



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Regulace akvaporinů modrým světlem  
prostřednictvím kryptochromových a  
fototropinových signálních drah**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Tereza Pavlíčková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2023

**Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. za použití v práci uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 6.5.2023

Podpis.....

### **Poděkování**

Chtěla bych poděkovat prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, ochotu a čas, které mi v průběhu vypracování této práce věnoval. Dále bych chtěla poděkovat celé skupině molekulární fyziologie zejména Mgr. Tereze Trávníčkové, Mgr. Tereze Miksteinové a Mgr. Natálii Závorkové za vytvoření příjemného pracovního prostředí a za rady při práci v laboratoři.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Pavlíčková
Název práce	Regulace akvaporinů modrým světlem prostřednictvím kryptochromových a fototropinových signálních drah
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2023
Klíčová slova	akvaporin, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>cry1-1</i> , <i>cry2-1</i> , HgCl <sub>2</sub> , <i>phot1</i> , <i>phot2</i> , <i>phot1/phot2</i> , světlo
Počet stran	59
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

## Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se v teoretické části věnuje problematice rostlinných akvaporinů a světelných signálních drah. V experimentální části byl zkoumán vliv modrého světla na regulaci akvaporinů prostřednictvím kryptochromových a fototropinových signálních drah. Pro experimenty bylo vybráno pět fotomorfogenních mutantů (*cry1-1*, *cry2-2*, *phot1*, *phot2*, *phot1/phot2*) rostliny *Arabidopsis thaliana*. Byly sledovány růstové reakce hypokotylu a kořene v přítomnosti inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> v různých světelných podmínkách (modré světlo, červené světlo, tma). Bylo dokázáno, že modré světlo ovlivňuje citlivost rostliny vůči HgCl<sub>2</sub>. Také bylo zjištěno, že fotoreceptor Phot2 hraje pravděpodobně důležitou úlohu v procesu regulace akvaporinů. Tuto reakci nejspíše ovlivňuje i fotoreceptor Phot1.

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Tereza Pavlíčková
Title of thesis	Regulation of aquaporins by blue light via cryptochrome and phototropin signaling pathways
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2023
Keywords	aquaporin, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>cry1-1</i> , <i>cry2-1</i> , HgCl <sub>2</sub> , light, <i>phot1</i> , <i>phot2</i> , <i>phot1/phot2</i>
Number of pages	59
Number of appendices	0
Language	Czech (English)

## **Abstract**

In the theoretical part, submitted bachelor's thesis discusses plant aquaporins and light signaling pathways. In the experimental part, the influence of blue light on the regulation of aquaporins via the cryptochrome and phototropin signaling pathways was investigated. Five photomorphogenic mutants (*cry1-1*, *cry2-2*, *phot1*, *phot2*, *phot1/phot2*) of *Arabidopsis thaliana* were selected for experiments. Growth responses of hypocotyl and root in the presence of the aquaporin inhibitor HgCl<sub>2</sub> and in different light conditions (blue light, red light, dark) were monitored. It was proved that blue light affects the responsiveness of the plants to HgCl<sub>2</sub>. Furthermore, it was found that photoreceptor Phot2 probably plays an important role in the regulation of aquaporins. Also, Phot1 most likely influences this response as well.

## Obsah

1 Úvod.....	8
2 Cíle práce .....	9
3 Literární přehled .....	10
3.1 Rostlinné akvaporiny .....	10
3.1.1 Vnitřní membránové proteiny (PIPs).....	12
3.1.2 Vnitřní proteiny tonoplastu (TIPs).....	13
3.1.3 Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26 (NIPs).....	13
3.1.4 Malé základní vnitřní proteiny (SIPs).....	13
3.1.5 Netypické vnitřní proteiny (XIPs) .....	14
3.2 Světlo a světelné signální dráhy.....	14
3.2.1 Fototropiny.....	15
3.2.2 Kryptochromy .....	16
3.2.3 ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptory .....	18
3.2.4 UVR8 receptory .....	18
3.2.5 Fytochromy .....	18
3.2.6 Akvaporiny a světlo .....	19
4 Materiál a metody .....	21
4.1 Rostlinný materiál.....	21
4.2 Použité chemikálie.....	21
4.3 Pracovní postupy.....	22
4.3.1 Příprava kultivačního média .....	22
4.3.2 Stratifikace a sterilizace a sterilní výsev semen.....	23
4.3.3 Přenos vyklíčených semen na médium s požadovanou koncentrací HgCl <sub>2</sub> .....	24
4.4 Vyhodnocení růstových reakcí .....	25
5 Výsledky .....	26

5.1 Mutant <i>cry1-1</i> a kontrolní genotyp <i>Ler</i> .....	26
5.1.1 Elongace hypokotylu .....	26
5.1.2 Elongace kořene.....	28
5.2 Mutant <i>cry2-1</i> a kontrolní genotyp <i>Col</i> .....	29
5.2.1 Elongace hypokotylu .....	29
5.2.2 Elongace kořene.....	31
5.3 Mutant <i>phot1</i> a kontrolní genotyp <i>glabra1</i> .....	33
5.3.1 Elongace hypokotylu .....	33
5.3.2 Elongace kořene.....	34
5.4 Mutant <i>phot2</i> a kontrolní genotyp <i>glabra1</i> .....	36
5.4.1 Elongace hypokotylu .....	36
5.4.2 Elongace kořene.....	38
5.5 Mutant <i>phot1/phot2</i> a kontrolní genotyp <i>glabra1</i> .....	40
5.5.1 Elongace hypokotylu .....	40
5.5.2 Elongace kořene.....	42
6 Diskuze .....	45
7 Závěr .....	50
8 Seznam zkratk .....	51
9 Literatura.....	53

## 1 Úvod

Příjem vody je jeden ze základních a životně důležitých procesů v životě rostliny. Voda je však polární molekula, a proto přes semipermeabilní fosfolipidovou membránu prostupuje nelehko. K usnadnění tohoto procesu se vyvinuly kanály zvané akvaporiny, přes které voda prochází o poznání snadněji. Tento transport vody je poháněný osmózou. Bylo popsáno 5 základních skupin akvaporinů, z nichž některé neslouží pouze pro vodu, ale i pro jiné malé nenabitě molekuly, jako je například močovina, arsenit, CO<sub>2</sub>, bór či glycerol. Akvaporiny nejsou přítomné pouze v cytoplasmatické membráně, ale nacházejí se i v membránách organel uvnitř buňky jako například ve vakuole či endoplasmatickém retikulu.

Světlo je důležitý faktor prostředí ovlivňující vývoj a růst rostlin. Světlo slouží jednak jako zdroj energie, jelikož rostliny jsou fotoautotrofní organismy, které přeměňují energii sluneční na energii chemickou. Hraje však zásadní roli v procesu zvaném fotomorfogeneze, kde slouží jako signál – informace. Pro příjem světelného signálu mají rostliny vyvinuté fotoreceptory. Tyto receptory působí v oblastech ultrafialového záření přes viditelné světlo až po dlouhovlnné červené světlo. Modré světlo a oblasti UV-A záření vnímají fototropiny, kryptochromy a ZTL/FKF1/LKP2 receptory. UVR8 receptory jsou citlivé v oblasti UV-B záření a na červené světlo reagují fytochromy.

Je známo, že modré světlo, vnímané fotoreceptory pro oblasti modrého světla, ovlivňuje řadu životně důležitých procesů rostliny. Mezi ně patří například fototropismus, fotomorfogeneze, doba kvetení, pohyb chloroplastů či otevírání průduchů. Některé studie naznačují i spojitost mezi modrým světlem a regulací genů pro akvaporiny. Tento fenomén však zatím není dalece prostudován. Pro pochopení mechanismu ovlivnění akvaporinů modrým světlem je důležité znát fotoreceptor, který se na tomto podílí. Tato bakalářská práce se věnuje fototropinovým a kryptochromovým signálním drahám a jejich případnému napojení na proces regulace akvaporinů modrým světlem u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Experimenty byly prováděny ve skupině molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů, společného pracoviště Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AVČR.



## 2 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce bylo zpracovat literární rešerši na problematiku akvaporinů a světelných signálních drah. Dále popsat doposud známé spojitosti mezi modrým světlem a regulací akvaporinů.

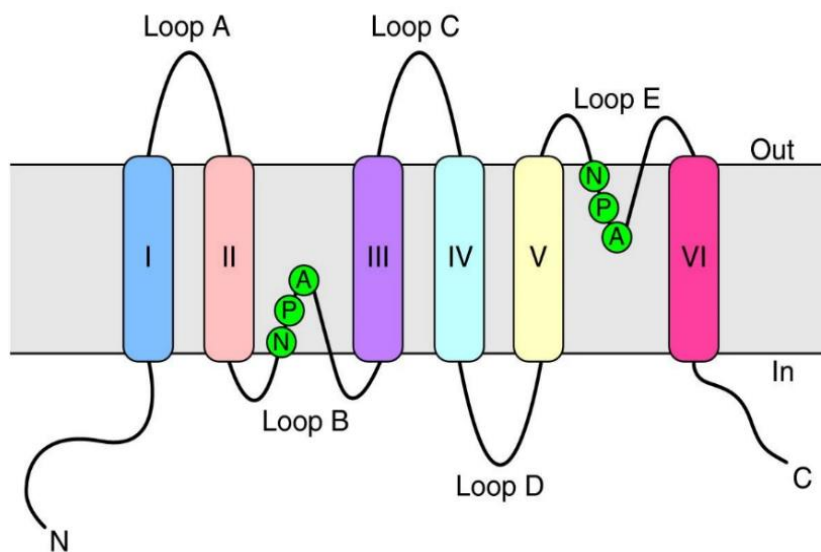
V experimentální části práce bylo cílem studovat v podmínkách *in vitro* interakci modrého světla a akvaporinů prostřednictvím sledování růstových reakcí fotomorfogenních mutantů s defekty ve fotoreceptorech Cry1, Cry2, Phot1 a Phot2 u rostliny *Arabidopsis thaliana* v přítomnosti inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> a v závislosti na světelných podmínkách. Cílem práce bylo zjistit možný vliv modrého světla na regulaci akvaporinů prostřednictvím fototropinových a kryprochromových signálních drah.

## 3 Literární přehled

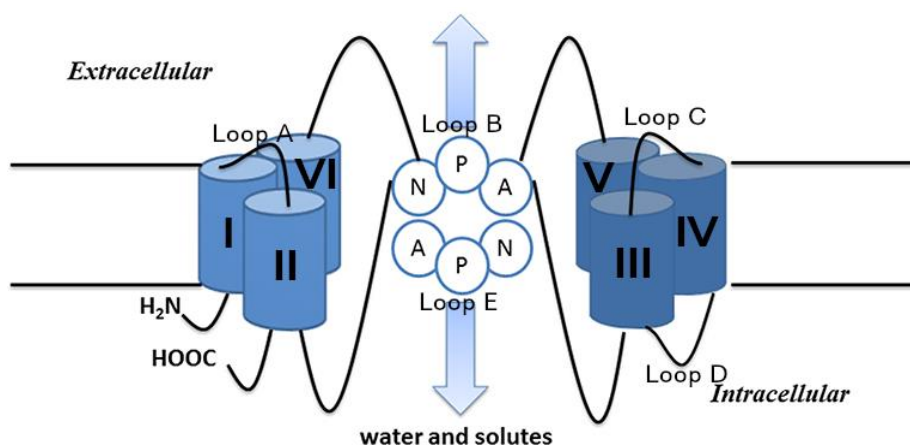
### 3.1 Rostlinné akvaporiny

Voda je velmi důležitá součást každého známého živého systému (Westall and Brack, 2018). Je to optimální rozpouštědlo, které umožňuje průběh biochemických reakcí, dále je důležitá při transportu živin či udržování turgoru. Její příjem buňkou je tak pro život esenciální. Voda, jako polární molekula, přes semipermeabilní lipidovou membránu prostou difúzí proniká jen v malém množství. Pro usnadnění jejího transportu přes membránové systémy se proto vyvinuly proteinové kanály zvané akvaporiny (neboli vodní kanály), přes které voda proniká o poznání snadněji. Tento proces je poháněný osmózou (Agre, 2004). Akvaporiny se vyskytují v biomembránách téměř všech živých organismů (Gomes et al., 2009). Propustnost akvaporinů, tedy jejich otevírání a zavírání, je nejrychleji regulována posttranslačně – fosforylací, metylací, acetylací, glykosylací či deaminací, avšak může být regulována i pomaleji přes expresi genů pro akvaporiny (Singh et al., 2020; Gomes et al., 2009). Významnou roli v expresi akvaporinů hrají rostlinné hormony (Kapilan, et al., 2018).

Akvaporiny jsou malé proteiny (21–32 kDa) tvořící tetramery (Singh et al., 2020; Kruse et al., 2006). Jejich monomery se sestávají z šesti  $\alpha$ -helixů zanořených do membrány. Tyto helixy jsou spojeny pěti smyčkami (A-E), přičemž pouze smyčky B a E se částečně nacházejí v membráně, a to tak že smyčka B se zanořuje z intracelulárního a smyčka E z extracelulárního prostoru. Na každé z těchto dvou smyček je přítomný aminokyselinový motiv NPA (asparagin, prolin, alanin), díky kterým tyto smyčky vytváří pór kanálu. C-terminální i N-terminální konce se nacházejí na vnitřní straně membrány (Agre, 2004; Kruse et al., 2006). Schématická struktura akvaporinu v membráně je znázorněna na Obr. 1. a schématické uspořádání akvaporinu tvořícího kanál v membráně pak na Obr. 2.



**Obr. 1: Schematická struktura akvaporinu v membráně.** Šest  $\alpha$ -helixů (I-VI) zanořených do membrány spojených pěti smyčkami (Loop A-Loop E). Smyčky B a E obsahují motivy N (asparagin), P (prolin), A (alanin) (podle jednopísmenného pojmenování aminokyselin). N – amino konec, C – karboxylový konec (převzato z Kruse et al., 2006).



**Obr. 2: Schématické uspořádání akvaporinu tvořícího kanál v membráně.** Šest  $\alpha$ -helixů (I-VI) zanořených do membrány spojených pěti smyčkami (Loop A-Loop E). Smyčky B a E obsahují motivy N (asparagin), P (prolin), A (alanin) (podle jednopísmenného pojmenování aminokyselin), které vytváří kanál pro vodu a další látky (převzato a upraveno podle Khajah and Luqmani, 2016).

U rostlin jsou akvaporiny velmi rozmanitou skupinou vnitřních membránových proteinů (Johanson et al., 2001). Kromě vody transportují i velkou spoustu jiných malých nenabitých molekul jako jsou například močovina, glycerol, ethanol, methanol, peroxid vodíku či arsenit nebo oxid uhličitý (Curticăpean, 2019). Nenacházejí se pouze v cytoplasmatické membráně, která ohraničuje celou buňku, ale také u membránových organel včetně endoplasmatického retikula a vakuoly (Kapilan et al., 2018). Rostlinné akvaporiny lze rozdělit do pěti skupin – vnitřní membránové proteiny (PIPs), vnitřní proteiny tonoplastu (TIPs), vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26 (NIPs), malé základní vnitřní proteiny (SIPs) a netypické vnitřní proteiny (XIPs) (Curticăpean, 2019).

### **3.1.1 Vnitřní membránové proteiny (PIPs)**

PIPs jsou akvaporiny, které se nachází nejčastěji v cytoplasmatické membráně rostlinných buněk. Usnadňují osmotický transport vody a některých malých neutrálních molekul (Hachez et al., 2013). Je to největší skupina akvaporinů. U *Arabidopsis* z celkových 35 genů pro akvaporiny jich 13 kóduje právě PIPs (Kapilan et al., 2018).

Hrají zásadní roli při regulaci velkého množství významných procesů rostliny jako je fotosyntéza, růst rostliny či její vývoj nebo příjem vody kořenem (Kapilan et al., 2018). PIPs jsou také důležité při reakcích rostlin na stres způsobený suchem (Ding et al., 2019). Když je potřeba dokáží PIPs velmi rychle měnit propustnost na základě některých biochemických signálů jako je pH, fosforylace smyčky B nebo heterotetramerizace. Tyto signály mění konformaci smyčky D, jež následně uzavře kanál (Yanef et al., 2016).

PIPs jsou rozděleny do dvou fylogenetických podskupin – PIP1 a PIP2 (Curticăpean, 2019). Do skupiny PIP1 patří 5 zástupců (PIP1; 1 až PIP1; 5). Mají v porovnání s PIP2 delší N-terminální konce a kratší C-terminální konce (Kapilan et al., 2018) a jejich propustnost není zdaleka tak velká jako u skupiny PIP2 (Chaumont et al., 2000). Skupina PIP2 se sestává z 8 zástupců (PIP2; 1 až PIP2; 8) (Kapilan et al., 2018). Uvádí se, že právě PIP2 mohou hrát roli při buněčném transportu vody v rostlinných orgánech (Kaldenhoff and Fischer, 2006).

### **3.1.2 Vnitřní proteiny tonoplastu (TIPs)**

TIPs jsou proteiny, které se hojně vyskytují v tonoplastu. Jejich funkce se liší u různých rostlinných druhů (Kapilan et al., 2018). TIPs jsou kromě vody propustné taky pro amonné kationty či amoniak (Holm et al., 2005). Některé kanály patřící do této skupiny mohou hrát roli při zajišťování rovnováhy močoviny mezi vakuolou a cytoplasmou (Kaldenhoff and Fisher, 2006). Kvůli jejich velkému počtu v tonoplastu je právě membrána vakuoly více propustná pro vodu než cytoplasmatická membrána obalující celou buňku, což může značit důležitou úlohu TIPs při regulaci turgoru (Kapilan et al., 2018).

Na základě jejich homologických podobností byly TIPs rozděleny do pěti podskupin (TIP1-TIP5) (Kapilan et al., 2018). Počet isoformů u jednotlivých rostlinných buněk se liší v závislosti na druhu. U *Arabidopsis thaliana* jich bylo objeveno 10, u *Populus trichocarpa* se nachází 17 isoformů TIPs (Curticăpean, 2019).

### **3.1.3 Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26 (NIPs)**

Nodulin-26 (Nod-26) je membránový protein, který byl objeven u luštěnin jako peribakteroidní membránový protein kořenových hlízek fixujících dusík (Sandal and Marcker, 1988). NIPs mají strukturu podobnou Nod-26, jejich syntéza probíhá v rostlinách a jsou důležité pro transport vody mezi rostlinou a symbiotickou bakterií (Kapilan et al., 2018).

NIPs se ale také nachází v plasmatických membránách a vnitřních membránách symbiotických i nesymbiotických rostlin jako je například *Arabidopsis thaliana*, kde se vyskytuje devět isoformů těchto proteinů (Wudick et al., 2009, Kapilan et al. 2018). Jejich úloha se nikterak neliší od jiných akvaporinů. Zajišťují transport vody a některých nenabitých rozpuštěných látek přes membránu. Efektivita je však o něco menší (Kapilan et al., 2018).

### **3.1.4 Malé základní vnitřní proteiny (SIPs)**

SIPs jsou malé transmembránové kanály nacházející se v rostlinách ve 2 až 3 isoformách a jsou lokalizovány ve vnitřních membránách, nejčastěji v membráně endoplasmatického retikula (ER) (Maurel, 2007; Curticăpean, 2019). Oproti ostatním rostlinným akvaporinům

mají kratší N-terminální konec (Kapilan et al., 2018). Jejich hlavní a důležitou úlohou je vodní transport uvnitř buňky (Curticăpean, 2019). Jelikož propouští vodu do ER, ovlivňuje tak jeho morfologii (Gomes et al., 2009). Jejich isoformy se liší v propustnosti, a to kvůli jinému umístění charakteristických motivů (Curticăpean, 2019).

### **3.1.5 Netypické vnitřní proteiny (XIPs)**

XIPs byly popsány u prvoků, hub, mechů a některých dvouděložných rostlin. U rostliny *Arabidopsis* však popsány nebyly (Kapilan et al., 2018). Do této skupiny patří 20 popsaných isoform (Ahmed et al., 2021).

Množství jednotlivých typů akvaporinů a mnohdy i jejich funkce se v rostlinných buňkách může lišit v závislosti na druhu (Curticăpean, 2019; Kapilan et al., 2018).

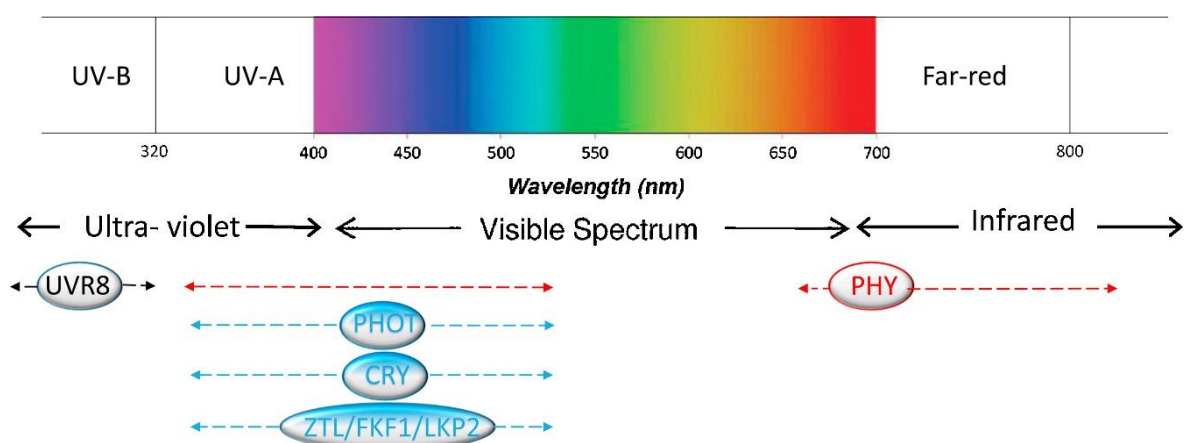
## **3.2 Světlo a světelné signální dráhy**

Světlo je jeden z nejdůležitějších faktorů prostředí, který ovlivňuje celý život rostliny (Qi et al., 2022). Je pro ně nejen zdrojem energie, jelikož prostřednictvím fotosyntézy dokáží přeměňovat energii sluneční na chemickou, ale také řídí řadu fyziologických reakcí v průběhu životního cyklu (Kami et al., 2010). Záření vnímané rostlinou ovlivňuje například vývoj semenáčků, vegetativní růst, kvetení či větvení rostliny (Huché-Thélier et al., 2016).

Rostlina vyvíjející se ve tmě využívá svou veškerou zásobu energie na maximální prodloužení hypokotylu za omezení vývoje děložních listů, kořenů a tvorby pigmentu (tzv. etiolizovaný růst). Tomuto ději se říká skotomorfogeneze (Carlson et al., 2019; Josse and Halliday, 2008). Rychle a přehnaně rostoucí hypokotyl zakončený apikálním háčkem dává sazenici možnost rychlého nalezení světla (Josse and Halliday, 2008). Po ozáření světlem přechází rostlina v tzv. fotomorfogenezi, kdy se jí prodlužování hypokotylu silně redukuje a vyvíjejí se děložní lístky a kořeny (tzv. deetiolizace) (Arsovski et al., 2012).

Rostlina je citlivá na světlo v oblastech ultrafialového záření přes viditelné světlo až po blízké infračervené záření. Nejvíce záření ve spektru viditelného světla vnímá rostlina v oblastech modrého (400-500 nm) a červeného (600-700 nm) světla. V menší míře vnímá i zelené světlo (500-600 nm) a dlouhovlnné červené světlo (730 nm) (Huché-Thélier et al., 2016).

K vnímání světla se u rostlin vyvinuly fotoreceptory. Aktivaci těchto receptorů dojde ke stimulaci následné signální kaskády, a to vede ke změnám genové exprese, které jsou zodpovědné za fyziologické a vývojové reakce (Yadav et al., 2020). U rostliny *Arabidopsis thaliana* je známých pět hlavních skupin těchto receptorů – kryptochromy, fototropiny a ZTL/FKF1/LKP2, které reagují v modré a UV-A oblasti, UVR8 receptory citlivé na UV-B záření a fytochromy absorbující červené světlo (Huché-Théliér et al., 2016; Nemhauser and Chory, 2002). Přehled fotoreceptorů ve svých aktivních oblastech zobrazuje Obr. 3.



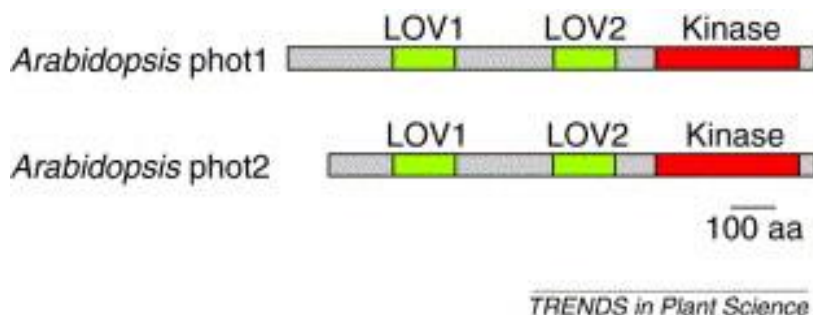
**Obr. 3: Aktivní světelné spektrum u rostlin.** Fototropiny (PHOT), kryptochromy (CRY), ZTL/FKF1/LKP2 – receptory pro modré světlo a UV-A záření, fytochromy (PHY) pro červené světlo a UVR8 receptory pro UV-B záření (převzato z Huché-Théliér et al., 2016).

### 3.2.1 Fototropiny

Fototropiny jsou fotoreceptory působící v oblasti modrého světla, které zastávají různé role v životě rostliny (Łabuz et al., 2012). U rostliny *Arabidopsis thaliana* byly objeveny 2 tyto fotoreceptory – Phot1 a Phot2 (Huché-Théliér et al., 2016). Jejich funkce se značně překrývají (Łabuz et al., 2012). Hrají důležitou úlohu při fototropismu, otevírání průduchů, polohování listů, akumulaci chloroplastů či rané fázi inhibice prodlužování hypokotylu (Huché-Théliér et al., 2016).

Fototropiny mají dvě LOV (light-oxygen-voltage) domény LOV1 a LOV2 nacházející se na N-terminálním konci. Tyto domény zprostředkovávají vnímání světla prostřednictvím vázaných chromoforů ve formě dvou flavin mononukleotidů (FMN) (Yadav et al., 2020; Paik and Huq, 2019). Dále obsahují serin/threonin kinázové domény, které

zodpovídají za šíření signálu v buňce (Hart and Gardner, 2021). Schématická struktura fototropinů *Arabidopsis thaliana* je na Obr. 4.



**Obr. 4:** Schématická struktura fototropinů rostliny *Arabidopsis thaliana* LOV domény jsou zobrazeny zeleně a serin/threonin kinázy červeně (převzato z Briggs and Christie, 2002).

LOV domény s nekovalentně vázaným chromoforem mají absorpční maximum při 447 nm (LOV<sub>447</sub>). Pokud dojde k ozáření, mění se nekovalentní vazba mezi uhlíkem chromoforu a konzervovaným cysteinovým zbytkem domény LOV<sub>447</sub> na vazbu kovalentní. Tento produkt má absorpční maximum při 390 nm (LOV<sub>390</sub>). Vzniklá kovalentní vazba je plně reverzibilní a ve tmě se vrací zpátky do původního stavu (LOV<sub>447</sub>) (Jones et al., 2007).

Převládající roli při regulaci aktivity fototropinu má zejména doména LOV2 (Jones et al., 2007). Ta je obklopená dvěma  $\alpha$ -helixy, které jsou zodpovědné za aktivaci kinázové domény. Vnímáním modrého světla fototropinem dojde k jejich rozvinutí, což má za následek aktivaci autofosforylace serinů a tím spuštění signalizační kaskády (Hart and Gardner, 2021; Huché-Thélier et al., 2016). Funkce LOV1 domény je zatím nejasná (Hart and Gardner, 2021).

Expresi fototropinů reguluje modré světlo, které zvyšuje expresi *PHOT2* a snižuje expresi *PHOT1*. Expresi *PHOT1* kontrolují *CRY1* a *PHYB* a expresi *PHOT2* ovlivňuje *CRY1*, *CRY2* a *PHYA* (Huché-Thélier et al., 2016).

### 3.2.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou fotoreceptory pro modré a UV-A záření nacházející se v bakteriích i eukaryotech (Lin and Todo, 2005). Jsou to flavoproteiny, které hrají důležitou roli v růstu a vývoji rostliny včetně prodlužování hypokotyly, iniciaci kvetení, deetiolizaci či otevírání průduchů (Shao et al., 2020; Palayam et al., 2021). U rostliny *Arabidopsis thaliana*, kde byly kryptochromy poprvé objeveny, byly dosud popsány tři geny kódující tyto proteiny citlivé



na světlo – *CRY1*, *CRY2*, *CRY3*, přičemž jejich produkty Cry1 a Cry2 fungují primárně v jádře a Cry3 v subcelulárních organelách (Kruusvee et al., 2022; Cao et al., 2020; Palayam et al., 2021).

Krytochromy mají spoustu strukturních podobností s DNA fotolyázami, ze kterých se také evolučně vyvinuly. Na rozdíl od fotolyáz však u Cry1 a Cry2 není známá funkce oprav DNA (Kruusvee et al., 2022). Cry3 nacházející se v mitochondriích nebo chloroplastech opravuje poškození jednovláknové DNA indukované UV zářením (Liu et al., 2016). Krytochromy obsahují dvě hlavní domény – vysoce konzervovanou oblast N-terminální fotolyázy (PHR) a C-terminální část (CCE) (Palayam et al., 2021). PHR doména obsahuje chromofory absorbující světlo. Jedním z nich je flavinadenindinukleotid (FAD) a druhým 5,10 – methenyltetrahydrofolát (pterin nebo MTHF) (Lin and Todo, 2005). CCE domény krytochromů kapradin, mechů a krytosemenných rostlin obsahují evolučně konzervovanou DAS (DQXVP-acidic-STAES) část (Wang and Lin, 2020). Schématická struktura krytochromů je na Obr. 5.



**Obr. 5: Schématická struktura krytochromů** Oranžová PHR doména, zelená CCE doména, modrý pterinový chromofor (MTHF) a fialový flavinadenindinukleotid (FAD) (převzato z Mishra and Khurana, 2017).

Pterinový chromofor slouží jako světlo-sběrný pigment, který přenáší excitační energii do FAD. FAD může existovat ve třech různých formách. FADox, oxidovaný stav, ten vykazuje maximální absorpci při UV-A záření a modrém světle. Po ozáření je redukován na protonovou (radikální) formu FADH $\cdot$ , prostřednictvím které jsou regulovány fyziologické reakce. Tato forma má absorpční maximum v oblasti zeleného světla, to převádí FADH $\cdot$  na plně redukovanou FADH $_2$  (také FADH $^-$ ) formu, která absorbuje málo viditelné vlnové délky světla, čímž je fotoreceptor deaktivován. Následnou oxidací přechází FADH $_2$  zpět na FADox (Mishra and Khurana, 2017; Wang and Lin, 2020). Druhý způsob ukončení fotocyklu je převedení FADH $\cdot$  zpět na FADox temnou konverzí (Mishra and Khurana, 2017). Aktivované krytochromy reagují prostřednictvím svých domén s více než 30 proteiny včetně COP1, AGB1 (podjednotka G-proteinu) či SPA1-SPA4 (supresory fytochromu A 1-4), což vede ke změnám v genové expresi rostliny (Wang and Lin, 2020).

### **3.2.3 ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptory**

ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptory jsou receptory modrého světla. Řadí se zde tři zástupci – zeitlupe (ZTL), flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1 (FKF1) a LOV Kelch protein 2 (LKP2) (Zoltowski and Imaizumi, 2014). Jejich hlavní funkce je kontrola degradace proteinových substrátů. Také se podílejí na regulaci doby kvetení či cirkadiálních rytmů rostliny (Banerjee and Batschauer, 2005; Pudasaini and Zoltowski, 2013).

ZTL/FKF1/LKP2 fotoreceptory se sestávají z N-terminální domény LOV, centrálně umístěného F-boxu a C-konce, který obsahuje šest Kelchových repetice (Suetsugu and Wada, 2013). Díky LOV doméně jsou schopny vnímat modré světlo, zatímco F-box a Kelchovy repetice jim umožňují vytvoření E3 ubikvitin ligázy s následnou ubikvitinací a degradací cílových proteinů (Feke et al., 2021).

### **3.2.4 UVR8 receptory**

UVR8 fotoreceptory reagují na světlo v UV-B oblasti. Tyto receptory jsou velmi důležité pro odolnost rostliny vůči stresu způsobeném UV-B zářením. Homodimerní UVR8 receptor přijme foton, což způsobí jeho monomerizaci a následnou interakci se signálním proteinem E3 ubikvitin ligázou COP1. Toto vede ke změnám v expresi genů (Podolec et al., 2021). Tyto receptory ovlivňují spoustu procesů včetně biosyntézy metabolitů, extenze stonku, expanze listů, uzavření průduchů, cirkadiálního rytmu, kvetení nebo odolnosti vůči patogenům (Liao et al., 2020).

### **3.2.5 Fytochromy**

Reakci rostlin na červené a dlouhovlnné červené světlo zprostředkovávají fotoreceptory zvané fytochromy (Phys) (Huché-Thélier et al. 2016). Tyto receptory hrají klíčovou úlohu při regulaci růstu a vývoje rostliny a při adaptaci na změny okolního prostředí (Klose et al., 2020). Fytochromy jsou dimerní chromoproteiny (Cheng et al., 2021). N-terminální část nese fotosenzorické jádro, které obsahuje PAS, GAF a PHY doménu, ke které je kovalentně vázán lineární tetrapyrrolový chromofor ve formě fytochromobilinu (Rockwell and Lagarias, 2010; Cheng et al., 2021). C-terminální část obsahuje histidinkinázové domény

(Rockwell and Lagarias, 2010). Chromofor je syntetizovaný v chloroplastu, odkud putuje do cytoplasmy a váže se na proteinovou část fytochromu (Huché-Thélier et al. 2016).

U rostliny *Arabidopsis thaliana* je přítomno 5 fytochromů – PhyA, PhyB, PhyC, PhyD a PhyE, kdy každý existuje v neaktivní P<sub>R</sub> formě a aktivní P<sub>FR</sub> formě (Huché-Thélier et al. 2016). Signalizaci zprostředkovává aktivní P<sub>FR</sub> forma (Klose et al., 2020). Při vystavení fytochromu červenému světlu přechází forma P<sub>R</sub>, nacházející se v cytosolu, do P<sub>FR</sub>, která se translokuje do jádra (Cheng et al., 2021). Přejít zpět z P<sub>FR</sub> do P<sub>R</sub> nastává buď absorpcí dalekého červeného záření nebo tzv. tepelnou či temností reverzí, tedy procesem tepelné relaxace nezávislým na světle (Klose et al., 2020; Cheng et al., 2021).

PhyA-PhyE u *Arabidopsis thaliana* se dělí do dvou skupin podle stability na světle na světlo-stabilní a světlo-labilní. PhyA je jediným fytochromem patřící mezi světlo-labilní, PhyB-PhyE jsou světlo-stabilní. PhyA je nejvíce zastoupeným fytochromem v sazenicích rostoucích ve tmě. Po ozáření světlem obsahující červené vlnové délky jeho hladina prudce klesá. PhyB je nejhojnější v rostlinách rostoucích na světle (Li et al., 2011).

Byla identifikována řada komponent specifických pro signální dráhu PhyA. Mezi ně patří například FHY1, FHY3, FAR1 nebo LAF1 a LAF3, které s největší pravděpodobností působí jako pozitivní regulátory této signální kaskády. Dále pak SPA1 a EID1, které působí jako negativní regulátory (Wang and Deng, 2004).

### 3.2.6 Akvaporiny a světlo

Expresi akvaporinů ovlivňují různé faktory prostředí včetně záření (Balarynová and Fellner, 2019). Vztah mezi světlem a regulací akvaporinů však není zatím dalece prostudován. Některé studie naznačují spojitost mezi modrým světlem a expresí některých genů kódujících akvaporiny.

Bylo zaznamenáno, že akvaporin-kódující gen *AthH2* (*AtPIP1;2*) rostliny *Arabidopsis thaliana* je indukován kontinuálním modrým světlem (Kaldenhoff et al., 1996). Gen *OsAQP*, který kóduje TIP v rýži, vykazoval vyšší míru transkripce v listech vystavených modrému světlu než červenému světlu či v listech ponechaných ve tmě (Liang et al., 2013). Další studie ukazuje, že modré světlo ovlivňuje transkripci *PIP1;3* a *PIP1;1* u rostliny *Solanum lycopersicum* (Balarynová and Fellner, 2019). Je známo, že u rostliny *S. lycopersicum* může být účinek modrého světla na expresi PIPs dvojí, jelikož modré světlo snižuje klíčení semen rajčat, naproti tomu však stimuluje prodlužování kořenů, proto PIPs

účastníci se těchto procesů mohou být regulovány opačně (Balaryová et al., 2018). U rostliny *Juglans regia* byla pozorována zvýšená akumulace transkriptů genů kódujících akvaporiny z rodiny PIP1 i PIP2 indukovaná světlem. Zároveň bylo zjištěno, že vliv světla na rodinu akvaporinů PIP2 byl mnohem větší než na akvaporiny ze skupiny PIP1 (Ben Baaziz, 2012). Na membránách tabáku byl objeven NtAQP1, patřící do skupiny PIP1, vázající riboflavin. Tato vazba může být indukována modrým světlem při vlnové délce 450 nm. Toto zjištění může značit roli PIP1 vázajícího riboflavin i jako fotoreceptoru (Lorenz et al., 2003).

## 4 Materiál a metody

### 4.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita semena následujících genotypů rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh:

1. Kontrolní genotyp Landsberg *erecta* (*Ler*) a od něj odvozený recesivní mutant *cry1-1* (CS70) (TAIR), single gene mutant (mutace v jednom genu). Mutace byla indukovaná pomocí urychlených neutronů (Ahmad and Cashmore, 1993).
2. Kontrolní genotyp Columbia (*Col*) a od něj odvozený recesivní mutant *cry2-1* (N3732), single gene mutant (mutace v jednom genu). Mutace byla indukovaná pomocí urychlených neutronů (Koornneef et al., 1980; Lin et al., 1996).
3. Kontrolní genotyp mutant *glabra1* (odvozený od ekotypu Col-0) a od něj odvození recesivní mutanti *phot1* (dříve *nph1*), single gene mutant (mutace v jednom genu) (Liscum and Briggs, 1995), *phot2* (dříve *npl1*), single gene mutant (mutace v jednom genu) (Jarillo et al., 2001) a *phot1/phot2*, double gene mutant (mutace ve dvou genech)

Semena mutantů *cry1-1* a *cry2-1* byla objednána prostřednictvím TAIR (The *Arabidopsis* Information Resource, <http://www.arabidopsis.org>) a laskavě poskytnuta ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center, Ohio State University, USA; <https://abrc.osu.edu/>). Semena mutantů *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* a kontrolního genotypu *glabra-1* byla laskavě poskytnuta Winslow R. Briggssem (Carnegie Institution of Washington, Stanford, CA, USA).

### 4.2 Použité chemikálie

MS médium (Cat. no. M0221.0100, Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

Phytoagar (Cat. no. P1001.1000, Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

Sterilní a nesterilní destilovaná voda

Pufř MES (Morpholinoethane sulfonic acid)

70 % a 96 % ethanol

Roztok KOH (hydroxid draselný) o koncentraci  $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Zásobní roztok  $\text{HgCl}_2$  (chloridu rtuťnatého) o koncentraci  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Sacharóza

Ředěný roztok SAVO ( $\text{NaClO}$  (chlornan sodný); 300 ml SAVO, 700 ml  $\text{H}_2\text{O}$ ; 1,4 % aktivního chloru)

### 4.3 Pracovní postupy

#### 4.3.1 Příprava kultivačního média

V experimentech byla semena kultivována na pevném MS médiu (Murashige and Skoog, 1962). Pro přípravu 2 l tohoto média byla použita 3l Erlenmayerova baňka, do které byl odměrným válcem přidán 1 l destilované vody. Do Erlenmayerovy baňky s vodou bylo dáno magnetické míchadlo a baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Roztok v baňce byl po celou dobu přípravy promícháván. Do Erlenmayerovy baňky bylo postupně přidáno 20 g sacharózy, 8,6 g MS média a 390,4 mg MES. Objem roztoku v baňce byl pomocí odměrného válce doplněn na 2 l destilovanou vodou. Pomocí pH metru bylo upraveno pH roztoku na 6,1 postupným přikapáváním 1M roztoku KOH Pasteurovou pipetou. Do 4 láhví se šroubovacím uzávěrem bylo naváženo 3,5 g phytoagaru a do každé následně přidáno 500 ml připraveného roztoku. Láhve byly uzavřeny a jejich víčka byla přikryta alobalem. Na alobal byl nalepen proužek autoklávovací pásky a médium bylo vysterilizováno v parním autoklávu a následně umístěno do chladničky. Sterilizace média v parním autoklávu při teplotě  $121 \text{ }^\circ\text{C}$  a tlaku 101,3 kPa byla provedena laborantkou.

### **4.3.2 Stratifikace a sterilizace a sterilní výsev semen**

#### **Stratifikace semen**

Na analytických vahách bylo do 1,5ml mikrozkušavky typu Eppendorf naváženo 6 mg semen kontrolního a mutantního genotypu rostliny *Arabidopsis thaliana*, což odpovídá asi 300 semenům. Každá mikrozkušavka byla doplněna po okraj destilovanou vodou ze stříčky. Mikrozkušavka byla uzavřena, promíchána a následně uložena na 3 dny do chladničky.

#### **Sterilizace semen**

Z mikrozkušavky se stratifikovanými semeny byla automatickou pipetou odpipetována voda tak, aby nedošlo k odpipetování semen. K semenům byl následně přidán 1 ml zředěného komerčního roztoku SAVO a mikrozkušavka byla protřepána. Sterilizace trvala 25 min za občasného protřepávání. Následně byl v laminárním boxu automatickou pipetou (1000 µl) se sterilní špičkou odpipetován roztok SAVA a semena byla celkem šestkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Po posledním přidání sterilní destilované vody byla voda v mikrozkušavce ponechána.

#### **Sterilní výsev semen**

Sterilní kultivační médium bylo rozpuštěno v mikrovlnné troubě. V laminárním boxu bylo do celkem šesti Petriho misek pro každý genotyp nalito po 20 ml média za pomoci sterilní plastové zkumavky o objemu 50 ml. Médium bylo ponecháno ztuhnout.

Po ztuhnutí média byl na jeho povrch proveden výsev semen. Skalpelem vysterilizovaným v 96% ethanolu s následným vyžiháním nad plamenem lihového kahanu byla seříznuta sterilní špička na automatickou pipetu (2-20 µl). Následně byly pomocí automatické pipety se seříznutou špičkou vysévána semena na ztuhlé kultivační médium v Petriho miskách v množství asi 50 semen na misku. Misky byly uzavřeny a zalepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Cat. no. 1320103112, Batist Medical a.s., Česká republika). Následně byly misky ve vertikální poloze zabaleny do hliníkové fólie, tak aby k nim nepronikalo světlo a umístěny do kultivační komory (Microclima MC1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) při 23 °C. Takto byla semena ponechána 3-4 dny.

### 4.3.3 Přenos vyklíčených semen na médium s požadovanou koncentrací HgCl<sub>2</sub>

V laminárním boxu bylo nejprve připraveno kultivační médium o požadované koncentraci chloridu rtuťnatého HgCl<sub>2</sub>. Do 300ml Erlenmayerovy baňky bylo pomocí plastové zkumavky o objemu 50 ml nalito 120 ml rozpuštěného média. Do média následně bylo automatickou pipetou přidáno odpovídající množství zásobního roztoku HgCl<sub>2</sub> o koncentraci 10<sup>-2</sup> mol·l<sup>-1</sup>. Objem zásobního roztoku HgCl<sub>2</sub> pro všechny použité koncentrace je uveden v tabulce (*Tabulka 1*).

*Tabulka 1 - Objem zásobního roztoku HgCl<sub>2</sub> ve 120 ml média o požadované koncentraci*

<b>Koncentrace HgCl<sub>2</sub> v médiu (μmol·l<sup>-1</sup>)</b>	<b>Objem zásobního roztoku HgCl<sub>2</sub> (10<sup>-2</sup> mol·l<sup>-1</sup>) na 120 ml média (μl)</b>
3	36
5	60
7	84
10	120
30	360
70	840
100	1200

Takto připravených 120 ml média bylo rozlito do celkem 6 Petriho misek (3 pro kontrolní a 3 pro mutantní genotyp). Po ztuhnutí média v miskách byl zahájen přenos vyklíčených semen.

Celý přenos se prováděl v laminárním boxu. Nejprve byla sterilním skalpelem přerušena páska z netkané textilie, kterou byly zalepeny Petriho misky s vyklíčenými semeny. Následně byly pomocí pinzety vysterilizované v 96% ethanolu s následným vyžiháním nad plamenem lihového kahanu přenášeny klíčky na médium s přídavkem HgCl<sub>2</sub> v Petriho miskách (5-12 klíčků na misku) tak, aby byla v každé misce rovnoměrně zastoupena semena s různě dlouhými kořeny. Od každého genotypu byly připraveny 3 misky se stejnou koncentrací HgCl<sub>2</sub>. Následně byly misky zalepeny páskou z netkané textilie a rozděleny na 3 sady. Jedna sada misek byla umístěna do kultivační komory s kontinuálním červeným světlem, druhá sada byla umístěna do kultivační komory s kontinuálním modrým světlem a třetí sada misek byla zabalena do hliníkové fólie tak, aby k nim nepronikalo světlo. Zdrojem kontinuálního modrého světla byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue s maximální intenzitou osvětlení 10 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> při vlnové délce 440 nm. Zdrojem kontinuálního



červeného světla byla zářivka Philips TLD36W/15-Red s maximální intenzitou osvětlení při  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  při vlnové délce 660 nm.

Takto zabalené byly umístěny do komory s modrým světlem. Kultivace probíhala při  $23\text{ }^\circ\text{C}$  po dobu 7 dní.

#### 4.4 Vyhodnocení růstových reakcí

Po 7 dnech kultivace za různých světelných podmínek a s různou koncentrací  $\text{HgCl}_2$  byla rostlinám za pomoci pinzety a pravítka změřena délka hypokotylu a kořene s přesností na 1 mm v závislosti na světelných podmínkách a koncentraci  $\text{HgCl}_2$ . Tyto hodnoty byly zapsány do tabulky. Následně byla z naměřených hodnot spočítána průměrná hodnota délky hypokotylu a kořene. Každý experiment byl proveden celkem ve třech opakováních pro získání co nejpřesnějších výsledků. Průměrná délka hypokotylu a kořene je tedy vždy průměrem ze všech třech těchto experimentů. Z této hodnoty byly následně spočítány směrodatná odchylka (v Excelu pomocí funkce SMODCH.VÝBĚR), střední chyba a procentuální inhibice růstu hypokotylu a kořene v závislosti na světelných podmínkách a koncentraci inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ . Z výsledků byly sestaveny grafy.

#### Výpočet průměrné inhibice

$$\% \text{ inhibice} = \frac{x - y}{x} \times 100 \%$$

x ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při nulové koncentraci inhibitoru  $\text{HgCl}_2$

y ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při studované koncentraci inhibitoru  $\text{HgCl}_2$

## 5 Výsledky

V experimentální části zabývající se regulací akvaporinů skrze receptory modrého světla, a to kryptochromy a fototropiny, byli použiti fotomorfogenní mutanti *cry1-1*, *cry2-1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* rostliny *Arabidopsis thaliana*. Jako kontrolní genotyp mutantu *cry1-1* byl použit ekotyp Landsberg *erecta* (*Ler*), pro mutantu *cry2-1* byl kontrolním genotypem ekotyp Columbia (*Col*) a pro všechny *phot* mutanty byl kontrolním genotypem mutant *glabra1*.

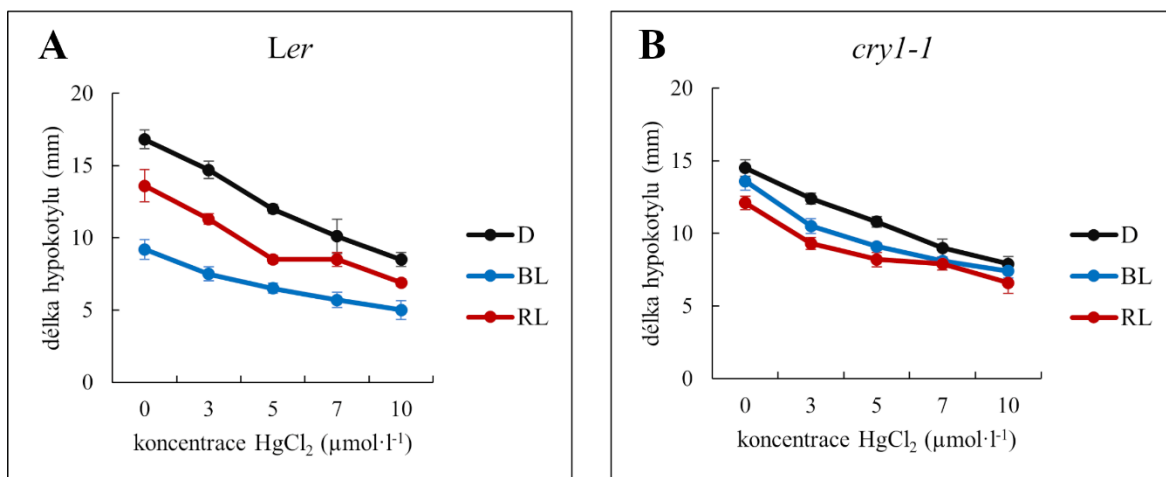
Experimenty probíhaly v přítomnosti inhibitoru akvaporinů chloridu rtuťnatého  $\text{HgCl}_2$  ve vybraných koncentracích. Kultivace rostlin poté probíhala při 23 °C v modrém (BL), červeném (RL) světle a ve tmě (D) po dobu 7 dní. Sedmý den kultivace byla změřena délka hypokotylu a kořene v závislosti na světelných podmínkách a koncentraci inhibitoru. Hodnoty délek kořene a hypokotylu jsou vždy průměrem délek ze tří nezávislých experimentů.

### 5.1 Mutant *cry1-1* a kontrolní genotyp *Ler*

U rostlin *Ler* a *cry1-1* byl použit inhibitor  $\text{HgCl}_2$  v koncentracích 0/3/5/7/10  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření hypokotylu a kořene probíhalo vždy v rámci jednoho experimentu.

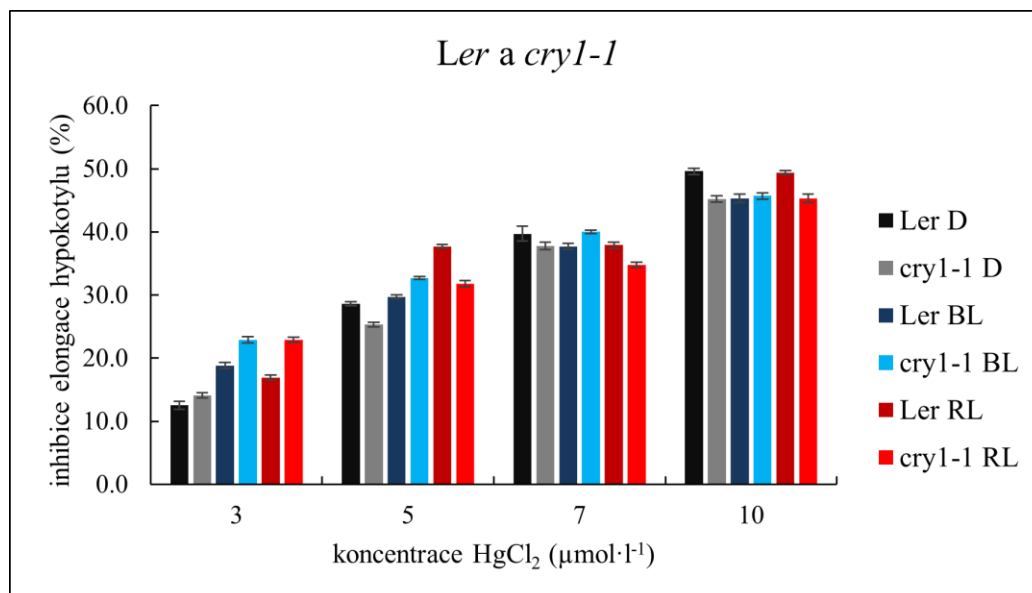
#### 5.1.1 Elongace hypokotylu

Z grafu (Obr. 6) vyplývá, že se zvyšující se koncentrací použitého inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  se zkracuje průměrná délka hypokotylu jak u kontrolní (*Ler*), tak u mutantní (*cry1-1*) rostliny. Dále je z obrázku patrný vliv BL a RL na inhibici délky hypokotylu u genotypu *Ler* při nulové koncentraci inhibitoru. Rostliny rostoucí v D bez přítomnosti inhibitoru dosahovaly průměrné délky hypokotylu 16,8 mm, na RL 13,6 mm a BL 9,2 mm. U rostlin mutantního genotypu *cry1-1* kultivovaných na BL a RL byla tato inhibice výrazně slabší. Průměrná délka hypokotylu při nulové koncentraci  $\text{HgCl}_2$  u rostlin kultivovaných v D byla 14,5 mm, na RL 12,1 mm a na BL 13,6 mm.



**Obr. 6:** Graf závislosti délky hypokotyly ekotypu *Ler* (A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky hypokotyly vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

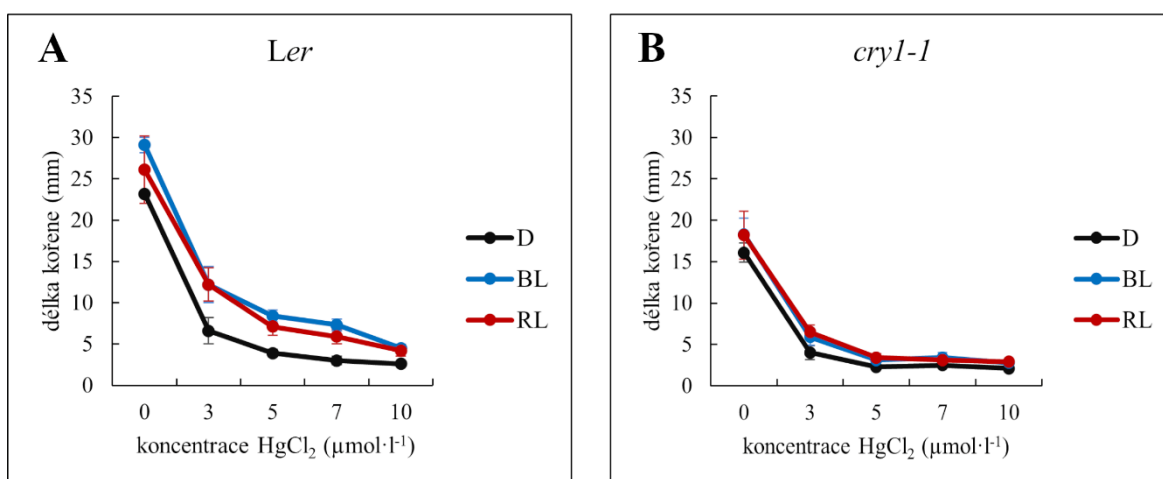
Z grafu (Obr. 7) je patrné, že inhibice délky hypokotyly u kontrolní (*Ler*) i mutantní (*cry1-1*) rostliny *Arabidopsis thaliana* roste se zvyšující se koncentrací HgCl<sub>2</sub> a není výrazně ovlivněna světelnými podmínkami. Zároveň jsou hodnoty inhibice délky hypokotylů mutantu *cry1-1* srovnatelné s hodnotami pro kontrolní genotyp *Ler* u všech studovaných koncentrací inhibitoru.



**Obr. 7:** Graf závislosti procentuální inhibice hypokotyly ekotypu *Ler* a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek hypokotyly ± SE a získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

### 5.1.2 Elongace kořene

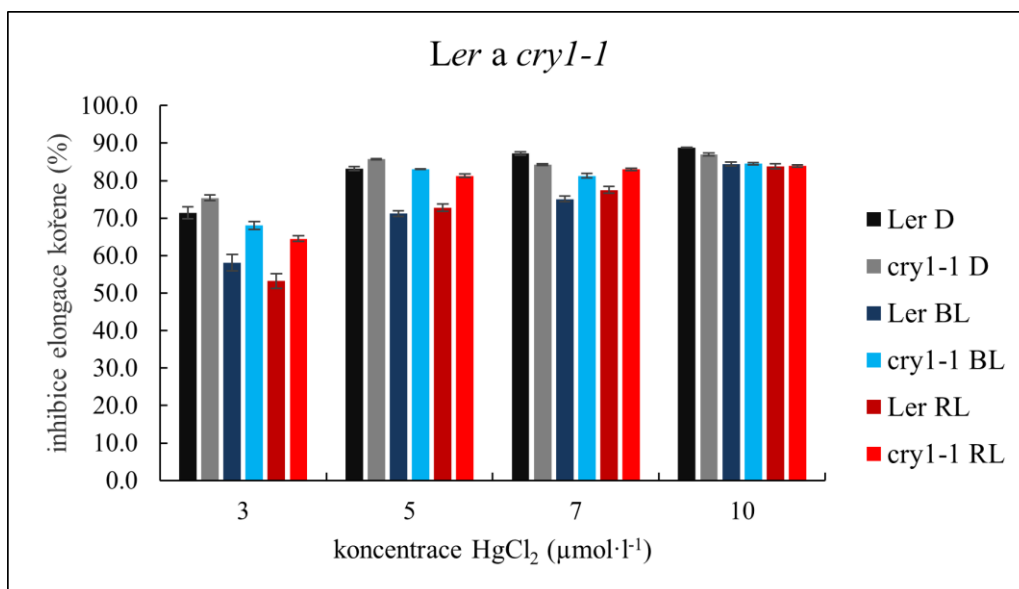
V grafu (Obr. 8) jsou patrné rozdíly délek kořene u ekotypu *Ler* i mutantu *cry1-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$ . Již při nízké koncentraci inhibitoru ( $3 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) dochází k velké inhibici růstu kořene. Délka kořene se poté již od koncentrace  $\text{HgCl}_2$   $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  se zvyšující se koncentrací nezměňuje. Je zde také patrný rozdíl délek kořene u rostlin kultivovaných v D a na BL u ekotypu *Ler* v nulové koncentraci inhibitoru. Světlo mělo stimulační vliv na růst kořene. Délka kořene na BL v průměru dosahovala 29,1 mm, na RL 26,1 mm. Délka kořene rostlin rostoucích ve tmě byla 23,2 mm. U mutantního genotypu *cry1-1* nebyla pozorována výrazná změna délky kořenů v závislosti na kvalitě světla v nulové koncentraci  $\text{HgCl}_2$ . U rostlin byla průměrná délka etiolizovaného kořene 16,1 mm, na RL 18,2 mm a na BL 18,3 mm.



**Obr. 8:** Graf závislosti délky kořene ekotypu *Ler* (A) a od něj odvozeného mutantu *cry1-1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky kořene vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Z grafu (Obr. 9) je patrné, že již při nízké koncentraci inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  dochází k vysoké inhibici růstu kořenů u kontrolní (*Ler*) i mutantní (*cry1-1*) rostliny *Arabidopsis thaliana*. Od koncentrace  $5 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  se přestává inhibice délky kořenů zvětšovat se zvyšující se koncentrací inhibitoru a je při všech světelných podmínkách (D, BL i RL) relativně srovnatelná. Z obrázku (Obr. 9) je rovněž zřejmé, že inhibice růstu kořene byla na BL a RL při nižších koncentracích inhibitoru znatelně nižší než ve tmě. Toto bylo pozorováno

především u ekotypu *Ler*. U mutanta *cry1-1* byl vliv světla na citlivost kořenů k  $\text{HgCl}_2$  méně výrazný.



**Obr. 9:** Graf závislosti procentuální inhibice kořene ekotypu *Ler* a od něj odvozeného mutanta *cry1-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek kořene  $\pm$  SE a získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

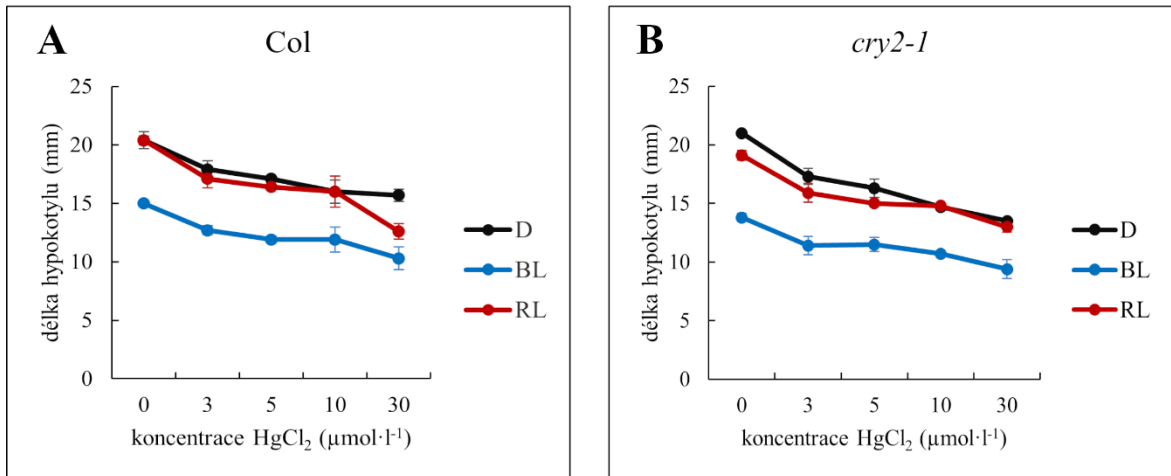
## 5.2 Mutant *cry2-1* a kontrolní genotyp Col

U rostlin Col a *cry2-1* byl použit inhibitor  $\text{HgCl}_2$  v koncentracích 0/3/5/10/30  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření hypokotylu a kořene probíhalo vždy v rámci jednoho experimentu.

### 5.2.1 Elongace hypokotylu

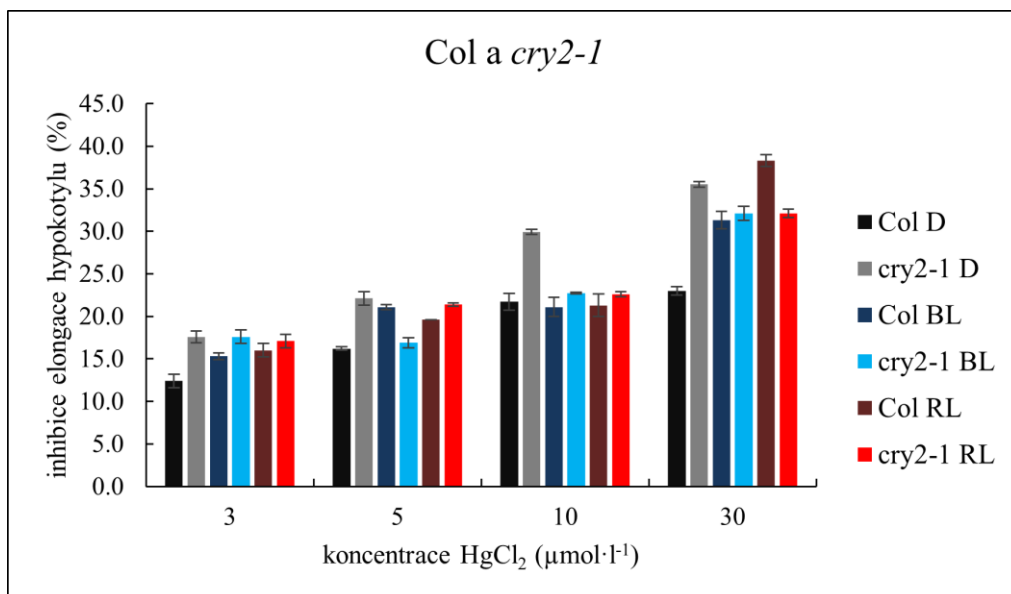
Z grafu (Obr. 10) je patrné, že délky hypokotylů rostliny *Arabidopsis thaliana* u kontrolního genotypu Col i u mutanta *cry2-1* se zmenšují se zvyšující se koncentrací inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ . Také je z obrázku patrný inhibiční účinek BL na délku hypokotylů u obou sledovaných genotypů. U mutantního genotypu *cry2-1* byla průměrná délka u rostlin kultivovaných při nulové koncentraci  $\text{HgCl}_2$  na BL 13,8 mm, zatímco na RL 19,1 mm a v D 21,0 mm.

U kontrolního genotypu Col byla situace podobná, rostliny rostoucí na BL měly hypokotyl dlouhý 15,0 mm, na RL 20,4 mm a v D také 20,4 mm.



**Obr. 10:** Graf závislosti délky hypokotylu ekotypu Col (A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky hypokotylu vnesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

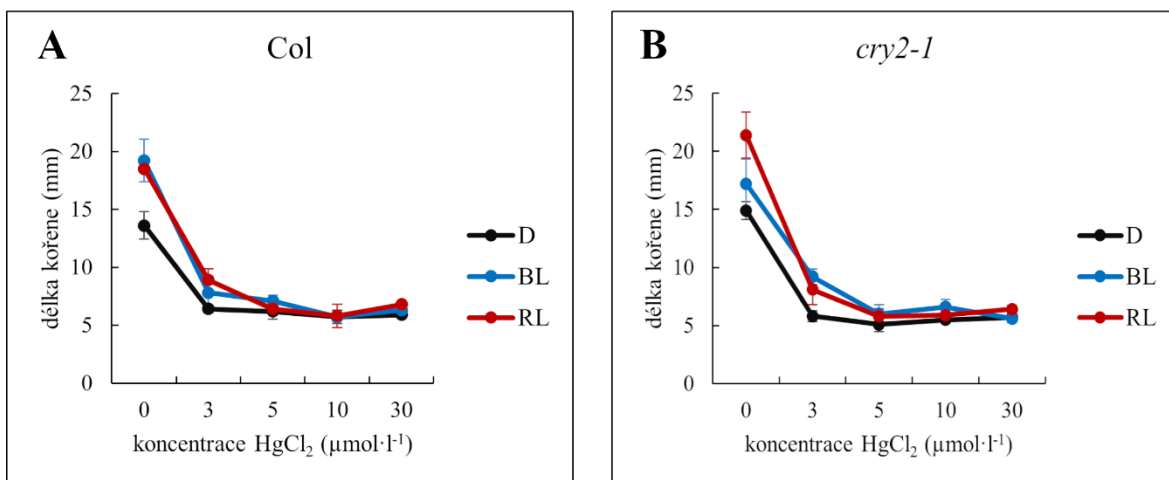
Z grafu (Obr.11) vyplývá, že se zvyšující se koncentrací HgCl<sub>2</sub> se také zvyšovala inhibice délky hypokotylů u kontrolní (Col) i mutantní (*cry2-1*) rostliny. Není zde patrný výrazný vliv světla na inhibici růstu hypokotylu. U *cry2-1* i Col jsou inhibice srovnatelné při všech koncentracích u rostlin kultivovaných na RL a BL. U rostlin kultivovaných v D došlo u mutantní rostliny *cry2-1* k vyšší inhibici než u kontrolní Col při všech použitých koncentracích HgCl<sub>2</sub>. Nejvýraznější rozdíl byl při koncentraci 30 μmol·l<sup>-1</sup>, kdy byla u kontrolního genotypu Col zaznamenána inhibice 23,0 % a u *cry2-1* 35,5 %.



**Obr. 11:** Graf závislosti procentuální inhibice hypokotyly ekotypu Col a od něj odvozeného mutanta *cry2-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (D, BL, RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek hypokotyly ± SE a získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

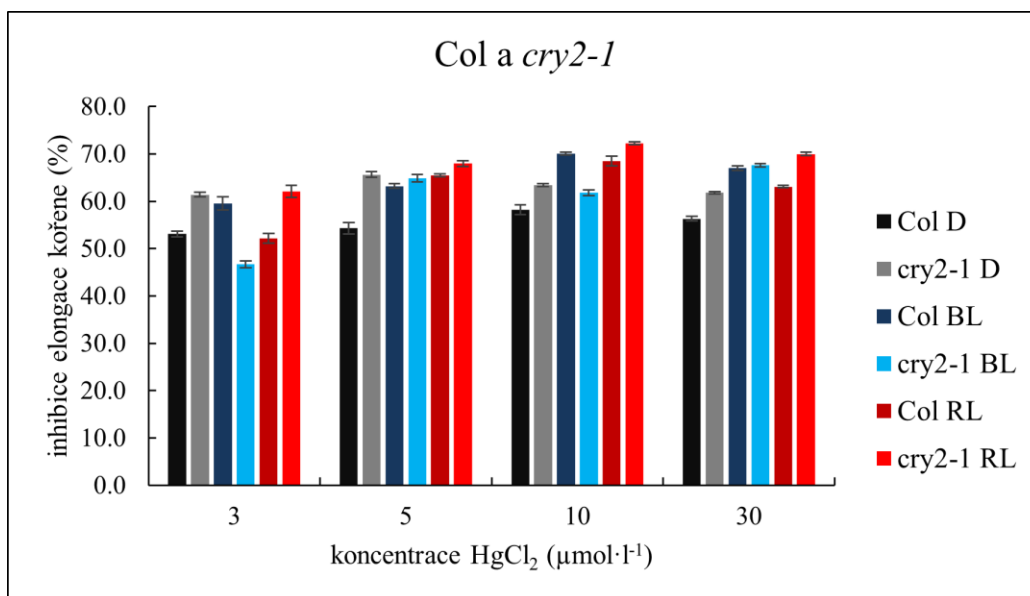
### 5.2.2 Elongace kořene

V grafu (Obr. 12) je zřejmý rozdíl délek kořene u kontrolního Col i mutantního *cry2-1* genotypu mezi rostlinami kultivovanými za přítomnosti inhibitoru a bez přítomnosti inhibitoru HgCl<sub>2</sub>. Při všech světelných podmínkách zůstává délka kořenů Col i *cry2-1* od koncentrace inhibitoru 5 µmol·l<sup>-1</sup> zhruba stejná a dále se nezvyšuje. Dále je zde patrný stimulační účinek BL a RL na délku kořene v nulové koncentraci inhibitoru oproti tmě u genotypu Col, kdy délka kořene rostlin rostoucí v D dosahovala 13,6 mm, u rostlin kultivovaných na BL byla délka kořene 19,2 mm a rostliny na RL měly kořen dlouhý 18,5 mm. U mutanta *cry2-1* byl rozdíl mezi délkami kořenů rostlin rostoucích v D a na BL při nulové koncentraci inhibitoru o něco menší. Délka kořene u rostlin kultivovaných v D byla 14,9 mm a na BL 17,2 mm. Kořeny rostlin rostoucích na RL bez přidání HgCl<sub>2</sub> byly nejdelší s délkou 21,4 mm.



**Obr. 12:** Graf závislosti délky kořene ekotypu Col (A) a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky kořene vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Z grafu (Obr. 13) vyplývá, že již při nízké koncentraci inhibitoru HgCl<sub>2</sub> dochází k velké inhibici elongace kořenů jak u rostlin Col, tak u *cry2-1*. Tato inhibice je podobná při všech testovaných koncentracích HgCl<sub>2</sub> a není zde ani patrný velký rozdíl mezi kontrolním (Col) a mutantním (*cry2-1*) genotypem v různých světelných podmínkách.



**Obr. 13:** Graf závislosti procentuální inhibice kořene ekotypu Col a od něj odvozeného mutantu *cry2-1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek kořene ± SE a získané ze tří nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

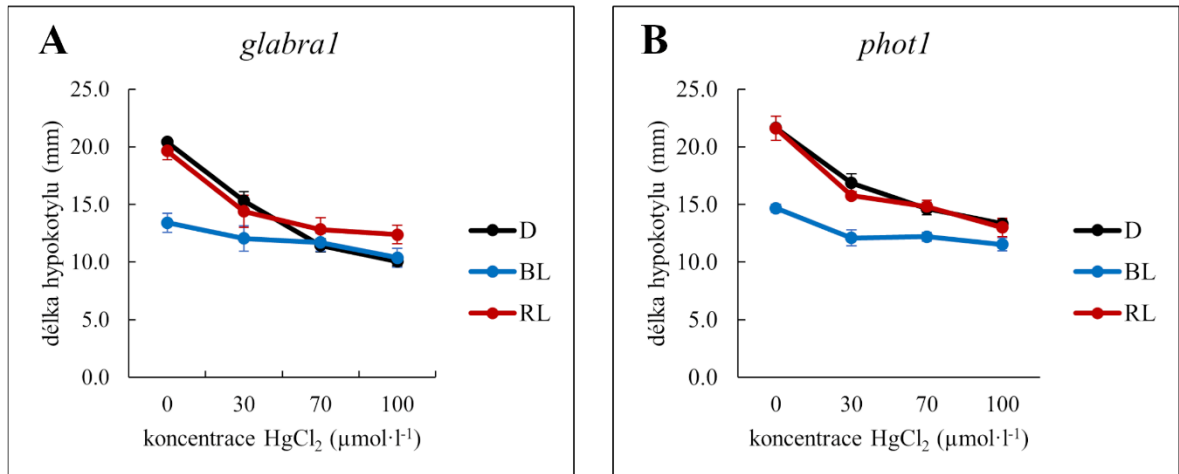


### 5.3 Mutant *phot1* a kontrolní genotyp *glabra1*

U rostlin *glabra1* a *phot1* byl použit inhibitor  $\text{HgCl}_2$  v koncentracích 0/30/70/100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Měření hypokotylu a kořene probíhalo vždy v rámci jednoho experimentu.

#### 5.3.1 Elongace hypokotylu

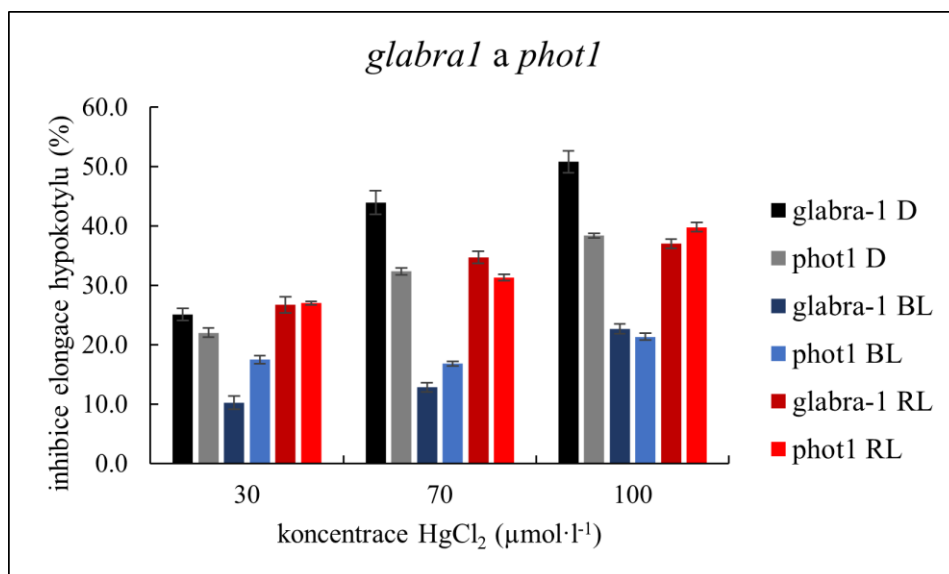
V grafu (Obr. 14) je vidět, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  se zkracuje délka hypokotylu u genotypu *glabra1* i *phot1*. Také je zde u obou genotypů patrné, že při nulové koncentraci  $\text{HgCl}_2$  rostliny kultivované na BL mají výrazně kratší hypokotyly než rostliny kultivované na RL nebo v D. U kontrolní rostliny *glabra1* byla průměrná délka hypokotylu rostliny kultivované na BL bez inhibitoru 13,8 mm, na RL 20,1 mm a v D 20,7 mm. U mutantu *phot1* dosahoval hypokotyl rostliny kultivované na BL v nulové koncentraci inhibitoru 14,7 mm, zatímco rostliny kultivované na RL a v D měly hypokotyly shodně 21,6 mm dlouhé.



**Obr. 14:** Graf závislosti délky hypokotylu ekotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (D, BL, RL). Délky hypokotylu vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří (v případě *phot1*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Graf (Obr. 15) pak ukazuje, že inhibice elongace hypokotylu u kontrolního genotypu *glabra1* i mutantního genotypu *phot1* se zvyšuje s rostoucí koncentrací použitého inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  ve všech světelných podmínkách (D, BL, RL). Dále je zde patrný rozdíl inhibice elongace hypokotylů u obou genotypů v závislosti na kvalitě světla. Rostliny kultivované na

BL měly při všech použitých koncentracích inhibitoru menší inhibici elongace hypokotylů než rostliny kultivované na RL a v D. U nejvyšší použité koncentrace  $\text{HgCl}_2$  ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) byla inhibice elongace hypokotylů rostlin rostoucích na BL u genotypu *glabra1* i *phot1* okolo 20 %, zatímco rostliny kultivované na RL a v D měly inhibici okolo 40 % až 50 %. Mezi kontrolním a mutantním genotypem pak žádný výrazný rozdíl v inhibici růstu hypokotylu ztelný není. Pouze etiolizované hypokotyly *gl-1* byly mírně tolerantnější k inhibičnímu účinku  $\text{HgCl}_2$ .

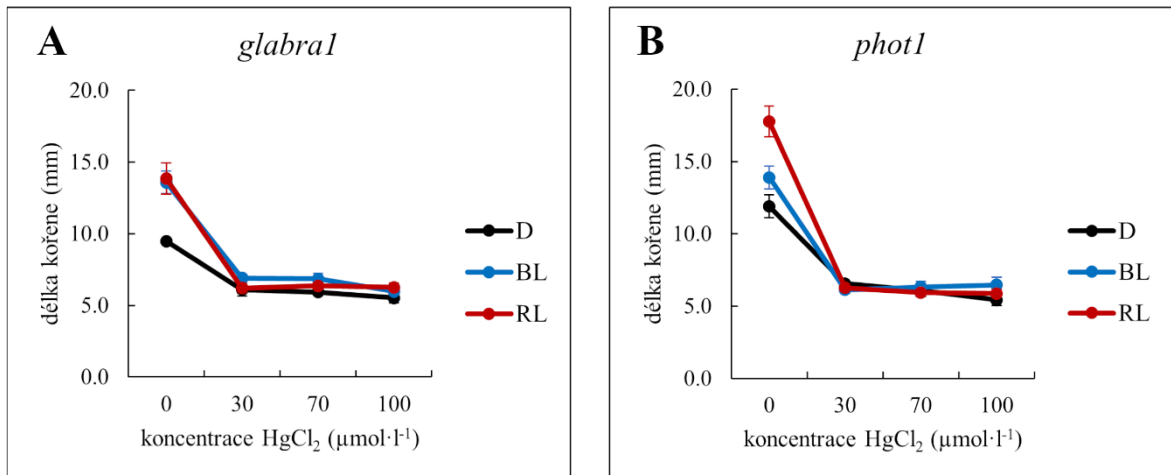


**Obr. 15:** Graf závislosti procentuální inhibice elongace hypokotylu kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek hypokotylu  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot1*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

### 5.3.2 Elongace kořene

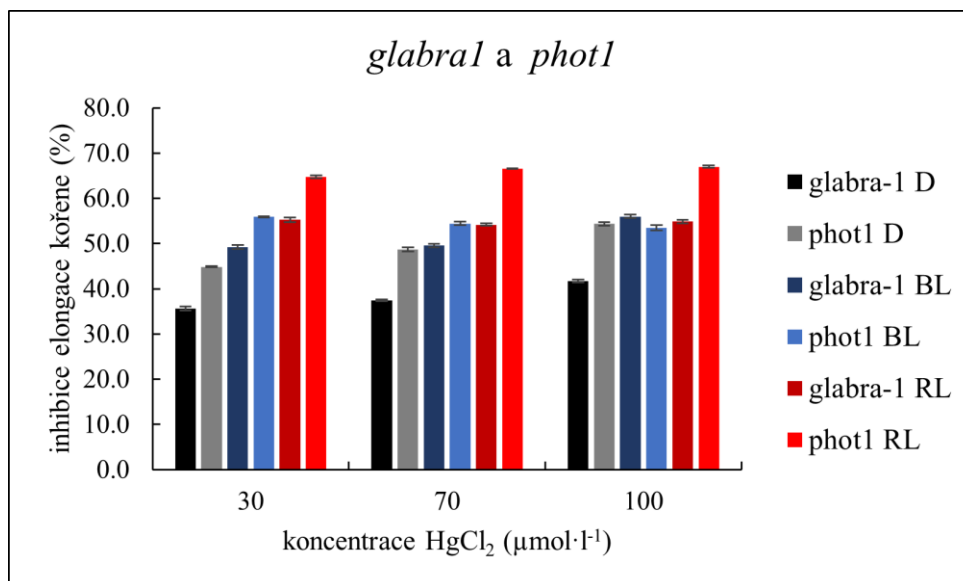
V grafu (Obr. 16) lze pozorovat silnou inhibici elongace kořene kontrolního genotypu *glabra1* i mutantu *phot1* již při nejnižší použité koncentraci ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ , a to za všech světelných podmínek (BL, RL, D). Délka kořene se při následných vyšších koncentracích  $\text{HgCl}_2$  již nijak výrazně nemění. U genotypu *glabra1* pozorujeme menší délku kořene při nulové koncentraci inhibitoru u rostliny kultivované v D oproti rostlinám rostoucím na BL nebo RL, kdy v D byla délka kořene 9,5 mm, na BL 12,9 mm a na RL 14,1 mm. U mutantu *phot1* nebyl rozdíl délek kořenů rostlin kultivovaných bez přítomnosti inhibitoru na BL a v D tak ztelný. Rostliny rostoucí v D měly v průměru kořen délky 11,9

mm a na BL 13,9 mm. Nejdelší pak byl kořen rostlin kultivovaných na RL a to 17,8 mm.



**Obr. 16:** Graf závislosti délky kořene ekotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot1* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky kořene vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE a získané ze tří (v případě *phot1*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Z grafu (Obr. 17) jsou patrné vysoké inhibice kořenů u kontrolní (*glabra1*) i mutantní (*phot1*) rostliny při všech použitých koncentracích HgCl<sub>2</sub>. Tyto inhibice se se zvyšující se koncentrací použitého inhibitoru již nijak významně nemění. Inhibice délky kořene ve všech koncentracích inhibitoru u kontrolního genotypu *glabra1* jsou vyšší při kultivaci na BL a RL oproti D. U *phot1* je pozorována vyšší inhibice pouze na RL oproti BL a D. U kontrolního genotypu (*glabra1*) je při kultivaci v D pozorována o něco nižší inhibice než u mutantní (*phot1*) rostliny. Dále je zde patrná lehce vyšší inhibice mutantu *phot1* oproti kontrolní rostlině *glabra1* při kultivaci na RL při všech použitých koncentracích inhibitoru.



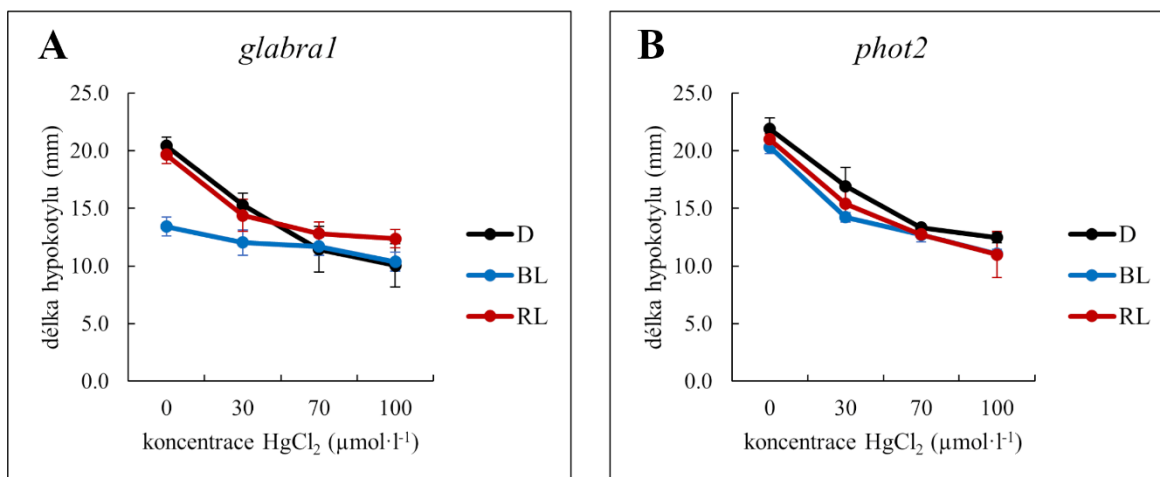
**Obr. 17:** Graf závislosti procentuální inhibice elongace kořene kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot1* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (D, BL, RL). Hodnoty inhibice vnesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek kořene  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot1*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

#### 5.4 Mutant *phot2* a kontrolní genotyp *glabra1*

U rostlin *glabra1* a *phot2* byly použity koncentrace 0/30/70/100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ . Měření hypokotylu a kořene probíhalo vždy v rámci jednoho experimentu.

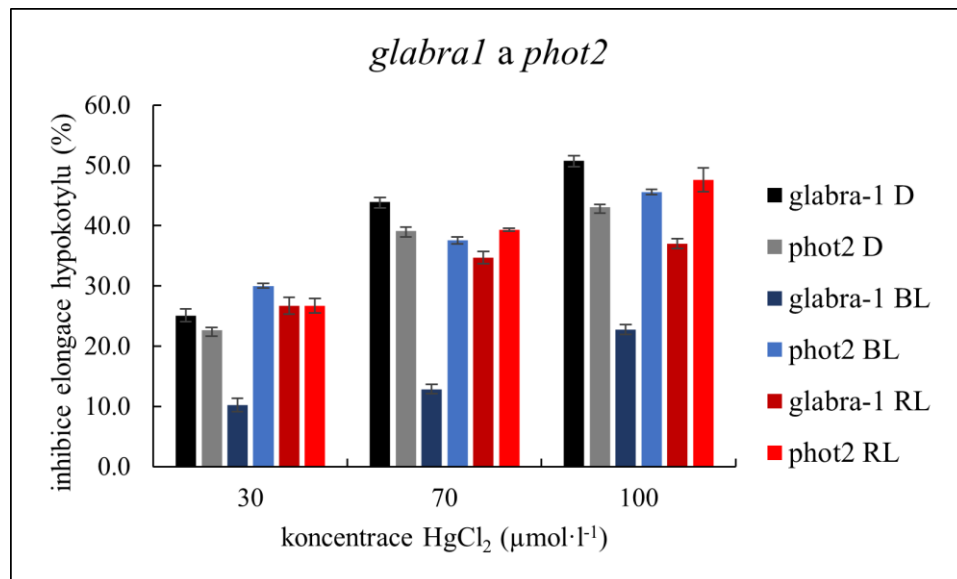
##### 5.4.1 Elongace hypokotylu

V grafu (Obr. 18) jsou znatelné rozdíly délek hypokotylů u obou genotypů v závislosti na koncentraci použitého inhibitoru. Se zvyšující se koncentrací  $\text{HgCl}_2$  se délka hypokotylů zmenšuje u rostlin rostoucích ve všech světelných podmínkách (BL, RL i D). U kontrolního genotypu *glabra1* je patrná inhibice délky hypokotylu vlivem BL v nulové koncentraci inhibitoru (viz výše). U mutantního genotypu *phot2* takovýto trend pozorován nebyl. Rostliny kultivované na BL v nulové koncentraci inhibitoru měly hypokotyl délky 20,3 mm, na RL 21,0 mm a v D 21,9 mm.



**Obr. 18:** Graf závislosti délky hypocotylu kontrolního genotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot2* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky hypocotylu vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

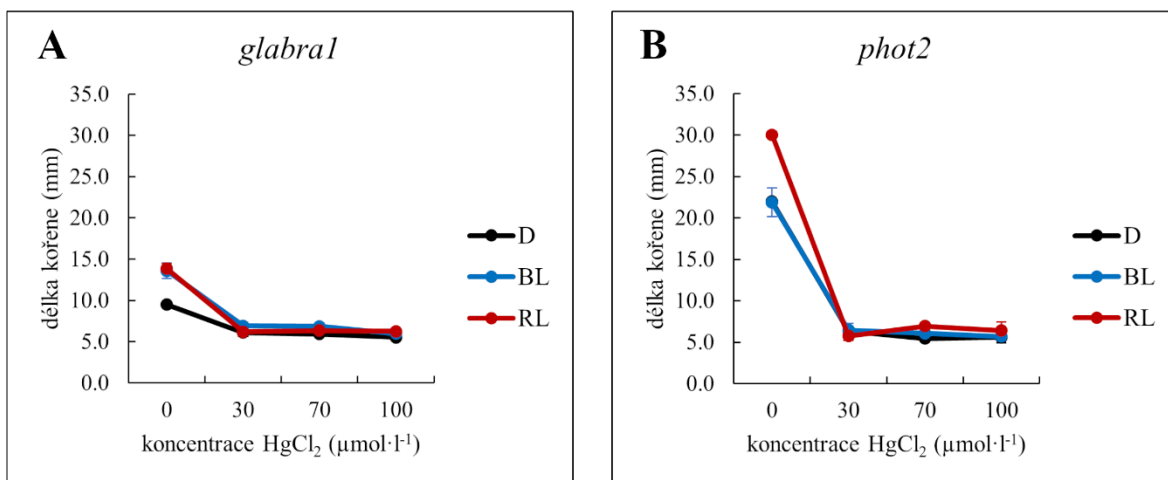
Z grafu (Obr. 19) vyplývá, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru se i zvyšuje inhibice elongace hypocotylu u kontrolního i mutantního genotypu za všech světelných podmínek (BL, RL i D). U kontrolního genotypu *glabra1* je patrné snížení v inhibici růstu hypocotylu u rostlin kultivovaných na BL oproti rostlinám kultivovanými na RL nebo v D (viz výše). Hypocotylы genotypu *phot2* vykazují oproti kontrolním rostlinám (*glabra1*) výrazně vyšší míru inhibice u rostlin rostoucích na BL při všech použitých koncentracích inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  (30/70/100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). U koncentrace 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$   $\text{HgCl}_2$  byla inhibice hypocotylu rostliny *phot2* 30,0 %, zatímco *glabra1* vykazovala inhibici 10,2 %. U koncentrace 70  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  to bylo u *phot2* 37,5 % a hypocotyl kontrolního genotypu *glabra1* byl inhibován z 12,8 %. Při nejvyšší použité koncentraci inhibitoru (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) inhiboval  $\text{HgCl}_2$  elongaci hypocotylu mutantu *phot2* z 45,6 % oproti kontrolním 22,7 % genotypu *glabra1*. U hypocotylů rostlin *phot2* kultivovaných v jiných světelných podmínkách (RL a D), za přítomnosti  $\text{HgCl}_2$  v různých koncentracích, nebyl pozorován výrazný rozdíl mezi inhibicí jejich elongace oproti kontrolním rostlinám.



**Obr. 19:** Graf závislosti procentuální inhibice elongace hypokotylu kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot2* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek hypokotylu  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

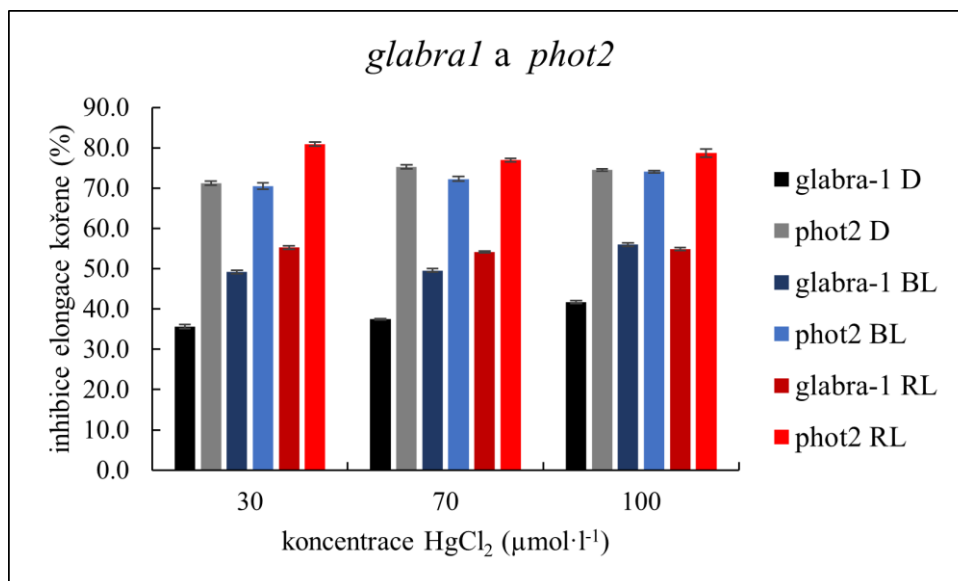
#### 5.4.2 Elongace kořene

V grafu (Obr. 20) lze pozorovat vysokou míru inhibice elongace kořene u kontrolního genotypu (*glabra1*) (viz výše) i u mutantu *phot2* už za použití nejnižší testované koncentrace inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) za všech světelných podmínek (BL, RL, D). Délka kořene se u mutantu *phot2* od této koncentrace se zvyšující se koncentrací inhibitoru již dále téměř neměnila. U mutantního genotypu *phot2* byly kořeny rostlin kultivovaných při nulové koncentraci inhibitoru na RL (30,0 mm) o něco delší, než u rostlin kultivovaných na BL (21,9 mm) nebo v D (22,0 mm).



**Obr. 20:** Graf závislosti délky kořene kontrolního genotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot2* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky kořene vnesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE a získané ze tří (v případě *phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Z grafu (Obr. 21) je patrné, že k vysokým procentuálním inhibicím elongace kořene dochází u obou genotypů (*glabra1* (viz výše) i *phot2*) za všech světelných podmínek již při nízké (30 μmol·l<sup>-1</sup>) koncentraci HgCl<sub>2</sub>. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru se u jednotlivých světelných podmínek (BL, RL, D) již inhibice u mutantu *phot2* téměř nemění. U kontrolního genotypu *glabra1* lze vidět vliv světla na inhibici délky kořene. Inhibice je při všech koncentracích inhibitoru vyšší na RL a BL oproti D. Naproti tomu, u mutantu *phot2* není vliv kvality světla na inhibici patrný. Dále je zde možné pozorovat vyšší inhibici elongace kořene mutantu *phot2* za všech světelných podmínek (BL, RL, D) oproti kontrolnímu genotypu *glabra1*. Při nejvyšší použité koncentraci (100 μmol·l<sup>-1</sup>) je inhibice elongace kořene u rostlin kultivovaných v D u mutantu *phot2* 74,5 %, u kontrolního genotypu *glabra1* 41,7 %. Rostliny *phot2* kultivované na RL měly elongaci kořene inhibovanou ze 78,7 % oproti kořenům kontrolního genotypu *glabra1*, které měly inhibici elongace 54,9 %. Na BL při nejvyšší použité koncentraci inhibitoru byla inhibice u kořenů genotypu *phot2* 74,1 %, zatímco u genotypu *glabra1* tomu bylo 56,0 %.



Obr. 21: Graf závislosti procentuální inhibice elongace kořene kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot2* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek kořene  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

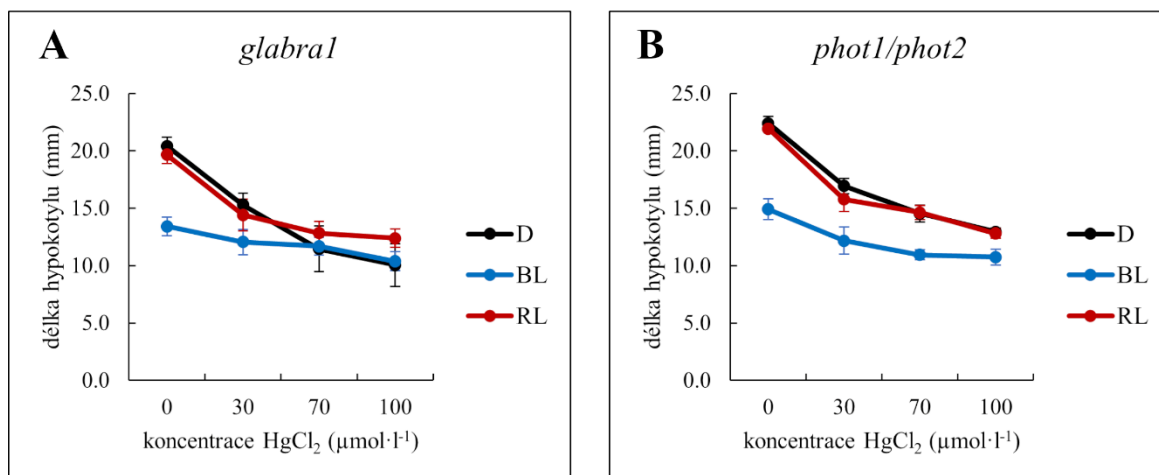
## 5.5 Mutant *phot1/phot2* a kontrolní genotyp *glabra1*

U rostlin *glabra1* a dvojitého mutantu *phot1/phot2* byly použity koncentrace 0/30/70/100  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ . Měření hypokotyly a kořene probíhalo vždy v rámci jednoho experimentu.

### 5.5.1 Elongace hypokotyly

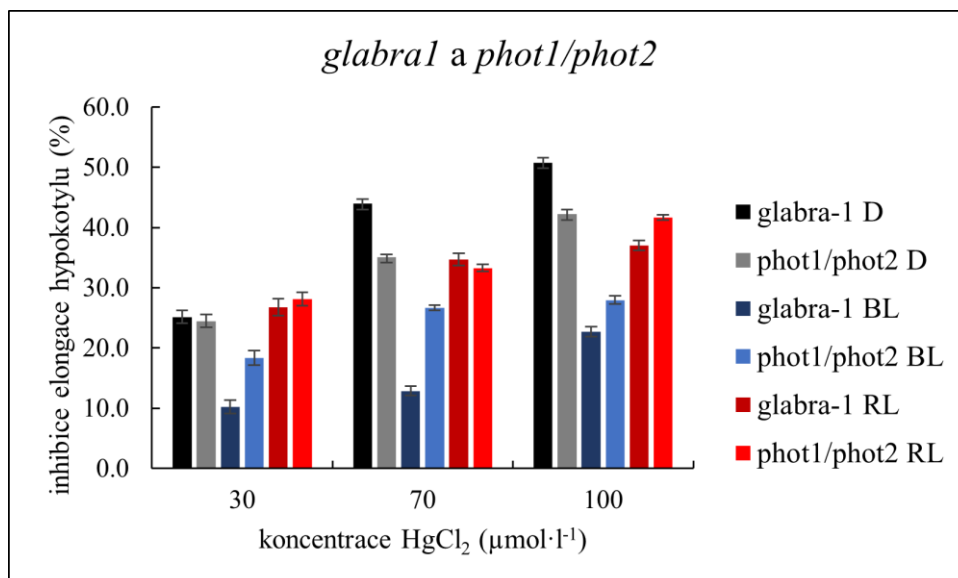
Z grafu (Obr. 22) je vidět, že se zkracuje délka hypokotyly se zvyšující se koncentrací inhibitoru  $\text{HgCl}_2$ , jak u kontrolního genotypu *glabra1* (viz výše), tak i u dvojitého mutantu *phot1/phot2*. Při nulové koncentraci inhibitoru je u obou genotypů patrný inhibiční vliv BL na délku hypokotyly. Hypokotyl zde dosahoval průměrné délky 14,9 mm, u RL tomu bylo 21,9 mm a v D 22,4 mm.





**Obr. 22:** Graf závislosti délky hypokotylu ekotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot1/phot2* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky hypokotylu vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE a získané ze tří (v případě *phot1/phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

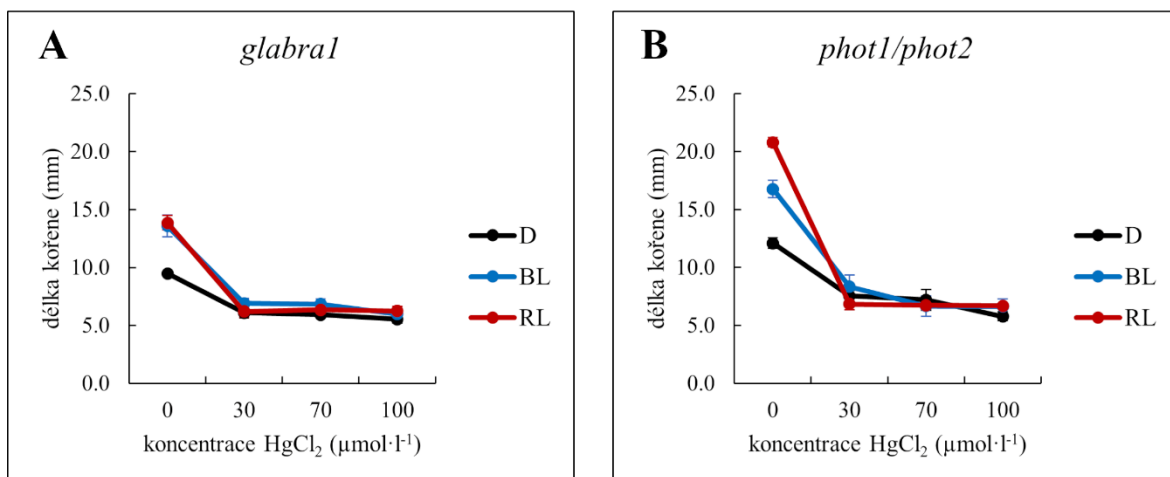
Graf (Obr. 23) zobrazuje zvyšující se inhibici elongace hypokotylu u mutantu *phot1/phot2* a jeho kontrolního genotypu *glabra1* (viz výše) v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru HgCl<sub>2</sub> za všech světelných podmínek (BL, RL, D). U rostlin mutantního genotypu *phot1/phot2* kultivovaných na BL lze pozorovat lehký pokles inhibice oproti rostlinám kultivovaným na RL nebo v D. Při koncentraci 100 μmol·l<sup>-1</sup> byla inhibice hypokotylů rostlin rostoucích v D nebo RL okolo 40 %, u rostlin kultivovaných na BL tomu bylo necelých 30 %. Na BL je vidět patrný rozdíl mezi mutantem a kontrolním genotypem v inhibici růstu hypokotylu při koncentraci inhibitoru 70 μmol·l<sup>-1</sup>. U kontrolního genotypu *glabra1* dosahovala v tomto případě inhibice hodnoty 12,8 % a u mutantu *phot1/phot2* 26,6 %. Při ostatních koncentracích nebyl rozdíl inhibice elongace hypokotylu tak výrazný.



**Obr. 23:** Graf závislosti procentuální inhibice elongace hypokotylu kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot1/phot2* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek hypokotylu  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot1/phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

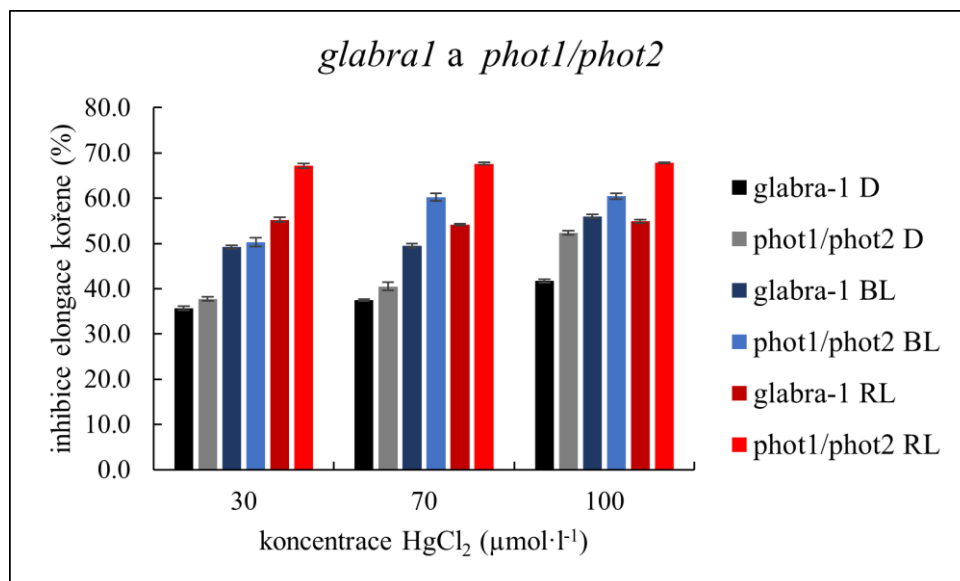
### 5.5.2 Elongace kořene

V grafu (Obr. 24) lze pozorovat, že již při nejnižší použité koncentraci ( $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  dochází za všech světelných podmínek (BL, RL, D) k vysoké inhibici elongace kořene u obou zobrazených genotypů (*glabra1* (viz výše), *phot1/phot2*). U mutantu *phot1/phot2* pak délka kořene se zvyšující se koncentrací zůstává téměř neměnná. Kořeny rostlin mutantu *phot1/phot2* kultivovaných v D při nulové koncentraci inhibitoru byly o něco kratší než na BL. Dosahovaly délky 12,1 mm, zatímco kořeny rostlin kultivovaných v BL byly v průměru dlouhé 16,8 mm. Rostliny rostoucí v RL bez přítomnosti  $\text{HgCl}_2$  měly kořeny nejdelší, a to 20,8 mm.



**Obr. 24:** Graf závislosti délky kořene ekotypu *glabra1* (A) a od něj odvozeného mutantu *phot1/phot2* (B) rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Délky kořene vynesené do grafu jsou průměrné hodnoty ± SE a získané ze tří (v případě *phot1/phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

Z grafu (Obr. 25) vyplývá, že již při nejnižší použité koncentraci inhibitoru HgCl<sub>2</sub> (30 μmol·l<sup>-1</sup>) dochází u obou genotypů k vysoké inhibici elongace kořene za všech světelných podmínek (BL, RL, D). U obou genotypů se inhibice už dále se zvyšující se koncentrací inhibitoru téměř nemění u všech světelných podmínek (D, RL, BL). Je zde však vidět vliv světla na inhibici. Inhibice délky kořene byla vyšší u obou genotypů u rostlin kultivovaných na RL i BL oproti D. V grafu je vidět malý rozdíl v inhibici mezi kontrolním a mutantním genotypem u rostlin kultivovaných na RL. Délka kořene mutantu *phot1/phot2* byla inhibována o něco více než u rostliny *glabra1* ve všech použitých koncentracích HgCl<sub>2</sub>.



**Obr. 25:** Graf závislosti procentuální inhibice elongace kořene kontrolního genotypu *glabra1* a od něj odvozeného mutantu *phot1/phot2* rostliny *Arabidopsis thaliana* na koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL). Hodnoty inhibice vynesené do grafu jsou vypočítané z průměrných délek kořene  $\pm$  SE a získané ze tří (v případě *phot1/phot2*) a čtyř (v případě *glabra1*) nezávislých experimentů po sedmi dnech kultivace.

## 6 Diskuze

Světlo je důležitý faktor prostředí, který ovlivňuje růst a vývoj rostliny (Qi et al., 2022). Jeho modrá složka ovlivňuje fotomorfogenezi, fototropismus, otevírání a zavírání průduchů a další (Huché-Thélier et al., 2016; Shao et al., 2020). Rostliny vnímají BL skrze fotoreceptory, mezi které patří fototropiny, kryptochromy a fotoreceptory skupiny ZTL/FKF1/LKP2 (Huché-Thélier et al., 2016). Existuje několik důkazů, kdy mělo BL vliv i na expresi akvaporinů (Kaldenhoff et al., 1996; Liang et al., 2013; Balarynová and Fellner, 2019). Tento jev však není zatím dalece prostudován. Akvaporiny jsou důležité transmembránové proteiny, které slouží pro transport vody a některých malých nenabitých molekul skrze membrány (Agre, 2004). Předložená bakalářská práce se věnuje možnému vlivu BL na regulaci akvaporinů a úloze fototropinů a kryptochromů v tomto procesu. Experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro* za přítomnosti inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$ . Zkoumána byla elongace hypokotylů a kořenů fotomorfogenních mutantů rostliny *Arabidopsis thaliana cry1-1*, *cry2-1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2*, kteří byli kultivováni v různých světelných podmínkách (BL, RL a D).

Je známo, že sloučeniny rtuti reagují s volnými sulfanovými skupinami v cysteinu, který je přítomný v akvaporinech a tím inhibují tyto kanály (Agre, 2004). Inhibiční účinek  $\text{HgCl}_2$  na akvaporiny byl potvrzen u všech fotomorfogenních mutantů i jejich kontrolních genotypů rostliny *Arabidopsis thaliana*, které byly v této bakalářské práci testovány. Rostliny kultivované při nulové koncentraci inhibitoru měly delší hypokotyl i kořen než rostliny kultivované v přítomnosti  $\text{HgCl}_2$ . U hypokotylů se inhibice zvyšovala s rostoucí koncentrací inhibitoru u všech zkoumaných genotypů. U kořene docházelo k vysoké inhibici elongace již při nízkých koncentracích a tato inhibice se poté již nezvyšovala a s rostoucí koncentrací  $\text{HgCl}_2$  zůstávala téměř neměnná. Výsledky ukazují, že akvaporiny jsou pozitivně zapojeny v růstu hypokotylu i kořene. Výsledky rovněž naznačují vyšší citlivost kořenů k tomuto inhibitoru oproti hypokotylu.

Při studiu růstu hypokotylu mutantního genotypu *cry1-1* a jeho kontrolního genotypu *Ler* při nulové koncentraci  $\text{HgCl}_2$  bylo zjištěno, že BL mělo u genotypu *Ler* inhibiční vliv na délku hypokotylu. Délka hypokotylu rostlin kultivovaných na BL byla menší oproti rostlinám rostoucím ve tmě. U mutantního *cry1-1* genotypu tento jev pozorován nebyl, rostliny rostoucí na BL měly srovnatelnou délku hypokotylu s rostlinami rostoucími ve tmě. Tento výsledek potvrzuje již známý fakt, že se fotoreceptor Cry1 jako hlavní podílí na

inhibici prodlužování hypokotylu způsobené modrým světlem (Ohgishi et al., 2004). Podobných výsledků bylo dosaženo s mutantem *phot2*. Mutantní rostliny *phot2* měly na BL srovnatelnou délku hypokotylu jako rostliny pěstované v D, zatímco u kontrolního genotypu *glabra1* byly hypokotyly na BL kratší oproti D. Tyto výsledky jsou tedy v rozporu s dřívějšími zjištěními, že se Phot2 nepodílí na inhibici prodlužování hypokotylu vlivem BL (Ohgishi et al., 2004). U dvojitého mutanta *phot1/phot2* však tento jev pozorován nebyl, což odpovídá tomu, že se fototropiny Phot1 a Phot2 se ve své funkci vzájemně ovlivňují, a že hrají na inhibici prodlužování hypokotylu vlivem modrého světla pouze vedlejší úlohu (Ohgishi et al., 2004). Dosud známou funkcí fototropinů ve fotomorfogenních odpovědích je funkce Phot1 v počáteční rychlé inhibici růstu hypokotylu vlivem modrého světla (Fankhauser and Stainger, 2002). Tento jev jsme však v našich experimentech zachytit nemohli, protože jsme studovali dlouhodobý vliv modrého světla na růst hypokotylu.

Kořeny rostlin genotypu *Ler* byly při kultivaci na BL o poznání delší než kořeny rostlin kultivovaných ve tmě. Je zde tedy patrný stimulační vliv světla na elongaci kořene. Oproti tomu mutant *cry1-1* takovýchto výsledků nedosahoval. Světlo nemělo vliv na délku kořene a kořen měl ve všech studovaných podmínkách (D, BL, RL) srovnatelnou délku. Je známo, že rostliny s defektem ve fotoreceptoru Cry1 vykazují snížené prodlužování kořene na BL (Canamero et al., 2006). Zatímco u ekotypu *glabra1* byly kořeny rostlin kultivovaných na BL i RL delší než etiolizované kořeny, u mutantů *phot1* a *phot2* byl pozorován stimulační efekt na délku kořenů spíše jen RL. Toto by mohlo naznačovat, že Phot1 a Phot2 se podílejí na stimulaci prodlužování kořene vlivem BL. Toto je v rozporu s dřívějšími zjištěními, že se fototropiny tohoto procesu neúčastní (Canamero et al., 2006). U dvojitého mutanta však stimulační efekt elongace kořene byl pozorován jak na RL, tak na BL. Toto zjištění naznačuje, že při vypnutí funkce obou fotoreceptorů Phot1 a Phot2 přebírají funkci obou fotoreceptorů v procesu stimulace růstu kořene jiné fotoreceptory. Tento výsledek tak může potvrzovat již dříve známé zjištění (Canamero et al., 2006).

Výsledky studia inhibice elongace hypokotylu mutanta *cry1-1* a jeho kontrolního genotypu *Ler* neukázaly žádný výrazný vliv světla na úroveň inhibice vyvolanou  $HgCl_2$ . Inhibice byla srovnatelná ve všech studovaných světelných podmínkách (D, BL, RL). Nebyl zde ani pozorovaný rozdíl mezi kontrolním genotypem *Ler* a mutantem *cry1-1*. Stejných výsledků bylo dosaženo při studiu inhibice elongace kořene těchto dvou genotypů. Inhibice nebyla závislá na kvalitě světla u obou genotypů a nebyl zde ani patrný rozdíl mezi

kontrolním a mutantním genotypem. Výsledky tedy naznačují, že u hypokotylu a kořene genotypu *Ler* nemá světlo výrazný vliv na regulaci aktivity aquaporinů.

Inhibice růstu hypokotylu mutantu *cry2-1* a ekotypu Col neukázala žádnou spojitost mezi kvalitou světla a inhibicí vyvolanou HgCl<sub>2</sub>. Inhibice růstu hypokotylů u obou genotypů byly relativně srovnatelné při všech světelných podmínkách (D, BL, RL). Dále zde nebyl pozorován žádný výrazný rozdíl mezi Col a *cry2-1* v citlivosti k HgCl<sub>2</sub>. Stejně tomu bylo při studiu inhibice elongace kořene u těchto dvou genotypů. Nebyl zde pozorován významný vliv světla na inhibici a ani zde nebyl patrný rozdíl mezi kontrolním genotypem Col a mutantem *cry2-1*. Výsledky tedy naznačují, že u genotypu Col, světlo nemá pravděpodobně výrazný vliv na regulaci aktivity aquaporinů.

Výsledky studia růstových reakcí hypokotylu a kořene kontrolních genotypů *Ler* a Col a mutantů *cry1-1* a *cry2-1* vlivem HgCl<sub>2</sub> ukázaly, že BL (a ani RL) neovlivňuje citlivost hypokotylů a kořenů k HgCl<sub>2</sub>. Tyto výsledky naznačují absenci vlivu světla na aktivitu akvaporinů. V minulosti byl pak sledován pouze vliv modrého světla na indukci exprese akvaporin-kódujícího genu *AthH2* (Kaldenhoff et al., 1996). Bylo by tedy zajímavé analyzovat expresi vybraných akvaporinů v našich experimentálních rostlinách a za našich experimentálních podmínek.

Studium inhibice elongace hypokotylu inhibitorem HgCl<sub>2</sub> u genotypu *glabra1* a *phot1* ukázalo, že BL výrazně snižovalo inhibiční účinek HgCl<sub>2</sub> na růst ve srovnání s inhibičním účinkem HgCl<sub>2</sub> u rostlin kultivovaných na RL nebo D. Z výsledků však nebyl současně patrný žádný rozdíl mezi mutantním (*phot1*) a kontrolním (*glabra1*) genotypem. Tyto výsledky naznačují spojitost mezi BL a regulací akvaporinů. V dřívějších studiích již byl prokázán vliv BL na regulaci exprese genů pro akvaporiny u rostliny *Arabidopsis thaliana* (Kaldenhoff et al., 1996). Tyto výsledky však také ukazují, že vliv BL na snížení citlivosti hypokotylů k HgCl<sub>2</sub> není pravděpodobně zprostředkován fotoreceptorem Phot1.

Výsledky inhibice prodlužování kořene u mutantu *phot1* a kontrolního genotypu *glabra1* ukázaly vliv světla na inhibici způsobenou HgCl<sub>2</sub>. U kontrolního genotypu *glabra1* byla inhibice růstu kořene vlivem inhibitoru vyšší u rostlin kultivovaných na BL a RL oproti inhibici pozorované v D. U mutantu pak byla vidět vyšší inhibice na RL při všech koncentracích a na BL u koncentrací 30 a 70 μmol l<sup>-1</sup> oproti D. Mutant pak vykazoval lehce vyšší citlivost k HgCl<sub>2</sub> na RL oproti kontrolnímu genotypu *glabra-1* ve všech studovaných koncentracích. Výsledky tedy mohou naznačovat vliv světla na aktivitu akvaporinů

v kořenech. Protože avšak dochází k vysokým inhibicím již při nízkých koncentracích inhibitoru, je obtížné pozorovat jakýkoli trend v inhibici.

Jak bylo zmíněno, u kontrolního genotypu *glabra1* BL výrazně snižovalo inhibiční účinek  $\text{HgCl}_2$  na růst hypokotylu. Tento jev však nebyl pozorován u mutanta *phot2*, kde úroveň inhibice prodloužení hypokotylu vlivem  $\text{HgCl}_2$  byla podobná ve D, BL i RL. Výsledky tedy naznačují, že světlo snižuje citlivost hypokotylů vlivem  $\text{HgCl}_2$  prostřednictvím fotoreceptoru Phot2.

U genotypu *glabra1* BL i RL zvyšovalo úroveň inhibice růstu kořene vlivem  $\text{HgCl}_2$ . Tento jev však nebyl pozorován i u mutanta *phot2*. Současně však *phot2* vykazoval výrazně vyšší inhibici růstu kořene vlivem  $\text{HgCl}_2$  než *glabra1*, a to za všech testovaných světelných podmínek. To ukazuje, že mutace v genu *PHOT2* zvyšuje citlivost kořene k  $\text{HgCl}_2$  nezávisle na světle, tedy na tom, zda je fotoreceptor Phot2 aktivován či nikoliv. Tento výsledek vede k závěru, že funkční fotoreceptor Phot2 pravděpodobně redukuje citlivost akvaporinů k  $\text{HgCl}_2$ .

U mutanta *phot1/phot2* BL, podobně jako u kontrolního genotypu *glabra1*, snižovalo inhibiční účinek  $\text{HgCl}_2$  na růst hypokotylu. Současně, hypokotylы mutanta *phot1/phot2* vykazovaly podobnou citlivost k  $\text{HgCl}_2$  jako hypokotylы *glabra1*, a to za všech světelných podmínek. Výsledky tedy naznačují, že regulace akvaporinů prostřednictvím BL přes fotoreceptor Phot2 může být podřízena vlivu fotoreceptoru Phot1.

Studium inhibice elongace kořene dvojitého mutanta *phot1/phot2* vlivem  $\text{HgCl}_2$  ukázalo podobný účinek inhibitoru na růst jako u kontrolního genotypu *glabra1*. Toto opět naznačuje, že vliv Phot2 na citlivost kořenů vůči inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  je pravděpodobně podřízen vlivu fotoreceptoru Phot1.

Studium inhibice kořenů není zcela jednoznačné, jelikož docházelo k vysokým inhibicím již při nízkých koncentracích inhibitoru, a tudíž bylo obtížné sledovat jakýkoli trend v inhibici prodloužení kořene. Výsledky s mutantem *phot2* však naznačily, že mutace v genu *PHOT2* může zvyšovat citlivost kořene k inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$ , a to nezávisle na světelných podmínkách. K potvrzení tohoto jevu by však bylo nutné provést další experimenty například s nižšími koncentracemi  $\text{HgCl}_2$ . U sledování inhibice hypokotylu byly výsledky o něco jasnější a byla pozorována spojitost mezi fotoreceptorem Phot2 a regulací akvaporinů specificky na BL. Výsledky s mutantem *phot1/phot2* však naznačili i spojitost této reakce s fotoreceptorem Phot1. V nedávné době bylo zjištěno, že mezi funkce fototropinů patří i ovlivnění proudění vody v listu (Grunwald et al., 2022). Tato bakalářská



práce tedy naznačuje, že by se fototropiny mohly podílet i na další části transportu vody v rostlině, a to regulací vodních kanálů – akvaporinů. Aktivace fototropinů může vést ke změně v transkripci genů kódujících akvaporiny, kdy je transkripce indukována. Také může docházet ke změně propustnosti kanálů tak, že aktivací fototropinů je tato propustnost stimulována. K plnému porozumění mechanismu však bude potřeba dalších studií jako například studium transkripce genů pro některé akvaporiny u fotomorfogenních *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* mutantů rostliny *Arabidopsis thaliana* v závislosti na světle a koncentraci inhibitoru HgCl<sub>2</sub>. Získané závěry by se daly také podpořit tím, že by byly podobným způsobem analyzovány mutantní rostliny naopak se zvýšenou funkcí fototropinů.

## 7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit možný vliv modrého světla na regulaci akvaporinů prostřednictvím fototropinových a kryptochromových signálních drah u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Byly sledovány růstové reakce fotomorfogenních mutantů v prostředí inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> ve zvolených koncentracích v podmínkách modrého světla (BL), červeného světla (RL) a tmy (D). Experimenty probíhaly na mutantech *cry1-1* (odvozený od genotypu Landsberg *erecta*), *cry2-1* (odvozený od genotypu Columbia), *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* (všechny odvozené od genotypu *glabra1*).

Výsledky předložené bakalářské práce ukazují, že akvaporiny jsou pozitivně zapojeny v procesu růstu hypokotylu i kořene rostliny *Arabidopsis thaliana*. Také bylo zjištěno, že kořeny jsou daleko citlivější k inhibitoru HgCl<sub>2</sub> než hypokotyl rostliny.

U genotypů *Ler* a *Col* světlo pravděpodobně nemá významný vliv na regulaci akvaporinů, zatímco u genotypu *glabra-1* modré světlo snižuje citlivost hypokotylů k inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub>. Dále je z výsledků patrné, že snížení citlivosti hypokotylů k HgCl<sub>2</sub> vlivem modrého světla není pravděpodobně zprostředkováno fotoreceptorem Phot1. Fotoreceptor, který pravděpodobně ovlivňuje tento proces je fotoreceptor Phot2.

Z výsledků dále vyplývá, že citlivost akvaporinů v kořeni je ovlivněna fotoreceptorem Phot2 nezávisle na světelných podmínkách, tedy nezávisle na tom, zda je receptor aktivován či nikoli. Studium dvojitého mutantu *phot1/phot2* pak naznačilo, že tato regulace akvaporinů je u kořenů i hypokotylů ovlivněna i fotoreceptorem Phot1, což naznačuje pravděpodobně epistatický účinek Phot1 nad Phot2.

## 8 Seznam zkratek

AGB1	<i>Arabidopsis</i> heterotrimeric G-protein $\beta$ -submit; $\beta$ -podjednotka G-proteinu u <i>Arabidopsis</i>
BL	blue light; modré světlo
CCE	CRY C-terminal extension; C-terminální doména kryptochromu
Col	Columbia
COP1	constitutive photomorphogenesis 1 protein; základní protein fotomorfogeneze 1
CRY	cryptochrome; kryptochrom
D	dark; tma
DAS	DQXVP-acidic STAES
ER	endoplasmatické retikulum
FAD	flavinadenindinukleotid
FAR	far-red-impaired response
FHY	far-red elongated hypocotyls
FMN	flavinmononukleotid
GAF	cGMP-specific phosphodiesterases, adenylyl cyclases, FhlA
LAF	long after far-red
Ler	Landsberg <i>erecta</i>
LOV	light-oxygen-voltage; světlem, kyslíkem, napětím regulovaná doména
MS	Murashige and Skoog médium
MTHF	methenyltetrahydrofolát

NIP	Nodulin26-like intrinsic proteins; akvaporiny podobné nodulinu26
Nod-26	nodulin26
NPA	Asparagin, Prolin, Alanin
PAS	per (period circadian protein)-arnr (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator protein)-sim (single-minded protein)
P <sub>FR</sub>	aktivní forma fytochromu
PHOT	phototropin; fototropin
PHR	photolyase homology region; fotolyázový homologní region
PHY	phytochrom; fytochrom
PIP	plasma membrane intrinsic proteins; vnitřní membránové proteiny
P <sub>R</sub>	neaktivní forma fytochromu
RL	red light; červené světlo
SIP	small basic intrinsic proteins; malé základní vnitřní proteiny
SPA	suppressor of phytochrome A; supresor fytochromu A
TIP	tonoplast intrinsic proteins; vnitřní proteiny tonoplastu
UV	ultra violet; ultrafialové záření
XIP	uncharacterized intrinsic proteins; netypické vnitřní proteiny
ZTL/FKF1/LKP2	zeitlupe/flavin-binding, Kelch repeat, F-box 1/LOV Kelch protein 2

## 9 Literatura

- Agre, P. (2004). Aquaporin water channels (nobel lecture). *Angewandte Chemie International Edition*, 43, 4278-4290
- Ahmad, M., & Cashmore, A. R. (1993). HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature*, 366, 162–166
- Ahmed, S., Kouser, S., Asgher, M., & Gandhi, S. G. (2021). Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia Plantarum*, 172, 1089-1105
- Arsovski, A. A., Galstyan, A., Guseman, J. M., & Nemhauser, J. L. (2012). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 10, e0147-e0177
- Balarynová, J., Danihlík, J., & Fellner, M. (2018). Changes in plasma membrane aquaporin gene expression under osmotic stress and blue light in tomato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 27-27
- Balarynova, J., & Fellner, M. (2019). Expression of genes encoding PIP aquaporins in tomato seeds exposed to blue radiation and mercury. *Biologia plantarum*, 63, 1-10
- Banerjee, R., & Batschauer, A. (2005). Plant blue-light receptors. *Planta*, 220, 498-502
- Ben Baaziz, K., Lopez, D., Rabot, A., Combes, D., Gousset, A., Bouzid, S., Cochard, H., Sakr, S., & Venisse, J. -S. (2012). Light-mediated  $K_{leaf}$  induction and contribution of both the PIP1s and PIP2s aquaporins in five tree species: walnut (*Juglans regia*) case study: walnut (*Juglans regia*) case study. *Tree Physiology*, 32, 423-434
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, 7, 204-210
- Canamero, R. C., Bakrim, N., Bouly, J. -P., Garay, A., Dudkin, E. E., Habricot, Y., & Ahmad, M. (2006). Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. *Planta*, 224, 995-1003
- Cao, S., He, S., Lv, H., Zhang, J., Aslam, M., Cheng, H., Hu, A., Cao, G., Zhang, X., Yu, Y., & Qin, Y. (2020). Genome-wide analysis of the cryptochrome gene family in plants. *Tropical Plant Biology*, 13, 117-126

- Carlson, K. D., Bhogale, S., Anderson, D., Tomanek, L., & Madlung, A. (2019). Phytochrome A regulates carbon flux in dark grown tomato seedlings. *Frontiers in Plant Science*, 10, 152-152
- Curticăpean, M. C. (2019). Plant aquaporins. *Acta Biologica Marisiensis*, 2, 36-48
- Ding, L., Uehlein, N., Kaldenhoff, R., Guo, S., Zhu, Y., & Kai, L. (2019). Aquaporin PIP2;1 affects water transport and root growth in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiology and Biochemistry*, 139, 152-160
- Feke, A., Vanderwall, M., Liu, W., & Gendron, J. M. (2021). Functional domain studies uncover novel roles for the ZTL Kelch repeat domain in clock function. *PLOS ONE*, 16, e0235938-e0235938
- Frankhauser, C. & Stainger, D. (2002) Photoreceptors in *Arabidopsis thaliana*: light perception, signal transduction and entrainment of the endogenous clock. *Planta*, 216, 1–16
- Gomes, D., Agasse, A., Thiébaud, P., Delrot, S., Gerós, H., & Chaumont, F. (2009). Aquaporins are multifunctional water and solute transporters highly divergent in living organisms, *Biochimica et biophysica acta*, 1788, 1213-1228
- Grunwald, Y., Gosa, S. C., Torne-Srivastava, T., Moran, N., & Moshelion, M. (2022). Out of the blue: Phototropins of the leaf vascular bundle sheath mediate the regulation of leaf hydraulic conductance by blue light: Phototropins of the leaf vascular bundle sheath mediate the regulation of leaf hydraulic conductance by blue light. *The Plant Cell*, 34, 2328-2342
- Hachez, C., Besserer, A., Chevalier, A. S., & Chaumont, F. (2013). Insights into plant plasma membrane aquaporin trafficking, *Trends in Plant Science*, 18, 344-352
- Hart, J. E., & Gardner, K. H. (2021). Lighting the way: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors: Recent insights into the structure and regulation of phototropin blue light receptors. *Journal of Biological Chemistry*, 296, 100594-100594
- Holm, L. M., Jahn, T. P., Møller, A. L. B., Schjoerring, J. K., Ferri, D., Klaerke, D. A., & Zeuthen, T. (2005). NH<sub>3</sub> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> permeability in aquaporin-expressing *Xenopus* oocytes. *Pflügers Archiv-European Journal of Physiology*, 450, 415-428

- Huché-Théliér, L., Crespel, L., Gourrierec, J. L., Morel, P., Sakr, S., & Leduc, N. (2016). Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 22-38
- Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R., & Chrispeels, M. J. (2000). Plasma membrane intrinsic proteins from maize cluster in two sequence subgroups with differential aquaporin activity. *Plant Physiology*, 122, 1025-1034
- Cheng, M. C., Kathare, P. K., Paik, I., & Huq, E. (2021). Phytochrome signaling networks. *Annual Review of Plant Biology*, 72, 217-244
- 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, 952-954
- Johanson, U., Karlsson, M., Johansson, I., Gustavsson, S., Sjövall, S., Fraysse, L., Weig, A. R., & Kjellbom, P. (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in arabidopsis provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiology*, 126, 1358-1369
- Jones, M. A., Feeney, K. A., Kelly, S. M., & Christie, J. M. (2007). Mutational analysis of phototropin 1 provides insights into the mechanism underlying LOV2 signal transmission. *Journal of Biological Chemistry*, 282, 6405-6414
- Josse, E. M., & Halliday, K. J. (2008). Skotomorphogenesis: the dark side of light signalling. *Current Biology*, 18, R1144-R1146
- Kaldenhoff, R., & Fischer, M. (2006). Functional aquaporin diversity in plants. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1758, 1134-1141
- Kaldenhoff, R., & Fischer, M. (2006). Aquaporins in plants. *Acta Physiologica*, 187, 169-176
- Kaldenhoff, R., Kölling, A., & Richter, G. (1996). Regulation of the Arabidopsis thaliana aquaporin gene AthH2 (PIP1b). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 36, 351-354
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 29-66

- Kapilan, R., Vaziri, M., & Zwiazek, J. J. (2018). Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research*, 51, 4-4
- Khajah, M. A., & Luqmani, Y. A. (2016). Role of aquaporins in breast cancer progression and Metastasis. *Tumor Metastasis*, 60-83
- Klose, C., Nagy, F., & Schäfer, E. (2020). Thermal reversion of plant phytochromes. *Molecular Plant*, 13, 386-397
- Koornneef, M., Rolff, E., & Spruit, C. J. P. (1980). Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*, 100, 147-160
- Kruse, E., Uehlein, N., & Kaldenhoff, R. (2006). The aquaporins. *Genome Biology*, 7, 206-206
- Kruusvee, V., Toft, A. M., Aguida, B., Ahmad, M., & Wenkel, S. (2022). Stop CRYing! Inhibition of cryptochrome function by small proteins. *Biochemical Society Transactions*, 50, 773-782
- Łabuz, J., Sztatelman, O., Banaś, A. K., & Gabryś, H. (2012). The expression of phototropins in *Arabidopsis* leaves: developmental and light regulation: developmental and light regulation. *Journal of Experimental Botany*, 63, 1763-1771
- Liang, W. -hong, Li, L., Zhang, F., Liu, Y. -xia, Li, M. -mi, Shi, H. -hao, Li, H., Shang, F., Lou, C., Lin, Q. -ting, Li, J. -jia, & Yang, X. -guang. (2013). Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of OsAQP, a rice aquaporin gene. *Plant Growth Regulation*, 69, 21-27
- Liao, X., Liu, W., Yang, H. -Q., & Jenkins, G. I. (2020). A dynamic model of UVR8 photoreceptor signalling in UV-B-acclimated *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 227, 857-866
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book*, 9, e0148-e0148
- Lin C., Ahmad M., Chan. J., & Cashmore, A. R. (1996) The electronic plant register. *Plant Physiology*, 110, 1047-1047
- Lin, C., & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology*, 6, 220-220



- Liscum, E., & Briggs, W. R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *Plant Cell*, 7, 473–485
- Liu, B., Yang, Z., Gomez, A., Liu, B., Lin, C., & Oka, Y. (2016). Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 129, 137-148
- Lorenz, A., Kaldenhoff, R., & Hertel, R. (2003). A major integral protein of the plant plasma membrane binds flavin. *Protoplasma*, 221, 19-30
- Maurel, C. (2007). Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties. *FEBS Letters*, 581, 2227-2236
- Mishra, S., & Khurana, J. P. (2017). Emerging roles and new paradigms in signaling mechanisms of plant cryptochromes. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 36, 89-115
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497
- Nemhauser, J., & Chory, J. (2002). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 1, e0054-e0054
- Ohgishi, M., Saji, K., Okada, K., & Sakai, T. (2004). Functional analysis of each blue light receptor, cry1, cry2, phot1, and phot2, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101, 2223-2228
- Paik, I., & Huq, E. (2019). Plant photoreceptors: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks: Multi-functional sensory proteins and their signaling networks. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 92, 114-121
- Palayam, M., Ganapathy, J., Guercio, A. M., Tal, L., Deck, S. L., & Shabek, N. (2021). Structural insights into photoactivation of plant Cryptochrome-2. *Communications Biology*, 4, 28-28
- Podolec, R., Lau, K., Wagnon, T. B., Hothorn, M., & Ulm, R. (2021). A constitutively monomeric UVR8 photoreceptor confers enhanced UV-B photomorphogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 118, e2017284118-e2017284118
- Pudasaini, A., & Zoltowski, B. D. (2013). Zeittupe senses blue-light fluence to mediate circadian timing in *arabidopsis thaliana*. *Biochemistry*, 52, 7150-7158

- Qi, L., Shi, Y., Terzaghi, W., Yang, S., & Li, J. (2022). Integration of light and temperature signaling pathways in plants. *Journal of Integrative Plant Biology*, 64, 393–411
- Rockwell, N. C., & Lagarias, J. C. (2010). A brief history of phytochromes. *ChemPhysChem*, 11, 1172-1180
- Sandal, N. N., & Marcker, K. A. (1988). Soybean nodulin 26 is homologous to the major intrinsic protein of the bovine lens fiber membrane. *Nucleic Acids Research*, 16, 9347-9347
- Shao, K., Zhang, X., Li, X., Hao, Y., Huang, X., Ma, M., Zhang, M., Yu, F., Liu, H., & Zhang, P. (2020). The oligomeric structures of plant cryptochromes. *Nature Structural & Molecular Biology*, 27, 480-488
- Singh, R. K., Deshmukh, R., Muthamilarasan, M., Rani, R., & Prasad, M. (2020). Versatile roles of aquaporin in physiological processes and stress tolerance in plants. *Plant physiology and biochemistry*, 149, 178–189
- Suetsugu, N., & Wada, M. (2013). Evolution of three LOV blue light receptor families in green plants and photosynthetic stramenopiles: phototropin, ZTL/FKF1/LKP2 and aureochrome. *Plant and Cell Physiology*, 54, 8-23
- Wang, H., & Deng, X. W. (2004). Phytochrome signaling mechanism\*. *The Arabidopsis Book*, 3, e0074.1-e0074.1
- Wang, Q., & Lin, C. (2020). Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71, 103-129
- Westall, Frances & Brack, Andre. (2018). The importance of water for life. *Space Science Reviews*, 214, 50-50
- Wudick, M. M., Luu, D. -T., & Maurel, C. (2009). A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184, 289-302
- Yadav, A., Singh, D., Lingwan, M., Yadukrishnan, P., Masakapalli, S. K., & Datta, S. (2020). Light signaling and UV-B-mediated plant growth regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 1270-1292

Yaneff, A., Sigaut, L., Gómez, N., Aliaga Fandiño, C., Alleva, K., Pietrasanta, L. I., & Amodeo, G. (2016). Loop B serine of a plasma membrane aquaporin type PIP2 but not PIP1 plays a key role in pH sensing. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1858, 2778-2787

Zoltowski, B. D., & Imaizumi, T. (2014). Structure and function of the ZTL/FKF1/LKP2 group proteins in Arabidopsis. *The Enzymes*, 35, 213-239