



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Regulace akvaporinů světlem prostřednictvím
fytochromů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

| | |
|-------------------------|--|
| Autor: | Adam Hurych |
| Studijní program: | B1501 Experimentální biologie |
| Studijní obor: | Experimentální biologie |
| Forma studia: | Prezenční |
| Vedoucí práce: | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Termín odevzdání práce: | 2024 |

Bibliografická identifikace

| | |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Adam Hurych |
| Název práce | Regulace akvaporinů světlem prostřednictvím fytochromů |
| Typ práce | Bakalářská |
| Pracoviště | Laboratoř růstových regulátorů |
| Vedoucí práce | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| Rok obhajoby práce | 2024 |
| Klíčová slova | Akvaporin, DDB1, fotomorfogeneze, <i>fril</i> , fytochrom, HgCl ₂ , <i>hp1</i> , hypokotyl, kořen, růst rostlin, světlo, <i>tril</i> |
| Počet stran | 45 |
| Počet příloh | 0 |
| Jazyk | Český (anglický) |

Abstrakt

Předkládaná bakalářská práce se v teoretické části zabývá rostlinnými akvaporiny, jejich regulací, fotomorfogenezí a světelnými signálními dráhami. V experimentální části byl zkoumán potenciační vliv světla na regulaci akvaporinů světlem. Pomocí fotomorfogenních mutantů *fril*, *tril* a *hp1* byl studován vliv inhibitoru akvaporinů HgCl₂ na růstové odpovědi rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na zvolených světelných podmínkách. Výsledky experimentů vedly k závěrům akvaporiny jsou důležitým prvkem pro správný růst a vývoj rostliny. Výsledky rovněž naznačují, že element světelné signální dráhy, protein DDB1, hraje úlohu v regulaci citlivosti rostlin k HgCl₂ modrým a červeným světlem. Výsledky provedených experimentů vedly rovněž k závěru, že fytochromy A a B nejsou v rostlinách rajčete pravděpodobně zapojeny v regulaci akvaporinů světlem.

Bibliographical identification

| | |
|---------------------------------|--|
| Author's first name and surname | Adam Hurych |
| Title of thesis | Light-induced regulation of aquaporins mediated by phytochromes |
| Type of thesis | Bachelor |
| Department | Laboratory of Growth Regulators |
| Supervisor | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D. |
| The year of presentation | 2024 |
| Keywords | Aquaporin, DDB1, <i>fri1</i> , HgCl ₂ , <i>hp1</i> , hypocotyl, light, photomorphogenesis, phytochrome, plant growth, root, <i>tri1</i> |
| Number of pages | 45 |
| Number of appendices | 0 |
| Language | Czech (English) |

Abstract

In the theoretical part, the submitted bachelor's thesis discusses plant aquaporins, their regulation, photomorphogenesis and light signaling pathways. In the experimental part, the potential impact of light on regulation of aquaporins was investigated. Using photomorphogenic mutants *fri1*, *tri1* and *hp1* was studied the influence of aquaporine inhibitor HgCl₂ on growth responses of tomato plant (*Solanum lycopersicum* L.) as a function of chosen light conditions. The results of the experiments led to the conclusion that aquaporins are an important element for proper plant growth and development. Results also suggests that the element of light signaling pathway, the protein DDB1, plays a role in regulating plant sensitivity to HgCl₂ under blue and red light. Results of the experiments also led to conclusion, that phytochromes A and B are probably not involved in the regulation of aquaporins by light in tomato plants.

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně
za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 12. 5. 2024

Podpis:

Chtěl bych poděkovat prof. RNDr. Martinu Fellnerovi Ph.D. za čas, odborné vedení, vstřícný a lidský přístup a cenné rady, který mi v průběhu zpracování této bakalářské práce věnoval. Zároveň bych chtěl poděkovat celé skupině molekulární fyziologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí. Jmenovitě potom Mgr. Natálii Závorkové a Mgr. Davidu Šimkovi za pomoc a rady.

OBSAH

| | |
|--|----|
| 1 Seznam zkratk | 7 |
| 2 Úvod a cíle práce..... | 10 |
| 3 Současný stav řešené problematiky..... | 11 |
| 2.1 Akvaporiny..... | 11 |
| 2.1.1 Vnitřní membránové proteiny..... | 12 |
| 2.1.2 Vnitřní proteiny tonoplastu..... | 13 |
| 2.1.3 Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26..... | 13 |
| 2.1.4 Malé základní vnitřní proteiny..... | 14 |
| 2.1.5 Regulace akvaporinů a abiotický stres..... | 14 |
| 2.1.6 Inhibice chloridem rtuťnatým | 14 |
| 2.2 Fotomorfogeneze..... | 15 |
| 2.2.1 Fytochromy | 16 |
| 2.2.2 Signální dráhy fytochromů..... | 18 |
| 2.2.3. Fotomorfogenní mutanti rajčete..... | 20 |
| 2.2.4. Kryptochromy | 22 |
| 2.2.5 Fototropiny | 23 |
| 4 Materiál a metody | 24 |
| 3.1 Rostlinný materiál | 24 |
| 3.2 Metody | 24 |
| 3.2.1 Příprava MS média..... | 24 |
| 3.2.2 Povrchová sterilizace a kultivace semen..... | 25 |
| 3.2.3 Přenos naklíčených semen | 25 |
| 3.2.4 Měření rostlin..... | 26 |
| 5 Výsledky | 28 |
| 5.1 Růstové reakce mutanta <i>fri1</i> | 28 |
| 5.1.1 Elongace hypokotylu mutanta <i>fri1</i> | 28 |
| 5.1.2 Elongace kořene mutanta <i>fri1</i> | 30 |
| 5.2 Růstové reakce mutanta <i>tri1</i> | 31 |
| 5.2.1 Elongace hypokotylu mutanta <i>tri1</i> | 31 |
| 5.2.2 Elongace kořene mutanta <i>tri1</i> | 33 |
| 5.3 Růstové reakce mutanta <i>hpl</i> | 35 |
| 5.2.1 Elongace hypokotylu mutanta <i>hpl</i> | 35 |
| 5.2.2 Elongace kořene mutanta <i>hpl</i> | 37 |
| 6 Diskuse..... | 40 |
| 7 Závěr | 43 |

| | |
|-------------------|----|
| 8 Literatura..... | 44 |
|-------------------|----|

1 Seznam zkratek

| | |
|-------|---|
| BL | blue light; modré světlo |
| COP1 | constitutive photomorphogenesis 1 |
| CRY | cryptochrome |
| D | dark; tma |
| DAS | DQXVP-acidic-STAES |
| DDB1 | UV-damaged DNA binding protein 1 |
| DET1 | de-etiolated 1 |
| DNA | deoxyribonucleic acid; deoxyribonukleová kyselina |
| DTT | dithiothreitol |
| fri1 | far-red insensitive |
| FRL | far red light; dlouhovlnné červené světlo |
| FUS | fusca |
| GAF | cGMP phosphodiesterase/adenyl cyclase/FhlA |
| HAT | histonacetyltransferasa |
| HFR1 | long hypokotyl in far-red 1 |
| HKRD | histidine kinase-related domain |
| hp1 | high-pigment 1 |
| HY5 | long hypocotyl 5 |
| LAF1 | long after far-red light 1 |
| LOV | light/oxygen/voltage |
| MIP | major intrinsic protein |
| MS | Murashige and Skoog |
| NIP | nodulin-26-like intrinsic protein |
| NPA | asparagin, prolin a alanin opakující se frekvence |
| OPM | output module |
| PAPP5 | phytochrome-associated protein phosphatase 5 |
| PAS | period/arnt/single-minded |
| Pfr | aktivní konformace fytochromu pro vnímání dlouhovlnné červené oblasti spektra |
| PHY | phytochrome |
| PIF3 | phytochrome-interacting factor 3 |
| PIP | plasma membrane intrinsic protein |

| | |
|------|---|
| Pr | neaktivní konformace fytochromu pro vnímání červené oblasti spektra |
| PRD | PAS-repeat domain |
| PSM | photosensory module |
| MES | kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová |
| RL | red light; červené světlo |
| RNA | ribonucleic acid, ribonukleová kyselina |
| SAVO | sanace (SA) vody (VO); roztok chlornanu sodného |
| SIP | small basic intristic protein |
| TIP | tonoplast intristic protein |
| tri1 | temporarily red insensitive |
| UV | ultra violet; ultrafialová |
| WT | wild type |

2 Úvod a cíle práce

Pro správný růst rostlin je zapotřebí udržení fyziologických funkcí. Růst rostlin je regulován různými faktory jako jsou například transmembránové proteiny akvaporiny (AQP), které mimo jiné zajišťují intra i extracelulární transport vody a jiných malých molekul. Akvaporiny podléhají různým formám regulace, nejzásadnější je míra fosforylace proteinu, míra exprese, anebo vliv inhibitorů.

Nezbytným vnějším faktorem pro správný růst a vývoj rostlin je světlo, u světla jsou důležité tři faktory: vlnová délka, intenzita a doba ozáření. Světlo rostliny potřebují pro fotosyntézu, ale slouží také jako environmentální signál pro fotomorfogenezi. Pokud se rostliny vyvíjí v prostředí s dostatkem světla, sledujeme inhibici prodlužování stonků rostlin, akumulaci a diferenciaci chloroplastů a rozšiřování listů. Těmito procesy se rostlina snaží co nejvíce zužítkovat světelnou energii. Naopak pokud rostliny pro svůj růst nemají dostatek světla, dochází k prodlužování stonků (hypokotylů), nediferencují se chloroplasty a tvoří se nerozvinuté listy, vyvíjí se tzv. skotomorfogenní fenotyp. Pro zprostředkování světelného signálu si rostliny vyvinuly speciální fotoreceptory jako jsou fytochromy, receptory červeného světla, a receptory modrého světla kryptochromy a fototropiny.

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda a jak jsou akvaporiny regulovány světlem a jestli je vliv světla na fungování akvaporinů zprostředkován fytochromy. Pro práci byl použit genetický přístup spočívající v analýze mutantů rostlin s defekty ve fytochomech. Konkrétně byly použity mutanti *tri1*, *fri1* a *hpl* u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), u nichž byly v podmínkách *in vitro* vyšetřovány růstové reakce k inhibitoru akvaporinů HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Experimenty bylo zjištěno, že mutant *hpl* je méně citlivý k inhibitoru akvaporinů HgCl_2 a změna citlivosti je závislá na světle. Tento efekt je pravděpodobně zapříčiněn mutací v genu *DDB1*.

Bakalářská práce byla vypracována v rámci pracovní skupiny molekulární fyziologie prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. v Laboratoři růstových regulátorů, která je společným pracovištěm Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky.

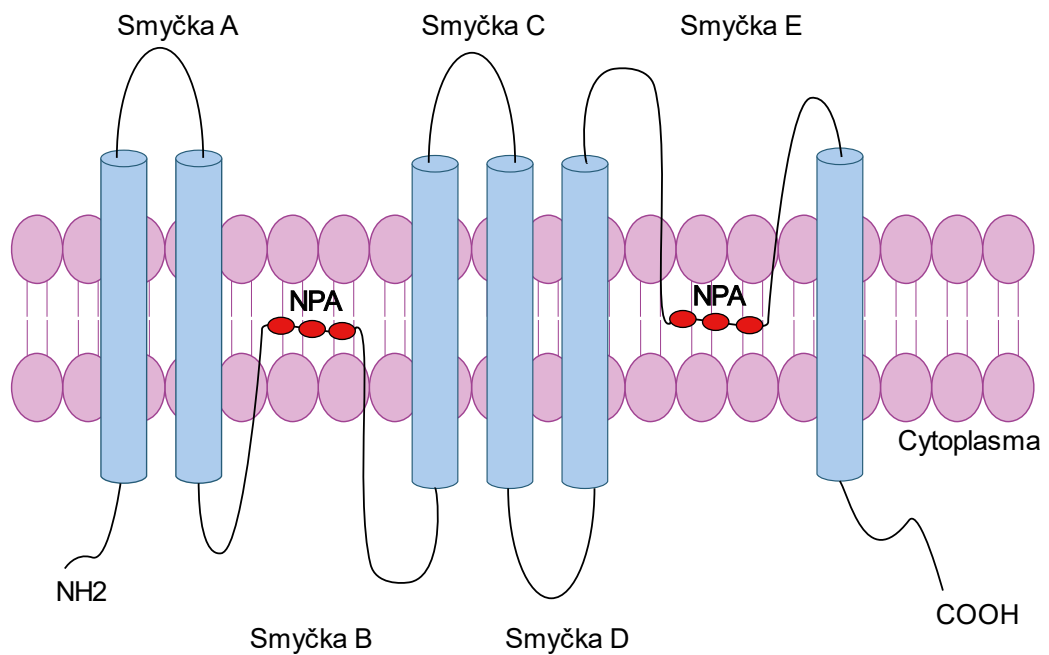
3 Současný stav řešené problematiky

2.1 Akvaporiny

Akvaporiny jsou transmembránové proteiny umožňující transport vody aj. látek. Vyskytují se v buňkách prokaryot, živočichů včetně člověka, hub i rostlin. Rostlinné akvaporiny jsou přítomné v důležitých orgánech rostliny. Nalezneme je v buňkách téměř všech rostlinných orgánů zahrnující kořen, stonek, list, květ, plod i semena. Obecně platí, že rostlinné buňky obsahují více akvaporinů než buňky živočišné (včetně lidských) (Curticapean, 2019). Akvaporiny jsou transmembránové proteiny, které spadají do skupiny hlavních vnitřních proteinů (major intrinsic proteins/ MIPs). Tyto skupiny dělíme na základě homologních sekvencí a lokalizace v buňce do čtyř podskupin PIP (PIP1 a PIP2), TIP, NIP a SIP (Maurel et al., 2008). Jejich hlavní úlohou je transport vody a rozpuštěných neutrálních látek, transport plynů jako oxid uhličitý nebo amoniak, živiny a jiné látky přes biologické membrány (Maurel, 2007).

Akvaporiny jsou proteiny velké asi 23-31 kDa tvořené šesti helixy, podélně nakloněnými a prostupujícími membránou, spojené pěti smyčkami. Dvě smyčky (B, D) v intra- a tři smyčky (A, C, E) v extra-cytoplasmatické straně membrány. Oba N- i C-terminální konce jsou vystaveny cytosolu (Maurel et al., 2008). Obecná struktura akvaporinů je znázorněna na Obrázku 1. První intracelulární B a třetí extracelulární E smyčky jsou vysoce hydrofobní a obsahují takzvaný motiv NPA. Hydrofobie smyček B a E má za následek jejich zanoření mezi lipidovou dvojvrstvou membrány. Motiv NPA je opakující se sekvence aminokyselin asparaginu, prolinu a alaninu, tento motiv je odpovědný za selektivní propustnost a tvoří elektrostatickou bariéru u všech akvaporinů. Dalším důležitým prvkem je smyčka C, která se spojuje se smyčkami B a E. Tímto spojením je umožněna permeabilita vody skrze akvaporiny (Kapilan et al., 2018). Uprostřed lipidové dvojvrstvy membrány se díky přímé symetrii hydrofobními částmi překrývají proteiny s motivem NPA, tímto spojením dochází k tvorbě dvou hemipórů. Spojení hemipórů připomínající svojí strukturou tvar přesýpacích hodina tvoří úzký kanál. Polypeptidové akvaporiny se seskupují do větších homotetramerních celků v membráně. Jednotlivé monomery pak tvoří samostatné vodní póry. Díky

elektrostatickým silám je skrze kanál akvaporinu přenášena voda ve směru gradientu (Shao et al., 2008).



Obrázek 1: Obecná struktura akvaporinů (AQP), obsahující šest transmembránových oblastí propojených pěti smyčkami a dva motivy NPA uvnitř membrány. Převzato a upraveno (Ahmed et al., 2021).

2.1.1 Vnitřní membránové proteiny

Vnitřní membránové proteiny (PIPs) jsou nejpočetnější skupina rostlinných akvaporinů, jejichž molekulární hmotnost se pohybuje okolo 30 kDa. Většina akvaporinů PIP skupiny se vyskytuje v plasmatických membránách a v místech s vysokým průtokem a výměnou vody. Tato početná skupina se dělí do dvou podskupin PIP1 a PIP2 na základě substitucí aminokyselinových sekvencí, rozdílné permeability vody a podle délky N- a C-terminálních konců molekuly (Kapilan et al., 2018).

Podskupina PIP1 se skládá z pěti izoform PIP1;1 - PIP1;5. V porovnání s PIP2 mají PIP1 kratší C-terminální konec a delší N-terminální konec molekuly. Některé PIP1 proteiny nejsou schopné autonomního fungování a zajištění permeability vody. Pro zajištění této funkce je nutné jejich složení do větších celků s PIP2 proteiny. Takovéto celky se skládají z heterotetramerní skupiny PIP1 proteinů a jednoho monomeru proteinu ze skupiny PIP2 (Kapilan et al., 2018).

Podskupina PIP2 se skládá z osmi izoform PIP2;1 - PIP2;8. Akvaporiny podskupiny PIP2 se skládají do heterotetramerních celků, protože nedokáží fungovat jako monomery (Gautam and Pandley, 2021). Bylo pozorováno, že PIP2 skupina je vysoce

permeabilní pro vodu, naopak PIP1 skupina nebývá aktivní ve všech rostlinných druzích (Ahmed et al., 2021).

2.1.2 Vnitřní proteiny tonoplastu

Vnitřní proteiny tonoplastu (TIPs) je označení pro skupinu akvaporinů nacházející se v membránách vakuol (tonoplast) s funkcí permeabilizace vody a přenos plynů skrze membránu. Udržování osmotické rovnováhy uvnitř vakuolárního systému a průtok vody skrze membrány vakuol zajišťují hlavně TIPs. Jejich další významnou rolí je transport dusíkatých látek a urychlování buněčného růstu či prodlužování částí rostlin (Gautam and Pandey, 2021). Klíčovou rolí vnitřních proteinů tonoplastu je udržování turgoru tonoplastu proti buněčné stěně, turgor je ovlivněný stavem TIPs, které se mění z otevřeného do uzavřeného a naopak (Curticapean, 2019). Jejich molekulová hmotnost se pohybuje v rozmezí mezi 25–28 kDa. Skupina TIP je složena z pěti podskupin, které se liší homologními sekvencemi (TIP1 – TIP5) (Kapilan et al., 2018). Vzhledem k vyššímu počtu akvaporinů v tonoplastu oproti cytoplasmatické membráně je míra permeability tonoplastu pro vodu vyšší než u plasmatické membrány (Kapilan et al., 2018; Curticapean, 2019). Vnitřní proteiny tonoplastu mohou mít roli při odpovědi na stres. Byl sledován pokles množství proteinů TIP1;2 v membráně tonoplastu po vystavení *Mesembryanthemum crystallinum* stresu zasolením (Wudick et al., 2009; Kapilan et al., 2018).

2.1.3 Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26

Rostliny z čeledi bobovitých (*Leguminous*) jako například čočka, hrách a fazole, žijí v symbiotickém vztahu s hlízkovými bakteriemi rodu *Rhizobacterium*. Takovýmto symbiotickým vztahem vznikají hlízky (nodules) na kořenech rostlin, skrze které je umožněna fixace dusíku pro rostliny. Během formace těchto hlízek se exprimují nodulinové proteiny a jsou transportovány do membrán. Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26 se vyskytují nejen v čeledi bobovitých rostlin a protein nodulin 26 je exprimován na symbiotické membráně rostlin. (Gautam and Pandey, 2021; Kapilan et al., 2018; Wudick et al., 2009; Curticapean, 2019).

Vnitřní membránové proteiny podobné nodulinu-26 (NIPs) jsou řazeny podle podobnosti aromatické nebo argininové konstrukce do pěti fylogenetických skupin (NIP1 - 5) a do tří funkčních skupin (NIP I – III) (Curticapean, 2019). V porovnání s ostatními skupinami akvaporinů (PIPs, TIPs, SIPs) mají NIPs menší schopnost permeability vody skrze membránu (Kapilan et al., 2018; Curticapean, 2019). Akvaporiny skupiny NIPs

jsou permeabilní pro malé organické roztoky (amoniak, močovina) a minerální živiny. Dále se uvažuje o jejich schopnosti zprostředkování propustnosti kovů jako: křemík, selen, arsen a bor (Gautam and Pandey, 2021; Curticapean, 2019).

2.1.4 Malé základní vnitřní proteiny

Malé základní vnitřní proteiny neboli SIPs jsou v porovnání s ostatními akvaporiny mnohem menší díky jejich kratší N-terminální sekvenci. C-terminální konec molekuly je stejně velký jako u všech ostatních akvaporinů, díky tomuto zkrácení N-terminálního konce molekuly jsou SIPs a NIPs schopny mimo vodu transportovat také jiné molekuly skrze biologické membrány (Gautam and Pandey, 2021; Kapilan et al., 2018). Jejich lokalizace v buňce je v membránách endoplasmatického retikula a jiných intracelulárních membránách (Curticapean, 2019).

2.1.5 Regulace akvaporinů a abiotický stres

Akvaporiny jsou důležité pro udržování fyziologických funkcí. Existuje více mechanismů, které se podílejí na přímé regulaci aktivity akvaporinů. Hlavním mechanismem buněčné regulace proteinové aktivity akvaporinů je fosforylace, která funguje jako molekulární spínač. Na stresové signály, jako jsou útoky patogenů, stres ze sucha nebo působení rostlinných hormonů, reagují kinázy, které jsou odpovědné za fosforylaci proteinů (Shao et al., 2008). Byly sledovány další ko- a posttranslační změny proteinů jako například glykosylace, sestríhy a acetylace (Maurel et al., 2008).

Dalším důležitým mechanismem je otevírání a zavírání akvaporinů. Tento proces je ovlivňován buď fosforylací nebo vlivem roztoků na obou stranách membrány. Zkoumání atomárních struktur SoPIP2;1 v otevřené a uzavřené konformaci pomohlo objasnit molekulární mechanismy uzavírání akvaporinů. Otevírání akvaporinů probíhá fosforylací smyčky B, která uvolní smyčku D, naopak zavírání je způsobeno fosforylací C-terminálního konce proteinu, která brání uzavření smyčky D sousedního monomeru. Akvaporiny skupiny PIPs mohou být také zavírány protony a divalentními kationty z cytosolické strany membrány. Byl sledován pokles permeability membrány pro vodu po defosforylaci GmNOD26 alkalickou fosfatázou u peribakteriálních membrán (Maurel et al., 2008).

2.1.6 Inhibice chloridem rtuťnatým

K inhibici akvaporinů může docházet prostřednictvím těžkých kovů, jako je například rtuť. Bylo pozorováno, že chlorid rtuťnatý se přímo váže do atomární struktury

akvaporinů. V póru akvaporinu se nachází volné cysteinové zbytky, inhibice chloridem rtuťnatým probíhá důsledkem vazby sulfohydrilového činidla na tyto volné cysteinové zbytky v oblasti akvaporinu, což má za následek konformační změnu póru. Takovou vazbou se tvoří fyzická bariéra pro tok vody a jiných molekul. Celý mechanismus ovlivňuje schopnost akvaporinů transportovat vodu (Shao et al., 2008). Některá redukční činidla, jako je například dithiothreitol (DTT), mohou zvrátit účinek chloridu rtuťnatého na blokaci pórů. Bylo pozorováno snížení a oddálení klíčení semen po přidavku chloridu rtuťnatého na modrém světle a ve tmě. Chlorid rtuťnatý také inhibuje růst kořenů a potlačuje expresi genu *PIP1;3* z celkem devíti testovaných *PIP* genů. Tato snížená exprese může být zmírněna při růstu rostlin na modrém světle. Naopak exprese genů *PIP1;2*, *PIP1;4*, *PIP1;5* a *PIP2;2* byla mírně zvýšena po přidavku HgCl_2 u WT na modrém světle (Balarynová and Fellner, 2019). V pozdějších fázích růstu (po klíčení semen) byly na rostlinách pozorovány anatomické změny jako zpožděný vývoj kořene v porovnání s výskytem děloh a absence kořenového vlášení (Willigen et al., 2006).

2.2 Fotomorfogeneze

Rostliny ke svému růstu a vývoji potřebují světlo. Světelná energie je zužitkována při fotosyntéze. Světlo však slouží i jako enviromentální signál pro fotomorfogenezi. Fotomorfogenezí rozumíme světlem zprostředkované odpovědi rostliny na světelné podmínky a změny schopností rostliny k nejefektivnějšímu využití světelné energie. Projevy fotomorfogeneze jsou nejvíce patrné v období mezi klíčením semen a tvorbou prvních skutečných listů. Všechny fáze života a vývoje rostlin jsou ovlivněny světlem, mezi tyto fáze řadíme růst stonku, syntézu chloroplastů, ovlivnění cirkadiálního rytmu rostliny, biosyntézu rostlinných pigmentů a další. Růst rostliny se liší v závislosti na světelných podmínkách. Za vývoje při tmě dochází k prodlužování stonků (hypokotylů) rostliny, nediferenciování chloroplastů a tvoří se nerozvinuté listy (dělohy, kotyledony), chráněné apikálním háčkem. Takový fenotyp rostliny vyvíjející se ve tmě označujeme jako etiolizovaný, přičemž vývoj rostliny ve tmě se nazývá skotomorfogeneze. Při dostatku světla dochází k de-etiolizaci, která je provázena inhibicí prodlužování stonků, akumulací a diferenciací chloroplastů a zvětšováním listů (Han et al., 2007). Fenotypový projev vlivu světla viz Obrázek 2.



Obrázek 2: Efekt vlivu světla na WT (cv. Rutgers) po 7 dnech pod vlivem rozdílné kvality světla. Fenotyp WT ve tmě na modrém a na červeném světle. Měřítka odpovídá 1 cm. Převzato a upraveno z Bergougnoux 2009.

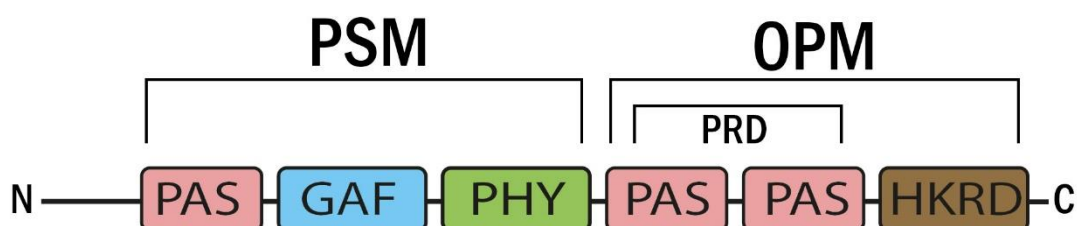
2.2.1 Fytochromy

Rostliny si během svého vývoje vyvinuly celou řadu fotoreceptorů (světlo-detekovatelné systémy). Hlavními třemi skupinami jsou fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Tyto fotoreceptory se odlišují svojí schopností detekovat světelný signál v různých vlnových délkách. Fytochromy poté absorbují světelné záření z červené (RL) a vzdálené červené (FRL) oblasti spektra a hrají důležitou roli ve fotomorfogenezi (Han et al., 2007). U *Arabidopsis* bylo identifikováno pět fytochromů (phyA až phyE) včetně dvou blízce příbuzných fytochromů typu phyB, phyB a phyD. Rajče také obsahuje pět fytochromů, včetně homologů *Arabidopsis* phyA, C a E a dva fytochromy úzce příbuzné typu phyB, phyB1 a phyB2. Nicméně, fytochromy phyB1 a phyB2 u rajčete nejsou ortologické k fytochromům phyB a D v *Arabidopsis*, ale představují nezávislou duplikaci v rámci čeledi *Solanaceae*. (Weller et al., 2000). Klíčení semen, prodloužení hypokotylu, syntéza flavonoidů a karotenů, de-etiolizace a další, jsou fyziologické procesy, které jsou ovlivňovány působením fytochromů (Cheng et al., 2021).

2.2.1.1. Struktura Fytochromů

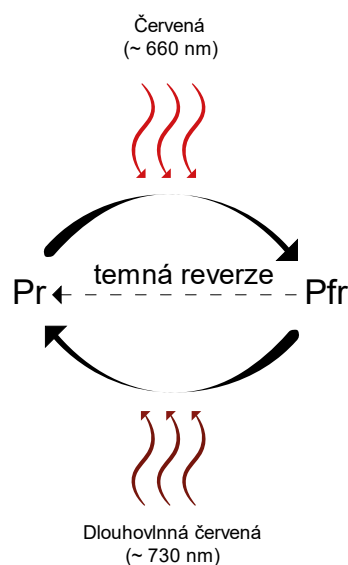
Fytochromy jsou dimerické chromoproteiny a jsou složeny ze dvou hlavních částí – z proteinového řetězce a chromoforu. Proteinový řetězec je asi 120 kDa velká molekula, která se kovalentně váže s nebílkovinným tetrapyrrolovým nebo bilinovým chromoforem (Carvalho et al., 2011). Fytochromy se skládají z monomerních apoproteinů, které obsahují N-terminální PSM (photosensory module) a C-terminální OPM (output module). Část PSM váže bilin a skládá se z variabilního N-terminálního prodloužení, domény PAS (Period/Arnt/Single-Minded), domény GAF (cGMP phosphodiesterase/adenylyl cyclase/FhlA) a PHY (phytochrome-specific) domény. Část

OPM zprostředkovává dimerizaci a přenos signálu na podřízené efekторы, obsahuje dvě tandemové repeticce domén PAS, které označujeme PRD (PAS-repeat domain) a histidinovou kinázu HKRD (histidine kinase-related domain). Obecnou strukturu fytochromu viz Obrázek 3 (Cheng et al., 2021).



Obrázek 3: Obecné schéma strukturních domén fytochromu. Fotosenzitivní část PSM složená z PAS, GAF a PHY domén a OPM část složená z PRD, tj. duální repeticce PAS domény a HKRD. Převzato a upraveno z Cheng et al., 2021.

Hlavní funkcí chromoforu je absorpce světelné energie a změna konformace fytochromu. Fytochrom se vyskytuje ve dvou stabilních konformacích, kdy jedna absorbuje světlo v červené (RL, ~ 660 nm; Pr) a druhá v dlouhovlnné červené (FRL, ~ 730 nm; Pfr) oblasti spektra. Ke změně konformace dochází po excitaci RL nebo FRL díky Z-E isomerizaci v C15/16 dvojně vazbě fytochromobilinu a dochází ke změně absorpce druhého typu světla důsledkem konformační změny (Carvalho et al., 2011). Forma Pr je považována za fyziologicky inaktivní, naopak forma Pfr jako aktivní. Konformace cytosolické Pr se po ozáření červeným světlem fotokonvertuje na aktivní Pfr, která se přemisťuje do jádra. K inaktivaci aktivní konformace Pfr dochází k tepelné světelně nezávislé relaxaci, kterou nazýváme temná reverze nebo ozáření FRL. Schéma tohoto fytochromového fotocyklu je znázorněno na Obrázku 4. Změny aktivní a inaktivní konformace fytochromů jsou ovlivňovány světlem a fungují jako spínače, kdy RL aktivuje fytochrom a FRL fytochrom inaktivuje (Cheng et al., 2021).



Obrázek 4: Fotocyklus fytochromů. Dvě formy fytochromu přechází mezi svojí aktivní (Pfr) a inaktivní (Pr) formou. Po ozáření červeným světlem dochází k fotoaktivaci Pr na Pfr. K relaxaci Pfr na Pr dochází buď ozářením dlouhovlnným červeným světlem, nebo za nepřisunu světla dochází k temné reverzi. Převzato a upraveno z Carvalho 2011.

2.2.1.2. Typy fytochromů

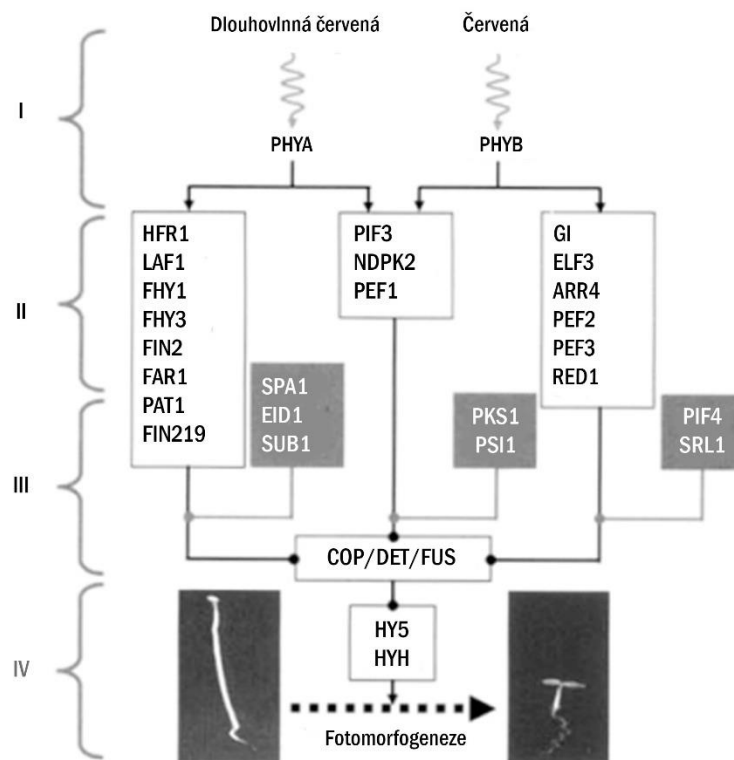
Bylo sledováno, že různé typy fytochromů u rostlin zasahují různě do procesu fotomorfogeneze rostliny, působení konkrétních fytochromů se provádí na fytochromově deficientních mutantech nebo na transgenních organismech. Fytochromy mohou být rozděleny do dvou skupin podle jejich vzorců exprese a proteinové stability na typ I (phyA u *Arabidopsis*), který je fotolabilní a typ II (phyB až phyE u *Arabidopsis*), který je fotostabilní. Jelikož u phyA dochází k rychlé degradaci po vystavení rostliny světelnému záření, tak se u rostlin pěstovaných ve tmě vyskytuje nejhojněji a je v nich aktivní (etiolované rostliny). Pro degradaci phyA je nutné selektivní rozpoznání a ubikvitinace fytochromu a celý proces je vázaný na světlo. Fytochromy typu II jsou aktivní a nejhojnější u rostlin pěstovaných na světle, kdy je nejčastěji vyskytujícím se typem phyB. Naopak phyC a phyE jsou méně časté. Indukce klíčení semen je iniciována nevratným způsobem působením phyA při kontinuálním RL, FRL nebo při nízkých intenzitách, naopak může být iniciována i phyB při vysoké intenzitě světla foto-reverzibilním způsobem a při nízkém přísunu světla (Han et al., 2007).

2.2.2 Signální dráhy fytochromů

Fytochromy ovlivňují vývoj rostliny pomocí mechanismů, které ještě nejsou zcela objasněny a podrobně popsány. Tyto procesy se odehrávají na molekulární úrovni a byly popsány čtyři hlavní důsledky aktivity fytochromů, které kontrolují subcelulární lokalizaci proteinů, transkripci, stabilitu proteinů a fosforylací proteinů. Jak již bylo

zmíněno, po fotoaktivaci cytoplasmatické formy fytochromu Pr červeným (R) světlem dochází ke změně konformace na formu Pfr, tato fotoaktivace nadále způsobuje translokaci proteinu do jádra. Fytochrom je v jádře přenesen do blízkosti genů, které jsou fytochromem regulovány, mezi takové geny patří například PIF3 (Phytochrome-Interacting Factor 3). Ve zkratce tedy fytochromy regulují genovou expresi po jejich aktivaci světlem a translokaci do jádra (Han et al., 2007).

Aktivovaný phyA a další komponenty světelné signalizace jsou degradovány ubikvitinací a 26S proteazomem. Degradace proteinů je klíčovým regulátorem buněčných procesů zahrnující světelnou signalizaci, cirkadiální rytmy a kvetení. Na genetických mutantech pěstovaných ve tmě byly sledovány fenotypové projevy, které odpovídají fenotypům rostlin pěstovaných na světle. Mezi tyto znaky patří rozvinuté listy, kratší hypokotyl a rozvinuté dělohy. Geny, které jsou za tyto změny odpovědné se nazývají COP (constitutive photomorphogenesis), DET (de-etiolated) a FUS (fusca). Recesivní povaha těchto mutací naznačuje, že kódují proteiny, které pracují jako represory fotomorfogeneze ve tmě. Zvláště důležitý je poté gen COP1, který kóduje enzym E3 ubikvitin ligázu, která váže na proteiny určené k degradaci ubikvitin. Tyto označené proteiny jsou následně přeneseny do proteazomu, kde jsou rozloženy na aminokyseliny. Mezi tyto komponenty, které podléhají ubikvitin-dependentní degradaci, patří také PIF3, HFR1 (long hypokotyl in far-red 1), LAF1 (long after far-red light 1) a HY5 (long hypokotyl 5). U rostlin pěstovaných ve tmě se uplatňuje efekt COP1, který se akumuluje v jádře, kde se podílí na ubikvitinaci transkripčních faktorů. Světlo skrze fytochromy A a B způsobuje migraci COP1 z jádra do cytosolu, to má za příčinu, že se v jádře hromadí transkripční faktory a je tímto umožněna exprese genů fotomorfogeneze. Zjednodušené schéma signální dráhy fytochromů viz Obr. 5 (Han et al., 2007).



Obrázek 5: Zjednodušené schéma signální dráhy fytochromově zprostředkované fotomorfozene. Fytochrom A i B mají separátní i sdílené signální komponenty, přičemž COP/DET/FUS slouží jako integrační bod signálů v signální dráze fytochromů. Šipky naznačují pozitivní signální přenos a plné kruhy negativní signální přenos. Tato dráha je rozdělena do čtyř hlavních kroků. Krok I je absorpce světla fytochromem a změna konformace. Krok II je interakcí fytochromů s podrízenými signálními komponenty. Krok III je integrace signálů skrze ubikvitin dependentní proteolýzu. Krok IV je regulace genů fotomorfozene. Převzato a upraveno z Han et al., 2007.

Dále bylo prokázáno zapojení fosforylace fytochromů v regulaci signalizace a jejich aktivity. Fosforylace fytochromů je řízena fosfatázou spojenou s fytochromem 5 (PAPP5), ta fosforyluje aktivní formy Pfr fytochromů phyA i phyB. Zvýšení stability Pfr je naopak ovlivněno defosforylací, kdy phyA i phyB nemohou interagovat s ligázami typu E3 a nedochází k jejich degradaci (Cheng et al., 2021). Fosforylace fytochromů probíhá v jejich pantové části a dochází tak k regulaci interakce s následnými komponentami v signálních drahách (Han et al., 2007).

2.2.3. Fotomorfogení mutanti rajčete

Fotomorfoze rostlin je možno sledovat pomocí různých mutantů, s mutacemi v genech, které se podílejí na fotomorfoze rostliny. Nejčastěji se jedná o mutace v kompozicích a zastoupení fotoreceptorů, nebo v drahách ovlivňující přenosy světelného signálu (Kendrick et al., 1997). Souhrnná tabulka obsažených fytochromů v mutantech viz Tabulka 1.

Tabulka 1: Přehledová tabulka zastoupení fytochromů u jednotlivých fotomorfogenních mutantů a WT. Převzato z Huub et al., 1997

| Parametr | Genotyp | | | |
|----------|---------|-------------|-------------|------------|
| | WT | <i>fri1</i> | <i>tri1</i> | <i>hp1</i> |
| phyA | + | - | + | + |
| phyB | + | + | - | + |

2.2.3.1 Mutant *fri1*

Jedná se o recesivního mutantu, u kterého byla prokázána necitlivost k FRL (k dlouhovlnnému červenému světlu) a byl označen zkratkou *fri* z anglického **F**ar-**R**ed **I**nsensitive. U něj byla pozorována absence fytochromu A u etiolovaných semen. Mutace leží na chromosomu 10 v genu *PHYA*, tento mutant je tedy deficientní ve fytochromu phyA (Kendrick et al., 1997). Obsah fytochromu B společně s malým zastoupením dalších typů fytochromů jsou u mutantu *fri1* podobné s WT. Mutant *fri1* se projevoval mírně delšími hypokotyly v porovnání s WT při pěstování pod BL a RL. WT zároveň slaběji inhiboval růst hypokotyly při pěstování pod FRL. Byla prokázána necitlivost mutantů *fri* k FRL, což se potvrdilo důkazem pěstováním těchto rostlin při tmě. Fenotyp rostliny je stejný při D i FRL. Takovýto fenotyp má prodloužené hypokotyly, uzavřené apikální háčky a nerozvinuté kotyledony. Po 28denní inkubaci za světelných podmínek 16 h W/ 8 h D, jsou rostliny *fri* i WT, až na mírně zpomalený růst *fri*, téměř identické fenotypicky. Zpomalený růst se projevoval více u rostlin pěstovaných ve sklenících. (van Tuinen et al., 1995a)

2.2.3.2 Mutant *tri1*

Jedná se o recesivního mutantu, u kterého byla prokázána dočasná necitlivost k RL (k červenému světlu) a byl označen zkratkou *tri* z anglického **T**emporarily **R**ed **I**nsensitive. Bylo pozorováno, že mutanti *tri* byli necitliví k červenému světlu během prvních dvou dnů po přenosu semen ze tmy, ovšem tato necitlivost nebyla ovlivněna fyziologickým stářím rostliny. Dočasná necitlivost má za následek zpožděnou de-etiolaci. Mutace *tri1* byla lokalizována na chromosomu 1 na genu *PHYB1*, tento mutant je tedy deficientní ve fytochromu phyB1. Rostliny *tri* vykazovaly nižší míru inhibice při nižších úrovních osvětlení s porovnáním s WT (wild-type; nemutovaný genotyp) kontrolními rostlinami (Kendrick et al., 1997). Při růstu pod modrým světlem (BL) mají rostliny *tri1* prodloužený hypokotyl v porovnání s WT. Na červeném světle (RL) se projevuje nižší míra inhibice růstu hypokotyly, rostliny obsahují menší množství anthokyaninu a mají menší, tmavě zelené kotyledony s porovnáním s WT. Celková produkce chlorofylu je jen málo ovlivněna mutací naopak akumulace anthokyaninu a plochy děloh jsou ovlivněny

genetickým pozadím. Se stářím rostlin se mezi *tri1* a WT zvětšuje rozdíl v délce hypokotylu a mladé listy mají nižší zastoupení anthokyaninu (van Tuinen et al., 1995b).

2.2.3.3 Mutant *hp1*

Monogenní recesivní mutant *hp1* vykazuje zvýšenou reakci na světlo, což je zapříčiněno zvýšenou produkcí chlorofylů, karotenoidů, lykopenů a kyseliny askorbové (vitamin C) ve zralých plodech v porovnání s WT rostlinami. Obsahuje tedy větší množství rostlinných pigmentů, od čehož byl odvozen i název mutanta High-Pigment. Zvýšená produkce chlorofylů se projevuje tmavými listy a plody, které mají tmavě zelenou nezralou barvu. Mutace *hp1* se vyznačuje pleiotrofním fenotypem a ovlivňuje základní fotomorfogenní procesy. K úplné de-etiolizaci semen pod R světlem a k syntéze vyššího množství anthokyaninu není nutná spolupráce B-fotoreceptoru a fytochromu oproti WT. Etiolovaná semena WT a mutanta *hp1* se neliší množstvím fytochromů phyA a phyB-příbuzným (Kendrick et al., 1997). Bylo prokázáno, že *hp-1* mutantní fenotyp je způsoben mutací rajčatového homologu genu *DDB1* (UV-damaged DNA binding protein 1) u *A. thaliana*. Tato mutace byla mapována na chromosomu 2. Protein DDB1 je velice důležitým faktorem v procesu opravy DNA a při regulaci buněčného cyklu. Zároveň má vysokou afinitu k různým poškozením DNA důsledkem UV záření. To je možný důkaz, že tento protein se mohl vyvinout z běžného mechanismu odpovědi na světelný stres. Bylo sledováno, že DDB1 interaguje biochemicky i geneticky s DET1 (de-etiolated 1) proteinem. Proteiny DDB1 i DET1 interagují buď s histonacetyltransferásami (HAT) nebo s HAT komplexy. Vzhledem k tomu, že DET1 interaguje s neacetylovaným koncem histonu H2B a je zahrnut v expresi mnoha světlem indukovaných genů, tak mohou spolu s DDB1 skrze chromatin regulovat expresi mnoha genů (Lieberman et al., 2004).

2.2.4. Kryptochromy

Kryptochromy a další rostlinné fotoreceptory modrého světla ve svojí proteinové struktuře obsahují flavin. Kryptochromy ovlivňují procesy jako de-etiolizaci, kvetení nebo cirkadiální rytmy. Fotosenzorické domény kryptochromů jsou příbuzné DNA opravujícímu enzymu DNA fotolyáse, avšak většinou postrádají funkci opravy DNA (Srinivas et al., 2004). Nejen u krytosemenných rostlin se na C-terminálním konci molekuly kryptochromů vyskytuje také DAS (DQXVP-acidic-STAES) doména. U *Arabidopsis* se vyskytují dva typy kryptochromů CRY1 a CRY2. Fytochromy interagují s dalšími rostlinnými proteiny jako jsou dříve zmíněné fytochromy, COP1 (constitutive photomorphogenesis 1), tzv. clock proteiny, chromatinem anebo s DNA. Možná

podléhají fosforylaci, která je závislá na modrém světle, ta ovlivňuje konformaci, intermolekulární interakce, fyziologické účinky a množství fotoreceptorových proteinů. Společně s fytochromy regulují některé funkce jako jsou třeba fotoperiodické kvetení, nebo prodlužování buněk. S fototropiny se účastní procesu otevírání a uzavírání průduchů (Han et al., 2007).

2.2.5 Fototropiny

Fototropiny jsou rostlinné fotoreceptory modrého světla, které mají mnoho regulačních účinků pro optimalizaci účinnosti fotosyntézy jako je fototropismus. Fototropiny jsou kódovány oblastí *NPH1* (Liscum and Briggs, 1995; Liscum and Briggs, 1996). S kryptochromy jsou odpovědné za světlem aktivované otevírání a uzavírání průduchů a v odpovědi na intenzitu světla posunují chloroplasty. U *Arabidopsis* byly popsány dva fototropiny PHOT1 a PHOT2. Fototropiny jsou světlem indukovatelné serin/threonin proteinové kinázy. Na N-terminální části fototropiny obsahují dvě LOV (Light/oxygen/voltage) domény, která zprostředkuje odpověď na světlo. Fototropinové signalizace je dosaženo po fotoexcitaci LOV domény, což má za následek autofosforylaci a aktivaci C-terminální kinasové domény. Obecnou strukturu fototropinů viz Obrázek 6 (Han et al., 2007).



Obrázek 6: Obecná struktura fototropinů. Fototropiny obsahují 2 LOV domény (Light/oxygen/voltage), které zprostředkovávají odpověď na světlo. Na C – terminálním konci se nachází PK (protein kinasová doména) Převzato a upraveno z Han et al., 2007.

4 Materiál a metody

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimentální část bakalářské práce byla použita semena následujících genotypů rostliny *Solanum lycopersicum* L. Recesivní mutant *tri1* (*temporarily red light-insensitive 1*, odvozen od kultivaru cv. *GT*; LA3808; deficientní ve *phyB1*; Van Tuinen et al. 1995b). Recesivní mutant *fri1* (*far-red-insensitive 1*, odvozen od kultivaru cv. *Money Maker*; deficientní ve *phyA*; Kerckhoffs et al. 1997). Recesivní mutant *hpl* (*high pigment1*; odvozen od kultivaru Rutgers (cv. *Rutgers* LA3004; Kendrick et al. 1997; mutace v genu *DDB1* – UV-damaged DNA binding protein 1; Lieberman et al. 2004; zesílené fytochromové reakce a zesílený fototropismus; Srinivas et al. 2004). Semena mutantů poskytl prof. C. M. Rick, TGC: Tomato Genetics Cooperative, University of Florida, Gainesville, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>

3.2 Metody

3.2.1 Příprava MS média

K přípravě MS média (Murashige and Skoog, 1962; Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Cat. No. M0221.0050) potřebujeme odměrný válec o objemu 1 l, Erlenmayerovu baňku o objemu 3 l, elektromagnetickou míchačku, analytické a laboratorní váhy, lžičky, váženky, pH metr, hliníkovou fólii, autoklávovací pásku, barevnou pásku, lihovou fixu, míchátko. Z chemikálií potom sacharózu, destilovanou vodu, MS médium, pufr MES (kyselina 2-(N-morpholino)ethansulfonová, cat. no. 29834,02, Serva, Německo), 1M KOH na úpravu pH a fytoagar (cat. No. 9002-18-0, Duchefa Biochemie, Nizozemsko). Nejprve bylo na laboratorních vahách naváženo 20 g sacharózy a sacharóza byla převedena do 3l Erlenmayerovy baňky. Pomocí 1l odměrného válce byla do Erlenmayerovy baňky přenesena destilovaná voda. Tato směs byla promíchána na elektromagnetické míchačce, za stálého míchání bylo do roztoku přidáno 8,6 g MS média, které bylo naváženo pomocí laboratorních vah a 390,4 mg pufru MES, který byl navážen pomocí analytických vah. Objem roztoku byl následně doplněn na 2 l. Dále bylo pomocí pH metru upraveno pH na 6,1 postupným dokapáváním 1M KOH do roztoku. Do pěti lahví s 2,8 g agaru byl tento roztok rozlít po 400 ml. Hrdlo láhve bylo obaleno hliníkovou fólií a opatřeno autoklávovací páskou – medium bylo označeno barevnou páskou se jménem a datem. Poté bylo hotové MS médium vysterilizováno v automatickém

parním autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa. Sterilní médium bylo uskladněno v ledničce.

3.2.2 Povrchová sterilizace a kultivace semen

Pro experiment byl použit flowbox, dlouhá pinzeta, automatické pipety s max. objemem 10 ml a 20-200 μ l, sterilní špičky, sterilní plastová 50ml zkumavka, dvě nesterilní kulaté plastové 50ml zkumavky, plastové sterilní Petriho misky (průměr 90 mm), lihový kahan, hliníková folie, mikrovlnná trouba a kuchyňská chňapka. Z chemikálií potom sterilní destilovaná voda, připravené MS médium, 98% a 70% ethanol a ředěný roztok SAVO (NaClO) obsahující 2,8 % aktivního chloru (0,6 l Savo + 0,4 l H₂O), sterilní Erlenmayerova baňka o objemu 300 ml, pravítko, krátká měkká pinzeta, černý papír, stojánky. Do každé zkumavky bylo napočítáno 300 semen jednoho genotypu a k semenům byl přidán roztok SAVO obsahující 2,8 % aktivního chloru (NaClO; ředění 0,6 l SAVO + 0,4 l H₂O), pro povrchovou sterilizaci. Sterilizace semen probíhala 25 až 30 minut. Pomocí mikrovlnné trouby bylo rozežráto připravené MS médium. Flowbox byl poté vysterilizován pomocí 70 % ethanolu. Další postup byl prováděn za sterilních podmínek. Tekuté MS médium bylo rozlito pomocí sterilní 50 ml zkumavky do 12 sterilních plastových Petriho misek (průměr 90 mm) po 20 ml a médium bylo ponecháno ztuhnout. Mezitím byla semena 6krát promyta sterilní destilovanou vodou pomocí 10ml automatické pipety. Odpad byl pipetován na 500 ml nesterilní kádinky. Po ztuhnutí MS média byl proveden výsev 50 semen stejného genotypu do každé Petriho misky pomocí dlouhé pinzety vysterilizované oplachem v 90 % ethanolu a ožehnuté nad plamenem lihového kahanu. Po vysetí všech semen byly misky popsány lihovou fixou jménem kultivaru či mutanta a datem. Petriho misky byly následně přelepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Softpore; výrobce Batist medical, a. s., Česká republika). Poté byly misky ve vertikální poloze pečlivě obaleny hliníkovou fólií. Takto zabalené byly přeneseny do automatické růstové komory (Microclima MC1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). Semena byla kultivována po dobu 3 až 4 dnů při teplotě 23 °C.

3.2.3 Přenos naklíčených semen

Přenos naklíčených semen byl prováděn tři dny po vysetí semen. Pomocí mikrovlnné trouby bylo rozežráto připravené MS médium. Další postup byl prováděn za sterilních podmínek. Tekuté MS médium bylo pomocí sterilní 50 ml plastové zkumavky přelito do sterilní Erlenmayerovy baňky o objemu 300 ml, do které bylo pipetováno příslušné množství zásobního roztoku HgCl₂ (10⁻² mol/l), aby vznikla média o daných

koncentracích. Výsledné koncentrace HgCl_2 byly 0, 10, 15, 20, 30, 40 a 50 $\mu\text{mol/l}$ (pipetované objemy viz Tabulka 2). Takto připravená média byla pro každý genotyp rozlita pomocí sterilní 50 ml zkumavky do 15 sterilních plastových Petriho misek po 20 ml a médium bylo ponecháno ztuhnout. Byly připraveny tři misky o dané koncentraci pro každý genotyp. Misky byly popsány lihovým fixem podle odpovídající koncentrace HgCl_2 . Na ztuhlém MS médium byla poté přenesena vyklíčená semena pomocí krátké měkké pinzety vysterilizované oplachem v 90 % ethanolu a ožehnuté nad plamenem lihového kahanu. Nejprve byla přenášena semena s nejkratšími klíčky a pak postupně s delšími tak, aby na každé misce bylo stejné velikostní spektrum rostlin. Semena byla přenášena náhodně bez ohledu na koncentraci v misce. Po přenesení semen byly misky popsány, podle světelných podmínek (BL, RL a D). Petriho misky byly následně přelepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Softpore; výrobce Batist medical, a. s., Česká republika). Poté byly misky ve vertikální poloze umístěny do stojánek a přeneseny do v růstových kultivačních komor s kontinuálním modrým (BL) a červeným (RL) světlem. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36 W/18 – Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 440 nm. Zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD- 36 W/15 – Red (Philips, USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ při 660 nm. V případě inkubace ve tmě byly misky ve vertikální poloze pečlivě zabaleny do hliníkové fólie. Naklíčená semena byla kultivována po dobu 7 dnů při teplotě 23 °C.

Tabulka 2: Objem zásobního roztoku HgCl_2 ve 120 ml média pro přípravu požadované koncentrace pro kultivaci rostlin.

| Koncentrace HgCl_2 v médiu ($\mu\text{mol/l}$) | Objem zásobního roztoku HgCl_2 (10^{-2} mol/l) na 120 ml média (μl) |
|---|--|
| 0 | 0 |
| 10 | 120 |
| 15 | 180 |
| 20 | 240 |
| 30 | 360 |
| 40 | 480 |
| 50 | 600 |

3.2.4 Měření rostlin

Po 7 dnech byly rostliny vyneseny z růstových komor a pomocí pravítka byly na černém papíře měřeny délky kořenů a hypokotylů s přesností na 1 mm. Data byla zaznamenávána do přehledné tabulky. Výsledky měření byly zpracovány a vyneseny do grafů pomocí programu Excel. Následně byly spočítány procentuální hodnoty míry inhibice růstu kořenů a hypokotylů rostlin při různých koncentracích, jako kontrola sloužily průměrné

délky částí rostlin pěstovaných bez inhibitoru akvaporinů HgCl_2 . Byla vypočtena směrodatná odchylka (pomocí Excelu a funkce SMODCH.VÝBĚR) a standardní chyba. Z těchto výsledků byly následně sestaveny grafy pro vyhodnocení praktické části.

5 Výsledky

Pro sledování regulace akvaporinů skrze fytochromy, byli použiti fotomorfogenní mutanti rajčete *tri1*, *fri1* a *hp1*. Jako kontrola těchto fotomorfogenních mutantů byly použity rostlinné kultivary, od kterých byly tyto mutanti odvozeni. Konkrétně se tedy jedná o kultivar Money Maker pro mutanta *fri1*, kultivar GT pro mutanta *tri1* a kultivar Rutgers pro mutanta *hp1*.

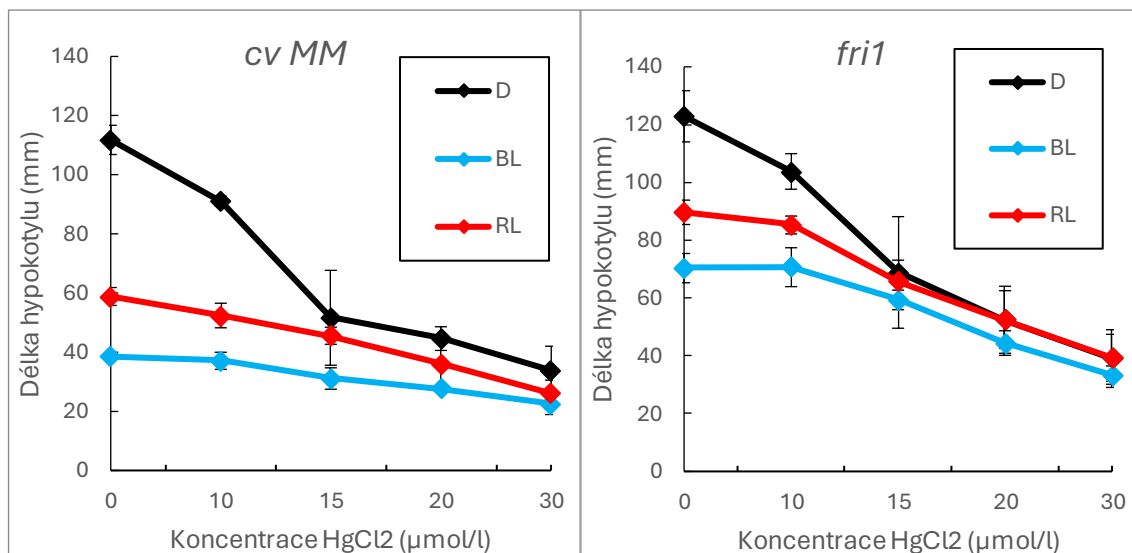
Semena rostlin se nechala naklíčit po dobu 3-4 dnů na MS médiu při 23 °C ve tmě (D). Pro blokaci akvaporinů byl použit inhibitor HgCl₂ v různých koncentracích, který byl přidán do MS média. Poté byla naklíčená semena sterilně přenesena na nové médium s obsahem inhibitoru a takto byla kultivována 7 dní při 23 °C ve třech sériích: jedna semena ve tmě (D), druhá na červeném (RL) a třetí na modrém (BL) světle. Takto bylo provedeno 3-5 nezávislých experimentů pro každého mutantu.

5.1 Růstové reakce mutantu *fri1*

Se semeny *fri1* a cv. MM byly provedeny celkem 3 experimenty. pro tyto dva genotypy byly použity koncentrace HgCl₂ 0, 10, 15, 20 a 30 μmol/l.

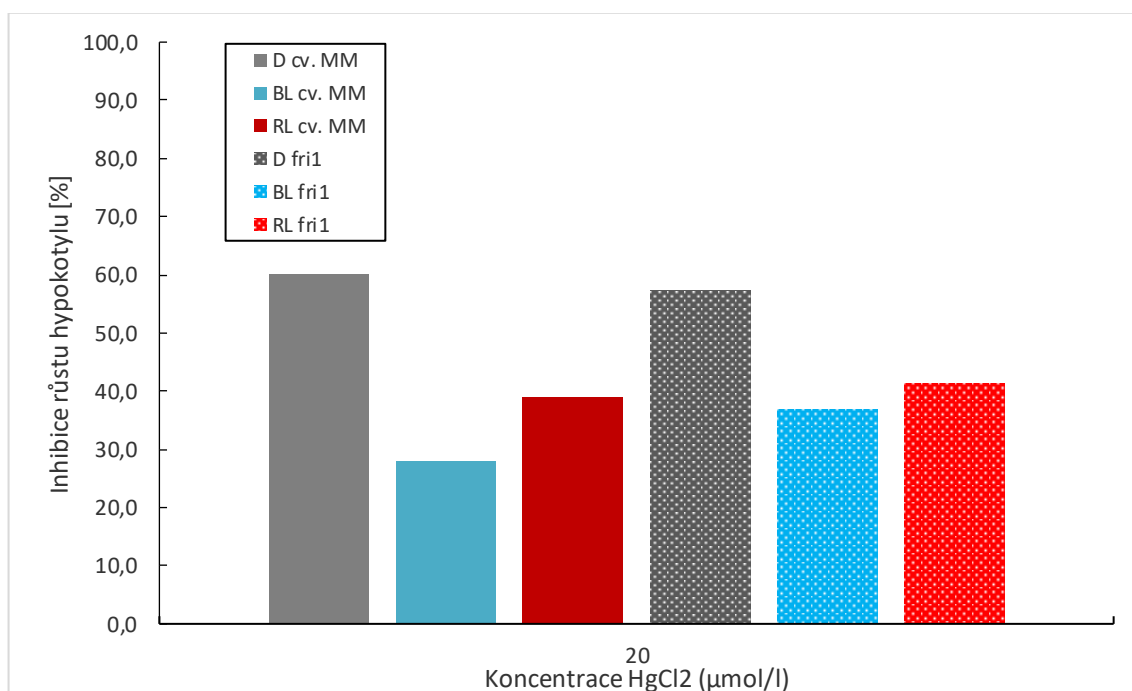
5.1.1 Elongace hypokotyly mutantu *fri1*

V těchto experimentech byl studován růst hypokotyly mutantu *fri1* a kontrolní rostliny cv. MM a jejich citlivost k HgCl₂ v závislosti na světelných podmínkách Obr. 7 ukazuje, že zatímco etiolizované hypokotyly cv. MM a *fri1* byly podobně dlouhé, na BL a RL se délky hypokotylů výrazně lišily, U genotypu cv. MM je více patrný vliv RL a BL na inhibici hypokotyly než u genotypu *fri1*. Průměrné délky hypokotylů cv. MM při nulové koncentraci inhibitoru byly v D 111,8 mm; na RL 58,8 a na BL 38,5 mm. Při nulové koncentraci inhibitoru rostliny genotypu *fri1* dosahovaly v D 122,9 mm; na RL 89,7 a na BL 70,3 mm průměrné délky hypokotyly. Z grafu (Obrázek 7) je patrné, že s rostoucí koncentrací HgCl₂ se zkracuje průměrná délka hypokotyly rostlin jak u kontrolního genotypu cv. MM, tak i u fotomorfogenního mutantu *fri1*. U genotypu cv. MM se délka hypokotyly při maximální koncentraci HgCl₂ 30 μmol/l ve tmě zkrátila o 69,7 %, na RL se délka zkrátila o 55,7 % a na BL o 41,3 %. U *fri1* se hypokotyl zkracoval na BL (52,6 %) a RL (56,1 %) méně než u kontrolní rostliny.



Obrázek 7: Růstové reakce hypocotylu rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. MM (vlevo) a mutanta *fri1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl₂. Vynesená data představují průměrné hodnoty ± SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů.

Pro zjištění citlivosti hypocotylů jednotlivých genotypů k HgCl₂ byla vypočítána míra inhibice v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl₂. Obrázek 8 ukazuje inhibici růstu hypocotylu obou genotypů vlivem HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l ve tmě, na BL či RL. U obou genotypů docházelo ve tmě k výrazně vyšší inhibici růstu hypocotylu než na světle (RL i BL). Rostliny rostoucí na modrém nebo na červeném světle vykazovaly tedy menší citlivost k HgCl₂ než ve tmě. Pokles citlivosti hypocotylů k HgCl₂ na modrém a červeném světle byl u obou genotypů podobný. Stejný trend byl pozorován i při ostatních koncentracích HgCl₂.

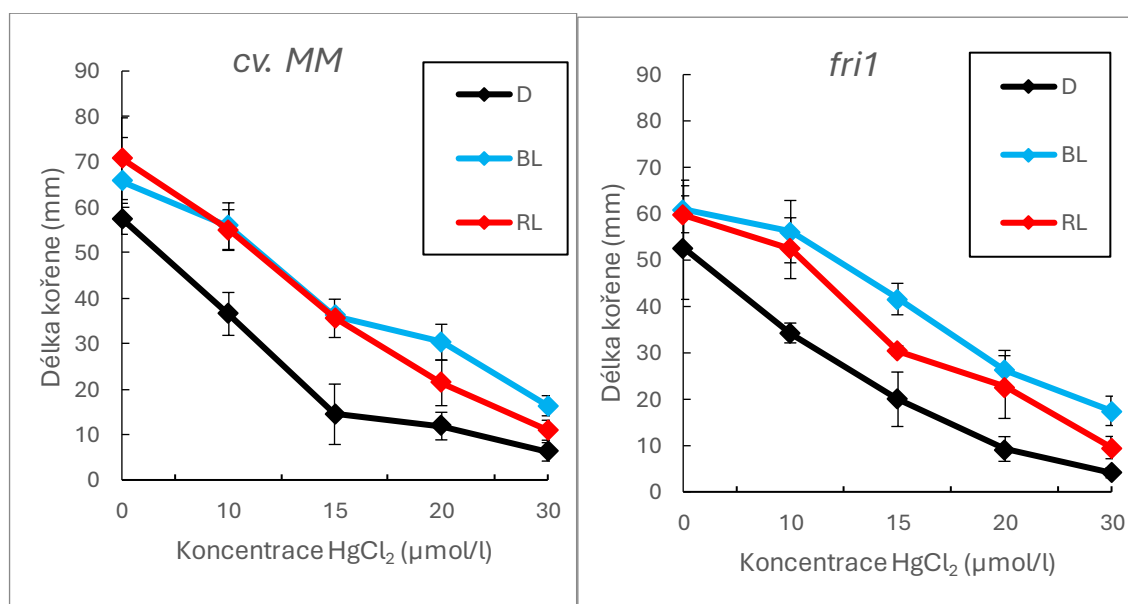


Obrázek 8: Inhibice růstu hypocotylu cv. MM a *fri1* vlivem HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l po 7 dnech kultivace rostlin

ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

5.1.2 Elongace kořene mutanta *fri1*

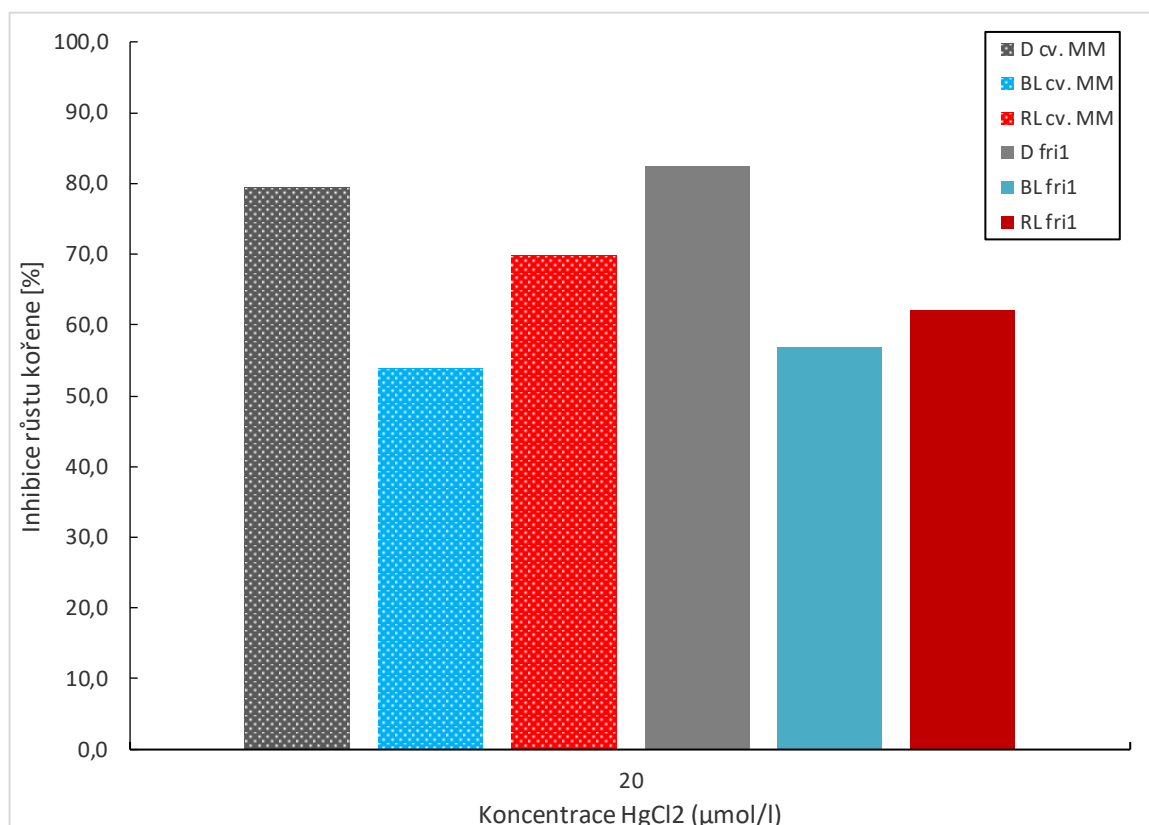
Dále byl studován růst kořene mutanta *fri1* a kontrolní rostliny cv. MM a jejich citlivost k HgCl_2 v závislosti na světelných podmínkách. Obrázek 9 ukazuje, že u obou genotypů rostliny ve tmě měly kratší kořeny než rostliny pěstované na světle. Při nulové koncentraci měly rostliny cv. MM průměrnou délku kořene zhruba 66 mm na BL, asi 71 mm na RL a přibližně 58 mm ve tmě. Při nulové koncentraci rostliny *fri1* měly průměrnou délku kořene 61 mm na BL, přibližně 60 mm na RL a asi 53 mm ve tmě. Je patrné, že HgCl_2 v médiu inhiboval růst kořene u obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací. Při koncentraci 30 $\mu\text{mol/l}$ dosahovaly kořeny cv. MM ve tmě asi 6 mm, tedy zkrácení o 89,2 %, na RL 11 mm, tedy zkrácení o 84,5 % a na BL se kořen zkrátil o 75,1 % zhruba na 16 mm. Při stejné koncentraci inhibitoru délky kořene mutanta *fri1* dosahovaly délky ve tmě asi 4 mm, došlo ke zkrácení o 92,2 %, na RL se kořeny zkrátily o 84 % na zhruba 10 mm, a s délkou přibližně 18 mm na BL došlo ke zkrácení o 71,3 %.



Obrázek 9: Růstové reakce kořene rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. MM (vlevo) a mutanta *fri1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl_2 . Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, které byly získány ze tří nezávislých experimentů.

Pro zjištění citlivosti kořenů jednotlivých genotypů k HgCl_2 byla vypočítána míra inhibice v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl_2 . Obrázek 10 ukazuje inhibici růstu kořene obou genotypů vlivem HgCl_2 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ ve tmě, na BL či RL. U obou genotypů docházelo ve tmě k vyšší inhibici růstu kořene než na světle (RL i BL). Rostliny obou genotypů rostoucí na modrém nebo na červeném světle

vykazovaly tedy menší citlivost k HgCl_2 než ve tmě. Ani při jedné testované koncentraci nebyly sledovány výrazné rozdíly mezi kontrolním a mutantním genotypem. Pro zjednodušení byly v grafu vyneseny hodnoty inhibice růstu kořene při reprezentativní koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$.



Obrázek 10: Inhibice růstu kořene cv. MM a fri1 vlivem HgCl_2 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ po 7 dnech kultivace rostlin ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

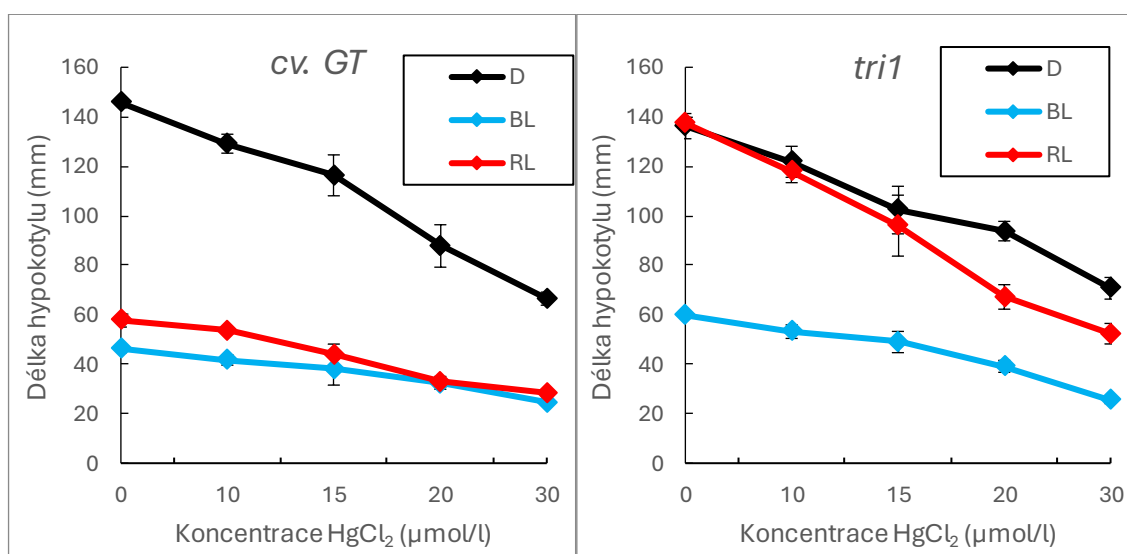
5.2 Růstové reakce mutantu *tri1*

Se semeny rostlin *tri1* a cv. GT byly provedeny celkem 4 experimenty. V grafech poté sledujeme průměrné hodnoty získané ze všech čtyř na sobě nezávislých experimentech. V těchto experimentech byly použity koncentrace HgCl_2 0, 10, 15, 20 a 30 $\mu\text{mol/l}$.

5.2.1 Elongace hypokotylu mutantu *tri1*

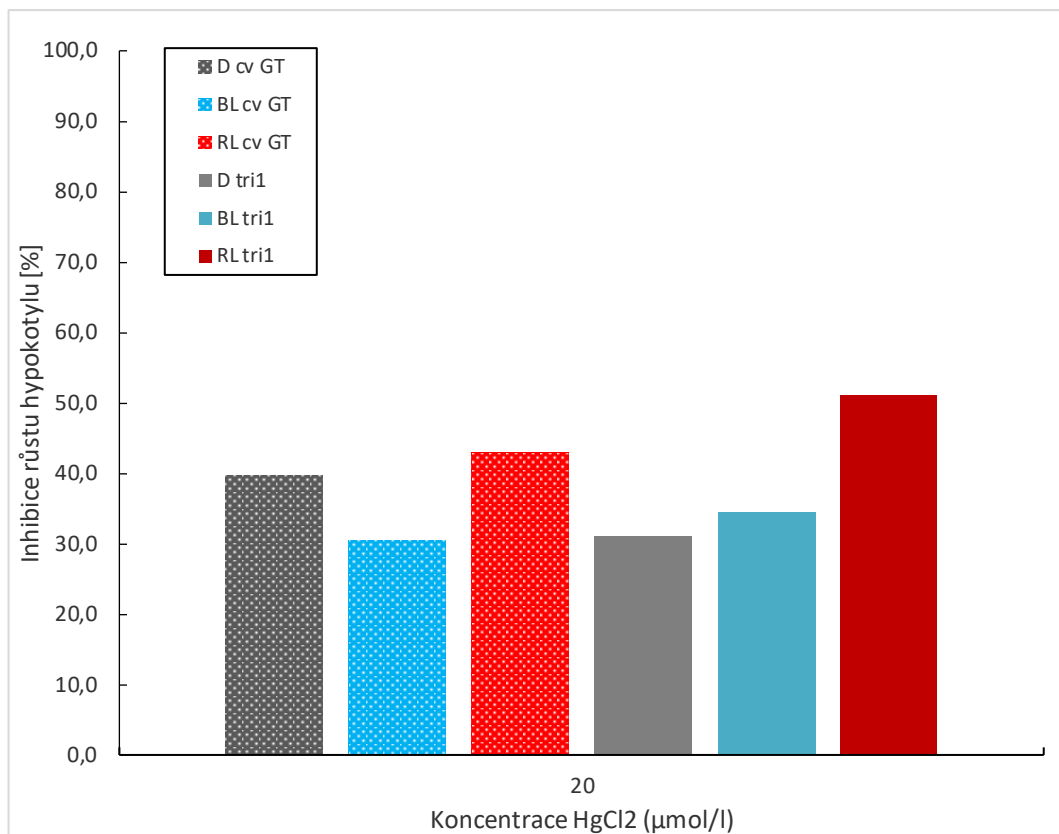
Byl sledován růst hypokotylu mutantu *tri1* a kontrolní rostliny cv. GT a jejich citlivost k HgCl_2 . Na obr. 11 pozorujeme, že při absenci HgCl_2 dosahovala délka etiolizovaných hypokotylů cv. GT kolem 146 mm. Modré světlo zkracovalo hypokotyl asi na 47 mm a červené zhruba na 57 mm. V případě mutantu *tri1* délka etiolizovaných hypokotylů dosahovala délky 136 mm. Modré světlo zkracovalo hypokotyl asi na 60 mm oproti cv. GT nedocházelo ke zkrácení hypokotylu na RL. Délky hypokotylů na RL dosahovaly asi

137 mm. V přítomnosti HgCl_2 docházelo k postupnému zkracování hypokotylů a s rostoucí koncentrací inhibitoru se zmenšovala i průměrná délka hypokotylů. Délka etiolizovaných hypokotylů cv. GT při maximální koncentraci $\mu\text{mol/l}$ dosahovala přibližně 66 mm, sledujeme zkrácení o 54,3 %. Na BL se hypokotyly zkrátily o 46,7 % a dosahovaly délky asi 25 mm a na RL přibližně 28 mm, kde došlo ke zkrácení o 50,7 %. V případě mutanta *tri1* docházelo ke zkracování hypokotyly ve tmě o 48,1 % asi na 71 mm, na BL se délka hypokotyly zmenšila o 57,5 % a průměrná délka byla kolem 25 mm a na RL došlo ke zkrácení o 61,9 % zhruba na 52 mm. Sledované genotypy se tedy lišily hlavně v délce hypokotyly na červeném světle, kdy u cv. GT docházelo na RL k výraznému zkrácení, oproti tomu průměrná délka hypokotylů mutanta *tri1* byla podobná etiolizovanému hypokotyly.



Obrázek 11: Růstové reakce hypokotyly rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (vlevo) a mutanta *tri1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl_2 . Vynesená data představují průměrné hodnoty \pm SE, které byly získány ze čtyř nezávislých experimentů.

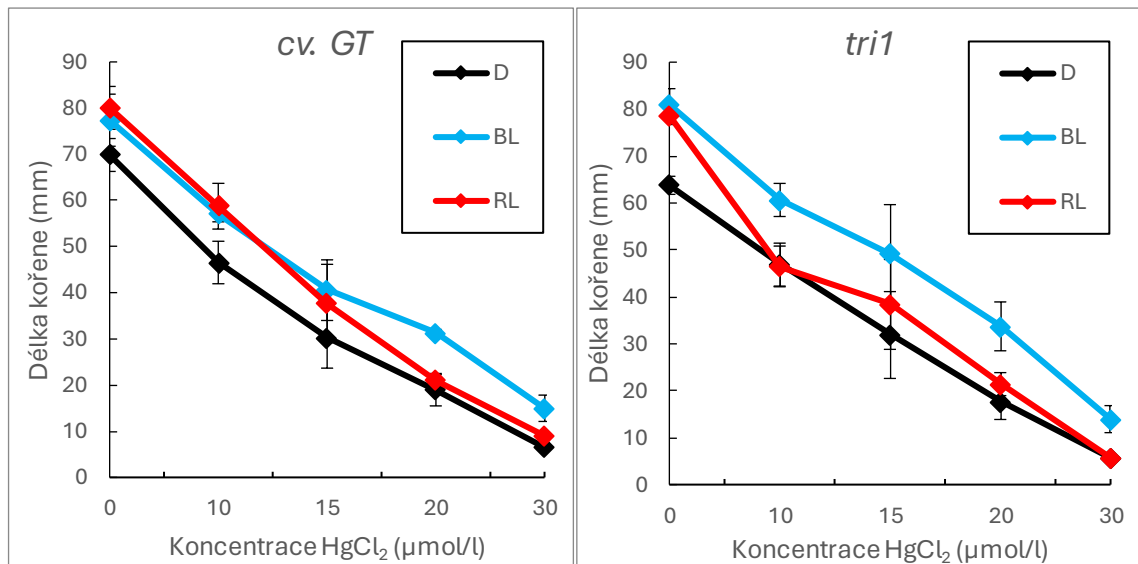
Pro zjištění citlivosti hypokotylů jednotlivých genotypů k HgCl_2 byla vypočítána míra inhibice v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl_2 . Obrázek 12 ukazuje inhibici růstu hypokotyly obou genotypů vlivem HgCl_2 o koncentraci 20 $\mu\text{mol/l}$ při různých světelných podmínkách. V grafu nepozorujeme výrazné rozdíly v míře inhibice růstu hypokotyly na BL a D mezi oběma genotypy. Míra inhibice růstu byla u obou genotypů mírně nižší na BL, a naopak vyšší na RL. Současně však citlivost hypokotylů obou genotypů k HgCl_2 nebyla na BL ani RL výrazně odlišná.



Obrázek 12: Inhibice růstu hypokotylu cv. GT a *tri1* vlivem HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l po 7 dnech kultivace rostlin ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

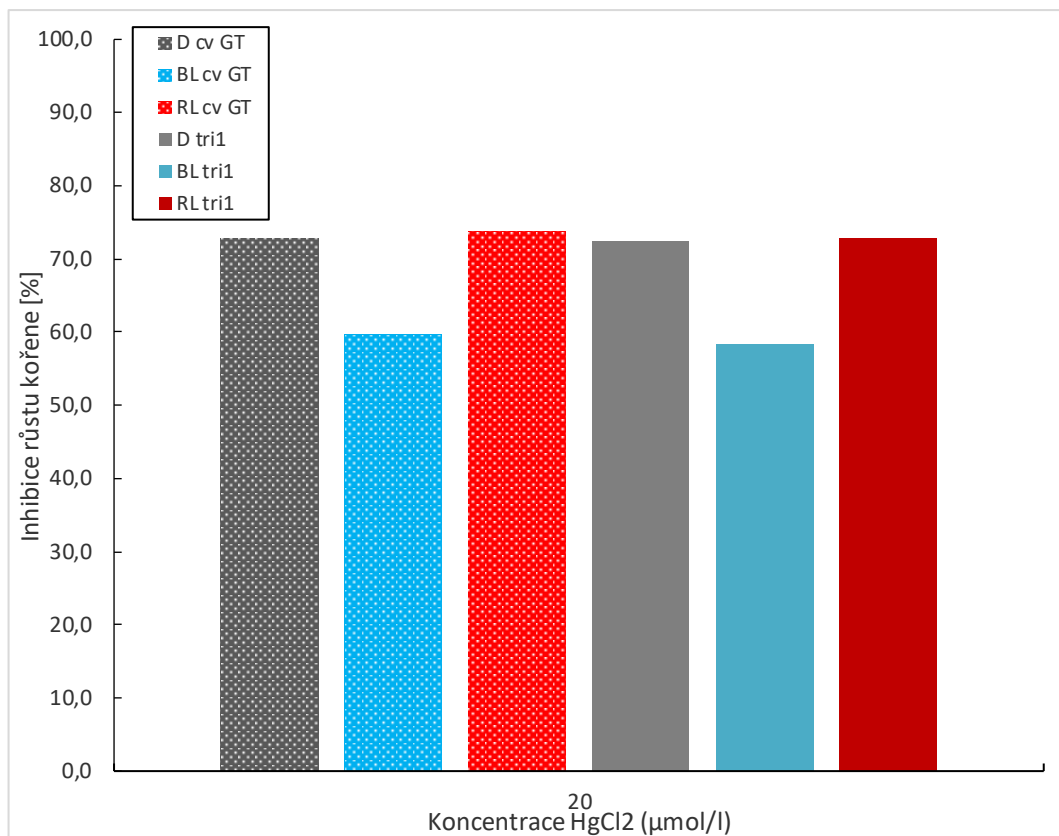
5.2.2 Elongace kořene mutanta *tri1*

Obr. 13 ukazuje, že při nulové koncentraci inhibitoru akvaporinů průměrné délky kořenu u cv. GT dosahovaly 69,8 na D, 77,4 na BL a 80,1 mm na RL. U *tri1* průměrné délky kořenu při nulové koncentraci inhibitoru akvaporinů dosahovaly 63,8 na D, 81 na BL a 78,6 mm na RL. V přítomnosti HgCl₂ se průměrná délka kořene postupně snižovala, úměrně s rostoucí koncentrací inhibitoru. Kořeny rostlin cv. GT se při maximální koncentraci (tj. 30 µmol/l) inhibitoru ve tmě zkrátily o 90,7 % asi na 7 mm, na BL se zkrátily o 80,6 % přibližně na 81 mm a na RL se průměrná délka kořenů snížila o 88,7 % na 9 mm. Kořeny rostlin *tri1* se ve tmě zkrátily o 91,1 % asi na 6 mm, na BL došlo ke zkrácení o 82,8 % přibližně na 14 mm a na RL došlo ke zkrácení o 92,7 % zhruba na 6 mm. Na BL měly rostliny *tri1* mírně delší kořeny s postupně snižující se koncentrací v porovnání k cv. GT. Naopak cv. GT rostliny měly mírně delší kořeny na RL a D.



Obrázek 13: Růstové reakce kořenerajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (vlevo) a mutanta *tri1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl₂. Vynesená data představují průměrné hodnoty ± SE, které byly získány ze čtyř nezávislých experimentů.

Procentuální míra inhibice růstu kořenů (viz Obrázek 14) se u obou genotypů nelišila. Obr. 14 ukazuje příklad inhibice při koncentraci 20 μmol/l HgCl₂. Z obrázku je zřejmé, že míra inhibice byla slabě vyšší u obou genotypů na D a RL. Současně je vidět, že citlivost cv. GT a mutanta *tri1* k HgCl₂ se od sebe významně nelišila, a to bez ohledu na světelné podmínky.



Obrázek 14: Inhibice růstu kořene cv. GT a tri1 vlivem HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l po 7 dnech kultivace rostlin ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

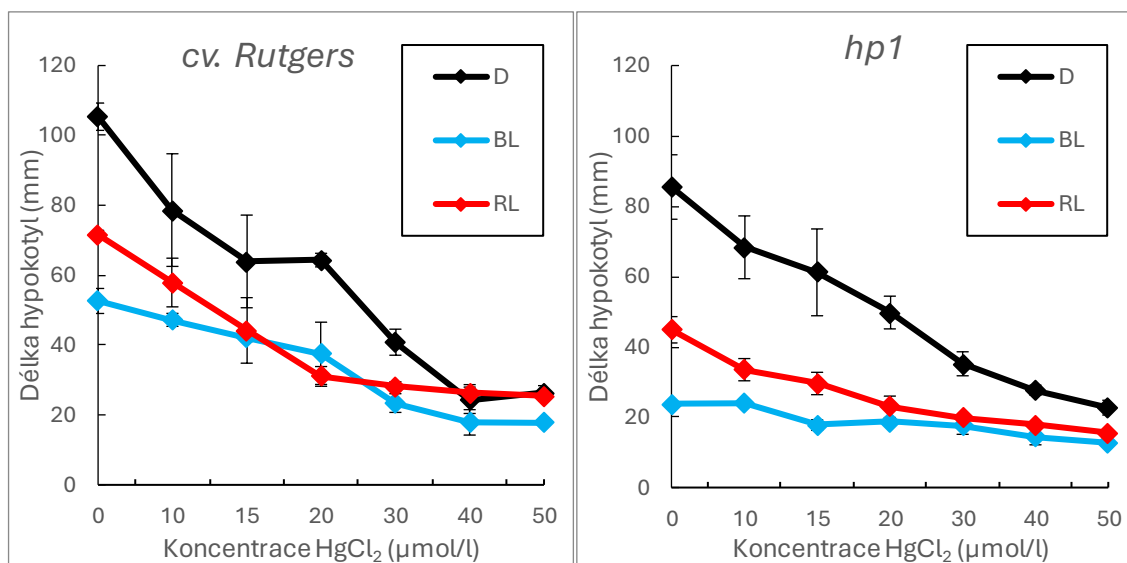
5.3 Růstové reakce mutantu *hp1*

Se semeny rostlin *hp1* a cv. Rutgers bylo provedeno celkem 5 experimentů, z toho 3 experimenty pro koncentrace 0, 10, 15, 20 a 30 a dva doplňující experimenty pro koncentrace 0, 30, 40 a 50 µmol/l HgCl₂. V grafech poté sledujeme průměrné hodnoty ze všech pěti na sobě nezávislých experimentů.

5.2.1 Elongace hypokotylu mutantu *hp1*

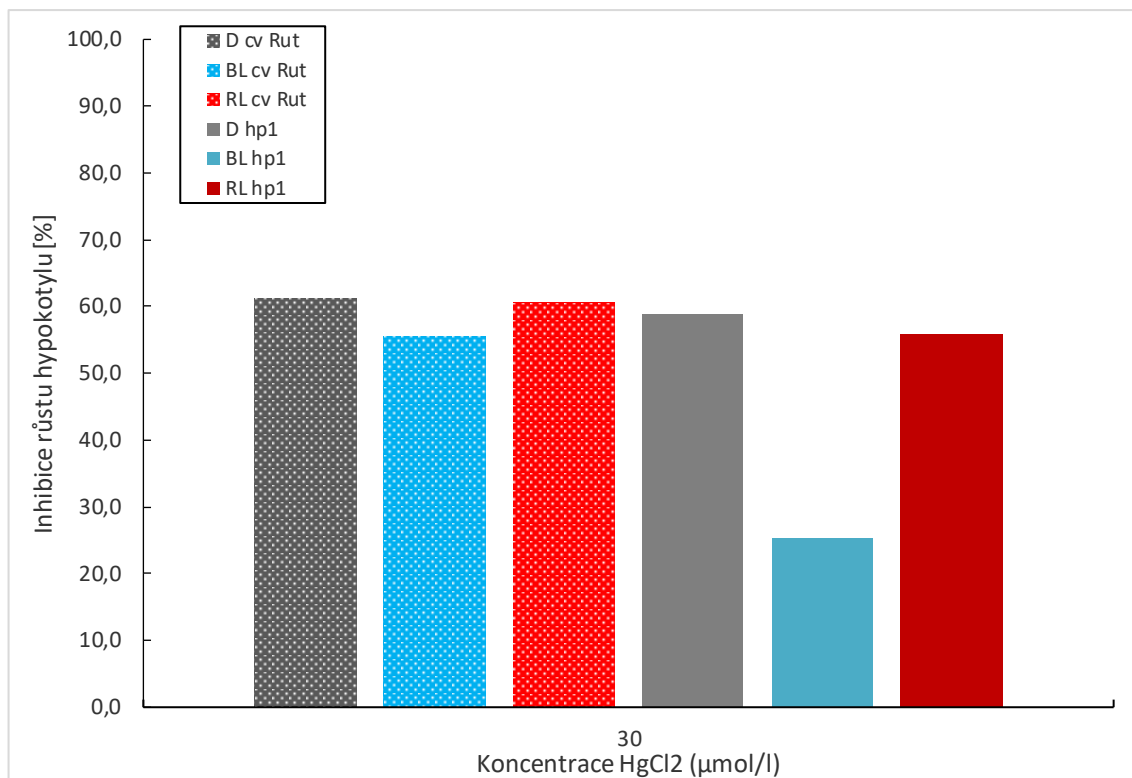
Při nulové koncentraci HgCl₂ pozorujeme v průměrné délce hypokotylu mezi kontrolní cv. Rutgers a *hp1* výrazné rozdíly, a to za všech testovaných světelných podmínek (Obr. 14). Průměrné délky hypokotylů u cv. Rutgers při nulové koncentraci inhibitoru akvaporinů činily 105,4 na D, 71,6 na RL 52,6 mm na BL, oproti tomu průměrné délky hypokotylů *hp1* činily 85,5 na D, 44,8 na RL a 23,6 mm na BL. U cv. Rutgers i *hp1* tedy dochází ke zkrácení délky hypokotylu na světle, přičemž u mutantu je redukce prodlužovacího růstu vlivem světla podstatně větší. U kontrolní rostliny cv. Rutgers i mutantu *hp1* sledujeme výrazný účinek inhibice HgCl₂ ve tmě i na světle. HgCl₂ o maximální testované koncentraci 50 µmol/l výrazně inhiboval růst hypokotylu u obou genotypů. U cv. Rutgers došlo ve tmě ke zkrácení o 75,1 % asi na 26 mm, na BL se délka

hypokotyly zkrátily o 65,9 % na 18 mm a na RL došlo ke zkrácení o 64,4 % přibližně na 26 mm. U mutantu *hp1* došlo ve tmě ke zkrácení hypokotyly o 73,4 % asi na 23 mm, k výrazné změně poté došlo na BL, kde se hypokotyl zkrátil pouze o 46,2 % asi na 13 mm a na RL se 73,4% zkrácením dosahovaly průměrné délky hypokotyly asi 16 mm.



Obrázek 15: Růstové reakce hypokotyly rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (vlevo) a mutantu *hp1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl₂. Vynesená data představují průměrné hodnoty ± SE, které byly získány z pěti nezávislých experimentů.

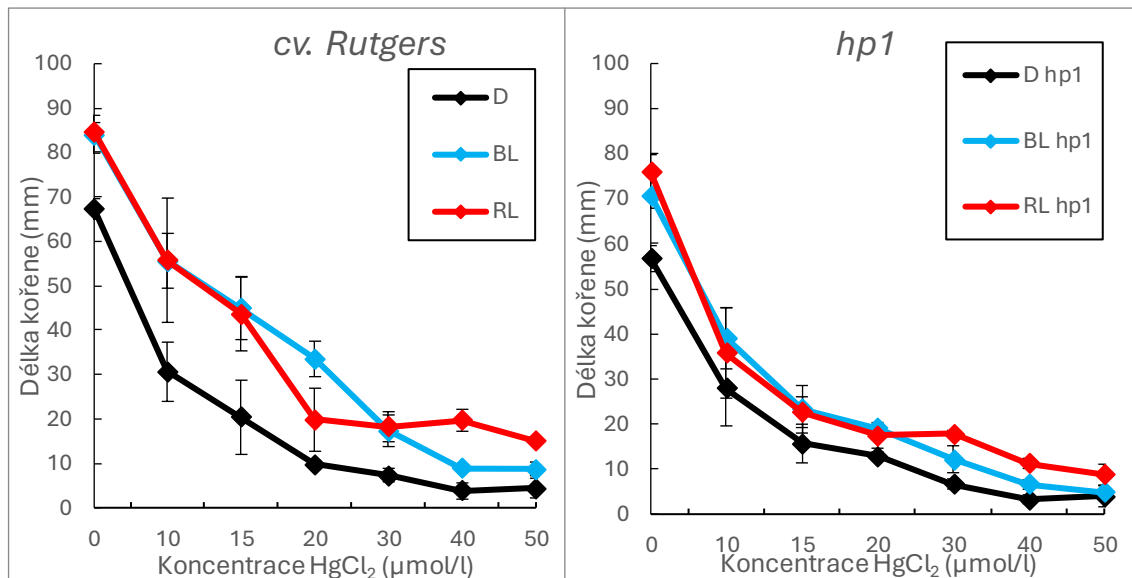
Byl sledován vztah míry inhibice růstu hypokotyly a koncentrace inhibitoru akvaporinů HgCl₂. Procentuální míra inhibice růstu hypokotyly při koncentraci HgCl₂ 30 μmol/l (viz Obrázek 16) je v porovnání s kontrolní rostlinou u *hp1* srovnatelná na D a RL, avšak míra inhibice na BL je výrazně nižší u *hp1*. Hypokotyly rostlin *hp1* na BL jsou tedy k HgCl₂ méně citlivé než hypokotyly cv. Rutgers. Míra inhibice se zvyšovala s rostoucí koncentrací inhibitoru HgCl₂, přičemž trend zůstával stejný



Obrázek 16: Inhibice růstu hypokotyly cv. Rutgers a *hp1* vlivem $HgCl_2$ o koncentraci $30 \mu mol/l$ po 7 dnech kultivace rostlin ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

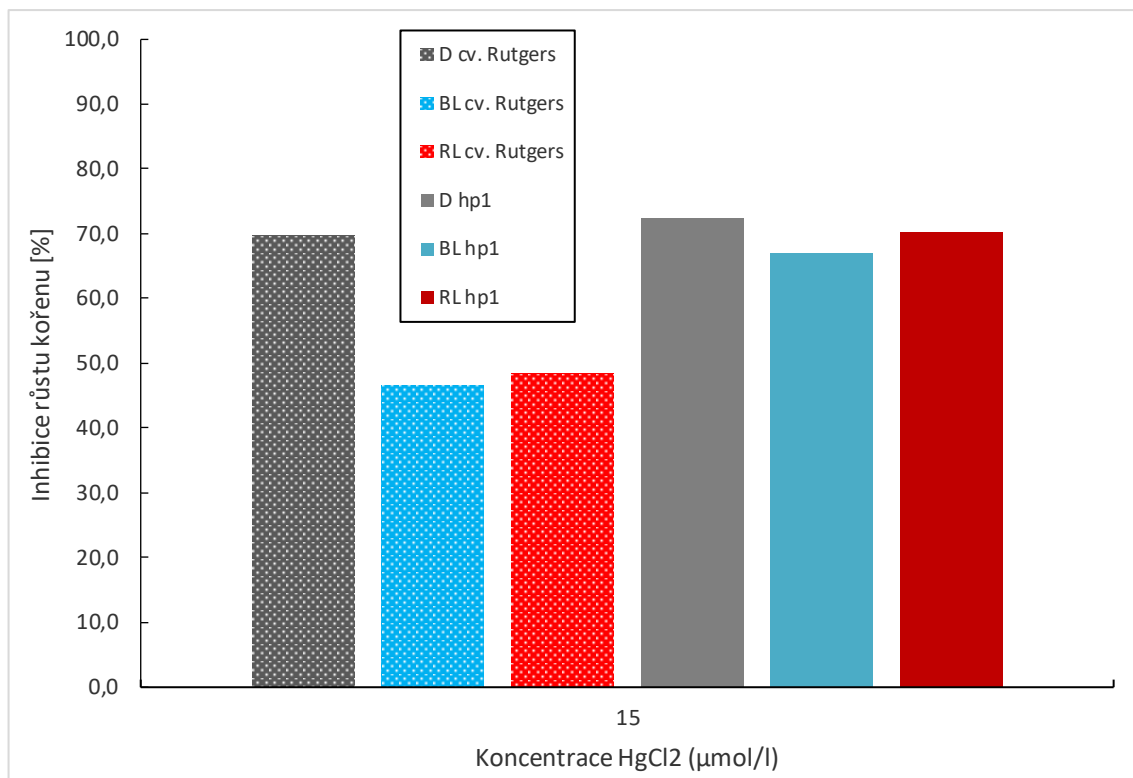
5.2.2 Elongace kořene mutantu *hp1*

Z grafů (Obrázek 17) je patrné, že při nulové koncentraci inhibitoru byly délky kořenů u obou genotypů rozdílné. U *hp1* dosahovala průměrná délka kořene na D 56,7, na RL 75,8 a na BL 70,7 mm, kontrolní genotyp dosahoval průměrných délek na D 67,3, na RL 84,6 a na BL 84,1 mm. Celkově tedy byly kořeny *hp1* kratší oproti kontrolní rostlině, přičemž citlivost kořenů ke světlu byla u obou genotypů podobná. U cv. Rutgers i mutantu *hp1* docházelo k postupnému zkracování kořene vlivem $HgCl_2$. Při maximální koncentraci inhibitoru dosahovaly kořeny cv. Rutgers délky asi 4 mm ve tmě (zkrácení o 93,4 %), zkrácení o 89,6 % přibližně na 9 mm na BL a 15 mm po zkrácení o 82,3 % zkrácení na RL. U mutantu *hp1* dosahovaly průměrné délky etiolizovaných kořenů při maximální koncentraci inhibitoru $HgCl_2$ délky 4 mm (zkrácení o 93 %), délky asi 5 mm po zkrácení o 93,2 % na BL a kořeny se zkrátily o 88,4 % zhruba na 9 mm na RL.



Obrázek 17: Růstové reakce kořene rajčete *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (vlevo) a mutantu *hp1* (vpravo) v závislosti na světelných podmínkách (D, BL, RL) po 7 dnech kultivace rostlin na kultivačním médiu obsahujícím vybrané koncentrace HgCl₂. Vynesena data představují průměrné hodnoty ± SE, které byly získány z pěti nezávislých experimentů.

Obr. 18 ukazuje procentuální míru inhibice při 15 μmol/l HgCl₂. Růst kořene u cv. Rutgers byl nejvíce inhibován ve tmě, zatímco na světle se míra inhibice růstu kořenu vlivem HgCl₂ snížila. Mutant *hp1* se v míře inhibice ve tmě od cv. Rutgers nelišil, avšak na světle ukazovaly kořeny mutantu *hp1* podobnou citlivost k HgCl₂ jako ve tmě. Tento rozdíl v inhibicích růstu kořenů vlivem HgCl₂ na světle mezi *hp1* a cv. Rutgers se vyskytoval pouze při této a nižších koncentracích inhibitoru. S rostoucí koncentrací inhibitoru se tyto rozdíly postupně zmenšovaly.



Obrázek 18: Inhibice růstu kořene cv. Rutgers a hp1 vlivem HgCl₂ o koncentraci 15 µmol/l po 7 dnech kultivace rostlin ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném (RL) světle. Vynesená data představují hodnoty inhibice růstu vypočítané z průměrných délek hypokotylů.

6 Diskuse

Výsledky experimentů ukázaly, že inhibitor akvaporinů HgCl₂ redukoval za testovaných všech světelných podmínek růst hypokotylů i kořenů. Výsledky tedy naznačují, že akvaporiny citlivé k HgCl₂ jsou pozitivně zapojeny v růstu rostlin rajčete.

Z výsledků měření lze dále konstatovat, že růst rostlin v přítomnosti HgCl₂ závisí na světle. Výsledky měření růstu hypokotylu u mutantu *fri1* a WT (cv. MM) ukazují, že rostliny jsou méně citlivé k HgCl₂ na BL a RL. Tyto výsledky naznačují, že světlo by mohlo ovlivňovat množství akvaporinů (indukovat jejich zvýšení) nebo ovlivňovat (tedy snižovat) jejich citlivost k inhibitoru HgCl₂. V míře inhibice růstu hypokotylu jsme současně nepozorovali výrazné rozdíly mezi oběma genotypy. Z těchto výsledků lze usoudit, že vliv světla na citlivost hypokotylů k HgCl₂ (tedy případně na citlivost či množství akvaporinů) není zprostředkován fytochromem A.

Závěry učiněné z výsledků měření růstu kořene u mutantu *fri1* a WT (cv. MM) jsou podobné jako u hypokotylů. Kořeny obou genotypů ukazovaly sníženou citlivost k HgCl₂ na BL a RL. Je tedy pravděpodobné, že světlo může ovlivňovat množství či aktivitu akvaporinů. Protože se však mezi oběma genotypy nevyskytovaly výrazné rozdíly v citlivosti kořenů k HgCl₂ za žádných s testovaných světelných podmínek, je možné se domnívat, že vliv světla na citlivost kořenů k HgCl₂ není zprostředkován fytochromem A.

Studie růstu hypokotylu mutantu *tri1* a cv. GT ukázaly, že mezi mutanty nebyly pozorovány výrazné rozdíly v citlivosti hypokotylů k HgCl₂, a to při všech testovaných světelných podmínkách. Pouze na červeném světle bylo pozorováno mírné zesílení inhibičního účinku inhibitoru se růst hypokotylu u mutantu *tri1*. Avšak vzhledem k tomu, že rozdíly nebyly výrazné, nelze z výsledků udělat jednoznačný závěr o zapojení PhyB1 v regulaci citlivosti hypokotylů rajčete k HgCl₂. Bylo by nutné provést větší počet nezávislých experimentů a výsledky, popřípadě statisticky zpracovat.

Výsledky měření kořene mutantu *tri1* a kontrolní rostliny cv. GT byla ověřena důležitost akvaporinů pro růst kořene inhibicí HgCl₂. Výsledky experimentů ukázaly, že u obou genotypů byla citlivost kořenů k inhibičnímu účinku HgCl₂ snížena vlivem modrého světla. Výsledky tedy naznačují, že by modré světlo mohlo hrát úlohu v regulaci akvaporinů v kořenech rostlin rajčete. Vzhledem k tomu, že kořeny *tri1* i cv. GT

reagovaly k HgCl_2 na modrém světle podobně, je možno učinit závěr, že vliv modrého světla na snížení citlivosti kořenů k HgCl_2 nebude zprostředkován PhyB1.

V růstu hypokotylu u mutanta *hpl* v porovnání s WT (cv. Rutgers) byly pozorovány výrazné rozdíly. Zatímco ve tmě nebo na červeném světle se míra inhibice růstu hypokotylů u testovaných genotypů téměř nelišila, na modrém světle došlo u mutanta *hpl* k výraznému snížení inhibice prodlužování hypokotylu vlivem HgCl_2 . Rostliny *hpl* jsou tedy méně citlivé na modrém světle k HgCl_2 . Výsledky tedy naznačují, že vliv modrého světla na citlivost hypokotylů k HgCl_2 je zprostředkován proteinem DDB1. Na základě tohoto závěru můžeme diskutovat vliv DDB1 na fotomorfogenezi rostlin. Vyskytují se u rostlin důsledkem mutace genu *DDB1* na modrém světle jiné izoformy nebo dochází k deformaci akvaporinů? Nebo dochází ke zvýšení počtu akvaporinů? Zvýšení počtu akvaporinů bychom mohli dokázat dalším zkoumáním na úrovni exprese RNA nebo proteinů. Změnu aktivity akvaporinů bychom pak mohli zjistit měřením míry fosforylace proteinů akvaporinů za různých světelných podmínek. Jak se mění úroveň exprese akvaporinů u mutanta v závislosti na HgCl_2 , jak se mění celkové množství AQP? Porovnáním mutanta *hpl* a WT by se dala určit míra fosforylace akvaporinů na BL a za přítomnosti HgCl_2 .

U kořene mutanta *hpl* a WT (cv. Rutgers) docházelo k opačnému efektu než u hypokotylu. U kořenů cv. Rutgers byl inhibiční účinek vlivem HgCl_2 snížen vlivem modrého i červeného světla, zatímco u *hpl* tato reakce chyběla. Výsledky tedy naznačují, že modré a červené světlo by mohlo prostřednictvím funkčního proteinu DDB1 snižovat citlivost akvaporinů k HgCl_2 nebo zvyšovat jejich množství.

Literárních údajů o regulaci akvaporinů není mnoho. Bylo například zjištěno, že modré světlo pozitivně ovlivňuje expresi některých akvaporinů rostlin *Arabidopsis*, rýže a rajčete (Kaldenhoff et al., 1996; Liang et al., 2012; Balarynová and Fellner, 2019). Dále byl sledován pokles exprese genů kodujících akvaporiny bílým světlem u rostlin rýže a vnímání červeného světla fytochromem pravděpodobně nehraje roli ve světlem zprostředkované regulaci hydraulické vodivosti na úrovni akumulace transkriptů určitých druhů akvaporinů (OsAQP) (Liang et al., 2012). Dále byl pozorován pokles exprese určitých genů akvaporinů (PIP1;3) vlivem HgCl_2 . Tato regulace nebyla ovlivněna světlem. Zároveň byl popsán vliv HgCl_2 na zvýšení exprese určitých akvaporinů (PIP1;2,

PIP1;4, PIP1;5 a PIP2;2) na modrém světle během procesu klíčení semen rajčete (Balarynová and Fellner, 2019).

7 Závěr

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda a jak jsou akvaporiny regulovány světlem a jestli je vliv světla na fungování akvaporinů u rostliny rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) zprostředkován fytochromy. Byl sledován vliv HgCl_2 na růst hypokotylu a kořene při odlišných světelných podmínkách (modré a červené světlo nebo tma) *in vitro*. Pro sledování efektu fytochromů byly pro experiment zvoleny fotomorfogenní mutanti rajčete *fri1* (odvozený od kultivaru Money Maker), *tri1* (odvozený od kultivaru GT) a *hpl* (odvozený od kultivaru Rutgers). Experimenty bylo potvrzeno, že akvaporiny jsou důležitým prvkem pro správný růst a vývoj rostlin. Pozitivně ovlivňují růst hypokotylu i kořene a jejich inhibice má za následek postupně se zkracující délky rostlinných částí v závislosti na koncentraci inhibitoru.

Výsledky experimentů s mutanty *fri1* a *tri1* vedly k závěrům, že PhyA a PhyB pravděpodobně nezprostředkovávají vliv světla na citlivosti hypokotylů a kořenů k inhibitoru HgCl_2 . Na druhé straně výsledky ukázaly, že změna citlivosti rostlin rajčete k HgCl_2 vlivem světla je pravděpodobně regulována signální dráhou proteinu DDB1. Tyto výsledky mohou být odrazovým můstkem pro další experimenty, které by mohly poodhalit mechanismy regulace akvaporinů a úlohu modrého a červeného světla v těchto procesech.

8 Literatura

- AHMED S, KOUSER S, ASGHER M, GANDHI G (2021) Plant aquaporins: A frontward to make crop plants drought resistant. *Physiologia Plantarum* 172: 1089-1105
- BALARYNOVÁ J and FELLNER M (2019) Expression of genes encoding PIP aquaporins in tomato seeds exposed to blue radiation and mercury. *Biologia Plantarum* 63: 1-10
- BERGOUGNOUX V, HLAVÁČKOVÁ V, PLOTZOVÁ R, NOVÁK O, FELLNER M (2009) The 7B-1 mutation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Journal of Experimental Botany* 60: 1-12
- CARVALHO R F, CAMPOS M L, AZEVEDO R A (2011) The role of phytochrome in stress tolerance. *Journal of Integrative Plant Biology* 53: 920-929.
- CURTICĂPEAN M (2019) Plant aquaporins. *Acta Biologica Marisiensis* 2: 36-48
- GAUTAM A and PANDEY A K (2021) Aquaporins responses under challenging environmental conditions and abiotic stress tolerance in plants. *The Botanical Review* 87: 467–495
- HAN Y J, SONG P S, J I KIM (2007) Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *Journal of Plant Biology* 50: 230-240
- HUUB L, KERCKHOFFS J, KENDRICK R E (1997) Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato. *Journal of Plant Research* 110: 141–149
- CHENG M C, KATHARE P K, PAIK I, HUQ E (2021) Phytochrome signaling networks. *Annual Review of Plant Biology* 72: 217-244
- KALDENHOFF R, KÖLLING A, RICHTER G (1996) Regulation of the *Arabidopsis thaliana* aquaporin gene AthH2 (PIP1b). *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology* 36: 351-354
- KAPILAN R, VAZIRI M, ZWIAZEK J J (2018) Regulation of aquaporins in plants under stress. *Biological Research* 51
- KENDRICK R E, KERCKHOFFS L H J, A Van TUINEN a M KOORNNEEF (1997) Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant, Cell and Environment* 20: 746-751
- LIANG W, LI L, ZHANG F, LIU Y, LI M, SHI H, LI H, SHANG F, LOU C, LIN Q, LI J, YANG X (2012) Effects of abiotic stress, light, phytochromes and phytohormones on the expression of *OsAQP*, a rice aquaporin gene. *Plant Growth Regulation*: 69: 21-27

- LIEBERMAN M, SEGEV O, GILBOA N, LALAZAR A, LEVIN I (2004) The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics* 108: 1574-1581
- LISCUM E and BRIGGS W R (1995) Mutations in the *NPH1* locus of Arabidopsis disrupt the perception of phototropic stimuli. *The Plant Cell* 7: 473-485
- LISCUM E and BRIGGS W R (1996) Mutations of Arabidopsis in potential transduction and response components of the phototropic signaling pathway. *Plant Physiology* 112: 291-296
- MAUREL C (2007) Plant aquaporins: novel functions and regulation properties. *FEBS Letters* 581: 2227-2236
- MAUREL C, VERDOUCQ L, LUU D T, SANTONI V (2008) Plant aquaporins: membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology* 59: 595-624
- MURASHIGE T and SKOOG F (1962) A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- SHAO H B, CHU L Y, SHAO M A, ZHAO C X (2008) Advances in functional regulation mechanisms of plant aquaporins: their diversity, gene expression, localization, structure and roles in plant soil-water relations (Review). *Molecular Membrane Biology* 25: 179-91
- Van TUINEN A, KERCKHOFFS J, NAGATANI A, KENDRICK R E, KOORNNEEF M (1995a) Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficient mutants of tomato. *Molecular Genetics and Genomics* 246: 133-141
- Van TUINEN A, HUUB L, KERCKHOFFS J, NAGATANI A, KENDRICK R E, KOORNNEEF M. (1995b) A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. *Plant Physiology* 108: 939-947
- WELLER J L, SCHREUDER M E, SMITH H, KOORNNEEF M, KENDRICK R E. (2000) Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. *The Plant Journal* 24: 345-356
- WILLIGEN C V, POSTAIRE O, TOURNAIRE-ROUX C, BOURSIAIC Y, MAUREL C (2006) Expression and inhibition of aquaporins in germinating arabidopsis seeds. *Plant & cell physiology* 47: 1241-1250
- WUDICK M M, LUU D T, MAUREL C (2009) A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist* 184: 289-302