

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2011

Maroš Prčina

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Expresse genů kódujících akvaporiny skupiny
PIP u rajčete**

Bakalářská práce

Maroš Prčina

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a že jsem použil pouze literární zdroje, uvedené v kapitole Literatura.

V Olomouci, dne 30. 12. 2011

.....
Podpis

Poděkování

Děkuji vedoucímu bakalářské práce doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a možnost podílet se na výzkumu, doktorandce Mgr. Janě Balarynové za poskytnutí výsledků své disertační práce a kolegyni Aleně Kadlecové za poskytnutí výsledků své dobrovolnické práce. Dále také děkuji kolegyním Véronique Bergounoux Ph.D., doktorandce Mgr. Janě Bořucké, technickým pracovnícím Mgr. Renátě Plotzové, Mgr. Marcele Foltýnové a Mgr. Marii Karlické, a doktorandovi Mgr. Janu Humplíkovi za nespočetné rady a pomoc při práci v laboratoři.

Shrnutí

Předložená bakalářská práce je zaměřena na studium role modrého světla a akvaporinů v reakcích semen rajčete (*Solanum lycopersicum*) ke stresovým podmínkám, a to konkrétně k osmotickému stresu. Modré světlo má nezbytný podíl v řízení mnoha aspektů života rostlin. Jedním z účinků modrého světla je redukce klíčení semen. Inhibiční účinek modrého světla se však neprojevuje u genotypu s mutací v genu 7B-1, jehož konkrétní funkce je dosud neznámá. Tento mutant byl vybrán pro studium interakcí vlivu modrého světla a stresových podmínek, protože vykazuje rezistenci vůči abiotickému stresu specificky na modrém světle.

Jedním z důvodů, které mohou zapříčinit lepší odolnost rostliny k vodnímu stresu obecně a osmotickému stresu konkrétně, je zvýšené množství nebo zvýšená aktivita akvaporinů, které se mohou podílet na příjmu vody rostlinou a lepší distribuci vody v rámci rostlinného organismu. To naznačují také výsledky této práce. Při kultivaci semen pod vlivem HgCl_2 , jakožto inhibitoru akvaporinů, byla zjištěna zhoršená klíčivost všech sledovaných semen. Semena mutované rostliny však vykazovala vyšší odolnost vůči inhibitoru akvaporinů. To naznačuje, společně se zvýšenou odolností na osmotický stres mutovaných semen, že se akvaporiny podílejí na adaptaci na osmotický stres. Proto byl v této práci dále sledován také vliv modrého světla na expresi jednoho akvaporinu třídy PIP u semen mutanta 7B-1 v porovnání s kontrolními rostlinami. Semena byla inkubována na modrém a červeném světle a ve tmě, a exprese byla sledována pomocí RT-PCR již po 24 hodinách inkubace, tedy v inhibiční fázi klíčení. Výsledky expresní analýzy ukázaly, že množství mRNA genu LePIP1-1 není v imbibovaných semenech 7B-1 a semenech kontrolní rostliny příliš vysoká a významně se neliší v závislosti na světelných podmínkách a genotypu semen.

Summary

Submitted bachelor thesis is focused on study of the role of blue light and aquaporins in reactions to stress conditions and particularly to osmotic stress in tomato (*Solanum lycopersicum*) seeds. Blue light acts as a fundamental regulation factor for many aspects of plant life. One of the effects is that blue light reduces seed germination. However, this inhibitory effect of blue light is not notable in a genotype with mutation in a gene 7B-1 whose function is still unknown. Because this mutant shows a resistance to abiotic stresses specifically under blue light, it was chosen for a study of interaction of stress conditions with blue light.

One of the reasons which can cause improvement of a water stress resistance in general and osmotic stress resistance in particular is high level or activity of aquaporins, contributing to better water uptake and better redistribution of water within plant organism. This is also indicated by the results of submitted bachelor thesis. Cultivation of tomato seeds on medium containing HgCl_2 , an inhibitor of aquaporins, resulted in reduction of germination while 7B-1 mutant seeds were affected by aquaporin inhibitor markedly less. This suggests, according to resistance to an osmotic stress showed in mutant seeds, that aquaporins contribute to the processes of adaptation to osmotic stress.

Submitted thesis consequently focuses also on the effect of blue light on expression of a PIP group aquaporin in a seeds of 7B-1 mutant in contrast with control seeds. Seeds were incubated in dark, under red and blue lights and the expression was observed by RT-PCR after 24-hour incubation which means that seeds were in the imbibition phase of germination. Results of the expression analysis showed that the amount of LePIP1-1 mRNA in imbibed seeds of the 7B-1 mutant and control plant is not high and does not differ regarding the light conditions and genotype.

Obsah

1	Úvod	9
2	Úvod do řešené problematiky	10
	2.1 Klíčení	10
	2.1.1 Faktory ovlivňující klíčení	10
	2.1.1.1 Vliv světla na klíčení	11
	2.1.1.2 Hormony zapojené do regulace klíčení	11
	2.1.1.3 Vliv stresu na klíčení	12
	2.1.1.3.1 Vodní stres	13
	2.2 Světlo	14
	2.2.1 Receptory modrého světla, odpovědi na modré světlo	15
	2.2.1.1 Kryptochromy	15
	2.2.1.2 Fototropiny	16
	2.2.1.3 Zeaxantiny	16
	2.3 Akvaporiny	17
	2.3.1 Akvaporiny u rostlin	17
	2.3.2 Struktura akvaporinů	18
	2.3.3 Aktivita a selektivita akvaporinů	19
	2.3.4 Regulace aktivity akvaporinů	19
	2.3.5 Místně a časově specifická exprese akvaporinů	21
	2.3.5.1 Změny v expresi akvaporinů u semen	21
	2.3.6 Akvaporiny a stres	22
3	Materiál a metodika	24
	3.1 Rostlinný materiál	24
	3.2 Prováděné pokusy	24
	3.2.1 Pokus 1	25
	3.2.1.1 Příprava MS média	25
	3.2.1.2 Povrchová sterilizace semen	25
	3.2.1.3 Výsev semen	25
	3.2.1.4 Kultivace semen	26
	3.2.2 Pokus 2	26
	3.2.3 Pokus 3	26

3.2.3.1	Izolace celkové RNA	27
3.2.3.2	Měření koncentrace a čistoty vyizolované celkové RNA	27
3.2.3.3	Přečištění vzorků celkové RNA pomocí DNasy	28
3.2.3.4	Kontrolní PCR	29
3.2.3.5	Elektroforéza produktu kontrolní PCR	30
3.2.3.6	Syntéza cDNA	30
3.2.3.7	PCR s primery pro geny LePIP1-1 a LeEF1	31
3.2.3.8	Elektroforéza produktu PCR s primery pro geny LePIP1-1 a LeEF1	33
4	Výsledky	34
4.1	Pokus 1	34
4.1.1	Maximální klíčivost	34
4.1.2	Kinetika klíčení semen	36
4.2	Pokus 2	41
4.2.1	4.2.1 Maximální klíčivost	41
4.2.2	Kinetika klíčení semen	43
4.3	Exprese genů kódujících akvaporiny skupiny PIP	48
4.3.1	Pokus 3	48
4.3.2	Další výsledky studie exprese akvaporinů skupiny PIP	49
5	Diskuze	51
6	Závěr	54
7	Literatura	55
8	Seznam použitých zkratk	60

1 ÚVOD

Moje bakalářská práce byla řešena v Laboratoři molekulární fyziologie na Katedře buněčné biologie a genetiky (do r. 2011) a v Laboratoři růstových regulátorů (od r. 2011), v rámci bilaterálního česko-amerického projektu nazvaného Mechanizmy světlem regulované tolerance rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) k osmotickému stresu. Projekt je řešen na PřF UP a financován Ministerstvem školství, mládeže a tělovýchovy (projekt č. ME10020).

Ačkoliv existence lidstva zásadně závisí na symbióze s rostlinami a využívání jejich schopnosti přetvořit sluneční energii na biomasu, stávají se mnohé zemědělsky významné oblasti čím dál méně úrodnými. Změny klimatu a činnosti člověka, zvýrazňující extrémní v aridních oblastech, spojené s klesajícími zásobami vody, vedou v současné době k čím dál intenzivnější potřebě efektivní produkce potravin. Jednou z cest je využití rostlin, odolných vůči vodnímu stresu. Dosud má však naše poznání rostlin velké mezery.

Dvěma, zřejmě nejdůležitějšími faktory vnějšího prostředí, ovlivňujícími život rostliny, jsou voda a světlo. Světlo je nepostradatelné pro život všech rostlin a ovlivňuje celý vegetační cyklus, včetně klíčení semen. Klíčení většiny semen je ovlivňováno jak intenzitou, tak i kvalitou světla, jemuž jsou vystaveny. Zároveň jsou rostliny ve fázi klíčení velmi citlivé k nedostatku vody. Proto je zcela na místě zájem o otomorfogenního mutanta rajčete 7B-1, vyznačujícího se, kromě odolnosti vůči abiotickému stresu, také specifickou reakcí na modré světlo a dalšími odlišnostmi, např. v biosyntéze některých fytohormonů, či expresi některých proteinů. U tohoto mutanta není dosud známa funkce mutovaného genu ani konkrétní změny ve fyziologických procesech. Z dosud provedených studií je však patrné, že mutace v genu 7B-1 narušuje signální dráhu modrého světla, ovlivňující pravděpodobně pochody spojené s kyselinou abscisovou. Zároveň je mutant odolný vůči abiotickému stresu, a jelikož je známo, že akvaporiny jsou u všech organismů zapojeny do udržování vodní homeostázy, je na místě prozkoumat, zda mutace v genu 7B-1 ovlivňuje aktivitu či expresi akvaporinů.

Cílem práce bylo přispět k cíli projektu, konkrétně zjistit, jak mutace v genu 7B-1 ovlivňuje schopnosti rostliny tolerovat osmotický stres a zda tato mutace ovlivňuje expresi akvaporinů. Proto jsem zpracoval literární zdroje vztahující se k danému tématu, provedl praktickou část, v níž jsem studoval nejprve vliv genotypu, kvality světla, osmotického stresu a inhibitoru akvaporinů na klíčení semen rajčete a posléze také vliv genotypu a kvality světla na expresi jednoho z akvaporinů skupiny PIP (*LePIP1-1*).

2 ÚVOD DO ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 KLÍČENÍ

Klíčení semene je v životě rostliny zcela zásadní – význam klíčení nespočívá pouze ve zrodu nové rostliny. Podmínky prostředí jsou proměnlivé, a proto klíčení, respektive jeho načasování, určuje v jakých podmínkách se rostlina stane aktivní součástí ekosystému.

Z ontogenetického hlediska je klíčení semene počátkem vegetativní fáze vývinu rostliny. Zajištění správného načasování klíčení je u mnohých druhů rostlin zprostředkováno dormancí. To je období mezi dozráním semene a počátkem klíčení, kdy jsou suchá dormantní semena dobře přizpůsobená přečkat nepříznivé podmínky. U semen, která procházejí obdobím dormance, začíná klíčení v první fázi bobtnáním (neboli imbibicí). Při bobtnání dochází k absorpci vody suchým semenem. Absorpce vody je umožněna velmi nízkým vodním potenciálem semene, a zpočátku je voda pouze pasivně nasávána do extracelulární matrix – neboť první fáze imbibice byla pozorována i u mrtvých semen (Krishnan a kol., 2004). Dalším aspektem typickým pro imbibici je oprava poškození buněk, jako například narušení integrity plazmatických membrán a poškození DNA, k čemuž dochází při dehydrataci semene (v průběhu jeho zrání), v průběhu dormance a zejména během rehydratace (Weitbrecht a kol., 2011).

Poté nastává druhá fáze klíčení, neboli fáze plató, kdy se příjem vody semenem po jistou dobu nezvyšuje. Zvyšuje se však poměr vody, obsažené v buňkách na úkor vody v extracelulární matrix. Pozdější zvýšení příjmu vody pak nastává ke konci fáze klíčení – po prasknutí semenných obalů. (Krishnan a kol., 2004) Díky rehydrataci je umožněno spuštění fyziologických procesů klíčení – semeno přejde ze suchého stavu a fáze dormance, kdy jsou utlumeny vývojové procesy, do fáze klíčení.

Třetí fází klíčení je růstová fáze (fáze proniknutí kořínku). Pro tuto fázi je charakteristická zejména prudce vzrůstající rychlost respirace, spojená s využíváním zásobních látek, jako zdroje energie, a také nárůst rychlosti proteosyntézy (Bewley, 1997). V příhodných podmínkách pak rychlý růst klíčku vyústí v prasknutí semenných obalů a proniknutí kořínku (radikuly) ven ze semene, což je považováno za ukončení klíčení (Kucera a kol., 2005).

2.1.1 FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ KLÍČENÍ

Klíčení dormantních semen nastává za příznivých podmínek prostředí. Základními předpoklady jsou dostatečná vlhkost a dostatek kyslíku. Na počátek klíčení však může mít vliv také jeden nebo více z mnoha dalších faktorů prostředí – světlo, nízké či naopak vysoké teploty, předchozí délka trvání dormance, komunikace s hostitelem, NO₂, obsažený v kouři, aj. (Smith a kol., 2010). Dalším z procesů, limitujících klíčení u některých čeledí (včetně Solanaceae, kam patří rajče jedlé - *S. lycopersicum*), je prasknutí endospermu, kdy v okolí klového otvoru (mikropyle) dochází k hydrolýze buněčných stěn endospermu, usnadňující průnik kořínku endospermem (Weitbrecht a kol., 2011).

2.1.1.1 Vliv světla na klíčení

Pro klíčení semen celé řady rostlin má v neposlední řadě význam také světlo. U některých druhů má světlo inhibiční účinek na klíčení semen. U jiných zase dlouhodobé či krátkodobé (i pouhých několik sekund) vystavení semena světlu stimuluje klíčení (Meeuse 2011). Vliv světla je spojen s velikostí semen, přičemž lze říci, že prolomení dormance je indukováno osvětlením zejména u těch rostlin, jejichž semena obsahují málo zásobních látek (kladně fotoblastická semena). Tyto rostliny mají semena přizpůsobena pro klíčení na povrchu půdy. Větší semena s větším množstvím zásobních látek, mají tendenci zahájit klíčení nezávisle na vlivu světla, začínají klíčení uvnitř půdy (záporně fotoblastická semena) (Smith a kol., 2010).

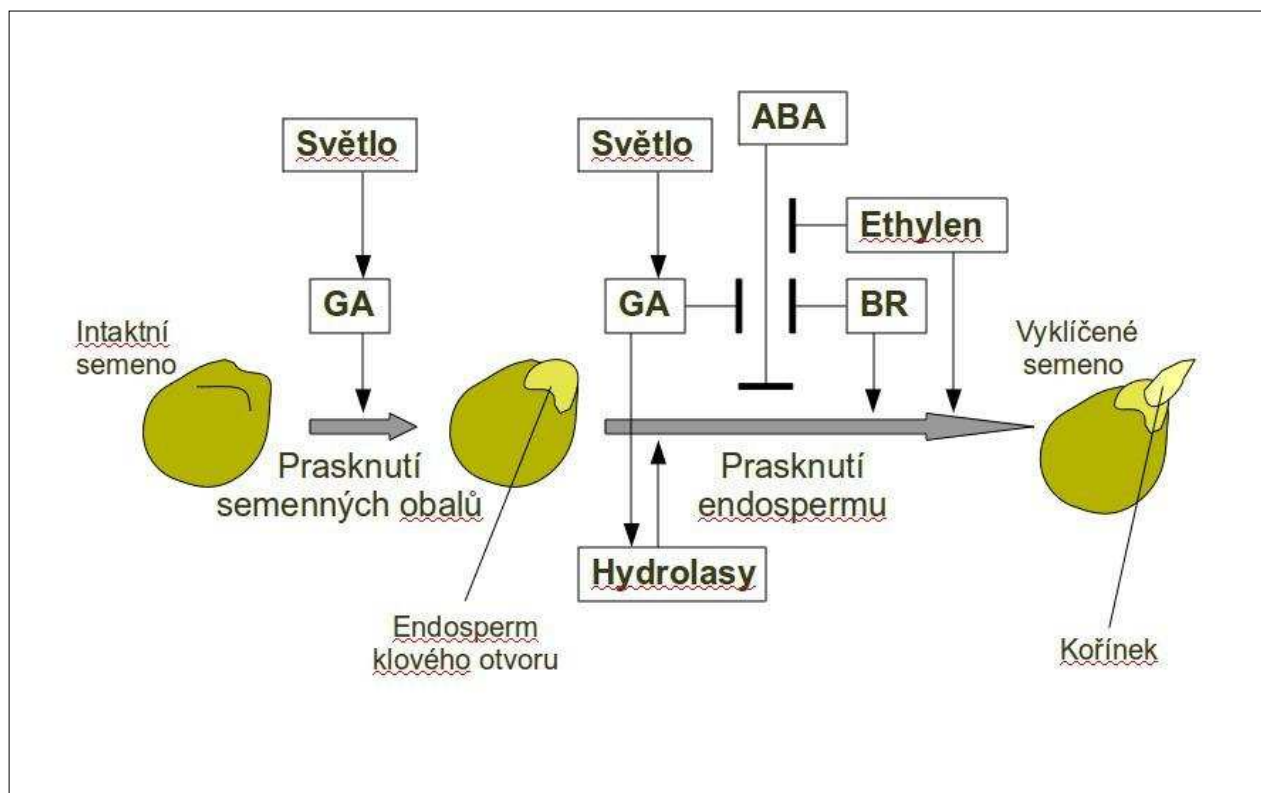
Světlo nemusí ovlivňovat klíčení pouze svojí (ne)přítomností, ale také svojí kvalitou. U některých druhů je klíčení semen inhibováno dlouhovlnnou složkou červeného světla (na hranici mezi červeným světlem a infračerveným zářením; tzv. far-red). Ve vegetaci zastíněných místech je světelné spektrum bohatší na tuto složku záření díky absorpci světla kratších vlnových délek ostatními rostlinami. Rozeznáváním far-red složky světla se semeno vyhýbá klíčení v zastíněné oblasti (Smith a kol., 2010).

2.1.1.2 Hormony zapojené do regulace klíčení

Faktory, ovlivňující klíčení, jsou napojeny na signální dráhy hormonů. Zřejmě nejdůležitějším hormonem, ovlivňujícím klíčení, je kyselina abscisová (dále jen ABA), působící jako pozitivní regulátor dormance a inhibitor klíčení (Kucera a kol., 2005). V počátku klíčení, zejména během imbibice, její množství prudce klesá (Weitbrecht a kol.,

2011). Kyselina giberelová (dále jen GA) působí proti ABA. Ačkoli ABA zřejmě inhibuje biosyntézu GA (Weitbrecht. a kol., 2011), s působením dalších faktorů, stimulujících produkci GA, se zvyšuje poměr GA:ABA, což vede ke klíčení, prostřednictvím oslabení endospermu (Müller a kol., 2006). GA také stimuluje buněčný růst (Luštinec a Žárský, 2005) a mobilizaci enzymů (např. amyláz) umožňujících využití zásobních látek v endospermu (Smith a kol., 2010).

Biosyntéza GA je u *Arabidopsis* stimulována světlem a vernalizací (jarovizací) (Yamauchi a kol., 2004). Ethylen a brassinosteroidy (dále jen BR) se do ovlivnění klíčení také zapojují inhibicí ABA a stimulací klíčení (Kucera a kol., 2005). U semen, která jsou v klíčení stimulována světlem, má světlo stimulační vliv prostřednictvím GA.



Obr. 1: Působení světla a hormonů na klíčení semene

Hormonální interakce ovlivňující klíčení semene tabáku (*Nicotiana*) a vliv na prasknutí semenných obalů a endospermu. ABA udržuje dormanci, prostřednictvím inhibice biosyntézy gibberelinů a hydroláz. Hydrolázy (např. b-1,3-glukanáza třídy I, a další), stimulovány signální drahou světla a GA, usnadňují prasknutí semenných obalů a endospermu, a tím proniknutí kořínku ven ze semene. Signální dráha světla a GA kromě toho inhibuje účinky ABA jejím odbouráváním. Ethylen a BR působí vůči ABA taktéž antagonisticky. Stimulují prasknutí endospermu, ale nepůsobí na prasknutí semenných obalů (Kucera a kol., 2005).

2.1.1.3 Vliv stresu na klíčení

Stresem jsou myšleny podmínky prostředí, které mohou negativně ovlivnit homeostázu organismu, vystaveného těmto podmínkám. Rostliny musí čelit vodnímu stresu, nedostatku minerálních živin, zasolení půdy, nedostatku kyslíku v půdě, překyselení půdy a vlivu xenobiotik (Luštinec a Žárský, 2005).

2.1.1.3.1 Vodní stres

Voda je základním předpokladem života všech organismů na zemi. Dostatek vody je tedy jeden z nejdůležitějších limitujících faktorů prostředí. Vodní stres může být způsoben jak přímo samotným nedostatkem vody, tak i nepřímo – zasolením – kdy vysoký osmotický potenciál půdy snižuje dostupnost vody pro rostlinu.

Z výše uvedených druhů stresu je klíčení semen, zejména dormantních, závislé pravděpodobně nejvíce na dostupnosti vody. Pro klíčení semen je nutný dostatek vody, aby mohlo dojít k imbibici. Na rozdíl od vzrostlé, fyziologicky aktivní zdravé rostliny, se dormantní semeno nemůže vodnímu stresu efektivně bránit adaptací. Vodní stres je proto zcela nežádoucí. Významný je také vliv zasolení – a to ať už prostřednictvím vytvoření osmotického stresu či toxicitou zvýšené koncentrace různých iontů. Po přidání jednoho z následujících osmotik: NaCl, Na₂SO₄, MgCl₂, MgSO₄ nebo manitolu, byla imbibice semen tím nižší, čím vyšší byl osmotický potenciál použitého osmotika. Také rychlost klíčení byla ovlivněna zvýšeným osmotickým potenciálem (Atia a kol., 2011).

2.2 SVĚTLO

Naprostá většina rostlin je fotoautotrofní – získávají veškerou potřebnou energii ze slunečního záření. Pouze určitá kvanta záření jsou však fotochemicky účinná a vyvolávají určité metabolické reakce nebo chemické přeměny v rostlinném organismu (<http://katedry.osu.cz>). Oba nejběžnější chlorofyly - chlorofyl a i chlorofyl b, mají dvě absorpční maxima přibližně mezi 400 a 480 nm, což odpovídá fialové a modré oblasti světelného spektra, a mezi 550 a 700 nm, což odpovídá červenému konci spektra (Smith a kol., 2010).

Jelikož je sluneční záření nezbytné pro metabolismus rostlin, není divu, že ovlivňuje všechny aspekty života rostliny. Světlem je řízen růst i vývoj rostliny (Smith a kol., 2010). Fotomorfogeneze, zahrnující především projevy buněčné diferenciaci a růst orgánů, závisí na kvalitě záření a míře ozáření. Světlo také stimuluje např. biosyntézu chlorofylu z prekurzorů či syntézu antokyanů. Ovlivňuje směr růstu rostlin (fototropismus) a synchronizuje vývoj a rytmické procesy životního cyklu rostlin (diurnální změny světla a tmy, a ročního období - fotoperiodismus), světlo také indukuje tvorbu květů a klíčení (<http://katedry.osu.cz>).

Ke vnímání světelných signálů mají rostliny vyvinuty fotoreceptory čtyř skupin. Jsou to fytochromy (PHY) pro červené (R) a vzdálené červené (FR) světlo, kryptochromy (CRY) pro modré (B) a ultrafialové A (UVA) světlo, fototropiny (PHOT) a neidentifikované receptory ultrafialového B záření (UVB) (Reková, 2010). To, že zelené světlo je pro fotosyntetické pochody rostliny nevyužitelné, může naznačovat, že rostliny na zelenou část spektra nereagují. Nedávno však byla tato domněnka překonána (Folta a Maruhnich, 2007). Přesto jsou však za nejdůležitější receptory slunečního záření u rostlin považovány receptory, reagující na modré a červené světlo.

Funkce fotoreceptorů se však částečně překrývají, tudíž jsou reakce na světlené podněty komplexním výsledkem spoluúčasti jednotlivých fotoreceptorů (Reková, 2010). Rostliny citlivě vnímají jak množství (intenzitu) světla, tak jeho kvalitu (vlnové délky). Neméně významný je také směr dopadajícího světla a doba po kterou na rostlinu působí (Reková, 2010).

2.2.1 RECEPTORY MODRÉHO SVĚTLA, ODPOVĚDI NA MODRÉ SVĚTLO

Modrá část světelného spektra, jakožto jednoho z nejdůležitějších signálů vnějšího prostředí, ovlivňuje mnoho dějů v rostlině. Stimuluje deetiolizaci (přechod ze skotomorfogeneze – stavu, kdy je semenáček dočasně adaptován na tmu, do fotomorfogeneze, během které se rostlina přizpůsobuje na příjem energie ze slunečního záření), reguluje dobu kvetení, fototropismus, otvírání průduchů, cirkadiánní rytmy a další procesy (Bednářová, 2010).

Rostliny však většinou reagují na modré světlo v kombinaci s dalšími vlnovými délkami. Na inhibici elongace hypokotylu, indukci kvetení a regulaci cirkadiánních rytmů se podílejí společně modré světlo, červené světlo a far-red. Některé pochody jsou však regulovány i pouze modrým světlem (Smith a kol., 2010). Modré světlo způsobuje rychlou inhibici elongace hypokotylu etiolizovaných rostlin. Na rozdíl od inhibice způsobené červeným světlem, která se projevuje po 8 až 90 minutách, se inhibice modrým světlem projevuje už během 15 až 30 sekund. Počáteční fáze inhibice elongace je zprostředkována fototropinem, za inhibici po 30 minutách jsou zodpovědné receptory CRY1 a CRY2 (Folta a Spalding, 2001).

Rostlina vnímá modré světlo, prostřednictvím receptorů dělených do tří skupin: kryptochromy, fototropiny a zeaxantiny (Bednářová, 2010).

2.2.1.1 Kryptochromy

Kryptochromy vnímají modré světlo a UVA o vlnové délce 320-500 nm. (Lin a Todo, 2005).

U *Arabidopsis* byly identifikovány tři kryptochromy CRY1, CRY2 a CRY3. Strukturně i funkčně jsou si příbuznější CRY1 a CRY2. CRY3 byl identifikován později a jeho funkce zatím nebyla zjištěna (Smith a kol., 2010). Kryptochromy působí jako regulátory genové exprese, přičemž u *Arabidopsis* regulují genovou expresi až 10 – 20% genomu (Ma a kol., 2001). CRY1 je exprimován konstitutivně. V závislosti na modrém světle inhibuje elongaci hypokotylu a stimuluje akumulaci anthocyaninů (Lin a kol., 1996). CRY2 je při ozáření mnohem méně stabilní, než CRY1. Je tedy negativně regulován modrým světlem, ale i zeleným světlem a UV-A (Lin a kol., 1996). CRY2, společně s CRY1, indukuje deetiolizaci, avšak pouze při nízké intenzitě ozáření (Lin a kol., 1998). Spolupůsobení CRY1 a CRY2 se vyskytuje i při inhibici růstu hypokotylu, při regulaci kvetení i při regulaci cirkadiánních

rytmů (Devlin a Kay, 2000). Kryptochromy také ovlivňují otevírání průduchů (Smith a kol., 2010). Co se však týká ovlivňování růstu primárního kořene, je působení CRY1 a CRY2 protichůdné – CRY1 podporuje jeho růst, zatímco CRY2 jej inhibuje. Růst primárního kořene je však modrým světlem stimulován i jinou, dosud neznámou signální drahou, než prostřednictvím působení CRY1 (Canamero a kol., 2006). Aktivita kryptochromů je regulována fosforylací, prostřednictvím fytochromu A (Spalding a Folta, 2005). Fosfosforylace kryptochromů následuje po jejich ozáření modrým světlem (Smith a kol., 2010). Homology CRY1 a CRY2 byly nalezeny také u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) (Perrotta a kol., 2000).

2.2.1.2 Fototropiny

Fototropiny jsou další z fotoreceptorů absorbujících modré světlo. Po ozáření u nich dochází k autofosforylaci, avšak následný přenos signálu není dosud zcela znám (Schäfer a Nagy, 2006). Jak již název této skupiny receptorů napovídá, jejich funkce spočívá v regulaci fototropismu. Mutanti *phot1* a *phot2* mutanti nereagují fototropicky na modré světlo, a to ani v závislosti na jeho intenzitě. Kromě vlivu na fototropismus se fototropiny, společně s kryptochromy inhibují elongaci hypokotylu etiolizovaných rostlin. Zpočátku nastupuje inhibice, zprostředkovaná fototropiny, kdežto inhibice, zprostředkovaná kryptochromy nastává až po 30 minutách. (Folta a Spalding, 2001). Fototropiny rovněž zprostředkují otevírání průduchů indukované modrým světlem (Smith a kol., 2010) a modrým světlem indukovaný pohyb chloroplastů (Goh, 2009).

2.2.1.3 Zeaxantiny

Třetími rostlinnými fotoreceptory modrého světla jsou zeaxantiny. Podílejí se na otevírání průduchů ve dne, které jsou tím citlivější na modré světlo, čím větší je v nich koncentrace zeaxantinů. Dále bylo zjištěno, že fungují jako receptory zeleného světla, které eliminuje inhibiční účinek modrého světla na prodlužování hypokotylu *Arabidopsis* (Folta, 2004).

2.3 AKVAPORINY

V minulosti se soudilo, že voda prostupuje buněčnými membránami pouze na základě prosté difúze. Polární vlastnosti molekuly vody však tuto difúzi velmi znesnadňují, jelikož vnitřní část fosfolipidové dvojvrstvy biomembrán má nepolární charakter. Pro větší mnohobuněčné organizmy, jejichž buňky jsou vystaveny prostředí a životodárné vodě pouze omezeným povrchem těla, by byl velký problém, zajistit rozvod vody pouze na základě difúze. Funkci rozvádění vody na větší vzdálenost tedy u vyšších rostlin splňují vodivá pletiva. Avšak i zde musí docházet k efektivní výměně vody mezi vodivým pletivem a sousedními buňkami. Navíc je u některých pletiv úroveň vodní propustnosti až extrémně vysoká (Baiges a kol., 2001). Proto se předpokládala existence membránových proteinů usnadňujících transport vody. A bylo jen otázkou času, než byl v roce 1992 u lidských erytrocytů popsán první akvaporin – CHIP28 (28-kDa Channel-forming Integral membrane Protein), neboli AQP1 (Agre a kol., 1993). Od tohoto objevu byl učiněn velký pokrok ve studiu struktury a funkcí akvaporinů, jak u živočichů, rostlin i mikroorganismů (Maurel a kol., 2007).

2.3.1 AKVAPORINY U ROSTLIN

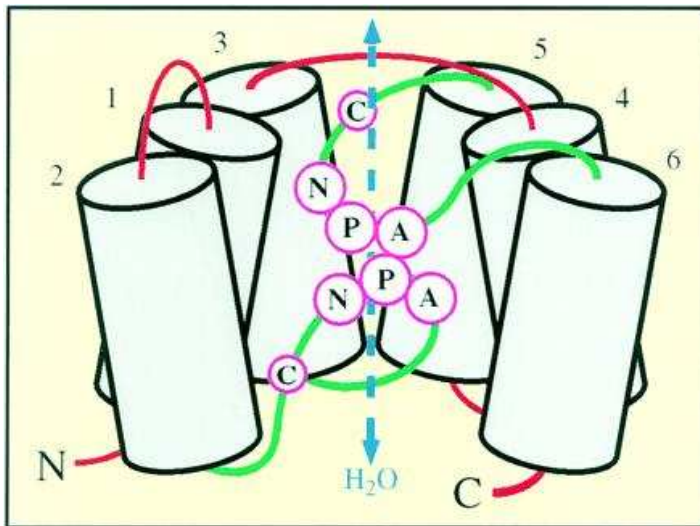
Akvaporiny patří do velké nadrodiny proteinů, tvořících transmembránové kanály, usnadňující průchod vody nebo jiných malých nenabitých molekul (např. glycerolu). Tato nadrodina se nazývá MIP (Major Intrinsic Protein) a je velmi starobylá a konzervativní. Akvaporiny se vyskytují u všech říší, tedy jak u bakterií a archaeí (Lee a kol., 2005), tak i u rostlin, u hub (Pettersson a kol., 2005) a u živočichů. Co se týká výskytu v rámci říše rostlin, byly identifikovány jak u rostlin nižších, např. u *Chara Corallina* (Ye a kol., 2004), tak i u všech skupin rostlin vyšších, počínaje mechem *Physcomitrella patens*, zastupujícím bryophyta.

Akvaporiny, vyskytující se u rostlin, jsou rozděleny na základě fylogenetické příbuznosti, resp. sekvenční homologie, do pěti rodin. První rodinou je PIP (Plasma membrane Intrinsic Protein), kam je řazeno nejvíce rostlinných akvaporinů. Akvaporiny rodiny PIP jsou dále děleny do dvou podskupin, PIPs1, které mají malou kanálovou aktivitu nebo jsou úplně neaktivní, a PIPs2 s vysokou kanálovou aktivitou (Chaumont a kol., 2000). TIPs (Tonoplast Intrinsic Proteins) se nacházejí ve vakuolární membráně a jsou dále děleny do tří podrodin na α -TIP, γ -TIP a δ -TIP (Zhao a kol., 2007). NIP (Nodulin-26 like Intrinsic Protein), případně nazývány NLM (Nodulin-26 Like MIP), jsou blízkými homology

GmNod26. GmNod26 je akvaporin hojně se vyskytující v peribakterioidní membráně kořenových hlízek sóje (*Glycine max*) (Maurel a kol., 2007). Akvaporiny spadající do skupiny SIP (Small basic Intrinsic Protein) se nacházejí v membráně endoplasmatického retikula. Poslední objevenou rodinou je XIP (X Intrinsic Protein). Byla objevena teprve nedávno, díky sekvenování genomu mechu *Physcomitrella patens* (slouží jako modelový organismus) (Anderberg a kol., 2009).

2.3.2 STRUKTURA AKVAPORINŮ

Akvaporiny, vyskytující se u všech říší organismů a patřící do všech rodin, vykazují vysokou míru strukturní konzervativnosti. Typickými vlastnostmi jsou molekulová hmotnost v rozmezí 26 až 29 kDa, dvě vysoce konzervované sekvence aminokyselin: asparagin-prolin-alanin, zvané NPA motiv a šest transmembránových α -helixů, spojených pěti smyčkami (Kaldenhoff a kol., 1999). Tři ze smyček (A, C a E) jsou orientovány směrem ven z buněčného kompartmentu a dvě ze smyček (B a D) jsou orientovány dovnitř buňky. Kromě toho dvě smyčky (B a E) vykazují hydrofobní charakter a jsou částečně zanořeny do vnitřní strany membránové dvojvrstvy (<http://www.aquaporin-aquaporins.com>). Právě tyto smyčky nesou NPA motivy a spolu s šesti transmembránovými α -helixy jsou trojrozměrně uspořádány tak, aby tvořily kanál, u něhož se předpokládá, že má tvar přesýpacích hodin (<http://www.aquaporin-aquaporins.com>). Oba konce polypeptidu, jak C- tak i N-konec, trčí z membrány a jsou orientovány do cytosolu (Zhao a kol., 2007). Přestože každý monomer akvaporinu vykazuje kanálovou aktivitu i sám, obvykle tvoří homotetramery (Zhao a kol., 2007). Toto uspořádání bylo prokázáno u TIP a PIP (Maurel a kol., 2008). Soudí se, že tetramerická kvartérní konformace je důležitá pro skládání proteinu, pro jeho stabilitu a pro transport do cílového místa v rámci buňky (Chaumont a kol., 2005). Studium vezikulárního transportu však byla také prokázána důležitost interakce akvaporinů různých podrodin (PIP1 a PIP2). Proto je možné, že pro aktivitu některých akvaporinů je nutná heterotetramerizace (Zelazny a kol., 2007) (viz kapitolu 2.3.4 Regulace aktivity akvaporinů.)



Obr. 2: Model struktury protomeru akvaporinu

Tento model ukazuje šest transmembránových domén (očíslovaných 1 - 6) a dva NPA motivy, nacházející se uvnitř membrány. Modrá šipka ukazuje trasu molekul vody, procházejících akvaporinem (Chrispeels a kol., 1999)

2.3.3 AKTIVITA A SELEKTIVITA AKVAPORINŮ

Akvaporiny umožňují průchod molekul vody velmi efektivně, přičemž selektivita je zprostředkována dvěma způsoby: jednak je průchod větších molekul znemožněn sféricky díky dvěma konstrikcím, tvořeným trojrozměrnou strukturou proteinu (jenž má tvar přesýpacích hodin), a druhý způsob spočívá v elektrostatickém odpuzování iontů, které by velikostně mohly skrz pór proniknout. Jedna z konstrikcí je tvořena oblastmi, obsahujícími NPA motivy. Druhá konstrikce se nazývá Ar/R, neboť je tvořena aromatickými aminokyselinami a argininem, a nachází se při vnitřním ústí póru (do cytosolu nebo dovnitř buněčného kompartmentu), výskyt argininu v Ar/R konstrikci znemožňuje průchod protonů, což hraje klíčovou roli pro udržení protonového gradientu, tak důležitého pro fyziologii rostlinných buněk. Mezi jednotlivými rodinami se vyskytují rozdíly v aktivitě a selektivitě. Zatímco akvaporiny rodiny PIP jsou dost konzervované, úzkými póry efektivně a vysoce selektivně propouštějícími vodu, akvaporiny rodin TIP, NIP a SIP jsou více diverzifikované (Maurel a kol., 2007). Akvaporiny umožňují průchod molekul vody velmi efektivně – například při tlakovém gradientu, rovnajícím se 1 MPa, byl naměřen průtok 10^9 molekul vody (Maurel a kol., 2007).

2.3.4 REGULACE AKTIVITY AKVAPORINŮ

Pro udržení homeostázy je v závislosti na měnících se podmínkách nutné, aby mohla buňka regulovat propustnost buněčných membrán. Regulace difúze molekul vody skrz membránu je fyziologicky nevhodné řešení požadavků buňky. Zato akvaporiny zprostředkovaná propustnost membrány pro vodu je regulovatelná, a to jak změnou počtu, tak i změnou aktivity akvaporinů. Jedním z hlavních mechanismů regulace aktivity proteinů obecně, je fosforylace (zprostředkovaná kinázami) a defosforylace (zprostředkovaná

fosfatázami). Kinázy jsou indukovány řadou signálů, mezi něž patří sucho, vodní stres, infekce patogenů, rostlinné hormony (např. auxin, ABA) a v neposlední řadě i světlo (Zhao a kol., 2007). Role fosforylace pro regulaci propustnosti akvaporinu byla prokázána funkční analýzou u oocytů *Xenopus laevis* – jednak farmakologickým ovlivněním aktivity kináz a fosfatáz, kterým bylo možno modulovat propustnost akvaporinů (Maurel a kol., 2007), ale také přímo fosforylací B-smyčky akvaporinu PIP1 z *Mimosa pudica*, která vedla ke zvýšení jeho aktivity (Maurel a kol., 2008). Díky stanovení molekulární struktury akvaporinu SoPIP2-1 (izolovaného z rostliny špenátu *Spinacia oleracea*) bylo zjištěno, že D-smyčka, interagující (prostřednictvím iontových a vodíkových vazeb) s N-koncem proteinu, slouží jako uzávěr kanálu na cytosolární straně (Maurel a kol., 2007 a Törnroth-Horsefield a kol., 2005).

Další způsob regulace spočívá v působení dvojmocných kationtů. Jednak díky možnému ovlivnění fosforylace (mnoho kináz patří mezi CDPK - Ca^{2+} dependentní protein kinázy), jako je tomu u α -TIP, jehož fosforylace je striktně Ca^{2+} dependentní (Johnson a Chrispeels, 1992). Kromě aktivace CDPK mohou dvojmocné kationty ovlivňovat aktivitu akvaporinů také přímo vazbou na akvaporin. U membránových vezikulů, izolovaných z kořenů *Beta vulgaris*, bylo zjištěno, že zvýšená koncentrace barnatých iontů snižuje vodní permeabilitu vezikulů. Mnohem silnější inhibiční účinek však měly ionty vápenaté (Alleva a kol., 2006). Dvojmocné kationty se váží přímo do uzavřené struktury akvaporinu a stabilizují ji (Maurel a kol., 2007). Propustnost akvaporinů také závisí na intracelulárním (resp. intravezikulárním) pH, přičemž nízké pH inhibuje propustnost (Alleva a kol., 2006).

Dalším z velmi významných způsobů regulace vodní propustnosti je také regulace akvaporinů na úrovni vezikulárního transportu do cílového místa a na úrovni tetramerních interakcí. Donedávna se soudilo, že akvaporiny tvoří homotetramery. Byla však také prokázána interakce akvaporinů různých podrodin. Byly-li v oocytech *X. laevis* exprimovány pouze kukuřičné (*Zea mays*) akvaporiny skupiny PIP1, jejichž aktivita byla nevýrazná, zatímco při společné expresi ZmPIP1 a ZmPIP2 akvaporinů byla aktivita výrazně vyšší. Molekulární interakce ZmPIP1 a ZmPIP2 byla prokázána imunoprecipitačními experimenty. Tyto výsledky mohou naznačovat heterotetramerizaci akvaporinů (Zelazny a kol., 2007). Kromě toho, studie aktivity akvaporinů u *M. pudica* naznačují, že kanálová aktivita MpPIP2-1 byla pozitivně ovlivněna fosforylací MpPIP1-1 (Temei a kol., 2005).

Kombinace fosforylace a defosforylace, homo/heterotetramerizace, a účinků dvojmocných kationtů a pH umožňuje zřejmě možnost velmi jemné regulace aktivity akvaporinů a tím i vodní propustnosti membrány, čímž může rostlina citlivě reagovat na drobné změny v dostupnosti vody v prostředí a rozdíly v množství vody v jednotlivých pletivech.

Díky konzervativnímu výskytu cysteinu blízko otvoru póru akvaporinu je možno akvaporiny specificky inhibovat pomocí HgCl_2 , který vytváří kovalentní vazbu se sulfhydrylovou skupinou cysteinu, čímž dojde k fyzickému zablokování otvoru póru (Zhao a kol., 2007).

2.3.5 MÍSTNĚ A ČASOVĚ SPECIFICKÁ EXPRESE AKVAPORINŮ

Různé rostlinné tkáně a orgány mají velmi rozdílný obsah vody. Zatímco v listech se může obsah vody pohybovat kolem 90%, dormantní semena obsahují vody pouze 5 – 15%. Tyto rozdíly jsou dány rozdílnou hydraulickou konduktivitou mezi různými rostlinnými pletivy a mezi různými obdobími stáří pletiva. Např. u rostoucího epikotylu hrášku byla hydraulická konduktivita kortikálních buněk 30 krát vyšší, než u buněk epidermis (Maurel a kol., 2008). Rostoucí rostlinné orgány vykazují také významný rozdíl vodního potenciálu, naznačující, že růst je limitován intenzitou zásobení vodou (Martre a kol., 2002). V různých tkáních a orgánech je tedy vyžadována odlišná intenzita transportu vody skrz membránu. Rychlý transport vody skrz membrány buněk je vyžadován pro růst buněk a pletiv, ale také při dalších procesech uvnitř rostlinného organismu, jako např. znovunaplnění embolizovaných cév či aktivní změny turgoru buněk (např. pohyb svěracích buněk průduchu či ohyb listů v pulvini) (Martre a kol., 2002). Jedním ze způsobů, jak může rostlina zajistit zvýšenou konduktivitu membrán v určitém časovém období, je tedy zvýšení exprese nebo aktivity akvaporinů.

2.3.5.1 Změny v expresi akvaporinů u semen

V jedné studii, provedené na rajčeti (*S. lycopersicum*) byla sledována exprese několika akvaporinů rodiny PIP u semen a plodů v průběhu jejich vývoje. Každý ze sledovaných akvaporinů vykazoval specifické změny v míře exprese v průběhu vývoje plodu a semene, přičemž většina akvaporinů byla exprimována nejvíce v rané fázi vývoje, poté se jejich exprese postupně ustálila na asi 50% maxima. V době vysoké exprese akvaporinů zároveň prudce klesal obsah vody v semenech. Později, když exprese akvaporinů klesla, se již obsah vody v semenech nesnižoval. Tyto výsledky naznačují, že akvaporiny rodiny PIP hrají významnou fyziologickou roli při vývoji semene (Shiota a kol., 2006).

Akvaporiny nacházejí také uplatnění při klíčení semen. U semen *Brassica napus* byla pozorována výrazná souvislost rychlosti klíčení s množstvím mRNA BnPIP1 a Bn γ -TIP2. Po předpůsobení roztokem ABA vykazovala semena vyšší rychlost klíčení, vyšší odolnost vůči

osmotickému stresu (klíčení v 15% PEG), či zasolení (klíčení v 100 mmol/l NaCl) a zároveň i vyšší expresi BnPIP1. Exprese Bn γ -TIP2, byla podobná, jako exprese BnPIP1, avšak oproti BnPIP1 zpožděná o několik dní (Gao a kol., 1999). Z toho se dá soudit, že PIP hraje roli v klíčení dřívě, než TIP a že mohou být zapojeny i v časné imbibici. Z výsledků studie klíčení semen *B. napus* (Gao a kol., 1999) vyplývá, že exprese akvaporinů je ovlivňována abscisovou kyselinou.

Akvaporiny přispívají rovněž k vodnímu transportu v kořenových pletivech, ve vnitřních pletivech transpirujících listů, jsou klíčové pro pohyby rostlin, prodlužování buněk a při klíčení semen (Maurel a kol., 2007).

2.3.6 AKVAPORINY A STRES

Zásobování vodou je klíčovým aspektem pro udržení života. Při zhoršené dostupnosti vody, způsobené suchem nebo osmotickým stresem, je regulace akvaporinů jedním ze způsobů, jakým se rostlina vypořádává se ztrátou vody. Například studie provedené na listech špenátu (*Spinacea oleracea*) ukazují, že se zvyšující se osmolaritou prostředí koreluje defosforylace akvaporinu SoPIP2-1 (Johansson a kol., 1996). Na základě toho byl navržen obecný model buněčné osmoregulace, zahrnující Ca^{2+} kanál aktivovaný mechanickou deformací plazmatické membrány a na Ca^{2+} závislou fosforylaci SoPIP2-1. Hydraulická konduktivita je maximální při vysokém vodním potenciálu buňky, umožňující vtok vody do buňky, až dokud není dosaženo maximálního turgoru (Johansson a kol., 1998).

Dalším příkladem je jistý kultivar rýže (*Oryza sativa*), vyznačující se odolností vůči suchu. Již začínající sucho indukuje v kořenech tohoto kultivaru několik akvaporinů rodiny PIP – tato reakce pravděpodobně umožňuje využití zbytků vody ve vysychající půdě (Maurel a kol., 2008).

Také studie transgenních rostlin ukazuje význam akvaporinů pro osmoregulaci. Rostliny transgenního tabáku s protismyslovou inhibicí PIP a rostliny transgenní *Arabidopsis* s protismyslovou inhibicí exprese PIP1 a PIP2 byly vystaveny suchu. Listy těchto rostlin poté vykazovaly nižší vodní potenciál, než listy kontrolních rostlin. Kromě toho, po odeznění nepřízně, způsobené suchem, probíhalo zotavení u transgenních rostlin výrazně pomaleji, než u rostlin kontrolních (Maurel a kol., 2008). Naproti tomu, díky studiím transgenních rostlin, overexprimujících akvaporiny, bylo zjištěno, že overexprese akvaporinu nemusí mít na toleranci sucha pouze pozitivní efekt, ale i nulový nebo dokonce negativní efekt, a to v závislosti na druhu sledovaného akvaporinu (Maurel a kol., 2008). Zda-li tyto výsledky jsou relevantní, zůstává nejasné, například i proto, že mnoho ze studií overexprese akvaporinů bylo

provedeno u heterologních druhů rostlin, což mohlo způsobit neadekvátní regulace akvaporinů, a tedy i neadekvátní stresové reakce (Maurel a kol., 2008). Jisté však je, že manipulace množství funkčních transkriptů akvaporinů vede ke změnám hydraulické konduktivity, vodního osmotického potenciálu buňky, úrovně transpirace, a v některých případech i schopnosti rostliny zotavit se z následků vodního stresu (Vera-Estrella a kol., 2004).

Několik studií sledovalo množství vody, transportované kořenovým systémem, přičemž se sledoval také vliv inhibitoru HgCl₂, jakožto inhibitoru akvaporinů a vliv 2-merkaptoetanolu, který potlačuje účinky HgCl₂. Tyto pokusy byly prováděny jak za standardních podmínek, tak při vodním stresu a ukazují, že za standardních podmínek je 35 – 80 % vodivosti kořenového systému zprostředkováno akvaporiny, a zajišťují až 60 – 80 % vodivosti při vysychání substrátu, či při jeho znovuzavlažení (Martre a kol., 2002). Nicméně kromě přímého ovlivnění hydraulické konduktivity akvaporinů, má použití HgCl₂ za následek rychlou depolarizaci plazmatické membrány buněk, a i dalšími způsoby může ovlivňovat fyziologii buněk. Proto výsledky experimentů s HgCl₂ by měly být potvrzeny i jinými způsoby (Martre a kol., 2002).

U rostlin *Mesembryanthemum crystallinum*, vystavených zasolení, byla pomocí specifických protilátek pozorována regulace množství několika akvaporinů. Množství McPIP2-1, nacházejícího se v plazmatických membránách kořenů, se zvyšovalo. V množství McPIP1-4 nebyla pozorována žádná změna. Množství McTIP1-2, nacházejícího se v tonoplastech listů, se při působení manitolem zvyšovalo, zatímco působení NaCl způsobilo pokles množství téhož akvaporinu. To naznačuje, odlišnost signálních drah, reagujících na osmotický a iontový stres (Vera-Estrella a kol., 2004).

Kromě bezprostředních reakcí akvaporinů na stres se akvaporiny také podílejí na zotavení rostliny po odeznění stresových podmínek. Příkladem může být réva vinná (*Vitis vinifera*), u níž se předpokládá specifický podíl akvaporinů na obnovení funkčnosti cévních svazků po embolizaci (Lovislo a kol., 2006).

Výše zmíněný kultivar rýže, odolný vůči suchu, má zvýšenou produkci ABA. (Maurel a kol., 2008), což naznačuje, že se ABA podílí na regulaci akvaporinů v odpovědi na vodní stres. To potvrzuje i studie, zkoumající vliv exogenní ABA na hydraulickou konduktanci kořenů kukuřice (*Zea mays*) (Hose a kol., 2000). ABA tedy pravděpodobně výrazně zvyšuje expresi některých isoform PIPů (Maurel a kol., 2008).

Samotné akvaporiny mohou zřejmě fungovat jako osmosenzory, avšak mechanismus recepce není zatím znám (MacRobbie, 2006).

3 MATERIÁL A METODIKA

3.1 ROSTLINNÝ MATERIÁL

Pokusy byly prováděny se semeny dvou odlišných genotypů rajčete jedlého (*S. lycopersicum* L.), konkrétně: mutant 7B-1 a kontrolní rostlina. Mutované rostliny, na nichž byly prováděny experimenty, byly vyselektovány jako linie, vykazující samčí sterilitu, která je závislá na fotoperiodě. Samčí sterilita se projevuje za dlouhých dní (16 hodin světlo, 8 hodin tma), zatímco za krátkých dní (8 hodin světla, 16 hodin tma) si rostliny zachovávají fertilitu (Sawhney, 1997). Posléze bylo zjištěno, že vyselektované mutované rostliny nesou recesivní mutaci v jednom genu, označeném jako 7B-1. Funkce tohoto genu zatím není známa. Z dosavadních experimentů je však zřejmé, že mutantní rostliny mají narušenou signální dráhu modrého světla. Jako kontrolní rostlina (wild-type, WT), odpovídající mutantu 7B-1, byl použit kultivar Rutgers (Sawhney, 1997, Fellner a Sawhney, 2001). Semena obou genotypů byla poskytnuta Prof. V. K. Sawhney na základě licence University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada.

3.2 PROVÁDĚNÉ POKUSY

A) POKUS 1: Sledování vlivu manitolu a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutantu 7B-1 v porovnání s WT:

Semena klíčila *in vitro* na MS médiu, obsahujícím různé koncentrace osmotika - manitolu (0 mmol/l, 50 mmol/l, 100 mmol/l, 150 mmol/l). Semena klíčila při různé kvalitě osvětlení: tma, červené světlo, modré světlo. Pokus byl proveden ve čtyřech opakováních.

B) POKUS 2: Sledování vlivu HgCl₂ a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutantu 7B-1 v porovnání s WT:

Semena klíčila *in vitro* na MS médiu, do něhož bylo přidáno různé množství inhibitoru akvaporinů HgCl₂. Média obsahovala různé koncentrace HgCl₂ (0 μmol/l, 10 μmol/l, 20 μmol/l, 30 μmol/l). Semena klíčila při různé kvalitě osvětlení: tma, modré světlo, červené světlo. Pokus byl proveden ve čtyřech opakováních.

C) POKUS 3: Sledování vlivu světelných podmínek na expresi genu PIP1-1 u klíčících semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT:

Extrakce mRNA ze semen imbibovaných 24 hodin, syntéza cDNA s primerem specifickým pro gen PIP1-1, amplifikace cDNA pomocí RT-PCR, a následné vyhodnocení výsledků: porovnání exprese na základě elektroforézy PCR produktu. Pokus 3 byl proveden na třech nezávislých sadách vzorků. Navíc, v rámci každé sady, byly PCR s primery pro sledované geny, a následná elektroforéza provedeny ve dvou opakováních. (bližší informace – viz dále)

3.2.1 POKUS 1: Sledování vlivu manitolu a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT:

3.2.1.1 Příprava MS média

Pevné MS médium (Murashige and Skoog 1962) bylo připraveno do dvou litrů rozpuštěním 20 g 1% sacharózy, 8,6 g MS média (Sigma, katalogové číslo: M5524(-50)) a 390,4 mg MES pufru (1 mmol/l). pH roztoku média bylo upraveno malým množstvím KOH na hodnotu 6,1. Přidáním různého množství manitolu byla připravena čtyři média o koncentracích manitolu 0, 50, 100 a 150 mmol/l. Média byla sterilizována autoklávováním.

3.2.1.2 Povrchová sterilizace semen

Pro jednotlivá opakování každého pokusu bylo použito asi 400 semen od každého z obou genotypů. Povrchová sterilizace semen byla provedena ve sterilních podmínkách – ve flow-boxu. Semena byla zalita roztokem Sava (3% aktivního chloru), jež se nechalo působit 20 minut, zkumavky byly během této doby občas protřepány. Poté byl roztok Sava odpipetován a semena byla šestkrát promyta sterilizovanou destilovanou vodou.

3.2.1.3 Výsev semen

Do Petriho misek (průměr 90 mm), obsahujících asi 20 ml média, bylo pomocí pinzety vysazeno asi 33 semen. Petriho misky byly oblepeny páskou z netkané textilie (Urgopore). Takto byly připraveny tři sady misek – jedna sada určena pro kultivaci na modrém světle, jedna pro kultivaci na červeném světle. Třetí sada misek, určená pro kultivaci ve tmě, byla navíc obalena v alobalu tak, aby k semenům neproniklo světlo.

3.2.1.4 Kultivace semen

Semena byla kultivována ve dvou automatických růstových komorách (Microclima 1000E, Snijders Scientific B. V., The Netherlands). V obou růstových komorách byla udržována konstantní teplota 23°C a vlhkost 50%. Automatické růstové komory se v udržovaných podmínkách lišily pouze kvalitou osvětlení. Semena určená pro kultivaci na modrém světle, byla umístěna do jedné z komor, kde bylo kontinuálně udržováno modré světlo s maximální intenzitou ozáření při 460 nm. Sada misek určená pro kultivaci na světle červeném, byla umístěna do druhé komory, kde bylo maximum ozáření při 660 nm. Osvětlení bylo zajištěno, v případě modrého světla, zářivkou Phillips TLD-36W/18-Blue (Phillips, USA; ozáření 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), v případě světla červeného, zářivkou Phillips TLD-36W/15-Red (Phillips, USA; ozáření 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Semena, určená pro kultivaci ve tmě (obalena v alobalu) byla taktéž umístěna do komory s červeným světlem. Klíčení semen bylo průběžně sledováno po dobu 8 dnů.

3.2.2 POKUS 2: Sledování vlivu HgCl_2 a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT:

Pokus 2 byl proveden obdobně, jako pokus 1 – dle výše popsané metodiky; byla obměněna pouze příprava média – Místo manitolu, přidaného v pokusu 1, byl v pokusu 2 přidán HgCl_2 . HgCl_2 byl přidán do Petriho misek těsně před vyséváním semen, a to tak, aby jeho koncentrace v Petriho miskách byly: 0, 10, 20 a 30 $\mu\text{mol/l}$.

3.2.3 POKUS 3: Sledování vlivu světelných podmínek na expresi genu pro PIP1-1 u klíčících semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT:

Část metodiky pokusu 3 byla obdobná jako u pokusů 1 a 2, avšak s následujícími odlišnostmi: semen WT bylo vysazeno 60, semen mutanta 7B-1 bylo vysazeno 35 (platí pro každé světlo), do média nebyl přidán ani manitol, ani HgCl_2 , a semena byla v růstových komorách inkubována pouze 24 hodin. Zbývá část metodiky pokusu 3 je popsána v následujícím postupu – porovnání exprese genu LePIP1-1:

3.2.3.1 Izolace celkové RNA

Semena byla z růstových komor přenesena do zatemněné laboratoře, kde byla zmrazena tekutým dusíkem. Manipulace se semeny v zatemněné laboratoři byla prováděna při adekvátním osvětlení (byly použity stejné zdroje světla, jako při kultivaci; se semeny, která byla kultivována ve tmě, bylo manipulováno při osvětlení zeleným světlem). Semena byla homogenizována v tekutém dusíku. Po 24 hodinách byly takto připravené vzorky pro další práci uskladněny při teplotě -80°C .

K izolaci RNA ze vzorků byl použit RNeasy Mini Kit (firma Qiagen) – podle následujícího postupu: K homogenizovaným vzorkům bylo přidáno 450 μl roztoku RLC pufru (obsahujícího β -merkaptoetanol). Směsi vzorků a pufru byly poté zvortexovány, následně pak přepipetovány do kolonek (QIAshredder homogenizer). Po centrifugaci (2 min, 13 000 rpm) byl supernatant opatrně přepipetován do nových mikrozkušavek. Ke každému vzorku bylo poté zvlášť přidáno 225 μl 96% ethanolu, roztok byl promíchán pipetováním a přenesen do kolonky (RNeasy Mini spin column). Pak byly vzorky centrifugovány (15 s, 13 000 rpm). Do kolonek bylo napipetováno 700 μl RW1 pufru (obsahujícího ethanol), a po 5 minutách inkubace byly vzorky centrifugací (15 s, 13 000 rpm) promyty; eluát byl vylit. Kolonky byly poté dvakrát promyty 500 μl RPE pufrem (obsahujícího ethanol) pomocí centrifugace (poprvé 15 s, podruhé 2 min, 13 000 rpm); eluát byl vylit. Pak byly kolonky centrifugovány ještě jednu minutu bez přidání pufru a následně přeneseny do nových mikrozkušavek (1,5 ml). Od tohoto kroku bylo se vzorky pracováno na ledu. Přímo na membránu kolonky bylo napipetováno 50 μl destilované vody (neobsahující RNázy, RNase-free water), a po krátké inkubaci (2-3 min) byla RNA navázaná na membráně kolonky vymyta centrifugací (1 min, 13 000 rpm) do nových mikrozkušavek. Tento krok byl zopakován dvakrát, takže výsledné množství roztoku RNA bylo 100 μl . Vzorky byly poté před další prací uloženy v mrazáku při teplotě -80°C .

3.2.3.2 Měření koncentrace a čistoty izolované celkové RNA

Po izolaci celkové RNA, byla změřena její koncentrace ve vzorcích, a to pomocí spektrofotometru (Bio Rad, SmartSpecTM Plus Spectrophotometer). Pro účel měření byly vzorky zředěny 50x v Tris-HCl, rozpuštěním 2 μl vzorku celkové RNA v 98 μl Tris-HCl (o koncentraci 10 mmol/l a pH = 7,5). Jako blank byl použit roztok 2 μl $^{\text{dep}}\text{H}_2\text{O}$ a 98 μl Tris-HCl.

3.2.3.3 Přečištění vzorků celkové RNA pomocí DNasy

Přečištění vzorků bylo provedeno pomocí DNasy. Na základě spektrofotometrického stanovení koncentrace a čistoty vzorků RNA, bylo určeno množství enzymu, potřebného pro každý vzorek. Obvykle se používají 2 μl enzymu na každých 50 μg RNA ve vzorku. Jelikož však výtěžky a čistota RNA ve vzorcích byly nízké, byly všechny vzorky přečištěny 2x 2 μl enzymu. Nejprve byl připraven následující premix (reagencie od firmy Takara) – viz Tab. 1.

	Objem pro 1 vzorek [μl]	Objem pro 19 vzorků [μl]
Pufr (10x DNase Buffer)	20,0	380,0
RRI	0,5	9,5
DNasa I	2,0	38,0
^{dep} H ₂ O	77,5	1472,5
Celkový objem	100,0	1900,0

Tab. 1: Složení premixu pro přečištění vzorků celkové RNA pomocí DNasy

Přečištění vzorků bylo provedeno podle následujícího postupu: Ke každému vzorku – o objemu 100 μl - bylo přidáno 100 μl premixu. Takto připravená reakční směs byla inkubována 45 minut ve vodní lázni při teplotě 37°C. Pak bylo ke vzorkům přidáno 200 μl fenol:chloroform:isoamylalkoholu (25:24:1). Vzorky byly zvortexovány a centrifugovány za chlazení (10 min, 13 000 rpm, 4°C). Pak byla horní fáze odpipetována do nových mikrozkušavek. Ke vzorkům bylo přidáno 200 μl chloroform:isoamylalkoholu (24:1), vzorky byly zvortexovány a centrifugovány (5 min, 13 000 rpm, 4°C). Horní fáze vzorků byla poté znovu odpipetována do nových mikrozkušavek. K některým vzorkům – těm, jejichž koncentrace byla nižší, než 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ - byl přidán 1 μl glykogenu; vzorky byly promíchány převrácením. Ke všem vzorkům bylo poté přidáno 20 μl octové kyseliny o koncentraci 1 mol/l; vzorky byly promíchány převrácením, a poté k nim bylo přidáno 550 μl 96% ethanolu. Vzorky byly ponechány přes noc při -80°C. Druhý den byly vzorky centrifugovány (30 min, 13 000 rpm, 4°C); supernatant byl vylit. Po přidání 500 μl 70% ethanolu byly vzorky centrifugovány znovu (5 min, 13 000 rpm, 4°C); supernatant byl vylit. Poté bylo do mikrozkušavek bylo přidáno 500 μl 96% ethanolu a byla provedena další centrifugace (5 min, 13 000 rpm, 4°C); supernatant byl vylit. Pak byly zkumavky s celkovou RNA, navázanou na stěnách, naposled několik vteřin centrifugovány, díky čemuž bylo možno odpipetovat zbytkový ethanol ze dna zkumavek. Ethanol, který se nepodařilo odpipetovat, byl nechán k odpaření - mikrozkušavky se vzorky byly ponechány otevřené po dobu několika

minut (ne více než 5). Následující krok byl proveden na ledu: Do mikrozkušavek se vzorky bylo napipetováno 15 μl , 20 μl nebo 30 μl $^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$ – v závislosti na výsledcích měření koncentrace RNA spektrofotometrem tak, aby vzorky, obsahující malé množství RNA, byly koncentrovány. Stěny mikrozkušavek byly vodou promyty tak, aby se RNA, vysrážená na stěnách, rozpustila. V jakém množství $^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$ byla RNA rozpuštěna, ukazuje Tab. 2.

Koncentrace vzorků	Množství $^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$
Pod 100 $\mu\text{g/ml}$	15 μl
Nad 100 $\mu\text{g/ml}$	20 μl
Nad 300 $\mu\text{g/ml}$	30 μl

Tab.2: Množství $^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$, použité pro rozpuštění RNA

Pozn.: práce s fenol:chloroform:isoamylalkoholem a chloroform:isoamylalkoholem byla prováděna v digestoři.

3.2.3.4 Kontrolní PCR

Pro kontrolu čistoty a koncentrace vzorků, byla provedena kontrolní PCR, s primery pro gen LeGAPDH. Nejprve byl však připraven PCR-premix z reagensů, popsanych v Tab. 3.

	Objem pro jeden vzorek [μl]	Objem pro 20 vzorků [μl]
Pufr (5x GoTaq buffer; Promega)	4,0	80,0
dNTPs (konc. 1 mmol/l)	2,0	40,0
LeGAPDH-F primer (10 $\mu\text{mol/l}$)	1,0	20,0
LeGAPDH-R primer (10 $\mu\text{mol/l}$)	1,0	20,0
$^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$	9,8	196,0
DNA-polymeráza (GoTaq; Promega)	0,2	4,0
Celkové množství	18,0	360,0

Tab.3: Složení PCR-premixu pro kontrolní PCR (pro kontrolu čistoty a koncentrace vzorků)

Pro kontrolní PCR bylo do 0,2 ml mikrozkušavek napipetováno 18 μl premixu a 2 μl vzorku, v případě kontroly 18 μl premixu a 2 μl $^{\text{depc}}\text{H}_2\text{O}$. Naprogramování kroků kontrolní

PCR v termocycleru (Bio Rad, MJ Mini™ Personal Thermal Cycler) ukazuje Tab. 4.

Krok	Teplota	Čas [min:s]
1. pre-denaturace	94°C	03:00
2. denaturace	94°C	00:30
3. nasednutí primerů	55°C	00:30
4. cDNA syntéza	72°C	01:00
5. zpět ke 2. kroku; 44 cyklů		
6. konečné prodloužení	72°C	05:00
7. ukončení reakce	15°C	až do vypnutí programu
8. konec		

Tab. 4: Naprogramování kroků kontrolní PCR

3.2.3.5 Elektroforéza produktu kontrolní PCR

Elektroforéza produktu kontrolní PCR, byla provedena v agarózovém gelu. Ten byl připraven smícháním 0,8 g agarózy v 80 ml 0,5x TBE pufru, rozvařením směsi v mikrovlnné troubě a přidáním 8 µl ethidium bromidu (ethidium bromid byl přidán až po vychladnutí). Do jamek v gelu bylo nanášeno 20 µl vzorků PCR produktu, které byly předtím obarveny 2 µl barviva (6x DNA Loading Dye; Fermentas). Pro kontrolu velikosti PCR produktu bylo použito 6 µl 100 bp Plus DNA Ladder (Gene Ruler). Zdroj stejnosměrného proudu byl nastaven na napětí $U = 85$ V. Po ukončení elektroforézy byla pořízena digitální fotografie gelu pomocí transiluminátoru (G Box, Syngene). Jak příprava gelu, tak i samotná elektroforéza byly provedeny v laboratoři vyhrazené pro práci s ethidium bromidem, aby bylo zamezeno zbytečné kontaminaci ostatních prostor, materiálu a pomůcek.

3.2.3.6 Syntéza cDNA

Před reakcí byl spočítán objem vzorku, odpovídající 1 µg RNA (na základě spektrofotometrického měření koncentrace přečištěné RNA). Pro syntézu cDNA byl použit PrimeScript™ 1st strand cDNA Synthesis Kit od firmy Takara. Od každého vzorku byla připravena reakční směs o složení, ukázaném v Tab. 5.

Reagencie	Objem
Oligo dT Primer (50 $\mu\text{mol/l}$)	1 μl
10 $\mu\text{mol/l}$ dNTPs	1 μl
Vzorek RNA	Objem, odpovídající 1 μg RNA
$^{\text{dep}}\text{H}_2\text{O}$	Doplnit do celkového objemu 10 μl

Tab. 5: Složení reakční směsi pro syntézu cDNA

Reakční směs byla inkubována v termocyleru (Bio Rad, DNA Engine, Peltier Thermal Cycler) po dobu 5 minut při teplotě 65°C. Poté byla přenesena na led. Zatímco se reakční směs chladila, byl připraven premix, viz Tab. 6.

	Objem pro jeden vzorek [μl]	Objem pro 20 vzorků [μl]
Pufr (5x PrimeScript™ buffer)	4,0	80,0
RNase inhibitor (40 U/ μl)	0,5	10,0
PrimeScript™ RTase (200 U/ μl)	0,5	10,0
$^{\text{dep}}\text{H}_2\text{O}$	5,0	100,0
Celkový objem	10,0	200,0

Tab. 6: Složení premixu pro syntézu cDNA

Ke každé reakční směsi (resp.vzorku) bylo přidáno 10 μl premixu. Po promíchání pipetováním a krátké centrifugaci (několik málo vteřin) byla reakční směs inkubována v termocyleru při teplotě 42°C po dobu 1 hodiny. Termocyler byl naprogramován, aby po uplynutí 1 hodiny zvýšil po dobu 5 minut teplotu na 95°C. Při této teplotě byl enzym (RTáza) inaktivován.

3.2.3.7 PCR s primery pro geny LePIP1-1 a LeEF1

Vzorky cDNA byly naředěny 2x (smícháním 1 μl vzorku cDNA a 9 μl $^{\text{dep}}\text{H}_2\text{O}$). Takto naředěné vzorky byly použity pro PCR s primery pro sledovaný gen LePIP1-1 a kontrolní (housekeeping) gen LeEF1. Pro PCR s primerem pro LePIP1-1 byl připraven PCR-premix dle Tab.7.

	Objem pro 1 vzorek [μ l]	Objem pro 20 vzorků [μ l]
Pufr (GoTaq Buffer; Promega)	4,0	80,0
1 mmol/l dNTPs	2,0	40,0
LePIP1-1-F primer*	1,0	20,0
LePIP1-1-R primer*	1,0	20,0
^{dep} cH ₂ O	10,8	216,0
DNA polymeráza (GoTaq; Promega)	0,2	4,0
Celkový objem	19,0	58,0

Tab. 7: Složení PCR-premixu pro PCR s primerem pro LePIP1-1

*Primery byly použity podle: Shiota a kol., 2006

Premix byl rozpipetován po 19 μ l do 0,2 ml mikrozskumavek, kam byl poté přidán 1 μ l zředěného vzorku (resp. 1 μ l ^{dep}cH₂O v případě kontroly). Termocycler (Bio Rad, DNA Engine Peltier Thermal Cycler) byl naprogramován podle Tab.8.

Krok	Teplota	Čas [min:s]
1. pre-denaturace	94°C	03:00
2. denaturace	94°C	00:30
3. nasednutí primerů	53°C	00:30
4. syntéza cDNA	72°C	01:00
5. zpět ke 2. kroku; 32 cyklů		
6. konečné prodloužení	72°C	05:00
7. ukončení reakce	15°C	až do vypnutí programu
8. konec		

Tab. 8: Naprogramování kroků pro PCR s primery pro LePIP1-1

Pro PCR s primery pro LeEF1 byl připraven PCR-premix dle Tab.9.

	Objem pro 1 vzorek [μ l]	Objem pro 20 vzorků [μ l]
Pufr (GoTaq Buffer; Promega)	4,0	80,0
1 mmol/l dNTPs	2,0	40,0
LeEF1-F primer (10 μ mol/l) *	1,0	20,0
LeEF1-R primer (10 μ mol/l) *	1,0	20,0
^{dep} cH ₂ O	10,8	216,0
DNA polymeráza (GoTaq; Promega)	0,2	4,0
Celkový objem	19,0	58,0

Tab. 9: Naprogramování kroků pro PCR s primery pro LeEF1

*Primery byly použity podle: Shiota a kol., 2006

Pozn.: LeEF1-F / R primery byly 10x naředěny ze zásobních roztoků primerů (rozpuštěných v Tris) o konc. 100 $\mu\text{mol/l}$.

Premix byl rozpipetován po 19 μl do 0,2 ml mikrozkušavek, kam byl poté přidán 1 μl zředěného vzorku (resp. 1 μl $^{\text{dep}}\text{H}_2\text{O}$ v případě kontroly). Termocycler (Bio Rad, MJ MiniTM Personal Thermal Cycler) byl naprogramován podle Tab.10.

Krok	Teplota	Čas [min:s]
1. pre-denaturace	94°C	03:00
2. denaturace	94°C	00:30
3. nasednutí primerů	60°C	00:30
4. syntéza cDNA	72°C	01:00
5. zpět ke 2. kroku; 27 cyklů		
6. konečné prodloužení	72°C	05:00
7. ukončení reakce	15°C	až do vypnutí programu
8. konec		

Tab. 10: Naprogramování kroků pro syntézu cDNA

3.2.3.8 Elektroforéza produktu PCR s primery pro geny LePIP1-1 a LeEF1

Příprava gelu byla provedena téměř stejně, jako elektroforéza produktu kontrolní PCR, avšak s následujícími obměnami: Byl použit 2% agarózový gel (místo 1%). Do jamek v gelu bylo nanášeno 15 μl vzorku. Na zdroji stejnosměrného proudu bylo nastaveno napětí $U = 70 \text{ V}$.

Pro kvantifikaci byl použit program ImageJ.

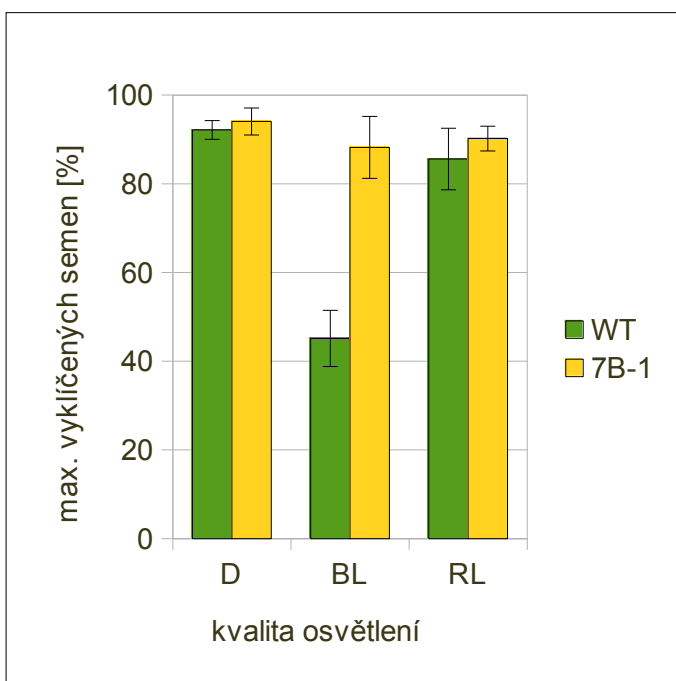
4 VÝSLEDKY

4.1 POKUS 1: Sledování vlivu manitolu a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT

Pokus 1 byl proveden ve čtyřech nezávislých opakováních, během nichž byla sledována klíčivost semen v závislosti na druhu osvětlení, a v závislosti na přítomnosti manitolu o různých koncentracích (0 mmol/l, 50 mmol/l, 100 mmol/l a 150 mmol/l). Klíčivost semen byla sledována v době od 3. dne do 8. dne po vysazení. Násbíraná data byla zpracována do čtyř grafů, porovnávajících maximální klíčivost, a do osmi grafů, porovnávajících kinetiku klíčení obou genotypů, vše v závislosti na použitém osmotiku - manitolu, a na světelných podmínkách. Pro další informace, viz kapitolu 3 Materiál a metodika.

4.1.1 MAXIMÁLNÍ KLÍČIVOST

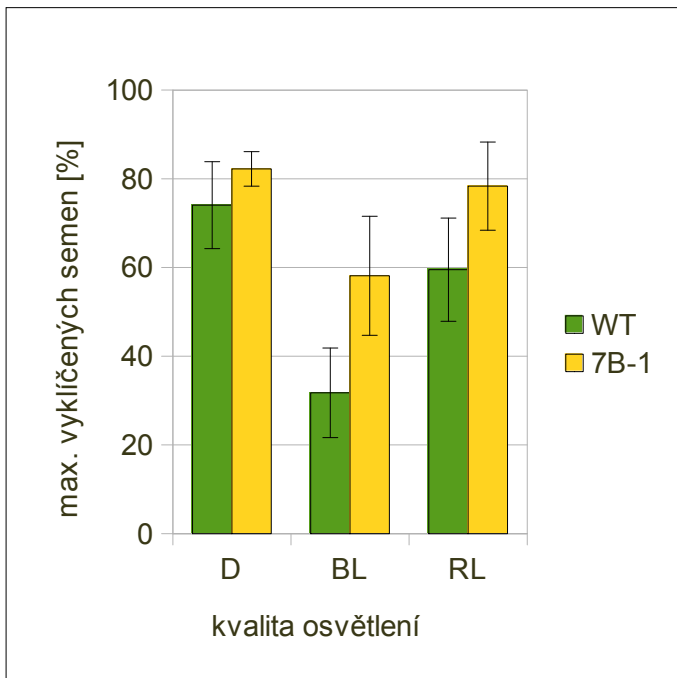
Obr. 3 ukazuje, že klíčivost semen WT, inkubovaných na bazálním médiu, byla výrazně snížena modrým světlem. Inhibiční účinek na klíčení však nebyl pozorován u mutanta 7B-1. Červené světlo nemělo u obou genotypů na klíčení semen vliv.



Obr. 3: Klíčivost semen 7B-1 a WT na bazálním médiu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

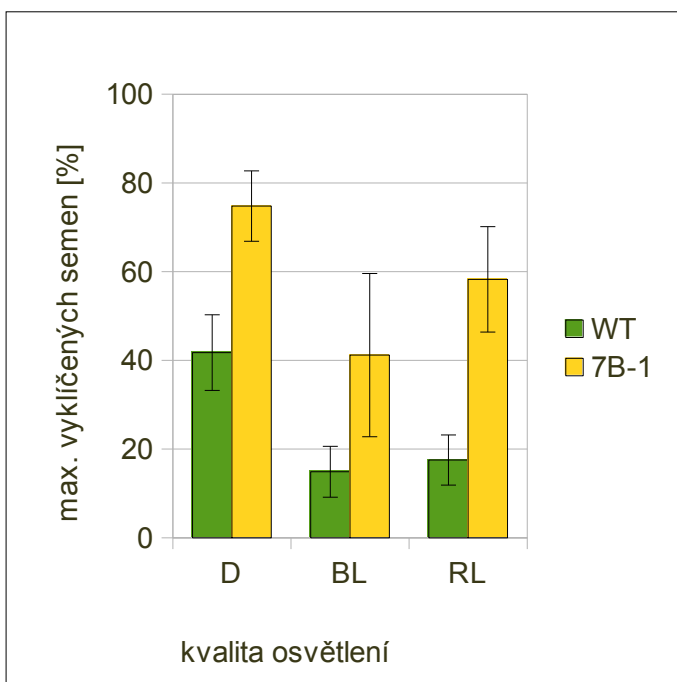
Graf na Obr. 4 ukazuje, že manitol o koncentraci 50 mmol/l snižoval maximální klíčivost semen, a to jak u WT, tak i 7B-1 (snížení u obou genotypů a na všech světlech asi o 20%). Snížení klíčivosti se ukázalo být výraznější u WT. Na modrém světle klíčily, oproti tmě a červenému světlu, hůře oba genotypy.



Obr. 4: Klíčivost semen na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu. Vykličovaná semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

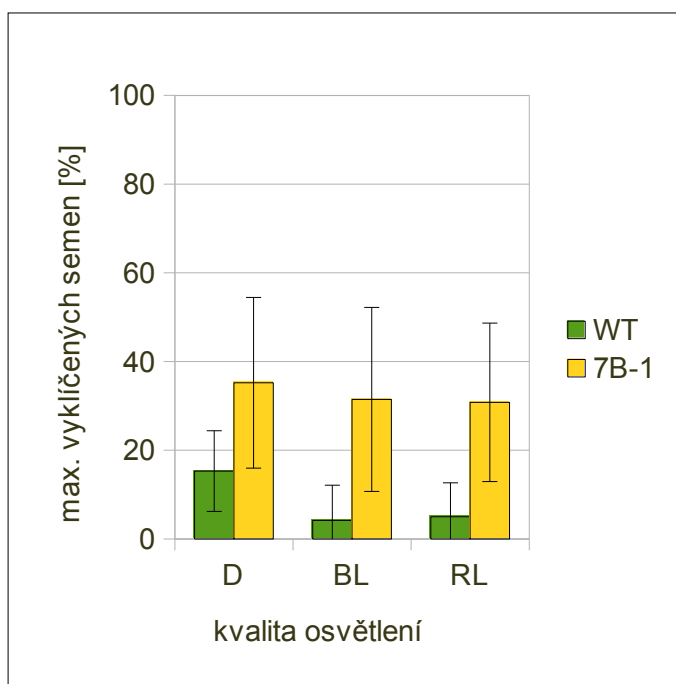
I v grafu, znázorněném na Obr. 5, je patrné, že po použití 100 mmol/l manitolu došlo dalšímu snížení maximální klíčivosti. Inhibice klíčivosti nastala jak u WT, tak i u 7B-1, u WT však klesla výrazněji (o 18 až 42% u WT, u 7B-1 max o 20%). Na tomto grafu lze také vidět, že 7B-1 má nižší maximální klíčivost na modrém světle, v porovnání s tmou či červeným světlem.



Obr. 5: Klíčivost semen na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu. Vykličovaná semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Podobný trend, jaký je vidět u předchozích testovaných koncentrací manitolu (Obr. 3, Obr. 4 a Obr. 5), je patrný také u koncentrace 150 mmol/l (Obr. 4), který ukazuje vliv 150 mmol/l manitolu na maximální klíčivost. Je zde patrné výrazné potlačení maximální klíčivosti u obou genotypů, zvláště však WT. Na tomto grafu je velmi dobře viditelný rozdíl v maximální klíčivosti WT a 7B-1, který postupně vzrůstal se zvyšujícím se množstvím použitého osmotika.

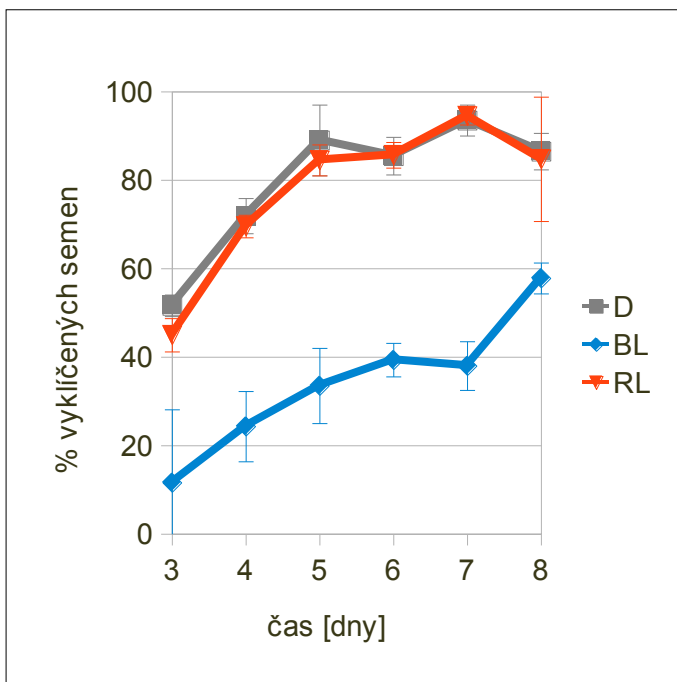


Obr. 6: Klíčivost semen na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

4.1.2 KINETIKA KLÍČENÍ SEMEN

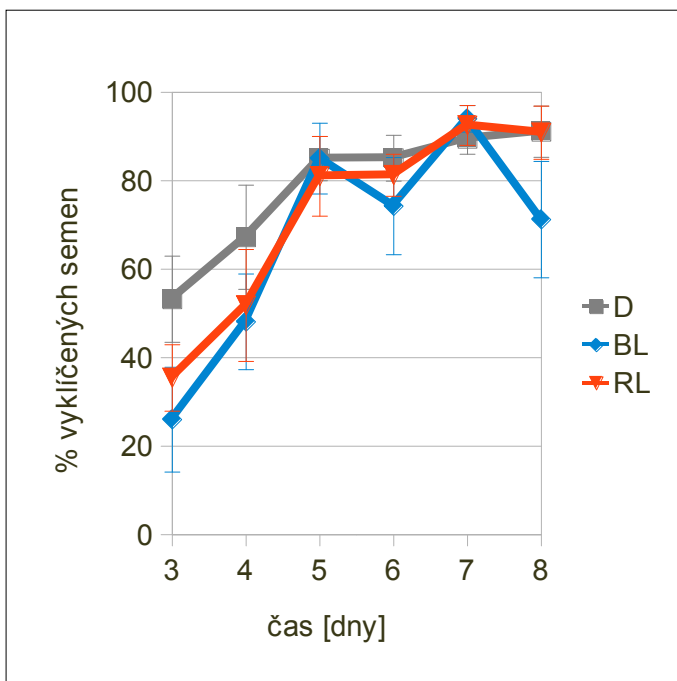
Podobně jako u Pokusu 1, také z dat získaných v Pokusu 2 byly vytvořeny grafy kinetiky klíčení pro lepší znázornění rozdílů reakcí sledovaných genotypů. Na Obr. 7 je znázorněna kinetika klíčení semen WT na médiu bez přítomnosti manitolu. Na první pohled je zde zřejmý velmi výrazný rozdíl v rychlosti klíčení v závislosti na světle. Ve tmě a na červeném světle byla již pátý den semena téměř na maximu klíčení, tedy přes průměrných 80%, zatímco na modrém světle klíčení WT probíhalo výrazně pomaleji - pátý den vyklíčilo průměrně 34% semen.



Obr. 7: Kinetika klíčení semen WT na bazálním médiu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Na rozdíl od WT byla kinetika klíčení semen 7B-1 (Obr. 8) podobná na všech světlech. Pátý den se klíčivost zvýšila nad průměrných 80%, a to za všech světelných podmínek, dále již stoupala jen mírně.

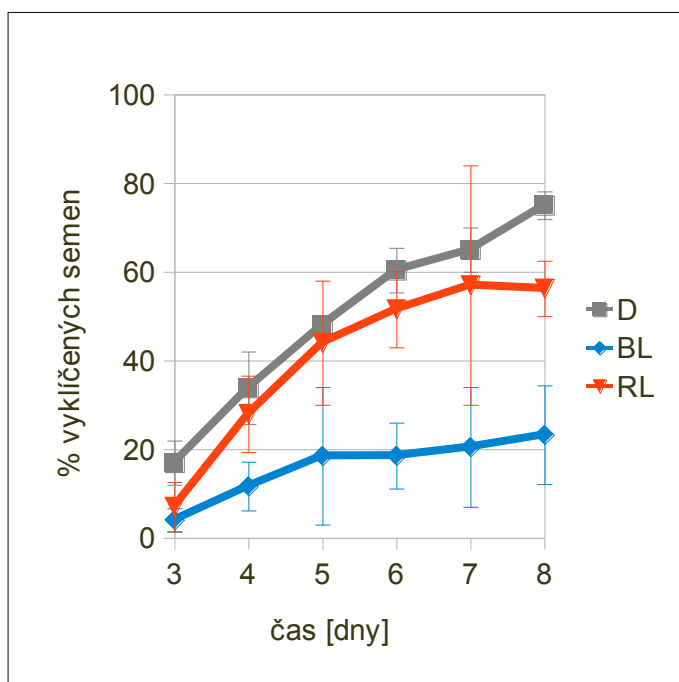


Obr. 8: Kinetika klíčení semen 7B-1 na bazálním médiu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Graf na Obr. 9 znázorňuje kinetiku klíčení WT pod vlivem 50 mmol/l manitolu. Také zde je vidět, že semena klíčí na modrém světle pomaleji. Během pěti dnů zvýšilo klíčení

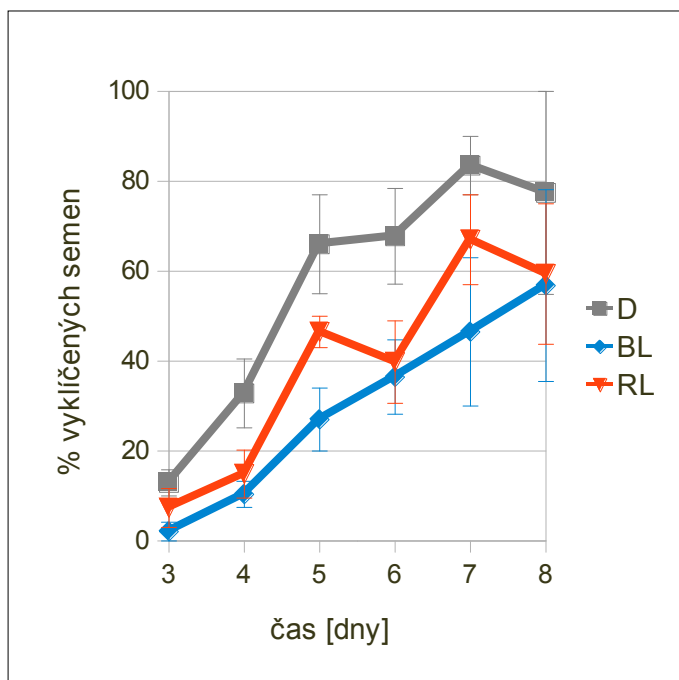
semen, inkubovaných ve tmě z počátečního stavu pod 20% až na průměrných 75% a průměrných 56% v případě semen inkubovaných na červeném světle. Z grafu je zřejmá i celková inhibice kinetiky klíčení, vyvolaná koncentrací manitolu 50 mmol/l.



Obr. 9: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

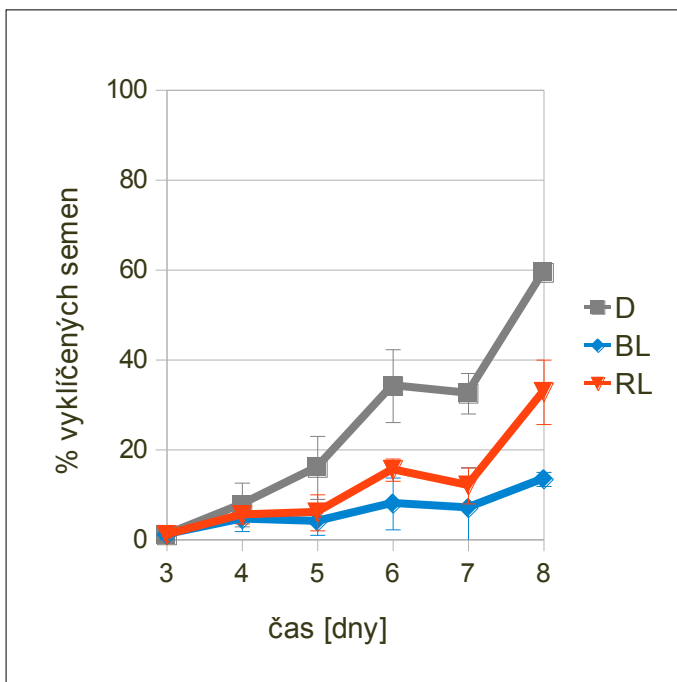
Graf na Obr. 10 vyjadřuje vliv 50 mmol manitolu na kinetiku klíčení semen mutanta 7B-1. Oproti kontrole (Obr. 8) je u 7B-1 vidět pomalejší klíčení na všech světlech, ale při porovnání s WT je vidět, že u 7B-1 není v kinetice klíčení výrazný rozdíl mezi klíčením na modrém a červeném světle a ve tmě. Počet vyklíčených semen vzrostl během pěti dnů z průměrných méně než 20% na průměrných 57 – 77 %.



Obr. 10: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 50 mmol/l manitolu. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

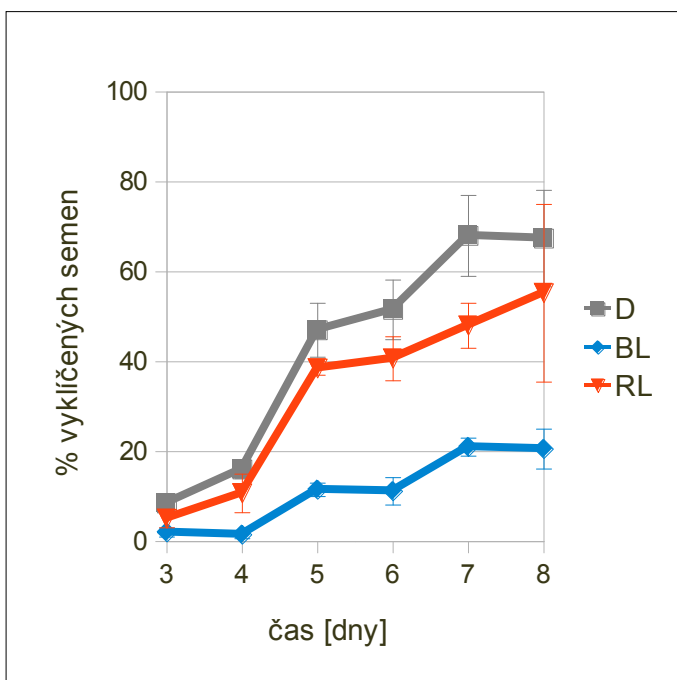
Další graf (Obr. 11) ukazuje vliv 100 mmol/l manitolu na kinetiku klíčení semen WT. Nejnižší klíčivosti opět dosahovala semena, kultivovaná na modrém světle, kdy se až po 8 dnech inkubace začala klíčivost blížit průměrným 20%, zatímco semena, inkubovaná ve tmě a na červeném světle, dosahovala podobných hodnot o 2 dny (červené světlo) nebo o 3 dny (tma) dříve.



Obr. 11: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

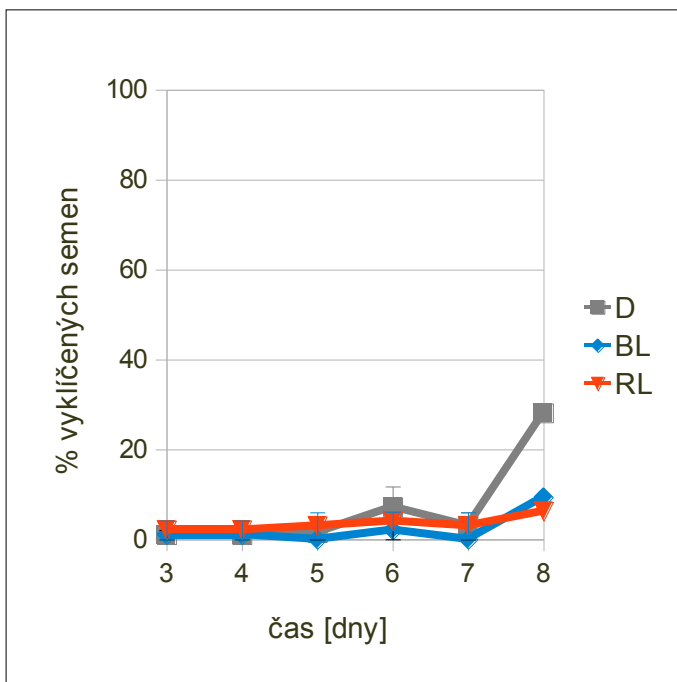
Na Obr. 12 je graf, znázorňující působení 100 mmol/l manitolu na kinetiku klíčení 7B-1. Na rozdíl od grafů na Obr. 9 a Obr. 10 je zde vidět výrazný rozdíl v klíčení semen na modrém světle, kdy semena teprve 7. dne dosáhla průměrné klíčivosti kolem 20%, zatímco ve stejný den se klíčivost semen na červeném světle blížila průměrným 50% a ve tmě průměrným 70%.



Obr. 12: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 100 mmol/l manitolu. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

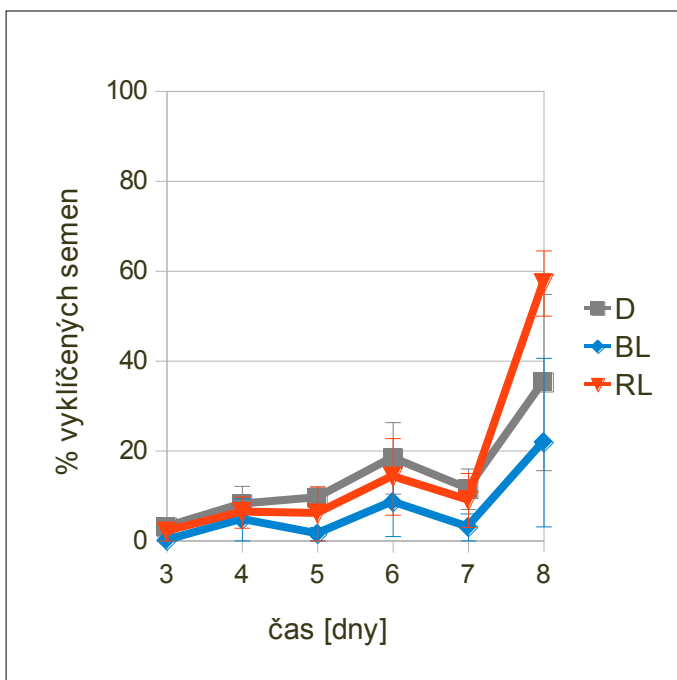
Kinetika klíčení semen, inkubovaných na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu, je znázorněna na Obr. 13 a Obr. 14. Je vidět, že manitol zcela inhiboval klíčení semen WT až do posledního dne sledování, kdy ve tmě stoupl počet vyklíčených semen až na průměrných 25% (Obr. 13) Na světle (červeném i modrém) vyklíčilo poslední den také více semen, avšak pouze pod průměrných 10%.



Obr. 13: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Podobně, jako na předchozím grafu, i na Obr. 14 je vidět, že 150 mmol/l manitolu velmi výrazně inhibovalo klíčení semen 7B-1, avšak znatelně méně než klíčení semen WT. Již 5. den klíčilo průměrně kolem 5% semen, a poslední den se klíčivost začala zvyšovat při všech světelných podmínkách.



Obr. 14: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu

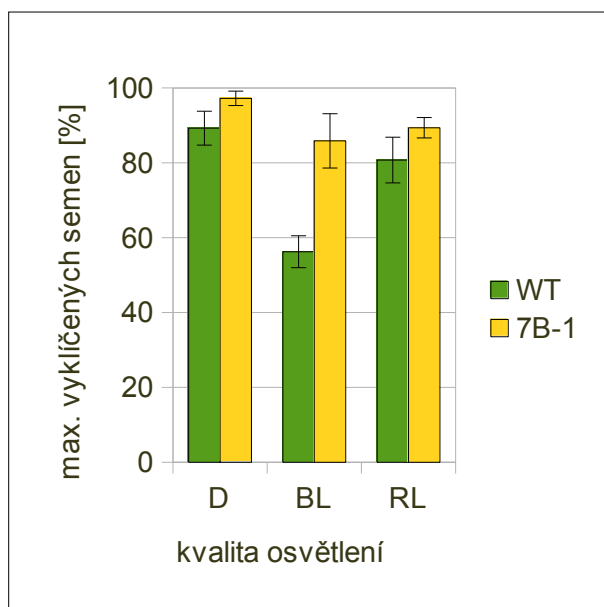
Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 150 mmol/l manitolu. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

4.2 POKUS 2: Sledování vlivu HgCl_2 a světelných podmínek na rychlost klíčení semen mutanta 7B-1 v porovnání s WT

Ve čtyřech nezávislých opakováních tohoto pokusu (opakování byla zprůměrována) byla sledována klíčivost semen v závislosti na druhu osvětlení, a v závislosti na přítomnosti inhibitoru akvaporinů HgCl_2 o různých koncentracích (0 $\mu\text{mol/l}$, 10 $\mu\text{mol/l}$, 20 $\mu\text{mol/l}$ a 0 $\mu\text{mol/l}$). Klíčení bylo sledováno v době od 3. dne do 8. dne po vysazení. Násbíraná data byla zpracována do čtyř grafů, porovnávajících maximální klíčivost, a do osmi grafů, porovnávajících kinetiku klíčení WT a 7B-1, vše v závislosti na použité koncentraci HgCl_2 , a na světelných podmínkách. Pro další informace, viz kapitolu 3 Materiál a metodika.

4.2.1 MAXIMÁLNÍ KLÍČIVOST

Obr. 15 ukazuje, že semena WT měla na bazálním médiu na modrém světle výrazně sníženou klíčivost (průměrně méně než 60%), zatímco maximální klíčivost 7B-1 byla při všech světlech podobná (nad 86%). Kromě toho je také patrná celkově mírně vyšší klíčivost 7B-1 v porovnání s WT.

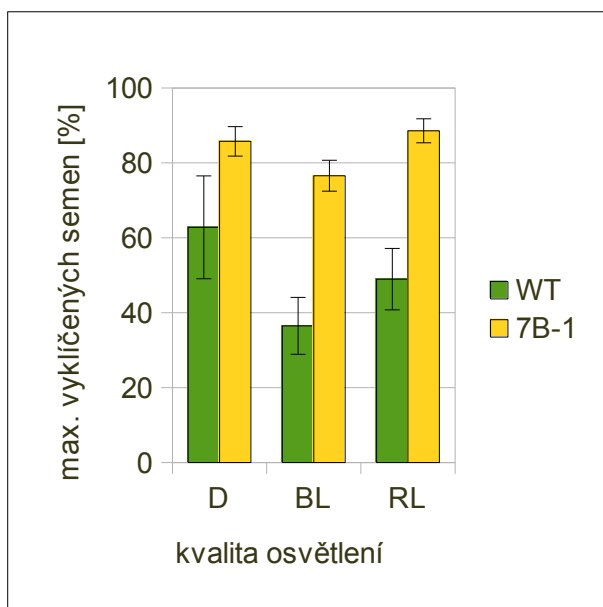


Obr. 15: Klíčivost semen 7B-1 a WT na bazálním médiu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Při použití HgCl_2 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$ se projeví inhibiční účinky HgCl_2 . Ty měly za následek snížení klíčivosti semen, zejména u WT, kde došlo ke snížení klíčivosti přes více než 20%, zatímco u 7B-1 pouze asi o 10% a méně. Porovnáním klíčivosti za různých světelných podmínek vyplývá, že jak u WT, tak u 7B-1 byla klíčivost na modrém světle nižší,

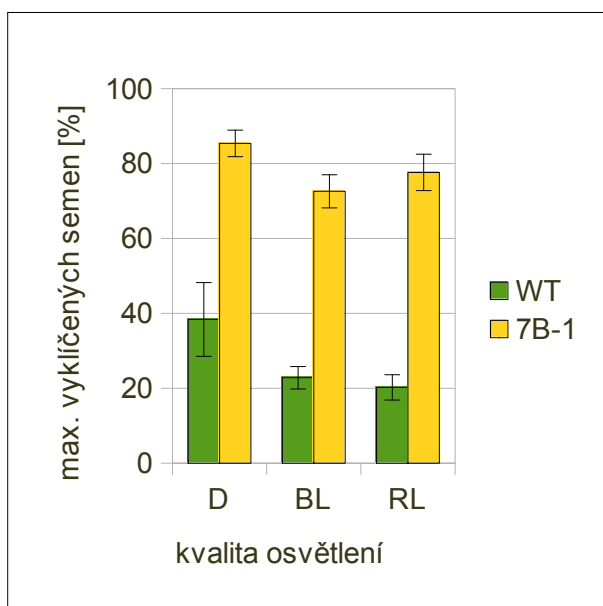
u WT byl však rozdíl patrnější. Viz Obr. 16.



Obr. 16: Klíčivost semen na médiu obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Další graf (Obr. 17) představuje vliv HgCl₂, o koncentraci 20 µmol/l, na maximální klíčivost semen. Tato koncentrace HgCl₂ ještě více snížila klíčivost semen WT až na průměrné hodnoty 20 – 38%. Klíčivost semen 7B-1 se stále pohybovala kolem 80%. Z porovnání klíčivosti při různých světelných podmínkách je vidět u 7B-1 pouze mírně nižší klíčivost na modrém a červeném světle, než ve tmě. U WT je tento rozdíl výraznější.

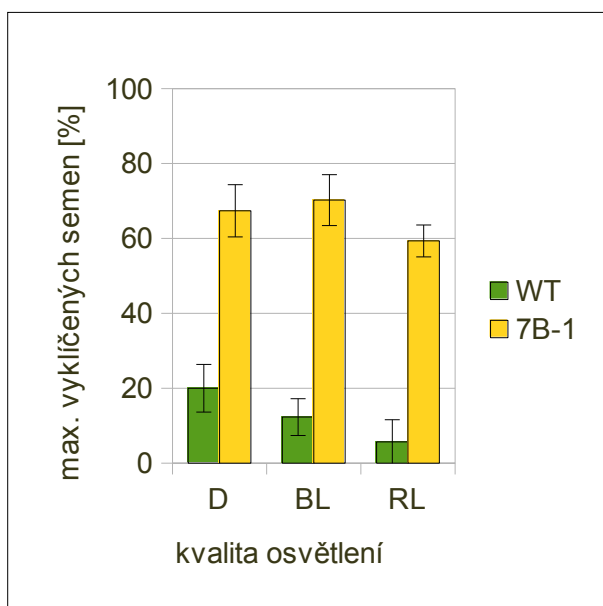


Obr. 17: Maximální klíčivost; 20 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 20 µmol/l HgCl₂. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Graf na Obr. 18 uvádí výsledky při použití nejvyšší testované koncentrace HgCl₂, tedy 30 µmol/l. Při této koncentraci je velmi patrný rozdíl mezi relativně dobrou klíčivostí 7B-1

(nad průměrných 60%) a špatnou klíčivostí WT (až pod průměrných 20%). Z porovnání klíčivosti při různých světelných podmínkách vyplývá, že jak u WT, tak i u 7B-1 je klíčivost nejnižší na červeném světle, rozdíl je výraznější u WT.



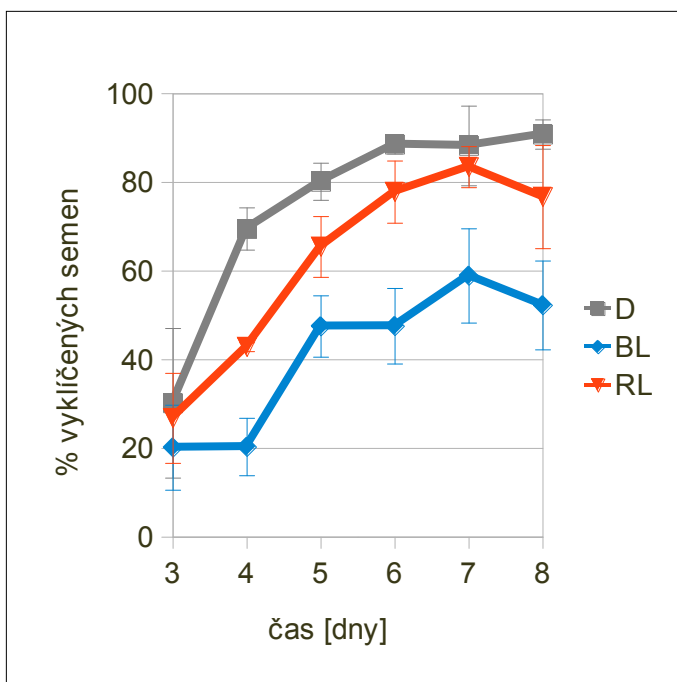
Obr. 18: Maximální klíčivost; 30 μmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na maximální klíčivost semen WT a 7B-1, na médiu, obsahujícím 30 μmol/l HgCl₂. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

4.2.2 KINETIKA KLÍČIVOSTI SEMEN

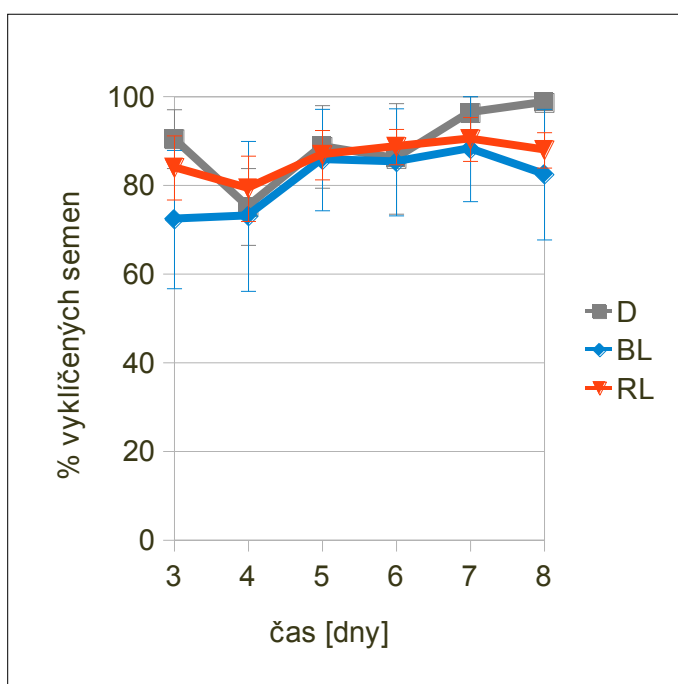
Jelikož byla klíčící semena průběžně sčítána po dobu několika dnů, byla nasbíraná data použita také pro vytvoření grafů kinetiky klíčení. Na těchto grafech lze totiž ještě lépe znázornit rozdíly v reakcích sledovaných genotypů k HgCl₂, než na grafech maximální klíčivosti.

Obr. 19 a Obr. 20 znázorňují kinetiku klíčení WT a 7B-1 bez přítomnosti HgCl₂. Porovnáme-li oba grafy, je jasně vidět dva výrazné rozdíly. Prvním je, že 7B-1 dosáhl prakticky maxima klíčení již na začátku sčítání, tedy 3. dne (Obr. 20). Druhým rozdílem je odlišnost rychlosti klíčení WT za různých světelných podmínek. Na červeném světle klíčí WT pomaleji, než ve tmě, a na modrém světle výrazně pomaleji, než ve tmě (Obr. 19). Naproti tomu, kinetika klíčení 7B-1 je podobná při všech světlech (Obr. 20).



Obr. 19: Kinetika klíčení semen WT na bazálním médiu

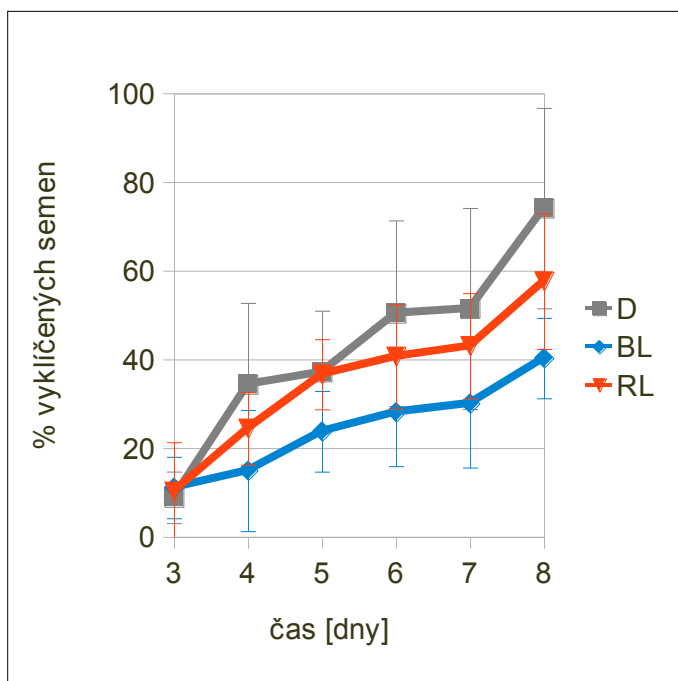
Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.



Obr. 20: Kinetika klíčení semen 7B-1 na bazálním médiu

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

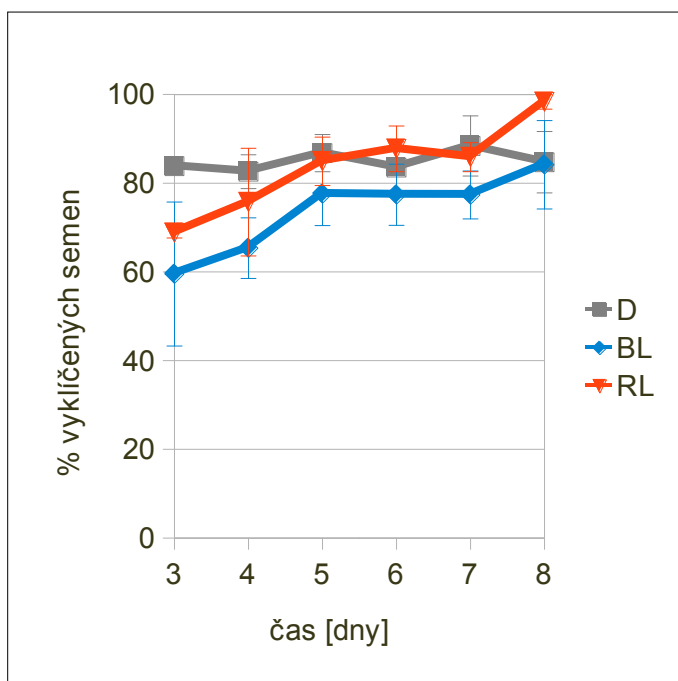
Další dva grafy na Obr. 21 a Obr. 22, znázorňují kinetiku klíčení semen WT a 7B-1 za působení HgCl_2 o koncentraci 10 $\mu\text{mol/l}$. Na Obr. 21 jsou patrné rozdíly v kinetice klíčení WT za různých světelných podmínek, přičemž klíčení je nejpomalejší na modrém světle.



Obr. 21: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

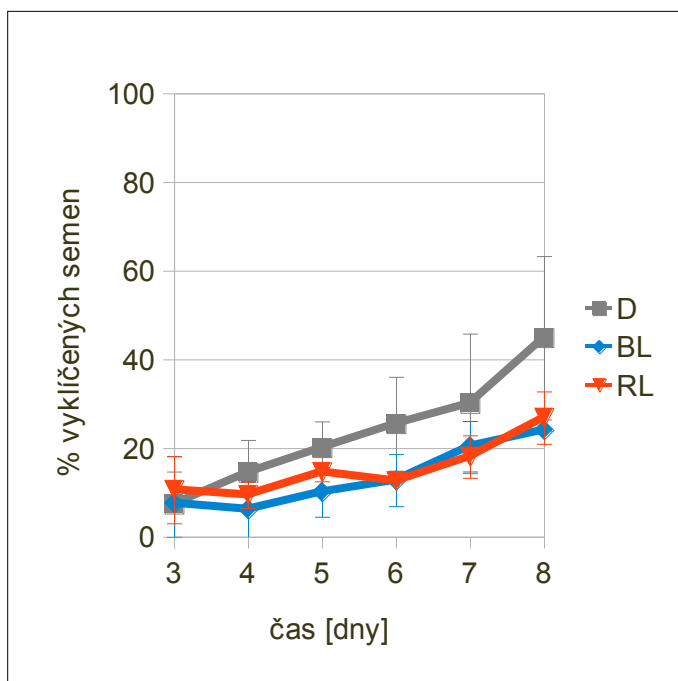
Obr. 22 ukazuje ovlivnění kinetiky klíčení 7B-1 za různých světelných podmínek. Na rozdíl od WT, dosahuje 7B-1 téměř maximálních hodnot klíčivosti již 5. den, a klíčení na jednotlivých světlech se navzájem dosti podobá.



Obr. 22: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 10 µmol/l HgCl₂. Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

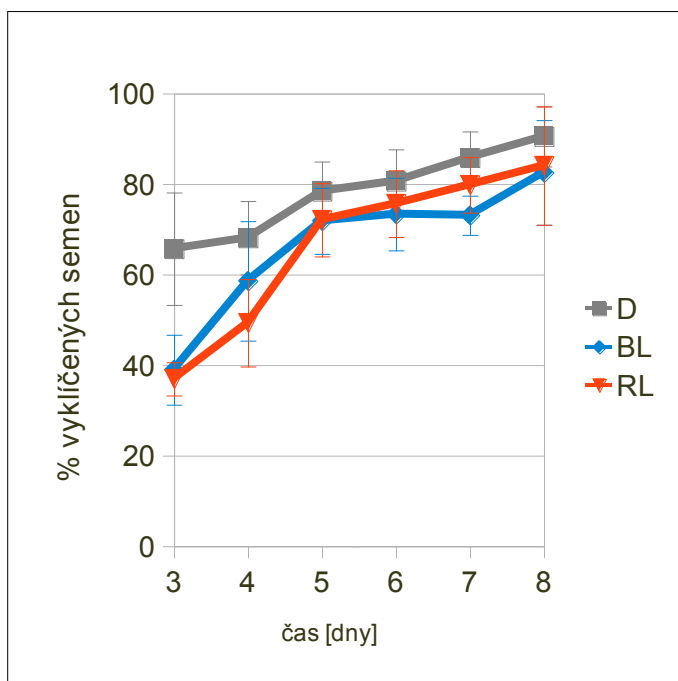
Na Obr. 23, znázorňujícího ovlivnění klíčení WT pomocí HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l, je patrné další ještě výraznější zpomalení kinetiky klíčení. Po osmi dnech nedosáhla semena WT průměrně ani 50% klíčivosti. Inhibice klíčení byla výraznější při červeném a modrém světle.



Obr. 23: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 20 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím 20 µmol/l HgCl₂. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Obr. 24 ukazuje, že ani použití HgCl₂ o koncentraci 20 µmol/l, nemělo za následek snížení rychlosti klíčení semen 7B-1 tak intenzivní, jako u WT. Přesto je na Obr. 12 patrná změna rychlosti klíčení oproti Obr. 20 a Obr. 22. Zároveň je také vidět, že rychlost klíčení semen 7B-1 byla velmi podobná na všech světlech.

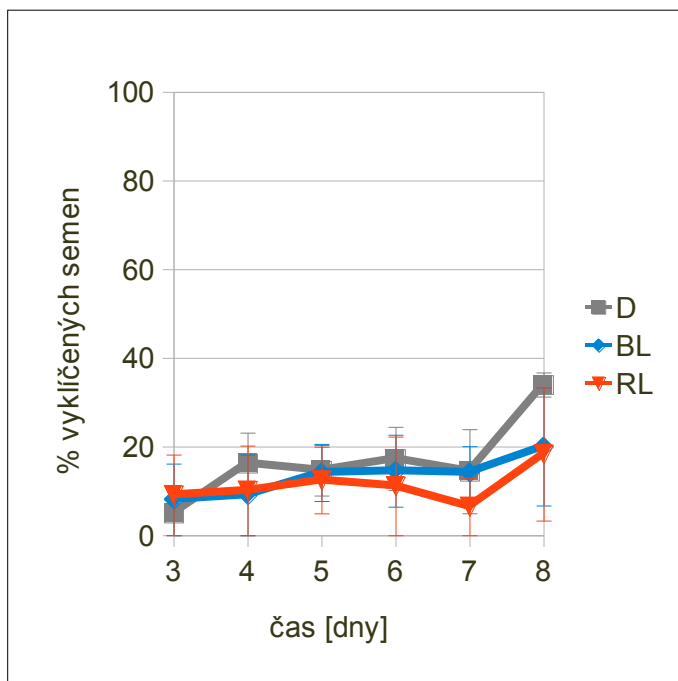


Obr. 24: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 20 µmol/l HgCl₂

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím 20 µmol/l HgCl₂. Vyklíčená semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty ± SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Působení nejvyšší použité koncentrace HgCl₂, tedy 30 µmol/l, na kinetiku klíčení WT

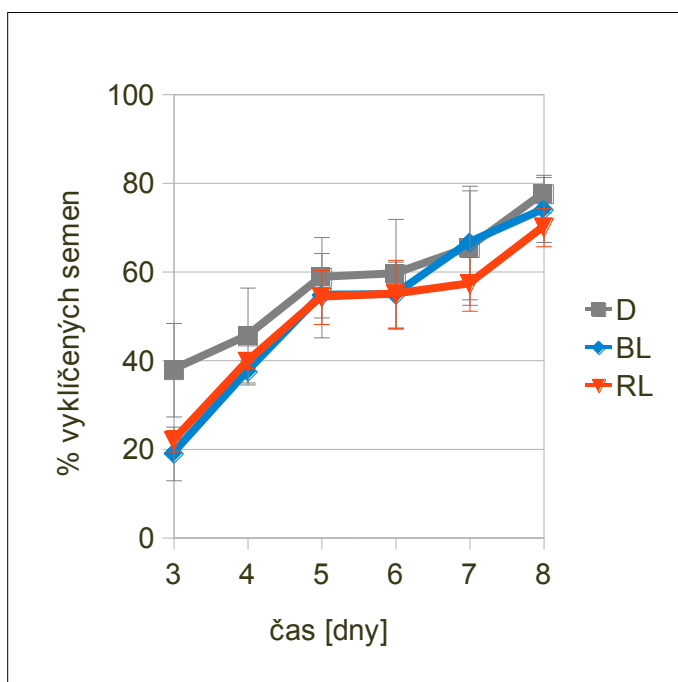
znázorňuje Obr. 25. Rychlost klíčení byla v tomto případě významně inhibována, ještě více, než v případě HgCl_2 o koncentraci $20 \mu\text{mol/l}$ – až do 7. dne se klíčivost semen držela pod průměrnými 20%. Při všech světelných podmínkách byla však kinetika klíčení podobná.



Obr. 25: Kinetika klíčení semen WT na médiu, obsahujícím $30 \mu\text{mol/l}$ HgCl_2

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen WT na médiu, obsahujícím $30 \mu\text{mol/l}$ HgCl_2 . Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

Jak je vidět na Obr. 26, také u 7B-1 byla rychlost klíčení semen výrazně zpomalena $30 \mu\text{mol/l}$ HgCl_2 , nicméně po pěti dnech byla klíčivost semen mezi průměrnými 50 - 60%, a to na všech světlech. Kinetika klíčení byla při všech světelných podmínkách podobná.



Obr. 26: Kinetika klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím $30 \mu\text{mol/l}$ HgCl_2

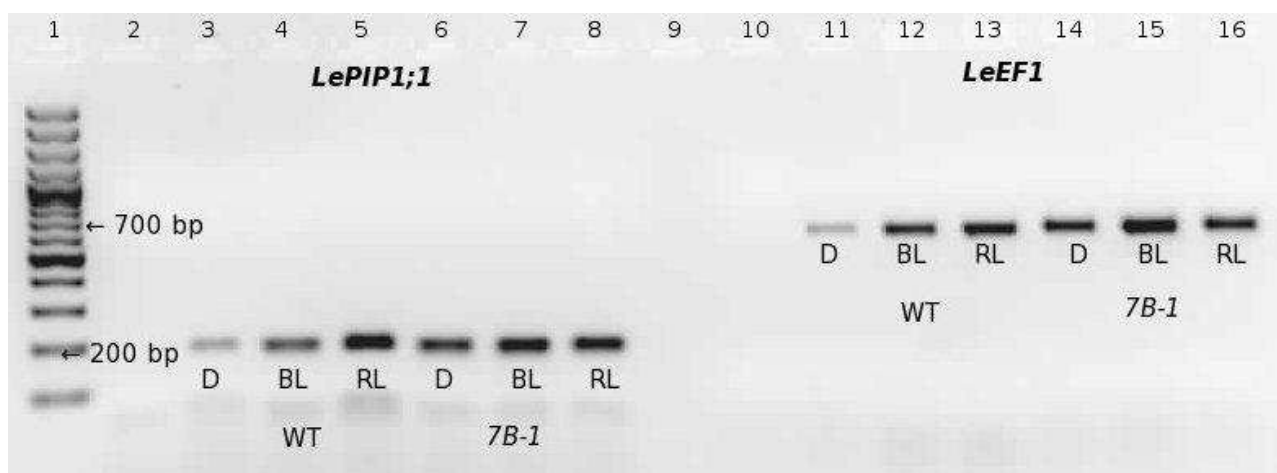
Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na kinetiku klíčení semen 7B-1 na médiu, obsahujícím $30 \mu\text{mol/l}$ HgCl_2 . Vykličena semena byla sčítána po dobu 8 dní. Hodnoty klíčení reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze čtyř nezávislých experimentů.

4.3. EXPRESE GENŮ KÓDUJÍCÍCH AKVAPORINY SKUPINY PIP

4.3.1 POKUS 3: Sledování vlivu světelných podmínek na expresi genu *LePIP1-1* u imbibovaných semen mutanta *7B-1* v porovnání s WT

Na základě Pokusu 1 a Pokusu 2 se lze domnívat, že mutace v genu *7B-1* ovlivňuje expresi některého z akvaporinů. Proto byl proveden Pokus 3, v němž byla sledována expresi genu pro akvaporin *LePIP1-1*. Pokus 3 byl proveden na třech nezávislých sadách vzorků (opakováních). Navíc, v rámci každé sady, byly PCR s primery pro sledované geny, a následná ELFO provedeny ve dvou opakováních. Výsledné exprese obou opakování byly zprůměrovány, a z průměru byla stanovena relativní expresi. Z těchto hodnot byl pak vypočten průměr všech tří nezávislých sad. V Pokusu 3 byla sledována expresi genu *LePIP1-1* a kontrolního genu *LeEF1* u semen WT a *7B-1*, imbibovaných po dobu 24 hodin. Expresi byla sledována v závislosti na světelných podmínkách, v nichž byly semena inkubována. Pro další informace, viz kapitolu 3 Materiál a metodika.

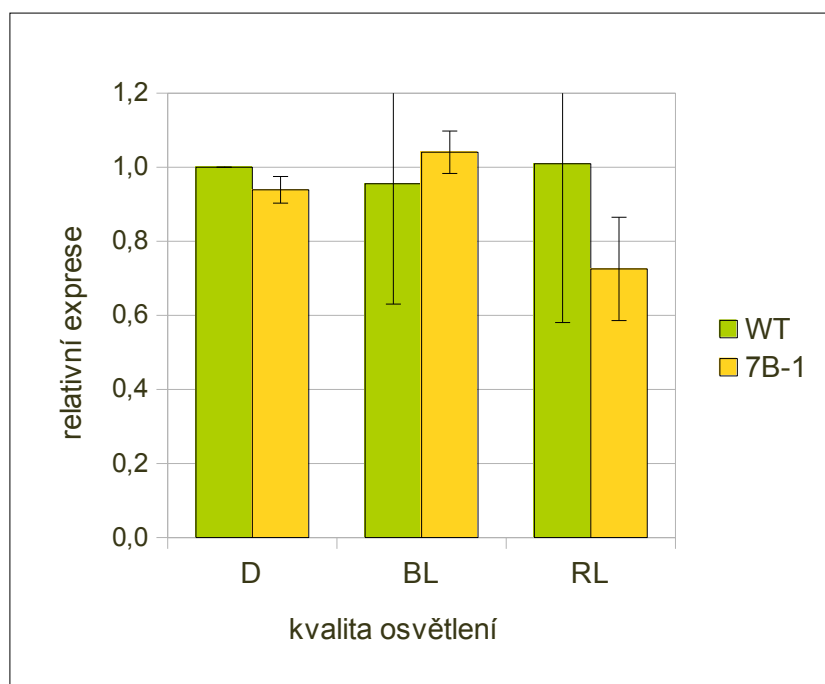
Na Obr. 27 vidíme expresi sledovaných genů. Na tomto obrázku je vidět, že ačkoliv se expresi genu *LePIP1-1* v rámci jednotlivých genotypů a světelných podmínek liší, je zároveň vidět podobný trend odlišnosti v expresi genu *LeEF1*.



Obr. 27: Expresi genu *LePIP1-1* a kontrolního genu *LeEF1*

Na tomto obrázku je invertovaná fotografie elektroforézy druhého opakování Sady 3. Obrázek ukazuje vliv různých světelných podmínek na expresi genu *LePIP1-1* a kontrolního provozního genu *LeEF1*. V horní části obrázku jsou očíslovány jamky v gelu. Do první jamky byl napipetován 100 bp žebříček. Do jamek 2 a 10 byla nanášena kontrola. Do jamek 3 – 8 byly napipetovány vzorky produktu PCR s primery pro gen *LePIP1-1* (WT v jankách 3 – 5; *7B-1* v jankách 6 – 8) Do jamek 11 – 16 byly napipetovány vzorky PCR produktu s primery pro gen *LeEF1* (WT v jankách 11 – 13; *7B-1* v jankách 14 – 16). Expresi byla sledována ve vzorcích semen, imbibovaných po dobu 24 hodin, na základním kultivačním médiu.

Graf na Obr. 28 ukazuje průměr relativních expresí genu LePIP1-1 v závislosti na genotypu a osvětlení imbibovaných semen. Celkově se všechny hodnoty relativní exprese navzájem podobaly - průměrné hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,73 – 1,04. Co se týká rozdílu exprese mezi WT a 7B-1, jediný výraznější rozdíl byl patrný u semen, inkubovaných na červeném světle, kde byla exprese u mutantu 7B-1 nižší, než u WT.



Obr. 28: Průměr relativních expresí genu LePIP1-1

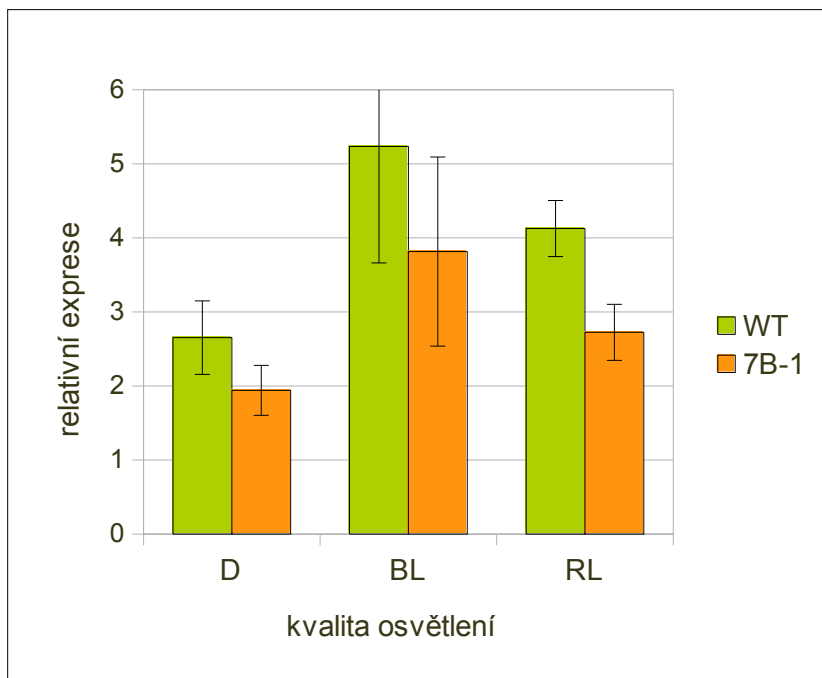
Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na expresi genu LePIP1-1 u semen WT a 7B-1. Expese byla zjištěna ze vzorků semen imbibovaných po dobu 24 hodin. Hodnoty exprese reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze tří nezávislých experimentů.

4.3.2 DALŠÍ VÝSLEDKY STUDIE EXPRESE AKVAPORINŮ SKUPINY PIP

Po 24 hodinové imbibici nebyl rozdíl v expresi genu LePIP1-1 u semen WT a 7B-1 výrazný. Proto zde také uvádím některé výsledky kolegyně doktorandky Jany Balarynové. Ta zkoumala expresi genu LePIP1-1 nejen ve stádiu imbibice, ale i v pozdějších stádiích klíčení, a sledovala také expresi dalších akvaporinů skupiny PIP.

Výsledky studie exprese LePIP1-1 u semen s kořínkem velikosti 3 – 10 mm (Obr. 27) ukazují, že u semen WT, inkubovaných ve tmě, stoupla exprese průměrně až na 2,5-násobek ve srovnání s expresí tohoto genu v imbibovaných semenech. Podobně, na modrém světle bylo zvýšení průměrné exprese až 5-násobné a na červeném světle 4-násobné. U semen 7B-1 vzrostla průměrná exprese genu méně. Ve tmě asi na 2-násobek, na modrém světle zhruba na

4-násobek, a na červeném světle asi na 3-násobek. Větší nárůst průměrné exprese byl tedy zjištěn u semen WT, než u semen mutanta 7B-1. Porovnáním těchto hodnot s hodnotami průměrné exprese ve stádiu imbibice je tedy vidět dosti výrazný nárůst průměrné exprese v pozdější fázi klíčení oproti fázi imbibice.



Obr. 29: Průměr relativních expresí genu LePIP1-1 u semen s 3 - 10 mm kořínkem

Graf ukazuje vliv různých světelných podmínek na expresi genu LePIP1-1 u semen WT a 7B-1. Exprese byla zjištěna ze vzorků semen s kořínkem velikosti 3 – 10 mm, což odpovídá asi 3. - 4. dni klíčení. Hodnoty exprese reprezentují průměrné hodnoty \pm SE ze tří nezávislých experimentů. Výsledky byly laskavě poskytnuty doktorandkou Janou Balarynovou.

5 DISKUZE

Pokusy 1 a 2 ukázaly, že klíčení semen rajčete cv. Rutgers (WT) v našich laboratorních podmínkách je inhibováno modrým světlem a dále odhalily, že mutant 7B-1 je k tomuto efektu modrého světla méně citlivý než WT. Modré světlo rovněž u WT zhoršuje reakci semen na osmotický stres a to více než u 7B-1. Tyto výsledky potvrzují původní zjištění, že 7B-1 má defekt buď v recepci modrého světla nebo v signální dráze modrého světla (Fellner and Sawhney 2002; Bergougnoux et al. 2009). A jelikož do regulace osmotického stresu jsou zapojeny akvaporiny, lze také předpokládat, že důsledkem defektu ve vnímání modrého světla je ovlivnění akvaporinů. To potvrzuje také Pokus 2, v němž bylo zjištěno, že semena mutantu 7B-1 jsou, v porovnání s WT, odolnější vůči HgCl₂, který specificky inhibuje akvaporiny (Savage a Stroud, 2007). Ačkoliv jsou semena mutantu 7B-1 inkubovaná na modrém světle odolnější vůči osmotickému stresu, než semena WT, inkubovaná na modrém světle, i přesto je u 7B-1 patrný mírný vliv modrého světla, zhoršující klíčení jeho semen. Proto je možné, že do zhoršení reakce na osmotický stres je zapojená i jiná signální dráha specifická pro modré světlo.

Výsledky Pokusu 3, v němž byla sledována exprese akvaporinu LePIP1-1, ukazují, že sledovaný akvaporin je při klíčení semen *S. lycopersicum* exprimován již ve fázi imbibice, na rozdíl od semen *A. thaliana*, u nichž podíl akvaporinů na imbibici prokázán nebyl (Willigen a kol., 2006). Dalším zjištěním je, že na expresi sledovaného akvaporinu neměl vliv ani genotyp ani kvalita osvětlení, při němž byla semena inkubována. Tři nezávislá opakování jsou navzájem mírně odlišná a není u nich patrný žádný specifický trend. Ani průměr všech nezávislých opakování nenaznačuje, že by exprese genu LePIP1-1 byla významně odlišná u WT a 7B-1, a při různých světelných podmínkách.

Kolegyně doktorandka Jana Balarynová provádí u semen WT a 7B-1 expresní analýzu více akvaporinů skupiny PIP (LePIP1-1, LePIP1-2, LePIP1-3, LePIP1-4, LePIP1-5, LePIP2-1, LePIP2-2, LePIP2-3 a LePIP2-4). Expresi sleduje nejen u semen ve stádiu imbibice, ale i v pozdějších stádiích klíčení. Její výsledky (Obr. 29) ukazují, že exprese sledovaného genu vzrůstá postupně s klíčením semen. Co se týče vlivu genotypu na expresi sledovaného genu, výsledky Jany Balarynové ukazují, že mutace 7B-1 snižuje expresi LePIP1-1, a to na všech světlech. Na základě těchto a dalších experimentů (Balarynová a kol., 2011) byly akvaporiny rozděleny do dvou skupin podle toho, jak je akvaporin exprimován v závislosti na genotypu (WT a 7B-1). Sedm z devíti sledovaných akvaporinů bylo exprimováno v obou genotypech stejně. U zbylých dvou akvaporinů (LePIP1-1 a LePIP1-3) byla však u mutovaných semen pozorována nižší exprese, než u WT. Výsledky J.

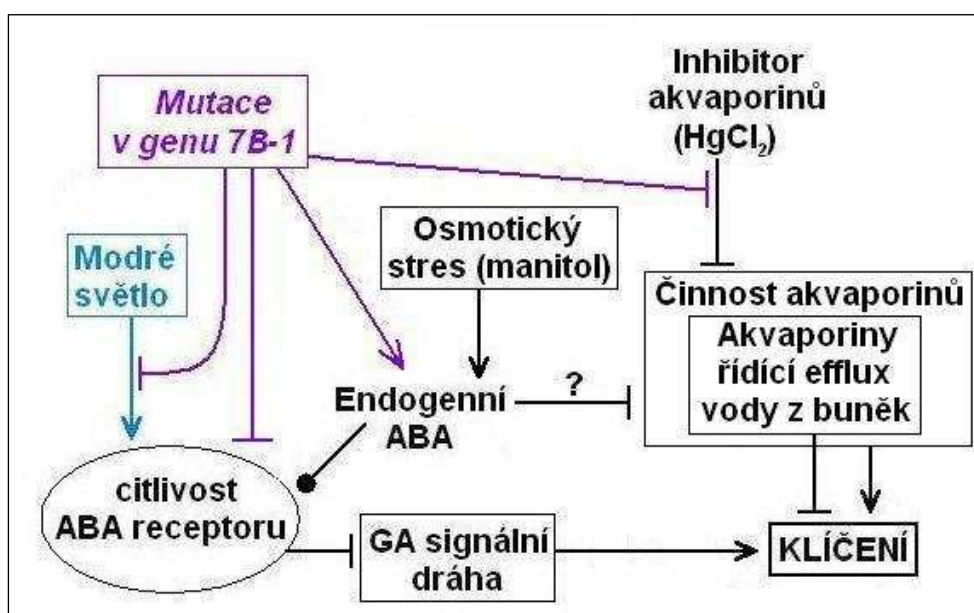
Balarynové rovněž ukazují, že exprese genu PIP1-1 v klíčících semenech je stimulována jak červeným, tak modrým světlem, a to v podobné míře u obou testovaných genotypů.

Velmi zajímavé je zamyšlení se nad postavením kyseliny abscisové u sledovaného mutanta. Je dobře známo, že se ABA podílí na regulaci klíčení a že se zároveň uplatňuje i při řízení reakcí na osmotický stres. Příkladem mohou být semena *B. napus*, která po předpůsobení ABA vykazovala větší rezistenci vůči osmotickému stresu (Gao a kol., 1999). Proto není možné opomenout výsledky studie, zabývající se mimo jiné sledováním vlivu exogenní ABA na klíčivost semen 7B-1 za různých světelných podmínek. Ukázalo se, že modré světlo má specifický vliv na citlivost vůči exogenní ABA. Byla-li totiž semena WT inkubována na modrém světle, a za přítomnosti exogenní ABA, klíčila výrazně méně, zatímco semena 7B-1 klíčila srovnatelně při všech světelných podmínkách. (Fellner a Sawhney, 2002). Že vnímání světla ovlivňuje biosyntézu ABA potvrzuje také studie, v níž se zjistilo, že *pew1* - mutant tabáku (*Nicotiana plumbaginifolia*), deficientní ve fytochromu A, vykazoval ve srovnání s WT vyšší hodnoty ABA. Listy tohoto mutanta byly zároveň odolnější vůči vodnímu stresu. (Kraepiel a kol., 1994). Semena mutanta *pew1* tak reagovala podobně na červené světlo (fytochrom A je fotoreceptorem červeného světla), jako mutant 7B-1 reaguje na světlo modré. Oba mutanti, *pew1* i 7B-1 tedy vykazují zvýšené množství endogenní ABA, a pre-adaptaci k abiotickému stresu. Jelikož má mutant *pew1* defekt ve fytochromu A, a mutant 7B-1 zřejmě v receptoru nebo signální dráze modrého světla, lze z těchto informací usoudit, že jak červené, tak i modré světlo může mít, prostřednictvím kumulace ABA, vliv na rezistenci vůči abiotickému stresu. Navíc obě rostliny náležejí do stejné čeledi Solanaceae.

Dalším zajímavým zjištěním je, že zvýšené množství ABA v semeni má zřejmě zásadní vliv na expresi akvaporinů. Semena *B. napus*, předpůsobená kyselinou abscisovou, vykazovala vysokou míru exprese BnPIP1 již v den předpůsobení, zatímco kontrolní semena exprimovala sledovaný gen až pátý den, a výrazně slaběji. (Gao a kol., 1999). Avšak ani moje výsledky sledování exprese genu LePIP1-1, ani výsledky doktorandky Jany Balarynové neukazují, že by semena mutanta 7B-1 exprimovala akvaporiny více, než kontrolní semena. Míra exprese akvaporinů je u semen mutanta podobná expresi u kontrolních semen nebo nižší. Přesto podíl akvaporinů na zvýšené rezistenci vůči osmotickému stresu není vyloučen, což potvrzuje Pokus 2. Sledovaná mutace může akvaporiny ovlivňovat na jiných úrovních, než na úrovni exprese a to například ovlivněním efektivity translace mRNA akvaporinů, ovlivněním post-translačních úprav akvaporinových proteinů (působící tak na jejich stabilitu), ovlivněním cíleného transportu akvaporinů nebo různým ovlivněním regulace jejich aktivity (viz kapitolu 2.3.4 Regulace aktivity akvaporinů). Je však také možné, že výsledky exprese genu PIP1-1 odrážejí množství funkčních proteinů PIP1-1. Fakt, že 7B-1 exprimuje gen

PIP1-1 méně než WT, by tak mohl znamenat, že PIP1-1 jsou určeny pro efflux vody (transport vody z buněk). Tím by semena 7B-1 byla schopna díky své mutaci udržovat v semeni více vody než kontrolní rostliny a tudíž klíčit lépe než semena WT.

Na základě svých výsledků a výsledků z předchozích experimentů se domnívám, že mutace v genu 7B-1 způsobuje defekt v signální dráze modrého světla, či v jeho percepci, a vede ke zvýšené produkci nebo akumulaci endogenní ABA, která pravděpodobně ovlivňuje akvaporiny na jiné úrovni, než na úrovni exprese. Je však třeba provést další experimenty, které by mohly tuto hypotézu potvrdit nebo vyvrátit, a zároveň vyloučit nescifické inhibiční působení rtuti, obsažené v HgCl_2 na klíčivost semen. Na základě svých výsledků a studia výsledků předchozích experimentů uvádím schéma možného působení některých faktorů, ovlivňujících klíčení semen rajčete (Obr. 30).



Obr. 30: Interakce některých faktorů, ovlivňujících klíčení semen rajčete

Manitol stimuluje produkci ABA, která inhibuje klíčení. Modré světlo inhibuje klíčení zvyšováním citlivosti receptoru pro endogenní ABA. Mutace v genu 7B-1 ovlivňuje klíčení několika způsoby: zvyšuje množství endogenní ABA, ale zároveň pravděpodobně snižuje citlivost ABA receptoru. Navíc mutace blokuje signální dráhu modrého světla. Pro klíčení je potřebná činnost akvaporinů, část z nich se však podílí na výdeji vody z buněk. Množství ABA zvýšené v důsledku mutace pravděpodobně inhibuje činnost akvaporinů, což může vést k inhibici effluxu vody a tím zvýšení množství vody v buňkách a lepšímu klíčení.

6 ZÁVĚR

V mojí bakalářské práci jsem v rámci pokusů s klíčením semen fotomorfogenního mutanta rajčete 7B-1 a kontrolní rostliny sledoval vliv osmotického stresu, vyvolaného manitolem, vliv inhibitoru akvaporinů HgCl_2 na klíčení semen, a interakci těchto vlivů a osvětlení použitého při inkubaci semen. Dále jsem sledoval vliv mutace v genu 7B-1 na expresi jednoho z akvaporinů skupiny PIP (LePIP1-1) v závislosti na osvětlení, při němž byla semena inkubována.

Výsledky svých experimentů jsem porovnal s výsledky dalších studií a s rešerší, kterou jsem vypracoval na dané téma. Moje práce potvrzuje rezistenci semen mutanta 7B-1 k osmotickému stresu, který byl vyvolán manitolem, a k inhibitoru akvaporinů (HgCl_2). Zároveň jsem potvrdil, že semena mutanta 7B-1 vykazují slabší odpověď na inhibiční účinky modrého světla na klíčení semen. Tímto moje práce ukazuje, že v odolnosti mutovaných semen vůči osmotickému stresu hrají roli akvaporiny, aniž by mutovaná semena měla oproti kontrole zvýšenou expresi akvaporinu LePIP1-1.

7 LITERATURA

Agre, P., Preston, G. M., Smith, B. L., Jung, J. S., Raina, S., Moon, C., Guggino, W. B. a Nielsen, S.: Aquaporin CHIP: the archetypal molecular water channel (1993) *American Journal of Physiology*, Vol. 265 No. 4, p. F463-F476

Alleva, K., Niemetz, C. M., Sutka, M., Maurel, C., Parisi, M., Tyerman, S. D. a Amodeo, G.: Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations (2006) *Journal of Experimental Botany*, Vol. 57, Issue: 3, p. 609-621

Anderberg, H., Danielson, J., Johanson, U. a Kjellbom, P.: Characterization of the novel aquaporin subfamily XIP in *Nicotiana benthamiana* (2009) Poster: *Membrane Biology & Transport*, Abs # P38018

Atia, A., Debez, A., Barhoumi Z., Smaoui, A. a Abdelly C.: Effects of different salts and mannitol on seed imbibition, germination and ion content of *Crithmum maritimum* L. (Apiaceae) (2011) *Journal of Biological Research-Thessaloniki*, Vol. 15, p. 37-45

Bednářová, M.: Exprese auxin-binding proteinů ve fotomorfogenních mutantech rajčete v závislosti na auxinu a světle (2010) *Bakalářská práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta, Katedra buněčné biologie a genetiky*

Baiges, I. Schäffner, A. R., Affenzeller, M. J. a Mas, A.: Plant Aquaporins (2002) *Physiologia Plantarum*, Vol. 115, Issue 2, p. 175-182

Balarynová, J., Humplík, J., Kadlecova, A., Prčina, M. a Fellner, M.: Poster: Involvement of aquaporins in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) seed germination under various light conditions (2011) *Plant biology*, August 6 – 10, Minneapolis, USA

Bewley, J. D.: Seed Germination and Dormancy (1997) *The Plant Cell*, vol. 9, p. 1055-1066

Bergougoux V, Hlaváčková V, Plotzová R, Novák O, Fellner M: The 7B-1 mutation in tomato confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (2009) *Journal of Experimental Botany* Vol. 60, 1219-1230

Canamero R. C., Bakrim N., Bouly JP., Garay A., Dudkin E. E., Habricot Y., Ahmad M.: Cryptochrome photoreceptors cry1 and cry2 antagonistically regulate primary root elongation in *Arabidopsis thaliana*. (2006) *Planta*, Vol. 224, No. 5, p. 995-1003

Chaumont, F., Barrieu, F., Jung, R. a Chrispeels, M. J.: Plasma Membrane Intrinsic Proteins from Maize Cluster in Two Sequence Subgroups with Differential Aquaporin Activity (2000) *Plant Physiology*, Vol. 122 No. 4, p. 1025-1034

Chaumont, F., Moshelion, M. a Daniels, M. J.: Regulation of plant aquaporin activity (2005) *Biology of the Cell*, Vol. 97, p. 749-764

Chrispeels, M. J., Crawford, N. M. a Schroeder, J. I.: Proteins for Transport of Water and Mineral Nutrients across the Membranes of Plant Cells (1999) *The Plant Cell*, Vol. 11, p. 661-675

Devlin P. F., Kay S. A.: Cryptochromes are required for phytochrome signaling to the circadian clock but not for rhythmicity. (2000) *The Plant Cell*, Vol. 12, p. 2499-2509

Fellner, M. a Sawhney, V. K.: The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid (2002) *Planta*, Vol. 214, p. 675-682

Fellner, M. a Sawhney, V. K.: Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses (2001) *Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 102, No. 2-3, p. 215-221

Folta, K. M.: Green light stimulates early stem elongation, antagonizing light-mediated growth inhibition (2004) *Plant Physiology*, Vol. 135, p. 1407-1416

Folta, K. M. a Maruhnich, S. A.: Green light: a signal to slow down or stop (2007) *Journal of Experimental Botany*, Vol. 58, Issue 12, p. 3099-3111

Folta K. M., Spalding E. P.: Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. (2001) *The Plant Journal*, Vol. 26, Issue 5, p. 471-478

Gao, Y-P., Young, L., Bonham-Smith, P. a Gusta, L. V.: Characterization and expression of plasma and tonoplast membrane aquaporins in primed seed of *Brassica napus* during germination under stress conditions (1999) *Plant Molecular Biology*, Vol. 40, No. 4, p. 635-644

Goh, C-H.: Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling (2009) *Plant signaling and Behavior*, Vol.4, No. 8, p. 693-695

Hose, E., Steudle, E. A Hartung, W.: Abscisic acid and hydraulic conductivity of maize roots: a study using cell- and root-pressure probes (2000) *Planta*, Vol. 211, No. 6, p. 874-882

Johnson, K. D. a Chrispeels, M. J.: Tonoplast-Bound Protein Kinase Phosphorylates Tonoplast Intrinsic Protein (1992) *Plant Physiology*, Vol. 100, No. 4, p. 1787-1795

Johansson, I., Karlsson, M., Shukla, V. P., Chrispeels, M. J., Larsson, C a Kjellboma, P.: Water transport activity of the plasma membrane aquaporin PM28A is regulated by phosphorylation (1998) *The Plant Cell*, Vol. 10, p. 451-459

Johansson, I., Larsson, C., Bo Ek a Kjellboma, P.: The major integral proteins of spinach leaf plasma membranes are putative aquaporins and are phosphorylated in response to Ca^{2+} and apoplastic water potential (1996) *The Plant Cell*, Vol. 8, p. 1181-1191

Kaldenhoff, R. a Eckert, M.: Features and functions of plant aquaporins (1999) *Journal of Phytochemistry and Photobiology B: Biology*, Vol. 52, Issues 1-3, p. 1-6

Kjellbom, P., Larsson, C., Johansson, I. I., Karlsson, M. a Johanson, U.: Aquaporins and water homeostasis in plants (1999) *Trends in Plant Science*, Vol. 4, No. 8, p. 308-314

Kraepiel, Y., Rousselin, P., Sotta, B., Kerhoas, L., Einhorn, J., Caboche, M., and Miginiac, E: Analysis of phytochrome and ABA-deficient mutants suggests that ABA degradation is controlled by light in *Nicotiana plumbaginifolia* (1994). *Plant Journal*, Vol. 6, Issue 5, p. 665-672

Krishnan, P., Joshi, D.K., Nagarajan, S. a Moharir, A.V.: Characterization of germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (2004) *Seed Science Research*, Vol. 14, Issue 4, p. 355-362

Krishnan, P., Joshi, D. K., Nagarajan, S. a Moharir A. V.: Characterization of germinating and non-viable soybean seeds by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy (2004) *Seed Science Research*, Vol. 14, Issue 4, p. 355-362

Kucera, B., Cohn, M. A. a Leubner-Metzger, G.: Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination (2005) *Seed Science Research*, Vol. 15, p. 281-307

Lee, J. K., Kozno, D., Remis, J., Kitagawa, Y., Agre, P. a Stroud, R. M.: Structural basis for conductance by the archaeal aquaporin AqpM at 1.68 Å (2005) *PNAS*, Vol. 102, No. 52, p. 18932-18937

Lin Ch., Todo T.: The cryptochromes (2005) *Genome Biology*, Vol. 6, No. 5, p. 220

Lin Ch., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J., Cashmore A. R.: Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. (1998) *Plant Biology* Vol. 95, No.5, p. 2686-2690

Liscum E., Briggs W. R.: Mutations of *Arabidopsis* in potential transduction and response components of the phototropic signalling pathway. (1996) *Plant Physiology*, Vol. 112, No. 1, p. 291-296

Lovisolò, C. a Scubert, A.: Mercury hinders recovery of shoot hydraulic conductivity during grapevine rehydration: evidence from a whole-plant approach (2006) Vol. 172, Issue 3, p. 469-478

Ludevid, D., Höfte, H., Himmelblau, E. a Chrispeels, M. J.: The Expression Pattern of the Tonoplast Intrinsic Protein γ -TIP in *Arabidopsis thaliana* Is Correlated with Cell Enlargement (1992) *Plant Physiol*, Vol. 100, No. 4, p. 1633-1639

Luštinec, J. a Žárský, V.: Úvod do fyziologie vyšších rostlin (2005) Univerzita karlova v Praze, nakladatelství Karolinum, Praha

Ma L., Li J., Qu L., Hager J., Chen Z., Zhao H., Deng X. W. (2001) Light control of *Arabidopsis* development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *The Plant Cell*, Vol. 13, p. 2589-2607

MacRobbie, E. A. C: Osmotic effects on vacuolar ion release in guard cells (2006) *PNAS* Vol. 103, No. 4, p. 1135-1140

Martre, P., Morillon, R., Barrieu, F., North, G. B., Nobel, P. S. a Chrispeels, M. J.: Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit (2002) *Plant Physiology*, Vol. 130, No.4, p. 2101-2110

Maurel, C.: Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties (2007) FEBS Letters, Vol. 581, Issue 12, p. 2227-2236

Maurel, C., Verdoucq, L., Doan-Trung Luu a Santoni, V.: Plant Aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions (2008) Annual Review of Plant Biology, Vol. 59, p. 595-624

Meeuse, B. J. D: Encyclopædia Britannica Online, seed and fruit (2011)

Müller, K., Tintelnot, S. a Leubner-Metzger, G: Endosperm-limited Brassicaceae Seed Germination: Abscisic Acid Inhibits Embryo-induced Endosperm Weakening of *Lepidium sativum* (cress) and Endosperm Rupture of Cress and *Arabidopsis thaliana* (2006) Plant Cell Physiology, Vol. 47, No. 7, p. 864-877

Pettersson, N., Filipsson, C., Becit, E., Brive, L. a Hohmann, S.: Aquaporins in yeasts and filamentous fungi (2005) Biology of the Cell, Vol. 97, p. 487-500

Perrota, G., Ninu, L., Flamma, F., Weller, J. L., Kendrick, R. E., Nebuloso, E. A Giliano, G: Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2 (2000) Plant Molecular Biology, Vol. 42, No. 5, p. 765-773

Reková, A.: Využití mutantů a analýzy genové exprese pro studium interakcí cytokininů a světla v regulaci plouživého růstu hypokotylů semenáčků *Arabidopsis thaliana* (2010) *Disertační práce, Masarykova Univerzita, Přírodovědecká fakulta*

Savage, D. F. a Stroud, R. M.: Structural basis of aquaporin inhibition by Merkury (2007) Journal of Molecular Biology, Vol. 368, Issue 3, p. 607-617

Schäfer E., Nagy F.: Photomorphogenesis in Plants and Bacteria, 3rd Edition (2006) Springer, Netherlands

Schuermans, J. A. M., van Dongen, J. T., Rutjens, B. P. W., Boonman, A., Pieterse, C. M. J. a Corstlap, A. C.: Members of the aquaporin family in the developing pea seed coat include representatives of the PIP, TIP, and NIP subfamilies (2003) Plant Molecular Biology, Vol. 53, No. 5, p. 655-667

Shiota, H., Sudoh, T. a Tanaka, I.: Expression analysis of genes encoding plasma membrane aquaporins during seed and fruit development in tomato (2006) Plant Science, Vol. 171, Issue 2, p. 277-285

Smith, A. M., Coupland, G., Dolan, L., Harberd, N., Jones, J., Martin, C., Sablowski, R., Amey, A.: Plant biology (2010) 270 Madison Av., New York 10016, USA and 2 Park Square, Milton Park, Abingdon, OX14 4RN, UK

Spalding E. P., Folta K.M.: Illuminating topics in plant photobiology. (2005) Plant, Cell and Environment, Vol. 28, p. 39-53

Temmei, Y., Uchida, S., Hoshino, D., Kanzawa, N., Kuwahara, M., Sasaki, S. a Tsuchiya, T.: Water channel activities of *Mimosa pudica* plasma membrane intrinsic proteins are regulated by direct interaction and phosphorylation (2005) FEBS Letters, Vol. 579, No. 20, p. 4417-4422

Törnroth-Horsefield, S., Wang, Y., Hedfalk, K., Johanson, U., Karlsson, M., Tajkhorshid, E., Neutze, R. a Kjellbom, P.: Structural mechanism of plant aquaporin gating (2005) *Nature*, Vol. 439, p. 688-694

Vera-Estrella, R., Barkla, B. J., Bohnert, H. J. a Pantoja, O.: Novel Regulation of Aquaporins during Osmotic Stress (2004) *Plant Physiology*, Vol. 135, No.4 , p. 2318–2329.

Weitbrecht, K., Müller, K. a Leubner-Metzger, G.: First off the mark: early seed germination (2011) *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, No. 10, p. 3289–3309

Willigen, C. V., Postaire, O., Tournaire-Roux, C., Boursiac, Y., Maurel, C.: Expression and Inhibition of Aquaporins in Germinating Arabidopsis Seeds (2006) *Plant & Cell Physiology*, Vol. 47, No. 9, p. 1241-1250

Yamauchi, Y., Ogawa, M., Kuwahara, A., Hanada, A., Kamita, Y. a Yamaguchi, S.: Activation of gibberellin biosynthesis and response pathways by low temperature during imbibition of Arabidopsis seeds (2004) *Plant Cell*, Vol. 16, p. 367–378

Ye, Q., Wiera, B. a Steudle E.: A cohesion/tension mechanism explains the gating of water channels (aquaporins) in Chara internodes by high concentration . (2004) *Journal of Experimental Botany*, Vol. 55, Issue 396, p. 449-461.

Zelazny, E., Borst, J. W., Muylaert, M., Batoko, H., Hemminga, M. A. a Chaumont, F.: FRET imaging in living maize cells reveals that plasma membrane aquaporins interact to regulate their subcellular localization (2007) *PNAS*, Vol. 104, No. 30, p. 12359-12364

Zhao, C.-X., Shao, H.-B. a Chu, L.-Y.: Aquaporin structure-function relationships: Water flow through plant living cells (2007) *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, Vol. 62, Issue 2, p. 163-172

Internetové odkazy:

<http://www.aquaporin-aquaporins.com/aquaporin-structure-hourglass-model-six-transmembrane-domains/>

Krpeš, V.: Ekofyziologie rostlin, <http://katedry.osu.cz>
http://www.google.fr/url?sa=t&rct=j&q=ekofyziologie%20rostlin%20v%C3%A1clav%20krpe%C5%A1&source=web&cd=1&ved=0CB0QFjAA&url=http%3A%2F%2Fkatedry.osu.cz%2Fkbe%2Fodd_bot%2Fstahni.php%3Fco%3Dstud_mat%26id%3D95_29.pdf&ei=jbLnTpu-LMnb4QSc3-zgCA&usg=AFQjCNFu6Drr39fi7EYxWrT7sN8FAFlwLg

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
B	modré světlo
BR	brassinosteroidy
cDNA	komplementární DNA
CRY1	krytochrom 1
CRY2	krytochrom 2
CRY3	krytochrom 3
cv. Rutgers	kultivar Rutgers
D	tma
^{depc} H ₂ O	voda ošetřená diethylpyrokarbonátem
dNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
ELFO	elektroforéza
EF1	gen earliness-1
GA	kyselina gibberelová
GAPDH	gen kódující glycerinaldehyd-3-fosfát dehydrogenasu
MIP	Major Intrinsic Protein
NIP	Nodulin-26 like Intrinsic
MS médium	Murashige a Skoog médiumProtein; skupina akvaporinů
NLM	Nodulin-26 Like MIP; skupina akvaporinů
NPA motiv	sekvence aminokyselin asparagin-prolin-alanin
PCR	polymerázová řetězová reakce
PHOT1	mutant s mutací v genu, kódujícím fototropin 1
PHOT2	mutant s mutací v genu, kódujícím fototropin 2
PIP	Plasma Membrane Intrinsic Protein; skupina akvaporinů
PIP1	podskupina akvaporinů, náležející do skupiny akvaporinů PIP
PIP2	podskupina akvaporinů, náležející do skupiny akvaporinů PIP
R	červené světlo
RT-PCR	reverse-transcription PCR
SE	standard error; standardní chyba
SIP	Small basic Intrinsic Protein; skupina akvaporinů
TBE	pufr – Tris/Borát/EDTA pufr
TIP	Tonoplast Intrinsic Protein; skupina akvaporinů
α-TIP	podskupina akvaporinů, náležející do skupiny akvaporinů TIP

γ -TIP	podskupina akvaporinů, náležející do skupiny akvaporinů TIP
δ -TIP	podskupina akvaporinů, náležející do skupiny akvaporinů TIP
UVA	dlohovlnné ultrafialové záření
UVB	středněvlnné ultrafialové záření
WT	wild type
XIP	X Intrinsic Protein; skupina akvaporinů