

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Interakce fototropinových signálních drah a aniontových
kanálů ve vývoji a růstu rostlin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Anežka Vacková
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2022

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anežka Vacková
Název práce	Interakce fototropinových signálních drah a aniontových kanálů ve vývoji a růstu rostlin
Typ práce	bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, PhD.
Rok obhajoby práce	2022
Abstrakt	Hlavním cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály zapojeny v růstu a vývoji rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. a pokud ano, zda může být jejich aktivita ovlivňována světlem a prostřednictvím receptorů modrého světla, fototropinů. Teoretická část shrnuje dosavadní poznatky o fotomorfogenezi rostlin a fotoreceptorech, charakterizuje aniontové kanály a jejich inhibitory a popisuje vliv světla na aniontové kanály. V experimentální části byl použit genetický přístup, který spočíval v charakterizaci růstu fotomorfogenních mutantů <i>phot1</i> , <i>phot2</i> a <i>phot1/2</i> v přítomnosti kyseliny niplumové (NIF), inhibitoru aniontových kanálů. V podmínkách <i>in vitro</i> byl během experimentů sledován účinek vybraných koncentrací NIF v kultivačním médiu na růst rostlin a vývoj rostlin, a to v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo). Výsledky experimentů naznačují, že aniontové kanály pozitivně ovlivňují růst rostliny a jejich aktivita může být regulována světlem prostřednictvím fotoreceptorů PHOT1 a/nebo PHOT2.
Klíčová slova	aniontové kanály, <i>Arabidopsis</i> , fotomorfogeneze, fototropiny, hypokotyl, kořen, kyselina niplumová, růst, světlo
Počet stran	41
Počet příloh	0
Jazyk	český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Anežka Vacková
Title of thesis	Interaction of phototropin signaling pathways and anion channels in plant development and growth
Type of thesis	bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, PhD.
The year of presentation	2022
Abstract	<p>The main aim of this bachelor thesis was to investigate whether anion channels are involved in the growth and development of <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh. plants and if so, whether their activity can be influenced by light and through blue light receptors, phototropins. The theoretical part summarizes the current knowledge on plant photomorphogenesis and photoreceptors, characterizes anion channels and their inhibitors, and describes the effect of light on anion channels. In the experimental part, a genetic approach was used to characterize the growth of <i>phot1</i>, <i>phot2</i> and <i>phot1/2</i> photomorphogenic mutants in the presence of niflumic acid (NIF), an anion channel inhibitor. Under <i>in vitro</i> conditions, the effect of selected concentrations of NIF in the culture medium on plant growth and development was monitored during experiments under light conditions (dark, blue and red light). The results of experiments suggest that anion channels are positively involved in plant growth and their activity can be regulated via photoreceptors PHOT1 and/or PHOT2.</p>
Key words	anion channels, <i>Arabidopsis</i> , growth, hypocotyl, light, niflumic acid, photomorphogenesis, phototropins, root
Number of pages	41
Number of appendices	0
Language	Czech

Já, níže podepsaná studentka, tímto čestně prohlašuji, že jsem tuto práci vypracovala samostatně a veškeré použité zdroje jsou řádně citovány a uvedeny v seznamu citované literatury.

V Olomouci dne

Anežka Vacková

Poděkování

Mé poděkování náleží především mému vedoucímu panu prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, PhD., který mě po celou dobu tvorby bakalářské práce odborně vedl, pomáhal mi, uděloval mi cenné rady a byl mi expertním průvodcem v průběhu experimentů. Děkuji mu také za vstřícnost, ochotu a inspiraci během psaní této práce. Děkuji pracovní skupině molekulární fyziologie, technickým laborantkám Tereze Miksteinové a Tereze Trávníčkové za praktickou pomoc při práci v laboratoři.

OSNOVA

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE	7
2 TEORETICKÁ ČÁST	9
2.1 Fotomorfogeneze.....	9
2.1.1 Fotoreceptory.....	9
2.1.1.1 Kryptochromy	10
2.1.1.2 Fototropiny.....	11
2.1.1.3 Fytochromy	12
2.2 Aniontové kanály v rostlinách	13
2.2.1 Typy aniontových kanálů	14
2.2.1.1 CLC kanály	15
2.2.1.2 Další typy aniontových přenašečů	16
2.2.2 Vliv světla na aniontové kanály	18
2.3 Inhibitory aniontových kanálů	20
3 MATERIÁL A METODIKA.....	22
3.1 Rostlinný materiál	22
3.2 Metodika	22
3.2.1 Příprava kultivačního média MS	22
3.2.2 Sterilizace a výsev semen	22
3.2.3 Přenos klíčících semen	23
3.2.4 Měření kořene a hypokotylu.....	24
4 VÝSLEDKY	25
4.1 Vliv inhibitoru NIF na aniontové kanály v růstu rostlin.	25
4.1.1 Růst kořenů.....	25
4.1.2 Růst hypokotylu.....	28
5 DISKUZE	32
5.1 Vliv NIF-senzitivních aniontových kanálů na růst kořene.....	32
5.2 Vliv NIF-senzitivních aniontových kanálů na růst hypokotylu	33
6 ZÁVĚR	35
7 CITOVANÁ LITERATURA	36
ZKRATKY	41

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Rostliny tvoří nedílnou součást přírody a jejich role je na Zemi nenahraditelná. Nejenže produkují životně důležitý kyslík, zároveň mají také nezastupitelnou roli v potravním řetězci jako zdroj potravy a jejich široké využití v průmyslových a hospodářských odvětvích tvoří nepostradatelnou součást života člověka. Složité biochemické a fyziologické procesy odehrávající se v rostlinném těle jsou předmětem bádání vědců v posledních desetiletích.

Všechny procesy v rostlinném těle jsou ovlivňovány mimo jiné i transportními proteiny nacházejícími se v membránách rostlinných buněk. Mezi ně se řadí i iontové kanály, jejichž funkcí je transport kationtů a aniontů, jež jinak nemohou přes membrány samovolně procházet. Je zřejmé, že iontové kanály hrají nezastupitelnou roli ve vývoji a růstu rostlin. Pro studium funkce aniontových kanálů se využívají látky, které jsou schopny tyto kanály více či méně blokovat, inhibitory aniontových kanálů. Mezi ně patří například NIF, DIDS, 9-AC, NPPB a další, které se často používají jako léčiva v humánní medicíně. Klíčovou úlohu v životě rostliny hraje světlo. Ovlivňuje klíčení semen, růst hypokotylu a listů nebo syntézu chlorofylu. Percepce světelného signálu je umožněna skrze fotoreceptory – kryptochromy, fototropiny, fytochromy a další, které se liší výskytem, strukturou a především vlnovou délkou, kterou vnímají. Rostliny jsou díky nim schopné reagovat na měnící se světelné podmínky, a to jak na změnu vlnové délky, tak i na změnu intenzity a směru osvětlení nebo také na délku expozice.

Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky růstu rostlin vlivem světla, fotomorfogeneze a zapojení aniontových kanálů ve fotomorfogenezi rostlin. V experimentální části bylo cílem zjistit, zda jsou aniontové kanály citlivé k inhibitoru aniontových kanálů, kyselině niiflumové (NIF), zapojeny v růstu a vývoji rostlin a zda může být jejich funkce ovlivněna světlenými podmínkami. Kombinací genetického a farmakologického přístupu, konkrétně využitím fotomorfogenních mutantů *phot1*, *phot2*, *phot1/2* s mutací v genech pro fotoreceptory modrého světla – fototropiny a aplikací vybraných koncentrací NIF bylo zkoumáno zapojení aniontových kanálů ve vývoji a růstu rostlin a současně bylo studováno, jak je tento vztah ovlivněn světlenými podmínkami, ve kterých se rostlina nachází.

Tato bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie na pracovišti Laboratoře růstových regulátorů pod Univerzitou Palackého v Olomouci a Ústavem experimentální botaniky AV ČR.

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotomorfogeneze

Kapitola se zabývá popisem fotomorfogeneze a jejími hlavními charakteristikami, přibližuje pojem fotoreceptory, jejich rozdělení, charakteristiku a molekulární mechanismus fungování fotoreceptorů.

Rostliny jsou ovlivňovány prostředím, ve kterém se nacházejí. Důležitým faktorem působícím na jejich život je světlo, ke kterému jsou značně citlivé, a to především k viditelné oblasti spektra, která je definována vlnovými délkami od 380 nm do 700 nm a má vliv na mnoho různých vývojových a fyziologických aspektů rostlinného života, včetně klíčení a kvetení a v kontextu fotomorfogeneze působí i na růst rostlin (Christie, 2007). K vnímání viditelného světla mají rostliny uzpůsobeny receptory označované jako fotoreceptory (Nemhauser a Chory, 2002). Limitující množství světla vede rostlinu k etiolizovanému růstu neboli skotomorfogenezi, pro kterou je charakteristický dlouhý růst hypokotylu, malé nevyvinuté dělohy (kotyledony), zakrňelý kořenový systém a bílé nebo žluté zbarvení, jež je dáno minimálním obsahem chlorofylu (Nemhauser a Chory, 2002). Pokud je růst rostliny ovlivněn i nepatrným množstvím světla, dochází ke změně charakteru růstu rostliny, který se v tomto případě označuje jako fotomorfogeneze (Taiz a Zeiger, 2002). Fotomorfogeneze je nejpřesněji definovaná jako proces, při kterém světlo jako signál změni vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii. Pro rostlinu, která prošla fotomorfogenezí, jsou tedy typické velké široce otevřené kotyledony, krátký tlustý hypokotyl, bohatý kořenový systém a celkové zbarvení rostliny do zelené způsobené dostatečnou syntézou chlorofylu. Zároveň rostliny vynikají pod vlivem světla časnější produkcí pravých listů a květů (Nemhauser a Chory, 2002).

Následující kapitola se věnuje fotoreceptorům, jakožto stěžejním rostlinným molekulám vnímajícím světlo, a tedy umožňujícím fotomorfogenezi.

2.1.1 Fotoreceptory

Fotoreceptory jsou rostlinné molekuly bílkovinné povahy zodpovědné za vnímání světla a přenos světelného signálu na další molekuly. Rozdělují se podle reakčního rozsahu vlnových délek na dvě skupiny. Do první skupiny patří receptory reagující na červené a dlouhovlnné červené světlo (600-800 nm), které se nazývají fytochromy (PHY) a mají

široký vliv na fotomorfogenezi rostlin (Christie, 2007). Do další skupiny se řadí dva typy receptorů reagující na UV-A a modré světlo (320-500 nm). Spadají do ní kryptochromy (CRY) a fototropiny (PHOT). Kryptochromy mají vliv na fotomorfogenezi, naopak fototropiny jsou součástí světlem ovlivněných regulačních procesů, které hrají roli jak během optimalizace průběhu fotosyntézy, tak i v procesu růstu rostliny (Christie, 2007). Další skupina fotoreceptorů Zeitlupe (ZTL) je příbuzná fototropinům a reaguje na modré světlo. Do této skupiny byly zařazeny proteiny, které ovlivňují cílenou proteolýzu látek, které souvisí s cirkadiálním rytmem rostliny (Pudasaini a kol., 2017).

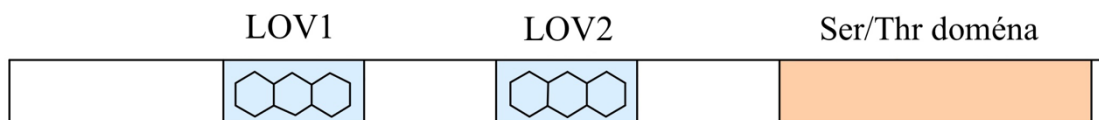
2.1.1.1 Kryptochromy

Kryptochromy jsou receptory modrého světla. Genomy většiny suchozemských rostlin kódují dva základní klady kryptochromů, CRY1 a CRY2, jejichž funkce se navzájem překrývají (Wang a Lin, 2020). Od roku 1993, kdy byl u *A. thaliana* identifikován první kryptochrom CRY1, byly tyto fotoreceptory nalezeny nejen v rostlinách, ale ve všech zkoumaných mnohobuněčných eukaryotních organismech (Lin a Shalitin, 2003). Na základě sekvenční analýzy můžou být kryptochromy rozděleny na tři skupiny: (1) rostlinné, (2) živočišné a (3) CRY-DASH (cryptochrome – *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, human) (Wang a Lin, 2020). Většina kryptochromů obsahuje doménu vázající chromofor, která sdílí podobnou strukturu s DNA fotolyasou, což je světlem aktivovaný enzym opravující DNA, a na karboxylovém konci se u mechorostů, kaprad'orostů a krytosemenných rostlin nachází konzervativní doména DAS (DQXVP-acidic-STAES) (Lin a Shalitin, 2003). Kryptochromy váží dva základní chromofory ve formě kofaktorů. Prvním je flavin adenin dinukleotid (FAD) a druhý je 5,10-methylentetrahydrofolát (MTHF) nazývaný také jako pterin (Lin a Todo, 2005). Různé mnohobuněčné eukaryotické organismy obsahují různý počet kryptochromů. V *A. thaliana* se nachází dva: CRY1 a CRY2. CRY1 je lokalizován jak v jádře, tak v cytoplazmě, naproti tomu CRY2 je výhradně jaderný protein. Primární způsob transdukce signálu kryptochromem je fotoresponzivní protein-protein interakce (Wang a Lin, 2020).

2.1.1.2 Fototropiny

Fototropiny jsou molekuly proteinové povahy řadící se mezi kinasy, které vnímají viditelné modré světlo o vlnových délkách od 320 do 500 nm (Christie, 2007). Název fototropin je odvozen od jeho základní funkce, kterou je ovlivnění růstu účinkem světla (Christie a kol., 1999). První fototropin byl izolován v roce 1997 (Briggs a Christie, 2002) z růstových částí hypokotylu hrachu rostoucího ve tmě, který se autofosforyloval působením modrého světla. Fototropiny jsou nejčastěji lokalizovány při plasmatické membráně v buňce, ale nejedná se o membránové proteiny, nýbrž jsou k membráně pouze vázány a mohou být vlivem různých faktorů uvolněny a lze je nalézt i v jiných částech buňky, např. v Golgiho aparátu nebo cytoplazmě (Sakamoto a Briggs, 2002; Kong a kol., 2013). Fototropiny ovlivňují otevírání průduchů, fototropismus, pohyb chloroplastů a inhibici délky hypokotylu (Christie, 2007).

Proteinová struktura fototropinu (Obr. 1) o velikosti 120 kDa může být rozdělena na dvě části: fotosenzorická doména na N-konci a serin/threoninová doména na C-konci. Detekce modrého světla je umožněna dvojicí LOV (light-oxygen-voltage) domén (LOV1 a LOV2), které jsou součástí fotosenzorické části, a které dokáží modré světlo absorbovat pomocí vazby dvou molekul oxidovaného flavin mononukleotidu (FMN), jež slouží jako chromofor, čímž dochází k fotoexcitaci a autofosforylaci fototropinu (Christie a kol., 1999).



Obr. 1: Struktura fototropinu (upraveno podle Christie, 2007)

V *A. thaliana* byly identifikovány dva druhy fototropinů (PHOT1 a PHOT2), jejichž funkce se překrývají a vzájemně doplňují (Briggs a Christie, 2002). Tyto fototropiny jsou kódovány geny *PHOT1* a *PHOT2*. Fototropin PHOT1 je citlivější ke světlu, pokud jde o fototropismus hypokotylu a aktivaci akumulárního pohybu chloroplastu než PHOT2, jehož funkce se naopak uplatňuje při vysoké intenzitě světla, kdy je výhradně zodpovědný za “únikový” pohyb chloroplastů, aby nedošlo k jejich poškození (Christie a kol., 2015). PHOT1 specificky ovlivňuje inhibici růstu hypokotylu po přenosu

etiolizovaného semene na světlo, destabilizaci transkriptu (Folta a Kaufman, 2003) a potlačuje laterální růst kořenů (Moni a kol., 2015).

2.1.1.3 Fytochromy

Fytochromy jsou proteinové pigmenty modré barvy s molekulovou hmotností okolo 125 kDa, které byly identifikovány v roce 1959. Tyto fotoreceptory jsou schopné absorbovat červené světlo (650-680 nm) a dlouhovlnné červené světlo (710-740 nm) a ovlivňují v rostlinách mnoho klíčových procesů. U krytosemenných rostlin fytochromy stimulují klíčení, tvorbu listových primordií a růst listů a v neposlední řadě také de-etiolizaci, která zahrnuje např. otevírání listů. Opačný vliv mají na prodlužování internodií a kvetení, které inhibují. Ve vyšších rostlin existuje několik druhů fytochromů, kódovaných geny *PHYA* až *PHYE* (Taiz a Zeiger, 2002).

Při zkoumání efektu červeného (RL – red light) a dlouhovlnného červeného světla (FRL – far-red light) na semena rostlin byly zjištěny rozdíly v klíčení, které vedly k potvrzení hypotézy, že fytochromy existují jako jeden pigment, který se mění z formy Pr absorbující RL na formu Pfr absorbující FRL, která je fyziologicky aktivní. Změna těchto vlastností není náhodná, ale reaguje právě na světelné podmínky. Ve tmě je syntetizován pigment absorbující RL, ale při působení světla dochází ke změně, kdy pigment absorbující FRL se stává dominantním (Taiz a Zeiger, 2002).

2.2 Aniontové kanály v rostlinách

Ve vývoji rostlin hraje transport látek jednu z nejdůležitějších rolí. Látky jsou v rostlině přepravovány ve formě roztoků, jejichž pohyb v těle rostliny je uskutečňován na velké vzdálenosti vodivými pletivy, ale neméně důležitou roli má i mezibuněčný a vnitrobuněčný transport látek, který je vykonáván skrze biologické membrány. Tyto membrány v rostlinných buňkách tvoří polopropustnou bariéru mezi dvěma prostředími, a to jak mezi vnitrobuněčným obsahem a buněčným okolím, tak i mezi jednotlivými kompartmenty buňky. Prostá difuze a osmóza patří do skupiny pasivního transportu a týká se vody a roztoků malých nenabitých molekul. Ionty a větší molekuly nemohou volně prostupovat membránou a pro tento pohyb potřebují specializované proteinové struktury zabudované ve fosfolipidové dvojvrstvě. Transportní membránové proteiny se dělí na pumpy, přenašeče a kanály. Pumpy umožňují transport látek proti elektrochemickému gradientu za spotřeby energie, a proto se tento jev označuje jako aktivní transport. Přenašeče a kanály energii nevyužívají, protože při přesunu iontů a molekul pracují s elektrochemickým gradientem. Tato bakalářská práce je zaměřena na specifickou skupinu membránových transportérů, které se nazývají aniontové kanály a následující kapitola se bude zabývat charakteristikou, typy a vlivem světla na jejich funkci (Taiz a Zeiger, 2002).

Aniontové kanály v rostlinách jsou molekuly proteinové povahy umístěné v buněčných membránách umožňující transport iontů oběma směry v závislosti na směru elektrochemického gradientu. Jsou součástí nejen plazmatické membrány, ale také membrány mitochondrií, endoplazmatického retikula nebo chloroplastů. Díky rozdílným velikostem póru a hustotám povrchového náboje jsou více či méně specifické pro různé ionty. Během přenosu se ionty mohou i nemusí ke kanálu vázat, ale v obou případech se jedná o transport velmi rychlý. Za jednu sekundu projde jedním kanálem až 10^8 iontů. Každý kanál má schopnost regulace a může se otevřít nebo zavřít v rámci procesu zvaném "gating". Signálem pro tento proces může být změna napětí, navázání hormonu nebo světlo. Světelná regulace kanálů je stěžejní v rámci této práce a je jí věnována kapitola 3.2.2 (Taiz a Zeiger, 2002).

Aniontové kanály mají v rámci rostlinné buňky široké spektrum fyziologických funkcí zahrnující osmoregulaci, buněčnou signalizaci, vliv na výživu rostliny a regulaci membránového napětí (Barbier-Brygoo a kol., 2000). Pro tuto bakalářskou práci je důležitý také vliv pohybu iontů na turgor, který reguluje mnoho procesů v rostlině včetně vývoje

a růstu, otevírání průduchů a mnoho dalšího (Barbier-Brygoo a kol., 2000; Ward a kol., 2009). Neméně důležitým procesem, který iontové kanály ovlivňují, je depolarizace membrány, jelikož její polarita závisí na rozdílných koncentracích iontů na vnější a vnitřní straně membrány a při otevření potřebných kanálů může dojít ke ztrátě tohoto napětí. Depolarizace má nepostradatelný význam v mnoha procesech odehrávajících se v rostlinné buňce (Ward a kol., 2009). Ionty hrají zásadní roli v mnoha pro rostlinu životně důležitých metabolických drahách. Hlavní ionty vyskytující se v rostlině jsou z anorganických vodíkové, draselné, sodné, chloridové, dusičnanové, síranové a fosforečné a z organických citrát a malát (Barbier-Brygoo a kol., 2011).

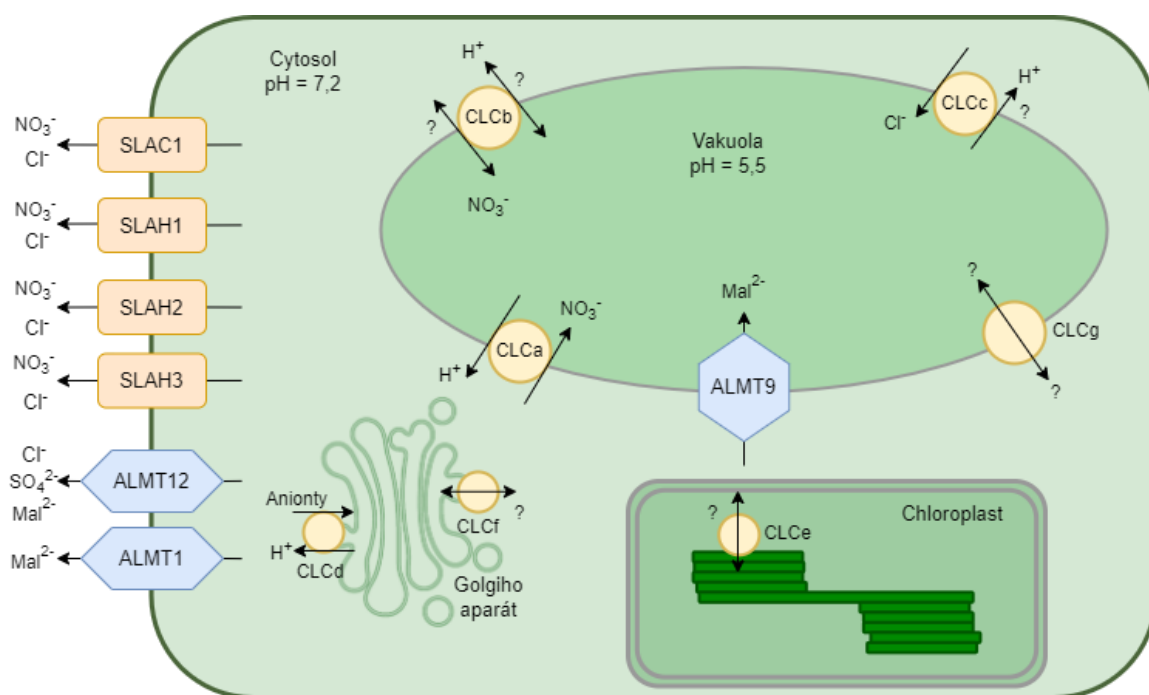
2.2.1 Typy aniontových kanálů

Aniontové kanály se dělí do dvou základních skupin podle jejich rychlosti transportu na R-typ (the rapid anion channel) a S-typ (the slow anion channel), který se také označuje jako SLAC. Poprvé byly tyto typy kanálů objeveny a charakterizovány přibližně před 30 lety v buňkách průduchu hrachu *Vicia faba* pomocí techniky patch-clamp, která pomohla v posledních desítkách let uskutečnit mnoho zásadních studií a objevů o aniontových kanálech (Barbier-Brygoo a kol., 2011). Tyto typy kanálů byly objeveny i v epidermálních buňkách hypokotylu a v buňkách průduchu *A. thaliana*, nebo v buňkách *Nicotiana tabacum* (Tavares a kol., 2011, Frachisse a kol., 2000).

Pro R-typ je typická vysoká rychlost přenosu v řádu milisekund díky schopnosti rychle přizpůsobit svůj “gating” změnám v napětí na membráně. Kanály tohoto typu jsou propustné pro řadu aniontů, dusičnatých a chloridových iontů a jejich zvláštností je propustnost i pro ionty síranové, které jsou jinak považovány za obtížně propustné (Barbier-Brygoo a kol., 2011). R-typ aniontových kanálů je kódovaný genem z rodiny ALMT1 (aluminium-activated malat transporter 1). Transportéry ALMT1 se nachází především v plasmatické membráně (Obr. 2). Jejich schopnost exportovat malát z kořenové špičky dává rostlině schopnost rezistence k hliníku. Organické ionty a tedy i malát obsahují karboxylové skupiny, které disponují schopností chelatovat bivalenty nebo trivalenty kationtů a tím tvořit netoxické sloučeniny (Barbier-Brygoo a kol., 2011, Meyer a kol., 2010).

Na rozdíl od R-typu S-typ vykazuje pomalou kinetiku otevírání a zavírání kanálu v řádu sekund a jejich “gating” závisí na membránovém napětí jen malou měrou. Pokud má dojít k aktivaci tohoto kanálu, musí nejprve dojít k depolarizaci membrány (Hedrich

a Geiger, 2017). Jsou vysoce selektivní pro dusičnanové ionty, ale propouští i ionty chloridové a malát. V roce 2008 byla objevena hlavní složka S-typu aniontového kanálu, která byla identifikována jako SLAC1 protein. Studium *slac1* mutanta neobsahujícího SLAC1 protein bylo zjištěno, že aniontové kanály S-typu nacházející se převážně ve svěřacích buňkách hrají zásadní roli v mechanismu uzavírání průduchů vlivem depolarizace membrány a poklesu turgoru a tím ovlivňují řadu procesů jako je stres ze sucha, reakce na kyselinu abscisovou a tmu. S-typ lze nalézt i v jiných částech rostliny jako jsou xylémové podpůrné buňky, kortikální buňky hypokotylu a buňky buněčných kultur (Barbier-Brygoo a kol., 2011). Lokalizaci kanálů SLAC v buňce znázorňuje obr. 2.



Obr. 2: Subcelulární lokalizace rodin kanálů SLAC/SLAH, ALMT a CLC v *Arabidopsis thaliana*. SLAC1/SLAH kanály jsou lokalizovány v plazmatické membráně spolu s dvěma kanály rodiny ALMT (ALMT12 a ALMT1), zatímco ALMT9 je umístěn v tonoplastu. Členové AtCLC rodiny se nachází v intracelulárních membránách: tonoplast (AtCLCa-c, AtCLCg), thylakoidní membrány (AtCLCe) a Golgiho aparát (AtCLCd a AtCLCf) (upraveno podle Barbier-Brygoo a kol., 2011).

2.2.1.1 CLC kanály

Proteiny chloridových kanálů (CLC, chloride channel) se vyskytují ve všech organismech od *Archea* a bakterií přes rostliny po živočišnou buňku včetně lidské (Jentsch, 2008; Barbier-Brygoo a kol., 2011). Označení této skupiny plyne z názvu chloridového kanálu CLC-0, který byl izolován z rejnoka *Torpedo marmorata* (Jentsch a kol., 1990).

CLC proteiny mohou fungovat v živočišných buňkách jako chloridové kanály nachází-li se v plasmatické membráně a v intracelulárním prostředí plní funkci přenašečů pro antiport dvou chloridových a jednoho vodíkového iontu. V roce 2006 bylo ale překvapivě zjištěno, že jeden z CLC proteinů *AtCLCa* zodpovídá v rostlinných buňkách *Arabidopsis* za akumulaci až 50 % dusičnanových iontů ve vakuolách a slouží pro antiport dvou iontů dusičnanů a jednoho protonu. Tento protein je také první CLC antiportér, který má úzce spřažený transport dusičnanových iontů s protony a vykazuje vyšší selektivitu k dusičnanovým iontům než k chloridovým (Barbier-Brygoo a kol., 2011).

V *A. thaliana* bylo identifikováno kromě *AtCLCa* dalších šest homologů CLC kanálů označovaných od *AtCLCb* po *AtCLCg*, které se liší původem a místem výskytu (Obr. 2). Kanály *AtCLCa* – *AtCLCc* a *AtCLCg* jsou lokalizovány v membráně vakuoly – tonoplastu. *AtCLCd* a *AtCLCg* se vyskytují na Golgiho tělískách a *AtCLCe* je umístěn v membráně thylakoidů chloroplastů (Lv a kol., 2009, Marmagne a kol., 2007). Podle původu je lze rozdělit na dvě skupiny. *AtCLCa-d* a *AtCLCg* jsou příbuznější k eukaryotickým CLC včetně těch savčích, naopak u *AtCLCe* a *AtCLCf* nacházíme podobnost k prokaryotickým CLC proteinům (Marmagne a kol., 2007).

2.2.1.2 Další typy aniontových přenašečů

Atmosféra je tvořena z velké části dusíkem, navzdory tomu rostliny přijímají tento prvek z půdy ve formě iontů v roztoku, z nichž jsou to především dusičnanový aniont a amonný kationt. Více jak 60 genů kóduje proteiny umožňující transport těchto iontů. Některé z nich byly zmíněny v předcházejících kapitolách (např. CLC), tato část se zabývá nejdůležitějšími přenašeči dusičnanových aniontů – NRT přenašeče, které jsou uzpůsobené k příjmu dusíku z půdy dle jeho dostupnosti v půdě a zároveň reagují na potřebu rostliny a jsou tedy schopné tento příjem regulovat (Gojon a kol., 2009).

Rozeznáváme dva druhy dusičnanových přenašečů: NRT1 a NRT2 (nitrate transporter), které katalyzují nízko afinitní (LATS: low-affinity transport) a vysoko afinitní (HATS: high-affinity transport) příjem dusíku skrze protonový symport na plasmatické membráně buněk kořene. Skupina NRT1 obsahuje 53 genů, skupina NRT2 obsahuje 7 genů kódující transportní proteiny pro dusičnanové anionty. Všechny tyto proteiny podléhají různým posttranskripčním modifikacím, které se podílejí na regulaci jejich aktivity. Většina přenašečů patřící do NRT1 skupiny disponují nízkoafinitním typem přenosu,

pouze *At-NRT1.1* je duální (Barbier-Brygoo a kol., 2011). Tento *At-NRT1.1* známý také jako CHL1 vyskytující se v *A. thaliana* byl poprvé izolován v roce 1993 Tsayem a kolegy. Bylo zjištěno, že má duální charakter a může fungovat jako HATS i LATS. Změna z nižší na vyšší afinitu je způsobena fosforylací threoninového zbytku (T101) vyvolanou změnou vnější koncentrace dusičnanů (Tsay a kol., 1993; Barbier-Brygoo a kol., 2011).

Vakuolární přenašeč malátu AttDT (*Arabidopsis thaliana* tonoplast dicarboxylated transporter) nacházející se v *A. thaliana* je ortologem k živočišnému přenašeči Na^+ /dikarboxylát (NaDC1-3). Nachází se v tonoplastu a jeho aktivita nezávisí na koncentraci sodíku, nýbrž je jeho aktivita poháněna elektrochemickým gradientem mezi vakuolou a cytolem (Barbier-Brygoo a kol., 2011). Mutantní rostliny v AttDT vykazují nižší koncentrace malátu v listech (Hurth a kol., 2005).

Za příjem síry, jednoho z esenciálních prvků pro rostlinu, je zodpovědný síranový přenašeč SULTR (sulfate transporter). Neumožňuje pouze příjem síranového aniontu z půdy ve formě roztoku, který probíhá formou symportu s protonem, ale i jeho distribuci. Rodina SULTR přenašečů je tvořena čtyřmi genovými podrodinami, které se z 60 % shodují ve své aminokyselinové sekvenci. Podrodiny SULTR1 a SULTR2 jsou primárně zodpovědné za příjem síranových aniontů kořeny z půdy a jejich distribuci do místa určení. SULTR3 zprostředkovávají přenos aniontů do chloroplastů a SULTR4 se nachází v tonoplastu, kde umožňují přesun uskladněných síranových aniontů do cytosolu (Wang a kol., 2021).

Fosfor je důležitý rostlinný makroprvek, který je ale málo rozpustný, v roztocích málo pohyblivý a má nízkou schopnost zabudovat se do organických sloučenin (Młodzińska a Zboińska, 2016). Primárně ho rostlina získává ve formě anorganického fosfátu a při neutrálním pH také ve formě dihydrogenfosforečnanového aniontu. Přes nízkou koncentraci fosforu v půdě (1-10 μM) je jeho obsah v rostlině relativně vysoký (5-20 mM) (Raghothama, 1999; Hinsinger, 2001). V *A. thaliana* existují vysokoafinitní a nízkoafinitní přenašeče. Vysokoafinitní přenašeče se nachází v plasmatické membráně buněk kořenu a patří do skupiny PHT1 (phosphate transporter). Principem transportu dihydrogenfosforečnanového aniontu je symport s protonem, transport anorganického fosfátu je poháněn H^+ -ATPasou v plasmatické membráně. Z kořenů je fosfor přenášen do xylému pomocí PHO1 přenašečů. Intracelulární přenašeče jsou lokalizovány především

ve vakuole (PHT5.1, PHT5.2, PHT5.3), Golgiho aparátu (PHT4.6), mitochondriích (PHT3.1, PHT3.2, PHT3.3) a plastidech (PHT2.1) (Młodzińska a Zboińska, 2016).

2.2.2 Vliv světla na aniontové kanály

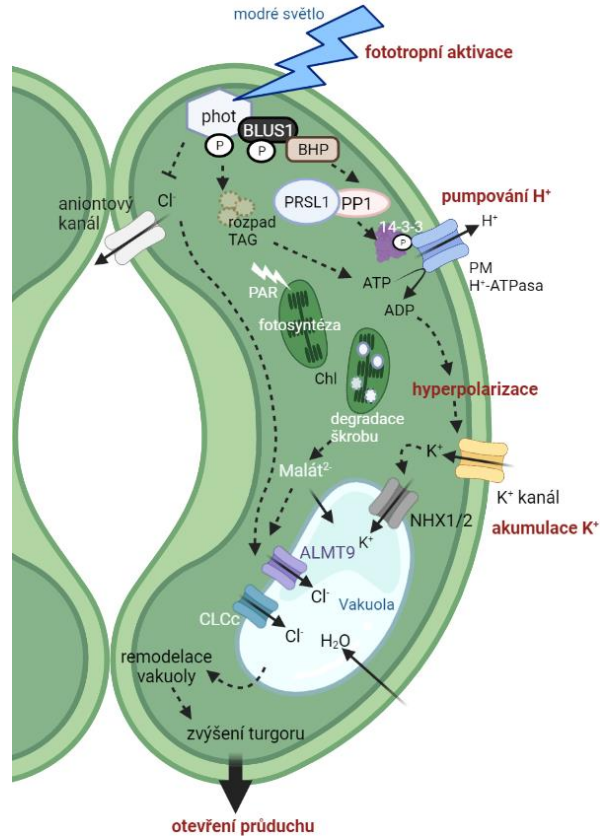
Funkce aniontových kanálů mohou být regulovány různými faktory. Řadí se do skupiny pasivních transportérů, jejichž funkce závisí na elektrochemickém gradientu substrátu. Otevírání a uzavírání kanálů „gating“ může být tedy řízeno membránovým napětím, jiné kanály mohou být ovlivněny vazbou ligandu, kterým je například vápenatý iont (Czempinski a kol., 1999; Spalding, 2000). Právě porozumění vlivu světla na aniontové kanály je předmětem mnoha studií, a i této bakalářské práce

Rostlinné buňky jsou v mnoha částech rostliny a v různých obdobích jejího vývoje zodpovědné za získávání důležitých informací ze světla prostřednictvím fotoreceptorů a přidružených signálních řetězců. Rostlina se přizpůsobuje světelným podmínkám a dochází tak k fotomorfogenezi. Aniontové kanály hrají během těchto procesů důležitou roli (Spalding, 2000). Pokud jsou ve tmě klíčící hypokotyly rostliny *A. thaliana* vystaveny modrému světlu, dojde k výraznému poklesu rychlosti růstu na úkor vývoje fotosyntetizujících orgánů (Cosgrove, 1994). Tato reakce může být rozlišena na dvě fáze inhibice (Parks a kol., 1998). První je spouštěna po přibližně 30 vteřinách prostřednictvím fotoreceptoru pro UVA/modré světlo. V druhé fázi hraje roli CRY1 a tato fáze začíná asi 46-60 minut pro expozici modrým světlem. Každé z těchto fází předchází značná depolarizace membrány, což svědčí o ovlivnění aniontových kanálů v této fotomorfogenní reakci (Spalding a Cosgrove, 1989).

Modré světlo má také význam při otevírání průduchů (Obr. 3). Kináza fototropinového receptoru (PHOT1 a PHOT2) je aktivována absorpcí modrého světla. Tento signál dále aktivuje H⁺-ATPasu lokalizovanou v plazmatické membráně stomatálních buněk, která pumpuje proton a tím dojde k hyperpolarizaci membrány. Tato změna napětí na membráně je vyrovnávána tokem draselného iontu dovnitř buňky, čímž narušuje osmotickou rovnováhu v buňce, voda proudí do buňky za zvyšování turgorového tlaku, který přímo způsobuje otevření průduchu (Hlavinka a kol., 2013).

S-typ aniontových kanálů může být také regulován světlem. Bylo zjištěno, že tyto kanály jsou modrým světlem inhibovány, naopak oxid uhličitý na ně má stimulační efekt (Brearley a kol., 1997; Raschke a kol., 2003; Roelfsema a kol., 2002). Jiným příkladem vlivu

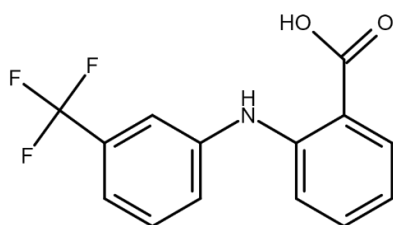
světla na aniontové kanály mohou být mezofylové buňky hrachu setého (*P. sativum*), u kterých byla pozorována aktivace aniontových kanálů bílým světlem (Elzenga a kol., 1995).



Obr. 3: Signální dráha otevírání stomat vlivem modrého světla. Šipky značí pozitivní regulaci, šipky tvaru „T“ symbolizují inhibici. Písmeno P v bílém poli představuje fosforylaci jednotlivých proteinů. Doba trvání a pořadí jednotlivých klíčových procesů pro otevírání průduchu vlivem světla (~2 hod.) je následující: aktivace fototropinu (do 1 min.), pumpování H⁺ (~2,5 min.), hyperpolarizace (několik minut), akumulace K⁺ (30-60 min.). Rozpad triacylglycerolů, degradace škrobu a remodelace vakuol jsou pozorovány 1 až 2 hodiny po zahájení světlené expozice (phot: fototropin, 14-3-3: 14-3-3 protein, Chl: chloroplast, PAR – photosynthetically active radiation: Fotosynteticky aktivní záření, TAG: triacylglycerol) (upraveno dle Inoue a Kinoshita, 2017) (vytvořeno pomocí BioRender.com).

2.3 Inhibitory aniontových kanálů

Inhibitory nebo také blokátory aniontových kanálů jsou chemikálie používané ve výzkumu pro studium role aniontových kanálů v regulaci vývoje, signální transdukci, růstu hypokotylů a regulaci turgoru (Thomine a kol., 1997a; Schwartz a kol., 1995). K nejběžněji používaným inhibitorům patří DIDS (4,4'-diisothiokyanatostilbene-2,2'-disulfonová), NPPB (5-nitro-2-(3-fenylproyl amino)benzoová kyselina), 9-AC (anthracen-9-karboxylová kyselina) a NIF (2-{[3-(trifluormethyl)fenyl]amino}nikotinová kyselina), (Obr. 4) (Thomine a kol., 1997a). Kyselina niflumová byla použita jako inhibitor aniontových kanálu v rámci experimentální části této bakalářské práce a její charakteristice je věnován následující odstavec.



Obr. 4: Strukturní vzorec kyseliny niflumové (NIF)

Kyselina niflumová (NIF) je spolu s 9-AC inhibitor aniontových kanálů S-typu (slow anion channel) ve svěřacích buňkách hrachu *Vicia faba* L. a společně také potlačují inhibici otevírání průduchů způsobenou kyselinou abscisovou (ABA) u *V. faba* L. a *Commelina communis* 1 (Thomine a kol., 1997a). Bylo zjištěno, že NIF potlačuje tuto inhibici za všech světelných podmínek, což napovídá tomu, že NIF inhibuje kanály, které fungují opačně než kanály regulované světlem (Hlavinka a kol., 2013; Schwartz a kol., 1995). Vliv inhibitoru NIF a dalších na aniontové kanály buněk průduchu studoval Schwartz a kol. (1995). V rámci jeho experimentů bylo zjištěno, že byla potřeba pouze 18 μM koncentrace kyseliny niflumové k 50% potlačení inhibice otevírání průduchu působením ABA v *C. communis*. K inhibici S-typu kanálů v stomatech kyselinou niflumovou stačila koncentrace 50 $\mu\text{mol/l}$ a tato inhibice nebyla reversibilní (Schwartz a kol., 1995). Thomine a kol. (1997a) studovali vliv NIF na růst etiolizovaného hypokotylu *Arabidopsis*, jehož růst byl jinak ovlivňován hormonem auxinem a bylo zjištěno, že NIF (100 μM) tlumil silnou redukci prodlužování hypokotylu, která relativně vyjádřená v procentech činila 35-53 % oproti kontrole.

V medicíně je NIF využíván jako nesteroidní protizánětlivé léčivo, protože blokuje neselektivní kationtové kanály aktivované vazbou vápenatého kationtu. (Gögelein a kol., 1990). Je také předmětem studia léčby rakoviny, kdy je kvůli své protirakovinové aktivitě testována například sloučenina stříbrného komplexu s kyselinou niflumovou a Diklofenakem (kyselina 2-[(2,6-dichlorfenyl)amino]fenyloctová) (Altay a kol., 2022) nebo kobaltnaté ($[\text{Co}(\text{nif})_2(\text{met})(4\text{-pic})]$) a nikelnaté $[\text{Ni}(\text{nif})_2(\text{met})(4\text{-pic})]$ komplexy (Caglar a kol., 2021).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 Rostlinný materiál

Interakce fototropinových signálních drah a aniontových kanálů byla studována na mutantních rostlinách huseníčku rolního *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Jako kontrola (wild type) sloužil genotyp *glabra1* (*gl-1*). Dále byli použiti mutanti v jednom genu (single mutanti) *phot1* a *phot2*, odvození od *gl-1*, kteří obsahovaly mutaci v genu pro fototropin PHOT1, respektive fototropin PHOT2, a mutant *phot1/2* s defekty v obou genech současně (double mutant). Protein PHOT1 byl poprvé popsán roku 1995 pod původním označením NPH1 (Liscum a Briggs, 1995) a o dva roky později byl izolován na třetím chromosomu (Huala a kol., 1997). Gen *PHOT2* byl dříve označován *NPL1* (Jarillo a kol., 2001).

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava kultivačního média MS

K přípravě 2 l kultivačního média MS (Murashige a Skoog, 1962) byl do 3 l Erlenmayerovy baňky odměřen 1 l destilované vody a opatrně vloženo magnetické míchadlo. Baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Na předvážkách bylo naváženo 20 g sacharózy a 8,6 g MS média (M0221.0100, Duchefa Biochemie, Nizozemsko) a na analytických vahách 390,4 mg MES pufru (2-(N-morfolino)ethanosulfonová kyselina) (p.a., 29834.02, Serva, Německo). Chemikálie byly za stálého míchání rozpuštěny v Erlenmayerově baňce a poté byl objem doplněn destilovanou vodou na 2 l. Pomocí 1M hydroxidu draselného (KOH) bylo pH upraveno na hodnotu 6,1. Následně bylo do každé ze 4 termolahví se šroubovacím uzávěrem naváženo 3,5 g fytoagaru (9002-18-0, Duchefa Biochemie, Nizozemsko) a nalito 500 ml připraveného tekutého média z Erlenmayerovy baňky. Láhve byly uzavřeny a uzávěr byl překryt aluminiovou folií a opatřen autoklávovací páskou. Láhve byly označeny datem a jménem. Médium bylo vysterilizováno v parním autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa. Sterilní médium bylo uskladněno v ledničce.

3.2.2 Sterilizace a výsev semen

Sterilizace i výsev probíhal ve sterilním prostředí ve flowboxu. Pro experiment bylo použito 350 semen mutantů *glabra1* a *phot1* rostliny *Arabidopsis thaliana*. Semena byla navážena

do mikrozkuvek (100 semen = cca. 2 mg) a byla 20 minut povrchově sterilizována pomocí 1 ml roztoku Sava obsahujícího 1,4 % aktivního chloru. Tento roztok Sava byl připraven smícháním 300 ml originálního přípravku Savo se 700 ml destilované vody. Během sterilizace semen bylo rozeřáno dříve připravené kultivační médium MS a do každé z 12 Petriho misek (sterilní plastové, průměr 90 mm) bylo nalito 20 ml MS média, jenž pak tuhlo v částečně zakrytých miskách. Z mikrozkuvky se semeny byl po 20 minutách odpipetován roztok Sava a semena byla šestkrát promyta vždy 1 ml sterilní destilované vody. Pro snadnější manipulaci se semeny a vysévání semen byla semena po dokončení sterilizace ponechána asi v 1 ml sterilní destilované vody. Sterilním skalpelem byla seříznuta plastová pipetovací špička tak, aby průměr jejího otvoru přibližně odpovídal velikosti průměru semene a automatickou pipetou (pro objemy 2 až 20 μ l) bylo vyseto přibližně 50 semen na každou z Petriho misek. Misky byly oblepeny dvakrát dokola páskou z netkané textilie (Softpore, Batiste Medical, ČR) označeny genotypem a zabaleny do alobalu, aby byla semena uchována ve tmě. Alobal byl opatřen jmenovkou s datem výsevu a po 3 dny byla semena kultivována v automatické růstové komoře (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko) při teplotě 23 °C.

3.2.3 Přenos klíčících semen

Z předem rozeřátého MS média byly připraveny 3 zásobní roztoky média s inhibitorem NIF (kyselina niflumová) (2-{{3-(trifluormethyl)fenyl}amino}nikotinová kyselina) (N-0630, Sigma, Německo) o objemu 60 ml, viz tabulka č. 1. Do 12 Petriho misek bylo rozlito médium s koncentracemi NIF: 30 μ mol \cdot l⁻¹, 90 μ mol \cdot l⁻¹, 120 μ mol \cdot l⁻¹.

Tabulka 1: Objemy a koncentrace inhibitoru NIF pro přípravu 60 ml média

Inhibitor	Koncentrace zásobního roztoku [mol·l ⁻¹]	Výsledné koncentrace testované v médiu [μmol·l ⁻¹]	Objem inhibitoru ve 60 ml MS média [μl]
NIF	10 ⁻²	30	180
		90	540
		120	720

Malou pinzetou, která byla před použitím opláchnuta v 96 % ethanolu a následně sterilizována žháním v plameni lihového kahanu, bylo přenášeno 10 rostlin stejné velikosti na každou z misek. Misky byly po transferu oblepeny páskou z netkané textilie a popsány genotypem, jménem, příslušnou koncentrací a typem světelných podmínek, do kterých byly umístěny. Rostliny byly inkubovány 7 dnů ve tmě nebo na modrém či červeném světle při teplotě 23 °C. Zdrojem modrého světla s maximální intenzitou osvětlení 10 μmol m⁻² s⁻¹ při vlnové délce 440 nm byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue. Zdrojem červeného světla s maximální intenzitou osvětlení při 10 μmol m⁻² s⁻¹ při vlnové délce 660 nm byla zářivka Philips TLD36W/15-Red. Petriho misky s rostlinami určenými pro růst ve tmě byly zabaleny do hliníkové folie, umístěny do stejné růstové komory a inkubovány rovněž 7 dnů při teplotě 23 °C.

3.2.4 Měření kořene a hypokotylu

Po týdnu inkubace rostlin na modrém, červeném světle a ve tmě byla změřena délka hypokotylu a kořene pomocí pravítka s přesností měření na 1 mm. Pro lepší vizualizaci a snazší měření byla každá rostlina pinzetou opatrně přesunuta a vyrovnána na podložce černé barvy. Hodnoty byly zapisovány do záznamového archu a z nich byly vypočítány průměrné hodnoty. Výsledky pak byly zpracovány ve formě grafů.

Pro určení statistické významnosti rozdílů mezi dvěma vzorky byl použit T-test (Mann-Whitney test). Statistická analýza byla provedena pomocí softwaru MS Excel (Microsoft, USA).

4 VÝSLEDKY

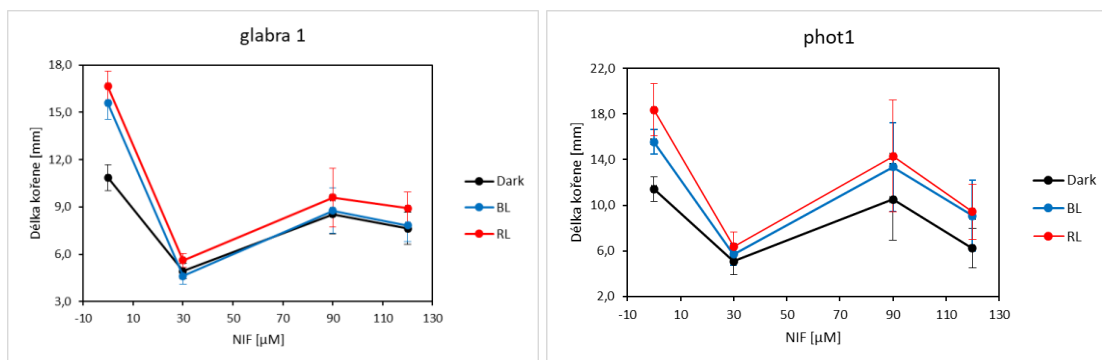
4.1 Vliv inhibitoru NIF na aniontové kanály v růstu rostlin.

Cílem experimentů bylo analyzovat růst hypokotylů a kořenů u čtyřech vybraných genotypů rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) v závislosti na koncentraci NIF a na vybraných světelných podmínkách. Genotyp *glabra-1* (*gl-1*) sloužil jako kontrolní genotyp pro mutanty *phot1*, *phot2* a dvojitý mutant *phot1/phot2*. Uvedení mutanti mají poruchu v genech pro fotoreceptory fototropiny PHOT1 a PHOT2 a mají narušeny všechny odpovědi zprostředkované fototropiny. Semena všech uvedených genotypů byla laskavě poskytnuta Winslow R. Briggssem (Carnegie Institution of Washington, Stanford, CA, USA).

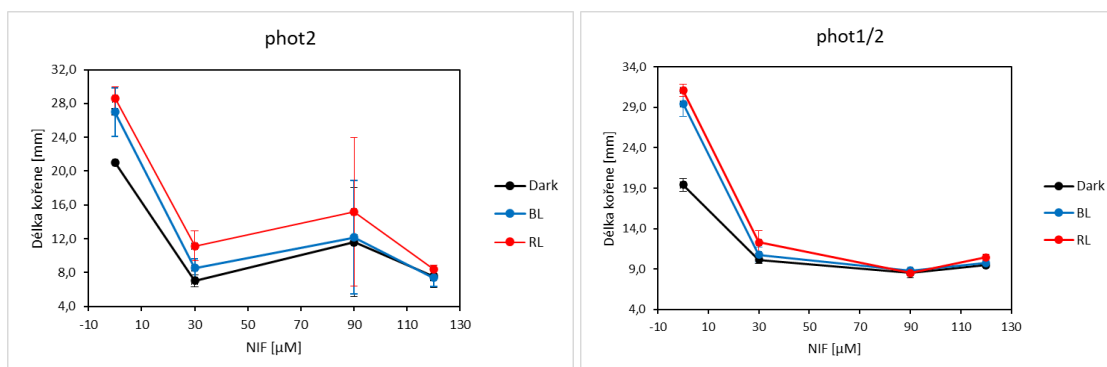
4.1.1 Růst kořenů

Růst kořenů jednotlivých mutantů *glabra1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/2* zobrazují obr. 1-4. U kontrolního genotypu *glabra1* (Obr. 1, vlevo) byly délky kořenů etiolizovaných rostlin (10,9 mm) při koncentraci NIF 0 μM podstatně kratší než kořeny rostlin rostoucí na modrém (15,6 mm) a červeném světle (16,6 mm). Inhibitor NIF aplikovaný v koncentracích 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$ pak růst kořenů zřetelně inhiboval u rostlin rostoucích na všech testovaných světelných podmínkách. Inhibice růstu kořenů inhibitorem NIF byla překvapivě nejvýraznější při koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$, a to ve tmě (4,9 mm) i na modrém (4,6 mm) a červeném (5,6 mm) světle, kdežto NIF v koncentracích 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$ redukoval růst kořenů méně, než při koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$, a to opět u rostlin rostoucích za všech testovaných světelných podmínek (Obr. 1, vlevo). Etiolizované kořeny *phot1* (Obr. č. 2, vpravo) byly na základním médium nejkratší (11,4 mm), naopak kořeny inkubované na červeném světle byly nejdelší (18,4 mm). Stoupající koncentrace inhibitoru NIF vedly k redukcí růstu kořenů *phot1*, a to nejvýrazněji opět při 30 $\mu\text{mol/l}$. Podobně jako u *gl-1* a mutantu *phot1*, kořeny mutantu *phot2* na médiu bez NIF byly nejkratší ve tmě (21,0 mm) a nejdelší na červeném světle (28,6 mm) (Obr. 3, vlevo). Růst kořenů mutantu byl následně výrazně potlačen inhibitorem NIF, podobně na všech testovaných světelných podmínkách. Opět bylo pozorováno, že nejsilněji byl růst kořenů *phot2* redukován u rostlin rostoucích na MS médiu s 30 $\mu\text{mol/l}$ NIF a opět nezávisle na světelných podmínkách (Obr. 3, vlevo). Podobná situace pak byla zjištěna u dvojitého mutantu *phot1/2* (Obr. 4, vpravo).

Etiolizované kořeny byly výrazně kratší než kořeny rostoucí na světle. Na červeném světle byly kořeny nejdelší. Přidáním 30 $\mu\text{mol/l}$ inhibitoru NIF do média docházelo k výrazné inhibici růstu, která však při 90 $\mu\text{mol/l}$ NIF klesala a opět stoupala při 120 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 4, vpravo).



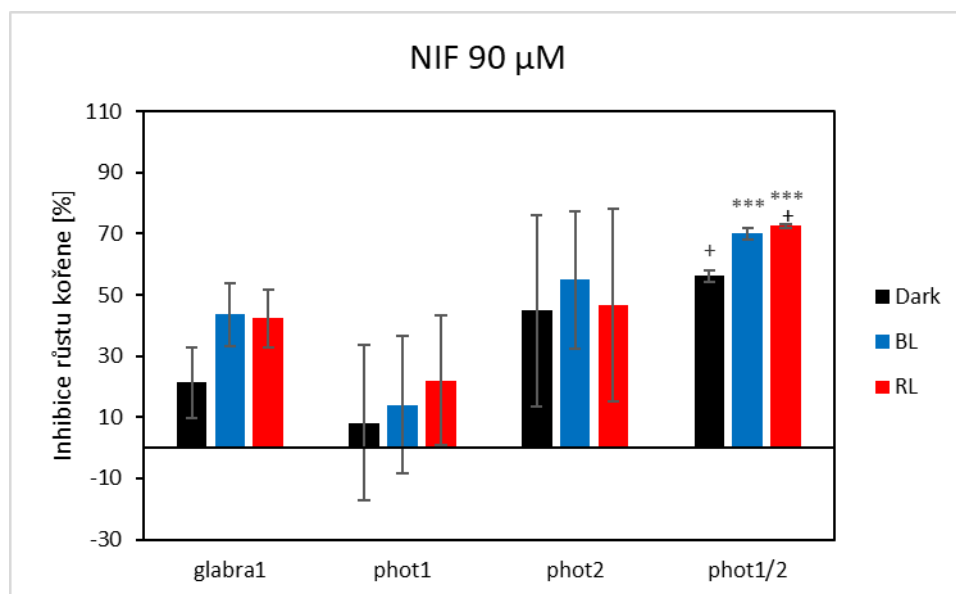
Obr. 1 a 2: Průměrné délky kořenů kontrolního genotypu *glabra 1* a mutantu *phot1* rostlin *Arabidopsis thaliana* L. inkubovaných ve tmě (Dark), na modrém (BL), červeném (RL) světle rostoucích po dobu 7 dnů na MS médiu obohaceném o vybrané koncentrace inhibitoru NIF. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE získané ze sedmi (*gl-1*) resp. ze tří (*phot1*) nezávislých experimentů.



Obr. 3 a 4: Průměrné délky kořenů mutantů *phot2* respektive *phot1/2* rostlin *Arabidopsis thaliana* L. inkubovaných ve tmě (Dark), na modrém (BL), červeném (RL) světle rostoucích po dobu 7 dnů na MS médiu obohaceném o vybrané koncentrace inhibitoru NIF. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Nejvýraznější rozdíly v délkách kořenů jednotlivých genotypů při odlišných světlených podmínkách vykazovaly rostliny ošetřené 90 μ M koncentrací inhibitoru NIF v MS médiu a tyto odlišnosti vyjadřuje relativní inhibice růstu vyjádřená v procentech (Obr. 5). Na obr. 5 je zřetelně vidět, že u kontrolního genotypu *gl-1* NIF ve tmě redukoval délku kořene asi o 21 %, zatímco modré světlo (inhibice růstu 43,7 %) a červené světlo (42,3 %) výrazně zvyšovalo relativní citlivost kořenů k NIF. U mutanta *phot1* se citlivost kořenů k inhibitoru rovněž zvýšila na modrém (14,1 %), ale především výrazně na červeném světle (22,1 %). Data rovněž ukazují, že mutace v genu *PHOT1* vedla ke snížení citlivosti etiolizovaných kořenů ve srovnání kontrolním genotypem *gl-1*. V případě *phot1* však vykazovaly vypočítané hodnoty inhibice růstu kořenů relativně vysokou variabilitu. U mutanta *phot2* byla citlivost kořenů na červeném světle (inhibice růstu 46,8 %) podobná citlivost etiolizovaných rostlin (44,8 %), ale byla mírně zvýšena pouze na modrém světle (54,9 %). Současně si můžeme všimnout, že relativní inhibice růstu kořene mutanta *phot2* byla ve tmě a na modrém světle, nikoliv však na světle červeném, znatelně vyšší než u kontrolního genotypu *gl-1* (Obr. 5). Signifikantní rozdíly však mezi vzorky pozorovány nebyly a hodnoty inhibice růstu ukazovaly vysokou variabilitu, podobně jako bylo zmíněno u mutanta *phot1*. U dvojitého mutanta *phot1/2* pak byla inhibice růstu kořenů znatelně zvýšena na modrém (70,0 %) a podobně na červeném světle (72,6 %) (Obr. 5). Je rovněž vidět, že citlivost kořenů dvojitého mutanta k inhibičním účinkům NIF byla výrazně vyšší než citlivost kořenů genotypu *gl-1*, a to při všech testovaných světelných podmínkách (Obr. 5).

Hodnoty relativní inhibice růstu kořene byly statisticky srovnány metodou T-testu. Na Obr. 5 jsou signifikantní rozdíly vyjádřeny pro hladinu významnosti $P = 0,1$ symbolem „+“ a pro hladinu významnosti $P = 0,01$ symbolem „***“. Relativní/Průměrná inhibice růstu kořenů dvojitého mutanta *phot1/2* ve tmě a na červeném světle byla oproti relativní/průměrné inhibici kořenů *gl-1* rostoucích ve stejných světelných podmínkách na hladině významnosti $P = 0,1$ signifikantně rozdílná. Signifikantní rozdíl při hladině významnosti $P = 0,01$ od kořenů *phot1/2* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci NIF vykazovaly relativní/průměrné inhibice růstu *phot1/2* rostoucí na modrém a červeném světle (Obr. 5).



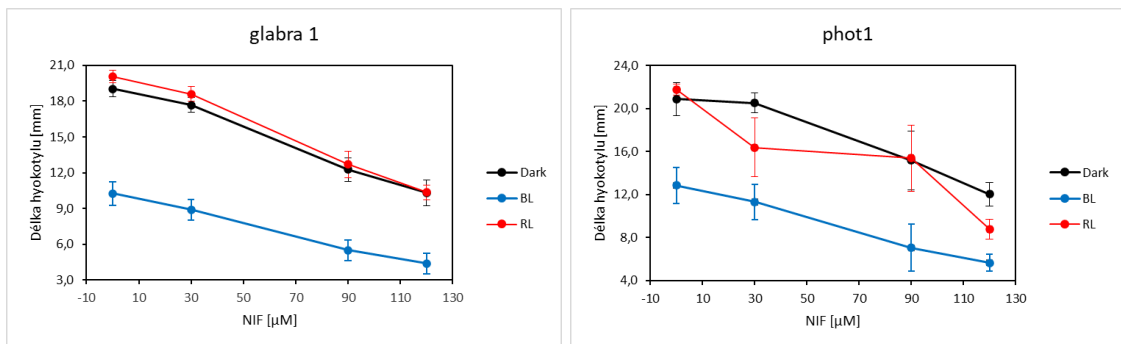
Obr. 5: V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu kořenů ± SE vypočítané ve 3 až 7 (*gl-1*) na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, $P = 0,1$) od kořenů *gl-1* rostoucích ve stejných světelných podmínkách; *** = signifikantní rozdíl (T-test, *** $P = 0,01$) od kořenů *phot1/2* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci NIF.

4.1.2 Růst hypokotylu

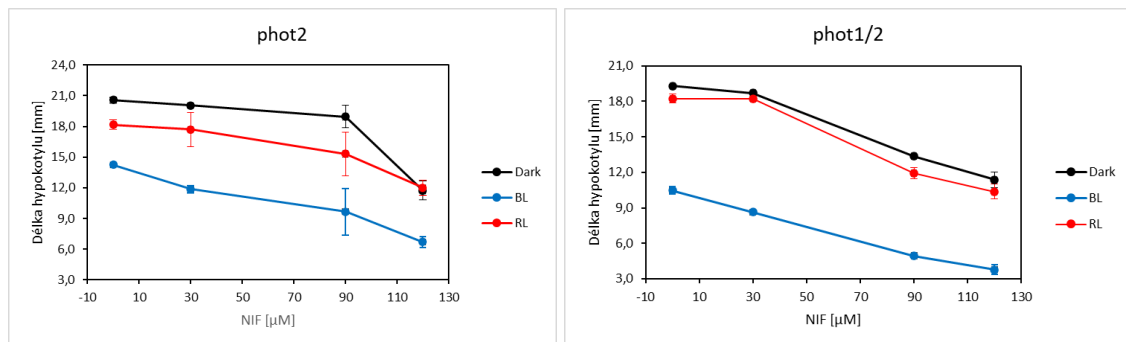
Růst hypokotylů byl sledován na mutantech *glabra1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/2* (Obr. 6-9). Hypokotyly kontrolních rostlin *glabra1* byly na základním médiu nejkratší v případě kultivace na modrém světle (10,3 mm). Rostliny rostoucí na červeném světle (20,1 mm) a ve tmě (19,0 mm) při jinak stejných podmínkách měly výrazně delší hypokotyly (Obr. 6, vlevo). Se stoupající koncentrací inhibitoru NIF (30, 90 a 120 μmol/l) docházelo k postupné redukci délky hypokotylu *gl-1*. Růst rostlin ošetřených 120 μmol/l kyseliny niifumové byl nejvíce inhibován, přičemž hypokotyly rostoucí na modrém světle byly nejkratší (4,4 mm), stejně jako na základním médiu. Na červeném světle a ve tmě byla délka hypokotylů větší (v obou případech 10,3 mm; Obr. 6, vlevo).

Hypokotyly *phot1* rostoucí na modrém světle byly na základním médiu opět nejkratší (12,8 mm), hypokotyly rostoucí na červeném světle (21,7 mm) a ve tmě (20,9 mm) je naopak výrazně přerůstaly (Obr. 7, vpravo). Stejně jako u kontrolního genotypu docházelo u *phot1* s rostoucí koncentrací inhibitoru k redukci délky hypokotylů. Nezávisle na použité koncentraci inhibitoru nejkratší byly vždy hypokotyly, které rostly na modrém světle (Obr. 7, vpravo). U genotypu *phot2* vykazovaly délky hypokotylů na základním médiu odlišné hodnoty (Obr. 8, vlevo). Rostliny rostoucí na modrém světle měly nejkratší

hypokotyly (14,2 mm), Etiolizované hypokotyly byly naopak nejdelší (20,6 mm). Inhibitor NIF přidávaný ve vybraných koncentracích pak růst inhiboval nezávisle na světelných podmínkách. Posledním sledovaným genotypem byl dvojitý mutant *phot1/2* (Obr. 9, vpravo), který měl stejně jako předešlé genotypy na základním médiu výrazně kratší hypokotyly u rostlin rostoucích na modrém světle (10,5 mm), kdežto hypokotyly inkubované na červeném světle (18,2 mm) a ve tmě (19,3 mm) byly podstatně delší. Délka hypokotylů byla pak se stoupající koncentrací NIF rovněž výrazně redukována (Obr. 9, vpravo).



Obr. 6 a 7: Průměrné délky hypokotylů mutantů *glabra1* respektive *phot1* rostliny *Arabidopsis thaliana* L. inkubovaných na modrém (BL), červeném (RL) světle a ve tmě (Dark) rostoucích po dobu 7 dnů na MS médiu obohaceném o vybrané koncentrace inhibitoru NIF. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze sedmi (*gl-1*) resp. tří (*phot1*) experimentů.

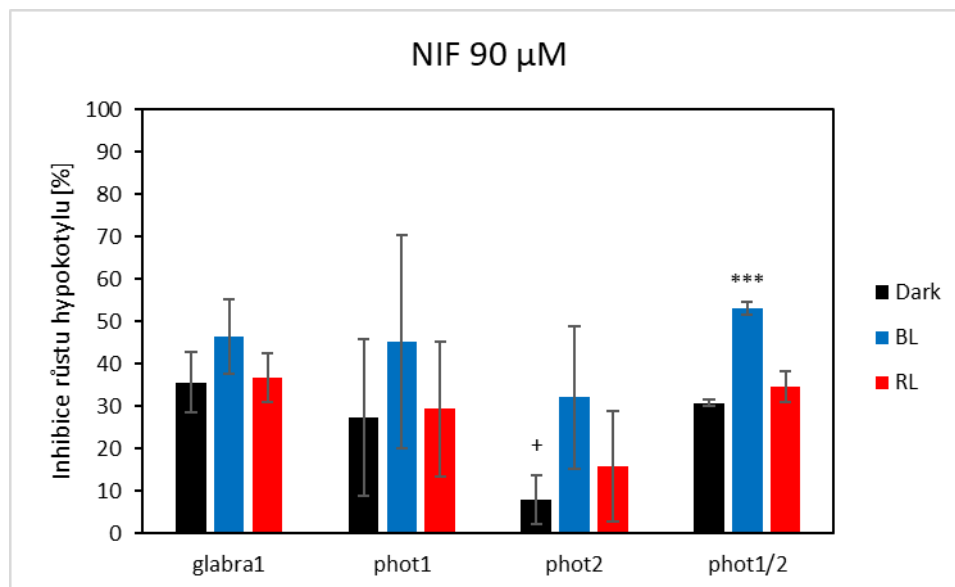


Obr. 8 a 9: Průměrné délky hypokotylů mutantů *phot2* respektive *phot1/2* rostliny *Arabidopsis thaliana* L. inkubovaných na modrém (BL), červeném (RL) světle a ve tmě (Dark) rostoucích po dobu 7 dnů na MS médiu obohaceném o vybrané koncentrace inhibitoru NIF. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze tří experimentů.

Nejvýznamnější rozdíly v délkách hypokotylů mezi jednotlivými mutanty byly pozorovány po přidání 90 μ mol/l inhibitoru NIF. Odlišnosti v relativní inhibici růstu hypokotylů jednotlivých genotypů (v %) při koncentraci 90 μ mol/l NIF jsou znázorněny na obr. 10. Přidání 90 μ mol/l inhibitoru NIF způsobilo u *glabra1* inhibici růstu, která byla

na modrém světle mírně zvýšena (46,4 %) oproti rostlinám stejného genotypu, které rostly na světle červeném (36,7 %) a ve tmě (35,6 %) (Obr. 10). Velice podobně reagoval i mutant *phot1*, u něhož byla ale inhibice růstu na červeném světle (29,3 %) a ve tmě (27,3 %) mírně nižší, než u *glabra1* (Obr. 10). Podobně jako u kořenů však vypočítané hodnoty inhibice růstu hypokotylů *phot1* vykazovaly relativně vysokou variabilitu. U mutantu *phot2* byla inhibice růstu hypokotylu vlivem 90 μ M NIF relativně nízká ve tmě (7 %), ale byla silně zvýšena působením modrého světla (32,1 %) a mírně působením červeného světla (15,8 %). Současně mutant *phot2* ukazoval oproti *gl-1* sníženou citlivost k NIF při všech testovaných světelných podmínkách (Obr. 10). U dvojitého mutantu *phot1/2* byla inhibice růstu hypokotylu vlivem NIF výrazně zvýšena vlivem modrého světla (52,9 %), ale pouze velice mírně vlivem červeného světla (34,6 %). Současně úroveň inhibice růstu hypokotylu *phot1/2* byla více či méně podobná inhibici pozorované u *gl-1*, a to při všech světelných podmínkách (Obr. 10).

Hodnoty relativní inhibice růstu hypokotylu byly statisticky srovnány metodou T-testu, signifikantní rozdíly jsou vyjádřeny pro hladinu významnosti $P = 0,1$ symbolem „+“ a pro hladinu významnosti $P = 0,01$ symbolem „***“ na obrázku 5. Relativní/průměrná inhibice růstu etiolizovaných hypokotylů mutantu *phot2* vykazovala signifikantní rozdíl od průměrné inhibice růstu hypokotylů *gl-1* rostoucích ve stejných světelných podmínkách při hladině významnosti $P = 0,1$. Stejně jako u výsledků kořenů i v tomto případě byla inhibice růstu hypokotylů *phot1/2* rostoucích na modrém světle signifikantně odlišná od hypokotylů *phot1/2* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci při hladině významnosti $P = 0,01$.



Obr 10: V grafu jsou vyneseny hodnoty průměrných inhibicí růstu hypokotylů \pm SE vypočítané ve 3 až 7 (*gl-1*) na sobě nezávislých experimentech; + = signifikantní rozdíl (T-test, $P = 0,1$) od hypokotylů *gl-1* rostoucích ve stejných světelných podmínkách; *** = signifikantní rozdíl (T-test, *** $P = 0,01$) od hypokotylů *phot1/2* rostoucích ve tmě při stejné koncentraci NIF.

5 DISKUZE

Experimentální část této bakalářské práce se zabývala otázkou, zda aniontové kanály ovlivňují růst rostliny a zda je možné aktivitu aniontových kanálů ovlivňovat světlem, prostřednictvím fotoreceptorů pro modré světlo, fototropinů. V experimentu je použita kombinace farmakologického a genetického přístupu, kdy byly na vybrané druhy mutantů *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. aplikovány různé koncentrace inhibitoru aniontových kanálů, kyseliny niiflumové. Vybraní mutanti měly defekt v genu pro fototropiny *PHOT1* a *PHOT2*.

5.1 Vliv NIF-senzitivních aniontových kanálů na růst kořene

Jak bylo již dříve zmíněno, kyselina niiflumová (NIF) je inhibitor aniontových kanálů a v kořenových epidermálních buňkách *Arabidopsis* NIF tuto inhibici vyvolává (Tavares a kol, 2011; Diatlof a kol. 2004). Bylo zjištěno, že NIF rovněž inhibuje aniontové kanály v epidermálních buňkách kořene pšenice (*Triticum aestivum*), aniontové kanály buněk kořenové stélky kukuřice a buněk apikální části kořene kukuřice a pšenice (Roberts, 2006).

V rámci experimentů této bakalářské práce, při kterých byly použity koncentrace kyseliny niiflumové 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$, byla zjištěno, že po přidání inhibitoru NIF do média byl růst kořenů u všech kultivarů nezávisle na světelných podmínkách inhibován. Tyto výsledky naznačují, že NIF-senzitivní kanály jsou zapojeny v růstu kořenu rostlin *Arabidopsis*, a to ve všech testovaných světelných podmínkách.

V experimentech s kontrolním genotypem *gl-1* bylo zjištěno, že inhibice růstu kořenů vlivem NIF se zvyšuje na modrém a červeném světle. To vede k dedukci, že světlo nějakým způsobem ovlivňuje aktivitu kanálů. Je například možné, že světlo nějakým způsobem zvyšuje citlivost NIF-senzitivních kanálů k inhibitoru NIF, tzn., že se vlivem světla mohou vlastnosti kanálů měnit. Je ale rovněž možné, že světlo může snižovat množství NIF-senzitivních kanálů neboli snižovat expresi genů, které NIF-senzitivní kanály kódují. Při menším množství kanálů by tak stačilo menší množství NIF v roztoku (menší koncentrace) k zablokování části z nich. V experimentech jsme zjistili, že zvýšení citlivosti kořenů k NIF vlivem světla je pozorováno i u mutantů *phot1*, *phot2* i *phot1/2*, neboli, že defekt v těchto fotoreceptorech reakci kořenů k NIF v tomto směru neovlivňuje. Z toho lze dedukovat, že zvýšení reakce kořenů k NIF vlivem světla není zprostředkován

fototropiny. Je však nutno zmínit, že hodnoty inhibice růstu kořenů u mutantů *phot1* a *phot2* byly v jednotlivých experimentech dosti variabilní, a proto pro potvrzení výše zmíněných závěrů by bylo nutno provést větší počet nezávislých experimentů. Výsledky rovněž ukázaly, že kořeny mutantu *phot1* vykazují za všech světelných podmínek sníženou reakci k NIF, zatímco mutant *phot2* a dvojitý mutant *phot1/2* ukazují naopak zvýšenou reakci k inhibičním účinkům NIF. Tyto výsledky naznačují, že funkční fotoreceptor PHOT1 by mohl zvyšovat reakci kořenů k NIF, kdežto PHOT2 by reakci kořenů k NIF mohl snižovat. Fakt, že dvojitý mutant v tomto smyslu reaguje podobně jako mutant *phot2* pak může znamenat, že PHOT2 by se mohl chovat k PHOT1 epistaticky, tedy nadřazeně.

Dále bylo zjištěno, že tato inhibice růstu kořenu je u *glabra1*, *phot1* a *phot2* neohledně na světelné podmínky překvapivě největší při koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ a při koncentraci 90 $\mu\text{mol/l}$ je mírně menší. Tento neočekávaný výsledek naznačuje, že při této koncentraci může jednak docházet k jiným jevům způsobující inhibici, které zatím nebyly popsány a mohly by být předmětem dalších experimentů. Je rovněž možné, že vzhledem k poměrně velkým odchylkám při měření kořenů *phot1* a *phot2* došlo k nějaké chybě při provádění experimentů.

5.2 Vliv NIF-senzitivních aniontových kanálů na růst hypokotylu

Z dřívějších výzkumů vyplývá, že kyselina niiflumová interaguje s aniontovými kanály regulovanými změnou napětí v hypokotylu *Arabidopsis* již při koncentraci 0,1 mM NIF, a inhibice stoupá s rostoucí koncentrací NIF (Thomine a kol., 1997b). Zároveň bylo dokázáno, že modré světlo inhibuje růst hypokotylu, a to vlivem aktivace aniontových kanálů (Cho a Spalding, 1996; White a Broadley, 2001).

V rámci experimentů této bakalářské práce, při kterých byly použity koncentrace kyseliny niiflumové 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$, bylo zjištěno, že po přidání inhibitoru NIF do média byl růst hypokotylů u všech kultivarů nezávisle na světelných podmínkách inhibován. Tyto výsledky naznačují, že NIF-senzitivní kanály jsou zapojeny v růstu hypokotylu rostlin *Arabidopsis*, a to ve všech testovaných světelných podmínkách.

Výsledky experimentů s kontrolním genotypem *glabra1* ukazují, že hypokotyle rostoucí na modrém světle mají výrazně zvýšenou inhibici růstu. Z toho lze vyvodit, že modré světlo, podobně jako v případě kořenů, ovlivňuje v hypokotylech aktivitu NIF-senzitivních aniontových kanálů. Tento trend byl zřejmý i přes relativně vysokou

variabilitu inhibicí růstu v jednotlivých experimentech. Stejně jako u kořene, tak i u hypokotylu můžeme předpokládat několik způsobů ovlivnění růstu hypokotylu světla. Je možné, že dochází k změně vlastností NIF-senzitivních kanálů vlivem modrého světla a je např. zvýšena citlivost kanálů vůči inhibitoru, nebo dochází k regulaci již na úrovni genové exprese a může docházet k snížení exprese genů, které NIF-senzitivní kanály kódují. Inhibice růstu hypokotylů vlivem stoupající koncentrace inhibitoru NIF a také vlivem modrého světla byla zároveň pozorována i u mutantů *phot1*, *phot2* a *phot1/2*. Rostliny s defektem ve fototropinech vykazovaly nejvyšší míru inhibice na modrém světle, a naopak na červeném světle a ve tmě byla pozorována snížena citlivost k inhibitoru NIF. Růst hypokotylů při těchto světelných podmínkách nebyl výrazně redukován. Z výsledků lze tedy vyvodit, že zvýšení reakce k NIF vlivem světla není pravděpodobně zprostředkováno fototropiny.

Srovnáme-li relativní inhibici růstu hypokotylů u jednotlivých genotypů, můžeme vidět, že mutant *phot2* vykazuje sníženou inhibici růstu vlivem NIF, a to především ve tmě a na červeném světle a mírně i na světle modrém. To by mohlo znamenat, že funkční fotoreceptor PHOT2 zvyšuje reakci k inhibitoru NIF, a to bez ohledu na světelné podmínky. Oproti tomu, *phot1* a dvojitý mutant *phot1/2* vykazují více či méně podobnou inhibici růstu hypokotylů jako kontrolní genotyp *gl-1*, a to při všech testovaných světelných podmínkách. To by mohlo znamenat, že funkční fotoreceptor PHOT1 není v růstových reakcích hypokotylů k NIF zásadně zapojen. Fakt, že dvojitý mutant reaguje podobně jako *gl-1* a *phot1*, naznačuje, že absence PHOT2 může být v případě reakce hypokotylu k NIF nějakým způsobem kompenzována.

6 ZÁVĚR

Tato bakalářská práce si kladla za cíl zjistit, zda jsou aniontové kanály zapojeny v růstu rostlin a zároveň, zda je tento proces ovlivňován světlem. Proces růstu byl studován na modelové rostlině huseníčku rolním *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.. Pro sledování vlivu aniontových kanálů na růst byl použit inhibitor aniontových kanálů, kyselina niflumová (NIF), která byla přidávána do základního média v koncentracích 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$. Aby bylo možné sledovat vliv světla na proces růstu, byly vybráni tři mutanti s defektem v genech pro dva fotoreceptory modrého světla, fototropiny. Zároveň byly rostliny inkubovány na třech světelných podmínkách, ve tmě, na modrém a červeném světle.

Z výsledků experimentů bylo zjištěno, že inhibitor NIF inhibuje růst kořene i hypokotylu, což vede k závěru, že NIF-citlivé aniontové kanály jsou zapojeny v růstu kořenů i hypokotylů *Arabidopsis*. Studium růstu hypokotylů a kořenů v přítomnosti NIF v různých světelných podmínkách vede k závěrům, že aktivita kanálů je pravděpodobně ovlivňována světlem. Výsledky analýzy mutantů *phot1* a *phot2* dále naznačují, že u kořenů funkční fotoreceptor PHOT1 by mohl zvyšovat jejich reakci k NIF, kdežto PHOT2 by reakci kořenů k NIF mohl snižovat. V případě výsledků analýzy mutovaných hypokotylů lze z výsledků naproti tomu dedukovat, že funkční fotoreceptor PHOT2 zvyšuje reakci k inhibitoru NIF, kdežto PHOT1 není v reakci hypokotylů k NIF zapojen. Protože však hodnoty inhibice růstu kořenů i hypokotylů u mutantů *phot1* a *phot2* byly v jednotlivých experimentech značně variabilní, je nutné zmíněné závěry brát zatím s rezervou, dokud nebudou získány výsledky z vyššího počtu dalších nezávislých experimentů.

Vzhledem k překvapivě výrazné inhibici růst kořene při ošetření rostlin koncentrací NIF 30 $\mu\text{mol/l}$ by bylo vhodné provést rozšiřující experimenty, které by tento jev podrobněji prozkoumaly. Dále je možné provést pokusy i s jinými typy inhibitorů, které by rozšířily znalosti o tom, jaké konkrétní aniontové kanály jsou v růstu rostlin zapojeny.

Výsledky experimentů nicméně naznačují, že aniontové kanály mohou být zapojeny v růstu rostlin, naznačují rozdílnost růstových mechanismů v kořenech a hypokotylech rostlin a nastolují zajímavé otázky o možném zapojení fotoreceptorů fototropinů v regulaci aktivity NIF-senzitivních kanálů světlem.

7 CITOVANÁ LITERATURA

- Altay, A., Caglar, S., & Caglar, B. (2022). Silver (I) complexes containing diclofenac and niflumic acid induce apoptosis in human-derived cancer cell lines. *Archives of Physiology and Biochemistry*, *128*, 69-79.
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S., & Wege, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, *62*, 25-51.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J. M., & Maurel, C. (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *1465*, 199-218.
- Brearley, J., Venis, M. A., & Blatt, M. R. (1997). The effect of elevated CO₂ concentrations on K⁺ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta*, *203*, 145-154.
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, *7*, 204-210.
- Caglar, S., Altay, A., Kuzucu, M., & Caglar, B. (2021). In vitro anticancer activity of novel Co (II) and Ni (II) complexes of non-steroidal anti-inflammatory drug niflumic acid against human breast adenocarcinoma MCF-7 Cells. *Cell Biochemistry and Biophysics*, *79*, 729-746.
- Cosgrove, D. J. (1994). Photomodulation of growth. *Photomorphogenesis in Plants* (631-658). Springer, Dordrecht.
- Czempinski, K., Gaedeke, N., Zimmermann, S., & Müller-Röber, B. (1999). Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany*, 955-966.
- Diatloff, E., Roberts, M., Sanders, D., & Roberts, S. K. (2004). Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiology*, *136*, 4136-4149.
- Elzenga, J. T. M., Prins, H., & Van Volkenburgh, E. (1995). Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta*, *197*, 127-134.

- Folta, K. M., & Kaufman, L. S. (2003). Phototropin 1 is required for high-fluence blue-light-mediated mRNA destabilization. *Plant Molecular Biology*, *51*, 609-618.
- Frachisse, J. M., Colcombet, J., Guern, J., & Barbier-Brygoo, H. (2000). Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, *21*, 361-371.
- Gögelein, H., Dahlem, D., Englert, H. C., & Lang, H. J. (1990). Flufenamic acid, mefenamic acid and niflumic acid inhibit single nonselective cation channels in the rat exocrine pancreas. *FEBS Letters*, *268*, 79-82.
- Gojon, A., Nacry, P., & Davidian, J. C. (2009). Root uptake regulation: a central process for NPS homeostasis in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, *12*, 328-338.
- Hedrich, R., & Geiger, D. (2017). Biology of SLAC 1-type anion channels—from nutrient uptake to stomatal closure. *New Phytologist*, *216*, 46-61.
- Hinsinger, P. (2001). Bioavailability of soil inorganic P in the rhizosphere as affected by root-induced chemical changes: a review. *Plant and Soil*, *237*, 173-195.
- Hlavinka, J., Nauš, J., & Fellner, M. (2013). Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, *209*, 75-80.
- Huala, E., Oeller, P. W., Liscum, E., Han, I. S., Larsen, E., & Briggs, W. R. (1997). *Arabidopsis* NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, *278*, 2120-2123.
- Hurth, M. A., Suh, S. J., Kretschmar, T., Geis, T., Bregante, M., Gambale, F., Martinoia, E., & Neuhaus, H. E. (2005). Impaired pH homeostasis in *Arabidopsis* lacking the vacuolar dicarboxylate transporter and analysis of carboxylic acid transport across the tonoplast. *Plant Physiology*, *137*, 901-910.
- Cho, M. H., & Spalding, E. P. (1996). An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *93*, 8134-8138.
- Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, *58*, 21-45.
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., & Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology*, *56*, 401-413.
- Christie, J. M., Salomon, M., Nozue, K., Wada, M., & Briggs, W. R. (1999). LOV (light, oxygen, or voltage) domains of the blue-light photoreceptor phototropin (*nph1*): binding

sites for the chromophore flavin mononucleotide. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *96*, 8779-8783.

Inoue, S. I., & Kinoshita, T. (2017). Blue light regulation of stomatal opening and the plasma membrane H⁺-ATPase. *Plant Physiology*, *174*, 531-538.

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.

Jentsch, T. J. (2008). CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, *43*, 3-36.

Jentsch, T. J., Steinmeyer, K., & Schwarz, G. (1990). Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature*, *348*, 510-514.

Kong, S. G., Kagawa, T., Wada, M., & Nagatani, A. (2013). A C-terminal membrane association domain of phototropin 2 is necessary for chloroplast movement. *Plant and Cell Physiology*, *54*, 57-68.

Lin, C., & Shalitin, D. (2003). Cryptochrome structure and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, *54*, 469-496.

Lin, C., & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology*, *6*, 1-9.

Liscum, E., & Briggs, W. R. (1995). Mutations in the NPH1 locus of *Arabidopsis* disrupt the perception of phototropic stimuli. *The Plant Cell*, *7*, 473-485.

lv, Q. D., Tang, R. J., Liu, H., Gao, X. S., Li, Y. Z., Zheng, H. Q., & Zhang, H. X. (2009). Cloning and molecular analyses of the *Arabidopsis thaliana* chloride channel gene family. *Plant Science*, *176*, 650-661.

Marmagne, A., Vinauger-Douard, M., Monachello, D., De Longevialle, A. F., Charon, C., Allot, M., Rappaport, F., Wollmann, F. A., Barbier-Brygoo, H., & Ephritikhine, G. (2007). Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *Journal of Experimental Botany*, *58*, 3385-3393.

Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A., Geiger, D., Martein, I., Martionia, E., & Hedrich, R. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal*, *63*, 1054-1062.

- Młodzińska, E., & Zboińska, M. (2016). Phosphate uptake and allocation—a closer look at *Arabidopsis thaliana* L. and *Oryza sativa* L. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1198.
- Moni, A., Lee, A. Y., Briggs, W. R., & Han, I. S. (2015). The blue light receptor Phototropin 1 suppresses lateral root growth by controlling cell elongation. *Plant Biology*, 17, 34-40.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497
- Nemhauser, J., & Chory, J. (2002). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book/American Society of Plant Biologists*, 1.
- Parks, B. M., Cho, M. H., & Spalding, E. P. (1998). Two genetically separable phases of growth inhibition induced by blue light in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Physiology*, 118, 609-615.
- Pudasaini, A., Shim, J. S., Song, Y. H., Shi, H., Kiba, T., Somers, D. E., Imaizumi, T., & Zoltowski, B. D. (2017). Kinetics of the LOV domain of ZEITLUPE determine its circadian function in *Arabidopsis*. *Elife*, 6, e21646.
- Raghothama, K. G. (1999). Phosphate acquisition. *Annual Review of Plant Biology*, 50, 665-693.
- Raschke, K., Shabahang, M., & Wolf, R. (2003). The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta*, 217, 639-650.
- Roberts, S. K. (2006). Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*, 169, 647-666.
- Roelfsema, M. R. G., Hanstein, S., Felle, H. H., & Hedrich, R. (2002). CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal*, 32, 65-75.
- Sakamoto, K., & Briggs, W. R. (2002). Cellular and subcellular localization of phototropin 1. *The Plant Cell*, 14, 1723-1735.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwarz, M., Scheaffer, J., Assmann, S. M., & Schroeder, J. I. (1995). Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant physiology*, 109, 651-658.
- Spalding, E. P. (2000). Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell & Environment*, 23, 665-674.

- Spalding, E. P., & Cosgrove, D. J. (1989). Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta*, *178*, 407-410.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2002). *Plant Physiology* (3. vydání). Sinauer Associates.
- Tavares, B., Domingos, P., Dias, P. N., Feijo, J. A., & Bicho, A. (2011). The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany*, *62*, 2273-2298.
- Thomine, S., Guern, J., & Barbier-Brygoo, H. (1997b). Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *The Journal of Membrane Biology*, *159*, 71-82.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Boufflet, M., Guern, J., & Barbier-Brygoo, H. (1997a). Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiology*, *115*, 533-542.
- Tsay, Y. F., Schroeder, J. I., Feldmann, K. A., & Crawford, N. M. (1993). The herbicide sensitivity gene *CHL1* of *Arabidopsis* encodes a nitrate-inducible nitrate transporter. *Cell*, *72*, 705-713.
- Wang, L., Chen, K., & Zhou, M. (2021). Structure and function of an *Arabidopsis thaliana* sulfate transporter. *Nature Communications*, *12*, 1-8.
- Wang, Q., & Lin, C. (2020). Mechanisms of cryptochrome-mediated photoresponses in plants. *Annual Review of Plant Biology*, *71*, 103-129.
- Ward, J. M., Mäser, P., & Schroeder, J. I. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annual Review of Physiology*, *71*, 59.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*, *88*, 967-988.

ZKRATKY

9-AC	anthracen-9-karboxylová kyselina
ABA	abscisic acid (kyselina abscisová)
ALMT	aluminium-activated malat transporter (hliníkem aktivovaný malátový přenašeč)
AttDT	<i>Arabidopsis thaliana</i> tonoplast dicarboxylated transporter (<i>Arabidopsis thaliana</i> vakuolární přenašeč malátu)
BL	blue light (modré světlo)
Chl	chloroplast
CLC kanály	chloride channel (chloridové kanály)
CRY	cryptochrome (krytochrom)
CRY-DASH	krytochrom – <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocystis</i> , human
DAS	DQXVP-acidic-STAES
DIDS	4,4'-diisothiokyanatostilbene-2,2'-disulfonová
FAD	flavin adenin dinukleotid
FMN	flavin mononukleotid
FRL	far-red light (dlouhovlnné červené světlo)
HATS	high-affinity transporters (vysoko afinitní transport)
LATS	low-affinity transport (nízko afinitní transport)
LOV doména	(light-oxygen-voltage) doména
MES	2-(N-morfolino)ethanosulfonová kyselina
MS médium	Murashige a Skoog základní médium
MTHF	5,10-methylentetrahydrofolát, pterin
NIF	niflumic acid (kyselina niflumová)
NPPB	5-nitro-2-(3-fenylproyl amino)benzoová kyselina
NRT přenašeče	nitrate transporter (přenašeče dusičnanových aniontů)
PAR	photosynthetically active radiation (fotosynteticky aktivní záření)
PHOT	phototropin (fototropiny)
PHT	phosphate transporter (fosfátový přenašeč)
PHY	phytochrome (fytochrom)
RL	red light (červené světlo)
SULTR	sulfate transporter (síranový přenašeč)
TAG	triacylglycerol
ZTL	zeitlupe