

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Zapojení fotoreceptorů a akvaporinů
v klíčení semen**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Jan Skácel
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Jan Skácel
Název práce Zapojení fotoreceptorů a akvaporinů
v klíčení semen
Typ práce Bakalářská
Pracoviště Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce 2016

Abstrakt

Předmětem předkládané bakalářské práce bylo studium citlivosti klíčení fotomorfogenních mutantů v podmínkách *in vitro* k inhibitoru rostlinných akvaporinů HgCl₂ v závislosti na světelných podmínkách. Cílem práce bylo zjistit, zda rostlinné akvaporiny hrají úlohu v klíčení semen, zda jejich aktivita či množství může být ovlivněno modrým světlem, a kterými fotoreceptory může být účinek světla zprostředkován. Experimentálními rostlinami byly mutanti rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) s defektem v kryptochromu CRY1 a mutanti *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) s defekty ve fotoreceptorech fototropinech PHOT1 a/nebo PHOT2. Výsledky ukázaly, že klíčení semen rajčete i *Arabidopsis* je redukováno inhibitorem HgCl₂. Zatímco u rajčete modré a červené světlo zvyšovalo citlivost semen k inhibičnímu účinku HgCl₂, u *Arabidopsis* byl účinek světla právě opačný. Dále bylo zjištěno, že ve tmě u mutanta rajčete *cry1-1* bylo klíčení semen citlivější k inhibitoru než klíčení u nemutované rostliny a že světlo citlivost semen *cry1-1* neovlivňuje. U *Arabidopsis* bylo zjištěno, že citlivost klíčení semen mutantů ve fotoreceptorech PHOT a rostliny *gl-1* k HgCl₂ byla podobná. Na základě těchto výsledků jsme došli k následujícím závěrům: 1) Rostlinné akvaporiny jsou zapojeny v klíčení semen; 2) Modré světlo může snižovat množství akvaporinů nebo snižovat jejich aktivitu; 3) Ovlivnění akvaporinů modrým světlem je zprostředkováno fotoreceptorem CRY1.

Klíčová slova akvaporiny, fotoreceptory, klíčení, HgCl₂, semeno
Počet stran 48
Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname Jan Skácel
Title of thesis Involvement of photoreceptors and aquaporins in seed germination
Type of thesis Bachelor
Department Laboratory of Growth Regulators
Supervisor doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation 2016

Abstract

The object of this thesis was to study the sensitivity of seed germination of photomorphogenic mutants to an inhibitor of plant aquaporins HgCl₂ in conditions *in vitro* and as a function of light quality. The aim of the study was to determine whether the plant aquaporins play a role in seed germination or whether their activity or amount may be affected by blue light and which photoreceptors can mediate the effect of light. Mutants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) with a defect in cryptochrome CRY1 and mutants of *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.) with defects in photoreceptors phototropin PHOT1 and/or PHOT2 Were used as experimental plants. The results showed that the germination of tomato and *Arabidopsis* seeds is reduced by inhibitor HgCl₂. While in tomato blue and red light increased the sensitivity of seeds to the inhibitory effect HgCl₂, in *Arabidopsis* the effect of light was just opposite. Furthermore, it was found that in the dark, seed germination of tomato mutant *cry1-1* was more sensitive to the inhibitor than seed germination in wild type plant, and that the light does not affect sensitivity of *cry1-1* seeds. In *Arabidopsis*, it has been found that seed germination sensitivity to HgCl₂ of mutants with defect in PHOT photoreceptors and plants *gl-1* was similar. Based on these results we came to the following conclusions: 1) Plant aquaporins are involved in seed germination; 2) Blue light may reduce the amount of aquaporins or reduce their activity; 3) Effect of aquaporins is mediated by a blue light photoreceptor CRY1.

Keywords aquaporins, photoreceptors, germination, HgCl₂, seed
Number of pages 48
Language Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Děkuji doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu zpracování bakalářské práce věnoval.

Obsah:

Seznam zkratk	7
1 Úvod.....	8
2 Současný stav řešené problematiky	9
2. 1 Klíčení semen	9
2. 2 Fotoreceptory	11
2. 2. 1 Fytochromy.....	11
2. 2. 2 Kryptochromy.....	13
2. 2. 3 Fototropiny	13
2. 2. 4 Fotoreceptory a klíčení	14
2. 3 Akvaporiny	16
2. 3. 1 Struktura akvaporinů	17
2. 3. 2 Rozdělení akvaporinů	18
2. 3. 3 Regulace akvaporinů	21
2. 4 Regulace akvaporinů světlem.....	23
3 Materiál a metody	24
3. 1 Rostlinný materiál	24
3. 2 Příprava kultivačního média MS.....	25
3. 3 Koncentrace inhibitoru HgCl ₂	25
3. 4 Sterilizace a výsev semen.....	25
3. 5 Vyhodnocení klíčivosti semen	26
4 Výsledky	28
4. 1 Klíčení semen <i>Solanum lycoperscium</i>	28
4. 2 Klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	33
5 Diskuze.....	38
6 Závěr	41
Citovaná literatura.....	42

Seznam zkratek

APQ1	akvaporin 1 červených krvinek
BL	<i>blue light</i> , modré světlo
cDNA	komplementární DNA
CRY	krytochrom
D	<i>dark</i> , tma
FMN	<i>flavin mononukleotide</i> , flavin mononukleotid
FR	<i>far-red light</i> , dlouhovlnné červené světlo
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , zelený fluorescenční protein
LOV	<i>light/oxygen/voltage</i> doména
MIP	<i>major intrinsic proteins</i>
MS médium	Murashige a Skoog médium
NIP	<i>nodulin-like intrinsic proteins</i>
Pfr	<i>far-red light-absorbing form of phytochrome</i> , biologický aktivní forma fytochromu
Phot	fototropin
Phy	fytochrom
PIP	<i>plasma membrane intrinsic proteins</i>
Pr	<i>red light-absorbing form of phytochrome</i> , neaktivní forma fytochromu
RL	<i>red light</i> , červené světlo
SIP	<i>small basic intrinsic proteins</i>
STK	<i>Serine/threonine kinase</i> , serin/threoninová kináza
TIP	<i>tonoplast intrinsic proteins</i>
XIP	<i>X intrinsic proteins</i>

1 Úvod

Fotoreceptory jsou receptory určené pro vnímání světla, jeho intenzity, barvy a směru paprsků. Důležitým typem světla je modré světlo, které hraje významnou roli v regulaci nejrůznějších procesů v těle rostlin. Akvaporiny jsou membránové proteiny tvořící kanály. Nachází se v plazmatické membráně a intracelulárních membránách rostlinných buněk, kde usnadňují přepravu vody, malých neutrálních rozpuštěných látek nebo plynů.

Hlavním cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, zdali jsou rostlinné akvaporiny zapojeny v klíčení semen, a zda jejich aktivita či množství může být ovlivněno modrým světlem. Strategií byl pak genetický přístup (analýza mutantů), při kterém bylo studováno klíčení ovlivněné inhibitorem HgCl_2 současně i světlem o různé kvalitě (D, BL, RL). Modelovými rostlinami byly rajče jedlé *Solanum lycopersicum L.* a huseníček rolní *Arabidopsis thaliana L.* (Heynh.). Významnými genotypy jsou zde mutanti rajčete *cry1-1*, *cry1-2* a mutanti *Arabidopsis phot1*, *phot2* a *phot1phot2* mající defekt v určitém genu kódující fotoreceptor pro modré světlo. Pomocí farmakologického přístupu, spočívajícího v aplikaci inhibitoru akvaporinů, HgCl_2 bylo studováno klíčení semen mutantů rajčete a *Arabidopsis*, s defekty ve fotoreceptorech CRY1, Phot1 a Phot2 ve tmě, na modrém a červeném světle. Použitou metodikou bylo studium klíčení semen *in vitro*.

Bakalářské práce byla prováděna v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci, konkrétně ve Skupině molekulární fyziologie pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. Finančně byly experimenty podporovány prostředky z projektu OPVK (č. projektu CZ.1.07/2.3.00/30.0004) a prostředky Laboratoře růstových regulátorů.

2 Současný stav řešené problematiky

2. 1 Klíčení semen

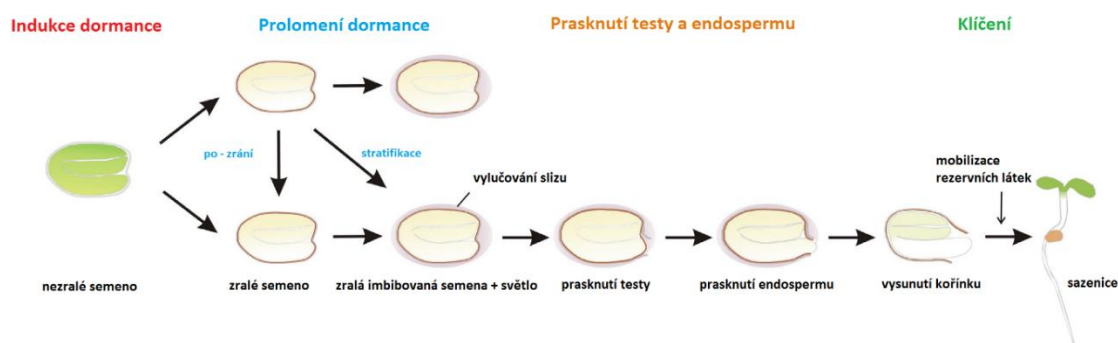
Semena jsou důležitou fází životního cyklu vyšších rostlin s ohledem na jejich přežití jako druhu. Jedná se o rostlinné jednotky, které jsou schopny přežít období mezi zráním a vznikem nové generace rostliny. Semena, převážně v suchém stavu, jsou dobře vybavená proti dlouhotrvajícím nepříznivým podmínkám. Pro optimalizaci klíčivosti za určitou dobu dochází ke vstupu semen do klidového období tzv. dormance. Semena, nacházející se ve stavu dormance, byla definována jako životaschopná semena postrádající schopnost klíčit za vhodných podmínek. U některých druhů rostlin se vyskytovala semena, která byla schopna klíčit, avšak celý proces nemohl být dokončen, jelikož okolní struktury obklopující embryo, bránily průniku kořínku ze semena. Tento jev je znám jako obalem řízená dormance (z *angl. the coat-enhanced dormancy*) (Bradford, 1996).

Klíčení je děj, při kterém dochází k různým procesům a přeměnám semene. Zahrnuje počáteční události, kam patří příjem vody a finální události, při kterých dochází k prodloužení zárodečné osy. Příjem vody semenem probíhá ve třech etapách. První etapa se vyznačuje postupnou zvyšující se rychlostí absorpce vody. Při druhé etapě dochází k jejímu stabilizování na určitou hodnotu. V poslední etapě je rychlost absorpce opět zvýšena (Bewley et Black, 1994). Klíčení se na buněčné úrovni projevuje v několika znacích. Jedním z těchto znaků je obnovení základních buněčných procesů, jako je transkripce, translace a oprava DNA. Následuje buněčná elongace a nakonec, v době vysunutí kořínku, dojde k obnovení buněčného dělení (Barroco et al., 2005; Masubelele et al., 2005).

Z hlediska fyzikálního je klíčení dvoufázový proces. Při první fázi dochází k protržení vnějšího obalu semene, testy, které je následováno prasknutím endospermu. Druhá fáze se vyznačuje prasknutím mikropylárního endospermu a vysunutím kořínku. Situace, kdy kořínek pronikne strukturou obklopující embryo, je obvykle známa pod pojmem „viditelné klíčení“, jenž značí ukončení celého procesu. (Obr. 1; Karszen, 1976; Hopher et Roberts, 1985; Leubner-Metzger et al., 1995; Krock et al., 2002; Petruzzelli et al., 2003; Leubner-Metzger, 2003; Liu et al., 2005).

Klíčení je indukováno nejrůznějšími faktory prostředí, avšak jedním z nejdůležitějších faktorů je světlo. Světlo bývá většinou zachycováno fotoreceptory fytochromy. Klasickým příkladem organismu, u kterého dochází k indukci klíčení

světlem, jsou semena *Arabidopsis*. Taková semena pak bývají označována jako fotoblastická (vyžadující světlo). Díky aktivaci fytochromů světlem dochází k indukci syntézy giberelinů důležitých pro vývoj rostliny. Naopak semena nefotoblastická (nevyžadující světlo), která jsou typická pro rajče, dobře klíčí i po rehydrataci ve tmě. Rozhodujícím faktorem, který klíčení umožňuje je Pfr forma fytochromů nacházejících se v semenech. Semena rajčete jsou citlivá ke světlu maximálně 16 hodiny od počátku rehydratace (Georghiou et Kendrick, 1991; Appenroth et al., 2006; Sawada et al., 2008).



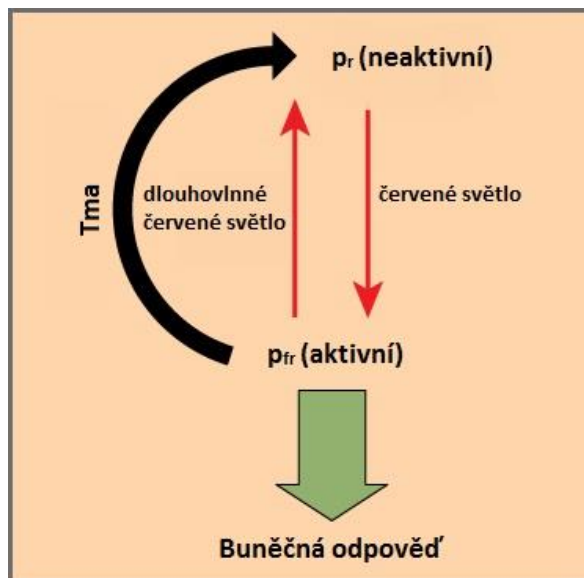
Obrázek 1. Klíčení semen *Arabidopsis thaliana*. Zralá semena *Arabidopsis* mohou být jak dormantní, tak nedormantní. Dormantní semena, po vystavení správným podmínkám prostředí (voda, světlo), klíčit nebudou. Dormance semen může být prolomena suchým skladováním nebo stratifikací (převzato a upraveno od Bentsink et Koornneef, 2008).

2. 2 Fotoreceptory

Na rozdíl od zvířat rostliny nejsou schopné pohybu, což jim znemožňuje unikat před nepříznivými podněty prostředí. Tyto podněty pak ovlivňují vývoj celé rostliny. Ze všech podnětů je světlo nejdůležitějším stimulem rostlinného vývoje. U rostlin se vyvinula řada schopností vnímání kvality, kvantity, směru a doby světla a interpretace těchto signálů, aby došlo ke správné fyziologické a vývojové odpovědi (Möller et al., 2002; Montgomery et Lagarias, 2002). K monitorování světla si rostliny vyvinuly řadu fotoreceptorů, které jsou charakteristické pro různé vlnové délky, jež vnímají. Červené a dlouhovlnné červené světlo (z *angl.* *red/far-red*), které dosahuje vlnové délky 600-750 nm, je vnímáno skupinou fotoreceptorů nazývajících se fytochromy. Modré a UV-A světlo, jež dosahuje vlnové délky 320-500 nm je vnímáno např. kryptochromy a fototropiny. Byl rovněž identifikován fotoreceptor UVR8, který pravděpodobně vnímá UV-B světlo o vlnové délce 282-320 nm. Tento fotoreceptor však není ještě dostatečně prozkoumán (Kendrick et Kronenberg, 1994; Briggs et Huala, 1999; Briggs et Christie, 2002).

2. 2. 1 Fytochromy

Fytochromy patří mezi fotoreceptory absorbující červené a dlouhovlnné červené světlo. Jsou známy jako regulátory klíčení při působení světla na semena (Borthwick et al., 1952; Shinomura et al., 1994). Z molekulárního hlediska je fytochrom, vyskytující se v rostlinách jako rozpustný homodimer, složený z apoproteinu, který je kovaletně navázaný na lineární tetrapyrrolový chromofor. Existují dvě různé fotoreversibilní formy fotoreceptorů. U rostlin rostoucích ve tmě, se nachází fytochrom v neaktivní červené světlo-absorbující Pr formě. Při vystavení Pr červenému světlu, dojde ke konverzi fytochromu na formu Pfr, absorbující dlouhovlnné červené světlo. Pfr je obecně považován za biologicky aktivní formu fytochromu a může být zpětně přeměněn na formu Pr dalším vystavením červenému světlu. Změna mezi Pr a Pfr je spojena, jak s konformační změnou ve struktuře fytochromů, tak i se změnami absorpčních maxim od 666 nm (Pr) do 750 nm (Pfr) (Obr. 2; Quail, 1997).



Obrázek 2. Systém změny konformace fytochromu: Při osvětlení červeným světlem je biologicky neaktivní forma fytochromu (Pr) převedena na biologicky aktivní formu (Pfr). Dochází k buněčné odpovědi. Následuje převedení fytochromu zpět na biologicky inaktivní formu dlouhovlnným červeným světlem a tmou (převzato a upraveno z Boundless.com).

Fytochromy můžeme rozdělit na základě jejich stability do dvou skupin. První typem fytochromů jsou fotolabilní fytochromy. Fytochromy patřící do této skupiny velmi rychle degradují po vystavení červenému či bílému světlu, na rozdíl od druhého typu fytochromů nazývajících se fotostabilní, které nedegradují (Clough et Vierstra, 1997). U *Arabidopsis* bylo objeveno pět charakteristických genů *PHYA-E* kódujících apoproteiny fytochromů. Jednotlivé geny mají odlišné, ale přesto překrývající se funkce (Sharrock et Quail, 1989). PhyA spadá do skupiny fotolabilních fytochromů, naopak PhyB-E patří do skupiny fytochromů fotostabilních. Fytochromy může být vnímáno také modré světlo (Abe et al., 1989), ale předpokládá se, že i zbývající členové skupiny fytochromů mohou mít v tomto ohledu podobnou funkci. Nicméně pouze u dvou z pěti známých fytochromů (PhyA a PhyB) bylo prokázáno, že přispívají k vnímání modrého světla (Neff et Chory, 1998; Poppe et al., 1998). Lokalizace fytochromů bývá často proměnlivá. Záleží na osvětlení rostliny světlem. Při růstu rostliny ve tmě se většinou fytochromy (PhyA a PhyB) nachází v cytoplazmě, naopak je-li rostlina vystavená světelnému záření, fytochromy jsou přesunuty do jádra (Sakamoto et Nagatani, 1996; Yamaguchi et al., 1999).

2. 2. 2 Kryptochromy

Je již dlouho známo, že rostliny na modré světlo reagují určitými biologickými odezvami. Avšak, první sekvence receptoru pro modré světlo (kryptochrom CRY1), kterou identifikovali pánové Ahmad a Cashmore u *Arabidopsis*, byla publikována až v roce 1993. Z jejich analýz vyplývá, že *Arabidopsis* obsahuje dva geny kryptochromů CRY1 a CRY2, které vykazují homologii, jak navzájem, tak i s geny fotolyázy bakteriální DNA. DNA fotolyáza patří mezi flavoproteiny nacházející se u mikrobů. Katalyzuje DNA opravy závislé na modrém/UV-A světle. Všechny fotolyázy obsahují dva chromofory. Prvním je flavin adenin dinukleotidový (FAD) chromofor. Druhým je světlosběrný chromofor tvořen buď deazaflavinem nebo pterinem (Sancar, 1994). Struktura kryptochromu obsahuje FAD a pterionový chromofor. Kryptochromy na rozdíl od DNA fotolyáz obsahují také rozšíření C-terminálních oblastí. I když přesná role těchto rozšíření není jasná, jejich význam bývá demonstrován pozorováním mutací *cry* alel právě v těchto oblastech. Podle genetických studií *Arabidopsis* byla zjištěna interakce mezi kryptochromy a fytochromy. Při interakci pak obě skupiny receptorů společně regulují různé odezvy na světlo, včetně buněčného prodlužování či fotoperiody kvetení. (Ahmad et Cashmore, 1993; Lin, 2002,1998; Sancar, 1994, 2000; Malhotra et al., 1995). Kryptochromy se v rámci rostliny vyskytují skoro ve všech rostlinných pletivech. Nicméně největším výskytem byl označen květ rostlin (Perrotta et al., 2001). V rámci rostlinné buňky je však výskyt kryptochromů CRY1 a CRY2 rozdílný. CRY1 se ve tmě vyskytuje v jádře, ale při ozáření je dopraven do cytoplazmy (Yang et al., 2001). Oproti tomu CRY2 se v jádře vyskytuje i po ozáření (Guo et al., 1999).

2. 2. 3 Fototropiny

Fototropiny patří mezi nejpozději charakterizované fotoreceptory (Briggs et Christie, 2002). Jedná se o fotoreceptory modrého světla, které regulují fotoperiodismus, pohyb chloroplastů, otevírání průduchů a expanzi listů (Christie 2007; Fankhauser et Christie 2015). Skupina rostlinných fototropinů, jež byla identifikována u *Arabidopsis*, obsahuje dva členy: Phot1 a Phot2. Tyto fototropiny vykazují úzkou sekvenční podobnost. Fototropiny se skládají ze dvou LOV (z *angl. Light/Oxygen/Voltage*) domén nacházejících se v N-terminální oblasti a jedné serin/threonin kinázové domény (STK) C-terminální oblasti (Huala et al., 1997). Na domény LOV obou zástupců (*phot1*, *phot2*) se pak váže flavinmononukleotidový chromofor (FMN) (Christie et al., 1999, Sakai et al., 2001). Největší výskyt obou fototropinů byl zaznamenán v listech a v

kořenech. Jejich subcelulární umístění závisí, stejně tak jako u předchozí skupiny, na osvětlení. Ve tmě se fototropiny nachází v cytoplazmatické membráně. Po ozáření modrým světlem dochází jejich přemístění do buněčné cytoplazmy (Kong, 2006; Sakamoto et Briggs, 2002).

2. 2. 4 Fotoreceptory a klíčení

Klíčení vyšších rostlin je složitý proces, který je ovlivněn velkým počtem genů a faktorů životního prostředí. Zatímco některá semena potřebují ke klíčení pouze rehydrataci, dormantní semena potřebují ke svému klíčení ještě další přídatné vnější vlivy jako je světlo (Bewley et Black, 1994; Casal et Sanchez, 1998). Role světelných signálů v regulaci klíčení je již dlouho známa. Podle několika studií bylo prokázáno, že světlo reguluje klíčení prostřednictvím aktivace fytochromů (Cone et Kendrick, 1986; Casal et Sanchez, 1998). Sazenice rostoucí ve tmě a semena vykazují tři různé režimy fytochromové činnosti, charakterizované rozdílným stupněm ovlivnění, které závisí na konformační fotoreverzibilitě struktury fytochromu (R/FR). Rozdělujeme je na reakce VLFR (z *angl. very low fluence response*), LFR (z *angl. low fluence response*) a HIR (z *angl. high irradiance response*).

Odezvy VLFR jsou zprostředkované fytochromy A. Tyto odezvy jsou velmi slabé a vykazují velmi nízkou R/FR fotoreverzibilitu (Smith et Whitelam, 1990). Na rozdíl od ostatních fytochromů, PhyA jeví extrémní světelnou labilitu a v Pfr formě podléhá rychlé proteolytické degradaci (Quail, 1994). Semena, nasávající vodu ve tmě, obsahují velké množství tohoto fytochromu a bývají velmi citlivá na světlo. Odhaduje se, že klíčení těchto semen by mohlo být indukované vystavením dennímu světlu po dobu několika milisekund (Smith, 1982). LFR odezvy jsou zprostředkované fytochromy ve stabilní formě Pfr (phyB) a na rozdíl od fytochromů A vykazují obrovskou R/FR fotoreverzibilitu.

V posledních letech byla role fytochromů v klíčení semen zkoumána u *Arabidopsis*. Průběh výzkumu zahrnoval analýzu klíčení wild-type rostliny, jež bylo porovnáváno s klíčením mutanta s deficitem v jednom či více fytochromech (Cone et Kendrick, 1986; Shinomura, 1997; Hennig et al., 2002). U *Arabidopsis* je klíčení primárně vyvoláno PhyB a sekundárně fytochromem PhyA (McCormac et al., 1993; Shinomura et al., 1994, 1996; Casal et Sanchez 1998; Shinomura et al., 2000). Odezvy VLFR a LFR jsou obě indukované stejným světlem, tedy dlouhovlnným červeným světlem. Nicméně u *Arabidopsis* nejsou PhyA a PhyB jedinými regulátory klíčení. Byla

pozorována indukce klíčení u dvojitého mutantu *phyAphyB*, který se vyznačuje deficitem fytochromů A i B, z toho vyplývá, že v regulaci klíčené je zapojen další fytochrom. Jedná se o fytochrom PhyE (Hennig et al., 2002).

Podobně jako u *Arabidopsis* i u rajčete existuje několik fytochrom deficientních mutantů (Kendrick et al., 1997; Emmanuel et Levy, 2002). Avšak geny kódující fytochromy u rajčete se od genů *Arabidopsis* liší. Rajče, na rozdíl od *Arabidopsis* nemá fytochromy C a D, naopak se u něj vyskytuje fytochrom F a druhý fytochrom B (Pratt et al., 1997). Na rozdíl od *Arabidopsis*, kde je potřeba aktivace fytochromů k vyvolání účinného klíčení, semena rajčete mohou klíčit při úplné tmě. Počáteční studie regulace klíčení rajčete ukázaly, že stále dlouhovlnné červené světlo působící na semena WT (wilde-type) klíčení inhibuje. Na druhou stranu v případě chromofor-deficitního mutantu *aurea* (Terry, 1997) si semena při působení stálého dlouhovlnného červeného světla zachovávají schopnost klíčení. Současně i červené světlo podporuje klíčení semen mutantu *aurea*, což naznačuje zapojení fytochromů v regulaci ve tmě klíčícího rajčete (Georghiou et Kendrick, 1991). Následně van Tuinen et al. (1995) prokázal, že semena PhyA-deficitního mutantu *fri* nevykazují inhibici zprostředkovanou dlouhovlnným červeným světlem, což značí zapojení PhyA v odpovědi na působení dlouhovlnného červeného světla.

2. 3 Akvaporiny

Akvaporiny jsou transmembránové proteiny, které fungují jako kanály umožňující selektivní transport molekul vody přes biologické membrány. Patří do velmi zachovalé a staré rodiny proteinů nazývané se MIP (z *angl. major intrinsic proteins*) s molekulovou hmotností v rozmezí 26 – 34kDa. Můžeme je nalézt téměř ve všech žijících organismech. Velmi značné zastoupení v organismu mají akvaporiny vyskytující se v rostlinných buňkách (Tyerman et al., 2002).

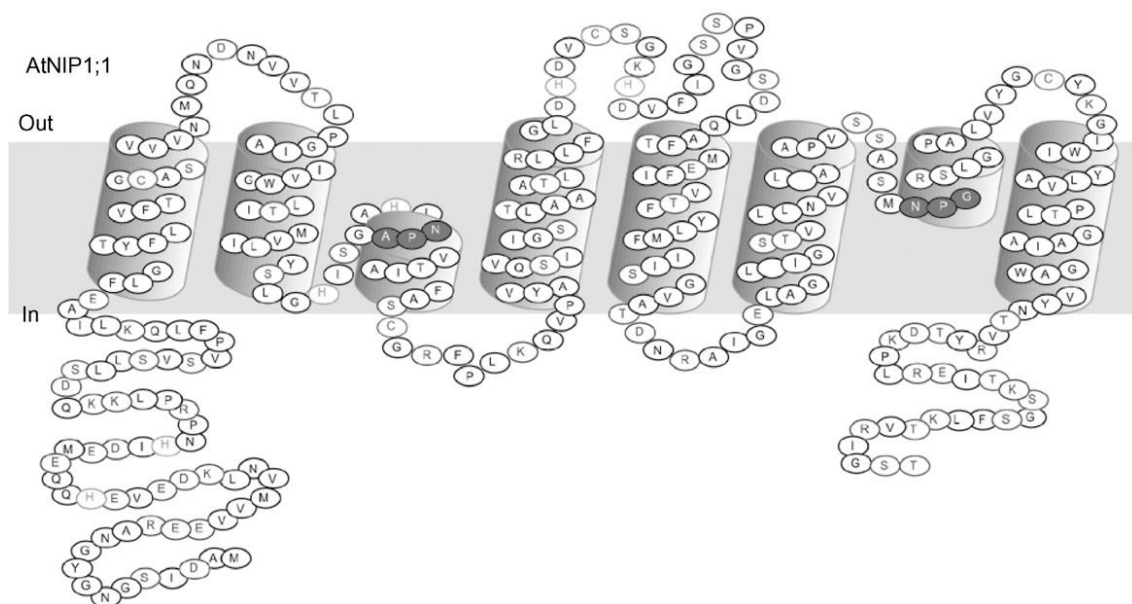
Jsou známé dva velmi důležité aspekty rostlinných akvaporinů. Prvním aspektem je jejich obrovská rozmanitost v rostlinách. V rámci genomu rostliny *Arabidopsis* bylo objeveno asi 35 různých druhů akvaporinů (Johanson et al., 2001). Dalším aspektem je multifunkčnost některých akvaporinů, dovolujících transport malých neutrálních molekul přes biologickou membránu, jako je glycerol, oxid uhličitý, amoniak, močovina, bór a peroxid vodíku (Hachez et al., 2006).

Akvaporiny jsou rozdílně exprimovány v různých orgánech a membránách. Exprese je regulována určitými environmentálními stresovými faktory, jako jsou chlad, sucho a zasolení (Tyerman et al., 2002). V rostlinné říši samotný jedinec exprimuje značně velké množství MIP homologů, jež rozdělujeme podle lokalizace v buňce do čtyř skupin. Prvními dvěma skupinami jsou akvaporiny TIP (z *angl. tonoplast intrinsic proteins*) a PIP (z *angl. plasma membrane intrinsic proteins*). Tyto dvě skupiny byly pojmenovány na základě jejich výraznému výskytu v tonoplastu a plazmatické membráně. Akvaporiny třetí skupiny, tedy NIP (z *angl. nodulin-like intrinsic proteins*) byly původně lokalizovány v peribakteroidní membráně symbiotických bakterií fixujících vzdušný dusík na kořenech luštěnin. Následně byly identifikovány i u jiných druhů rostlin a to v plazmatické membráně. Čtvrtou skupinou jsou akvaporiny SIP (z *angl. small basic intrinsic proteins*), které se pravděpodobně hromadí v membránách endoplazmatického retikula. V nedávné době byla objevena další skupina akvaporinů vyskytujících se u mechu *Physcomitrella patens* (Čepěnka odstálá) a některých dvouděložných rostlin, včetně rajčete a topolu. Nově objevená skupina byla označena XIP (z *angl. X intrinsic proteins*). Avšak podrobná lokalizace akvaporinů v buňce nebyla zatím zjištěna (Danielson et al., 2008).

2. 3. 1 Struktura akvaporinů

Obecná struktura akvaporinů byla prozkoumána teprve nedávno a většina informací pochází ze studií červených krvinek, tedy spíše jejich akvaporinu APQ1. Celé tělo akvaporinů tvoří polypeptidové podjednotky skládající se ze šesti transmembránových α -helikálních domén. Domény jsou propojeny a ohraničeny dvěma intra- a třemi extracelulárními smyčkami (A-E), dále N- a C- terminálními oblastmi, které jsou zanořené do cytosolu (Obr. 3; Murata et al., 2000).

Smyčky B a E pronikají, každá z opačné strany, do centra kanálu. Na tomto místě pak tvoří dva krátké hydrofobní α -helixy. Jeden z nich obsahuje asparagin-prolin-alaninovou sekvenci (NPA). Jedná se o základní komponentu každého akvaporinu, která tvoří selektivně determinující region. Druhý tzv. aromatic/Arg region je tvořen čtyřmi aminokyselinami a bývá označován jako proton vylučující filtr. Společně tak s transmembránovými doménami tvoří oba regiony pór akvaporinu o vysoké specifitě (Murata et al., 2000).



Obrázek 3. Struktura akvaporinu: schématická vyobrazení třídímní struktury akvaporinu založené na strukturálních studiích lidského AQP1 a GLP-F bakterie *E. coli*. (Postaire et al., 2007).

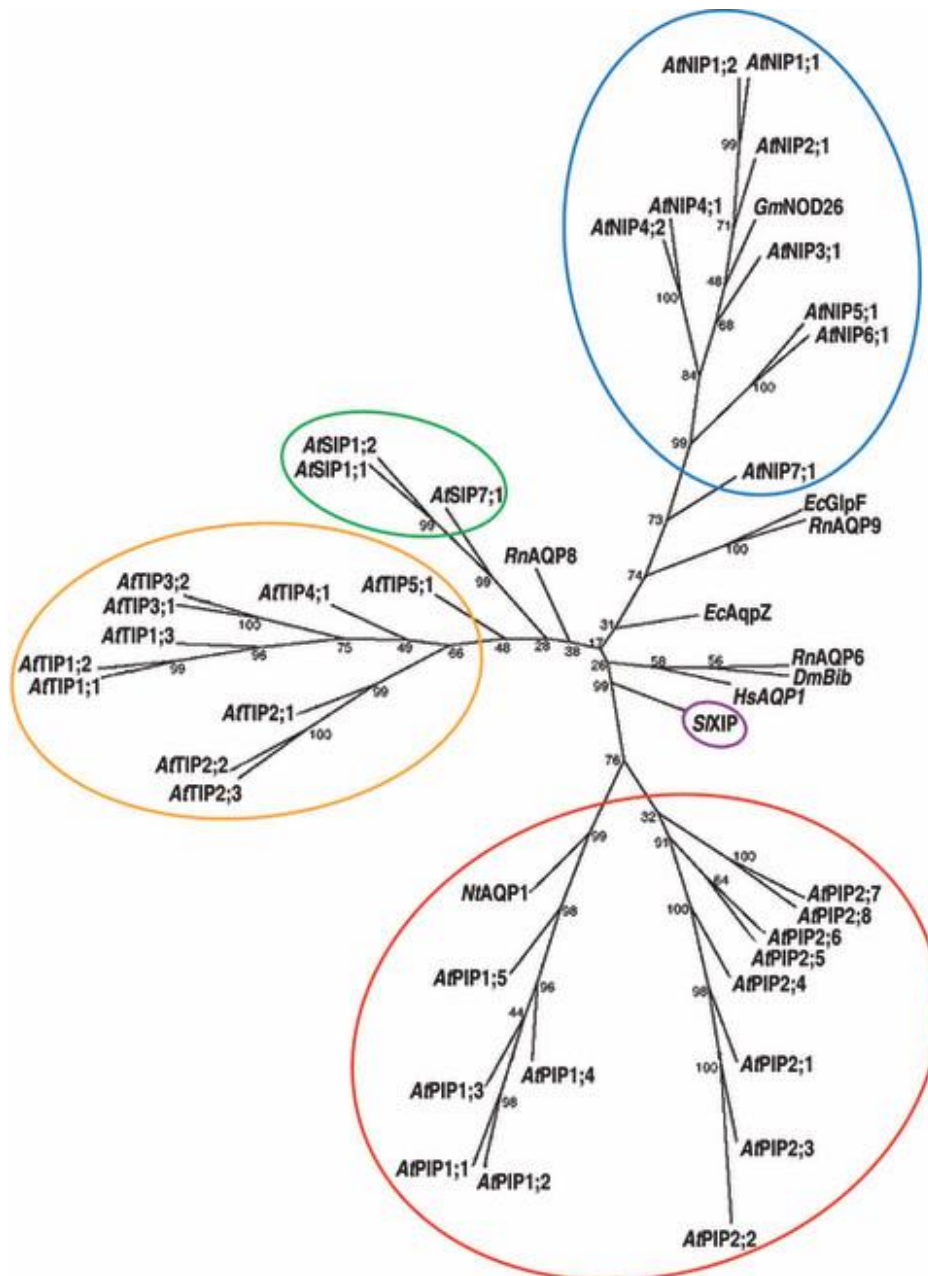
Polypeptidy akvaporinů tvoří v membráně většinou homotetramery, ačkoliv funkční jednotka při transportu vody bývá monomerní. Jeden monomer dává vznik jednomu vodnímu póru (Verkman et al., 1996). Podle Murata et al. (2000) každý monomer interaguje se dvěma sousedními monomery pravděpodobně prostřednictvím

vodíkových vazeb mezi zbytky různých transmembránových α -šroubovic. Vzhledem k tendenci tvořit agregáty, můžou rostlinné akvaporiny vytvářet také oligomery (Daniels et al., 1999).

2. 3. 2 Rozdělení akvaporinů

V současné době je známo více než 800 druhů proteinů rodiny MIP vyskytujících se u bakterií, kvasinek, prvoků, archeí, hmyzu, savců a rostlin. Na základě substrátové specifity a podobnosti proteinové sekvence, bylo těchto 800 MIP rozděleno do tří podskupin. První podskupinou jsou APQs (z *angl. aquaporins*) podílející se na vodním a iontovém transportu. Druhou podskupinou jsou GLPs (z *angl. glycerol-facilitators*) propustných pro glycerol a neutrální molekuly. Třetí a poslední podskupinou jsou GLAs (z *angl. aquaglyceroporins*), které jsou propustné zároveň pro vodu i pro glycerol (Karkouri et al., 2005).

U jednobuněčných organismů, jako jsou bakterie a kvasinky, je rozmanitost MIP nejmenší. Obvykle vlastní pouze jeden nebo dva geny kódující akvaporiny. V savčím organismu bylo zjištěno jen asi 10 druhů akvaporinů, které pravděpodobně představují celkový počet této skupiny. Zatímco v rostlinné říši dává jedna rostlina možnost vzniku podstatně většímu počtu MIP homologů. Široká rozmanitost těchto homologů byla poprvé zaznamenána, když Weig et al. (1997) identifikovali 23 různých genů MIP nacházejících se u *Arabidopsis*. Později však celkový počet těchto homologů vzrostl. Bylo identifikováno více než 35 různých isoformů MIP u *Arabidopsis* (Johanson et al., 2001) a nejméně 31 u kukuřice (Chaumont et al., 2001). Rostlinné akvaporiny můžeme tedy rozdělit do 4 podskupin: TIP, NIP, SIP a PIP.



Obrázek 4. Fylogenetický vztah rostlinných akvaporinů (AQPs) a zástupci homologů zvířat a bakterií. Obrázek popisuje kompletní set všech 35 akvaporinů rostliny *Arabidopsis thaliana*, v němž se nachází také akvaporin sóji *GmNOD26*, tabáku virginského *NtAQP1* a rajčete jedlého *SIXIP*. V červeném kruhu se nachází skupina PIP (*plasma membrane intrinsic proteins*), v oranžovém TIP (*tonoplast intrinsic proteins*), v modrém NIP (*nodulin26-like intrinsic proteins*) a v zeleném SIP (*small basic intrinsic proteins*). Vyšší rostliny mohou obsahovat i dodatečné podskupiny, jak je XIP (*X intrinsic proteins*) fialový kruh. Jsou zde uvedeny i akvaporiny savců (*HsAQP1*, *RnAQP6*, *RnAQP8*, *RnAQP9*), *Drosophily* (*DmBip*) a *Escherichii coli* (*AQPZ*, *GlpF*) (převzato a upraveno od Wudick et al., 2009).

TIP - *Tonoplast intrinsic proteins*

Rostlinná vakuola je buněčný úložný prostor, jehož hlavní funkcí je především ukládání různých látek, ať už bezpečných či nebezpečných pro buňku. Vakuola dále bývá zapojena v regulaci turgoru, buněčné signalizaci a degradaci látek. Membránou obklopující rostlinnou vakuolu je tonoplast. Vysoká rychlost transportu vody a malých rozpuštěných látek skrz tonoplast je zprostředkována akvaporiny ze skupiny TIP, díky čemuž se z vakuoly stává centrum buněčné osmoregulace. Podle Gerbeau et al. (1999), který analyzoval tonoplasty tabáku, bylo zjištěno, že akvaporiny TIP netransportují pouze vodu, ale také močovinu či glycerol. Proto, kromě jejich role jako vodních kanálů, zabezpečují také rovnováhu koncentrace močoviny v různých buněčných kompartmentech.

NIP - *Nodulin 26-like intrinsic proteins*

Mezi první popsané členy této skupiny akvaporinů patří nodulin 26, který byl nalezen u sóji. Bylo zjištěno, že k vytváření akvaporinů NIP dochází při formování kořenových hlízek, na které později nasedají symbiotické bakterie fixující vzdušný dusík (Fortin et al., 1987). Stejně jako u předchozí skupiny, akvaporiny TIP se nezaměřují jen na obousměrný transport vody, ale taky jiných rozpustných látek. Obousměrným transportem prochází například glycerol, NH₃ a ostatní látky rozpustné ve vodě. Pomocí těchto akvaporinů je zprostředkována komunikace mezi rostlinnou cytoplazmou a symbiotickými bakterioidy. V současné době je známo 9 členů akvaporinů skupiny NIP. Podle homologie v utváření pórů, můžeme jednotlivé členy rozdělit do dvou podskupin: NIP1 a NIP2 (Wallace et Roberts, 2004). Zástupci první skupiny NIP1 (NIP1;1; NIP1;2; NIP2;1; NIP3;1; NIP4;1; NIP4;2) mají velice podobnou strukturu jako původní nodulin 26. Jsou také nazývány jako aquaglycerolporiny. Druhá skupina NIP2 (NIP5;1, NIP6;1, NIP7;1) se od první skupiny NIP výrazně liší. Rozdílnost těchto dvou skupin spočívá v místě, kde dochází k fosforylaci a tedy k regulaci celého akvaporinu (Weaver et Roberts, 1992).

SIP - *Small intrinsic proteins*

Jak už název napovídá, jedná se o skupinu proteinů MIP malé velikosti. Dokonce i zastoupení v rostlinách je velmi nízké. Skupina SIP byla identifikována pomocí fylogenetické analýzy jednotlivých proteinů ve spojení se studii databáze modelových rostlin (Johanson et Gustavsson, 2002). Charakter proteinu této skupiny je

velmi bazický. Hlavním důvodem jejich malé velikosti v porovnání s ostatními skupinami MIP proteinů, je přítomnost mnohem kratší N-terminální oblasti, směřující do cytosolu. Podobnou N-terminální oblast můžeme pozorovat u akvaporinu *Escherichia coli* AqpZ. Lokalizace akvaporinů SIP byla po dlouhou dobu velkou záhadou. Velký pokrok učinil až Ishikawa et al. (2005), který k jejich lokalizaci využil zelený fluorescenční protein GFP a díky tomu zjistil, že nejvíce akvaporinů skupiny SIP se nachází na povrchu endoplazmatického retikula. Naopak v plazmatické membráně či tonoplastu byl výskyt SIP mizivý.

PIP - Plasma membrane intrinsic proteins

PIP proteiny představují skupinu s největším počtem členů. Skládá se z 13 členů nalezených v *Arabidopsis* a kukuřici. Jak už název skupiny napovídá, hlavním výskytem těchto akvaporinů je plazmatická membrána, většinou všech buněk v rostlině tzn. kořenové části i nadzemní části. Skupinu můžeme rozdělit do dvou podskupin nazývajících se PIP1 a PIP2. Jejich rozdílnost spočívá v délce N- a C-terminální oblasti a také v propustnosti vody. Akvaporiny, které patří do podskupiny PIP2 vykazují vyšší propustnost vody než PIP1 akvaporiny. Opět může docházet k transportu nejen vody, ale také jiných látek jako je glycerol, močovina a plyny (př. CO₂ nebo NH₃) (Prasad et al., 1998; Terashima et Ono, 2002). Funkce jednotlivých PIP1 akvaporinů není předem předurčena. Záleží na tom v jaké buňce se akvaporiny vytvoří. U akvaporinů vytvořených v buňkách kořene převládá transport vody, naopak akvaporiny, jež se vytvoří například v buňkách listů, dochází k transportu spíše malých rozpuštěných molekul či plynů (Kaldenhoff et Fischer, 2006).

2. 3. 3 Regulace akvaporinů

Vzhledem k vysoké rozmanitosti rostlinných akvaporinů existuje řada mechanismů regulace jejich aktivity a vzniku. Mezi nejznámější mechanismy patří post-translační modifikace (fosforylace, heterodimerizace), vliv pH, koncentrace cytozolického Ca²⁺, působení tlaku, sucha a jiných stresových faktorů. Působení regulačních mechanismů na aktivitu akvaporinů může být přímé nebo nepřímé skrze určité procesy, které zodpovídají za strukturální změny proteinů. Pomocí těchto mechanismů může rostlina přesně kontrolovat vodní tok nejen z buňky do buňky, ale také uvnitř buněk (Seoh et al., 1996).

Nejběžnějším způsobem regulace aktivity akvaporinu je fosforylace. Kinázy zodpovědné za fosforylaci akvaporinů jsou indukovány při odezvě na celou řadu faktorů zahrnující sucho, napadení patogeny, působení rostlinných hormonů a světla (Johansson et al., 2000; Chaumont et al., 2005). Pomocí fosforylačních analýz, byl mechanismus fosforylace studován u N- a C- terminálních oblastí serinových zbytků akvaporinů fazolu (PvTIP3;1), sóji (GmNOD26) a listu špenátu (SoPIP2;1) (Johnson et Chrispeels, 1992; Weaver et Roberts, 1991, 1992; Miao et al., 1992).

Propustnost plazmatické membrány může být dále ovlivněna dvojmocnými kationty (Ca^{2+}) a hodnotou pH. Pomocí tlakové sondy byla měřena buněčná hydraulická vodivost u suspenze buněk *Arabidopsis*. Kationty Ca^{2+} přidané do roztoku buněk, snížily hydraulickou vodivost o čtyřnásobek její původní hodnoty. Kromě toho, bylo zjištěno, že kationty H^+ reverzibilně snižují aktivitu vodních kanálů. To vedlo k předpokladu, že pH i dvojmocné kationty mají určitý vliv na propustnost membrány a dále také propojují vodní transport s buněčnou signalizací a metabolismem buněk (Gerbeau et al., 2002).

Mezi doplňkový mechanismus regulace akvaporinů patří tzv. molekulární dopravování (z *angl. molecular trafficking*). Hlavním faktorem je zde osmotický stres, který vyvolává přemísťování proteinů z tonoplastu do jiných membránových struktur. Časné účinky osmotického stresu na expresi a regulaci akvaporinů, byly analyzovány při expozici kořenů *Arabidopsis* solí (Boursiac et al., 2005).

2. 4 Regulace akvaporinů světlem

Podle Kaldenhoff et al. (1996) mohou být akvaporiny regulovány modrým světlem, jež působí na geny, které je kódují. U *Arabidopsis thaliana*, byl zkoumán efekt modrého světla, který působí na gen *AthH2*. Výsledky výzkumu ukázaly, že modré světlo zde indukuje aktivitu genu *AthH2*, a tím i množství exprimovaných akvaporinů. Aktivita genu *AthH2* může být ale také indukována bílým světlem nebo některými fytohormony jako jsou například gibbereliny a kyselina abscisová. Naopak působením červeného světla aktivita genu *AthH2* indukována není (Kaldenhoff et al., 1993).

3 Materiál a metody

Přístroje:

magnetická míchačka

pH metr

předvážky

analytické váhy

laminární box

mikrovltná trouba

růstové komory Microclima 1000; Snijders Scientific B. V., The Netherlands

Pomůcky:

pinzeta, automatická pipeta (20 µl, 1 ml, 10 ml), sterilní špičky k pipetám, lihový kahan, sterilní plastové kulaté Petriho misky (průměr 90 mm), páska z netkané textilie, 50 ml sterilní i nesterilní zkumavky, mikrozukavky, 0,5 l varné lahve, lahvička na líh, sterilní skalpel, lihová fixa, nesterilní nádoba 0,5 l.

Chemikálie:

Savo (0,6 l Savo + 0,4 l destilovaná voda), HgCl₂ (10⁻² M), MES pufr, MS medium (Murashige et Skoog, 1962), fytoagar (Duchefa Biochemie), 1 M KOH, líh 70% a 90%, sterilní destilovaná voda

3. 1 Rostlinný materiál

Pro experimenty byla použita semena dvou druhů rostlin. Prvním druhem bylo rajče jedlé *Solanum lycopersicum L.*, kultivar Money Maker (cv. MM) a z něj odvození dva recesivní mutanti *cry1-1* a *cry1-2*. Jejich mutace spočívaly v defektu kryptochromu CRY1. Mutanti byli připraveni působením gama záření (Weller et al. 2001). Semena cv. MM a obou mutantů byla laskavě poskytnuta R.E. Kendrickem, Wageningen University, Wageningen, Holandsko.

Druhým použitým druhem byl huseníček rolní *Arabidopsis thaliana L.* (Heynh.) Na rozdíl od rajčete, byly použity čtyři různé genotypy. Genetickým základem byl recesivní mutant *glabra1 (gl-1)*, v němž byly generovány defekty ve fotoreceptorech fototropinech PHOT1 a/nebo PHOT2 a vyselektováni mutanti *phot1*, *phot2* a dvojitý mutant *phot1phot2*. Mutant *glabra1* sloužil jako kontrolní genotyp.

Semena mutantů *glabra1*, *phot1*, *phot2* a *phot1/phot2* byla laskavě poskytnuta W. R. Briggsem, Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, USA.

3. 2 Příprava kultivačního média MS

Jednotlivá semena byla vyseta na předem připravené kultivační MS médium (Murashige et Skoog, 1962). 2 l média byly připraveny podle následujícího postupu: Do 1 l destilované vody bylo, za stálého míchání na magnetické míchače, přidáno 20 g sacharózy, 8,66 g MS média (Cat. no. M5524, Caisson, USA) a 390,4 mg MES pufru. Po úplném rozpuštění jednotlivých složek, byl objem vzniklého roztoku doplněn destilovanou vodou na 2 litry. pH roztoku bylo pak upraveno na hodnotu 6,1 postupným přidáváním 1 M KOH. Mezitím bylo připraveno pět půllitrových varných nádob, přičemž do každé z nich bylo naváženo 2,8 g agaru. Následně bylo do každé nádoby nalito 400 ml připraveného média. Dalším krokem byla sterilizace média pomocí autoklávu. Po sterilizaci byly nádoby uloženy do lednice až do doby použití.

3. 3 Koncentrace inhibitoru HgCl₂

Pro všechny experimenty byly využity čtyři typy médií, lišících se pouze v objemovém množství inhibitoru akvaporinů HgCl₂. Finální koncentrace HgCl₂ v médiích byly 0, 10, 20, a 30 μmol/l, přičemž pro přípravu médií s HgCl₂ byl využit zásobní roztok HgCl₂ o koncentraci 10⁻² M. Jednotlivá objemová množství inhibitoru v médiu jsou popsána v níže uvedené tabulce (Tab. 1).

Tabulka 1: Objemová množství inhibitoru HgCl₂ v 120 ml MS média

Typ média	Množství inhibitoru HgCl ₂
0 μmol/l (kontrolní)	0 μl
10 μmol/l	120 μl/120 ml
20 μmol/l	240 μl/120 ml
30 μmol/l	360 μl/120 ml

3. 4 Sterilizace a výsev semen

Pro jeden experiment bylo potřeba zhruba 380 semen v rámci jednoho genotypu. Semena rajčete byla napočítána jednotlivě, kdežto semena *Arabidopsis* musela být navážena na analytických váhách z důvodu malé velikosti. U *Arabidopsis* bylo naváženo přibližně 8 mg semen od každého genotypu, což odpovídá zhruba 400

semenům. Dále bylo nutné semena *Arabidopsis* stratifikovat kvůli synchronizaci klíčení. Stratifikace spočívala v tom, že semena byla ponechána ve vodě při teplotě +5 až 10°C a ve tmě po dobu minimálně čtyř dnů před výsevem. Semena rajčete byla povrchově sterilizována v 50 ml plastové zkumavce 3% roztokem Sava (0,6 l Savo + 0,4 l destilovaná voda) přibližně po dobu 30 minut. Vyšší účinnost sterilizace byla docílena občasným protřepáním zkumavky. Semena *Arabidopsis* byla sterilizována v 1,5 ml plastové mikrozkušavce stejným způsobem jako u rajčete. Po uplynutí 30 minut byla semena v laminárním boxu 5x propláchnuta sterilní destilovanou vodou a to v případě rajčete pomocí 10 ml pipety, v případě *Arabidopsis* pomocí 1 ml pipety.

Rozehráté MS médium bylo vychlazeno na pokojovou teplotu. Po vychladnutí, byly namíchaný a rozlity do Petriho misek čtyři typy médií o daném objemovém množství inhibitoru HgCl₂ podle výše uvedené tabulky (Tab. 1). Do každé Petriho misky bylo nalito 20 ml média. Kontrolní médium bylo označeno číslicí 0, což značí nepřítomnost HgCl₂.

Výsev semen byl proveden ve sterilním prostředí laminárního boxu. Semena rajčete byla vysévána pinzetou (sterilizace nástroje 96% ethanolem a opálením nad lihovým kahanem). Semena *Arabidopsis thaliana* byla vysévána pomocí 20 µl pipety. Na jednu Petriho misku bylo vyseto zhruba 30 – 35 semen. Po samotném výsevu byly Petriho misky zalepeny páskou z netkané textilie a uloženy vertikálně do růstových komor (Microclima 1000; Snijders Scientific B.V., The Netherlands). Semena byla kultivována po dobu 7 dnů na modrém, nebo červeném světle při teplotě 23°C. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností 10 µmol m⁻² s⁻¹ při 440 nm. Zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností 10 µmol m⁻² s⁻¹ při 660 nm. Pro kultivaci ve tmě byly misky se semeny zabaleny do alobalu a umístěny do stejné růstové komory.

3. 5 Vyhodnocení klíčivosti semen

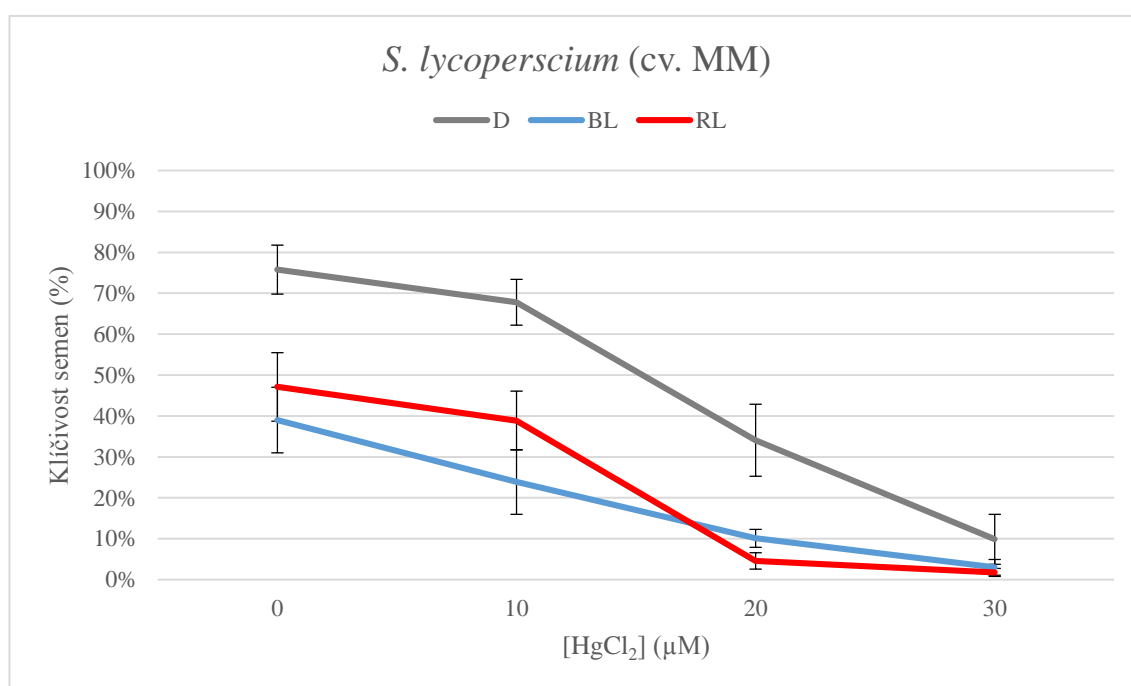
Klíčivost semen byla průběžně zaznamenávána po dobu 7 dnů, počínaje 3. dnem od výsevu, kdy semena začínala v našich experimentálních podmínkách klíčit. Po získání hodnot z jednoho experimentu u obou genotypů byla klíčivost vyjádřena v procentech. Každý experiment byl zopakován 3-5x a z těchto hodnot byly získány průměrné hodnoty. Výsledkem zpracování průměrných hodnot byl graf závislosti klíčivosti v

procentech na koncentraci inhibitoru. Veškeré zpracování bylo provedeno v programu Microsoft Excel 365.

4 Výsledky

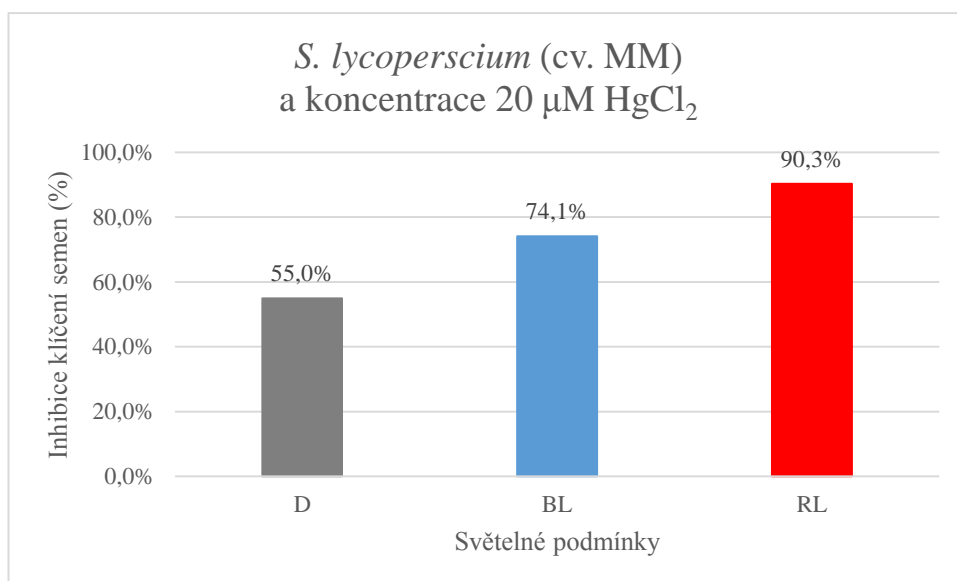
Prvním dílčím cílem experimentů bylo zjistit, zda jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen. K tomu byl použit tzv. farmakologický přístup, který spočíval v použití inhibitoru akvaporinů, HgCl_2 , a bylo studováno, zda tento inhibitor ovlivňuje proces klíčení semen. Druhým cílem bylo zjistit, zda případné zapojení akvaporinů v klíčení semen může být ovlivněno světlem. Vliv inhibitoru HgCl_2 byl proto studován ve tmě, na modrém a červeném světle. Třetím cílem bylo zjistit, zda vliv světla na funkci akvaporinů je zprostředkován specifickými fotoreceptory modrého světla, kryptochromy či fototropiny. K tomu byl využit genetický přístup, spočívající ve studiu mutantů rajčete a *Arabidopsis* s defekty v genech kódujících kryptochrom CRY1 a/nebo fototropiny Phot1 a Phot2. Všechny experimenty probíhaly v podmínkách *in vitro* pod příslušným osvětlením (D, BL, RL) a za přítomnosti HgCl_2 ve vybraných koncentracích (0, 10, 20 a 30 $\mu\text{mol/l}$).

4. 1 Klíčení semen *Solanum lycopersicum* ovlivněné inhibitorem HgCl_2 a kvalitou světla.

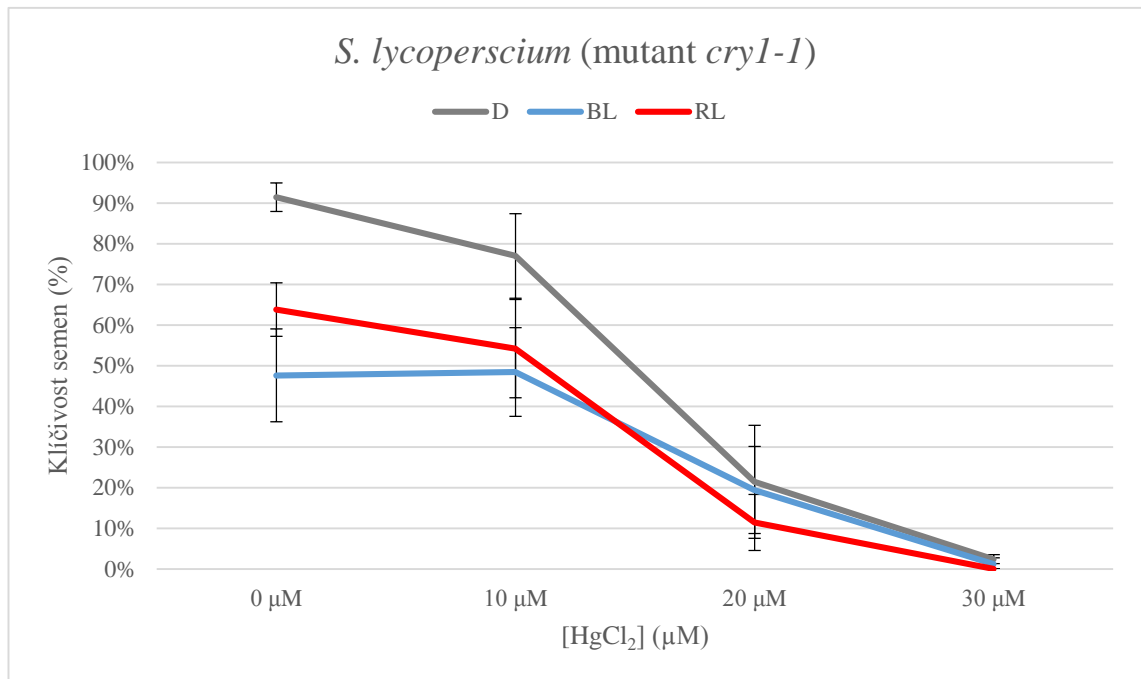


Graf 1. Procento maximální klíčivosti *Solanum lycopersicum* WT (cv. MM) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočítané z 9 nezávislých experimentů.

Výsledky v Grafu 1 ukazují, že modré a červené světlo samo o sobě výrazně snižovalo klíčení semen cv. MM. Výsledky dále dokumentují, že HgCl_2 inhibovalo klíčení semen rajčete úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru. Ve tmě lze pozorovat 50% inhibici klíčení semen při zhruba $20 \mu\text{M}$ koncentraci. Pokud byla semena kultivována na modrém či červeném světle, docházelo k silnější inhibici klíčení semen než ve tmě. Konkrétně, na modrém světle byla pozorována 50% inhibice klíčení zhruba při koncentraci $12 \mu\text{M}$ a na červeném světle to bylo asi při koncentraci $15 \mu\text{M}$. Srovnání procent inhibice klíčení semen při koncentraci $20 \mu\text{M}$ a v závislosti na světelných podmínkách ukazuje Graf 2.

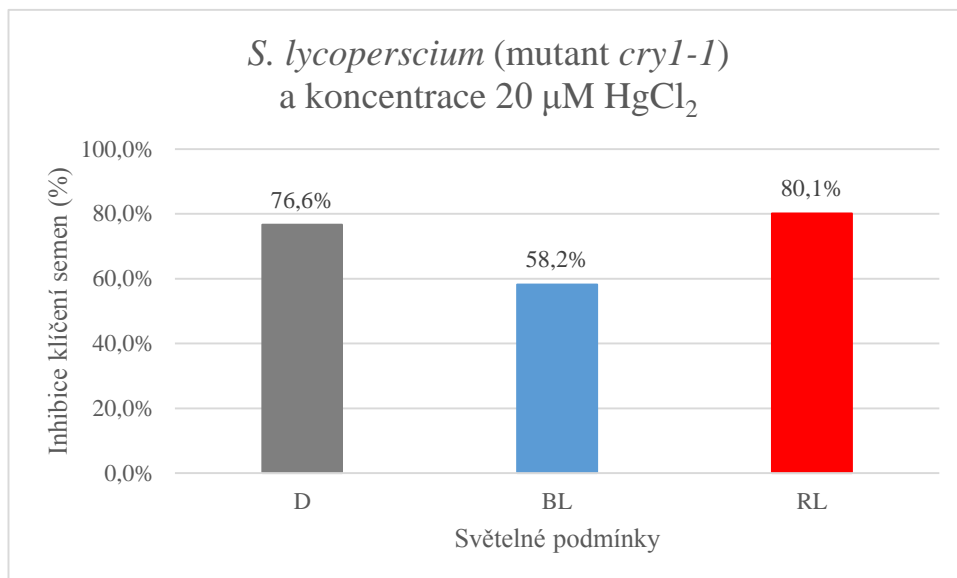


Graf 2. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Solanum lycopersicum* WT (cv. MM) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci $20 \mu\text{M}$ HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.

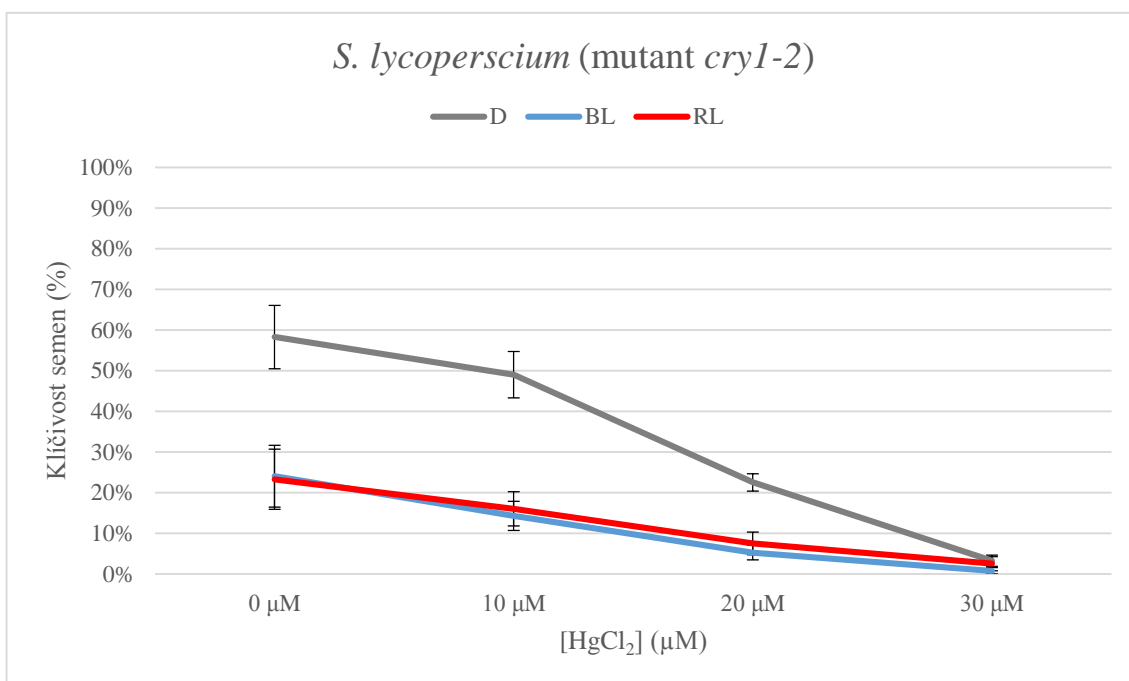


Graf 3. Procento maximální klíčivosti *Solanum lycopersicum* mutanta (*cryI-1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl₂ ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SE vypočtené z 5 nezávislých experimentů.

Působení modrého a červeného světla v případě mutanta *cryI-1* mělo podobný vliv jako u cv. MM, tedy výrazně snižovalo klíčení semen (Graf 3). Dále výsledky uvedené v Grafu 3 dokumentují, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru HgCl₂ bylo klíčení semen *cryI-1* výrazně inhibováno. Oproti cv. MM, se však klíčení semen *cryI-1* ukázalo jako citlivější k HgCl₂. Např. ve tmě lze pozorovat 50% inhibici klíčení semen při zhruba 16 μM koncentraci. Na druhou stranu semena *cryI-1* kultivovaná na modrém světle byla ve srovnání s cv. MM méně citlivá k HgCl₂. Docházelo zde k slabší inhibici než ve tmě. 50% inhibice klíčení semen byla pozorována zhruba při 19 μM. Na červeném světle semena *cryI-1* vykazovala podobnou citlivost k HgCl₂ jako cv. MM. Srovnání procent inhibice klíčení semen *cryI-1* při koncentraci 20 μM a v závislosti na světelných podmínkách ukazuje Graf 4.



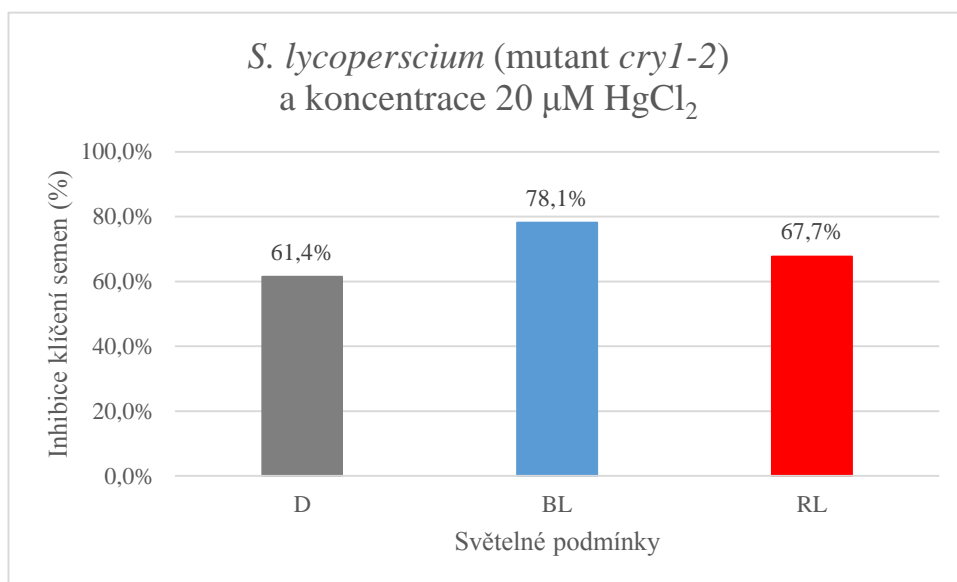
Graf 4. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Solanum lycoperscium* mutanta (*cry1-1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci 20 μM HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.



Graf 5. Procento maximální klíčivosti *Solanum lycoperscium* mutanta (*cry1-2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.

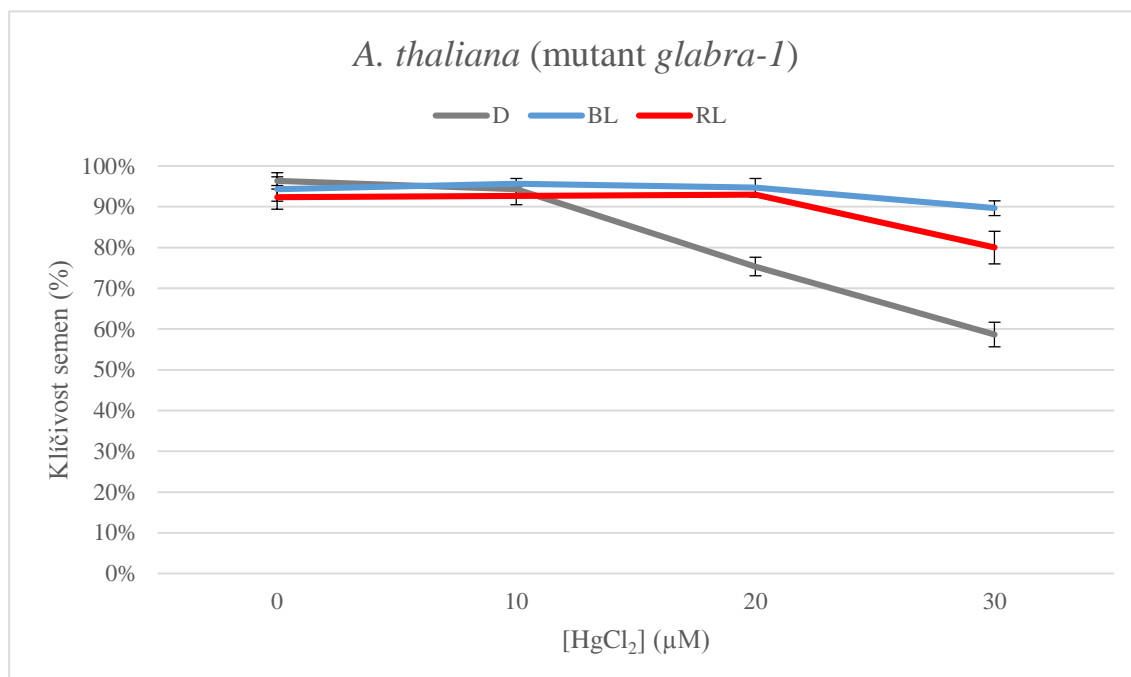
Stejně jako u cv. MM a *cry1-1* i zde výsledky ukazují, že modré a červené světlo výrazně snižovalo klíčení semen mutanta *cry1-2* (Graf 5). HgCl_2 zde mělo také podobný, inhibiční, efekt v porovnání s cv. MM a *cry1-1*. Klíčení semen *cry1-2* se

oproti cv. MM zdálo mírně citlivější k HgCl_2 , jak ve tmě tak i na modrém a červeném světle. Oproti *cry1-1* byla však citlivost klíčení semen *cry1-2* ve tmě a na červeném světle nižší (Graf 4 a 6). Na modrém světle pak semena *cry1-2* vykazovala vyšší citlivost k inhibičním účinkům HgCl_2 než semena *cry1-1*. Srovnání procent inhibice klíčení semen *cry1-2* při koncentraci $20 \mu\text{M}$ a v závislosti na světelných podmínkách ukazuje Graf 6 (pro srovnání s cv. MM a *cry1-1* viz Grafy 2 a 4).



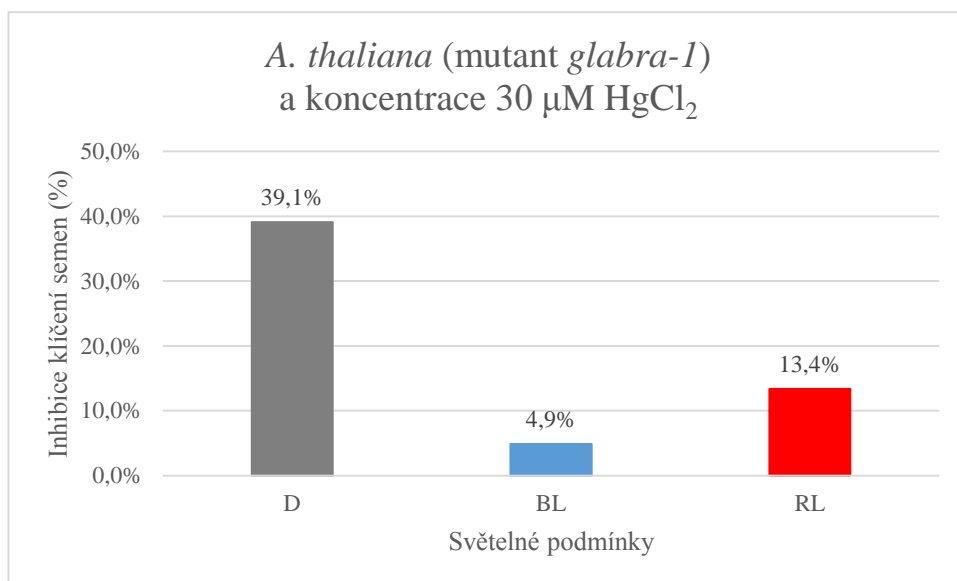
Graf 6. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Solanum lycoperscium* mutanta (*cry1-2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci $20 \mu\text{M}$ HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.

4. 2 Klíčení semen *Arabidopsis thaliana* ovlivněné inhibitorem HgCl₂ a kvalitou světla.

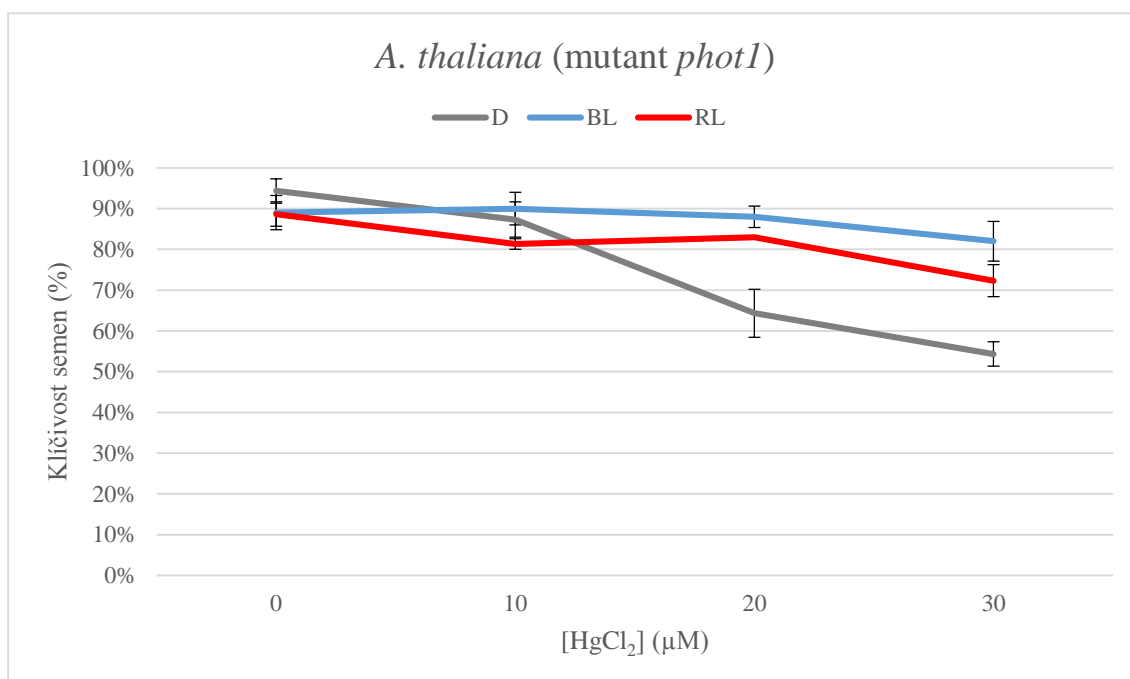


Graf 7. Procento maximální klíčivosti *Arabidopsis thaliana* mutanta (*glabra-1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl₂ ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty ± SE vypočítané ze 3 nezávislých experimentů.

V porovnání se semeny rajčete, klíčení semen *Arabidopsis* nebylo redukováno ani modrým ani červeným světlem. Podle výsledků uvedených v Grafu 7 je zřejmé že modré a červené světlo klíčení semen mutanta *glabra-1* nesnižovalo. Podobně jako u semen rajčete, HgCl₂ inhiboval klíčení semen *Arabidopsis*, ale, při stejných použitých koncentracích HgCl₂ mnohem slaběji, než tomu bylo u semen rajčete. Na rozdíl od rajčete, modré i červené světlo naopak snižovalo inhibiční účinek HgCl₂ na klíčení semen *glabra-1* (Graf 8).



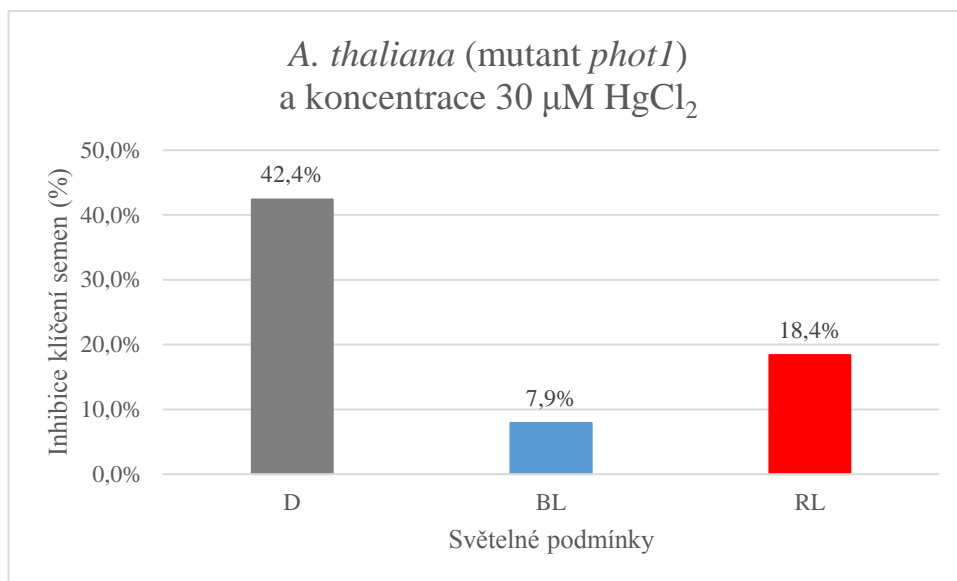
Graf 8. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutanta (*glabra-1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci 30 μM HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.



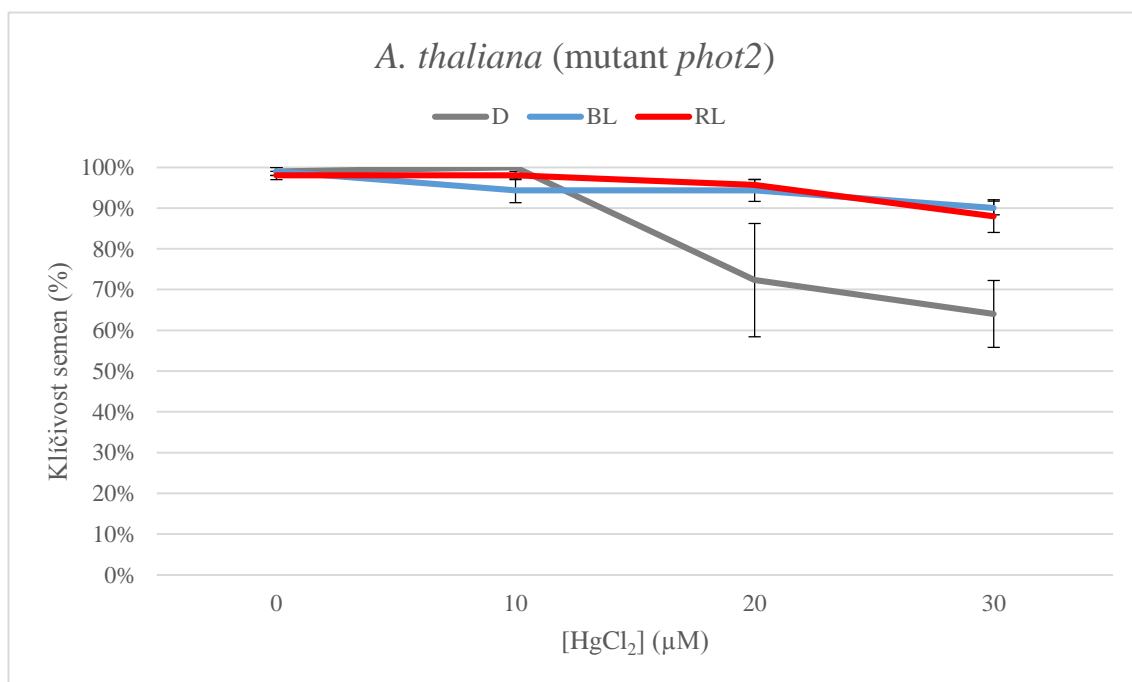
Graf 9. Procento maximální klíčivosti *Arabidopsis thaliana* mutanta (*phot1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočtené ze 3 nezávislých experimentů.

Hodnoty klíčivosti semen mutantů *phot1* a *phot 2* dosahovaly ve tmě i na modrém a červeném světle podobných hodnot jako tomu bylo u kontrolního genotypu *gl-1* a klíčení bylo rovněž inhibováno HgCl_2 úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru (Graf 9 a 11). Jak je pak zjevné z Grafu 10 a 12, modré a červené světlo opět snižovalo

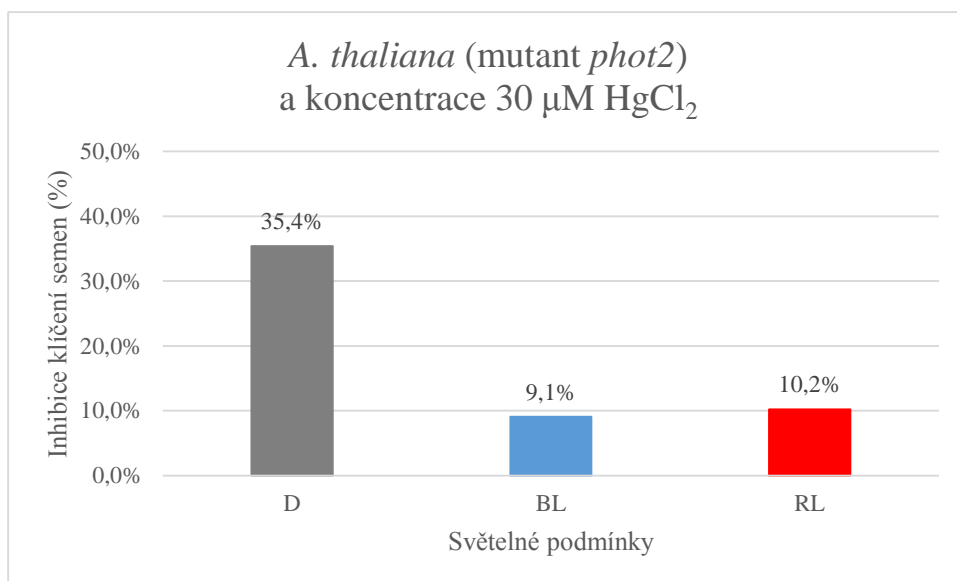
inhibiční účinek HgCl_2 na klíčení semen obou genotypů, podobně jako bylo pozorováno u *gl-1*.



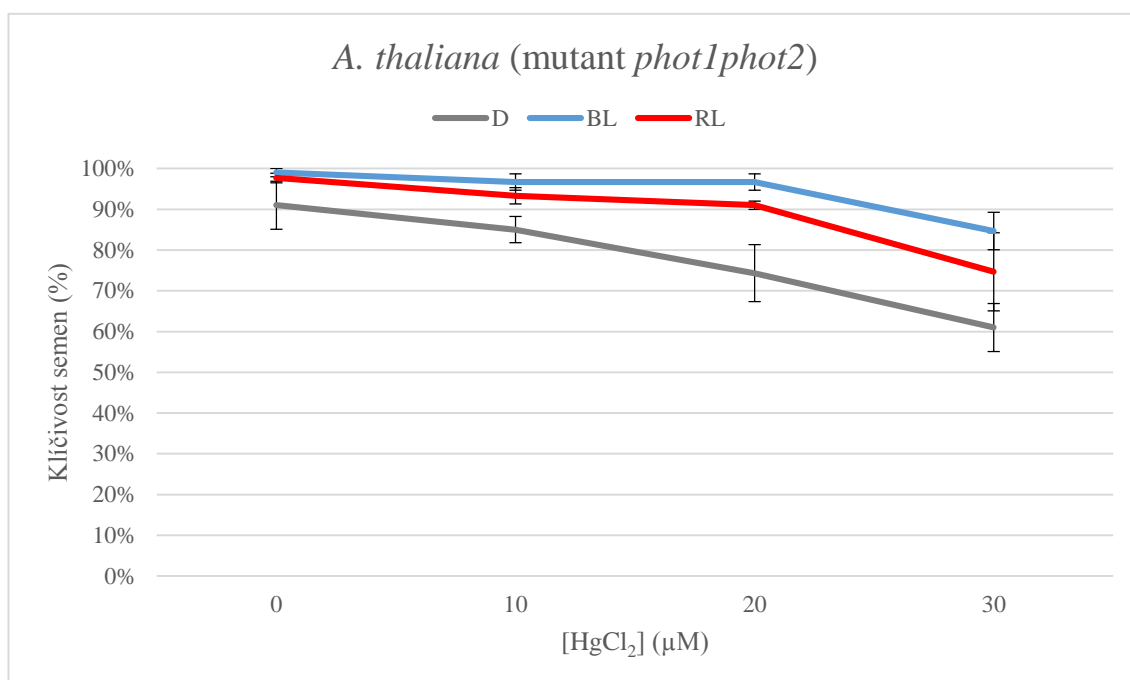
Graf 10. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutanta (*phot1*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci $30 \mu\text{M HgCl}_2$ v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.



Graf 11. Procento maximální klíčivosti *Arabidopsis thaliana* mutanta (*phot2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočtené ze 3 nezávislých experimentů.



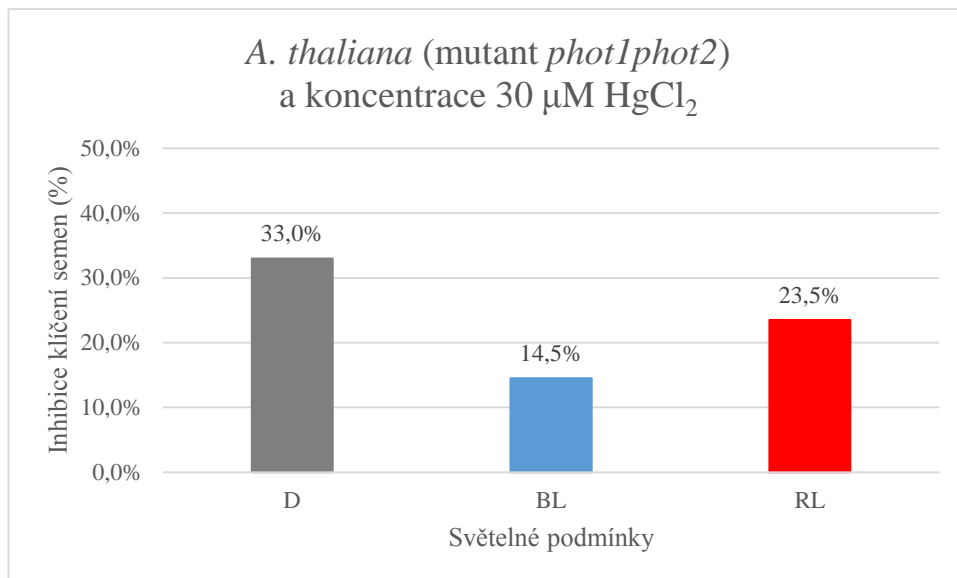
Graf 12. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutantu (*phot2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci 30 μM HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.



Graf 13. Procento maximální klíčivosti *Arabidopsis thaliana* mutantu (*phot1phot2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) ovlivněné rostoucí koncentrací inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ve tmě, na modrém (BL) a červeném (RL) světle 7. den po výsevu semen. Data reprezentují průměrné hodnoty \pm SE vypočtené ze 3 nezávislých experimentů.

V případě mutantu *phot1pho2* s oběma defektními geny *PHOT1* i *PHOT2* byly výsledky podobné jako u jednoduchých mutantů *phot1* a *phot2*. Hodnoty maximálního klíčení semen dvojitého mutantu na médiu bez přítomnosti HgCl_2 byly ve tmě, na

modrém a červeném světle podobné jako u *gl-1* i jednoduchých mutantů *phot1* a *phot2* (Graf 13, srovnání s Grafy 7, 9 a 11). Semena dvojitého mutantu ukazovala podobnou reakci k inhibičnímu účinku HgCl_2 , a to při všech použitých experimentálních podmínkách (Graf 14, srovnání s Grafy 8, 10 a 12).



Graf 14. Srovnání procent maximální inhibice klíčení *Arabidopsis thaliana* mutantu (*phot1phot2*) v podmínkách *in vitro* (MS médium) při koncentraci 30 µM HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) 7. den po výsevu semen.

5 Diskuze

Interakcí mezi akvaporiny a modrým světlem se zabýval Ralf Kaldenhoff na pracovišti Botanický ústav univerzity Hannover v Německu. Předmětem jeho výzkumu byl vliv světla na expresi a regulaci akvaporinů. Zkoumal jeden z prvních genů kódující rostlinné akvaporiny PIP1b (dříve *AthH2*). PIP1b hraje důležitou roli při prodlužování zárodečné osy. Je silně aktivován modrým a bílým světlem. Expres PIP1b akvaporinů vyvolaná modrým světlem byla pozorována již po dvou hodinách od ozáření ve tmě rostoucích rostlin *Arabidopsis*. Nicméně zda exprese akvaporinů PIP1b hraje roli během světelně řízených procesů jako je fotomorfogeneze, je třeba ještě objasnit (Kaldenhoff et al., 1993).

Podobnou problematikou působení červeného, modrého světla a inhibitoru akvaporinů HgCl_2 na klíčení semen se ve své bakalářské práci zabývala Jana Zaoralová (2007). Pro své experimenty s klíčením použila rostlinného zástupce *Lycopersicon esculentum* Mill. (nyní *Solanum lycopersicum* L.) a mutanta *7B-1*, který má s velkou pravděpodobností defekt v signální dráze modrého světla (Fellner et al. 2001; Fellner and Sawhney 2002) s podezřením na defekt ve fototropinové signalizaci (Ježilová et al. 2012; Hlavinka et al. 2013; Fellner and Bergougnoux, nepublikované výsledky). Podle svých výsledků Zaoralová zjistila, že gen *7B-1* je zapojen ve vnímání světelných signálů, které pravděpodobně ovlivňují aktivitu nebo množství akvaporinů v semenech rajčete.

První rostlinou, která byla použita v rámci experimentální části předkládané bakalářské práce, bylo rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. Bylo využito tří různých genotypů, a to WT cv. MM a od něj odvození mutanti *cry1-1* a *cry1-2*. Pro zjištění zdali jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen bylo využito HgCl_2 , který je obecně znám jako inhibitor akvaporinů (Tazawa et al., 1996, 1997; Kjellbom et al., 1999). Výsledky ukázaly, že v případě WT docházelo k postupné inhibici klíčení semen úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru. Výsledky také ukázaly že, při osvětlení BL a RL docházelo k větší inhibici klíčení semen než ve tmě. Z toho můžeme dedukovat, že BL a RL může buď snižovat expresi genů kódujících HgCl_2 -citlivé akvaporiny a nebo zvyšovat jejich citlivost k HgCl_2 . V případě mutanta *cry1-1*, který má defekt v genu pro kryptochrom 1, výsledky ukázaly, že oproti WT klíčení semen ukazuje ve tmě vyšší citlivost k HgCl_2 , zatímco na BL jsou naopak semena *cry1-1* méně citlivá k inhibičnímu účinku HgCl_2 . To naznačuje, že vliv modrého světla na citlivost klíčení semen k HgCl_2

je zprostředkován fotoreceptorem CRY1. Na základě získaných výsledků lze navrhnout mechanismus, jak by regulace akvaporinů modrým světlem prostřednictvím fotoreceptoru CRY1 mohla fungovat. Protože vliv mutace *cry1-1* na citlivost semen k HgCl₂ je ovlivněn modrým světlem, je možné usuzovat, že vliv CRY1 na akvaporiny závisí na lokalizaci fotoreceptoru CRY1 v buňce. Ve tmě se CRY1 nachází v jádře (Yang et al., 2001). V jádře může docházet k produkci akvaporinů prostřednictvím CRY1, který zde může ovlivňovat transkripční faktor regulující expresi genů kódující akvaporiny. Při působení modrého světla dochází k aktivaci CRY1 a jeho přemístění do cytoplazmy. I když malá část CRY1 zůstává v jádře, vliv na transkripční faktory ovlivňující expresi akvaporinů se sníží a tím se sníží produkce akvaporinů. Větší množství CRY1 se po aktivaci modrým světlem nachází v cytoplazmě. CRY1 v cytoplazmě by mohl interagovat přímo, nebo prostřednictvím dalšího proteinu, s plazmamembránovými akvaporiny a tím zvyšovat jejich citlivost k HgCl₂.

Mutace *cry1-1* spočívá v tom, že je do přechodu z G na A na pozici 1680 cDNA defektního genu *CRY1* vložen předčasný stop kodon, který má za následek zkrácení proteinu CRY1. Ke zkrácení dochází těsně před prodloužením C-terminální oblasti a chromofor vázající oblast je zde neporušená (Weller et al., 2001). Je tedy zřejmé, že tato oblast proteinu CRY1 je důležitá pro ovlivnění citlivosti klíčení semen k HgCl₂ modrým světlem. Mutace v *cry1-1* však neměla vliv na citlivost klíčení semen k HgCl₂ na RL. Je tedy zřejmé, že vliv červeného světla na citlivost klíčení semen k HgCl₂ je zprostředkován jiným fotoreceptorem. Na rozdíl od *cry1-1*, mutant *cry1-2* ukazoval reakce klíčení semen podobné reakcím cv. MM. Mutace *cry1-2*, způsobující ztrátu všech vazebných míst proteinu CRY1 pro interakci s FAD chromoforem (Park et al., 1995) nemění, ve tmě či na světle, reakci semen rajčete k HgCl₂. Je tedy zřejmé, že tato mutace zásadně nemění funkci CRY1 ve studované reakci klíčení semen.

Druhou experimentální rostlinou byl huseníček rolní *Arabidopsis thaliana* L. (Heynh.). Bylo využito čtyř různých genotypů. Mutant *glabra-1* sloužil jako genetický základ, od něhož byli pak dále odvozeni mutantí mající defekt v genu pro fototropiny, tedy *phot1*, *phot2*, *phot1phot2*. Výsledky ukázaly, že na rozdíl od semen rajčete, BL a RL výrazně snižovalo inhibiční účinek HgCl₂ na klíčení semen, a to podobně u všech použitých genotypů *Arabidopsis*. Výsledky tedy naznačují, že na rozdíl od semen rajčete, u fotoblastických semen *Arabidopsis* BL a RL buď zvyšovalo množství HgCl₂-citlivých akvaporinů a nebo snižovalo jejich citlivost k HgCl₂. Podle výsledků experimentů s mutanty *phot1*, *phot2* a *phot1phot2* ve srovnání s genetickým základem

glabra-1 můžeme také usuzovat, že vliv BL a RL na citlivost semen *Arabidopsis* k HgCl_2 není zprostředkován fototropiny.

Výsledky prezentovaných experimentů nastolují nové otázky. Například, zda navržená interakce CRY1 a akvaporinů během klíčení semen je obecným mechanismem fungujícím i u jiných rostlinných druhů. Odpověď na otázku, by mohly přinést podobné experimenty s jinými druhy rostlin a jejich mutanty ve fotoreceptoru CRY1. Druhou otázkou může být, zda fotoreceptory Phot1 a Phot2 opravdu nejsou zapojeny v regulaci akvaporinů modrým světlem během klíčení semen. Podobné experimenty s fototropinovými mutanty u jiných rostlinných druhů (např. rajče) by mohly tuto otázku zodpovědět.

Pro zjištění vlivu modrého světla na množství akvaporinů, nebo na citlivost akvaporinů k HgCl_2 , zapojených v klíčení semen, by mohlo být využito přímých analýz exprese genů kódujících akvaporiny nebo akvaporinů.

6 Závěr

Cílem výše předložené bakalářské práce bylo studium zapojení rostlinných akvaporinů v klíčení semen a možnost jejich regulace či exprese modrým světlem. Bylo využito farmakologického přístupu, který spočíval v aplikaci inhibitoru akvaporinů HgCl_2 . Použitou metodou bylo klíčení *in vitro* a strategie spočívala ve využití genetického přístupu (analýze mutanta). Působení HgCl_2 o různé koncentraci (0, 10, 20, 30 $\mu\text{mol/l}$) bylo studováno při klíčení semen mutantů rajčete jedlého *Solanum lycopersicum L.* a huseničku rolního *Arabidopsis thaliana L.* (Heynh.) s defekty ve fotoreceptorech CRY1 a Phot1 a Phot2 ve tmě, na modrém a červeném světle.

V případě rajčete bylo zjištěno, že akvaporiny citlivé k HgCl_2 jsou v procesu klíčení semen s největší pravděpodobností zapojeny, a to za všech světelných podmínek. Dále také můžeme říci, že modré světlo pravděpodobně snižuje expresi genů kódujících akvaporiny, nebo naopak zvyšuje citlivost akvaporinů k HgCl_2 . Mechanismus regulace akvaporinů modrým světlem je zmíněn výše v diskuzi. Červené světlo působí na klíčení semen podobně jako modré, ovšem efekt není tak silný. Podle studia mutanta *cry1-1* je patrné, že efekt modrého světla je zprostředkován kryptochromem 1. Zajímavým zjištěním je rovněž fakt, že mutant *cry1-1* ukazuje změny v citlivosti k HgCl_2 i ve tmě, což naznačuje, že fotoreceptor CRY1 ovlivňuje klíčení semen, i když není aktivován modrým světlem.

Na rozdíl od rajčete modré i červené světlo snižuje citlivost semen *Arabidopsis* k HgCl_2 . Z toho lze usuzovat, že u fotoblastických semen *Arabidopsis* světlo může zvyšovat expresi genů kódujících akvaporiny, nebo snižovat jejich citlivost k HgCl_2 . Na základě výsledků studia mutantů *phot1 phot2* a *phot1phot2* můžeme také usuzovat, že efekt modrého i červeného světla na citlivost semen *Arabidopsis* k HgCl_2 není zprostředkován fototropinem.

Citovaná literatura

- Abe H. (1989)** Amino-terminal amino acid sequences of pea phytochrome II fragments obtained by limited proteolysis. *Plant Cell Physiol.* 30: 1089-1097
- Ahmad M., Cashmore A.R. (1993)** HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with the characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 366: 162–166
- Appenroth K.J., Lenk G., Goldau L., Sharma R. (2006)** Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant Cell Environ.* 29, 701–709
- Barroco R.M., Van P.K., Bergervoet J.H., De V.L., Groot S.P., Inze D., et Engler G. (2005)** The role of the cell cycle machinery in resumption of postembryonic development. *Plant Physiol.* 137: 127-140
- Bentsink L. et Koornneef M., (2008)** Seed Dormancy and Germination, *The Arabidopsis book* 18: 3
- Bewley J.D., et Black M. (1994)** *Seeds: Physiology of Development and Germination.* (New York: Plenum Press)
- Borthwick H.A., Hendricks S.B., Parker M.W., Toole E.H., Toole V.K. (1952)** A reversible photoreaction controlling seed germination. *PNAS, USA* 38: 662–666
- Boursiac Y., Chen S., Luu D.T., Sorieul M., Van Den Dries N. et Maurel C. (2005)** Early effects of salinity on water transport in *Arabidopsis* roots. Molecular and cellular features of aquaporin expression. *Plant Physiol.* 139: 790–805
- Bradford K.J. (1996)** Population-based models describing seed dormancy behaviour: Implications for experimental design and interpretation. In *Plant Dormancy*, G.A. Lang, ed (Oxford, UK: CAB International), pp. 313-339
- Briggs W.R., Huala E. (1999)** Blue-light photoreceptors in higher plants. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 15: 33–62
- Briggs W.R., Christie J.M. (2002)** Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.* 7: 204–210
- Casal J.J., Sanchez R.A. (1998)** Phytochromes and seed germination. *Seed Sci. Res.* 8: 317–329
- Clough R.C., Vierstra R.D. (1997)** Phytochrome degradation. *Plant Cell Environ.* 20: 713–721
- Cone J.W. et Kendrick R.E. (1986)** Photocontrol of seed germination. In *Photomorphogenesis in Plants* (eds R.E. Kendrick & G.H.M. Kronenberg), pp. 443–465
- Daniels M.J., Chrispeels M.J., Yeager M. (1999)** Projection structure of a plant vacuole membrane aquaporin by electron cryo-crystallography. *J. Mol. Biol.* 294: 1337–1349

- Danielson J.A., Johanson U. (2008)** Unexpected complexity of the aquaporin gene family in the moss *Physcomitrella patens*. *BMC Plant Biol.* 8: 45
- Emmanuel E. et Levy A.A. (2002)** Tomato mutants as tools for functional genomics. *Current Opinion in Plant Biol.* 5: 112–117
- Fankhauser C., Christie J.M. (2015)** Plant Phototropic Growth. *Curr. Biol.* 25: R384–R389
- Fellner M. et Sawhney V.K. (2001)** Seed germination in a tomato male sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low temperature stresses. *Theor. Appl. Genet.* 102: 215–221
- Fellner M. et Sawhney V.K. (2002)** The 7B-1 mutant in tomato show blue light specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta.* 214: 675–682
- Fortin M.G., Morrison N.A. et Verma D.P. (1987)** Nodulin-26, a peribacteroid membrane nodulin is expressed independently of the development of the peribacteroid compartment. *Nucl. Acids Res.* 15: 813–824
- Georghiou K., Kendrick R.E. (1991)** The germination characteristics of phytochrome-deficient aurea mutant tomato seeds. *Physiol. Plant.* 82: 127–133
- Gerbeau P., Amodeo G., Henzler T., Santoni V., Ripoche P., Maurel C. (2002)** The water permeability of Arabidopsis plasma membrane is regulated by divalent cations and pH. *Plant J.* 30: 71–81
- Gerbeau P., Güçlü J., Ripoche P. et Maurel C. (1999)** Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant J.* 18: 577–587
- Guo H., Duong H., Ma N., Lin C. (1999)** The Arabidopsis blue light receptor cryptochrome 2 is a nuclear protein regulated by a blue light-dependent post-transcriptional mechanism. *Plant J.* 19: 279–287
- Hachez C., Zelazny E., Chaumont F. (2006b)** Modulating the expression of aquaporin genes in planta: a key to understand their physiological functions? *Biochim. Biophys. Acta* 1758: 1142–1156
- Hennig L., Stoddart W.M., Dieterle M., Whitelam G.C. & Schäfer E. (2002)** Phytochrome E controls light-induced germination of Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128: 194–200
- Hepher A. et d Roberts J.A. (1985)** The control of seed germination in *Trollius ledebouri*: the breaking of dormancy. *Planta* 166: 314–320
- Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E. et Briggs W.R. (1997)** Arabidopsis NPH1: a protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science* 278: 2120–2123
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J. et Jung R. (2001)** Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125: 1206–1215

- Chaumont F., Moshelion M. et Daniels M.J. (2005)** Regulation of plant aquaporin activity, *Biol. Cell* 97: 749–764
- Christie J.M. (2007)** Phototropin blue-light receptors. *Annu Rev. Plant Biol.* 58: 21–45
- 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. *PNAS, USA* 96: 8779–8783
- Ishikawa F., Suga S., Uemura T., Sato M.H. et Maeshima M. (2005)**. Novel type aquaporin SIPs are mainly localized to the ER membrane and show cell-specific expression in *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Lett* 579: 5814–5820
- Johanson U. et Gustavsson S. (2002)**. A new subfamily of major intrinsic proteins in plants. *Mol. Biol. Evol.* 19: 456–461
- 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 Physiol.* 126:1358–1369
- Johansson I., Karlsson M., Johanson U., Larsson C., Kjellbom P. (2000)** The role of aquaporins in cellular and whole plant water balance, *Biochim. Biophys. Acta* 1465: 324-342
- Johnson K.D., Chrispeels M.J. (1992)** Tonoplast-bound protein kinase phosphorylates tonoplast intrinsic protein, *Plant Physiol.* 100: 1787-1795
- Kaldenhoff R., Kölling A., Richter G. (1993)** A novel blue light- and abscisic acid-inducible gene of *Arabidopsis thaliana* encoding an intrinsic membrane protein. *Plant Mol. Biol.* 23: 1187-1198
- Kaldenhoff R., Kölling A., Richter G. (1996)** Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene *AthH2* (PIP1b). *J Photochem. Photobiol. B: Biol.* 36: 351-354
- Kaldenhoff R. et Fischer M. (2006)** Aquaporins in plants, *Acta Physiol.* 187: 169–176
- Karkouri K.E., Gueune´ H. et Delamarche C. (2005)** MIPDB: a relational database dedicated to MIP family proteins. *Biol. Cell* 97: 535–543
- Karssen C.M. (1976)** Uptake and effect of abscisic acid during induction and progress of radicle growth in seeds of *Chenopodium album*. *Physiol. Plant.* 36: 259-263
- Kendrick R.E., Kerckhoffs L.H.J., van Tuinen A. et Koornneef M. (1997)** Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant Cell and Environ.* 20: 746–751
- Kendrick R.E., Kronenberg G.H.M. (1994)** Photomorphogenesis in Plants.
- Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M. et Jophanson U. (1999)** Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Sci.* 4: 3089–314
- Kong S-G., Suzuki T., Tamura K., Mochizuki N., Hara-Nishimura I., Nagatani A. (2006)** Blue lightinduced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. *Plant J.* 45: 994–1005

- Krock B., Schmidt S., Hertweck C. et Baldwin I.T. (2002)** Vegetation-derived abscisic acid and four terpenes enforce dormancy in seeds of the post-fire annual, *Nicotiana attenuata*. *Seed Sci. Res.* 12: 239-252
- Leubner-Metzger G., Fründt C., Vögeli-Lange R., et Meins F. (1995)** Class I beta-1,3-glucanases in the endosperm of tobacco during germination. *Plant Physiol.* 109: 751-759
- Leubner-Metzger G. (2003)** Functions and regulation of beta-1,3-glucanases during seed germination, dormancy release and after-ripening. *Seed Sci. Res.* 13: 17-34
- Lin C. (2002)** Blue light photoreceptors and signal transduction. *Plant Cell Suppl.* 207–225
- Lin C. et al. (1998)** CRY2, a second member of the Arabidopsis cryptochrome gene family. *Plant Physiol.* 110: 1047
- Liu P.P., Koizuka N., Homrichhausen T.M., Hewitt J.R., Martin R.C. et Nonogaki H. (2005)** Large-scale screening of Arabidopsis enhancer-trap lines for seed germination-associated genes. *Plant J.* 41: 936-944
- Malhotra K. et al. (1995)** Putative blue-light receptors from Arabidopsis and *Sinapis alba* with a high degree of sequence homology to DNA photolyase contain the two photolyases cofactors but lack DNA repair activity. *Biochemistry* 34: 6892–6899
- Masubelele N.H., Dewitte W., Menges M., Maughan S., Collins C., Huntley R., Nieuwland J., Scofield S. et Murray J.A.H. (2005)** D-type cyclins activate division in the root apex to promote seed germination in *Arabidopsis*. *PNAS, USA* 102: 15694-15699
- McCormac A.C., Smith H. & Whitelam G.C. (1993)** Photoregulation of germination in seed of transgenic lines of tobacco and Arabidopsis which express an introduced cDNA encoding phytochrome A or phytochrome B. *Planta* 191: 386–393
- Miao GH., Hong Z., Verma D.P.S. (1992)**, Topology and phosphorylation of soybean nodulin-26, an intrinsic protein of the peribacteroid membrane, *J. Cell Biol.* 118: 481-490
- Möller S.G. et al. (2002)** The cell biology of phytochrome signaling. *New Phytol.* 154: 553–590
- Montgomery B.L., Lagarias J.C. (2002)** Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends Plant Sci.* 7: 357–366
- Murashige T., Skoog F. (1962)** A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473–497
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fijiyoshi Y. (2000)** Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407: 599–605

- Neff MM. et Chory J. (1998)** Genetic interactions between phytochrome A, phytochrome B and cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiol.* 118: 27-36
- Park H.W., Kim S.T., Sancar A. et Deisenhofer J. (1995)** Crystal structure of DNA photolyase from *Escherichia coli*. *Science* 268: 1866 - 1872
- Perrotta G., Yahoubyan G., Nebuloso E. Renzi L., Giuliano G. (2001)** Tomato and barley contains duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell Environ.* 24: 991–97
- Petruzzelli L., Muller K., Hermann K. et Leubner-Metzger G. (2003)** Distinct expression patterns of beta-1,3-glucanases and chitinases during the germination of Solanaceous seeds. *Seed Sci. Res.* 13: 139-153
- Poppe C. (1998)** The blue-light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana* *Plant J.* 16: 465-471
- Postaire O., Verdoucq L., Maurel C. (2007)** Aquaporins in plants: from molecular structures to integrated functions, *Adv. Bot. Res.* 46:75–136
- Prasad G.V., Coury L.A., Finn F. et Zeidel M.L. (1998).** Reconstituted aquaporin 1 water channels transport CO₂ across membranes. *J. Biol Chem.* 273: 33123–33126
- Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.-M., Kelmenson P.M., Lazarova G.I., Kubota T. & Alba R.M. (1997)** The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Plant, Cell and Envir.* 20: 672–677
- Quail P. (1997)** An emerging molecular map of the phytochromes. *Plant Cell Environ.* 20: 657–666
- Quail P. (1994)** Phytochrome genes and their expression, In *Photomorphogenesis in Plants*, 2nd ed.(eds. R.E Kendrick and G.H.M. Kronenberg) pp. 71-104
- Sakai T. et al. (2001)** *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *PNAS, USA* 98: 6969–6974
- Sakamoto K., Briggs W.R. (2002)** Cellular and Subcellular Localization of phototropin 1. *Plant Cell* 14: 1723–1735
- Sakamoto K., Nagatani A. (1996)** Nuclear localization activity of phytochrome B. *Plant J.* 10: 859–868
- Sancar A. (1994)** Structure and function of DNA photolyase. *Biochemistry* 33: 2–9
- Sawada Y., Aoki M., Nakaminami K., Mitsuhashi W., Tatematsu K., Kushiro T., Koshiba T., Kamiya Y., Inoue Y., Nambara E., Toyomasu T., (2008)** Phytochrome- and Gibberellin-Mediated Regulation of Abscisic Acid Metabolism during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiol.* 146: 1386–1396
- Seoh S.A., Sigg D., Papazian D.M. et Bezanilla F. (1996)** Voltage-sensing residues in the S2 and S4 segments of the Shaker K⁺ channel. *Neuron* 16: 1159–1167

- Sharrock R.A., Quail P.H. (1989)** Novel phytochrome sequences in *Arabidopsis thaliana*. Structure, evolution and differential expression of a plant regulatory photoreceptor family. *Genes Dev.* 3: 1745–1757
- Shinomura T. (1997)** Phytochrome regulation of seed germination. *J. Plant Research* 110: 151–161
- Shinomura T., Nagatani A., Chory J. et Furuya M. (1994)** The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiol.* 104: 363–371
- Shinomura T., Uchida K. et Furuya M. (2000)** Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 122: 147–156
- Smith H. (1982)** Light quality, photoperception and plant strategy. *Ann. Rev. of Plant Physiol.* 33: 481–518
- Smith H. et Whitelam G.C. (1990)** Phytochrome, a family of photoreceptors with multiple physiological roles. *Plant Cell Environ.* 13: 695–707
- Tazawa M., Asai K. et Iwasaki N. (1996)** Characteristics of Hg- and Zn-sensitive water channels in the plasma membrane of *Chara* cells. *Bot. Acta* 109: 388–396
- Tazawa M., Ohkuma E., Shibasaka M. et Nakashima S. (1997)** Mercurial-sensitive water transport in barley roots. *J. Plant Res.* 110: 435–442
- Terashima I. et Ono K. (2002)**. Effects of HgCl₂ on CO₂ dependence of leaf photosynthesis: evidence indicating involvement of aquaporins in CO₂ diffusion across the plasma membrane. *Plant Cell Physiol.* 43: 70–78
- Terry M.J. (1997)** Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell Environ.* 20: 740–745
- van Tuinen A., Kerckhoffs L.H.J., Nagatani A., Kendrick R.E. et Koornneef M. (1995)** Far-red light insensitive, phytochrome A deficient mutants of tomato. *Mol. Gen. Genetics* 246: 133–141
- Tyerman S.D., Niemietz C.M., Bramley H., (2002)** Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell Environ.* 25: 173–194
- Verkman A.S., Van Hoek A.N., Ma T., Frigeri A., Skach W.R., Mitra A., Tamaropoo B.K., Farinas A. (1996)** Water transport across mammalian cell membranes. *Am. J. Physiol.* 270: C12–C30
- Wallace I.S. et Roberts D.M. (2004)** Homology modeling of representative subfamilies of *Arabidopsis* major intrinsic proteins. Classification based on the aromatic/arginine selectivity filter. *Plant Physiol.* 135: 1059–1068
- Weaver C.D. et Roberts D.M. (1992)**. Determination of the site of phosphorylation of nodulin 26 by the calcium-dependent protein kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31: 8954–8959

Weaver C.D., Crombie B., Stacey G., Roberts D.M. (1991), Calcium- dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules, *Plant Physiol.* 95: 222-227

Weig A., Deswarte C., Chrispeels M.J. (1997) The major intrinsic protein family of Arabidopsis has 23 members that form three distinct groups with functional aquaporins in each group, *Plant Physiol.* 114: 1347–1357

Weller J.L., Perrotta G., Schreuder M.E., van Tuinen A., Koornneef M., Giuliano G., Kendrick R.E. (2001) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *Plant J.* 25, 427–440

Wudick M.M., Luu D.T. et Maurel C. (2009) A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytol.* 184: 289–302

Yamaguchi R., Nakamura M., Mochizuki N., Kay S.A., Nagatani A. (1999) Light-dependent Translocation of Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic Arabidopsis. *J. Cell Biol.* 145: 437–445

Yang H.Q., Tang R.H., Cashmore A.R. (2001) The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *Plant Cell* 13: 2573–2587

Boundless.com: <https://www.boundless.com/biology/textbooks/boundless-biology-textbook/plant-form-and-physiology-30/plant-sensory-systems-and-responses-184/the-phytochrome-system-and-red-light-response-701-11926/images/phytochrome-system/>
24. 7. 2016