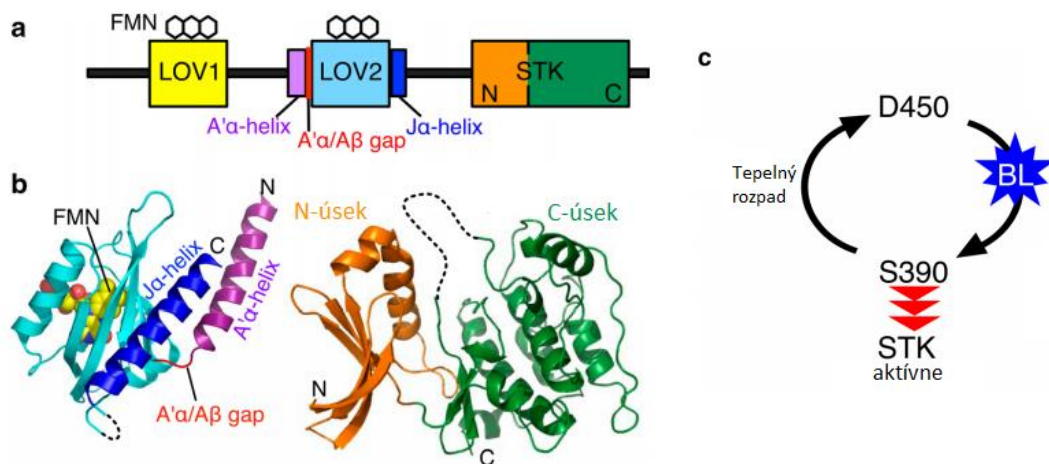
### 3.3.2. Prenos svetelného signálu v rastline

#### 3.3.2.1. Fototropíny 1 a 2

Svetlo je jedným z najdôležitejších elektromagnetických signálov, ktoré organizmy prijímajú z okolitého prostredia. Rastliny disponujú systémom svetlocitlivých chromoproteínov. Druhom fotoreceptorov citlivých predovšetkým na modré svetlo sú fototropíny (phot). Fototropín bol prvýkrát identifikovaný ako fotoreceptor počas fototropickej reakcie (Christie et al. 1998). V dnešnej dobe je známe, že phot indukuje pohyb chloroplastov (Kagawa et al. 2001, Jarillo et al. 2001), otvára prieduchy (Kinoshita et al. 2001), spôsobuje sploštenie listov (de Carbonnel et al. 2010) a navodzuje fotomorfogénu pri pôsobení modrého svetla (Kozuka et al. 2011). Predpokladá sa, že tieto reakcie phot vedú k maximálnej fotosyntetickej aktivite rastliny. Vyššie rastliny majú dve izoformy fototropínov. Sú nimi phot1 a phot2. Obe izoformy indukujú pohyb chloroplastov a otvorenie stómat. Oba fototropíny sú citlivé na modré svetlo avšak pracujú nezávisle od seba. Napríklad phot1 funguje ako senzor modrého svetla pre fototropizmus v širokom rozmedzí žiarenia, zatiaľ čo phot2 funguje ako senzor excitovaný vysokým tokom svetla u etiolovaných rastlín (Sakai et al. 2001). Fototropín 2 zapríčiňuje, že sa chloroplasty vyhýbajú silnému žiareniu.

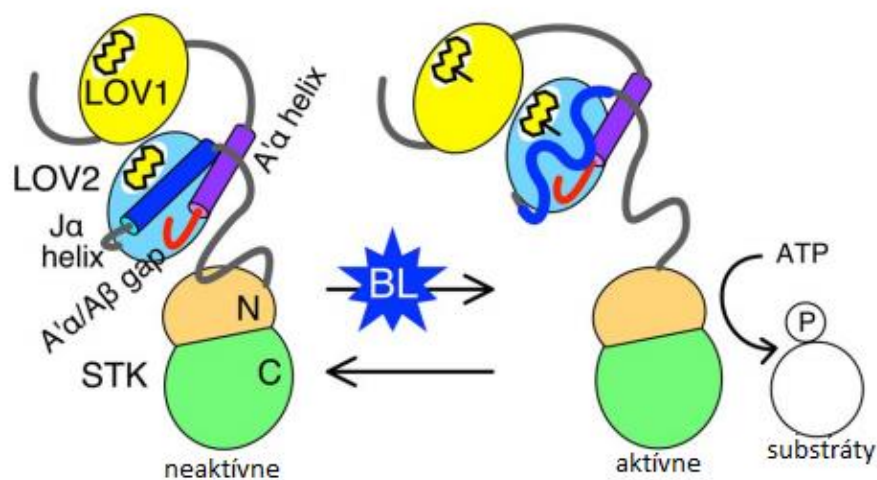
Fototropíny sa skladajú zo 700 až 1000 aminokyselinových zvyškov a dvoch molekúl prostetického flavínmononukleotidu (FMN). N-koncová časť phot je zložená z dvojice domén LOV1 a LOV2, ktoré viažu FMN (LOV z angl.: light/oxygen/voltage). Je známe, že doména LOV patrí do podmnožiny Per-ARNT-Sim super rodiny, ktoré sprostredkujú interakciu proteín-proteín. C-koncovú časť phot tvorí doména serín/treonín kináza (STK), ktorá patrí do rodiny AGC (cAMP-depentná proteínkináza, cGMP-depentná proteínkináza a fosfolipid-depentná proteínkináza C). Aktiváciou STK je sprístupnený druhý posol, ktorý posiela biochemický signál ďalej po signálnej dráhe. LOV2 a STK sú spojené linkerom zloženým z približne 70 aminokyselinových zvyškov. LOV má trojrozmernú štruktúru zloženú z niekoľkých  $\beta$ -skladaných listov a  $\alpha$ -helixov ( $\alpha/\beta$  skelet). Na C-konci domény LOV2 sa nachádzajú helixy A' $\alpha$  a J $\alpha$ , pričom A' $\alpha$  helix je spojený so zvyškom domény LOV2 prostredníctvom takzvaného A' $\alpha$ /A $\beta$  gapu (Obr. č. 5; Christie et al. 1998; Crosson and Moffat 2001; Bogre et al. 2003).

V tme sa LOV viaže nekovalentne na jeden chromofor FMN s vakom vytvoreným v  $\alpha/\beta$  skelete, pričom vykazuje maximálne absorpčné spektrum 450 nm (stav D450). Po ožiarení modrým svetlom LOV prechádza fotoreakčným cyklom v prechodnej forme a rozbije cysteínový zvyšok lokalizovaný v tesnej blízkosti FMN. Vzniká tak prechodný adukt medzi FMN a cysteínovým zvyškom LOV2. Zvyšok je charakterizovaný absorpčným maximom 390 nm (stav S390). Stav S390 sa termodynamicky vracia k D450 v časovom rozmedzí niekoľkých sekúnd až minút. Tvorba cysteínového zvyšku indukuje naklonenie izoalloxazínového kruhu FMN, preskupuje dobre konzervovaný bočný reťazec glutamátu a reorganizuje sieť vodíkových väzieb okolo kruhu. Predpokladá sa, že tieto malé, ale významné konformačné zmeny v proteínovej časti LOV pri pôsobení modrého svetla spúšťajú autofosforyláciu STK. Zatiaľ čo neaktívna forma D450 nie je schopná podporiť aktivitu STK, S390 je signalizačný stav schopný aktivácie STK. Preto LOV2 pôsobí ako primárny regulátor aktivácie STK po ožiarení modrým svetlom (Obr. č. 5; Christie et al. 1999, 2002; Crosson and Moffat, 2002; Salomon et al. 2000; Kasahara et al. 2002).



**Obr. č. 5:** **a.** Organizácia troch funkčných domén LOV1, LOV2 a STK a primárna štruktúra phot; **b.** Kryštalická štruktúra LOV2 a model STK u phot1; **c.** Schéma fotocyklu LOV2 (prevzaté a upravené od Okajima 2016)

Napriek podobnosti vo svojich štruktúrach a fotoreakčných cykloch majú LOV1 a LOV2 odlišné úlohy vo funkcii fototropínov. Bolo pozorované, že LOV1 predlžuje rozpad signalizačného stavu S390 v LOV2 a nepriamo reguluje STK. Rýchlosť rozpadu S390 v LOV2 koreluje s pomerom aktivovaných fotomolekúl v bunkách ožiarených modrým svetlom. Rozdiely v rýchlosti rozpadu majú za následok zreteľnú citlivosť na svetlo medzi jednotlivými phot. Rastliny by tak mohli modulovať senzitivitu fototropínov v rámci adaptácie na environmentálne zmeny počas evolúcie (Okajima 2016). Predpokladá sa tiež, že skupina LOV1 u phot1 a phot2 pôsobí svojou štruktúrou ako dimerizačné miesto (Katsura et al. 2009). Doména LOV2 je zodpovedná za autofosforyláciu kinázovej domény závislú na modrom svetle a je nevyhnutná pre signálnu transdukciiu sprostredkovanú phot1 a phot2 (Obr. č. 6; Christie et al. 2002).



**Obr. č. 6:** Schéma usporiadania funkčnej domény a kľúčových segmentov phot za tmy (vľavo) a pri modrom svetle (vpravo) (prevzaté a upravené od Okajima 2016)

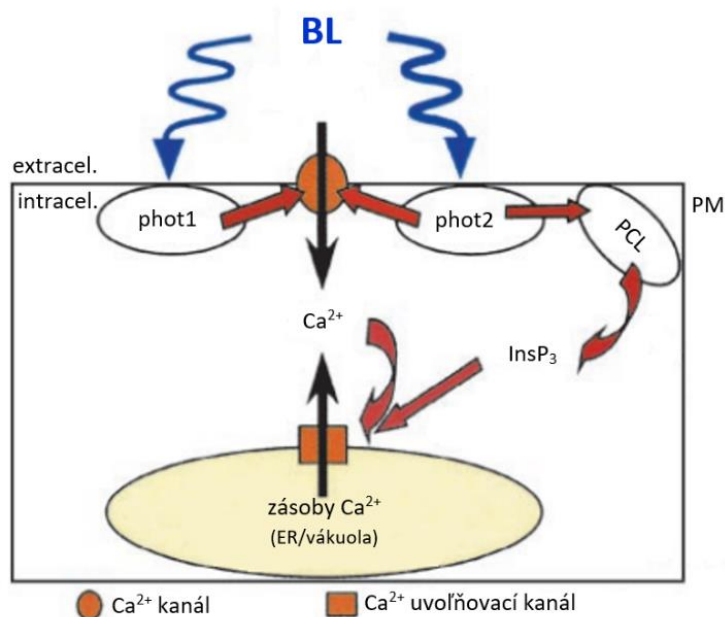
Bolo zistené, že do regulácie aktivity STK prispievajú aj A'α-helix, Jα-helix a A'α/Aβ gap. V tme A'α a Jα-helixy pravdepodobne interagujú s N-koncovou časťou STK za účelom potlačenia aktivity STK prostredníctvom neidentifikovaného priameho a/alebo nepriameho kontaktu. Ako už bolo vyššie spomenuté, osvetlenie rastliny modrým svetlom indukuje tvorbu prechodného aduktu medzi FMN a konzervovaným cysteínovým zvyškom LOV2. Bočné reťazce aminokyselinových zvyškov a sieť vodíkových väzieb okolo FMN sa reorganizujú, a potom sa malé konformačné zmeny v modrým svetlom excitovanom LOV2 prenášajú do A'α a Jα-helixov na povrchu β-listu (Okajima 2016). Čiastočným rozvinutým špirály sa Jα uvoľní z povrchu LOV2. Lokálne konformačné zmeny sa potom šíria do medzery A'α/Ap a vyvolávajú reorganizáciu lokálnych interakcií pravdepodobne v oblasti spojovníka, ktoré sa tiež podieľajú na aktivácii STK (Kashojiya et al. 2016).

Ako bolo uvedené, fototropíny sprostredkujú pod vplyvom modrého svetla fototropizmus, pohyb chloroplastov a otvorenie prieduchov v rastline. Fyziologické štúdie naznačujú, že ióny vápnika ( $\text{Ca}^{2+}$ ) v cytoplazme hrajú kľúčovú úlohu v spomínaných reakciách indukovaných modrým svetlom. Bola zistená interakcia phot1 a phot2 v súvislosti so zvýšením  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazme, avšak zvýšenie cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  indukované modrým svetlom prostredníctvom fotoreceptorov phot1 a phot2 prebieha odlišne (Harada et al. 2003).

Vápenaté ióny ( $\text{Ca}^{2+}$ ) sú najuniverzálnejším intracelulárnym poslom. Sú schopné spojiť širokú škálu extracelulárnych signálov so špecifickými odpoveďami bunky. Signály, ktoré vznikajú z dôvodu nárastu  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazme, sú posielané konkrétnym efektorom k iniciácii bunkových reakcií.  $\text{Ca}^{2+}$  pochádza buď z extracelulárneho priestoru, alebo z bunkových zásob, ktoré sú uložené v endoplazmatickom retikulu a vakuole (Sanders et al. 1999, Sanders et al. 2002).

Výskum Bapourina et al. naznačuje, že phot1 môže byť zodpovedný výlučne za prítok  $\text{Ca}^{2+}$  z extracelulárnych priestorov. Sato et al. uvádza, že  $\text{Ca}^{2+}$  uvoľňovaný z bunkových zásob je pravdepodobne zodpovedný za pohyb chloroplastov vyvolaný modrým svetlom a že  $\text{Ca}^{2+}$  získaný z extracelulárneho priestoru nie je k tejto signalizácii nevyhnutný (Bapourina et al. 2002, Sato et al. 2001).

Novšie štúdiá preukázali, že phot1 a phot2 by mohli indukovať prítok  $\text{Ca}^{2+}$  z apoplastu cez kanál v PM a phot2 by mohol spúšťať tok  $\text{Ca}^{2+}$  z bunkových zásob z endoplazmatického retikula alebo z vakuoly v závislosti na InsP3 (inositol 1, 4, 5-trifosfát), ktorý je sprostredkovaný fosfolipázou C (PLC). Výsledky ďalej ukázali, že modrým svetlom indukované zvýšenie  $\text{Ca}^{2+}$  prostredníctvom dráhy PLC je možné len v prítomnosti phot2. Avšak aj phot1 má pravdepodobne súvislosť so správnym fungovaním PLC. Bol teda navrhnutý model, kde phot1 stimuluje phot2-dependnú dráhu PLC (Obr. č. 7). Tento model naznačuje možnosť, že existujú určité funkčné interakcie phot1 a phot2 k indukácii zvýšenia cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  (Harada et al. 2003).



**Obr. č. 7:** Schéma signálnej dráhy procesu zvyšovania koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  v bunkách listoch *A. thaliana* v závislosti od phot1 a phot2 a modrého svetla (prevzaté a upravené od Harada et al. 2003)

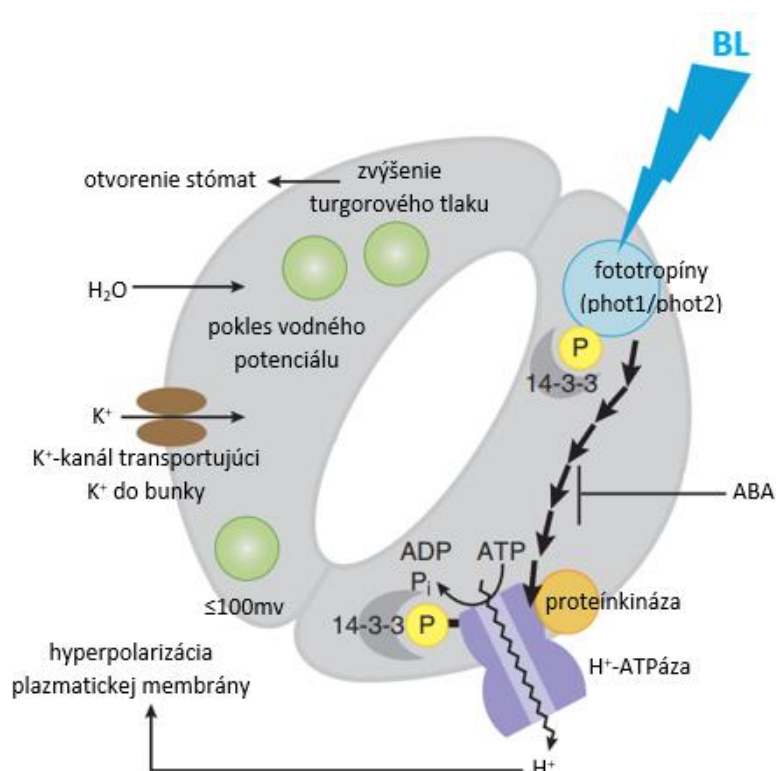
Mechanizmus otvárania prieduchov z veľkej časti indukuje modré svetlo prostredníctvom fototropínov (phot1, phot2). Hlavným bodom intracelulárnej signalizácie je aktivácia  $\text{H}^+$ -ATPázy, ktorá pumpuje  $\text{H}^+$  ióny von z buniek prieduchov, a tým dochádza k prechodnej hyperpolarizácii membrány (Assmann et al. 1985). Modré svetlo teda zvyšuje vnútorný negatívny elektrický potenciál na cytoplazmatickej membráne aktiváciou elektrónovej protónovej pumpy. Po objave protónovej pumpy indukovanej modrým svetlom boli v plazmatickej membráne ochranných buniek stómat objavené aj napätím riadené draselné kanály ( $\text{K}^+$ -kanály), ktoré sú aktivované hyperpolarizáciou membrány (Schroeder et al. 1987). Úlohou aktivovaných  $\text{K}^+$ -kanálov je transportovať  $\text{K}^+$  do cytosolu buniek. Tieto kanály taktiež vychytávajú  $\text{K}^+$ , keď sú ochranné bunky hypopolarizované (hodnoty potenciálu sú nižšie, než rovnovážny membránový potenciál).  $\text{K}^+$ -kanály na aktiváciu a udržanie svojej aktivity vyžadujú ATP, naopak aktivita týchto kanálov je inhibovaná  $\text{Ca}^{2+}$  (Schroeder et al. 1989).

$\text{H}^+$ -ATPáza je protónová pumpa uložená v cytoplazmatickej membráne buniek a je aktivovaná fosforyláciou (Kinoshita and Shimazaki 1999). Fosforylácia prebieha výlučne na C-konci  $\text{H}^+$ -ATPázy s následnou väzbou proteínu 14-3-3 na fosforylovaný C-koniec. Ukázalo sa, že tento koniec funguje ako autoinhibičná doména  $\text{H}^+$ -ATPázy (Palmgren 2001). Fosforylácia zvyškov Ser a Thr v tejto doméne podporuje aktivitu protónovej pumpy, čo naznačuje, že do tejto regulácie je zapojená serín/treonín proteinkináza (Sondergaard et al. 2004). Pre aktiváciu tejto proteinkinázy je potrebné naviazanie proteínu 14-3-3 na  $\text{H}^+$ -ATPázu, ale rovnako môže byť táto kináza priamo aktivovaná aj modrým svetlom (Kinoshita and Shimazaki 2002, Kinoshita and Shimazaki 1999).

Binding-proteín 14-3-3 je molekula, ktorá sa dokáže viazať na iné proteíny, a tak modifikovať ich aktivitu, meniť ich intracelulárnu lokalizáciu alebo stimulovať interakcie s inými proteínmi. Tento proteín do istej miery interaguje aj so samotným fototropínom a je dôležitý v modrom svetle indukovanej signálnej dráhe. Fototropín sa po autofosforylácii v ochranných bunkách stómat reverzibilne viaže na proteín 14-3-3. Väzobné miesto sa nachádza medzi doménami LOV1 a LOV2. Komplex 14-3-3–phot môže potom prenášať signál na ostatné phot, ktoré by potom mohli prenášať signál na ďalšie prvky signálnej dráhy (Kinoshita and Shimazaki 2002, Kinoshita et al. 2003, Shimazaki et al. 2007).

14-3-3 proteíny sa podieľajú na signalizácii modrým svetlom v prieduchoch ako regulátor phot, ale aj  $H^+$ -ATPázy. Proteín 14-3-3 funguje ako aktivátor protónovej pumpy prostredníctvom jej fosforylácie v reakcii na modré svetlo (Obr. č. 8). Proteín 14-3-3 sa tiež viaže na fototropín pri jeho fosforylácii a zdá sa, že táto väzba predchádza aktiváciou protónovej pumpy v ochranných bunkách prieduchov (Kinoshita and Shimazaki 2002, Kinoshita et al. 2003).

Súvislosť so signálnou dráhou medzi fototropínom a protónovou pumpou v ochranných bunkách stómat má aj proteínová fosfatáza. Na základe experimentov bolo zistené, že proteínová fosfatáza sprostredkuje signalizáciu medzi fototropínom a  $H^+$ -ATPázou v ochranných bunkách prieduchov (Shimazaki et al. 2007).



**Obr. č. 8:** Schéma procesov závislých na modrom svetle, ktoré zapríčiňujú otváranie stómat (prevzaté a upravené od Shimazaki et al. 2007)



Mechanizmus regulácie koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  v rastlinnej bunke prostredníctvom phot je popísaný vyššie. Zvýšenie  $\text{Ca}^{2+}$  prostredníctvom fotoropínov bude pravdepodobne potrebné pre rýchlu inhibíciu hypokotylovej elonácie (Folta et al. 2003), pohyb chloroplastov (Tlalka and Fricker 1999), fototropizmus (Babourina et al. 2002) a rýchlej inhibície rastu závislej na phot1. V ochranných bunkách prieduchov však nebol pozorovaný nárast koncentrácie  $\text{Ca}^{2+}$  v závislosti na modrom svetle. Bolo ale zistené, že  $\text{Ca}^{2+}$  je druhým poslom pre ABA-indukovaným uzavretím stómat (Blatt 2000). Vysoká koncentrácia cytosolického  $\text{Ca}^{2+}$  spôsobila uzavretie stómat alebo inhibovala ich otvorenie aktiváciou aniónových kanálov a inaktiváciou protónovej pumpy a  $\text{K}^+$ -kanálov (Kinoshita et al. 1995). Tieto výsledky sú teda v rozpore s predstavou, že na otvorenie prieduchov je potrebný  $\text{Ca}^{2+}$ .

### 3.3.3. Vplyv svetla a schopnosti rastlín tolerovať sol'ný stres

Je známe, že v rastline prebieha mnoho reakcií, ktoré sú ovplyvňované svetlom. Rôzne vlnové dĺžky svetla dokážu v rastlinnom organizme vyvolať zmeny, aktivovať alebo inhibovať určitú signálnu dráhu, indukovať génovú expresiu. V niektorých prípadoch svetlo dokáže tiež vyvolať stresovú reakciu. Naskytuje sa teda otázka, ako reaguje rastlina rastúca v zasolenom prostredí na svetlo. Vo výskumoch, ktoré sa zaberajú touto problematikou, sa kladie dôraz na úlohu jednotlivých fotoreceptorov v reakciách na svetlo a súvislosť signálnych dráh pre svetlo a stres (Roeber et al. 2020).

Nahusto rastúce rastliny neustále súťažia o svetlo. Vyvinuli si preto spôsob ako sa efektívne vyhnúť tieňu. Jedná sa o tzv. syndróm predchádzania tieňu (The shade avoidance syndrome; SAS), vďaka ktorému sú rastliny schopné uniknúť tieňu susednej rastliny a vystaviť sa tak dostatočnému žiareniu. V prírodných podmienkach sú však rastliny vystavované viacerým stresovým faktorom súčasne. Aby bolo možné pochopiť jednotlivé odpovede rastlín na tieto faktory, je kľúčové identifikovať ich spoločné črty, rozdiely a interakcie. Bolo študované vzájomné pôsobenie svetla a iných biotických a abiotických stresov na rastliny. Príkladom je štúdium pôsobenia sol'ného stresu a SAS. Zistilo sa, že zasolenie pôdy inhibuje predlžovanie hypokotylu a stopky, ktoré je asociované s SAS u *Arabidopsis thaliana*. Bolo tiež ukázané, že zasolenie ovplyvňuje signálnu dráhu ABA a brassinosteroidov u *Arabidopsis*, čím potláča SAS a že signalizácia SAS pravdepodobne vykazuje spätnú väzbu k tolerancii na zasolenie (Coubier and Pierik 2020).

Bolo dokázané, že kryptochrómy (cry) ako receptory modrého svetla, tvoria súčasť reakcie na zasolenie. Transgénne rastliny *Arabidopsis thaliana*, ktoré nadmerne exprimovali gény *CRY1* a *CRY2*, vykazovali vyššiu citlivosť na zasolenie ako divoký typ (WT). Tiež sa ukázalo, že rastliny s overexpresiou *CRY1* boli na soľ citlivejšie, než rastliny s overexpresiou *CRY2* (Xu et al. 2009, Zhou et al. 2018). Zistilo sa, že v zasolenom prostredí v semenách nadmerne exprimujúcich *CRY1* dochádza k modifikácii expresie génov, ktoré slúžia ako odpoveď na sol'ný stres. Ukázalo sa tiež, že

mutantné semená *cry1* oproti WT v prítomnosti soli a ABA vykazujú toleranciu na soľný stres. Spomenuté procesy sú pravdepodobne regulované komplexom HY5-ABI5 (LONG HYPOCOTYL 5-ABA INSENSITIVE 5), kde HY5 je transkripčný faktor pre svetlom regulované gény a ABI5 transkripčný faktor zohrávajúci kľúčovú úlohu v regulácii klíčenia a rastu rastliny v prítomnosti ABA a abiotických stresov. V súvislosti s týmito výsledkami sa predpokladá, že svetlom aktivované kryptochrómy negatívne ovplyvňujú odpoveď rastliny na zasolenie a že *cry1* kontroluje odpoveď na soľný stres prostredníctvom ABA signálnej dráhy (Zhou et al. 2018, Sharma et al. 2014, D'Amico-Damião and Carvalho 2018).

Kryptochrómy boli študované aj v súvislosti s reguláciou lokálnej a diaľkovej signalizácie deficitu vody v rajčiakoch. Z nedostatku vody sa v rastline zvyšuje tvorba peroxidu vodíka ( $H_2O_2$ ), ktorého negatívnym účinkom je hlavne peroxidácia lipidových membrán. Zistilo sa, že molekula  $H_2O_2$  je pravdepodobne zapojená do diaľkovej signalizácie základných fyziologických procesov, ktoré regulujú odpoveď rastliny na stres zo sucha (napríklad rast koreňov alebo uzavretie prieduchov). Metódou štiepenia bolo zistené, že modrým svetlom aktivovaný fotoreceptor *cry1* pozitívne reguluje expresiu génu *HY5*. Vďaka tomu je podporovaná aktivita antioxidantných enzýmov, ktoré potom eliminujú  $H_2O_2$  a jeho peroxidačné účinky. Z toho vyplýva, že *cry1* môže byť zapojený aj do reakcií, ktoré sú spojené s toleranciou rastliny k stresu (D'Amico-Damião et al. 2021).

Okrem iného bol skúmaný proteóm halofytnej rastliny *Physcomitrella patens*, ktorá bola vystavená soľnému stresu. Z výsledkov bolo zrejmé, že počas zasolenia dochádza v rastline k syntéze proteínov, ktoré sú zapojené do obrany pred soľným stresom a udržania iónovej homeostázy. Zistilo sa, že signálne proteíny, ako napríklad proteín 14-3-3 a fototropíny, môžu spolupracovať pri regulácii PM  $H^+$ -ATPázy, udržiavaní iónovej homeostázy alebo zvýšení fotosyntetickej aktivity, čo vedie k tolerancii voči zasoleniu (Wang et al. 2008).

Kovtun et al. (2019) ukázal, že ľuľok zemiakový (*Solanum tuberosum* L.) je schopný tolerovať zasolenie po krátkej expozícii modrému svetlu. Autor uvádza, že modré svetlo dokáže v rastline stimulovať akumuláciu organických látok s antioxidantným účinkom.

V súvislosti s riešenou problematikou boli študované gény a ich produkty, ktoré môžu byť zapojené do signálnych dráh pre svetlo a stres. Jedným z nich je napríklad gén *GBF1*, ktorého produktom je G-box väzobný faktor (GBF) patriaci do skupiny transkripčných faktorov zvaných bZIP (Basic Leucine Zipper Domain). Molekula GBF je zapojená do svetelnej signalizácie špecificky pre modré svetlo a je pravdepodobné, že reguluje génovú expresiu aj v reakcii na abiotický stres. Úloha GBF v signálnej dráhe modrého svetla spočíva v interakcii v G-box elementom, ktorý reaguje na svetelné žiarenie. Zo štúdie génu *GBF1* v pšenici a v *Arabidopsis thaliana*, bolo zistené, že nadmerná expresia toto génu zvyšuje citlivosť oboch rastlín na zasolenie a kyselinu abscisovú (ABA). Mediátorom tejto reakcie je pravdepodobne transkripčný faktor ABI5, pretože pri nadmernej expresii *GBF1* je zvýšená aj expresia génu pre ABI5. Štúdia tiež ukázala, že GBF závislá citlivosť

na zasolenie nezávisí od svetla. To naznačuje, že GBF je bežnou súčasťou signálnych dráh modrého svetla a abiotického stresu (Sun et al. 2015).

Ďalej bol študovaný proteín LIP1 (Light intensive period 1), ktorý predstavuje faktor asociovaný s cirkadiánnymi hodinami rastliny. Výsledky štúdia naznačujú, že LIP1 je okrem potlačenia fotomorfogenézy rastliny na červenom a modrom svetle potrebný aj pre svetlom riadenú inhibíciu endoreplikácie a toleranciu soľného stresu u *Arabidopsis thaliana*. Ukázalo sa, že rastliny s defektom v géne pre LIP1 sú citlivejšie na zasolenie v porovnaní s WT. Na základe toho možno tvrdiť, že proteín LIP1 je potrebný pre maximálnu toleranciu rastliny k zasoleniu (Terecskei et al. 2013).

Štúdie tiež dokázali, že do signálnej dráhy modrého svetla v rastlinách je zapojený aj proteín STO (Salt tolerance protein). Bolo zistené, že STO negatívne reguluje inhibíciu predĺžovania hypokotylov vyvolanú modrým svetlom. Proteín STO je však primárne charakterizovaný tým, že jeho ektopický výskyt umožňuje kvasinkám toleranciu na soľ a že nadmerná expresia génu *STO* v *Arabidopsis thaliana* spôsobuje rast koreňa v zasolenom prostredí (Indorf et al. 2007).

Jednou z odpovedí rastliny na extrémne prírodné podmienky akými sú zasolenie alebo suchosť pôdy je akumulácia prolínu. Molekuly prolínu pôsobia ako osmoprotektant a zabezpečujú stabilizáciu enzýmov alebo udržiavajú redoxnú rovnováhu rastliny v nepriaznivých podmienkach. Bolo dokázané, že modré a červené svetlo (okrem dlhovlnného červeného svetla) sú nevyhnutné pre akumuláciu prolínu v rastline indukovanú soľným stresom. Toto žiarenie je tiež nevyhnutné pre up a down reguláciu génov pre 1-pyrolín-5-koaxyl syntázu (P5CS1) a prolindehydrogenázu 1 (PDH1), ktoré kontrolujú biosyntetické a katabolické dráhy prolínu. Ukázalo sa, že transkripčný faktor HY5 podporuje biosyntézu prolínu spojením svetelných a stresových signálov. Uvedená štúdia jednak objasňuje interakcie medzi stresom a svetelnými signálmi a tiež potvrdzuje, že HY5 je kľúčovým regulátorom metabolizmu prolínu (Kovács et al. 2019).

Témou reakcie rastliny na soľný stres na modrom svetle sa zaoberá aj podrobný výskum mutantnej rastliny rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) s mutáciou v géne *7B-1*. Táto recesívna mutácia vznikla spontánne v jednom géne. Fenotyp mutantu *7B-1* je charakterizovaný samčou sterilitou, kedy rastlina pestovaná počas dlhého dňa (16 hodín svetlo, 8 hodín tma) produkuje deformované tyčinky a peľ s nízkou životaschopnosťou (Sawhney 1997). Mutant sa vyznačuje tým, že je tolerantný k abiotickým stresom ako je zasolenie alebo osmotický stres, a to hlavne na modrom svetle. Výsledky teda naznačujú, že pôsobenie modrého svetla posilňuje inhibičný účinok stresových faktorov v semene a že tolerančné mechanizmy, ktoré sa prejavujú u mutantu *7B-1*, spočívajú v poruche vnímania modrého svetla alebo v poruche jeho signálnej dráhy indukovanej modrým svetlom (Fellner and Sawhney 2001, 2002).

Nedávne genetické a molekulárne výskumy ukázali, že mutant *7B-1* vykazuje významnú väzbu s génom *SIGLO2*, ktorý patrí do B triedy MADS-box génovej rodiny. Gény patriace do tejto rodiny sú transkripčnými faktormi génov pre vývoj kvetu podľa modelu ABC (Pucci et al. 2017).

## **4 Materiál a metódy**

### **4.1. Rastlinný materiál**

K experimentom boli použité semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) kultivar (cv.) Rutgers a mutantné semená *7B-1* odvodené od tohto kultivaru s mutáciou v géne *7B-1*. Jedná sa o spontánnu mutáciu v géne, ktorého funkcia doposiaľ nie je úplne známa, avšak semená mutanta *7B-1* vykazujú toleranciu k abiotickým a biotickým stresom a to špecificky v modrej oblasti svetelného spektra (Fellner and Sawhney 2002, Bergougnoux et al. 2009). Nedávno však bola zistená významná väzba medzi *7B-1* a génom *SIGLO2* (Pucci et al. 2017). Semená mutanta *7B-1* a cv. Rutgers boli láskavo poskytnuté V. K. Sawhney z University of Saskatchewan, Saskatoon, Kanada.

### **4.2. Pracovné postupy**

Experimentálnu časť predloženej diplomovej práce predstavuje predovšetkým štúdium géovej expresie, ktorá bola zameraná na expresiu génov pre fotoreceptory phot1 a phot2 v semenách rajčiaka jedlého a jeho mutanta *7B-1*. Samotnému štúdiu expresie génov však predchádzalo štúdium klíčenia semien rovnakej rastliny, ktorého cieľom bolo zistiť, respektíve potvrdiť, vplyv modrého svetla a soľného stresu na klíčenie týchto semien.

#### **4.2.1. Príprava kultivačného média (MS)**

Vo vykonaných experimentoch bolo použité MS médium (Murashige and Skoog 1962) ako pevné kultivačné médium pre kultiváciu semien v určitých podmienkach. K príprave dvoch litrov MS média bol do Erlenmayerovej banky s objemom 3 l pridaný 1 liter destilovanej vody. Po tom, ako bola banka s vodou a miešadlom postavená na magnetickú miešačku, bolo navážených 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (kat. č. M5519-10L, Duchefa Biochemie, Holandsko) a 390,4 mg MES a látky boli za stáleho miešania postupne pridané do banky s vodou. Za stáleho miešania boli pridané látky rozpustené. Po rozpustení všetkých látok, bol objem média doplnený na 2 litre. Následne bolo na pH metri pridaním 1M KOH (hydroxidu draselného) upravené pH média na hodnotu 6,1. Médium bolo vždy pripravované v objeme dva litre, ktorý bol následne rozdelený do piatich sklenených termofliaš v objeme 400 ml, pričom do každej fľaše bolo navážených a pridaných 2,8 g phyto agaru (kat. č. P1003.1000, Duchefa Biochemie, Holandsko). Médium bolo potom sterilizované pomocou autoklávu a uskladňované v chladničke.

#### **4.2.2. Postup pre štúdium klíčivosti semien**

Bola pozorovaná klíčivosť semien rajčiaka jedlého a mutanta *7B-1* v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL). Semená boli zároveň vystavené soľnému stresu, ktorý bol indukovaný prítomnosťou NaCl v kultivačnom médiu. Koncentrácia NaCl v médiu bola 0, 50, 75 a 100 mmol/l. Experimenty boli opakované päťkrát, pričom tri opakovania neprebiehali na RL.

##### **4.2.2.1. Povrchová sterilizácia a výsev semien**

Semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers) a mutanta *7B-1* použité vo všetkých experimentoch boli pred samotným výsevom na pripravené kultivačné MS médium povrchovo sterilizované nasledovným postupom. Z oboch genotypov bolo v každom experimente potrebných približne 360 až 420 semien. Semená boli sterilizované po dobu 30 minút v riedenom roztoku chlórnanu sodného (NaClO, SAVO), ktorý obsahoval 2,8% aktívneho chlóru, v plastových skúmavkách typu Falcon (50 ml). Počas prebiehajúcej sterilizácie bol obsah v skúmavkách niekoľkokrát premiešaný pretrepaním. Po uplynutí daného času bol roztok NaClO odpipetovaný pomocou 10 ml pipety a nahradený sterilnou destilovanou vodou. Takýto oplach semien od NaClO prebiehal za sterilných podmienok v pripravenom laminárnom boxe a bol opakovaný u každého genotypu celkom päťkrát.

V laminárnom boxe bolo pripravených 24 plastových okrúhlych Petriho misiek s priemerom 90 mm. Do boxu bola taktiež pripravená sterilná plastová skúmavka typu Falcon (50 ml) a sterilná Erlenmayerova banka (300 ml), ktoré slúžili na dávkovanie a miešanie MS média. Tuhé kultivačné MS médium bolo zohriate v mikrovlnnej rúre a privedené tak do tekutého stavu. Po miernom vychladnutí bol do 120 ml média v banke napipetovaný 5M zásobný sterilný roztok NaCl tak, aby výsledná koncentrácia NaCl v médiu činila 0, 50, 75 a 100 mM. Napipetované objemy 5M zásobného roztoku NaCl sú uvedené v tabuľke 1. Potom bol pripravený roztok MS média a NaCl rozdelený do Petriho misiek vždy v objeme 20 ml na jednu misku. Rozliate médium sa následne v pootvorených miskách nechalo stuhnúť.

**Tabuľka 1:** Objem 5M zásobného roztoku NaCl pre prípravu uvedenej koncentrácie NaCl v 120 ml MS média

Výsledná koncentrácia NaCl v médiu [mmol/l]	Objem zásobného roztoku NaCl [ml]
0	0
50	1,2
75	1,8
100	2,4

K výsevu bol v boxe prichystaný zapálený liehový kahan a nádoba s 96% ethanolom, ktoré slúžili k sterilizácii pinzety. Sterilnou pinzetou bolo na misku vysiatych vždy približne 30-35 semien daného genotypu. Po výseve boli Petriho misky dvakrát po svojom obvode oblepené páskou z netkanej textílie (Ugropore alebo Softpore). Semená boli kultivované v rastovej komore Snijders Scientific za príslušných svetelných podmienok. Misky, ktorých semená boli kultivované na modrom a červenom svetle, boli vo vertikálnej polohe umiestnené do stojanov a uložené do kultivačnej rastovej komory. Zdrojom modrého svetla s maximálnou ožiarenosťou  $10 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pri 440 nm bola žiarivka Philips TLD36W/18-Blue. Zdrojom červeného svetla s maximálnou ožiarenosťou  $10 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  pri 660 nm bola žiarivka Philips TLD36W/15-Red. Misky, ktorých semená boli kultivované v tme, boli zabalené do alobalu a taktiež boli vo vertikálnej polohe uložené v spodnej časti rovnakej kultivačnej komory. Kultivácia semien prebiehala celkom 7 až 8 dní pri teplote  $23^{\circ}\text{C}$ .

#### 4.2.2.2. Vyhodnotenie klíčivosti semien

U semien oboch genotypov bola klíčivosť vyhodnocovaná vždy od tretieho alebo štvrtého dňa po výseve. Experiment bol opakovaný päťkrát a opakovania prebiehali nezávisle na sebe. Princíp vyhodnotenia klíčivosti predstavoval spočítanie všetkých semien v danej Petriho miske a semien, ktoré klíčili. Pomer týchto dvoch údajov (počet vyklíčených/všetkých semien\*100) udával percento klíčivosti semien v miske. Jednotlivé hodnoty klíčivosti boli spriemerované a hodnoty klíčivosti zo 7. dňa od vysiatia boli ďalej spracované do podoby grafu závislosti klíčivosti semien na koncentrácií NaCl. Taktiež bola vypočítaná percentuálna inhibícia klíčivosti pomocou vzorca  $[(a - b) / a] * 100\%$ , kde  $a$  predstavuje priemerné percento klíčivosti semien na 0 mM NaCl a veličina  $b$  predstavuje priemerné percento klíčivosti pri zvolenej koncentrácií NaCl.

### **4.2.3. Postup pre štúdium expresie génov *PHOT1* a *PHOT2***

Bola študovaná expresia génov *PHOT1* a *PHOT2*, ktorých produkty predstavujú svetlocitlivé fotoreceptory - fototropíny. Tieto rastlinné receptory sú citlivé na modré svetlo v oblasti 390-500 nm svetleného spektra. Génová expresia bola opäť študovaná na semenách dvoch genotypoch rajčiaka jedlého – cv. Rutgers (WT) a mutant *7B-1* v tme a na modrom svetle. Semená boli navyše kultivované na médiu s obsahom NaCl o koncentráciách 0, 50 a 75 mmol/l, ktorý u nich vyvolal soľný stres. K štúdiu génovej expresie boli urobené štyri rovnaké a na sebe nezávislé experimenty.

#### **4.2.3.1. Výsev, zber a homogenizácia semien**

Sterilizácia a výsev semien na Petriho misky s MS médiom prebiehali rovnako ako v postupe pre štúdium klíčenia semien, ktorý je uvedený vyššie. Avšak NaCl sa v médiu vyskytovala iba v koncentráciách 0, 50 a 75 mmol/l. Semená boli kultivované v tme a na modrom svetle v rovnakej rastovej komore ako semená, u ktorých bolo pozorované klíčenie. Po kultivácii semien, ktorá trvala vždy 72 hodín, nasledoval zber semien v tmavej komore. Počas zberu semien kultivovaných na modrom svetle bolo v komore zapnuté modré svetlo a počas zberu semien kultivovaných v tme bolo zapnuté zelené svetlo. Petriho misky so semenami boli pomocou skalpelu otvorené a jednotlivé semená boli sterilnou pinzetou (sterilizácia v 96% ethanole a vyžihanie nad plameňom) prenesené na sterilný alobal (sterilizácia 96% ethanolom) na analytických váhach. Na váhach bolo navážených vždy približne 130 mg semien z danej misky. Navážené semená boli zabalené do alobalu prenesené do nádoby s tekutým dusíkom. Výber semien pre ďalšie spracovanie prebiehal pri zbere náhodne.

Následne bola pripravená vychladená sterilná tretia miska s tĺčikom, stojan na mikroskúmvky, mikroskúmvka eppendorf (2 ml) a sterilná špachtľa. Všetky použité predmety boli pravidelne ochladzované tekutým dusíkom. Do tretej misky bol naliaty tekutý dusík a vhožené semená z alobalu. Semená boli následne v miske rozdrvené tĺčikom na jemný prach. Ten bol pomocou špachtle prenesený do príslušnej mikroskúmvky, ktoré boli potom spolu s obsahom uchovávané v hlbokomraziacom boxe pri teplote -80°C.

#### **4.2.3.2. Izolácia RNA a jej prečistenie**

Pri izolácii celkovej RNA z pripravených vzoriek bol použitý kit Isolate II RNA Plant Kit (Bioline, Veľká Británia). Izolácia prebiehala v dvoch častiach za sebou, kde prvá časť prebiehala v digestore a druhá časť prebiehala na pracovnom stole.

Zhomogenizované vzorky v mikroskúmvkách boli prenesené a umiestnené do stojanu v digestore. V mikroskúmvke eppendorf (1,5 ml) bola pripravená zmes Lysis Bufferu (RLS)

a  $\beta$ -mercaptoethanolu, pričom na jednu vzorku bolo použitých 350  $\mu$ l Lysis Bufferu a 3,5  $\mu$ l  $\beta$ -mercaptoethanolu. Zmes bola do mikroskúmavky napipetovaná ešte pred samotným rozmraznutím obsahu. Potom bola každá vzorka dôkladne zhomogenizovaná na mikrotrepačke desaťkrát po dobu 10 až 15 sekúnd na strednej rýchlosti. Po homogenizácii boli vzorky vložené do centrifúgy a scentrifugované (13 000 rpm, 24°C, 2 minúty). Oddelený supernatant každej vzorky bol potom prepipetovaný na pripravenú fialovú kolónu nasadenú na špeciálnu neuzatvárateľnú mikroskúmavku (2 ml). Kolóna s obsahom bola scentrifugovaná (13 000 rpm, 24°C, 2 minúty). Fialová kolóna bola po centrifugácii vyhodnená a obsah mikroskúmavky bol prepipetovaný do novej uzatvárateľnej mikroskúmavky (1,5 ml). Následne bolo do každej vzorky napipetovaných 350  $\mu$ l 70% ethanolu a vzorky boli pretrepané pomocou mikrotrepačky dvakrát po dobu 5 sekúnd. Po pretrepaní boli vzorky prepipetované na modrú kolónu nasadenú na špeciálnu mikroskúmavku a scentrifugované (13 000 rpm, 24°C, cca 30 sekúnd). Kolóna so vzorkou bola potom prenesená na novú neuzatvárateľnú mikroskúmavku. Na modrú kolónu bolo napipetovaných 350  $\mu$ l Membrane Desalting Bufferu (MEM) a obsah bol opäť scentrifugovaný (13 000 rpm, 24°C, cca 60 sekúnd). Stočený kvapalný obsah v skúmavke bol vyliaty a kolóna s RNA bola nasadená späť na skúmavku.

Nasledovala druhá časť izolácie RNA, ktorá prebiehala mimo digestora a spočívala v eluácii RNA z kolóny do mikroskúmavky. Na ľade bola do mikroskúmavky (1,5 ml) pripravená reakčná zmes DNaseI. Do zmesi bol napipetovaný roztok DNaseI a RDN v objemoch uvedených v tabuľke 2. Z pripravenej zmesi bolo odobraných 100  $\mu$ l a prenesených na membránu modrej kolóny so vzorkou. Pôsobenie reakčnej zmesi na vzorku prebiehalo 15 minút pri izbovej teplote. Potom bolo na kolónu pridaných 200  $\mu$ l Wash Bufferu RW1 a vzorka bola scentrifugovaná (13 000 rpm, 24°C, cca 30 sekúnd). Po stočení na centrifuge bola modrá kolóna s RNA prenesená na novú neuzatvárateľnú mikroskúmavku (2 ml). Bolo pridaných 600  $\mu$ l Wash Bufferu RW2 a vzorka bola scentrifugovaná pri rovnakých podmienkach 30 sekúnd. Obsah v skúmavke bol vyliaty do odpadu a na kolónu bolo pridaných 250  $\mu$ l Wash Bufferu a kolóny so skúmavkami boli stočené na centrifuge (13 000 rpm, 24°C, 2 minúty). Tento výplach proteínov s použitím 250  $\mu$ l Wash Bufferu RW2 bol opakovaný dvakrát. Po poslednom centrifugovaní vzoriek boli modré kolóny prenesené na uzatvárateľné mikroskúmavky (1,5 ml), ktoré boli súčasťou používaného kitu. Následne bolo na kolónu napipetovaných 40  $\mu$ l Rnase-free vody a vzorky boli pri izbovej teplote ponechané po dobu 5 minút a následne boli scentrifugované (13 000 rpm, 24°C, 1 minúta). Proces popísanej eluácie RNA bol zopakovaný znovupoužitím odfiltrovanej Rnase-free vody z mikroskúmavky. Zisk celkovej RNA činil 40  $\mu$ l.



**Tabuľka 2:** Reakčná zmes pre degradáciu DNA (Isolate II RNA Plant Kit, Bioline)

	Objem pre 1 vzorku [μl]
RDN	90
DNaseI	10
Celkom	100

Nasledovalo prečistenie získanej RNA, ktoré bolo rozdelené na dve časti, pričom prvá časť prebiehala ihneď po izolácii celkovej RNA a druhá časť v nasledujúci deň. Od tohto momentu sa počas celého pracovného postupu pre štúdium expresie génov so vzorkami a použitými látkami pracovalo vždy na ľade.

Do mikroskúmavky (1,5 ml) bola pripravená reakčná zmes, ktorej zložky a ich objemy sú uvedené v tabuľke 3. Do jednej vzorky bolo napipetovaných 10 μl z tejto zmesi. Vzorka bola premiešaná a krátky čas centrifugovaná v príručnej minicentrifúge. Takto pripravená vzorka bola na 1 hodinu vložená do termobloku s teplotou 37°C. Po vypršaní času bola vzorka presunutá opäť na ľad a boli k nej napipetované 2 μl EDTA. Potom bola vzorka opäť vložená na 2 minúty do termobloku s teplotou 80°C. Po 2 minútach bola vzorka presunutá na ľad a bolo k nej pridaných 48 μl Nuclease-free vody, 10 μl 3M octanu sodného, 250 μl vychladeného ethanolu (96%) a 2 μl glykogénu. Obsah v mikroskúmavke bol premiešaný, stočený na minicentrifúge a vzorka bola uložená na noc do hlbokomraziaceho boxu pri teplote -80°C.

**Tabuľka 3:** Reakčná zmes pre prečistenie vyizolovanej RNA (Isolate II RNA Plant Kit, Bioline)

	Objem pre 1 vzorku [μl]
10x DNaseI buffer	4
Recombinant DnaseI	4
Recombinant Ribonuclease Inhibitor	0,5
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	1,5
Celkom	10

Ďalší deň bola vzorka ponechaná k rozmraznutiu na ľade a následne scentrifugovaná (13 000 rpm, 4°C, 30 minút). Supernatant, ktorý sa oddelil počas centrifugácie bol odpipetovaný a do mikroskúmavky bolo pridaných 500 μl vychladeného 70% ethanolu. Obsah bol opäť stočený vo vychladenej centrifúge (13 000 rpm, 4°C, 5 minút). Vzniknutý supernatant bol z mikroskúmavky odstránený a bolo pridaných 500 μl vychladeného 96% ethanolu. Opäť prebehla centrifugácia vzorky (13 000 rpm, 4°C, 5 minút). Ethanol, ktorý zostal na dne skúmavky bol odpipetovaný a skúmavka

s vyzrážanou RNA na stenách sa nechala hore dnom vysušiť na vzduchu od zvyšného ethanolu po dobu 5 minút. Potom bola RNA zo stien rozpustená v 15  $\mu$ l Rnase-free vody a na Nanodrope (Thermo Scientific) bola zmeraná koncentrácia celkovej RNA vo vzorke.

#### 4.2.3.3. PCR pre prečistenú RNA

Ak bola koncentrácia celkovej RNA vo vzorke dostatočná (minimálne 120 ng/ $\mu$ l) bola urobená PCR pre prečistenú RNA za účelom kontroly prítomnosti DNA, ktorá bola vo vzorke nežiadúca. Bol zapnutý termocycler (Bio-rad Laboratories, USA) a bol zvolený program, ktorého rozpis je uvedený v tabuľke 4. Potom bola do mikroskúmavky (1,5 ml) pripravená reakčná zmes pre PCR. Zoznam zložiek zmesi a ich pipetované objemy sú uvedené v tabuľke 5. Bola pripravená 0,2 ml mikroskúmavka, do ktorej bolo napipetovaných 18  $\mu$ l reakčnej zmesi pre PCR a následne 2  $\mu$ l vyizolovanej RNA, ktorá slúžila ako templát pre PCR reakciu. Taktiež boli pripravené vzorky, ktoré slúžili ako pozitívna a negatívna kontrola. Pozitívna kontrola obsahovala 2  $\mu$ l cDNA (namiesto RNA) a negatívna kontrola obsahovala 2  $\mu$ l Nuclease-free vodu (namiesto RNA). Pripravené vzorky boli premiešané, stočené a vložené do termocycleru, na ktorom bol potom zapnutý navolený program.

**Tabuľka 4:** Program pre PCR v termocycleri

Teplota [°C]	Čas
94	3 min
94	30 sek
55	30 sek
72	1 min
72	5 min
4	...

45 cyklov

**Tabuľka 5:** Zložky reakčnej zmesi pre PCR reakciu (Bioline)

	Objem pre 1 vzorku [μl]
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	13
5x My Taq Buffer	4
10uM primer <i>GAPDH</i> – F <sup>1</sup>	0,5
10uM primer <i>GAPDH</i> – R <sup>2</sup>	0,5
My Taq Polymerase	0,1
Celkom	18,1

<sup>1</sup>Sekvencia F primeru pre kontrolný gén *GAPDH*: 5'- ATC CAT TTA TTT CCA CTG ATT ACA A – 3'

<sup>2</sup>Sekvencia R primeru pre kontrolný gén *GAPDH*: 5'- CAT GGG AGC ATC TTT GCT A – 3'

Po skončení programu v termocykleri, bol výsledok PCR zobrazený na elektroforéze. K tomu bol pripravený 1,5% agarózový gél. Do Erlenmayerovej banky bolo navážených 1,3 g agarózy, ku ktorej bolo pridaných 80 ml 0,5x TBE. Banka s obsahom bola ohrievaná v mikrovlnnej rúre pokiaľ sa agaróza úplne nerozpustila. Po miernom ochladení tekutého gélu bolo k nemu napipetovaných 5 μl GelRed (10 000x riedený vo vode) a gél bol premiešaný. Gél bol vyliaty do pripravenej formy, do ktorej bol potom vložený hrebeň vytvárajúci jamky. Čas tuhnutia gélu vo forme bol 30 minút. Následne bol hrebeň z formy vytiahnutý a gél bol prenesený do vaničky s 0,5x TBE, kde prebiehala elektroforéza. Následne bol do každej PCR vzorky pridaný 1 μl 6x loading Dye, ktorý bol zmiešaný so vzorkou a obsah skúmaviek bol napipetovaný do príslušných jamiek. Do prvej jamky v géli bolo napipetovaných 6 μl štandardu molekulových hmotností (100 bp ladder). Elektroforéza prebiehala po dobu cca 45 minút. Po uplynutí doby bol gél odfotografovaný v programe GeneSys pri UV v uzatvorenej fotokomore a bola vizuálne vyhodnotená čistota vyzolovanej celkovej RNA.

#### 4.2.3.4. Syntéza cDNA a PCR pre nasyntetizovanú cDNA

Komplementárna DNA (cDNA) bola syntetizovaná z prečistenej RNA za použitia komponentov z kitu PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa) a termocyklera (Bio-rad), na ktorom bol navolený program popísaný v tabuľke 6. Program na cycleri bol spustený a ihneď dočasne pozastavený, aby došlo k optimálnemu nahriatiu veka a dosky. K syntéze cDNA bol potrebný 1 μg RNA, a preto bol objem použitej RNA vypočítaný ako 1000/koncentrácia RNA. Následne bol dopočítaný objem vody tak, aby RNA a voda činili spolu 8 μl. Do mikroskúmavky (0,2 ml) bol napipetovaný vypočítaný objem Nuclease-free vody a následne bol napipetovaný príslušný objem vyzolovanej RNA. Bola pripravená reakčná zmes č. 1 pre syntézu cDNA, ktorej zložky a ich objemy sú uvedené v tabuľke 7. Do nariadenej RNA boli zo zmesi č. 1 napipetované 2 μl. Obsah bol

premiešaný, stočený a mikroskúmavka bola vložená do cyclera v momente, keď bolo veko zohriate na 105°C a doska mala teplotu 65°C. Potom bol pripravený program spustený na 5 minút. Po uplynutí času bol program opäť pozastavený a vzorka bola schladená v ľade. Ďalej bola podľa tabuľky 8 pripravená reakčná zmes č. 2, z ktorej bolo do vzorky napipetovaných 10 µl. Vzorka bola premiešaná a vložená do termocyclera. Program bol spustený na dobu 75 minút. Potom bol pozastavený a vzorka bola opäť schladená v ľade. Do vzorky bolo napipetovaných 0,5 µl Rnasa H, obsah bol premiešaný a skúmavka vrátená do cyclera. Spustený program bežal po dobu 15 minút. Vzorka nasyntetizovanej cDNA bola potom uskladnená v mraziacom boxe pri teplote -20°C.

**Tabuľka 6:** Program pre syntézu cDNA v termocycleri

Teplota [°C]	Čas
65	5 min
42	60 min
70	15 min
37	15 min
4	...

**Tabuľka 7:** Reakčná zmes č. 1 pre syntézu cDNA (PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)

	Objem pre 1 vzorku [µl]
10mM dNTP	1
50uM Oligo dT Primer	1
Celkom	2

**Tabuľka 8:** Reakčná zmes č. 2 pre syntézu cDNA (PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit, TaKaRa)

	Objem pre 1 vzorku [µl]
Rnase-free water	4,5
5x PrimerScript buffer	4
RNase Inhibitor	0,5
PrimeScript Rtase	1
Celkom	10

Po syntéze prebehla reakcia PCR pre cyklickú cDNA na termocycleri, na ktorom bol nastavený program popísaný v tabuľke 9. Bola pripravená reakčná zmes pre PCR podľa tabuľky 10. V mikroskúmavke (0,2 ml) bol 1 µl cDNA nariadený vodou (nuclease-free) v pomere 1:1. K objemu nariadenej cDNA bolo pridaných 18 µl reakčnej zmesi. Boli pripravené aj vzorky pre pozitívnu a negatívnu kontrolu tak, že do skúmavky s pozitívnou kontrolou boli napipetované 2 µl kontrolnej cDNA (namiesto vzorkovej cDNA) a do skúmavky s negatívnou kontrolou boli napipetované 2 µl vody (nuclease-free; namiesto vzorkovej cDNA). Vzorky boli štandardne premiešané, stočené a vložené do cyclera, na ktorom bol spustený navolený program, ktorý trval 1 hodinu a 17 minút. Po skončení programu bol výsledok PCR zobrazený na elektroforéze. Postup prípravy gélu, vzoriek, chod elektroforézy a vyhodnotenie sú totožné s vyššie uvedeným postupom v časti PCR pre prečistenú RNA.

**Tabuľka 9:** Program pre PCR v termocycleri

Teplota [°C]	Čas	
94	3 min	
94	30 sek	
60	30 sek	30 cyklov
72	45 sek	
72	5 min	
15	...	

**Tabuľka 10:** Zložky reakčnej zmesi pre PCR reakciu (Bioline)

	Objem pre 1 vzorku [µl]
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	13
5x My Taq Buffer	4
10uM primer <i>PP2Acs</i> – F <sup>3</sup>	0,5
10uM primer <i>PP2Acs</i> – R <sup>4</sup>	0,5
My Taq Polymerase	0,1
Celkom	18,1

<sup>3</sup>Sekvencia F primeru pre kontrolný gén *PP2Acs*: 5'-TCC GAG TCC CAG GTC AAG AG – 3'

<sup>4</sup>Sekvencia R primeru pre kontrolný gén *PP2Acs*: 5'- GCT ACA AGC AGT GTA ACT GTT TCA – 3'

#### 4.2.3.5. Real-time PCR

Z pripravených vzoriek cDNA bola skúmaná úroveň génovej expresie pomocou kvantitatívnej PCR (qPCR). Študovanými génmi, tzv. génmi záujmu (genes of interest; GI) boli *PHOT1* a *PHOT2*, ktorých produktom sú svetlocitlivé fotorepetory – fototropíny. Ako referenčné gény, tzv. housekeepingové gény (housekeeping genes; HG) boli použité *PP2Acs* a *EFL*. Primery pre GI a HG boli laborantkou nariadené podľa postupu od výrobcu (výsledná koncentrácia primerov bola 100 mmol/l) a boli predom optimalizované.

Prvým krokom v príprave vzoriek pre qPCR bola úprava koncentrácie nasyntetizovanej cDNA na 1/4 pomocou riedenia. Komplementárna DNA bola nariadená vodou (Nuclease-free) do mikroskúmaviek (0,2 ml) spôsobom, ktorý je uvedený v tabuľke 11. Potom bola do štyroch 1,5 ml mikroskúmaviek pripravená reakčná zmes (pre každú dvojicu primerov zvlášť). Jednotlivé zložky a k nim príslušné použité objemy sú uvedené v tabuľke 12. Bola pripravená mikrotitračná 96 jamková doska (Bio-rad), do ktorej boli najskôr podľa schémy (Obr. č. 9) napipetované reakčné zmesi tak, že jedna jamka obsahovala 16 µl zmesi. Potom bola do jamiek podľa schémy (Obr. č. 9) napipetovaná nariadená cDNA v objeme 4 µl na jamku. Ku každej reakčnej zmesi bola v doske vytvorená negatívna kontrola, tak, že namiesto cDNA boli do jamky napipetované 4 µl Nuclease-free vody. Obsah v jamkách bol premiešaný pipetou a na dosku bola nalepená fólia (Bio-rad). V prípade, že sa v jamkách vyskytovali vzduchové bubliny alebo sa roztok zachytil na stenu jamky, bola mikrotitračná doska stočená na centrifúge. Následne bola doska so vzorkami vložená do cyclera pre qPCR (Bio-rad), na ktorom bol nastavený a spustený program uvedený v tabuľke 13. Po dokončení programu bola relatívna expresia vybraných génov (R) vyhodnotená podľa vzorca:

$$R = (1 + Eff_{(GI)})^{\Delta Ct(GI)} / (1 + Eff_{(HG)})^{\Delta Ct(HG)}$$

*Eff* – účinnosť primerov

$\Delta Ct_{(GI, HG)}$  = priemer Ct vzorky – priemer Ct kontroly

Relatívna inhibícia expresie bola vypočítaná podľa vzorca  $[(R_{ctrl} - R_{vz.}) / R_{ctrl}] * 100\%$ . Výsledky boli štatisticky vyhodnotené v programe REST 2009.

**Tabuľka 11:** Riedenie cDNA na 1/4

	Objem pre 1 vzorku [µl]
cDNA	1
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	3
Celkom	4

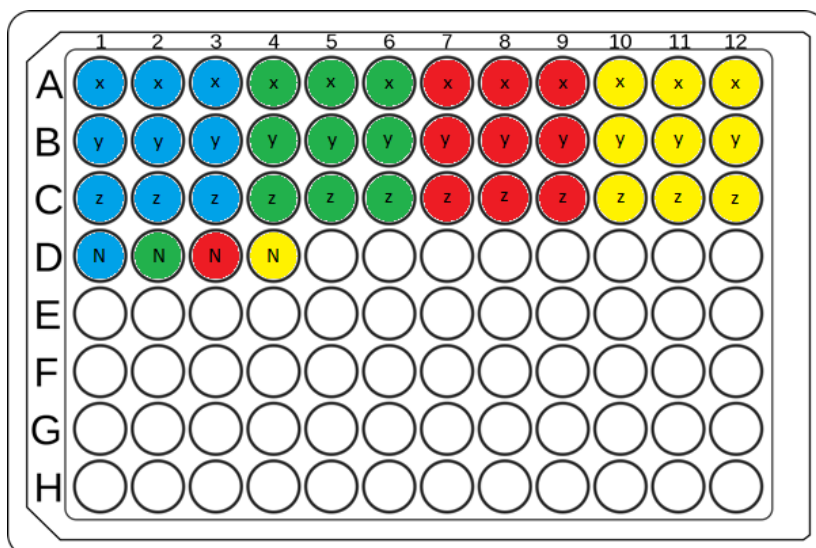
**Tabuľka 12:** Zloženie reakčných zmesí pre qPCR (SensiFAST™ SYBR® Lo-ROX Kit, Biorline)

	<b>Objem pre 1 vzorku</b>
	<b>[μl]</b>
2x SensiFAST SYBR® Lo-ROX Mix	10
10uM primer – F <sup>5</sup>	0,8
10uM primer – R <sup>5</sup>	0,8
Nuclease-free H <sub>2</sub> O	4,4
Celkom	16
<sup>5</sup> Sekvencia F primeru pre <i>GI PHOT1</i> : 5' - ATG GAA GAA GAA ACA AGC – 3'	
Sekvencia R primeru pre <i>GI PHOT1</i> : 5' - TTA GAA AAC ATT GTT TG – 3',	
Sekvencia F primeru pre <i>GI PHOT2</i> : 5' - ATG GAA AAC CAG AGA AG – 3'	
Sekvencia R primeru pre <i>GI PHOT2</i> : 5' - CTA GAA TAA GTC CAT TG – 3'	
Sekvencia F primeru pre <i>HG PP2Acs</i> : 5' - TCC GAG TCC CAG GTC AAG AG – 3'	
Sekvencia R primeru pre <i>HG PP2Acs</i> : 5' - GCT ACA AGC AGT GTA ACT GTT TCA – 3'	
Sekvencia F primeru pre <i>HG EF1</i> : 5' - CCC AAG CCA TCA GAC AA – 3'	
Sekvencia R primeru pre <i>HG EF1</i> : 5' - CAA CAG GGA CAG TTC CAA TAC CA – 3'	

**Tabuľka 13:** Program pre qPCR v termocycleri

<b>Teplota [°C]</b>	<b>Čas</b>
95	2 min
95	5 sek
60,5	20 sek
75	10 sek
95	2 sek

39  
cyklov



**Obr. č. 9:** Schéma pipetovania do 96 jamkovej mikrotitračnej dosky pre tri vzorky cDNA (v radoch: x, y, z), štyri reakčné zmesi (v stĺpcoch: modrá, ● – primer pre *PHOT1*; zelená, ● – primer pre *PHOT2*; červená, ● – primer pre *PP2Acs*; žltá, ● – primer pre *EF1*) a štyri vzorky pre negatívnu kontrolu (N).

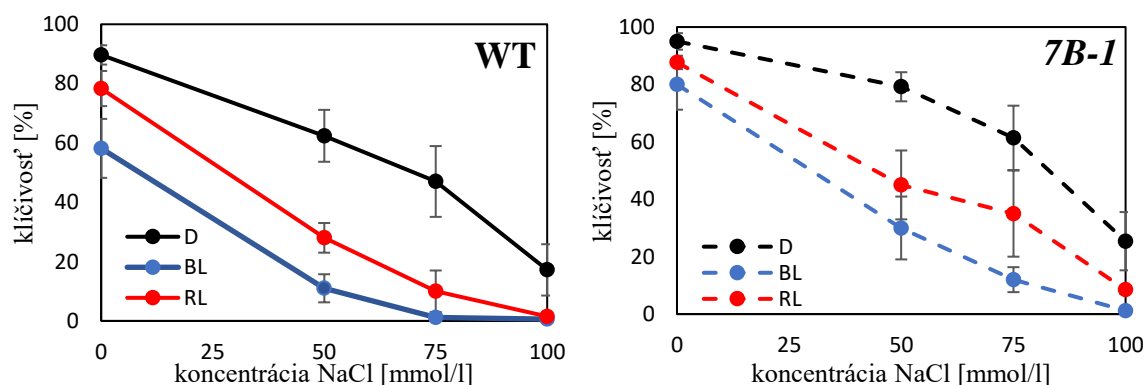


## 5 Výsledky

Všeobecným cieľom diplomovej práce bolo priniesť informácie o tom, či modré svetlo ovplyvňuje citlivosť rastlín k zasoleniu. Účelom experimentov bolo potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu, že zasolenie môže spätnou väzbou ovplyvňovať signálne dráhy modrého svetla. Experimentálnym cieľom predloženej práce bolo teda štúdium expresie génov pre fototropíny (*PHOT1*, *PHOT2*) a to, aký vplyv má soľný stres na expresiu týchto génov v semenách rajčiaka jedlého. V práci bolo takisto študované klíčenie semien rajčiaka jedlého vystavených zasoleniu so zámerom potvrdiť doposiaľ zistené informácie, že modré svetlo zosilňuje inhibičný účinok zasolenia na klíčenie semien. Experimentálnymi rastlinami boli semená rajčiaka cv. Rutgers a od neho odvodený mutant *7B-1*, ktorý má potlačené reakcie sprostredkované fototropínami a na modrom svetle vykazuje zvýšenú toleranciu k abiotickým stresom. Výsledky sú rozdelené do dvoch častí, pričom v jednotlivých experimentoch boli použité semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1*. V časti, ktorá sa zaoberá klíčením semien, sú uvedené výsledky klíčivosti semien v tme, na modrom a červenom svetle. Uvedené sú tiež výsledky inhibície klíčivosti. V ďalšej časti sú zahrnuté výsledky génovej expresie v semenách, ktoré boli kultivované 72 hodín v tme a na modrom svetle. Z týchto výsledkov bola vypočítaná inhibícia, respektíve stimulácia expresie génov v daných podmienkach.

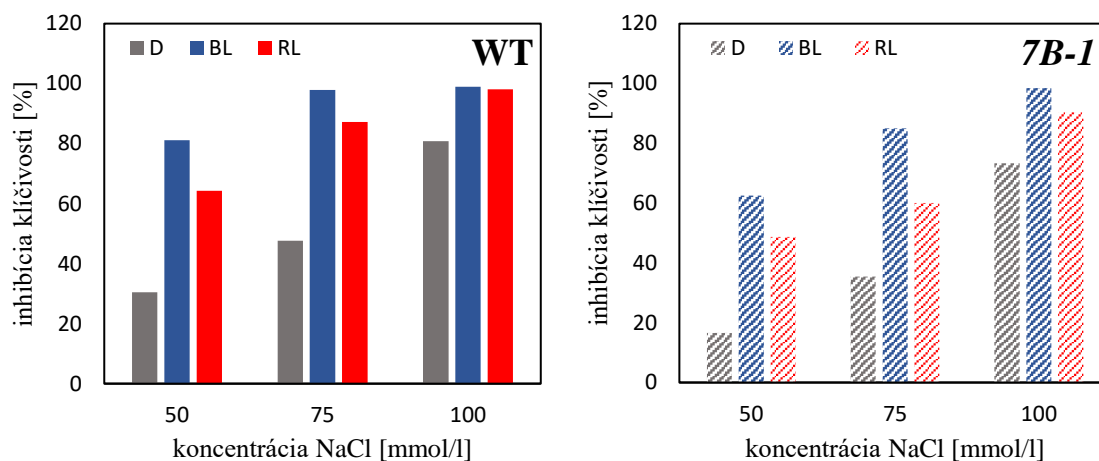
## 5.1. Štúdium klíčivosti semien

Semená rajčiaka boli kultivované na MS médiu s obsahom chloridu sodného (NaCl) o koncentráciách 0, 50, 75 a 100 mmol/l v tme (D), na modrom (BL) a červenom (RL) svetle. Obrázok č. 10 predstavuje grafické znázornenie klíčivosti semien WT a *7B-1* za uvedených podmienok. Na obrázku možno vidieť, že klíčenie WT a *7B-1* klesá so zvyšujúcou sa koncentráciou NaCl. To možno pozorovať na všetkých svetelných podmienkach. Modré a červené svetlo u oboch genotypov výrazne znižuje klíčivosť semien, pričom účinok BL je intenzívnejší. Pri porovnaní jednotlivých genotypov je vidieť, že klíčenie mutanta *7B-1* na médiu bez NaCl sa vo všetkých svetelných podmienkach pohybuje v intervale od 80 až 100%, zatiaľ čo WT v intervale od 58 do 90%. Významným rozdielom je predovšetkým výrazne vyššia klíčivosť semien *7B-1* na modrom svetle. Tiež možno pozorovať, že mutant *7B-1* klíči na BL pod vplyvom NaCl s koncentráciou 50 mmol/l približne o 20% viac než WT za rovnakých podmienok. Rozdielnu klíčivosť vykazujú semená WT a *7B-1* na BL a RL v prostredí 75 mM NaCl. Zatiaľ čo semená WT na BL vykazujú klíčivosť 1,2%, semená mutanta *7B-1* klíčia približne o 10% viac. Na červenom svetle v daných podmienkach je rozdiel klíčivosti genotypov až 25%. Účinok NaCl o koncentráciách 100 mmol/l pôsobil na klíčivosť semien mutanta pri všetkých svetelných podmienkach podobne ako na semená divokého typu. Oba genotypy na tejto koncentrácii klíčili najmenej.



**Obr. č. 10:** Vplyv NaCl na klíčenie semien *Solanum lycopersicum L.* cv. Rutgers (WT, vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo), ktoré boli kultivované v tme (D) na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL). Prezentované výsledky klíčivosti sú zo 7. až 8. dňa po výseve na MS médiu s NaCl a udávajú priemernú percentuálnu hodnotu  $\pm$  SE klíčivosti semien z piatich (dvoch pre RL) na sebe nezávislých experimentov.

Relatívna inhibícia klíčivosti bola vypočítaná vzhľadom na klíčivosť semien WT v tme na 0 mM NaCl, ktoré slúžili ako kontrola (Obr. č. 11). Výsledky relatívnej inhibície klíčivosti ukazujú, že klíčenie semien WT je inhibované vo väčšej miere než klíčenie mutanta *7B-1*. To možno pozorovať na všetkých svetelných podmienkach pri NaCl o koncentráciách 50 a 75 mmol/l. Pri koncentráciách 100 mmol/l NaCl je inhibícia klíčivosti u oboch genotypov podobná a takto ovplyvnené semená takmer neklíčili.



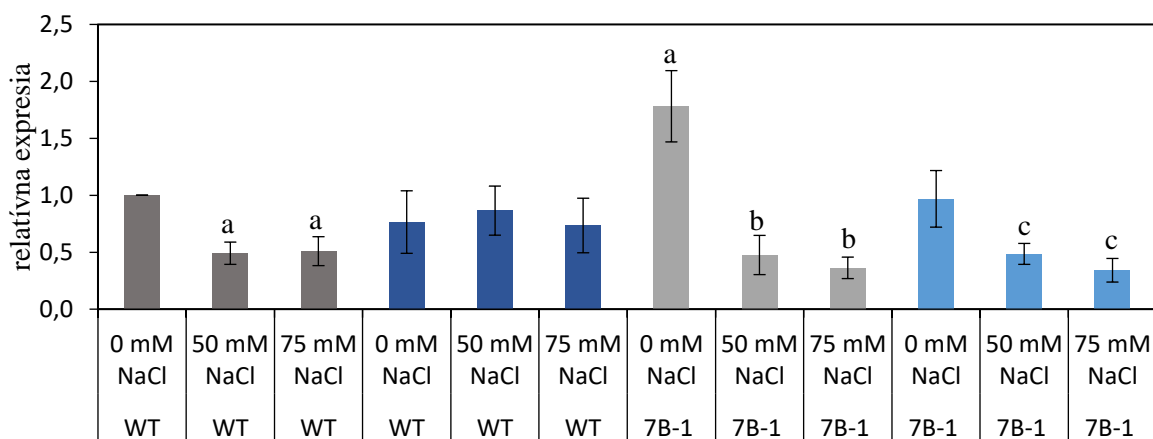
**Obr. č. 11:** Závislosť relatívnej inhibície klíčivosti semien *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT, vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo) na koncentráciách NaCl (50, 75 a 100 mmol/l) a na svetelných podmienkach (D, BL a RL). Uvedené výsledky predstavujú percentuálnu hodnotu inhibície klíčivosti vypočítanú z priemernej klíčivosti semien.

## 5.2. Štúdium expresie génov

Génová expresia bola študovaná na semenách rajčiaka jedlého, ktoré boli kultivované na MS médiu s NaCl o koncentráciách 0, 50 a 75 mmol/l v tme (D) a na modrom svetle (BL) po dobu 72 hodín. Génmi záujmu boli *PHOT1* a *PHOT2*, ktorých produktami sú na modré svetlo citlivé rastlinné fotoreceptory phot1 a phot2. Referenčné gény boli *PP2Acs* (gén kódujúci katalytickú podjednotku proteínfosfatázy 2A) a *EFI* (gén kódujúci elongačný faktor 1). Expresia týchto génov bola študovaná pomocou metódy qPCR. Zo získaných Ct hodnôt pre gény záujmu (GI = gene of interest) a referenčné gény (HG = housekeeping gene) bola podľa vzorca uvedeného v kapitole Materiál a metódy vypočítaná relatívna génová expresia (R). Z nej bola následne vypočítaná inhibícia, respektíve stimulácia expresie GI. Ako kontrolná vzorka pre výpočet relatívnej expresie oboch GI slúžili semená WT kultivované v tme na 0 mM koncentrácií NaCl. Výsledné hodnoty pre relatívnu génovú expresiu boli štatisticky vyhodnotené v programe REST2009.

### 5.2.1. Expresia génu *PHOT1*

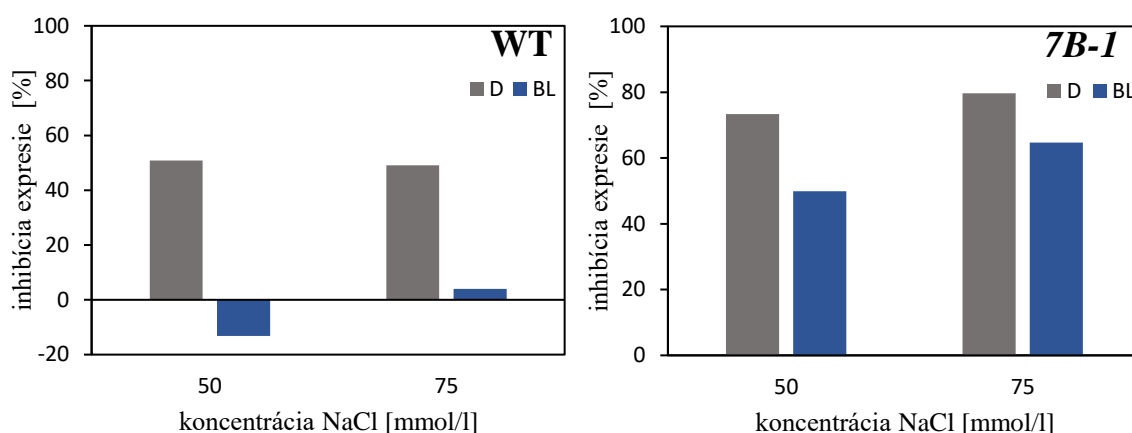
Z prezentovaných výsledkov na obrázku č. 12 možno povedať, že v tme u semien WT soľný stres vyvolaný NaCl, znižuje expresiu *PHOT1*, a to ako pri koncentrácií 50, tak aj 75 mmol/l. Výsledky ďalej ukazujú, že u semien WT na médiu bez či s NaCl modré svetlo výrazne neovplyvnilo expresiu *PHOT1*. Vo výsledkoch expresie *PHOT1* u semien mutanta *7B-1*, ktoré boli kultivované v D na médiu bez NaCl však možno pozorovať zreteľný nárast expresie študovaného génu v porovnaní s expresiou *PHOT1* u WT. V porovnaní s WT, NaCl výrazne redukoval expresiu *PHOT1*, a to jednak u semien kultivovaných v D, ale aj na BL. U mutanta *7B-1* je možno takisto pozorovať výrazný redukčný účinok BL na expresiu študovaného génu (Obr. č. 12).



**Obr. č. 12:** Relatívna expresia génu *PHOT1* v semenách *Solanum lycopersicum L.* cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1*, ktoré boli kultivované v tme a na modrom svetle na MS médiu s NaCl o koncentrácií 0, 50 a 75 mmol/l. Hodnoty predstavujú priemernú relatívnu expresiu génu *PHOT1*  $\pm$  SE vypočítanú zo štyroch na sebe nezávislých experimentov. Písmenom a je označená štatistická významnosť rozdielu (T-Test) v porovnaní s expresiou *PHOT1* u semien WT v D bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom b je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT1* u semien *7B-1* v D bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom c je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT1* u semien *7B-1* na BL bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ).

### 5.2.1.1. Vplyv NaCl na expresiu *PHOT1*

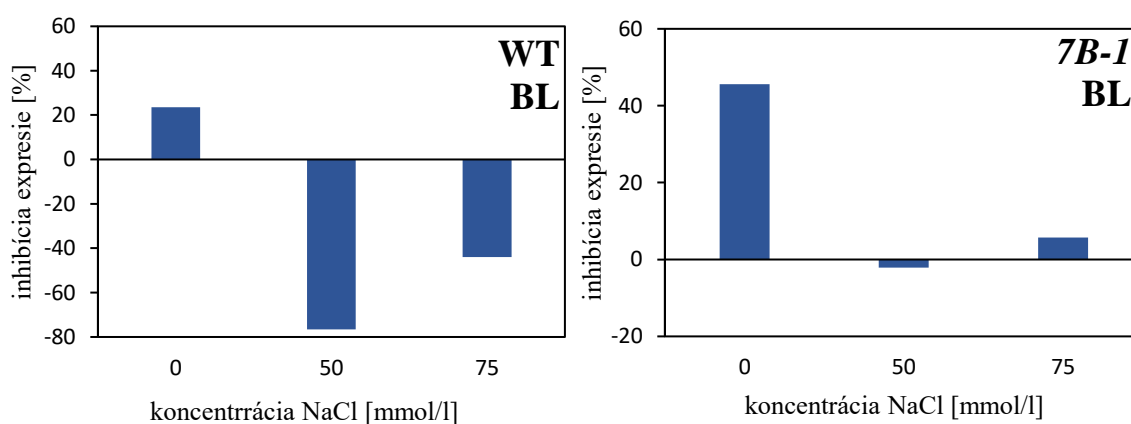
Na obrázku č. 13 sú prezentované dáta inhibície expresie génu *PHOT1* vplyvom NaCl o koncentráciách 50 a 75 mmol/l u WT v D a *7B-1* kultivovaných v D a na BL. Hodnoty boli vypočítané v závislosti na expresii *PHOT1* u semien WT alebo *7B-1*, ktoré za daných svetelných podmienok neboli vystavené soľnému stresu. Výsledky ukazujú, že u semien WT kultivovaných v tme soľný stres inhiboval expresiu *PHOT1* o približne 50% na oboch použitých koncentráciách NaCl. Naopak u semien mutanta *7B-1* v D bola expresia *PHOT1* inhibovaná až o približne 75% na oboch použitých koncentráciách NaCl. Zatiaľ čo u semien WT na BL nebol pozorovaný výrazný efekt NaCl na expresiu *PHOT1*, tak u *7B-1* bola na BL v zasolenom prostredí inhibovaná expresia *PHOT1* o 41% na koncentracii 50 mmol/l a o 63% na koncentracii 75 mmol/l.



**Obr. č. 13:** Expresia génu *PHOT1* vplyvom NaCl v semenách *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo), ktoré boli kultivované v tme a na modrom svetle po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu inhibíciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT1*.

### 5.2.1.2. Vplyv modrého svetla na expresiu *PHOT1*

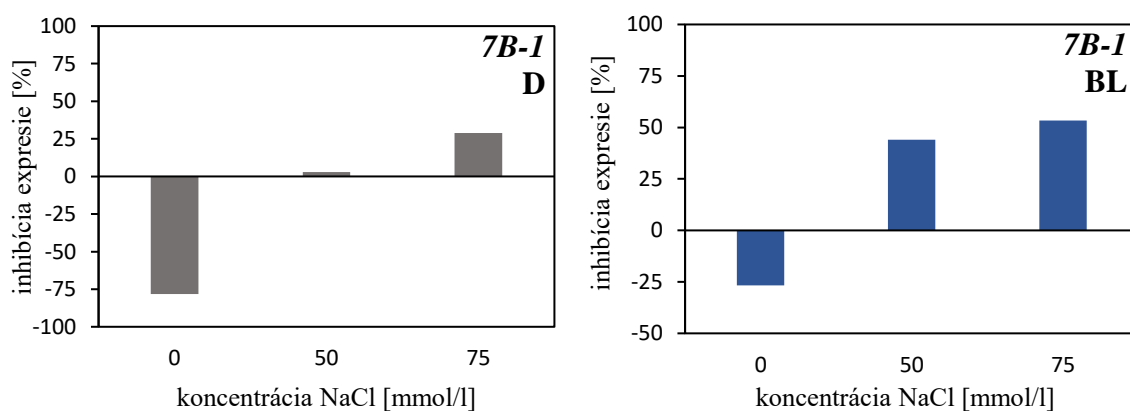
U semien oboch genotypov kultivovaných na modrom svetle na 0, 50 a 75 mmol/l NaCl bol vypočítaný inhibičný účinok modrého svetla na expresiu *PHOT1* v závislosti na výsledkoch expresie *PHOT1* v tme u daného genotypu na príslušnej koncentrácii NaCl (Obr. č. 14). U semien WT kultivovaných na 0 mM NaCl nemalo BL významný efekt na expresiu *PHOT1*, avšak u *7B-1* na BL možno pozorovať výraznú inhibíciu expresie *PHOT1* vplyvom modrého svetla, ktorá činí približne 46%. U WT na BL v prostredí 50 a 75 mM NaCl bola expresia *PHOT1* značne stimulovaná oproti WT v tme. Oproti tomu na expresiu *PHOT1* u semien *7B-1* v zasolenom prostredí nemalo modré svetlo výrazný inhibičný, respektíve stimulačný efekt.



**Obr. č. 14:** Expresia génu *PHOT1* vplyvom modrého svetla v semenách *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT, vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo), ktoré boli kultivované na modrom svetle po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu inhibíciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT1*.

### 5.2.1.3. Vplyv mutácie *7B-1* na expresiu *PHOT1*

V závislosti na relatívnej expresii *PHOT1* u semien WT, ktoré boli kultivované na médiu s NaCl v D a na BL, bol vypočítaný vplyv mutácie *7B-1* na expresiu *PHOT1* (Obr. č. 15). U semien *7B-1* kultivovaných v D na médiu bez NaCl spôsobila mutácia stimuláciu expresie daného génu približne o 78%. Za to na BL došlo vplyvom mutácie *7B-1* iba k slabšej stimulácii expresie *PHOT1*, ktorá bola 27%. Mutácia u *7B-1* v D a v zasolenom prostredí nemala výrazný efekt na expresiu *PHOT1*. Naopak u mutanta *7B-1* kultivovaného na BL v zasolenom prostredí bola vplyvom mutácie inhibovaná expresia génu *PHOT1*. Na koncentracii 50 mmol/l NaCl bola inhibovaná o 44% a na koncentracii 75 mmol/l o 53%.

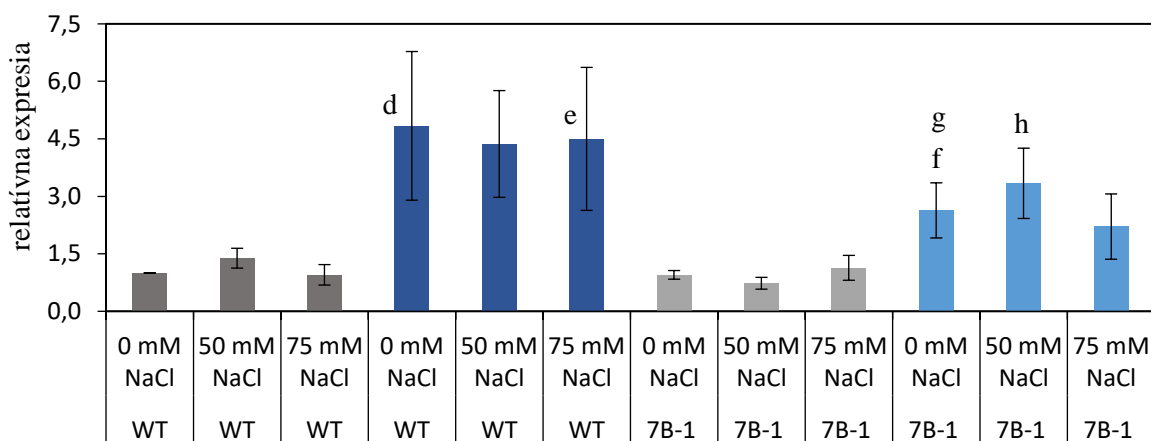


**Obr. č. 15:** Expresia génu *PHOT1* vplyvom mutácie u semien mutanta *7B-1*, ktoré boli kultivované v tme (vľavo) a na modrom svetle (vpravo) po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu inhibíciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT1*.



### 5.2.2. Expresia génu *PHOT2*

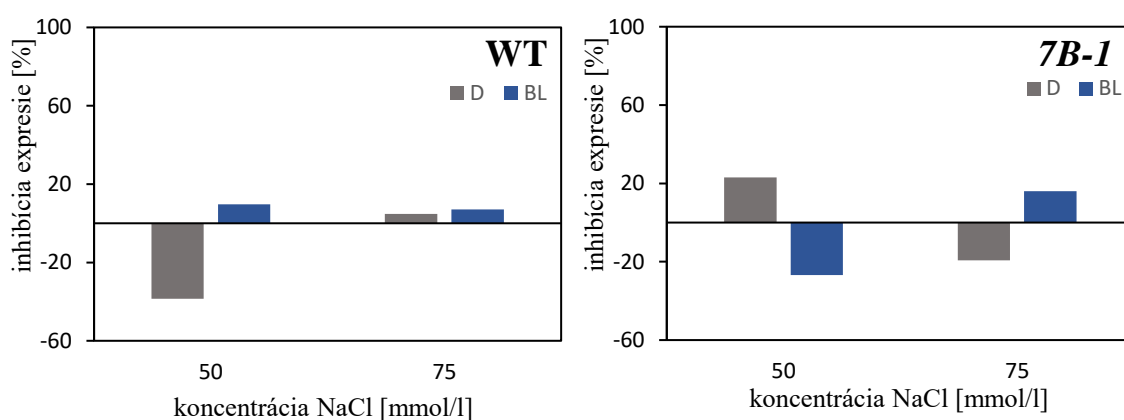
Výsledky relatívnej expresie génu *PHOT2*, ktoré sú prezentované na obrázku č. 16, ukazujú, že NaCl v testovaných koncentráciách ani v tme a ani na BL významne neovplyvňuje expresiu *PHOT2* v semenách WT alebo *7B-1*. Možno však pozorovať, že u WT a *7B-1* expresia *PHOT2* na BL stúpa v porovnaní s D. Výsledky tiež ukazujú že *PHOT2* je u WT na BL exprimovaný vo vyššej miere než v semenách mutanta *7B-1* na BL. Na rozdiel od expresie *PHOT1*, expresia génu *PHOT2* na BL bola veľmi variabilná o čom svedčia vysoké hodnoty SE.



**Obr. č. 16:** Relatívna expresia génu *PHOT2* v semenách *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1*, ktoré boli kultivované v tme a na modrom svetle na MS médiu s NaCl o koncentrácií 0, 50 a 75 mmol/l. Hodnoty predstavujú priemernú relatívnu expresiu génu *PHOT2*  $\pm$  SE vypočítanú zo štyroch na sebe nezávislých experimentov. Písmenom d je označená štatistická významnosť rozdielu (T-test) v porovnaní s expresiou *PHOT2* u semien WT v D bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom e je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT2* u semien WT v D na 75 mmol/l NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom f je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT2* u semien WT na BL bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom g je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT2* u semien *7B-1* v D bez NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ). Písmenom h je označená štatistická významnosť rozdielu v porovnaní s expresiou *PHOT2* u semien *7B-1* v D na 50 mmol/l NaCl (hodnota  $p \leq 0,05$ ).

### 5.2.2.1. Vplyv NaCl na expresiu *PHOT2*

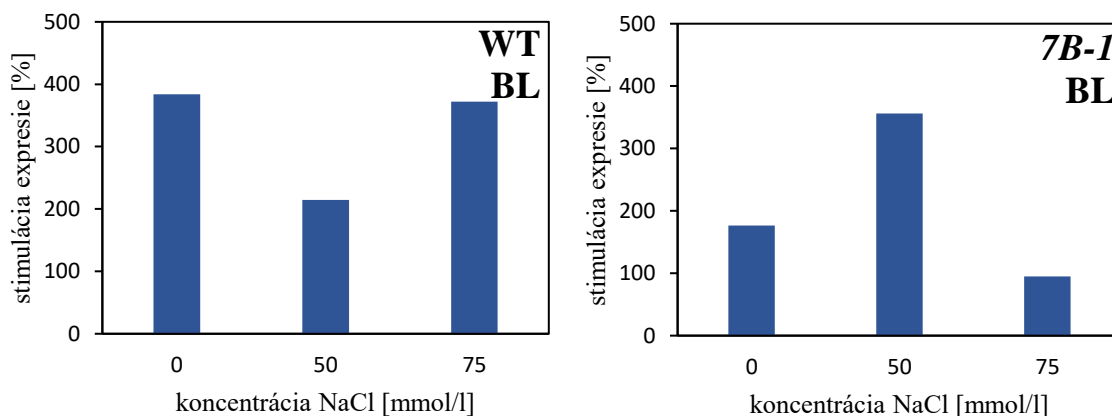
Výsledky prezentované na obrázku č. 17 predstavujú inhibíciu expresie génu *PHOT2* vplyvom NaCl o koncentrácií 50 a 75 mmol/l u semien WT a *7B-1*, ktoré boli kultivované na BL a v D. Hodnoty boli vypočítané v závislosti na expresii *PHOT2* u semien WT alebo mutanta *7B-1*, ktoré za daných svetelných podmienok neboli vystavené soľnému stresu. U WT v tme na 50 mM NaCl bola stimulovaná expresia *PHOT2* o približne 39%. Na koncentrácií 75 mmol/l NaCl nedošlo u WT v D k výraznej inhibícii, respektíve stimulácii expresie *PHOT2*. U semien mutanta *7B-1* v D a na BL taktiež nedošlo vplyvom soli k určitej inhibícii, respektíve stimulácii expresie *PHOT2*. Je však potrebné pripomenúť, že uvedené rozdiely v expresii neboli významné (Obr. č. 16).



**Obr. č. 17:** Expresia génu *PHOT2* vplyvom NaCl v semenách *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT, vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo), ktoré boli kultivované v tme a na modrom svetle po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu inhibíciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT2*.

### 5.2.2.2. Vplyv modrého svetla na expresiu *PHOT2*

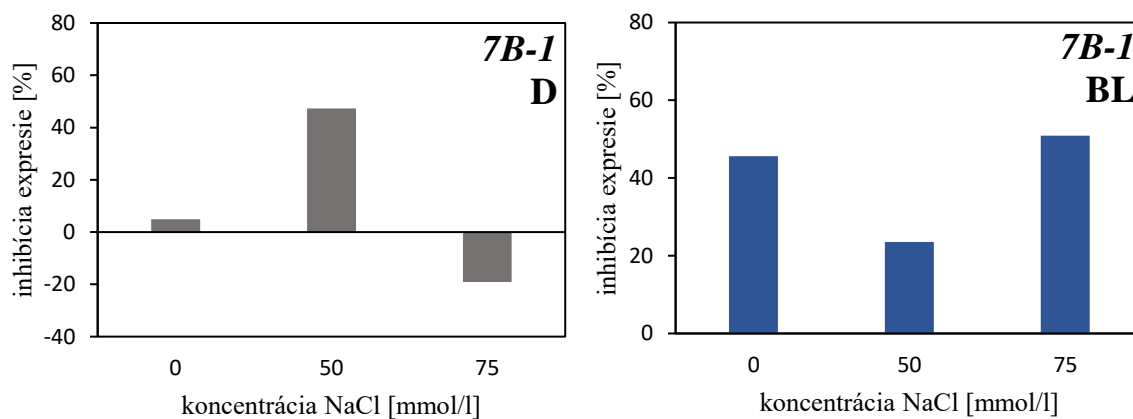
Účinok modrého svetla na expresiu *PHOT2* u WT na 0, 50 a 75 mM NaCl bol vypočítaný v závislosti na expresii *PHOT2* u WT v tme. Podobne u mutanta *7B-1* bol účinok BL vypočítaný v závislosti na expresii *PHOT2* u *7B-1* v tme (Obr. č. 18). Výsledky ukázali, že u WT aj u *7B-1* bola expresia *PHOT2* stimulovaná modrým svetlom, avšak u WT bola expresia *PHOT2* stimulovaná výraznejšie než u mutanta *7B-1*.



**Obr. č. 18:** Expresia génu *PHOT2* vplyvom modrého svetla v semenách *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT, vľavo) a mutanta *7B-1* (vpravo), ktoré boli kultivované na modrom svetle po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu stimuláciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT2*.

### 5.2.2.3. Vplyv mutácie *7B-1* na expresiu *PHOT2*

Vplyv mutácie *7B-1* na expresiu génu *PHOT2* bol vypočítaný na základe relatívnej expresie *PHOT2* u WT v tme, na modrom svetle a v prítomnosti NaCl (Obr. č. 19). Zatiaľ čo u *7B-1* v D je efekt mutácie na expresiu daného génu variabilný, u semien *7B-1* kultivovaných na BL je expresia *PHOT2* výrazne inhibovaná a to aj v prítomnosti NaCl.



**Obr. č. 19:** Expresia génu *PHOT2* vplyvom mutácie u semien mutanta *7B-1*, ktoré boli kultivované v tme (vľavo) a na modrom svetle (vpravo) po dobu 72 hodín. Hodnoty predstavujú percentuálnu inhibíciu expresie vypočítanú z priemernej expresie génu *PHOT2*.

## 6 Diskusia

Jeden z aktuálnych problémov pre pestovanie rastlín je zasolenie pôdy. Soľným stresom je inhibovaný rast a vývoj rastlín, čím dochádza k zníženiu ich produktivity a kvality plodín. Svetlo, slúži jednak ako zdroj energie, ale poskytuje aj informácie, ktoré rastliny využíva pri svojom vývoji a raste. Svetelné signály ovplyvňujú teda celý rad procesov, ktoré v rastline prebiehajú. Štúdie, zaoberajúce sa vzájomným pôsobením svetla a soli na rastlinu, ukázali, že signálne dráhy týchto faktorov vykazujú spoločné znaky a vzájomnú interakciu.

Mutant *7B-1*, ktorý je mutantom rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) cv. Rutgers, sa dostal do pozornosti vedcom po tom, ako bola u neho objavená samčia sterilita pri pestovaní za dlhého dňa. Táto mutantná rastlina, ktorej mutácia vznikla spontánne v jednom gène, bola ďalej študovaná za účelom potencionalnej produkcie hybridných semien a zlepšovania plodín (Sawhney 1997). Ďalšie výskumy však ukázali, že mutant *7B-1* je zaujímavý aj v oblasti tolerancie okolitého stresu a v odpovedi na modré svetlo (Fellner and Sawhney 2001, 2002). Výsledky štúdií tiež ukázali, že mutácia *7B-1* poškodzuje zatiaľ neznámy element signálnej dráhy modrého svetla, ktorý je zapojený do otvárania stómat (Ježilová et al. 2012; Hlavinka et al. 2013), pohybu chloroplastov, fototropizmu a ranej inhibície rastu hypokotylu (Fellner, nepublikované výsledky). Možno teda predpokladať, že defekt nastáva v signálnej dráhe BL sprostredkovej fototropínami (phot) (Hlavinka et al. 2013). Na základe doterajších poznatkov o danej problematike bolo všeobecným cieľom práce zistiť, či modré svetlo prostredníctvom fototropínových signálnych dráh ovplyvňuje citlivosť rastlín k zasoleniu. Experimenty mali potvrdiť alebo vyvrátiť navrhnutú hypotézu, že soľný stres môže spätnou väzbou ovplyvňovať signálne dráhy modrého svetla. Štúdium expresie fototropínov malo za cieľ ozrejmiť, aký vplyv má soľný stres na expresiu génov kódujúcich fototropíny *phot1* a *phot2* v semenách rajčiaka. Súčasťou práce bolo takisto štúdium klíčivosti semien rajčiaka so zámerom overiť, či modré svetlo zosilňuje inhibičný účinok zasolenia na klíčenie semien.

Naše výsledky štúdia klíčivosti semien *Solanum lycopersicum L.* cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1* ukazujú, že zvyšujúcou sa koncentráciou NaCl klesá klíčivosť semien oboch genotypov vo všetkých svetelných podmienkach. Značí to, že klíčivosť semien je inhibovaná zasoleným prostredím a miera inhibície závisí na koncentrácií soli v okolitom prostredí. Možno tiež tvrdiť, že červené (RL) a modré svetlo (BL) zosilňuje inhibičný účinok soli, pričom inhibícia klíčivosti je výraznejšia na BL. Pri porovnaní výsledkov inhibície klíčivosti u WT a *7B-1*, možno povedať, že semená mutantu sú tolerantnejšie na soľný stres. Túto toleranciu vykazujú mutantné semená kultivované na médiu s NaCl o koncentrácií 50 a 75 mmol/l v D, RL a BL. Popísané výsledky teda potvrdzujú predošlé tvrdenia o tom, že BL zvyšuje inhibičný účinok soli na klíčenie semien a že mutant *7B-1* dokáže nejasným spôsobom tolerovať zasolenie zvlášť na modrom svetle.

Štúdium relatívnej expresie génov *PHOT1* a *PHOT2* v semenách *Solanum lycopersicum L.* cv. Rutgers (WT) a mutantu *7B-1*, ktoré boli pestované v zasolenom prostredí v tme a na modrom svetle,

prinieslo zaujímavé výsledky. Ukázalo sa, že soľný stres zasahuje do signálnej dráhy *PHOT1*. Ako u semien WT, tak u semien *7B-1* sa zistilo, že v tme zasolenie znižuje expresiu *PHOT1*. Toto zníženie však bolo výrazne vyššie u *7B-1*. Kľúčovým výsledkom je ale fakt, že na modrom svetle zasolenie signifikantne znižovalo expresiu *PHOT1* v semenách mutanta *7B-1*, nie však u WT. Tieto výsledky potvrdzujú našu hypotézu, že soľný stres ovplyvňuje signálne dráhy modrého svetla, konkrétne, že tlmí signalizáciu modrého svetla sprostredkovanú fototropínami.

Výsledky ďalej ukázali, že na expresii *PHOT1* sa podieľa aj funkčný produkt génu *7B-1*. Z našich výsledkov vyplýva, že u semien WT funkčný produkt *7B-1* tlmí expresiu *PHOT1* v tme. Dôkazom toho je výrazná stimulácia expresie *PHOT1* u semien mutanta *7B-1* inkubovaných v tme. Ďalšie výsledky tejto práce následne ukázali, že u semien *7B-1*, nie však u WT, je expresia *PHOT1* redukovaná modrým svetlom. Tento výsledok korešponduje s výsledkami predošlých experimentov, ktoré uvádzajú, že mutant *7B-1* disponuje menším množstvom fototropínov v bunkách (Fellner, nepublikované výsledky) a je menej vnímavý k modrému svetlu (Fellner et al. 2001). Je teda zrejmé, že vďaka mutáciou a soľným stresom downregulovanej expresii *PHOT1* sa dokáže semeno mutanta *7B-1* do určitej miery vyhnúť negatívnym účinkom soľnému stresu.

Naše výsledky je možno porovnať so zatiaľ jedinou štúdiou, ktorá ukázala, že osmotický stres upreguluje expresiu génov kódujúcich fotoreceptory *cry2* v koreňoch a klíčiach embryách *Arabidopsis thaliana*. Zistilo sa, že nadmerná expresia génov pre kryptochrómy nežiaduco ovplyvňuje odolnosť rastlín voči osmotickému stresu (Xu et al. 2009). Tieto výsledky, rovnako ako naše, poukazujú na to, že gény pre fotoreceptory sú asociované so signálnymi dráhami abiotických stresov.

Z výsledkov expresie *PHOT2* nemožno potvrdiť, že by soľný stres ovplyvňoval hladinu transkriptu *PHOT2*. Výsledky však ukázali, že u WT expresia *PHOT2* bola stimulovaná vplyvom BL a že táto stimulácia bola výrazne redukovaná mutáciou *7B-1*. Tento výsledok teda naznačuje, že funkčný produkt génu *7B-1* je zapojený do signálnej dráhy BL, pretože zosilňuje expresiu génu *PHOT2*. Pozitívny vplyv modrého svetla na expresiu *PHOT2* korešponduje s predošlými výskumami u *Arabidopsis thaliana* (Łabuz et al. 2012). Táto štúdia tiež ukázala, že *PHOT2* je u *Arabidopsis* takisto upregulovaný modrým svetlom. U expresie *PHOT2* na BL u oboch genotypov možno však pozorovať vysoké štandardné chyby, ktoré sú pravdepodobne spôsobené nestabilitou transkriptu génu *PHOT2* na BL.

Ak by funkčný produkt génu *7B-1* spôsobil upreguláciu *PHOT1* a *PHOT2* na BL a súčasne blokoval inhibičný účinok soli na expresiu *PHOT1*, znamenalo by to, že táto molekula je zodpovedná za zvýšenú citlivosť semien na zasolenie na modrom svetle. U mutanta *7B-1* dochádza vďaka mutáciám k zníženiu expresie *PHOT1* a *PHOT2* na BL, a inhibícia expresie *PHOT1* je umocnená soľným stresom. Pokiaľ predpokladáme, že expresia *PHOT1* a *PHOT2* odráža podobnú situáciu na úrovni proteínov (Fellner, nepublikované výsledky), potom sa mutant stáva kvôli zníženému počtu funkčných fototropínov čiastočne defektný vo vnímaní modrého svetla. Vďaka tomuto defektu

pravdepodobne dokáže účinnejšie odpovedať na soľný stres a stáva sa tak voči nemu tolerantnejším aj po ovplyvnení modrým svetlom.

V súvislosti s expresiou génov a ich prepisom do proteínov je nutné podotknúť, že množstvo transkriptu daného génu nemusí odpovedať množstvu konečného produktu. Je možné, že expresia génov môže byť regulovaná negatívnou spätnou väzbou, čo znamená, že množstvo fototropínov následne znižuje expresiu génu pre fototropíny.

Na základe získaných výsledkov je možné navrhnúť ďalší postup v riešení študovanej problematiky, ktorý by pomohol objasniť, či navrhnutý mechanizmus regulácie citlivosti semien rajčiaka k zasoleniu na modrom svetle, je správny. Budúce experimenty by teda spočívali v kvantifikácii jednotlivých fototropínových proteínov v semenách vystavených zasoleniu a modrému svetlu. Následne by bolo možné v semenách rajčiaka porovnať relatívnu expresiu génov s expresným profilom fototropínových receptorov.

## 7 Záver

Hlavnou podstatou diplomovej práce bolo priniesť informácie o tom, či má modré svetlo vplyv na citlivosť rastlín k soľnému stresu. Vykonané experimenty mali potvrdiť alebo vyvrátiť hypotézu, že zasolenie by mohlo spätnou väzbou ovplyvňovať signálne dráhy modrého svetla. Cieľom experimentov bolo teda štúdium expresie génov, ktoré kódujú fototropíny phot1 a phot2 a to, aký vplyv má soľný stres na expresiu týchto génov v semenách rajčiaka jedlého. Práca sa rovnako zaoberala aj štúdiom klíčenia semien rajčiaka v zasolenom prostredí, ktoré malo za cieľ potvrdiť, že modré svetlo zosilňuje inhibičný účinok zasolenia na klíčenie semien rajčiaka.

Boli urobené dva druhy experimentov, pričom v oboch boli použité semená rajčiaka jedlého (*Solanum lycopersicum L.*) kultivar Rutgers a semená mutanta *7B-1* odvodené od tohto kultivaru. V štúdiu klíčenia semien a expresie génov pre fototropíny boli semená oboch genotypov vystavené soľnému stresu v rôznych svetelných podmienkach. Génová expresia bola následne sledovaná pomocou kvantitatívnej RT-PCR.

Zo získaných výsledkov možno urobiť niekoľko záverov. Výsledky klíčivosti semien potvrdili doposiaľ zistené informácie, že modré svetlo zvyšuje citlivosť semien rajčiaka jedlého na zasolenie a že mutant *7B-1* vykazuje toleranciu k soľnému stresu zvlášť na modrom svetle. Štúdium expresie génov pre phot1 potvrdilo hypotézu, že soľný stres ovplyvňuje signálne dráhy modrého svetla a teda, že signálna dráha modrého svetla a soľného stresu spolu interagujú.

Ukázalo sa, že semená mutanta *7B-1* majú na modrom svetle vplyvom mutácie a zasolenia zníženú expresiu génu *PHOT1*. Tým má mutant *7B-1* oslabenú signalizáciu modrého svetla, čo môže vysvetľovať toleranciu mutanta *7B-1* k zasoleniu na BL. Štúdium expresie génu *PHOT2* prinieslo informáciu, že modré svetlo aj funkčný produkt *7B-1* stimuluje množstvo transkriptu *PHOT2*.

Do budúcnosti možno navrhnúť ďalší postup, ktorým by pomohol detailnejšie objasniť mechanizmus regulácie citlivosti semien rajčiaka k zasoleniu na modrom svetle. Tento postup by rovnako prebiehal na molekulovej úrovni a spočíval by v kvantifikácii fototropínových proteínov phot1 a phot2 v semenách rajčiaka, ktoré by boli kultivované za rovnakých podmienok, aké boli použité v experimentoch tejto práce.



## 8 Citovaná literatúra

- Assmann, S. M., Simoncini, L., & Schroeder, J. I.** (1985). Blue light activates electrogenic ion pumping in guard cell protoplasts of *Vicia faba*. *Nature*, 318(6043), 285–287
- Babourina, O., Newman, I., & Shabala, S.** (2002). Blue light-induced kinetics of H<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> fluxes in etiolated wild-type and phototropin-mutant *Arabidopsis* seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(4), 2433–2438
- 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), 1094–1104
- Batschauer, A.** (1999). Light perception in higher plants. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS*, 55(2), 153–166
- Bergougnoux, V., Hlaváčková, V., Plotzová, R., Novák, O., & Fellner, M.** (2009). The *7B-1* mutation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1219–1230
- Bewley, J. D.** (1997). Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, 1055–1066
- Blatt, M. R.** (2000). Cellular Signaling and Volume Control in Stomatal Movements in Plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 221–241
- Bögre, L.** (2003). Growth signalling pathways in *Arabidopsis* and the AGC protein kinases. *Trends in Plant Science*, 8(9), 424–431
- Bonner, F. T., & Southern Forest Experiment Station** (1984). Glossary of Seed Terms for Tree Seed Workers. Academic Service
- Borthwick, H. A., Hendricks, S. B., Parker, M. W., Toole, E. H., & Toole, V. K.** (1952). A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 38(8), 662–666
- Botha, F. C., Potgieter, G. P., & Botha, A. M.** (1992). Respiratory metabolism and gene expression during seed germination. *Plant Growth Regulation*, 11(3), 211–224
- Courbier, S., & Pierik, R.** (2020). Canopy Light Quality Modulates Stress Responses in Plants. *IScience*, 22, 441–452
- Crosson, S., & Moffat, K.** (2001). Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(6), 2995–3000
- Crosson, S., & Moffat, K.** (2002). Photoexcited Structure of a Plant Photoreceptor Domain Reveals a Light-Driven Molecular Switch. *The Plant Cell*, 14(5), 1067–1075
- D'Amico-Damião, V., & Carvalho, R. F.** (2018). Cryptochrome-Related Abiotic Stress Responses in Plants. *Frontiers in Plant Science*, 9, 1897

- D'Amico-Damião, V., Dodd, I. C., Oliveira, R., Lúcio, J. C., Rossatto, D. R., & Carvalho, R. F.** (2021). Cryptochrome 1a of tomato mediates long-distance signaling of soil water deficit. *Plant Science*, 303, 110763
- Daszkowska-Golec, A.** (2011). Arabidopsis Seed Germination Under Abiotic Stress as a Concert of Action of Phytohormones. *OMICS: A Journal of Integrative Biology*, 15(11), 763–774
- de Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M. R. G., Inoue, S., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K., Hangarter, R., & Fankhauser, C.** (2010). The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 Protein Is a Phototropin Signaling Element That Regulates Leaf Flattening and Leaf Positioning. *Plant Physiology*, 152(3), 1391–1405
- Deinlein, U., Stephan, A. B., Horie, T., Luo, W., Xu, G., & Schroeder, J. I.** (2014). Plant salt-tolerance mechanisms. *Trends in Plant Science*, 19(6), 371–379
- Dekkers, B. J. W., Pearce, S., van Bolderen-Veldkamp, R. P., Marshall, A., Widera, P. I., Gilbert, J., Drost, H.-G., Bassel, G. W., Müller, K., King, J. R., Wood, A. T. A., Grosse, I., Quint, M., Krasnogor, N., Leubner-Metzger, G., Holdsworth, M. J., & Bentsink, L.** (2013). Transcriptional Dynamics of Two Seed Compartments with Opposing Roles in *Arabidopsis* Seed Germination. *Plant Physiology*, 163(1), 205–215
- dos Reis, S. P., Lima, A. M., & de Souza, C. R. B.** (2012). Recent Molecular Advances on Downstream Plant Responses to Abiotic Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8628–8647
- Ehrenshaft, M., & Brambl, R.** (1990). Respiration and Mitochondrial Biogenesis in Germinating Embryos of Maize. *Plant Physiology*, 93(1), 295–304
- El-Hendawy, S., Elshafei, A., Al-Suhaibani, N., Alotabi, M., Hassan, W., Dewir, Y. H., & Abdella, K.** (2019). Assessment of the salt tolerance of wheat genotypes during the germination stage based on germination ability parameters and associated SSR markers. *Journal of Plant Interactions*, 14(1), 151–163
- Fellner, M., & Sawhney, V. K.** (2001). Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 102(2–3), 215–221
- Fellner, M., & Sawhney, V. K.** (2002). The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta*, 214(5), 675–682
- Fellner, M., Zhang, R., Pharis, R. P., & Sawhney, V. K.** (2001). Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 725–738
- Folta, K. M., Lieg, E. J., Durham, T., & Spalding, E. P.** (2003). Primary Inhibition of Hypocotyl Growth and Phototropism Depend Differently on Phototropin-Mediated Increases in Cytoplasmic Calcium Induced by Blue Light. *Plant Physiology*, 133(4), 1464–1470

- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K., & Shinozaki, K.** (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. *Current Opinion in Plant Biology*, 9(4), 436–442
- Graeber, K., Nakabayashi, K., Miatton, E., Leubner-Metzger, G., & Soppe, W.** (2012). Molecular mechanisms of seed dormancy. *Plant, Cell & Environment*, 35(10), 1769–1786
- Guo, Y., Jia, W., Song, J., Wang, D., Chen, M., & Wang, B.** (2012). *Thellungilla halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. *Acta Physiologiae Plantarum*, 34(4), 1287–1294
- Gupta, B., & Huang, B.** (2014). Mechanism of Salinity Tolerance in Plants: Physiological, Biochemical, and Molecular Characterization. *International Journal of Genomics*, 2014, 1–18
- Harada, A., Sakai, T., & Okada, K.** (2003). phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> differently in *Arabidopsis* leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), 8583–8588
- Hasegawa, P. M., Bressan, R. A., Zhu, J.-K., & Bohnert, H. J.** (2000). Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 51(1), 463–499
- Hlavinka, J., Nauš, J., & Fellner, M.** (2013). Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, 209, 75–80
- Hofmann, N.** (2014). Cryptochromes and Seed Dormancy: The Molecular Mechanism of Blue Light Inhibition of Grain Germination. *The Plant Cell*, 26(3), 846
- Holdsworth, M. J., Bentsink, L., & Soppe, W. J. J.** (2008). Molecular networks regulating *Arabidopsis* seed maturation, after-ripening, dormancy and germination. *New Phytologist*, 179(1), 33–54. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02437.x>
- Chen, M., Chory, J., & Fankhauser, C.** (2004). Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annual Review of Genetics*, 38(1), 87–117
- Chen, Y., Zong, J., Tan, Z., Li, L., Hu, B., Chen, C., Chen, J., & Liu, J.** (2015). Systematic mining of salt-tolerant genes in halophyte- *Zoysia matrella* through cDNA expression library screening. *Plant Physiology and Biochemistry*, 89, 44–52
- Chinnusamy, V., Gong, Z., & Zhu, J. K.** (2008). Abscisic Acid-mediated Epigenetic Processes in Plant Development and Stress Responses. *Journal of Integrative Plant Biology*, 50(10), 1187–1195
- Chinnusamy, V., Schumaker, K., & Zhu, J. K.** (2004). Molecular genetic perspectives on cross-talk and specificity in abiotic stress signalling in plants. *Journal of Experimental Botany*, 55(395), 225–236
- Christie, J. M.** (1998). *Arabidopsis* NPH1: A Flavoprotein with the Properties of a Photoreceptor for Phototropism. *Science*, 282(5394), 1698–1701

- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., & Briggs, W. R.** (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): Binding sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 96(15), 8779–8783
- Christie, J. M., Swartz, T. E., Bogomolni, R. A., & Briggs, W. R.** (2002). Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal*, 32(2), 205–219
- Indorf, M., Cordero, J., Neuhaus, G., & Rodríguez-Franco, M.** (2007). Salt tolerance (STO), a stress-related protein, has a major role in light signalling. *The Plant Journal*, 51(4), 563–574
- Jahromi, F., Aroca, R., Porcel, R., & Ruiz-Lozano, J. M.** (2008). Influence of Salinity on the In Vitro Development of *Glomus intraradices* and on the In Vivo Physiological and Molecular Responses of *Mycorrhizal Lettuce* Plants. *Microbial Ecology*, 55(1), 45–53
- Jarillo, J. A., Gabrys, H., Capel, J., Alonso, J. M., Ecker, J. R., & Cashmore, A. R.** (2001). Phototropin-related NPL1 controls chloroplast relocation induced by blue light. *Nature*, 410(6831), 952–954
- Ježilová, E., Fellner, M., Bergougnoux, V., & Špundová, M.** (2012). Is the rate of photosynthesis under blue light altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica*, 50(3), 477–480
- Jung, J. K. H., & McCouch, S.** (2013). Getting to the roots of it: Genetic and hormonal control of root architecture. *Frontiers in Plant Science*, 4, 186
- Kagawa, T.** (2001). *Arabidopsis* NPL1: A Phototropin Homolog Controlling the Chloroplast High-Light Avoidance Response. *Science*, 291(5511), 2138–2141
- 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), 762–773
- Kashojiya, S., Yoshihara, S., Okajima, K., & Tokutomi, S.** (2016). The linker between LOV2- $\alpha$  and STK plays an essential role in the kinase activation by blue light in *Arabidopsis* phototropin1, a plant blue light receptor. *FEBS Letters*, 590(1), 139–147
- Katsura, H., Zikihara, K., Okajima, K., Yoshihara, S., & Tokutomi, S.** (2009). Oligomeric structure of LOV domains in *Arabidopsis* phototropin. *FEBS Letters*, 583(3), 526–530
- Kinoshita, T., & Shimazaki, K.** (1999). Blue light activates the plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. *The EMBO Journal*, 18(20), 5548–5558
- Kinoshita, T., & Shimazaki, K.** (2002). Biochemical Evidence for the Requirement of 14-3-3 Protein Binding in Activation of the Guard-cell Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase by Blue Light. *Plant and Cell Physiology*, 43(11), 1359–1365

- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., & Shimazaki, K.** (2001). phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, 414(6864), 656–660
- Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., & Shimazaki, K.** (2003). Blue-Light- and Phosphorylation-Dependent Binding of a 14-3-3 Protein to Phototropins in Stomatal Guard Cells of Broad Bean. *Plant Physiology*, 133(4), 1453–1463
- Kinoshita, T., Nishimura, M., & Shimazaki, K.** (1995). Cytosolic Concentration of Ca<sup>2+</sup> Regulates the Plasma Membrane H<sup>+</sup>-ATPase in Guard Cells of Fava Bean. *The Plant Cell*, 1333–1342
- Kovács, H., Aleksza, D., Baba, A. I., Hajdu, A., Király, A. M., Zsigmond, L., Tóth, S. Z., Kozma-Bognár, L., & Szabados, L.** (2019). Light Control of Salt-Induced Proline Accumulation Is Mediated by ELONGATED HYPOCOTYL 5 in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*, 10, 1584
- Kovtun, I. S., Efimova, M. V., Malofii, M. K., & Kuznetsov, V. V.** (2019). Tolerance of Potato Plants to Chloride Salinity Is Regulated by Selective Light. *Doklady Biological Sciences*, 484(1), 19–22
- Kozuka, T., Kong, S.-G., Doi, M., Shimazaki, K., & Nagatani, A.** (2011). Tissue-Autonomous Promotion of Palisade Cell Development by Phototropin 2 in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 23(10), 3684–3695
- Łabuz, J., Sztatelman, O., Banaś, A. K., & Gabryś, H.** (2012). The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63(4), 1763–1771
- Lee, K. P., & Lopez-Molina, L.** (2012). Control of seed germination in the shade. *Cell Cycle*, 11(24), 4489–4490
- Lee, S. C., & Luan, S.** (2012). ABA signal transduction at the crossroad of biotic and abiotic stress responses. *Plant, Cell & Environment*, 35(1), 53–60
- Liu, J., & Zhu, J. K.** (1997). An *Arabidopsis* mutant that requires increased calcium for potassium nutrition and salt tolerance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), 14960–14964
- Munns, R., & Tester, M.** (2008). Mechanisms of Salinity Tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59(1), 651–681
- Murashige, T., & Skoog, F.** (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473-497
- Neill, S. J., Horgan, R., & Rees, A. F.** (1987). Seed development and vivipary in *Zea mays* L. *Planta*, 171(3), 358–364
- Nicolás, G., & Aldasoro, J. J.** (1979). Activity of the Pentose Phosphate Pathway and Changes in Nicotinamide Nucleotide Content during Germination of Seeds of *Cicer arietinum* L. *Journal of Experimental Botany*, 30(6), 1163–1170

- Oh, E., Yamaguchi, S., Hu, J., Yusuke, J., Jung, B., Paik, I., Lee, H.-S., Sun, T.-, Kamiya, Y., & Choi, G.** (2007). PIL5, a Phytochrome-Interacting bHLH Protein, Regulates Gibberellin Responsiveness by Binding Directly to the GAI and RGA Promoters in *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell*, 19(4), 1192–1208
- Okajima, K.** (2016). Molecular mechanism of phototropin light signaling. *Journal of Plant Research*, 129(2), 149–157
- Onaga, G., & Wydra, K.** (2016). Advances in Plant Tolerance to Abiotic Stresses. *Plant Genomics* 2, 1-12
- Paik, I., & Huq, E.** (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 114–121
- Palmgren, M. G.** (2001). Plant plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPases: Powerhouses for Nutrient Uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1), 817–845
- Piskurewicz, U., Turečková, V., Lacombe, E., & Lopez-Molina, L.** (2009). Far-red light inhibits germination through DELLA-dependent stimulation of ABA synthesis and ABI3 activity. *The EMBO Journal*, 28(15), 2259–2271
- Pucci, A., Picarella, M. E., & Mazzucato, A.** (2017). Phenotypic, genetic and molecular characterization of *7B-1*, a conditional male-sterile mutant in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 130(11), 2361–2374
- Quintero, F. J., Martínez-Atienza, J., Villalta, I., Jiang, X., Kim, W.-Y., Ali, Z., Fujii, H., Mendoza, I., Yun, D.-J., Zhu, J.-K., & Pardo, J. M.** (2011). Activation of the plasma membrane Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter Salt-Overly-Sensitive 1 (SOS1) by phosphorylation of an auto-inhibitory C-terminal domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(6), 2611–2616
- Rea, P. A., & Sanders, D.** (1987). Tonoplast energization: Two H<sup>+</sup> pumps, one membrane. *Physiologia Plantarum*, 71(1), 131–141
- Reddy, M. P., Sanish, S., & Iyengar, E. R. R.** (1992). Compartmentation of ions and organic compounds in *Salicornia brachiata* Roxb. *Biologia Plantarum*, 35(4), 173–179
- Roeber, V. M., Bajaj, I., Rohde, M., Schmülling, T., & Cortleven, A.** (2020). Light acts as a stressor and influences abiotic and biotic stress responses in plants. *Plant, Cell & Environment*, 44(3), 645–664
- Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T. E., Christie, J. M., Briggs, W. R., Wada, M., & Okada, K.** (2001). *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(12), 6969–6974
- Salomon, M., Christie, J. M., Knieb, E., Lempert, U., & Briggs, W. R.** (2000). Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin. *Biochemistry*, 39(31), 9401–9410

- Sanders, D., Brownlee, C., & Harper, J. F.** (1999). Communicating with Calcium. *The Plant Cell*, 11(4), 691–706
- Sanders, D., Pelloux, J., Brownlee, C., & Harper, J. F.** (2002). Calcium at the Crossroads of Signaling. *The Plant Cell*, 14(suppl 1), S401–S417
- Sato, Y., Wada, M., & Kadota, A.** (2001). External  $\text{Ca}^{2+}$  Is Essential for Chloroplast Movement Induced by Mechanical Stimulation But Not by Light Stimulation. *Plant Physiology*, 127(2), 497–504
- Sawhney, V. K.** (1997). Genic male sterility. *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*, 183–198
- Sharma, P., Chatterjee, M., Burman, N., & Khurana, J. P.** (2014). Cryptochrome 1 regulates growth and development in *Brassica* through alteration in the expression of genes involved in light, phytohormone and stress signalling. *Plant, Cell & Environment*, 37(4), 961–977
- Shimazaki, K., Doi, M., Assmann, S. M., & Kinoshita, T.** (2007). Light Regulation of Stomatal Movement. *Annual Review of Plant Biology*, 58(1), 219–247
- Schroeder, J. I., & Hagiwara, S.** (1989). Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature*, 338(6214), 427–430
- Schroeder, J. I., Raschke, K., & Neher, E.** (1987). Voltage dependence of  $\text{K}^+$  channels in guard-cell protoplasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 84(12), 4108–4112
- Sondergaard, T. E., Schulz, A., & Palmgren, M. G.** (2004). Energization of Transport Processes in Plants. Roles of the Plasma Membrane  $\text{H}^+$ -ATPase. *Plant Physiology*, 136(1), 2475–2482
- Sun, Y., Xu, W., Jia, Y., Wang, M., & Xia, G.** (2015). The wheat *TaGBF1* gene is involved in the blue-light response and salt tolerance. *The Plant Journal*, 84(6), 1219–1230
- Taiz, L., & Zeiger, E.** (2002). *Plant Physiology* (3rd ed.). Sinauer Associates
- Terecskei, K., Tóth, R., Gyula, P., Kevei, É., Bindics, J., Coupland, G., Nagy, F., & Kozma-Bognár, L.** (2013). The Circadian Clock-Associated Small GTPase LIGHT INSENSITIVE PERIOD1 Suppresses Light-Controlled Endoreplication and Affects Tolerance to Salt Stress in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 161(1), 278–290
- Tlalka, M., & Fricker, M.** (1999). The role of calcium in blue-light-dependent chloroplast movement in *Lemna trisulca* L. *The Plant Journal*, 20(4), 461–473
- Vaistij, F. E., Gan, Y., Penfield, S., Gilday, A. D., Dave, A., He, Z., Josse, E.-M., Choi, G., Halliday, K. J., & Graham, I. A.** (2013). Differential control of seed primary dormancy in Arabidopsis ecotypes by the transcription factor SPATULA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(26), 10866–10871
- Volkov, V.** (2015). Salinity tolerance in plants. Quantitative approach to ion transport starting from halophytes and stepping to genetic and protein engineering for manipulating ion fluxes. *Frontiers in Plant Science*, 6, 873

- Wang, X., Yang, P., Gao, Q., Liu, X., Kuang, T., Shen, S., & He, Y.** (2008). Proteomic analysis of the response to high-salinity stress in *Physcomitrella patens*. *Planta*, 228(1), 167–177
- Weiss, D., & Ori, N.** (2007). Mechanisms of Cross Talk between Gibberellin and Other Hormones. *Plant Physiology*, 144(3), 1240–1246
- Xu, P., Xiang, Y., Zhu, H., Xu, H., Zhang, Z., Zhang, C., Zhang, L., & Ma, Z.** (2009). Wheat Cryptochromes: Subcellular Localization and Involvement in Photomorphogenesis and Osmotic Stress Responses. *Plant Physiology*, 149(2), 760–774
- Zhou, T., Meng, L., Ma, Y., Liu, Q., Zhang, Y., Yang, Z., Yang, D., & Bian, M.** (2018). Overexpression of sweet sorghum cryptochrome 1a confers hypersensitivity to blue light, abscisic acid and salinity in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 37(2), 251–264
- Zhu, J. K.** (2003). Regulation of ion homeostasis under salt stress. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(5), 441–445



## 9 Skratky

ABA	- kyselina abscisová
ABI5	- ABA INSENSITIVE 5
ATP	- adenzíntrifosfát
BL	- <i>blue light</i> , modré svetlo
bZIP	- Basic Leucin Zipper Domain
cAMP	- cyklický adenzínmonofosfát
cDNA	- komplementárna DNA
cGMP	- cyklický guanozínmonofosfát
cry	- kryptochróm
D	- <i>dark</i> , tma
EDTA	- kyselina ethyléndiamintetraoctová
<i>EF1</i>	- gén kódujúci elongačný faktor 1
F primer	- <i>forward primer</i> , priamy primer
FMN	- flavínmononukleotid
GA	- giberelín
GBF	- G-box väzobný faktor
HKT	- K <sup>+</sup> -Na <sup>+</sup> -transportér
HY5	- LONG HYPOCOTYL 5
LIP1	- Light intensive period 1
LOV	- light/oxygen/voltage
MEM	- Membrane Delasting Buffer
MS	- Murashige and Skoog
NHX	- Na <sup>+</sup> /H <sup>+</sup> -exchanger
P5CS1	- 1-pyrólín-5-karboxyl syntáza
PDH1	- prolindehydrogenáza 1
phot1	- fototropín 1
<i>PHOT1</i>	- gén kódujúci fototropín 1
phot2	- fototropín 2
<i>PHOT2</i>	- gén kódujúci fototropín 2
PLC	- fosfolipáza C
PM	- plazmatická membrána
<i>PP2Acs</i>	- gén kódujúci podjednotku proteínfosfatázy
qPCR	- kvantitatívna PCR
R primer	- <i>reverse primer</i> , reverzný primer
RDN	- Reaction Buffer for DNase I
RL	- <i>red light</i> , červené svetlo

RLS	- Guanidin hydrochloride Lysis Buffer
ROS	- reaktívne formy kyslíka
RW1, 2	- Wash Buffer 1, 2
SAS	- The shade avoidance syndrome
SOS	- Salt overly sensitive
STK	- serín/treonín kináza
STO	- Salt tolerance protein
TBE	- Tris-borát-EDTA
V-ATPáza	- H <sup>+</sup> -ATPáza uložená v tonoplaste vakuoly
V-PPáza	- H <sup>+</sup> -pyrofosfatáza uložená v tonoplaste vakuoly
WT	- <i>wild type</i> , divoký typ