

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Vliv světelných podmínek a teplotního stresu na
aktivaci antioxidačních mechanismů u *Solanum
lycopersicum***

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Michaela Glosová
Studijní program:	N 1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc.RNDr. Lenka Luhová PhD.
Termín odevzdání práce:	26.4.2010

„Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.“

V Olomouci dne 26.4.2010

Michaela Glosová

„Děkuji Dr. Martinu Fellnerovi za poskytnutí rostlinného materiálu, dále děkuji Mgr. Janě Piterkové a Mgr. Šárce Adámkové za rady a pomoc při zpracování mé experimentální části.

Hlavně děkuji doc. RNDr Lence Luhové za rady a připomínky, za poskytnutí velkého množství literatury, za velkou trpělivost a za čas, který konečnému zpracování diplomové práce věnovala.“

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora Bc. Michaela Glosová
Název práce Vliv světelných podmínek a teplotního stresu na aktivaci antioxidantních mechanismů u *Solanum lycopersicum*
Typ práce Diplomová
Pracoviště Katedra biochemie
Vedoucí práce doc.RNDr. Lenka Luhová PhD.
Rok obhajoby práce 2010

Abstrakt

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících vývoj rostlin zahrnující proces klíčení semen, de-etiolaci, kvetení, vývoj listu atd. Světelné signály jsou detekovány prostřednictvím fotoreceptorů, které absorbují v červené nebo v UV/modré oblasti spektra. Světelné podmínky mají vliv na zapojení obranných mechanismů v reakci rostliny vystavené vlivu biotických nebo abiotických stresových faktorů. Světlo a teplota ve spojení s působením rostlinných fytohormonů umožňují regulaci řady fyziologických dějů, jako je např. klíčení, rostlinná architektura a vývoj stonku. V experimentální části předložené práce byl studován vliv různých světelných podmínek na klíčení semen, vývoj rostliny, aktivitu zvolených antioxidantních enzymových systémů (peroxidasa, akorbátperoxidasa, superoxidodismutasa, katalasa, glutathionreduktasa), produkci fenolů, lignifikaci a produkci heat shock proteinů 70 (Hsp70) u rostlin „wild type“ a mutantu *7B-1 S. lycopersicum*. Byly detekovány významné rozdíly ve sledovaných parametrech u jednotlivých genotypů za zvolených světelných podmínek. V dalším experimentu byl porovnán vliv krátkodobého teplotního stresu na aktivitu studovaných antioxidantních mechanismů a produkci Hsp70 u obou genotypů kultivovaných za rozdílných světelných podmínek. Vysoká aktivita některých antioxidantních enzymů u mutantu *7B-1* může být spojena se zvýšenou odolností k působení abiotického stresu. Produkce Hsp70 byla výrazně zvýšená po vystavení teplotnímu stresu v obou genotypech za různých světelných podmínek. Byla pozorována možná asociace mezi produkcí Hsp70 a aktivitou antioxidantních enzymů u obou genotypů. Zvýšená hladina Hsp70 a snížená intenzita aktivity antioxidantního systému poukazuje na možnost role Hsp70 v kompenzačním mechanismu obranných procesů vůči oxidativnímu stresu.

Klíčová slova světlo, teplota, *Solanum lycopersicum*, Hsp70, antioxidantní enzym,
Počet stran 117
Počet příloh 0
Jazyk Český

Bibliographical identification:

Autor's first name and surname	Bc.Michaela Glosová
Title	The effect of light conditions and temperature stress on activation of antioxidant mechanism in <i>Solanum lycopersicum</i>
Type of thesis	Master
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc.RNDr.Lenka Luhová Ph.D.
The year of presentation	2010
Abstract	

Light is one of the most important factors that influences plant development which includes seed germination, de-etiolation, flowering, leaf development etc. Light signals are detected through photoreceptors, which absorb red/far-red or blue/UVA light. Light conditions influence the involvement of defense mechanisms found within the reaction of plants that are exposed to biotic and abiotic stress factors. The interaction of light and temperature in association with plant phytohormones enable regulation of several developmental events; such as seed germination, plant architecture, and stem development. The experimental part of this study observed the effect of divers light conditions in seed germination, development and activity of selected antioxidant enzyme systems, (peroxidase, ascorbate peroxidase, superoxide dismutase, catalase, glutathione reductase) production of phenols, lignifications and production of heat shock protein 70 (Hsp70) in "wild type" and *7B-1* mutant plants of *S. lycopersicum*. Significant differences were detected in the observed parameters of individual genotypes within chosen light conditions. In the next experiment observations were made on the influence of short term temperature stress on the activity of studied antioxidants mechanisms and production of Hsp70 in both genotypes cultivated in different light conditions. Higher activity of some antioxidant enzymes in the mutant *7B-1* can be related to the increased resistance to the abiotic stress. Production of Hsp70 was significantly increased after the exposure to temperature stress in both genotypes in different light conditions. The possible association between production of Hsp70 and the activity of antioxidant enzymes in both genotypes was observed. Increased level of Hsp70 and lowered level of intensity of activity of antioxidant systems shows possibility, that Hsp70 forms compensatory mechanism in the defence processes against oxidative stress.

Keywords	light, temperature stress, <i>Solanum lycopersicum</i> , Hsp70, antioxidant enzyme
Number of pages	117
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE:.....	4
BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION:.....	5
CÍLE PRÁCE.....	11
1 ÚVOD.....	13
2 FOTORECEPTORY.....	14
2.1 ROZDĚLENÍ FOTORECEPTORŮ.....	14
2.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA.....	15
2.2.1 Fytochromy.....	15
2.2.2 Kryptochromy.....	16
2.2.3 Fototropiny.....	17
2.3 STRUKTURA.....	18
2.3.1 Struktura fytochromů.....	18
2.3.2 Struktura kryptochromů.....	20
2.3.3 Struktura fototropinů.....	21
2.4 FUNKCE.....	22
2.4.1 Světelná aktivace fotoreceptorů.....	22
2.4.1.1 Světelná aktivace fytochromů.....	22
2.4.1.2 Světelná aktivace kryptochromů.....	25
2.4.1.3 Světelná aktivace fototropinů.....	25
2.4.2 Funkce.....	26
2.4.2.1 Fytochromy.....	26
2.5 PRINCIP PŘENOSU SIGNÁLU.....	27

2.5.1	Signalizace UV-B	29
2.5.2	Signalizace fytochromů	29
2.5.3	Signalizace kryptochromů.....	32
2.5.4.	Signalizace fototropinů.....	33
2.6	LOKALIZACE	36
2.6.1	Lokalizace fytochromů.....	36
2.6.2	Lokalizace kryptochromů	36
2.6.3	Lokalizace fototropinů	37
2.7	AUTOFOSFORYLACE A ÚLOHA KINAS	38
2.7.1	Fytochromy	38
2.7.2	Kryptochromy	39
2.7.3	Fototropiny.....	40
2.8	VLIV SVĚTELNÝCH SIGNÁLŮ NA VÝVOJ ROSTLIN.....	41
2.8.1	Klíčení.....	41
2.8.2	De-etiolace	42
2.8.3	„Shade avoidance“	43
2.8.4	Fototropismus	44
2.8.5	Vývoj listu.....	45
2.8.6	Fotoperiodická regulace kvetení	45
2.9	FOTOMORFOGENEZE	46
2.9.1.	Skotomorfogeneze	46
2.9.2.	Fotomorfogeneze	47
3	ÚLOHA FOTORECEPTORŮ V REAKCI NA STRES	47
3.1	OSMOTICKÝ STRES.....	47

3.2 VZTAH MEZI TEPLOTOU A SVĚTLEM VE VÝVOJI ROSTLINY	48
3.2.1 Teplota jako signál	48
3.2.2 Vztah mezi teplotou a světlem	48
3.3 SVĚTLO A ROSTLINNÝ PATOGEN.....	50
4 VZTAH MEZI FOTORECEPTORY A RNS A ROS.....	51
4.1 CHARAKTERISTIKA RNS	51
4.2 CHARAKTERISTIKA ROS	53
5 VZTAH SVĚTLA A HEAT SHOCK PROTEINŮ	59
6 MATERIÁL A METODY	63
6.1 CHEMIKÁLIE	63
6.2 PŘÍSTROJE A EXPERIMENTÁLNÍ VYBAVENÍ	64
6.3 ROSTLINNÝ MATERIÁL	64
6.3.1 Charakterizace použitých rostlin	64
6.3.2 Pěstování rostlin ve sterilních podmínkách	65
6.3.3 Podmínky pěstování.....	65
6.3.4 Teplotní stres	65
6.4 POUŽITÉ METODY.....	66
6.4.1 Stanovení klíčivosti.....	66
6.4.2 Stanovení základních popisných parametrů charakterizujících semenáčky	66
6.4.3 Stanovení Hsp70 a aktinu.....	66
6.4.4 Stanovení izoenzymového zastoupení peroxidas	67
6.4.5 Stanovení guajakolperoxidase aktivity (GPX).....	68
6.4.6 Stanovení askorbátperoxidase aktivity (APX).....	68
6.4.7 Stanovení aktivity syringaldazinperoxidasy (SPOX)	69

6.4.8 Stanovení aktivity katalasy (CAT).....	69
6.4.9 Stanovení aktivity superoxiddismutasy (SOD)	69
6.4.10 Stanovení aktivity glutathionreduktasy (GR)	71
6.4.11. Stanovení lipidické peroxidace.....	71
6.4.12 Stanovení volných fenolů.....	72
6.4.13 Stanovení obsahu ligninu.....	73
7 VÝSLEDKY	74
7.1 STUDIUM VLIVU SVĚTELNÝCH PODMÍNEK.....	74
7.1.1 Vliv světelných podmínek na klíčivost semen	74
7.1.2 Vliv světelných podmínek na vývoj rostlin	75
7.1.3 Vliv světelných podmínek na aktivaci antioxidačních mechanismů	78
7.1.3.1 Vliv světelných podmínek na GPX aktivitu	79
7.1.3.2 Vliv světelných podmínek na CAT aktivitu	80
7.1.3.3 Vliv světelných podmínek na APX aktivitu	81
7.1.3.4 Vliv světelných podmínek na SOD aktivitu.....	81
7.1.3.5 Vliv světelných podmínek na GR aktivitu	82
7.1.3.6 Vliv světelných podmínek na produkci volných fenolů	83
7.1.3.7 Vliv světelných podmínek na intenzitu lipidické peroxidace.....	83
7.1.4 Vliv světelných podmínek na produkci Hsp70	84
7.1.5 Vliv světelných podmínek na syntézu ligninu	85
7.1.5.1. Vliv světelných podmínek na SPOX aktivitu	85
7.1.5.2. Vliv světelných podmínek na syntézu ligninu.....	85
7.2 STUDIUM VLIVU TEPLOTNÍHO STRESU.....	86
7.2.1 Vliv teplotního stresu na produkci Hsp70.....	86

7.2.2	Vliv teplotního stresu na produkci aktinu.....	87
7.2.3	Vliv teplotního stresu na antioxidantní systémy	88
7.2.3.1	Vliv teplotního stresu na GPX aktivitu	88
7.2.3.2	Vliv teplotního stresu na CAT aktivitu.....	90
7.2.3.3	Vliv teplotního stresu na APOX aktivitu.....	90
7.2.3.4	Vliv teplotního stresu na SOD aktivitu	91
7.2.3.5	Vliv teplotního stresu na GR aktivitu.....	92
7.2.3.6	Vliv teplotního stresu na produkci volných fenolů.....	92
7.2.3.7	Vliv teplotního stresu na intenzitu lipidické peroxidace	93
7.2.4	Vliv teplotního stresu na produkci ligninu.....	94
7.2.4.1	Vliv teplotního stresu na SPOX aktivitu	94
7.2.4.2	Vliv teplotního stresu na lignifikaci	94
8	DISKUZE	95
8.1	VLIV SVĚTELNÝCH PODMÍNEK.....	95
8.1.1	Vliv světla na klíčivost a vývoj rostliny	95
8.1.2	Vliv světla na antioxidantní systémy	98
8.1.3	Vliv světla na produkci Hsp70.....	102
8.1.4	Vliv světla na produkci aktinu	103
8.1.5	Vliv světla na lignifikaci	103
8.2	VLIV TEPLOTNÍHO STRESU ZA RŮZNÝCH SVĚTELNÝCH PODMÍNEK	104
	ZÁVĚR.....	108
	LITERATURA.....	109
	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	116

CÍLE PRÁCE

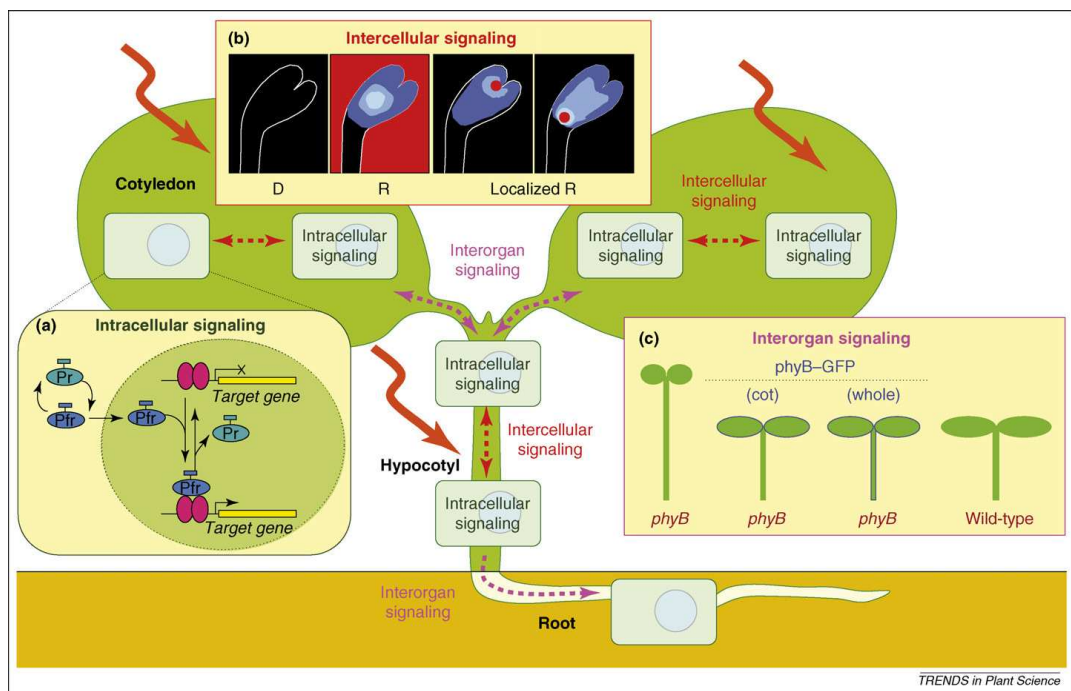
Cílem teoretické části bylo vypracování literární rešerše na téma: rostlinné fotoreceptory a jejich charakteristika (struktura, funkce, přenos signálu, autofosforylace) a role ve vývoji rostlin. Dále byla zahrnuta role fotoreceptorů v reakci na abiotický a biotický stres. V poslední řadě bylo popsáno spojení teploty a světelného signálu v regulaci rostlinných vývojových procesů a produkci proteinů Hsp70.

Hlavním cílem experimentální části bylo stanovení úrovně aktivity antioxidantních systémů u semenáčků WT a *7B-1 S.lycopersicum* a porovnání reakcí obou genotypů na teplotní stres na úrovni aktivace antioxidantních mechanismů. Dále byl studován vliv světelných podmínek na klíčení a vývoj, produkci aktinu, Hsp70 a hladinu lignifikace u *S.lycopersicum*.

TEORETICKÁ ČÁST

1 ÚVOD

Rostliny jsou fototrofní organismy pevně zakotvené v půdě, proto si vyvinuly mimořádný stupeň vývojové plasticity k optimalizování jejich růstu a reprodukci v odpovědi na měnící se okolní podmínky (Pavlová & Daněk, 2002; Sullivan & Deng, 2003). Mezi nejvýznamnější faktory ovlivňující rostlinný vývoj patří světlo (Franklin et al., 2005). Rostliny si vytvořily během evoluce složité mechanismy k vnímání kvality, kvantity, směru, doby světla a zpracování těchto signálů v následné fyziologické a vývojové odpovědi (Sullivan & Deng, 2003). Světelná signalizace v rostlinách zahrnuje děje od světelné detekce vedoucí ke změně genové exprese až k objevení měřitelných růstových a vývojových změn. Ve smyslu celé rostliny byla identifikována intracelulární a intercelulární signalizace (Bou-Torrent et al., 2008) (Obr.1).



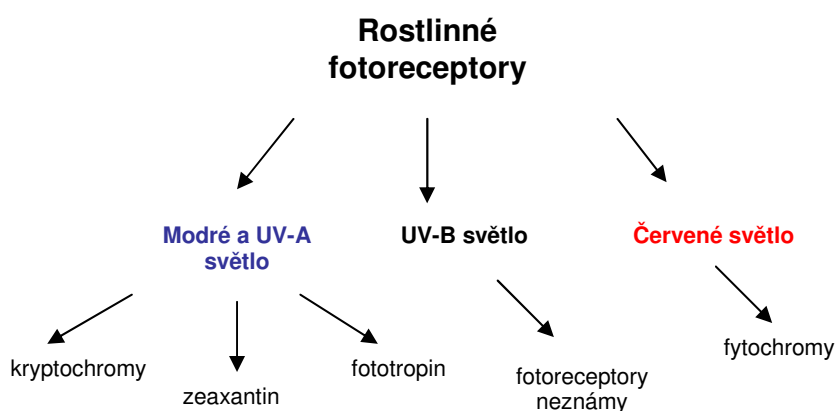
Obr.1 Model reprezentující síť interakcí probíhající po detekci světelného signálu v celé rostlině (červené šipky). (a) Zachycení signálu zahajuje signalizaci uvnitř buněk orgánů (intracelulární signalizace) prostřednictvím modulační sítě, která se může v rámci různých buněk a orgánů lišit (b) Intercelulární signalizace zahrnuje detekci změn vývoje a růstu v buňkách a tkáních, které nebyly vystaveny světelnému signálu a které si vytvářejí odpověď na tento signál. Světlo-stimulující buňky produkují signál (tečkované šipky), který se může šířit do (b) sousedních buněk (intercelulární signalizace) nebo (c) vzdálených orgánů (interorganová signalizace) (převzato z Bou-Torrent et al., 2008).

2 FOTORECEPTORY

Rostliny jsou během svého života vystaveny působení celé řady vnějších signálů. Během evoluce byl vyvinut složitý systém receptorů a signálních transdukčních drah, které tvoří odpovídající reakci na tyto signály. Vytvořený systém umožňuje přizpůsobit růst a vývoj rostlin daným podmínkám a zvyšuje možnost reprodukce a přežití rostlinného organismu. Mezi hlavní faktory ovlivňující růst a vývoj rostlin patří světlo, které neslouží jen jako primární zdroj energie pro fotosyntézu, ale také jako pozitivní informace pro modulování mnoha rostlinných vývojových procesů: klíčení, de-etiolace, růst listů, elongace stonku, otvírání průduchů, přemístění chloroplastů a zahájení kvetení. Jednotlivé typy fotoreceptorů jsou charakterizovány a dále děleny na základě schopnosti interagovat se světlem o určité vlnové délce (Briggs & Olney, 2001; Sullivan & Deng, 2003; Wang, 2005).

2.1 ROZDĚLENÍ FOTORECEPTORŮ

Fotoreceptory se podle části spektra, ve které absorbují světlo, dělí na tři základní skupiny: fotoreceptory červeného, modrého/UV-A a UV-B světla (Obr.2). Do první skupiny patří fytochromy, které odpovídají za absorpci červeného světla ($\lambda = 600-750$ nm). Do skupiny detekující modré a UV-A světlo ($\lambda = 320-500$ nm) se řadí kryptochromy, fototropin a zeaxantin. Fotoreceptor UV-B světla ($\lambda = 282-320$ nm) nebyl dosud identifikován. Mezi fotoreceptory je možné zařadit i chimerní typ – fytochrom 3 (phy3), který se strukturně podobá fytochromům a fototropinu (Briggs & Olney, 2001; Sullivan & Deng, 2003; Wang, 2005; Taiz & Zeiger, 2006).

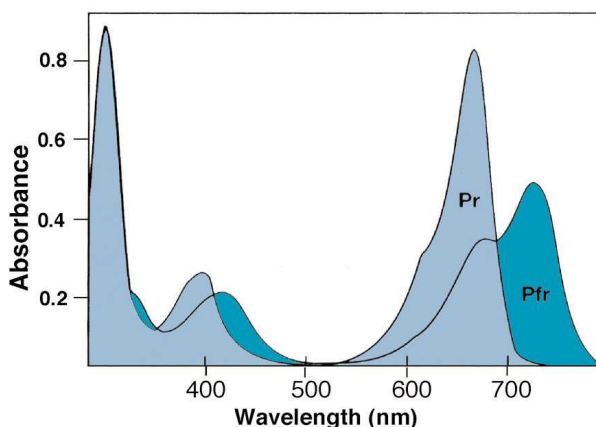


Obr.2 Schéma rozdělení rostlinných fotoreceptorů (převzato ze Sullivan & Deng, 2003; Taiz & Zeiger, 2006).

2.2 ZÁKLADNÍ CHARAKTERISTIKA

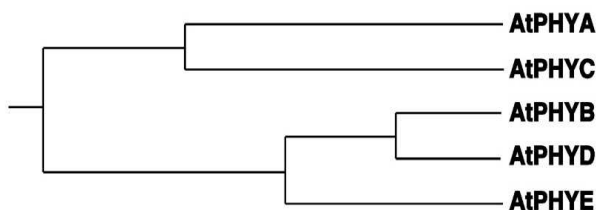
2.2.1 Fytochromy

Fytochromy tvořící skupinu fotoreceptorů, která zachycuje blízké (R) a daleké červené (FR) světlo v rozsahu $\lambda = 600$ až 750 nm, se nachází u vyšších rostlin a ve fotosyntetických a nefotosyntetických bakteriích, řasách, houbách a nižších rostlinách. Tyto fotoreceptory se podílí na regulaci celé řady rostlinných procesů jako je klíčení, de-etiolace, komplex odpovědí zvaný vyhnutí se zastínění („shade avoidance“), kvetení apod. (Falciatore & Bowler, 2005; Sullivan & Deng, 2003). Fytochromy mají dvě fotoreverzibilní formy, které se mezi sebou přepínají: Pr - forma absorbující červené světlo (R) maximálně při 660 nm a Pfr - forma absorbující dlouhovlnné červené světlo (FR) maximálně při 730 nm (Wang, 2005). Absorpční spektrum obou forem je znázorněno na obr.3.



Obr.3 Absorpční spektrum dvou fytochromových reverzibilních forem: Pr (absorpční maximum při 660 nm) a Pfr (absorpční maximum při 730 nm) (převzato z Wang and Deng, 2002).

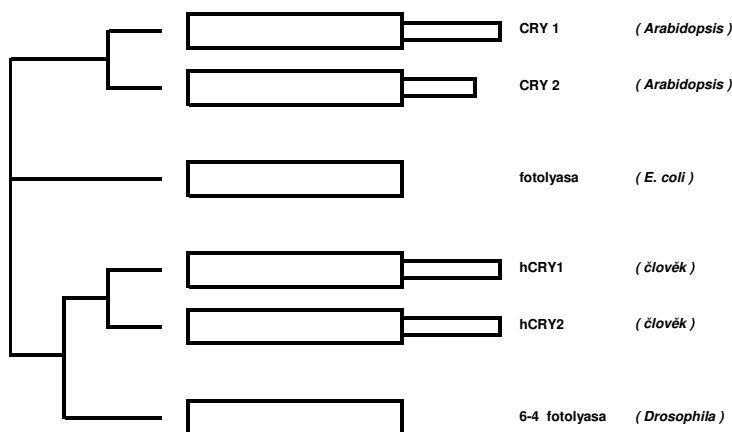
V *Arabidopsis thaliana* bylo detekováno pět fytochromů (phyA-phyE), které kódují pět různých členů fytochromové genové rodiny (PHYA-PHYE) (Wang, 2005). Fylogenetická analýza sekvencí fytochromových genů (PHY) z *A. thaliana* ukazuje, že během vývoje těchto genů proběhly čtyři duplikační kroky, při kterých se jednotlivé geny osamostatnily (Deng & Wang, 2002; Smith 2000) (Obr.4).



Obr.4 Fylogenetický strom pěti fytochromových genů z *A. thaliana*. První duplikace zahrnuje tvorbu linií PHYA/C a PHYB/D/E. Další dvě duplikace způsobují separaci PHYA od PHYC a PHYB/D od PHYE. Při poslední divergenci, která proběhla mnohem později, se oddělily PHYB od PHYD. PHYB a PHYD sdílí 80 % aminokyselinové sekvence a tvoří větev genové rodiny. Samotný PHYE, PHYA a PHYC tvoří dvě další větve rodinného evolučního stromu (převzato z Deng & Wang, 2002, Smith, 2000).

2.2.2 Kryptochromy

Kryptochromy, receptory detekující modré a UV světlo v oblasti $\lambda = 320-500$ nm se vyskytují u rostlin např. řasy, kapradiny, mechy, krytosemenné rostliny (Wang, 2005). Tyto fotoreceptory se podílejí na regulaci některých rostlinných procesů, jako je např. de-etiolace, cirkadiální hodiny, kvetení atd. (Sullivan & Deng, 2003). Absorpční spektrum kryptochromů tvoří dva píky v oblasti UV-A ($\lambda = 320-400$ nm) a v oblasti modrého světla ($\lambda = 400-500$ nm). Kryptochromy jsou vysoce příbuzné s prokaryotickými DNA fotolyasami, patří do kryptochromové/fotolyasové genové rodiny (Obr.5). DNA fotolyasy, enzymy opravující poškození DNA způsobené UV-B zářením, jsou indukovány UV-A a modrým světlem. Kryptochromy a DNA fotolyasy se liší v proteinové struktuře. Kryptochromy nevlastní fotolyasovou aktivitu a fotolyasy fotoreceptorovou funkci kryptochromů.



Obr.5 Schéma evoluční příbuznosti kryptochromů a fotolyas. Schéma ukazuje relativní evoluční příbuznost rostlinných a živočišných kryptochromů s fotolyasami typu I (*E.coli*) a 6-4 (*Drosophila*) (převzato a upraveno z Ahmad, 1999).

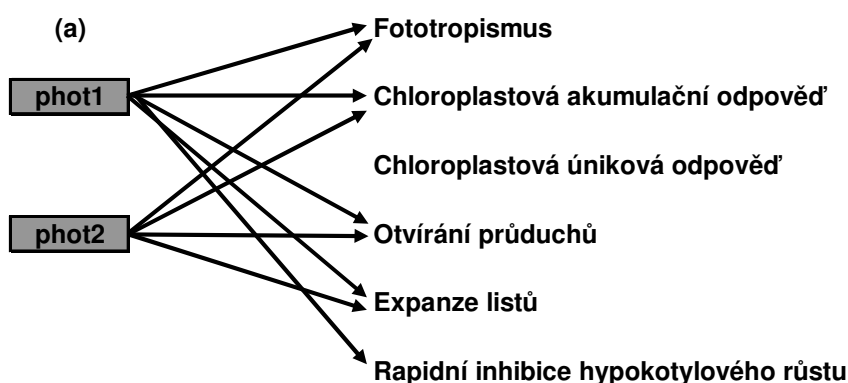
Modelový organismus *A. thaliana* obsahuje 3 kryptochromové geny: CRY1, CRY2 a CRY3. První dva geny se účastní odpovědi související s de-etiolací (elongace

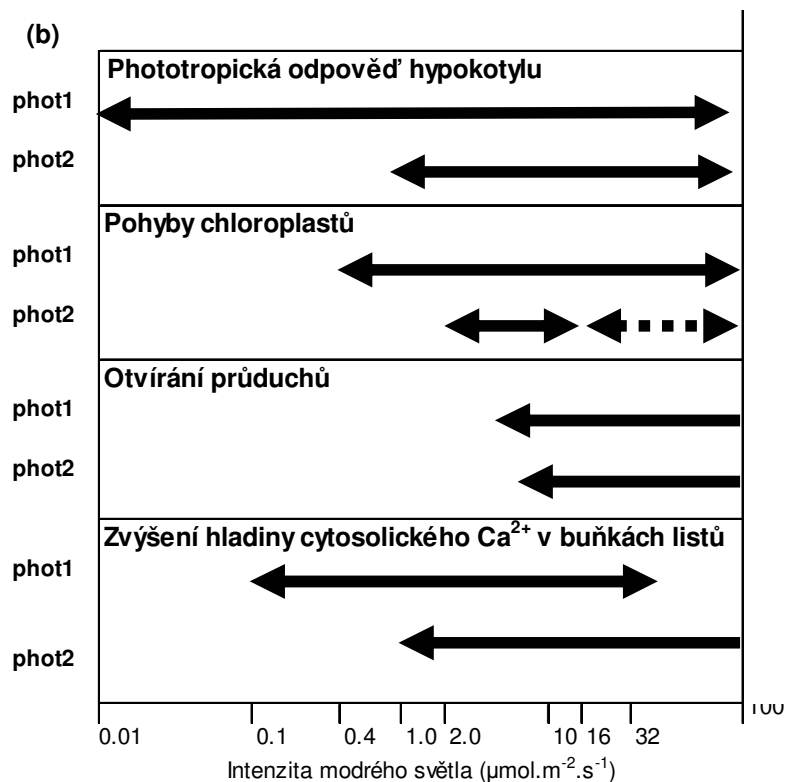
hypokotyly, expanze kotyledonů a akumulace anthokyaninu) a s dobou kvetení. CRY3 se od prvních dvou (CRY1 a CRY2) strukturně liší.

Krytochrom 3 z *A. thaliana* (At-cry3) patří do Cry-DASH (zkratka pochází z latinských názvů: *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis* a *Human*) krytochromové podrodiny a je blízce příbuzný s krytochromem Cry-DASH pocházející z kyanobakterie *Synechocystis*, který funguje jako transkripční faktor. Funkce genu CRY3 není dosud známa (Falciatore & Bowler, 2005; Li & Yang, 2007; Wang, 2005).

2.2.3 Fototropiny

Fototropiny jsou receptory, které absorbují světlo v modré ($\lambda = 390-500$ nm) a UV-A ($\lambda = 320-390$) oblasti. Absorpční spektra fototropinu vykazují velký a malý pík v modré oblasti spektra ($\lambda = 450$ a 470 nm) a široký absorpční band v UV-A oblasti ($\lambda = 365$ nm) (Briggs & Christie, 2002). Fototropiny byly nalezeny v řadě vyšších (huseniček, oves, rýže, hrách) a nižších rostlin (kaprady, mechy). Tyto fotoreceptory kontrolují řadu rostlinných dějů, jako je fototropismus, světlem indukované otvírání průduchů a pohyb chloroplastů v odpovědi na změnu světelné intenzity, které slouží k optimalizaci účinnosti fotosyntézy u rostlin (Briggs & Christie, 2002; Wang, 2005) (Obr.6a). *A. thaliana* obsahuje dva strukturně příbuzné fototropinové proteiny phot1 a phot2, jejichž funkce se v jednotlivých procesech může lišit nebo překrývat (Briggs & Christie, 2002; Christie, 2007; Wang, 2005). phot1 a 2 ukazují u *A.thaliana* různou citlivost k modrému světlu při různých dějích (Harada & Shimazaki, 2007) (Obr.6b).





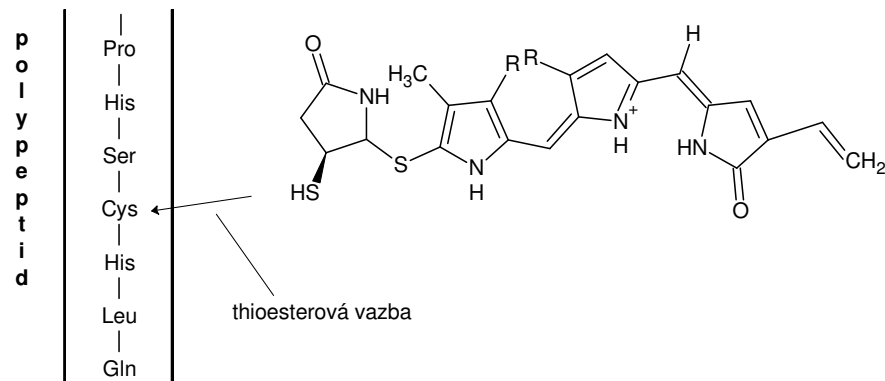
Obr.6 Funkce a fotosenzitivita phot1 a phot2 z *A.thaliana*. (a) Funkce phot1 a phot2 v pohybu a růstu rostliny: phot1 reguluje rapidní inhibici růstu hypokotylu, zatímco phot2 ne. (b) Fotosenzitivita phot1 a 2 v indukci fototropismu, pohybu chloroplastů, otvírání průduchů a zvýšení hladiny cytosolického Ca^{2+} . phot1 působí v širokém rozmezí intenzity modrého světla, u fototropismu od 0,01 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a u akumulace chloroplastů od 0,4 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. phot2 potřebuje vyšší intenzitu, u fototropismu od 1 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a u akumulace chloroplastů od 2 do 16 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. phot2 sám zprostředkovává chloroplastovou únikovou odpověď za světla v mezofylových buňkách o intenzitě od 32 do 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Ve svěracích buňkách oba fototropiny spolupracují na regulaci otvírání průduchů, kde má phot1 vyšší světelnou senzitivitu než phot2. phot1 a 2 jsou také zahrnuti v expanzi listů, kde je phot1 mnohem citlivější než phot2. Pozn. Šipky u pohybu chloroplastů ukazují chloroplastovou akumulární odpověď a přerušované šipky chloroplastovou únikovou odpověď (převzato a upraveno z Harada & Shimazaki, 2007).

2.3 STRUKTURA

2.3.1 Struktura fytochromů

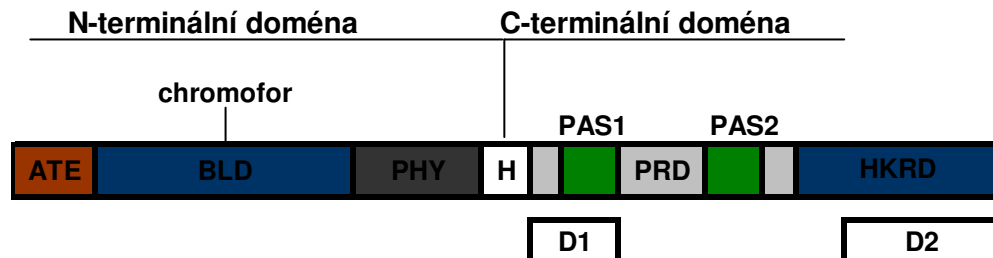
Fytochromy jsou dimerní rozpustné chromoproteiny skládající se ze dvou polypeptidů (cca 125 kDa), ke kterým je kovalentně připojený lineární tetrapyrrolový chromofor fytochromobilin syntetizovaný v chloroplastu z hemu (Obr.7).

chromofor: fytochromobilin



Obr.7 Struktura molekuly fytochromu. Chromofor se thioesterovou vazbou váže k cysteinovému residuu ve fytochromovém polypeptidu (převzato a upraveno z Taiz & Zeiger, 2006).

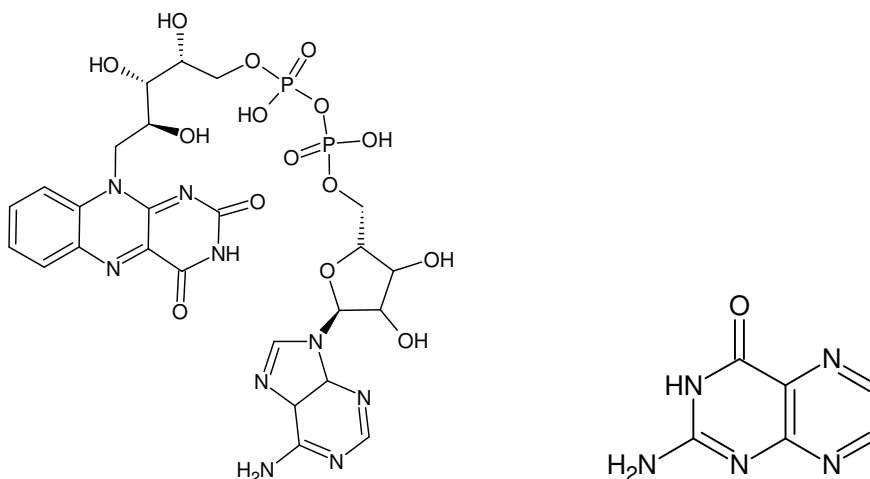
Fytochromové apoproteiny jsou syntetizovány v cytosolu, kde jsou autokatalyticky uspořádány s tetrapyrrolovým chromoforem fytochromobilinem (Obr. 16). Monomer fytochromu se skládá ze dvou strukturálních domén: globulární N – terminální fotosenzorové domény (cca 70 kDa) a více lineární C-terminální domény, která se podílí na dimerizaci a přenosu signálu (cca 55 kDa) (Chen at al. 2004, Smith 2000; Wang, 2005) (Obr.8).



Obr. 8 Strukturní mapa fytochromu. N-terminální fotosenzorová doména a C-terminální regulační doména jsou spojeny pružným regionem (H). N-terminální doména u všech fytochromů (A-E) je vysoce konzervovaná a dělí se do tří regionů: aminokoncové rozšíření (ATE; asi 6-10 kDa), centrální bilinylasová doména (BLD, asi 40 kDa) a phy doména (asi 20 kDa). BLD doména obsahuje konzervovaná cysteinové residua, které tvoří thioesterovou vazbu s A cyklem chromoforu fytochromobilinu. C-terminální doména je členěna na dvě poddomény: PAS-příbuzná doména (PRD) obsahující dvě PAS domény (PAS-1 a PAS-2) a histidin kinasa-příbuzná doména (HKRD). V C-terminální polovině molekuly jsou lokalizovány dva předpokládané dimerizační motivy (D1 a D2) (převzato a upraveno z Chen et al., 2004; Wang, 2005).

2.3.2 Struktura kryptochromů

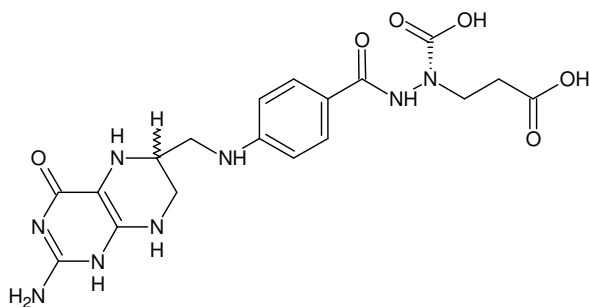
Kryptochromy jsou chromoproteiny (cry) tvořené apoproteinem a dvěma chromofory, flavinadenindinukleotidem (FAD), (Obr.9) a pterinem (Obr.10) nebo deazaflavinem, které se k proteinu vážou nekovalentní vazbou. Za redoxních podmínek tvoří FAD při reakci s cry1 stabilní meziprodukt flavosemichinon, který absorbuje v zelené části spektra (Chen et al.,2004; Briggs & Christie, 2009).



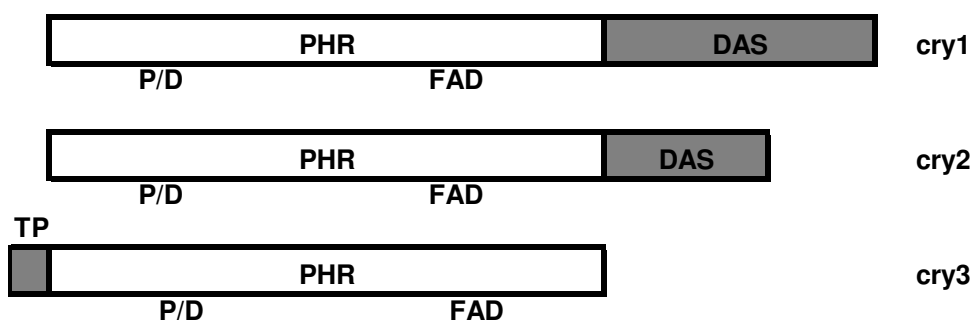
Obr. 9 Struktura flavinadenindinukleotidu (FAD) Obr. 10 Struktura pterinu

U *A. thaliana* byly nalezeny dva kryptochromy (cry1 a cry2), které jsou v rostlinách po celou ontogenesi na světle i ve tmě, ve všech částech rostliny včetně kořenů, květů a plodů. Apoprotein cry1 je rozpustný protein tvořený 681 aminokyselinovými zbytky, apoprotein cry2 je tvořen 612 aminokyselinovými zbytky. N-terminální doména kryptochromů *A. thaliana* je sekvenčně příbuzná s DNA fotolyasami (PHR) a zodpovídá za vázání chromoforu a za světlo-absorbující kapacitu. C-terminální doména je důležitá pro funkci fotoreceptoru (Pavlová & Daněk, 2002; Wang, 2005) (Obr.12).

Cry3 z *A. thaliana* se skládá z PHR domény a z N-terminální domény, která obsahuje transportní peptid zprostředkovávající import do chloroplastů a mitochondrií. PHR doména obsahuje vazebná místa pro dva nekovalentně se vážící chromofory: katalytický FAD a methyltetrahydrofolát (MTHF) (Obr.11), který umožňuje zachycení světelného signálu na receptor (Huang et al., 2006; Chen et al., 2004).



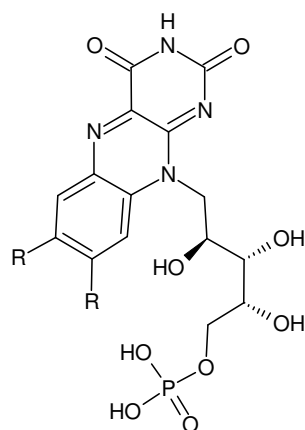
Obr.11 Struktura 5-methyltetrahydrofolátu (MTHF)



Obr.12 Strukturní mapa všech tří typů kryptochromů. Kryptochromy mají fotolyasovou homologní oblast, na kterou se váží chromofory FAD a pterin nebo deazaflavin (P/D). cry1 a cry2 mají krátké C-terminální domény s nízkým stupně konzervace kromě krátkých homologních úseků (DAS). cry3 má transportní peptid (TP), který je potřebný pro lokalizaci do chloroplastu a mitochondrií (převzato a upraveno z Chen et al., 2004).

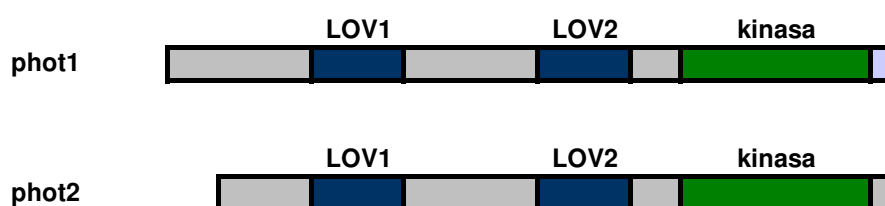
2.3.3 Struktura fototropinů

Fototropiny (phot) jsou flavoproteiny nepříbuzné kryptochromům ani fotolyasám. Fototropiny mají N-terminální fotosenzorovou doménu a C-terminální serin-threonin kinasovou doménu (Obr.14). N-terminální fotosenzorová doména obsahuje dva velmi podobné regiony (cca 110 AMK) LOV1 a LOV2, které na sebe vážou molekulu chromoforu flavinmononukleotidu (FMN) (Christie & Briggs & 2009; Christie, 2007; Wang, 2005) (Obr.13).



Obr.13 Struktura flavinmononukleotidu (FMN)

LOV domény patří do velké proteinové rodiny PAS (proteiny: Per, ARNT, Sim), která je regulována vnějšími faktory jako je světlo, kyslík a napětí, podle toho vznikla zkratka LOV (light, oxygen, voltage). LOV domény fungují jako senzory modrého světla, které prochází uzavřeným fotocyklem (Briggs & Christie, 2009; Christie, 2007; Wang, 2005). Struktura LOV1 a LOV2 je téměř identická a zahrnuje 5 antiparalerních β -řetězců propojených dvěma α -helixy (Christie, 2007).



Obr.14 Proteinové struktury fototropinů (phot1, phot2). LOV domény jsou znázorněny modře a kinasové domény, které katalyzují fosforylaci proteinů zeleně. phot1 a phot2 jsou sekvenčně velmi podobné (převzato a upraveno z Briggs & Christie, 2002).

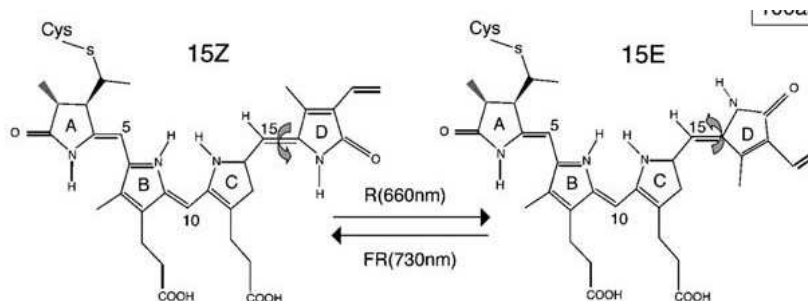
2.4 FUNKCE

2.4.1 Světelná aktivace fotoreceptorů

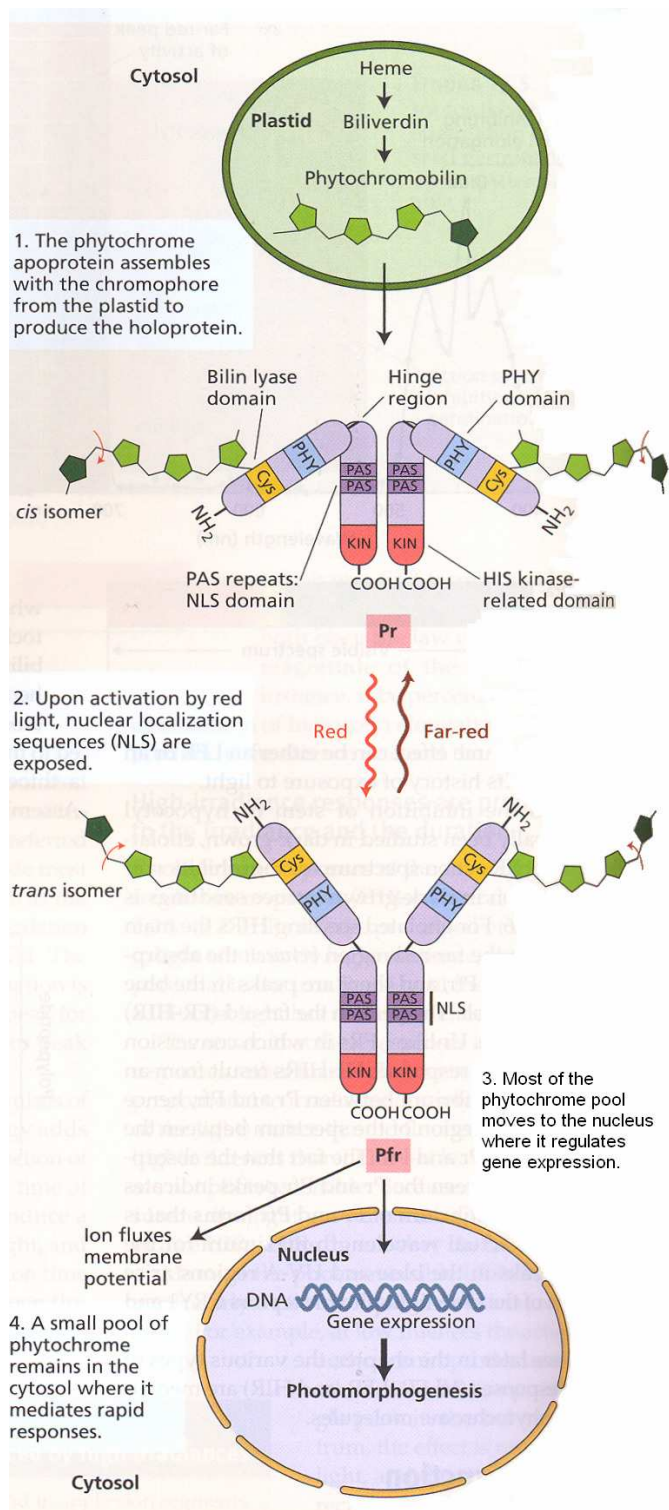
2.4.1.1 Světelná aktivace fytochromů

Fytochromy mají dvě relativně stabilní, spektrálně se lišící formy Pr a Pfr. Po absorpci červeného světla (R) dochází k přeměně biologicky neaktivní formy Pr na biologicky aktivní formu Pfr, která se může vrátit do původní formy po absorpci dlouhovlnného červeného světla (FR) (Obr.16). Tato světelná přeměna je spuštěna

změnou konfigurace mezi fytochromobilinovými izomery 15Z a 15E (Obr.15). Při fotoreverzibilní reakci se v obou směrech reakce tvoří přechodné formy fytochromů, kde po ozáření denním světlem dochází po několika minutách k vytvoření rovnováhy mezi Pr a Pfr (Smith, 2000; Sullivan & Deng, 2003; Wang, 2005).



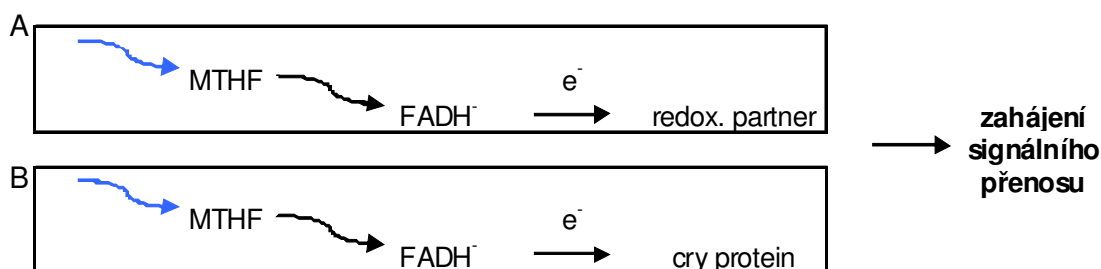
Obr.15 Fotoreverzibilní reakce Pr a Pfr formy fytochromů. Po expozici blízkým červeným světlem dochází na chromoforu k přeměně izomeru Z na izomer E mezi C a D kruhem na dvojně vazbě C-15, která způsobí konformační změnu v apoproteinu. V důsledku této změny dochází k tvorbě Pfr formy fytochromu (převzato z Chen et al, 2004; Wang & Deng, 2002).



Obr.16 Schéma syntézy a aktivace fytochromu. (1). Molekula fytochromobilinu je transportována z plastidu do cytoplasmy, kde se spojuje s fytochromovým apoproteinem za vzniku holoproteinu fytochromu. (2). Po aktivaci je Pfr forma s pomocí jaderných lokalizačních sekvencí (NLS) transportována do jádra, kde reguluje genovou expresi. (3). Většina molekul Pfr se stěhuje do jádra, ale malé množství zůstává v cytosolu, kde reguluje biochemické procesy (4). (převzato z Taiz & Zeiger, 2006).

2.4.1.2 Světelná aktivace kryptochromů

Kryptochromy jsou strukturně blízké fotolyasám, proto jejich aktivace probíhá prostřednictvím světlem-řízené redoxní reakce. Existují dva modely principu této reakce: intermolekulární a intramolekulární reakční model, jehož funkce byla na základě genetických experimentů prokázána (Obr. 17) (Wang, 2005).

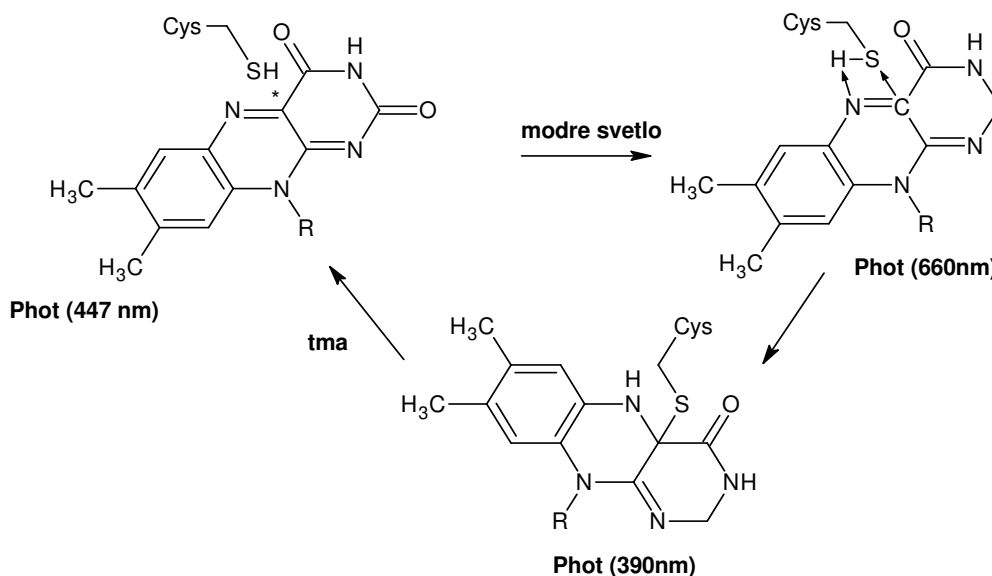


Obr.17 Dva modely znázorňující aktivaci funkce kryptochromu. (A). Intermolekulární model: MTHF absorbuje díky své excitační energii foton, který se dále přenáší ke katalytickému chromoforu FADH⁻. Excitovaný FADH⁻ uvolňuje elektron, který se dostává k předpokládanému redoxnímu partnerovi a tím zahájí kryptochromovou signalizaci. (B). Intramolekulární model ukazuje stejnou reakci jako předchozí model, liší se v tom, že elektron uvolněný z FADH⁻ reaguje s aminokyselinovým zbytkem v proteinu kryptochromu a tím dochází ke spuštění signální kaskády (převzato z Wang, 2005).

2.4.1.3 Světelná aktivace fototropinů

Světelná aktivace fototropinu je založena na cyklu fotochemických reakcí, které po absorpci UV/modrého světla vedou ke vzniku kovalentního komplexu mezi chromoforem FMN a aminokyselinovým zbytkem cysteinu (Obr.18) (Briggs & Christie, 2009).

Na aktivaci LOV domén se dále podílí amfipatický α -helix (20 AMK), který se nachází ve vnitřní straně LOV domény. Tento helix se spojuje s jádrem LOV domény a světlem vyvolaná tvorba cysteinyl-flavinového komplexu spouští několik strukturálních změn v doméně vedoucích k odtržení tohoto helixu a následné aktivaci C-proteinkinásové domény phot a přenosu signálu (Wang, 2005) (fosforylace) (Obr.29).



Obr.18 Schéma fotocyklu LOV domény fototropinu. Absorpce UV/modrého světla excituje FMN způsobující protonaci N5 atomu isoalloxazinového kruhu díky odštěpení protonu z konzervovaného Cys v LOV doméně polypeptidu. Tato protonace spouští reakci thiolátu na atomu uhlíku (*), vedoucí k tvorbě cysteinyl-flavinového komplexu, který může být ve tmě přeměněn zpět do základního stavu. Jednotlivé komponenty tohoto cyklu se liší spektrálními vlastnostmi, tzn. že neaktivní forma fototropinu maximálně absorbuje ve tmě při 447 nm, aktivní forma při 390 nm a meziprodukt reakce při 660 nm na světle (převzato a upraveno z Christie, 2007; Wang, 2005).

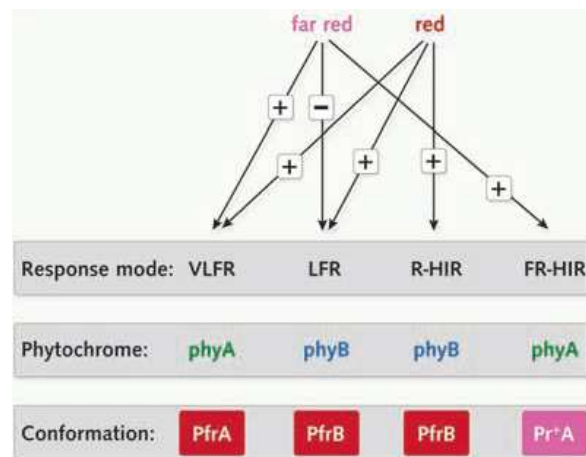
2.4.2 Funkce

2.4.2.1 Fytochromy

Fytochromy se na základě světelné stability dělí do dvou skupin. Typ I – světelně labilní fytochromy, mezi které patří phyA, se po vystavení červenému nebo bílému světlu rozpadají. Fytochromy II. typu jsou světelně stabilní a patří k nim fytochromy phyB-E (Sullivan & Deng, 2003).

Fytochromy jsou zodpovědné za řadu reakcí (odpovědí), které mohou být na základě vlnové délky a intenzity světla potřebné k aktivaci odpovědi rozděleny do několika módů: velmi málo intenzivní (VLFRs), málo intenzivní (LFRs) a vysoce intenzivní (HIR) odpovědi (Falciatore & Bowler, 2002) (Obr.19). Velmi málo intenzivní odpovědi jsou zprostředkovány phyA a začínají už při intenzitě světla $0,0001 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ a vrcholí při $0,05 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. Tyto odpovědi neukazují typickou fotoreverzibilitu R/FR a podílí se hlavně na regulaci klíčení semen. Málo intenzivní odpovědi jsou zprostředkovány fytochromy stabilními ve formě Pfr, tzn. phyB, C, D a E. Pro zahájení

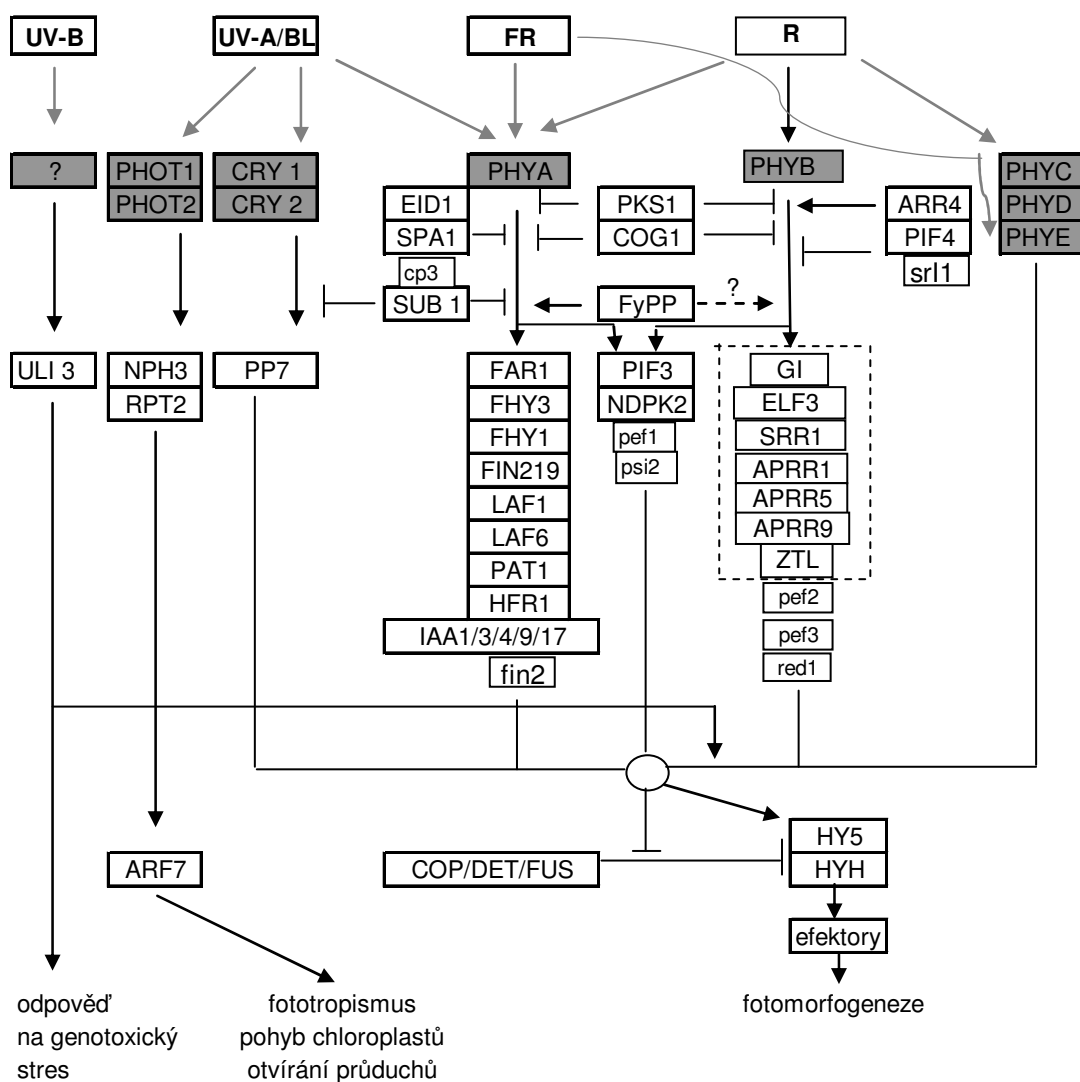
LFR je potřeba intenzita $1.0 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$ a pro saturaci $1000 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}$. Tyto odpovědi jsou typické velkou reverzibilitou R/FR a podílí se na regulaci dějů např. klíčení a pohyb listů. Oba typy odpovědí vyvolávají pouze krátké pulsy světla, zatímco HIR potřebují dlouhotrvající nebo vytrvalé vystavení světelnému záření s vysokou energií. Intenzita záření potřebná k maximální HIR je 100 x vyšší než u LFR. Tato odpověď se účastní elongace hypokotylu a kvetení. Při vysoce intenzivní odpovědi R a FR světlo působí v opačném směru a je detekováno dvěma fotoreceptory phyA a phyB. HIR odpovědi se proto mohou dále dělit na odpovědi k blízkému (R-HIR) a dalekému červenému světlu (FR-HIR) (Taiz & Zeiger, 2006; Franklin et al., 2005; Schafer & Bowler, 2002; Shinomura et al., 2000). Na základě genetické analýzy bylo zjištěno, že různé receptory můžou zprostředkovávat různé odpovědi (Obr.19) (Falciaiore & Bowler, 2005).



Obr.19 Módy odpovědi fytochromů. Různé módy fytochromové odpovědi. Na schématu je ukázán vliv R a FR světla na každý mód, které spolu s fytochromy zprostředkovávají počáteční odpověď (převzato z Bowler & Schafer, 2002).

2.5 PRINCIP PŘENOSU SIGNÁLU

Receptory aktivované světlem zahajují šíření signálu, které vede k přechodné nebo trvalé fyziologické odpovědi. Genetický výzkum mutantů ukazuje na přítomnost světlo-signalizujících proteinů, které se řadí do dvou tříd. První třída těchto proteinů je součástí skupiny COP/DET/FUS proteinů regulující proces fotomorfogeneze za tmy. COP/DET/FUS proteiny jsou považovány za negativní regulátory fotomorfogeneze. Druhá třída zahrnuje světlo-signalizující proteiny vyvíjející se normálně ve tmě, zatímco na světle ovlivňují světelné signály detekované specifickými fotoreceptory. Komplexní regulační síť různých fotoreceptorů s potenciálními světlo-signalizujícími meziprodukty je znázorněna na obr. 20 (Gyula et. al., 2003).



Obr.20 Schéma signální sítě různých typů fotoreceptorů. UV-B je absorbováno neidentifikovanými receptory a vyvolává obranné odpovědi vedoucí k poškození DNA a ovlivňuje fotomorfogenezi zesilujícími PHYB-specifickými reakcemi. ULI3 je jednou ze signálních komponent zprostředkovávající tyto odpovědi. UV-A/modrá (BL) část spektra je monitorována pomocí fototropinů (phot), kryptochromů (cry) a fytochromu A (phyA). Fototropiny regulují fototropismus a intracelulární pohyb chloroplastů. Kryptochromy zachycují signál pro modré světlo-indukující odpovědi fotomorfogeneze. phyA (částečně i phyE) odpovídá na kontinuální daleké červené a vysoce slabé intenzivní červené a modré světlo, zatímco phyB-E zachycují kontinuální červené světlo. Signály od různých fotoreceptorů jsou spojeny komplexní regulační sítí, která inhibuje aktivitu proteinové třídy COP/DET/FUS a indukuje expresi transkripčních faktorů HY5 a HY5 HOMOLOGUE (HYH). Cirkadiální hodiny ovlivňují tuto regulační síť na různých úrovních. Zkratky: APRR1/5/9 – pseudo-odpovědný regulátor z *A. thaliana*; ARF7 – auxin-odpovědný faktor 7; COG1 – COGWHEEL1; *cp3* – kompakta 3; EID1 – citlivý na tmavě červené světlo 1; ELF3 – raně kvetoucí 3; FAR1 – poškozená odpověď na FR světlo; FHY1/2 – dlouhý hypokotyl při FR světle 1/2; FIN219 – necitlivý na FR světlo 219; GI –

Gigantea; HFR1 - dlouhý hypokotyl při FR světle 1; IAA1/3/4/9/17 – indol-3-octová kyselina-odpovědný faktor 1/3/4/9/17; LAF1/6 - dlouho po FR světle 1/6; NDPK2 – nukleosiddifosfátkinasa 2; PAT1 – signální přenos phyA; PSI2 – fytochromová signalizace 2; red1 – prodloužené červené světlo; srl1 – krátký hypokotyl na červeném světle; SRR1, - snížená citlivost na červené světlo 1; SUB1 – krátce pod modrým světlem 1 (převzato a upraveno z Gyula et.al., 2003).

2.5.1 Signalizace UV-B

Přenos signálu UV-B světla vede v aktivaci komponent ULI3 a HY5 (Obr.20). ULI3 se nachází pouze v odpovědích na UV-B světlo. Tento protein, jehož funkce není známá, obsahuje vazebná místa pro hem a diacylglycerol a nachází se v cytoplasmě a v plasmatické membráně. HY5 z proteinové rodiny, která obsahuje základní strukturní motiv - leucinový zip (bZIP), se podílí na regulaci normálního vývoje za všech světelných podmínek (Chen et al., 2004; Ellenberger, 1994).

2.5.2 Signalizace fytochromů

Fytochromová signální dráha je v cytoplasmě indukována Ca^{2+} a cGMP a také fytochrom-indukující fosforylací regulačních proteinů: auxin/indol-3-octová kyselina (Aux/IAA), cry1, cry 2 a substrát fytochromové kinasy 1 (PKS1) (Tab.1). Fosforylační aktivita ovlivňující světelnou signalizaci byla potvrzena pouze u phyA (Gyula et al., 2003; Kaluri et al., 2007).

Signalizace všech fytochromů (phyA-E) začíná translokací světlem aktivované formy Pfr z cytoplasmy do jádra, kde se váže s dalšími proteiny jako jsou např. transkripční faktory typu helix –smyčka-helix, (bHLH) Fytochrom-interagující faktor 3 (PIF3) a 4 (PIF4), které kontrolují expresi několika cílových genů (Franklin et al., 2005; Schafer & Bowler, 2002) (Tab.1) (Obr. 21).

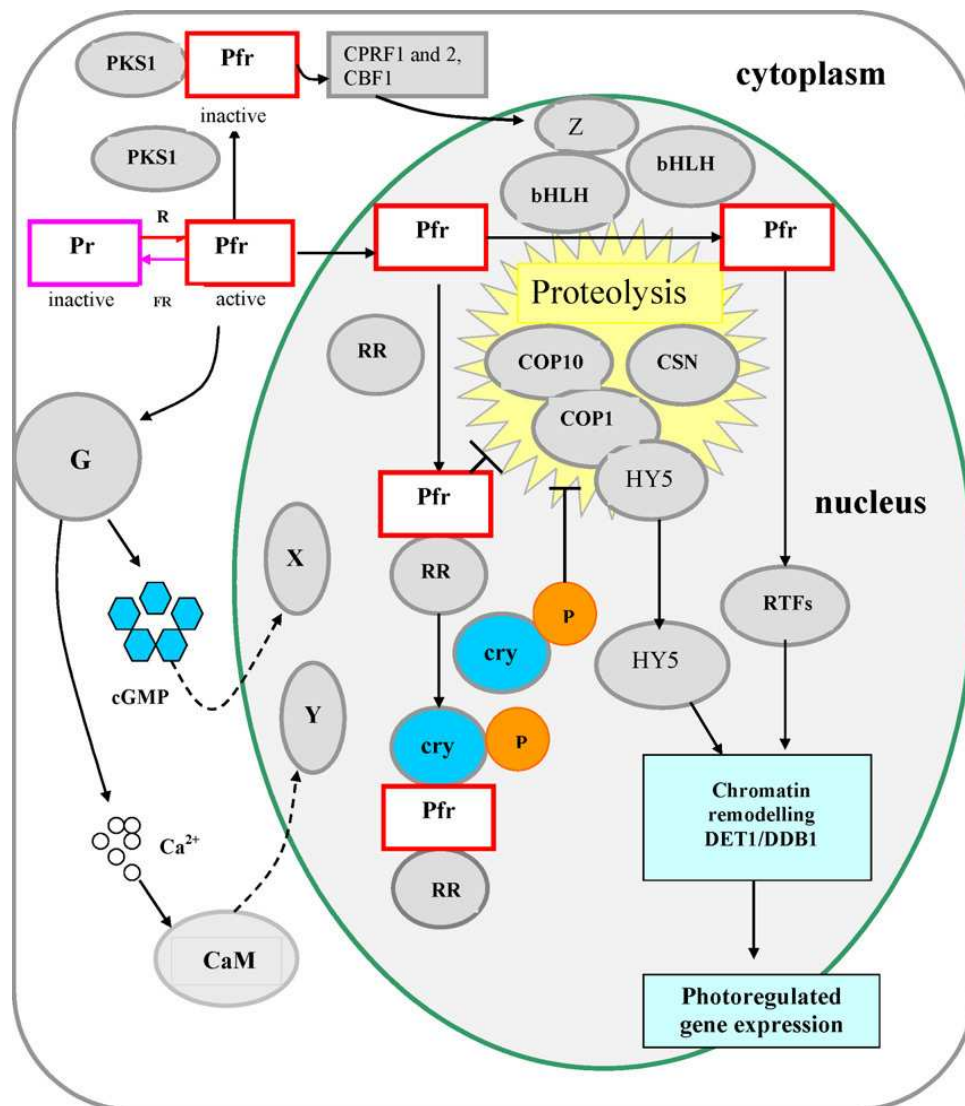
Tab.1 Vazební partneři fytochromů (převzato z Chen, 2004; Gyula et al., 2003; Schafer & Bowler, 2002)

vazební partner	phyA/phyB	Pr/Pfr	lokalizace	funkce v phy signalizaci
ARR4	B	obě	J,C	stabilizace formy Pfr phyB spojení s cytokininovou signál. dráhou
Aux/IAA	A	obě	J	spojení s auxin-signál.dráhou
cry1	A	?	J	fotoreceptorová spolupráce
cry2	B	?	J	fotoreceptorová spolupráce
ELF3	B	obě	J	regulace cirkadiálních hodin
NDPK2	A	Pfr>Pr	J,C	pozitivní regulátor A a B
PIF3	B(A)	Pfr	J	pozitivní regulátor odpovědí phyB vazba phyB s cirkadiálními rytmy
PIF4	B	oba	J	negativní regulátor B
PKS1	A,B	?	C	negativní regulátor translokace phy do jádra

Legenda: C-cytosol; J-jádro;

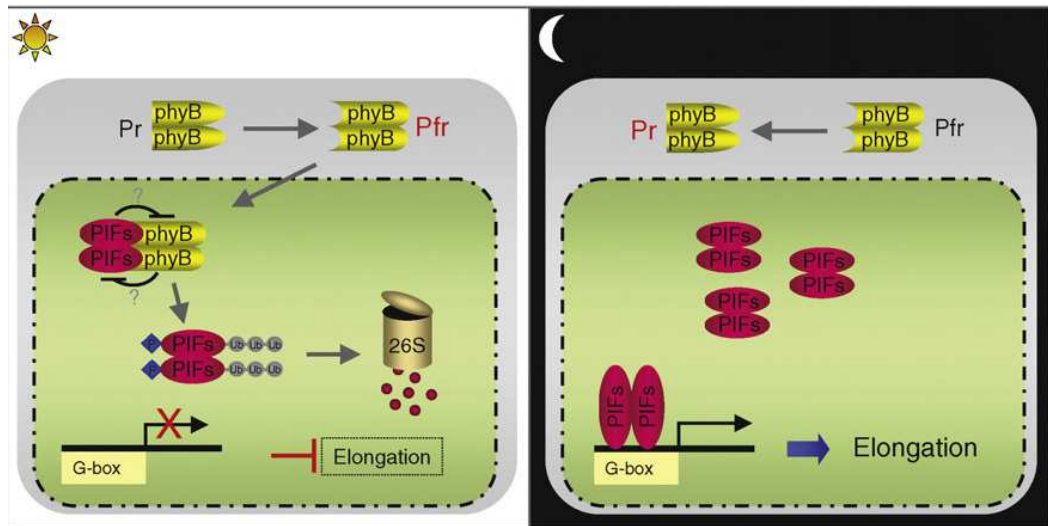
Pozn.: Cirkadiální rytmy jsou pravidelné cykly v metabolismu, fyziologických procesech a chování v odpovědi na denní/noční cyklus. Tyto cykly spolu se světlo-dependentními dráhami zprostředkovávají vnímání délky dne v rostlinách (Sullivan & Deng, 2003).

Mezi další interakční partnery patří ARR4 (odpovědný regulátor 4 z *A. thaliana*). stabilizující konformaci phyB a COP (konstitutivní fotomorfogeneze) proteiny, které jsou zahrnuty v ubikvitin-dependentní degradaci phyA (Obr.21). Mezi COP proteiny patří COP9 signalosom (CSN), COP1 a COP10. COP9 signalosom je proteinový komplex způsobující degradaci vybraných proteinů blízce příbuzný regulační podjednotce 19S proteasomu 26S, který degraduje polyubikvitinované proteiny (Obr.22). COP10 se strukturně podobá ubikvitin-konjugující E2 enzymu, zatímco COP1 působí jako E3 ligasa vyvolávající degradaci HY5 v jádře za tmy u cry a phy (Gyula et al.,2003; Schafer & Bowler, 2002; Franklin et al., 2005).



Obr.21 Schéma fytochromového signálního přenosu. Červené světlo spouští tvorbu aktivní formy fytochromu (Pfr), což způsobuje přechod velké části Pfr do jádra. V cytoplasmě poté dochází k fosforylaci fytochromu (označeno jako P) a dalších proteinů jako je cytoplasmický protein PKS1 a transkripční faktory CPRF1, CPRF2 a GBF1, což způsobuje transport těchto komponent do jádra. CPRF1 and CPRF2 jsou členové hlavní "promoter-binding transcription factor family" (CPRF) a GBF1 je G-box vázající faktor 1. Tvorba Pfr je také následována aktivací heterotrimerního G-proteinu (G) neznámým mechanismem vedoucí k změně obsahu cytoplasmického cGMP a Ca^{2+} s kalmodulinem (CaM). To vede k aktivaci transkripčních faktorů (X a Y) potřebných při světlo-dependentní expresi různých genů. (Pfr) reguluje transkripci díky několika paralelním drahám. První dráha zahrnuje translokaci Pfr do jádra, kde váže transkripční faktory bHLH rodiny (např. PIF1, PIF3, PIF4, PIF5, PIF6, PIF7), které aktivují klíčové transkripční faktory (RTFs) indukující řadu světlem-regulovaných genů. V druhé jaderně-lokalizované dráze fytochromy interagují s odpovědnými regulátory (RR), které je stabilizují v aktivované formě a dále mohou aktivovat expresi světlem-regulovaných genů inhibovaných COP1-, COP10 a CSN-dependentní proteolýzou transkripčního faktoru HY5. Další možností regulace je vazba k aktivovaným kryptochromům (cry). V cytoplasmě mohou fytochromy

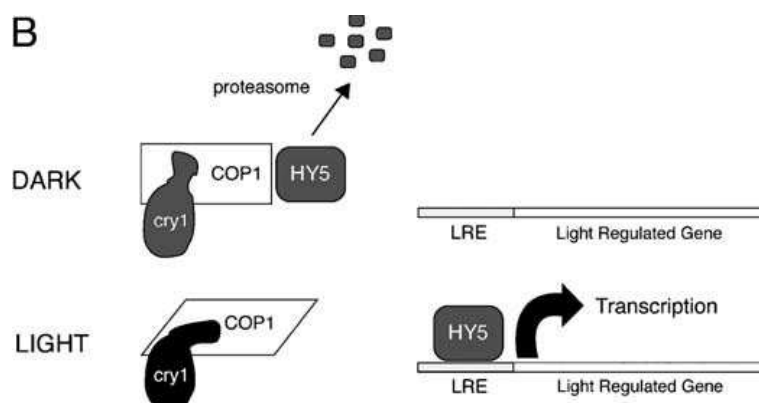
aktivovat genovou expresi přes G-proteiny, cGMP-dependentní dráhu a (Ca^{2+}), který reguluje protein SUB1. Pro regulaci genů odpovědných za fotomorfogenezi je nezbytné remodelování chromatinu, které zprostředkuje nukleosom-vázající komplex DET/DDB1. X, Y and Z, jsou neznámé transkripční faktory (převzato a upraveno z Kreslavski et al., 2009; Schafer & Bowler, 2002).



Obr.22 Model světlo-dependentní proteosomální degradace PIF. Světlem aktivovaný phyB přechází do jádra a interaguje s transkripčními faktory PIF. PhyB fosforyluje (P) PIFs, což vede k ubikvitinylaci (Ub) neznámou E3 ligasou před vlastní proteosomovou degradací. Ve tmě mohou naakumulované PIF podpořit transkripci cílových genů, což vede k buněčné elongaci. (převzato z Henriques et al., 2009).

2.5.3 Signalizace kryptochromů

cry1 a cry2 se spolu s fytochromy podílí na indukci fotomorfogeneze, ale uspořádání a délka jejich signální dráhy se liší (Gyula et al., 2003) (Obr.20). Centrální roli v signalizaci cry hraje světlo-regulující proteinová degradace, které se účastní protein COP1 interagující s C-terminální doménou cry1 i cry2 za tmy i za světla. COP1 protein je nezbytný pro světlo-regulující degradaci několika transkripčních faktorů (např. bZIP protein HY5) zahrnuté ve světlo-regulující transkripci. Mechanismus degradace HY5 je znázorněn na obr.23 (Chen et al., 2004; Li & Yang, 2007).



Obr.23 Mechanismus aktivace signální dráhy kryptochromu. Za světelných podmínek dochází k modifikaci cry1, který vede ke konformační změně COP1 uvolňující transkripční faktor HY5, který může aktivovat příslušné geny. Za tmy COP1 spustí degradaci HY5 (převzato z Chen et al., 2004).

U kryptochromů bylo identifikováno několik dalších signálních komponent (Tab.2), které se nacházejí v jádře nebo cytoplasmě. SUB1 je Ca^{2+} -vázející protein, který se účastní signalizace cry1 a cry2 a phyA (Tab.2). Tento protein potřebuje k signalizaci světlem-aktivovaného vazebného partnera HY5. Ve tmě SUB1 neukazuje žádnou reakci (Briggs & Spudich, 2005). Kryptochromy se dále podílí na aktivaci aniontových kanálků vedoucích v depolarizaci plazmatické membrány (Chen et al., 2004).

Tab.2 Souhrn signálních látek v cry-signální dráze a jejich regulace cry-dependentní signální dráhy (převzato z Chen et al., 2004; Gyula et al., 2003; Mohler et al., 2003).

Signální komponenta	Zkratka	Positivní/ negativní regulace
protáhlý hypokotyl na světle	HY5	+
homolog HY5	HYH	+
dlouhý hypokotyl za FR světla	HFR1	+
protein fosfatasa 7 z <i>A.thaliana</i>	AtPP7	+
phytochrom A	phyA	?
phytochrom B	phyB	?
krátce pod modrým světlem	SUB1	-

Zkratky: FR - dlouhovlnné červené světlo

2.5.4. Signalizace fototropinů

Přenos signálu phot1 začíná světlem-regulovanou autofosforylací (kapitola autofosforylace), která probíhá na několika serinových residuích při různé intenzitě světla

a aktivuje několik signálních komponent, jejichž výčet je shrnut v tabulce 3 (Chen et al, 2004). Tyto signální látky se podílí na regulaci celé řady modré světlo-dependentních procesech např. fototropismus, otvírání průduchů, pohyb chloroplastů atd. (Christie, 2007) (Tab.4).

Tab.3 Komponenty fototropinem-zprostředkované signální dráhy (převzato z Christie, 2007; Moore & Perez, 1967; Luesse et.al., 2006)

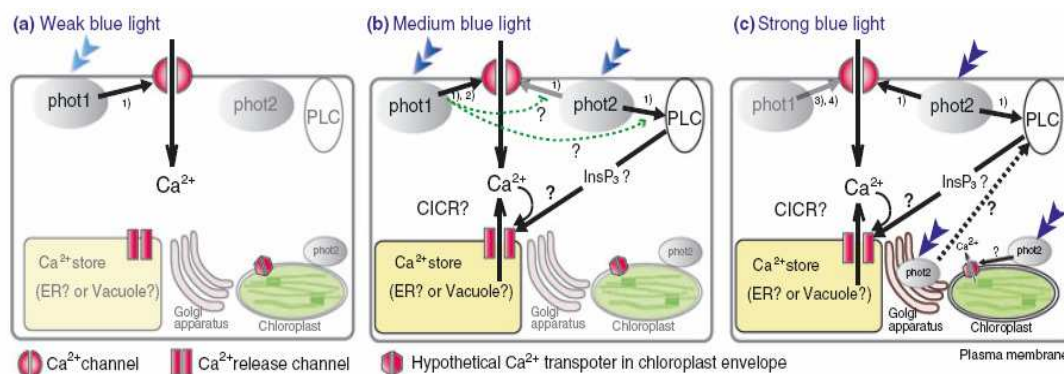
Zkratka	Název	Typ phot	lokalizace
NPH3	nefototropický hypokotyl 3	phot1	PM
RPT2	kořenový fototropismus 2	phot1	?
PKS1	substrát fytochromové kinasy 1	phot1	
NPH4	nefototropický hypokotyl 4	?	J
MSG2	Massugu 2	?	J
PIN1	změněný PIN protein 1	phot1	?
14-3-3	protein eluovaný ve 14 frakci hovězího sérového homogenátu a rozdělený při S-elfo na pozici 3,3	phot1 i phot2	C
VfPIP1	phot1-interagující protein z Vicia faba	phot1	M
CHUP1	neobvyklé umístění chloroplastů 1	?	C (VCHM)
PMI1	narušený pohyb plastidů 2	?	?
JAC1	J-doménový protein potřebný pro odpověď na akumulaci chloroplastů	?	C
Ca²⁺	vápenatý kation	pho1 i phot2	C
Zkratky	C - cytosol; J - jádro; M - mitochondrie; PM - plasmatická membrána; S- elfo - škrobová elektroforéza; VCHM - vnitřní chloroplastová membrána		

Tab.4 Přehled fce kryptochromových signálních komponent v různých rostlinných procesech (převzato z Christie, 2007).

Proces	Signální komponenta
fototropismus	NPH3, RPT2, PKS1, NPH4, MSG2, PIN1
gravitropismus	NPH4, MSG2
inhibice růstu hypokotylu	Ca ²⁺
otvírání průduchů	RPT2, 14-3-3, VfPIP1, Ca ²⁺
relokalizace chloroplastů	CHUP1, PMI1, JAC1, Ca ²⁺
spojení s dalšími fotoreceptory	PKS1

Mezi významné signální přenašeče v rostlinách patří cytosolický Ca²⁺, který se podílí na regulaci procesů řízených fototropiny (phot1 a phot2), které jsou zahrnuty v tabulce 4. Zdroje vápenatých kationů pochází z extracelulárního prostoru a nebo vnitřních zásob buňky (např. ER a vakuola). Fototropiny zprostředkovávají mobilizaci Ca²⁺ v odpovědi na modré světlo hlavně v cytosolu (Obr.24). phot1 indukuje transport Ca²⁺ z extracelulárního prostoru do cytosolu přes napětím-řízené kanálky v plasmatické membráně. phot2 stimuluje uvolnění Ca²⁺ z vakuol nebo ER, jeho akce

je závislá na typu tkáně a světelných podmínkách (Obr. 24). phot1 indukuje mobilizaci Ca^{2+} při mnohem nižší intenzitě ($0,1 - 50 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) modrého světla než phot2 ($1 - 250 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Schéma akce obou phot při mobilizaci Ca^{2+} zahrnuje obrázek 23 Harada & Shimazaki., 2007).



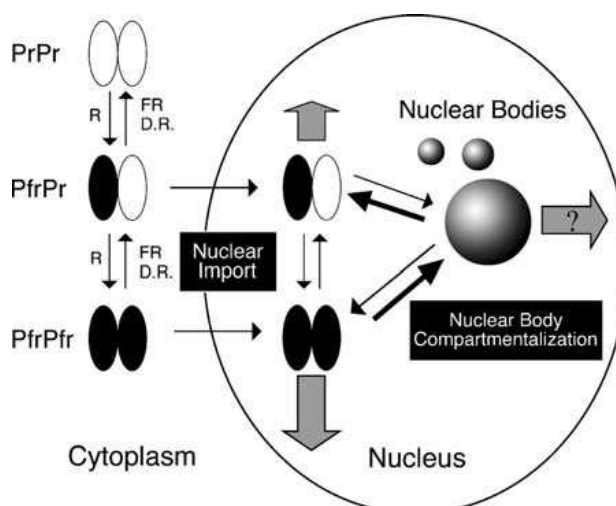
Obr.24 Schéma mobilizace Ca^{2+} zprostředkované phot1 a phot2 za slabé (a), střední (b) a silné intenzity modrého světla. (a) Při nízké intenzitě modrého světla phot1 lokalizovaný v plasmatické membráně sám stimuluje přítok Ca^{2+} přes Ca^{2+} kanálky v plasmatické membráně z apoplastu do cytosolu. (b) Při střední intenzitě modrého světla phot1 zprostředkovává stejný transport jako při nízké intenzitě. Při těchto podmínkách phot2 v plasmatické membráně může sám stimulovat Ca^{2+} - indukující uvolnění vápníku (CICR) z vnitřních zásob prostřednictvím fosfolipasa C (PLC)-dependentní signalizace a také indukovat přítok Ca^{2+} přes Ca^{2+} kanálky. phot2 může aktivovat zvýšení hladiny Ca^{2+} z apoplastu v buňkách listu pouze za tohoto světla (viz šedá šipka). Předpokládá se, že v listech phot1 indukuje phot2-dependentní PLC dráhu a potlačuje phot2-dependentní přítok Ca^{2+} z apoplastu do cytosolu. (c) Za vysoké intenzity modrého světla phot2 v plasmatické membráně může aktivovat indukci CICR prostřednictvím PLC-zprostředkované signalizace a přítoku Ca^{2+} přes vápenaté kanály v plasmatické membráně. phot2 nacházející se v Golgiho aparátu se může podílet na uvolnění Ca^{2+} z vnitřních zásob při intenzitě modrého světla od $20-48 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. phot2 nacházející se pravděpodobně na chloroplastu může indukovat uvolnění Ca^{2+} z chloroplastu při silné intenzitě modrého světla (převzato z Harada & Shimazaki., 2007).

2.6 LOKALIZACE

2.6.1 Lokalizace fytochromů

Phy A-E (*A. thaliana*) se za tmy akumulují v cytoplasmě. Po zachycení světelného signálu dochází k přeměně formy Pr na Pfr, která je transportována do jádra. Po transportu do jádra fytochromy tvoří intranukleární tělíska (NBs) o různé velikosti a tvaru, které závisí na kvalitě a množství světla (Obr.25). Reversibilní tvorba NBs probíhá podle denního schématu měnícího se na základě fotoperiody. Funkce těchto tělísek není jasná, ale předpokládá se účast na degradaci fytochromů v cytoplasmě a kontrole transkripce specifických rostlinných genů.

V etiolovaných a na světle rostoucích rostlinách většina forem Pr a Pfr zůstává v cytoplasmě, kde jsou některé z nich součástí cytoplasmatické membrány nebo jsou k ní jen částečně připojeny (Chen et al, 2004; Nagy & Schafer, 2002; Wang, 2005).

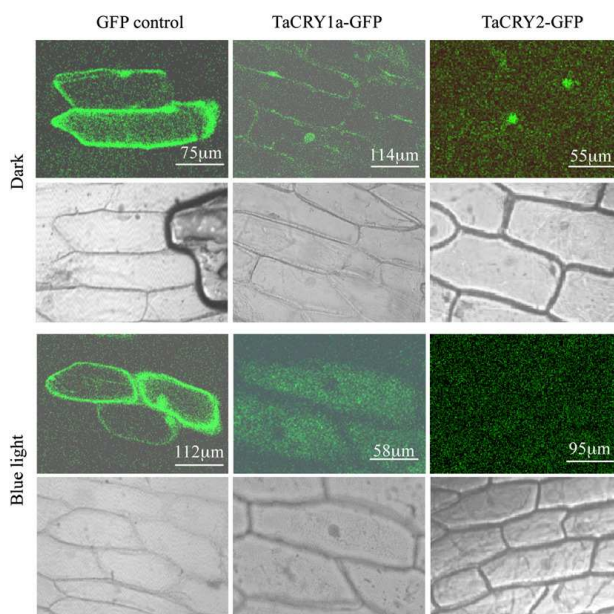


Obr.25 Schématické znázornění fytochromové lokalizace s použitím phyB jako modelu. Po světelné aktivaci fotoreceptoru dochází k dvěma dějům: jaderný import a tvorba jaderného tělíska. Pro uskutečnění jaderného importu je nezbytná nejméně jedna molekula fytochromu v Pfr formě v dimeru. V jádře se pfrpfr homodimery začleňují do jaderných tělísek (Chen et al, 2004).

2.6.2 Lokalizace kryptochromů

V práci Xu et al. bylo prokázáno, že umístění kryptochromových genů 1 a 2 v buňce se liší. cry1 je světlo-dependentní protein, který je za tmy cílen do jádra, zatímco za světelných podmínek zůstává v cytoplasmě, kde se může akumulovat

podél plazmatické membrány (Obr.26). cry2 se bez ohledu na světelné podmínky nachází v jádře, protože v C-terminální doméně obsahuje jaderný lokalizační signál (JLS) a v ostatních buněčných komponentách se nachází jen v nepatrném množství. Po vystavení modrému světlu se cry1 z pšenice degraduje (Obr.26) (Wang, 2005; Xu et al., 2009). U *Arabidopsis* byla prokázána asociace cry2 s chromosomy, ale zatím nebylo zjištěno, zda se cry2 váže přímo na DNA nebo se váže k chromosomu prostřednictvím protein-proteinové interakce (Wang, 2005).



Obr. 26 Buněčná lokalizace cry1 a cry2. Fúzní proteiny TaCRY1a-GFP a TaCRY2-GFP byly přechodně transformovány do epidermálních buněk cibule ve tmě a na modrém světle. Ve tmě TaCRY2-GFP konstrukt vykazuje intenzivní fluorescenční signál v jádře a slabý signál v dalších částech buňky. Při přechodu ze tmy na světlo se TaCRY2-GFP konstrukt neobjevuje. TaCRY1-GFP konstrukt vykazuje signál v jádře a v blízkosti plazmatické membrány, po aplikaci modrého světla byl signál detekován v cytoplasmě (převzato z Xu et a., 2009)

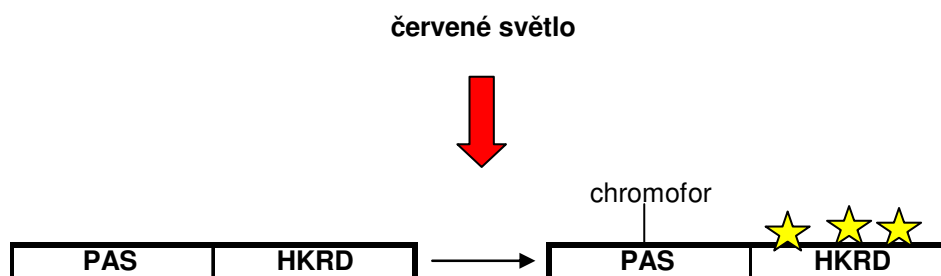
2.6.3 Lokalizace fototropinů

phot1 a phot2 jsou umístěny v cytoplasmě, kde jsou vázány k cytoplazmatické membráně dosud neidentifikovaným způsobem. phot1 je vysoce hydrofilní protein nacházející se v cytoplazmatické membráně, kde se váže k jejímu povrchu zejména jako periferní protein (Wang, 2005).

2.7 AUTOFOSFORYLACE A ÚLOHA KINAS

2.7.1 Fytochromy

Rostlinné fytochromy jsou Ser/Thr kinasy obsahující HKRD region příbuzný s bakteriálními histidinkinasami, který zprostředkovává jejich autofosforylaci a fosforylaci dalších proteinů. Autofosforylace phyA je zprostředkována připojením chromoforu a zesílena po vystavení phyA R světlu (Obr.27). phyA také fosforyluje několik proteinů *in vitro*, např. cry1, cry2, Aux/IAA, PKS1 a NDPK2, atd.



Obr. 27 Schéma autofosforylace fytochromu A (převzato z Wang, 2005)

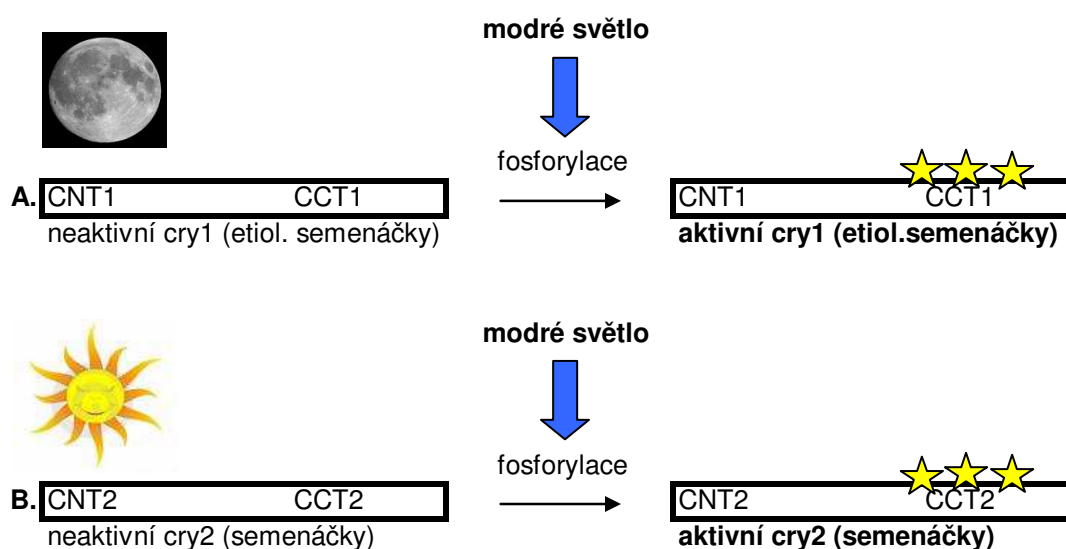
U PhyA byly zmapovány dvě fosforylační místa (Ser-7, Ser-598). Ser-7 je trvale fosforylován v obou formách Pr i Pfr., toto residuum je zapojeno do regulace signalizace phyA. Fosforylace Ser-598 je závislá na světle a přednostně k ní dochází v Pfr formě *in vivo*. Fosforylace phyB je jen částečně závislá na HKRD regionu, proto nebyl u phyB prokázán fosforylační status a kinasová aktivita ovlivňující světelnou signalizaci (Gyula, et al., 2003; Chen et al., 2004; Wang, 2005).

Mezi fyziologické role fosforylační modifikace fytochromů patří regulace jejich stability (phyA), jejich subcelulární lokalizace a jejich interakce se signálními partnery. Např. fosforylace Ser-598 inhibuje interakci phy se signálními partnery NDPK2 (nucleosiddifosfátkinasa 2) a PIF3 (fytochrom-interagující partner 3). Interakce phyA s FYPP (fytochrom asociující proteinfosfatasa) zahajuje fytochromovou aktivitu v kvetení a zkracování hypokotyly. Inhibice FYPP jeho fytochromovou aktivitu snižuje, což znamená že vratná fosforylace a defosforylace může být klíčovým mechanismem pro fytochrom-zprostředkující světelnou signalizaci. (Gyula et al., 2003; Kim, et al., 2002; Kreslavski et al., 2009; Wang, 2005).

2.7.2 Kryptochromy

Modré světlo - dependentní proteinová fosforylace je důležitá pro biologickou aktivitu kryptochromů. Protein cry1 je fosforylován díky phyA na jeho C-terminální doméně po vystavení etiolovaných rostlin různé intenzitě modrého světla (Obr.28). V práci Shalitin et al., 2003, bylo prokázáno že cry1 protein z hmyzích buněk může být fosforylován *in vitro* bez přítomnosti proteinkinasy, lze předpokládat, že cry1 může mít autofosforylační aktivitu závislou na modrém světle.

Fosforylace cry2 nebyla detekovaná v etiolovaných semenáčcích, ale byla prokázána krátce po vystavení semenáčků modrému světlu (Obr.28). Fosforylace tohoto proteinu je závislá na poměru intenzity modrého světla a době vystavení (Li & Yang, 2007).

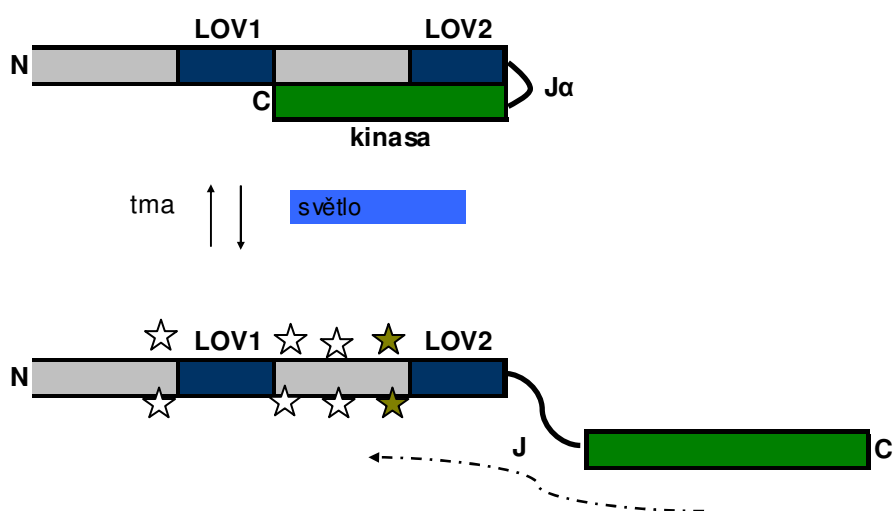


Obr. 28 Schéma modré světlo-dependentní fosforylace cry1 a cry2. (A) cry1 je fosforylován (hvězdičky) po vystavení rostlin ze tmy modrému světlu. Tato fosforylace se zvyšuje s rostoucí intenzitou modrého světla. (B) Fosforylace cry2 není detekovaná v etiolovaných rostlinách, ale objevuje se až poté co jsou semenáčky vystaveny modrému světlu. Zkratky:CCT-C-koncová kryptochromová domény; CNT – N-koncová kryptochromová doména (převzato z Li & Yang, 2007).

Modrým světlem-indukovaná fosforylace kryptochromů slouží nejen k aktivaci jejich signální dráhy, ale fosforylace může při vysoké intenzitě modrého světla také značit aktivovaný cry2 pro proteasom-zprostředkující degradaci, která signální dráhu inhibuje (Li & Yang, 2007; Wang, 2005).

2.7.3 Fototropiny

phot1 je protein asociovaný s membránou, u kterého po ozáření modrým světlem dochází k autofosforylaci v C-terminální Ser/Thr kinasové doméně vedoucí k aktivaci proteinu (Obr.29). Fosforylace probíhá na dvou rozhraní N-konce a LOV1 domény a H regionu mezi LOV1 a LOV2, kde se nachází osm fosforylačních míst (serinová residua), které se liší intenzitou světla potřebnou pro fosforylaci a funkcí. Seriny umístěné u LOV1 domény jsou fosforylovány za nižší intenzity modrého světla než seriny umístěné u LOV2 domény (Obr.29). Funkce obou typů fosforylací se zatím předpokládá. Fosforylace probíhající blízko domény LOV1 se může podílet na ovlivňování protein-proteinových interakcí se signálními komponenty např. NPH3, zatímco fosforylace u LOV2 se může účastnit znečítlivění receptoru (Wang, 2005).

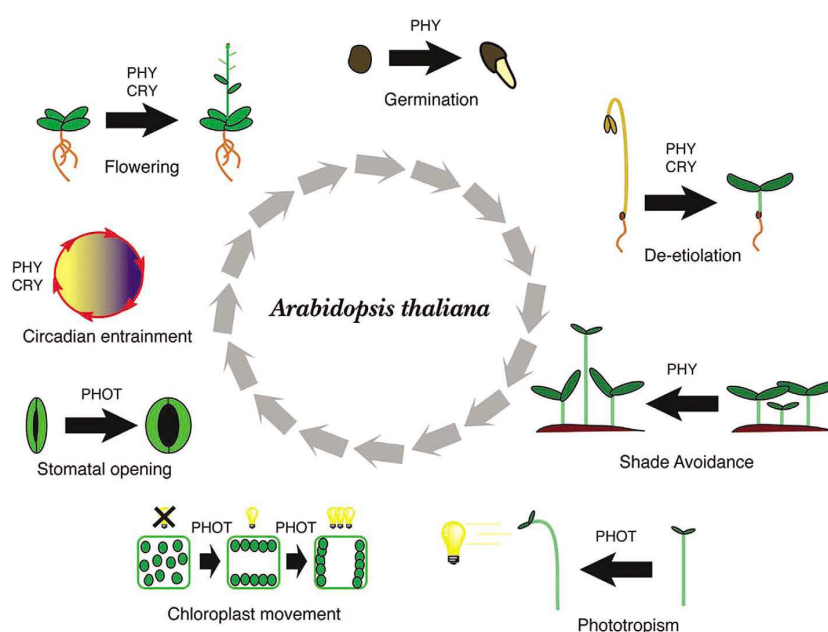


Obr.29 Schéma aktivace fototropinu prostřednictvím světlem-řízené autofosforylace. Ve tmě je fototropinový receptor nefosforylovaný a inaktivní (nahore). Za těchto podmínek asociuje α – helix označovaný jako $J\alpha$ -helix s povrchem domény LOV2. $J\alpha$ -helix se nachází u C-konce LOV2 a skládá se z polární a nepolární strany, která zakotvuje do β – řetězce jádra LOV2. LOV2 doména tedy působí jako represor fototropinové kinasové aktivity ve tmě. Po absorpci modrého světla doménou LOV2 dochází k odštěpení $J\alpha$ helixu. Uvolnění $J\alpha$ helixu vede k aktivaci C-terminální kinasové domény a následně autofosforylaci fotoreceptoru závislé na intenzitě modrého světla. Na N-konci fototropinu se nachází osm serinových fosforylačních míst, které se rozdělují do dvou skupin: fosforylační místa s nízkou/střední potřebou intenzity světla (bílá barva) a fosforylační místa s vysokou potřebou intenzity světla (zelená barva). Dvě fosforylační místa se nachází mezi před LOV1 blízko N-konce proteinu (Ser²⁷, Ser³⁰). Zbývající fosforylační místa jsou lokalizována mezi doménami LOV1 a LOV2 (Ser²⁷⁴, Ser³⁰⁰, Ser³¹⁷, Ser³²⁵, Ser³²⁵, Ser³³², Ser³⁴⁹). Místa poblíž domény LOV1 (Ser²⁷, Ser³⁰, Ser²⁷⁴ a Ser³⁰⁰) jsou fosforylovány při nízké intenzitě modrého světla. Ostatní místa u domény LOV2 jsou fosforylovány při střední

nebo vysoké intenzitě světla. Po inkubaci ve tmě se aktivovaný phot1 může vrátit zpět do nefosforylovaného stavu. Doména LOV1 se částečně podílí na autofosforylaci fotoreceptoru (převzato a upraveno z Christie, 2007).

2.8 VLIV SVĚTELNÝCH SIGNÁLŮ NA VÝVOJ ROSTLIN

Světelné signály zachycené fotoreceptory (fytochromy, kryptochromy a fototropiny) regulují vývoj rostlin během jejich životního cyklu, který zahrnuje procesy: klíčení, de-etiolace, fototropismus, vývoj listů, komplex odpovědí zvaný vyhnutí se zastínění, regulace kvetení, atd. (Obr.30). Na základě působení světelných signálů s dalšími okolními signály může rostlina předpokládat změny v okolí a přizpůsobit podle toho svůj vývoj (Franklin et al., 2005).



Obr.30 Světlem-regulovaný vývoj v modelovém rostlinném organismu *A.thaliana*. Světlo ovlivňuje vývoj rostliny během jejího životního cyklu. Jednotlivé vývojové aspekty regulují fotoreceptory: fytochromy (phy), kryptochromy (cry) nebo fototropiny (phot), které působí sami nebo v kombinaci s nějakým dalším fotoreceptorem (převzato a z Sullivan & Deng, 2003).

2.8.1 Klíčení

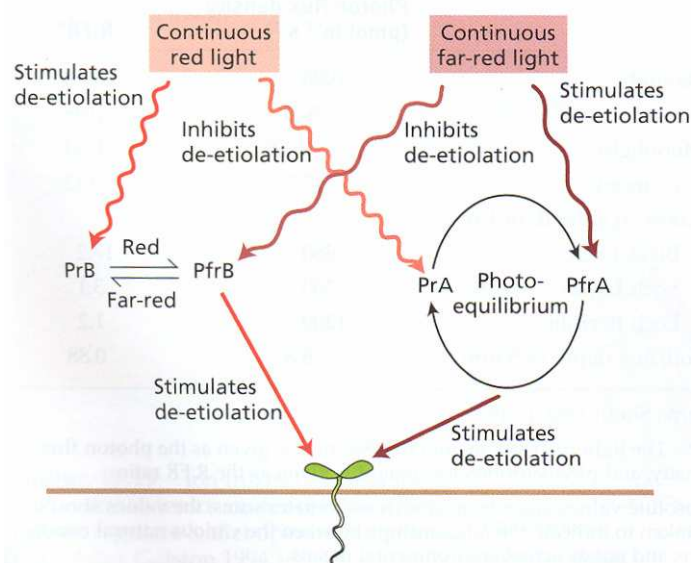
Proces klíčení je regulován zejména fytochromovou rodinou fotoreceptorů (phyA, B, C, D a E), která působí v několika módech (Sullivan & Deng, 2003). Semena a semenáčky rostoucí ve tmě vykazují tři různé módy fytochromové akce (VLFR, LFR a HIR), které jsou charakterizovány poměrem a reverzibilitou R/FR. Zahájení klíčení

spouští mód VLFR zprostředkovaný phyA a mód LFR zprostředkovaný phyB. Dále se na regulaci klíčení pomocí módu LFR podílí také phyC, D a E, kde účast phyD není nezbytně nutná díky blízké sekvenční příbuznosti s phyB. Poslední akční mód podílející se na klíčení je FR-HIR, kterou zprostředkovávají dva fytochromy phyA a phyE (Franklin et al., 2005).

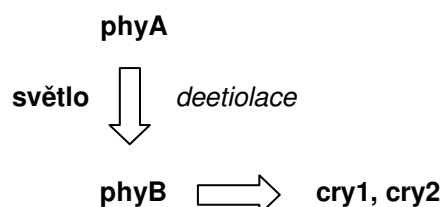
2.8.2 De-etiolace

Po přechodu rostliny na světlo dochází k de-etiolaci, která způsobuje změnu v několika vlastnostech rostliny (Obr.30). U dvouděložných rostlin lze pozorovat zastavení prodlužování stonkových částí, otevření a zoevření kotyledonů a tvorbu řapíku. Jednoděložné rostliny zastavují prodlužování listů, jejichž čepele expandují. Dále dochází k syntéze chlorofylu, proteinů fotosyntetického aparátu, enzymů Calvinova cyklu a k přestavbě etioplastů a proplastidů na chloroplasty, což je nezbytné pro aktivaci fotosyntézy (Daněk & Pavlová, 2002). Regulace tohoto procesu je založena na interakci jednotlivých fytochromů např. phyA a phyB (Obr. 31), ale také phyC, D, a E (Taiz & Zeiger, 2006). phyA se prostřednictvím módu FR-HIR podílí na inhibici elongace hypokotylu. Všichni členové fytochromové rodiny se po vystavení kontinuálnímu R světlu účastní aktivace expanze kotyledonů (Franklin et al., 2005).

Dále je deetiologie řízena prostřednictvím spolupráce fytochromových a kryptochromových fotoreceptorů, které jsou aktivní při určité intenzitě světla (Obr. 32) (Sullivan & Deng, 2003). Kryptochromy se během de-etiolace podílejí na inhibici elongace hypokotylu a ovlivňování hladiny antokyaninu (Franklin et al., 2005).



Obr. 31 Antagonistické role phyA a phyB při deetiolační odpovědi. phyB absorbující kontinuální R světlo stimuluje deetiolační udržováním vysoké hladiny PfrB. Kontinuální FR světlo absorbované phyB naopak stimulaci zabraňuje snižováním hladiny PfrB. Regulace deetiolační phyA závisí na fotostacionárním stavu fytochromu (šipkový cyklus). phyA po absorpci kontinuálního FR světla stimuluje tento proces, zatímco po absorpci kontinuálního R světla ho inhibuje (převzato z Taiz & Zeiger, 2006).



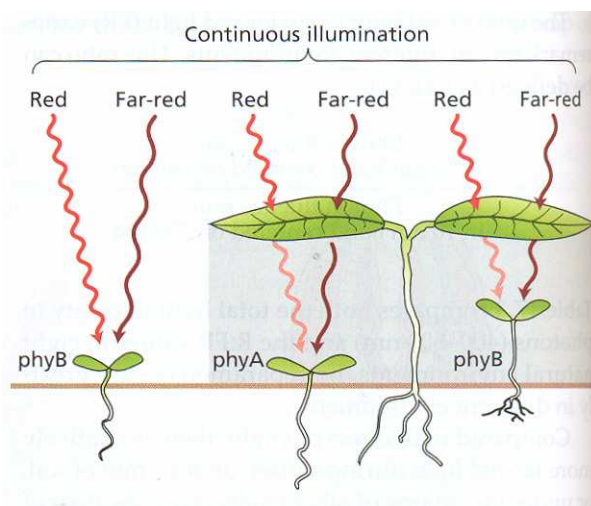
Obr. 32 Schéma souhry cry a phy během regulace de-etiolace. Po ozáření semenáčků světlem je phyA degradován a de-etiolace je kontrolována phyB a hlavně Kryptochromy (převzato z Sullivan & Deng, 2003).

2.8.3 „Shade avoidance“

V přirozených podmínkách rostliny neustále soutěží se stínící vegetací o zdroj světla, který je nezbytný pro fotosyntézu a další procesy. Proto si rostliny vyvinuly dvě strategie obrany: žít ve stínu (shade tolerance) a nebo únik z cesty (shade avoidance) (Sullivan & Deng, 2003). „Shade avoidance“ zahrnuje soubor procesů zabraňující stínění ostatní vegetací (Obr.33). Mezi tyto procesy patří tvorba dlouhých internodií a řapíků, zvýšení apikální dominance, urychlení kvetení, snížení tvorby plodů a semen, tvorba listů s velkými a tenkými čepelemi a vysoce výkonným fotosyntetickým aparátem (Daněk & Pavlová, 2002). „Shade avoidance“ je soubor obraných procesů, který zprostředkovávají fytochromy (Smith, 2000). Regulace tohoto procesu pomocí phyA a phyB je znázorněna na obrázku 34. Rostliny vnímají přítomnost sousední vegetace jako snížení poměru R:FR světla, které se odráží nebo prochází skrz zelené tkáň. Poměr R:FR denního světla se pohybuje kolem 1,5 a trochu kolísá s povětrnostními podmínkami. Fotosyntetické pigmenty, chlorofyly a karotenoidy absorbují světlo nejvíce v oblasti viditelného světla včetně R světla, což způsobuje změnu poměru světla R:FR na hodnotu 0,09-0,7 pro zastíněné rostliny (Franklin et al., 2005).



Obr.33 Obranné mechanismy rostliny (*Sinapis alba*) proti stínění. Vlevo je rostlina nevystavená stínu vegetace. Vpravo rostlina vykazuje typické znaky „shade avoidance“: listy s velkými čepelími a dlouhými řapíky, stimulace růstu atd. (převzato z Franklin et al., 2005).



Obr.34: Úloha phyA a phyB na vývoj semenáčků na světle a ve stínu. Na slunečním světle obohaceném o červené světlo je deetiologie primárně řízena phyB (vlevo). Semenáček vystavený stínu s vysokým obsahem FR světla zahajuje deetiologii primárně prostřednictvím phyA (uprostřed). phyA je labilní, proto to je tato odpověď dále řízena phyB. Při přepínání z phyA na phyB se zastaví inhibice růstu stonku, což dovoluje zrychlit růst stonku a následně se vyhnout stínu (převzato z Taiz & Zeiger, 2006).

2.8.4 Fototropismus

Fototropismus je proces řízený světlem, který způsobuje zakřivení nebo ohyb rostlinných orgánů. Existují dva typy odpovědí a to: pozitivní a negativní fototropismus. Pozitivní fototropismus znamená růst rostlinné části směrem ke světelnému zdroji (př.

stonek), který je důležitý pro maximalizaci fotosyntézy během raného vývoje. V důsledku negativního fototropismu dochází k růstu rostliny směrem od světla (např. primární kořeny) (Sullivan & Deng, 2003). Tento proces je zprostředkovaný fototropinovou rodinou fotoreceptorů, která obsahuje phot1 a phot2 odlišně regulující fototropismus při různé intenzitě modrého světla (Franklin et al., 2005).

2.8.5 Vývoj listu

Vývoj listu je jedním ze světlem-regulovaných procesů, které ovlivňují architektonickou stavbu rostliny (velikost, tvar a úhel listu, výška rostliny a stupeň úžlabního větvení). Vytvářející listy se musí přizpůsobovat kolísající hladině světla, která může způsobit snížení fotosyntetické produktivity nebo fotooxidativní poškození chloroplastů. Rostliny mohou uplatnit dvě strategie: otvírání průduchů a migrace chloroplastů (Franklin et al., 2005).

Průduchy jsou malé póry v listu a stonku regulující výměnu plynů na základě napínání a smršťování páru svěřacích buněk, které způsobují otvírání a zavírání průduchů (Sullivan & Deng, 2003). Tento proces reguluje phot1 a phot2 a během fotosyntetické aktivity také fytochromy.

Chloroplasty se vlivem slabých světelných podmínek prostřednictvím phot1 akumulují na svrchní straně palisádových mesofylových buněk pro dosažení maximalizace fotosyntézy, zatímco za intenzivních světelných podmínek se prostřednictvím phot2 chloroplasty řadí kolmo ke směru od světelného zdroje k minimalizování světelného poškození (Sullivan & Deng, 2003).

2.8.6 Fotoperiodická regulace kvetení

Živé organismy vnímají změnu v délce dne neboli fotoperiodě, která umožňuje přizpůsobit jejich reprodukční vývoj každoročním sezónním změnám. Fotoperioda je důležitý signál v kontrole kvetení. Rostliny se podle vnímané délky dne při kvetení rozdělují na dlouhodobní (LDP) a krátkodobní rostliny (SDP) (Franklin et al., 2005; Sullivan & Deng, 2003). Na regulaci kvetení se podílí fytochromy a kryptochromy. phyA funguje jako iniciátor kvetení u LDP, zatímco phyB zprostředkovává inhibici kvetení závislou na červeném světle a phyC se podílí na inhibici kvetení v SDP *Arabidopsis*. cry1 se podílí na vnímání fotoperiody u SDP, zatímco cry2 u LDP. Modré světlo způsobuje inhibici phyB. phyA vykazuje důležitou aktivitu v dlouhotrvajícím modrém světle (Franklin et al., 2005).

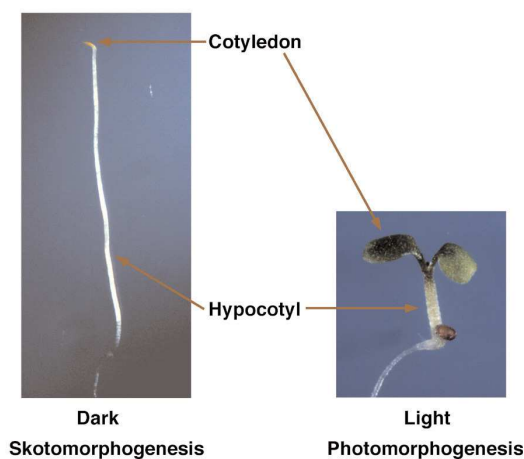
2.9 FOTOMORFOGENEZE

Fotomorfogeneze je soubor procesů probíhajících na světle, kterými rostliny reagují na různé světelné podmínky (kvalita, kvantita světelného záření a fotoperioda), tak že upravují metabolické procesy, mění pozici orgánů, utvářejí svou vnější podobu i vnitřní strukturu a řídí proces ontogeneze. Jednotlivé světelné podmínky jsou detekovány prostřednictvím souborů receptorů. Opačným termínem k fotomorfogenezi je skotomorfogeneze, která zahrnuje růst a vývoj rostlin ve tmě (Daněk & Pavlová, 2002; Sullivan & Deng, 2003).

2.9.1. Skotomorfogeneze

Skotofotomorfogeneze neboli vývoj rostliny ve tmě zahrnuje vývojový proces klíčení. Klíčení (germinace) se spouští pouze za příhodných podmínek, jinak semeno zůstává v suchém stavu (Sullivan & Deng, 2003). V přirozeném světelném okolí je načasování klíčení ovlivňováno mnoha faktory: okolní teplota, přístup k vodě, umístění semene v půdním profilu, narušení půdy a stupeň vegetačního stínění (Franklin et al., 2005).

Rostlina vykazuje během skotomorfogeneze typické vlastnosti (Obr.35), které se u jednoděložných a dvouděložných rostlin liší. Dvouděložné rostliny mají dlouhé stonkové části (hypokotyl, epikotyl, internodia), charakteristické zakřivení nejmladší stonkové části pod vzrostlým vrcholem, malé (kotyledony) složené k sobě a bezřapíkaté listy s redukovanými čepelemi přisedlé ke stonku. Jednoděložné rostliny mají prodloužené listy někdy po délce srolované. Oba typy rostlin vykazují společné vlastnosti: nepřítomnost chloroplastů, žlutá barva rostliny, nevyvinutý fotosyntetický aparát a vývoj etioplastů z protoplastů (Daněk & Pavlová, 2002).



Obr.35 Rozdílné fenotypy semenáčků *A. thaliana* rostoucích ve tmě a na světle. Ve tmě prochází semenáčky skotomorfogenním vývojovým programem, který je charakteristický hlavně dlouhými hypokotyly, uzavřenými kotyledony. Na světle rostoucí semenáčky prochází fotomorfogenezí a jsou charakterizovány krátkými hypokotyly, otevřenými a rozptýlenými zelenými kotyledony (převzato z Wang & Deng, 2002).

2.9.2. Fotomorfogeneze

Fotomorfogeneze zahrnuje tři procesy závislé na světle: de-etiolace, „shade avoidance“ a regulace cirkadiánními rytmy. Mezi další světlo-regulující procesy patří změna postavení listů, lokalizace chloroplastů v buňce, otvírání nebo zavírání květů a změna velikosti průduchové štěrbin (Daněk & Pavlová, 2002). De-etiolace a „shade avoidance“ již byly v textu charakterizovány. Regulace cirkadiánními rytmy je spojena s pravidelným střídáním světla a tmy (fotoperiody). S vnějším (exogenním) oscilátorem jsou synchronizovány vnitřní (endogenní) cirkadiánní hodiny v rostlinách. Základem cirkadiánních hodin u všech organismů je transkripční/translační zpětnovazebná smyčka s pozitivními a negativními regulačními prvky (Falcitore & Bowler, 2005; Sullivan & Deng, 2003). Podle fotoperiody řídí rostliny průběh ontogeneze, např. počátek kvetení (přechod do generativní fáze ontogeneze), vstup do období klidu (dormace), opad listů a tvorbu zásobních orgánů (Daněk & Pavlová, 2002).

3 ÚLOHA FOTORECEPTORŮ V REAKCI NA STRES

3.1 OSMOTICKÝ STRES

Xu prokázal, že světelné signály zachycené fotoreceptory kryptochromy (cry) jsou zapojeny v biotické a abiotické stresové obranné reakci včetně osmotického stresu (Xu et al., 2009), např. byla pozorována změna exprese genů Ta-CRY1a a Ta-CRY2 u transgenní pšenice po vystavení rostlin osmotickému stresu. Nadexprese CRY genů zeslabuje regulační role stresově-odpovědných genů v toleranci na osmotický stres.

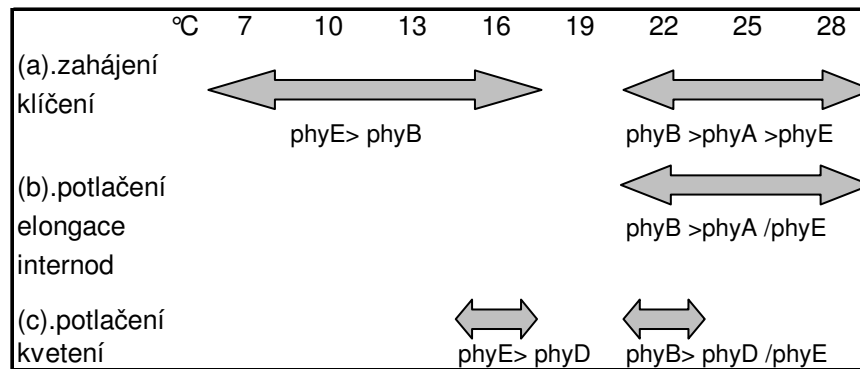
3.2 VZTAH MEZI TEPLOTOU A SVĚTLEM VE VÝVOJI ROSTLINY

3.2.1 Teplota jako signál

Růst a vývoj rostliny může být regulován na základě propojení signálních drah dvou faktorů: teplota a světlo. Teplota je významný vnější faktor mající významnou úlohu během rostlinného vývojového programu (např. klíčení, elongace růstu, kvetení). Teplotní signály mohou fungovat jako stimuly kontrolující časování vývojového přechodu a zesilující toleranci k budoucím teplotním extrémům a jsou důležité při udržování rostlinné homeostázy ve spojení s cirkadiánními rytmy. Mnoho teplotně regulovaných odpovědí je řízeno změnou hladiny rostlinných endogenních hormonů (např. kyselina abscisová, ABA; kyselina gibberellová, GA; auxin) a nebo signálním přenosem. ABA a GA jsou důležitými faktory v regulaci klíčení zahrnující dormaci semen a GA a auxin se ukazují roli v teplotně řízené elongační odpovědi (Heggie & Halliday, 2005; Franklin et al., 2009). Molekulární mechanismus teplotní signalizace nebyl dosud zcela objasněn, ale je známo, že přechod rostlin do vyšších teplot vede k iniciaci exprese heat-shock proteinů a přechod do nižších teplot zvyšuje hladinu volného Ca^{2+} (Franklin et al., 2009).

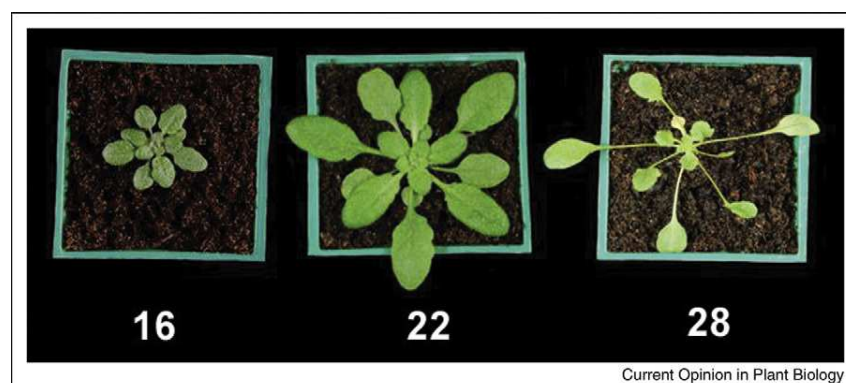
3.2.2 Vztah mezi teplotou a světlem

Spojení světelných a teplotních signálů se podílí na regulaci klíčení (dormace semen), elongaci růstu, rostlinné architektuře a kvetení. Pro zahájení klíčení je potřebná perioda chladu a světla, která ovlivňuje syntézu rostlinného hormonu GA prostřednictvím transkripční regulace GA3 oxidasy (GA3 ox). Při vysoké teplotě indukce syntézy kyseliny abscisové potlačuje biosyntézu GA a zabraňuje klíčení. Kromě GA a ABA se na regulaci klíčení podílí ethylen, který působí proti ABA. Při regulaci klíčení dochází za různých teplot k odlišným změnám funkční hierarchie (Franklin et al., 2009; Heggie & Halliday, 2005) (Obr.36a).



Obr.36: Funkční hierarchie fytochromů při různých růstových teplotách v rostlinných procesech regulovaných světelnými a teplotními signály. (a) phyB je nejdůležitější pro podporu klíčení za vysokých teplot (>19 °C), dále následuje phyA a pak phyE. Při nižších teplotách (<19 °C) hraje dominantní roli phyE, následovaný phyB. Bylo zjištěno že i phyC a phyD můžou podporovat klíčení při teplotě 19 °C. (b). phyB spolu s cry1 s phyA a phyE inhibují elongaci internod při teplotě > 19 °C, zatímco při nižších teplotách k potlačení internod nedochází. (c). Při 22 °C hraje důležitou roli v potlačení kvetení phyB, zatímco při nižších teplotách jsou dominantní v regulaci tohoto děje phyE a phyD. Pozn. Na regulaci potlačení kvetení se může podílet také cry1 (převzato a upraveno z Franklin et al., 2009).

Rostlinná architektura je modulována během vývoje vlivem teploty a světla a jejich komplexní interakcí s endogenními fytohormony zahrnující GA, ABA, cytokinin, brassinosteroidy a auxin. Přímé efekty teploty na rostlinnou architekturu jsou demonstrovány na obrázku 36. Prostřednictvím fotoreceptorů je při vyšších teplotách potlačována elongace internod stonku v *Arabidopsis* (Obr.36b). Spojení teplotních a světelných signálů při regulaci kvetení vykazuje změnu ve fotoreceptorové hierarchii za různých teplotních podmínek (Franklin et al., 2009; Heggie & Halliday, 2005) (Obr. 36c).



Obr.36 Regulace rostlinné architektury řízená teplotou. *A. thaliana* roste v 10-hodinových fotoperiodách (tma/světlo (130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) při teplotě 16, 22 a 28 °C po dobu 30 dnů. Při 16 °C jsou rostliny zakrslé a mají kompaktní růžici. Rostliny rostoucí při 22 °C ukazují největší povrch

listů a biomasu. Růst při 28 °C vede k významné elongaci petiolů, listové hyponastii a redukcii listové plochy (převzato a upraveno z Franklin et al., 2009).

3.3 Světlo a rostlinný patogen

Rostliny mohou být vystaveny působení řady patogenů (houby, bakterie a viry), které způsobují poškození procesů jako je fotosyntéza, transpirace, příjem živin apod. Rostlinné druhy neschopné zahájit obrannou reakci podléhají infekci vedoucí k uhynutí rostliny, zatímco resistantní rostliny bojují proti biotickému stresu např. prostřednictvím rezistentního systému „gene-for-gene“ (Kunz et.al, 2006).

Fotoreceptor Wc-1 z houby *Fusarium oxysporum* se podílí na stimulaci vývoje hyf, hydrofobicitě povrchu, světlo-indukující karotenogenezi, zvýšené expresi fotolyasových genů atd. *F. oxysporum* obsahuje několik fotoreceptorových genů, které jsou identické s geny houby *Neurospora crassa*: např. kryptochrom DASH, fytochromy phy (1-12) a opsin-1. Wc-1 z houby *F. oxysporum* obsahuje podobné strukturní prvky jako fotoplin rostlin: tzn. aktivační doménu na N-konci, LOV domény, dvě PAS dimerizační domény, jadernou lokalizační sekvenci atd. Dále bylo zjištěno, že Wc-1 je postradatelný při napadení rostliny (rajče) houbou *F. oxysporum* (Ruiz et al., 2008).

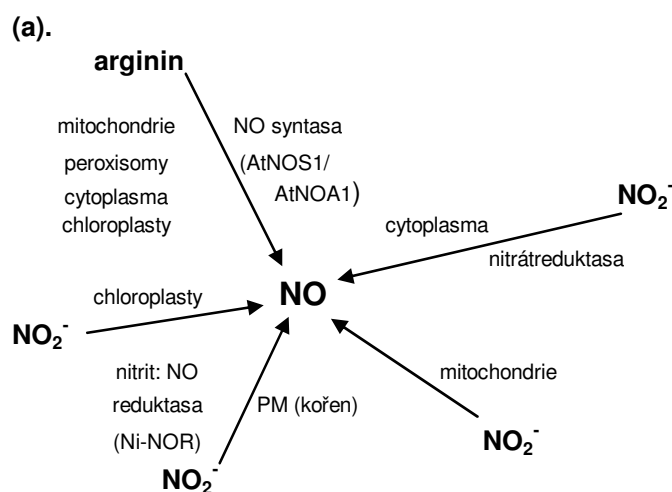
UV světlo může vyvolávat expresi obranných genů zapojených rovněž v obranných procesech v reakci rostlin na působení patogenů. Rostlina se proti UV světlu brání vznikem podobných signálních drah (např. fenylypropanoidová dráha) s podobnými signálními komponenty (fenylypropanoidy, ROS, NO, Ca, MAP kinasy apod.). Rostlinné odpovědi vyvolané působením UV-zářením a patogeny mohou být také propojeny díky ubikvitin-zprostředkované signalizaci. UV světlo indukuje různé odpovědi, protože existuje velká variabilita mezi jednotlivými rostlinami a interakcemi patogen-hostitel.

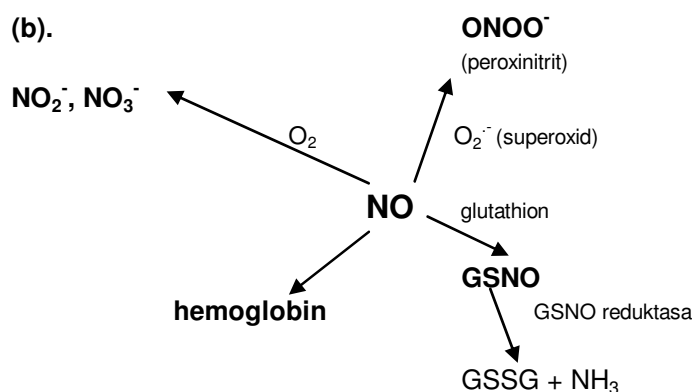
UV-B světlo stimuluje tvorbu genů důležitých pro patogenní resistenci v rostlinách (např. chitinasa, lipoxygenasa, „patogen-related protein“). UV-C záření zvyšuje resistenci proti viru tabákové mozaiky v tabákových listech (Kunz et.al, 2006).

4 VZTAH MEZI FOTORECEPTORY A RNS A ROS

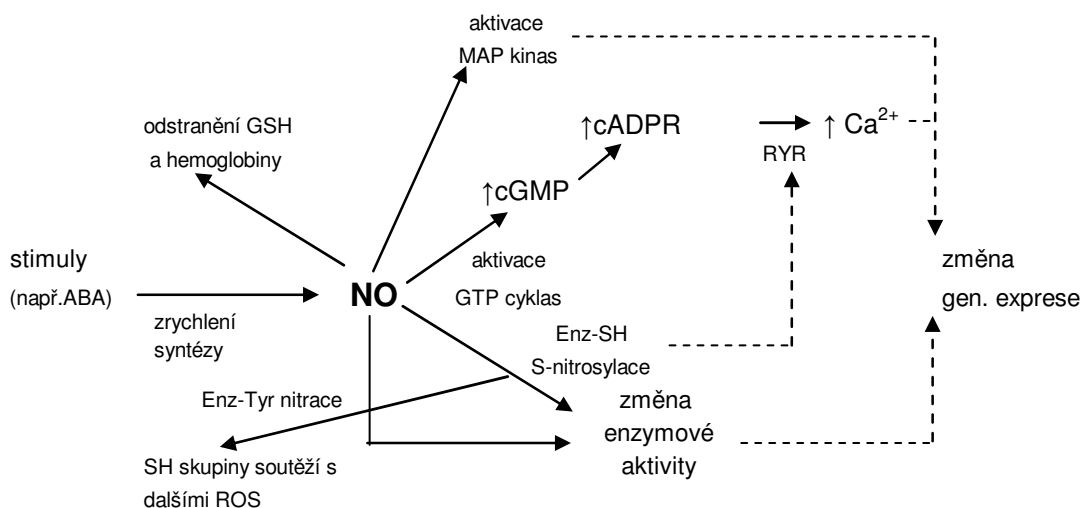
4.1 CHARAKTERISTIKA RNS

Reaktivní formy dusíku (RNS) jsou odvozeny od oxidu dusnatého (NO). NO se v plynném stavu chová jako volný radikál, který je nestabilní a reaktivní jen po krátkou dobu. Tento radikál může přijmout nebo ztratit jeden elektron za vzniku NO^- a NO^+ (Wilson et al., 2008). Produkce NO v rostlinách je založena na chemických reakcích. Významnou roli v produkci NO hrají dva enzymy NO syntasa (NOS) a nitrátreduktasa (NR) (Neil et al., 2008). NOS katalyzuje přeměnu L-argininu na hydroxylarginin a dále na citrulin a NO (Wilson et al., 2008). NR nejdříve katalyzuje přeměnu nitrátu na nitrit a ten následně na NO prostřednictvím NAD(P)H-dependentní reakce. Přehled potencionálních zdrojů NO je znázorněn na obr. 37a. NO je biologicky aktivní molekula, která je rychle metabolizována (Neil et al., 2008). Souhrn chemických a enzymatických reakcí vedoucích k odstranění NO je ukázán na Obr.37b. Specifický receptor NO nebyl v rostlinách identifikován. NO je malá nenabitá molekula schopná difúze a pohybu skrz membránu a akumulace v membráně. Dále je schopna interagovat a modifikovat řadu proteinů, proto je považována za molekulu schopnou signálního přenosu. Přehled signalizace cestou NO je přehledně shrnut v obrázku 38 (Neil et al., 2008; Wilson et al., 2008).





Obr.37 Tvorba (a) a odstranění (b) NO v rostlinných buňkách. NO může být tvořen z argininu enzymem NO syntasou; AtNOA1 je potřebná pro tento proces v *Arabidopsis*. NO může být dále tvořen z nitritu (NO_2^-) nitrátreduktasou (NR), nitrit:NO reduktasou (Ni-NOR). NO reaguje s kyslíkem a superoxidem. NO je metabolizován reakcí s hemoglobinem a reaguje s glutathionem za vzniku S-nitrosogluthionu (GSNO). GSNO je odbourán GSNO reduktasou, která hraje roli v regulaci signální sítě kontrolované kyselinou salicylovou (SA) (převzato z Neil et al., 2008).



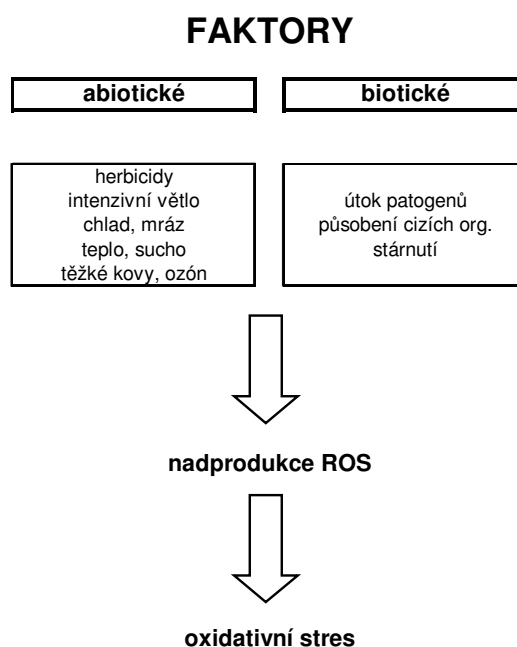
Obr.38 Přehled možných signálních mechanismů NO v rostlinách. Stimuly indukovaná produkce NO, aktivuje GTP cyklasy a vede k tvorbě cGMP, který indukuje uvolnění volných Ca^{2+} přes signalizaci cyklickou ADP-ribosou (cADPR). Společně s aktivací signální dráhy MAP kinas může docházet ke změně enzymové aktivity a genové exprese (převzato a upraveno z Wilson et al., 2008).

Studie Beligni & Lamattina, 2000 prokázala zapojení NO v reakcích rostlin na světlo. Byl potvrzen stimulační vliv NO na klíčení semen salátu, zapojení NO v de-etiolačním procesu u pšenice seté a dále byl prokázán inhibiční vliv na elongaci hypokotylu a internód u *A. thaliana*. Signální dráhy NO a fytochromů mohou být teoreticky propojeny, protože vlastní společné signální komponenty: heterotrimerní G-

proteiny, cGMP, Ca^{2+} a kalmodulin. Přítomnost Ca^{2+} a kalmodulinu může také vysvětlit společný efekt NO a stresu na de-etiolaci.

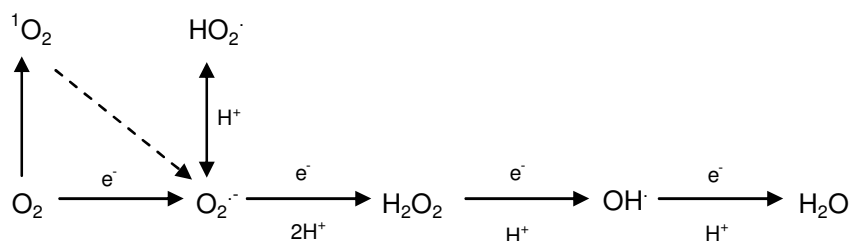
4.2 CHARAKTERISTIKA ROS

Rostliny jsou v průběhu života vystavovány celé řadě stresových faktorů (např. intenzivní světlo, teplo, chlad, mráz, těžké kovy, napadení patogenem), které u nich mohou způsobit poškození různého rozsahu (od poškození orgánů až po buněčnou smrt). Tyto faktory mohou vyvolat oxidativní stres, který se projevuje nadměrnou tvorbou tzv. reaktivních forem kyslíku (ROS) (Obr.39). Ochranu před oxidativním stresem ROS umožňuje celá řada antioxidačních systémů, které se vyskytují v různých částech buňky (Piterková et al., 2005).



Obr.39 : Schéma vzniku oxidativního stresu (převzato z Piterková et al., 2005)

ROS jsou částečně redukované formy atmosférického kyslíku (O_2), které narozdíl od něj mohou velmi snadno oxidovat různé buněčné komponenty. Mezi ROS patří singletový kyslík $^1\text{O}_2$ vycházející z excitace O_2 , dále superoxidový radikál O_2^- , peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál OH^\cdot , které vznikly po přenosu jednoho, dvou nebo tří elektronů na kyslík (Mittler, 2002) (Obr.40).



Obr.40 Reakční schéma tvorby ROS z kyslíku (O_2). Základní stav O_2 může být aktivován příjmem energie vedoucí k obrácení spinu 1 nepárového elektronu způsobující tvorbu singletového kyslíku ($^1\text{O}_2$). 1-elektronová redukce O_2 vede ke vzniku superoxidového radikálu ($\text{O}_2\cdot^-$), který existuje v rovnováze s hydroxyperoxidovým radikálem ($\text{HO}_2\cdot$). Následující redukční reakce vedou ke vzniku peroxidu vodíku (H_2O_2), hydroxylovému radikálu ($\text{OH}\cdot$) a vodě (H_2O) (převzato a upraveno z Vranova et al., 2002).

Tvorba ROS je za normálních podmínek nízká, ale při narušení buněčné rovnováhy vlivem stresových faktorů dochází k nadměrnému zvýšení koncentrace ROS v buňce. ROS jsou nejen toxické meziprodukty aerobního metabolismu vyvolávající poškození, jako je lipidická peroxidace, inaktivace enzymů, oxidace proteinů, poškození DNA a RNA nebo až apoptózu buňky. ROS jsou také signální molekuly kontrolující obranné procesy, hrající důležitou roli při programované buněčné smrti a strukturálním zesílení rostlinné buněčné stěny. ROS působí toxicky na patogenní organismus (Piterkova et al., 2005). Biologická role ROS je přehledně popsána v tabulce č.5.

Produkce ROS v buňce se účastní řada enzymatických a neenzymatických systémů (Hudcovská, 2002). Neenzymatické systémy zahrnují metabolické reakce jako je např. redukce kyslíku v elektronovém transportním řetězci v mitochondriích, fotolýza vody během elektronového transportního řetězce a excitace chlorofylu v chloroplastech, β -oxidace mastných kyselin a glyoxylátový cyklus v peroxisomech atd. (Mitler, 2002; Piterkova et al., 2005). Do skupiny enzymatických systémů patří enzymy xantinoxidasa, lipoxygenasa, oxalát oxidasa a NADPH oxidasa (Tab.6) (Piterková et al., 2005). Produkce a tvorba jednotlivých forem ROS je znázorněna v tabulce 5.

Tab.5 Zdroje, lokalizace a biologická role ROS (převzato a upraveno z Piterkova et al., 2005; Triantaphylides & Havaux, 2009).

ROS	zdroje	lokalizace	biologická role
<i>superoxidový radikál</i> $O_2^{\cdot-}$	fotosyntetický ET řetězec	CH	peroxidace lipidů
	respirační ET řetězec	M	inaktivace enzymů
	NADPH-oxidasa	PM	depolymerizace polysacharidů
	xantinoxidasa	PE	oxidace síry, askorbátu a NADPH
	peroxidasy (Mn, NADH)	BS	redukce cytochromu c a iontů kovů
<i>peroxid vodíku</i> H_2O_2	glykolátoxidasa	PE	inhibice fixace CO_2
	β -oxidace mastných kyselin	PE	inaktivace enzymů Calvinova cyklu
	oxalátoxidasa	A	oxidace sulfhydrilů a flavonolů
	peroxidasy (Mn, NADH)	BS	substrát oxidační reakce
	aminoxidasy	A	
<i>hydroxylový radikál</i> OH^{\cdot}	Haber-Weissova reakce		velmi silné oxidační činidlo
	Fentonova reakce		poškození DNA, peroxidace lipidů degradace proteinů
<i>singletový kyslík</i> 1O_2	excitované chlorofylové molekuly v tripletovém stavu	CH	mutageneze peroxidace lipidů reakce s AMK (Tyr, Met a Cys), thioly (glutathion), DNA báze a sekundární metabolity (např. terpeny)
	Zkratky: A – apoplast, BS - buněčná stěna, ET –elektronový transportní, CH – chloroplast, M –mitochondrie, PE - peroxisomy, PM - plasmatická membrána		

Tab.6 Tvorba ROS prostřednictvím enzymatických reakcí (převzato a upraveno z Blokhina et al., 2003; Piterkova et al., 2005)

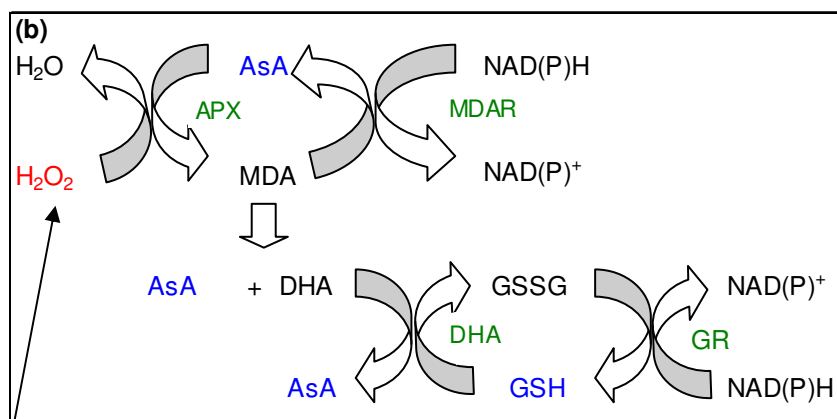
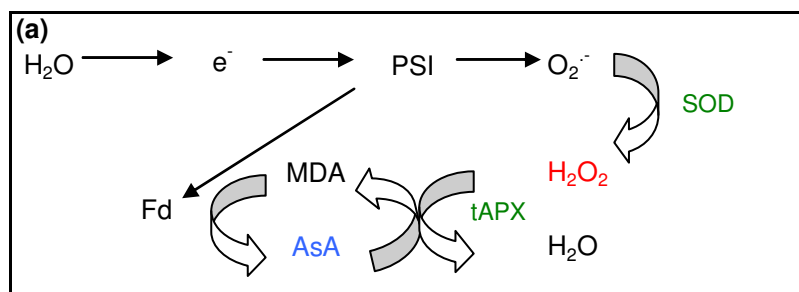
enzym	vznik ROS	lokalizace
xantinoxidasa	xanthin \rightarrow močovina + $O_2^{\cdot-}$	peroxisomy
lypoxigenasa	$PNMK + X \rightarrow PNMK^{\cdot} + X-H$	plasmatická membrána
oxalátoxidasa	$HOOC-COOH + O_2 \rightarrow 2 CO_2 + H_2O_2$	apoplast
NADPH oxidasa	$NADPH + 2 O_2 \rightarrow 2 O_2^{\cdot-} + NADP^+ + H^+$	plasmatická membrána
glykolátoxidasa		peroxisomy
aminoxidasa	$RCH_2NH_2 + O_2 + H_2O \rightarrow NH_3 + H_2O_2$	apoplast
Zkratky: PNMK - polynenasycené mastné kyseliny		

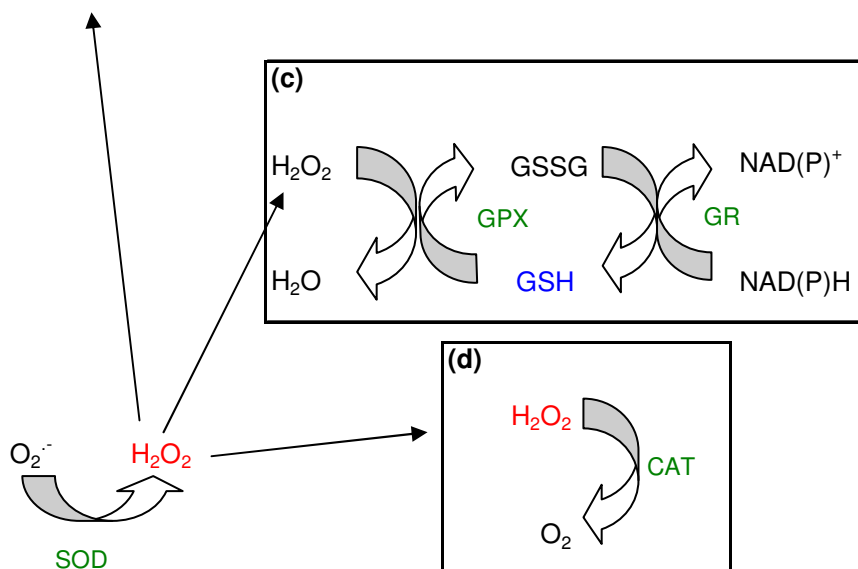
Rostliny si vyvinuly enzymatické a neenzymatické systémy sloužící k odstranění vznikajících ROS. Mezi neenzymatické antioxidanty hlavně patří glutathion, kyselina askorbová, tokoferol a karotenoidy (Tab.7). K enzymům s antioxidačním účinkem se řadí superoxiddismutasa (SOD), askorbátperoxidasa (APX), katalasa (CAT), glutathionreduktasa (GR) atd. (Hung et al., 2005; Piterková et al., 2005) (Tab.6).

Tab.7: Neenzymatické a enzymatické systémy regulace tvorby ROS (převzato a upraveno z Mittler, 2002).

Antioxidanty	Lokalizace	Forma ROS
neenzymatické		
kyselina askorbová	CH, C, M, PE, A	H_2O_2 , $O_2^{\cdot -}$
glutathion	CH, C, M, PE, A	H_2O_2
α -tokoferol	membrány	ROOH, 1O_2
karotenoidy	CH	1O_2
enzymatické		
superoxiddismutasa	CH, C, M, PE, A	$O_2^{\cdot -}$
askorbátperoxidasa	CH, C, M, PE, A	H_2O_2
katalasa	PE	H_2O_2
glutathionperoxidasa	C	H_2O_2 , ROOH
peroxidasy	BS, C, V	H_2O_2
Zkratky: A - apoplast, BS - buněčná stěna, C - cytosol, CH - chloroplast, M - mitochondrie, P - peroxisomy, V - vakuola		

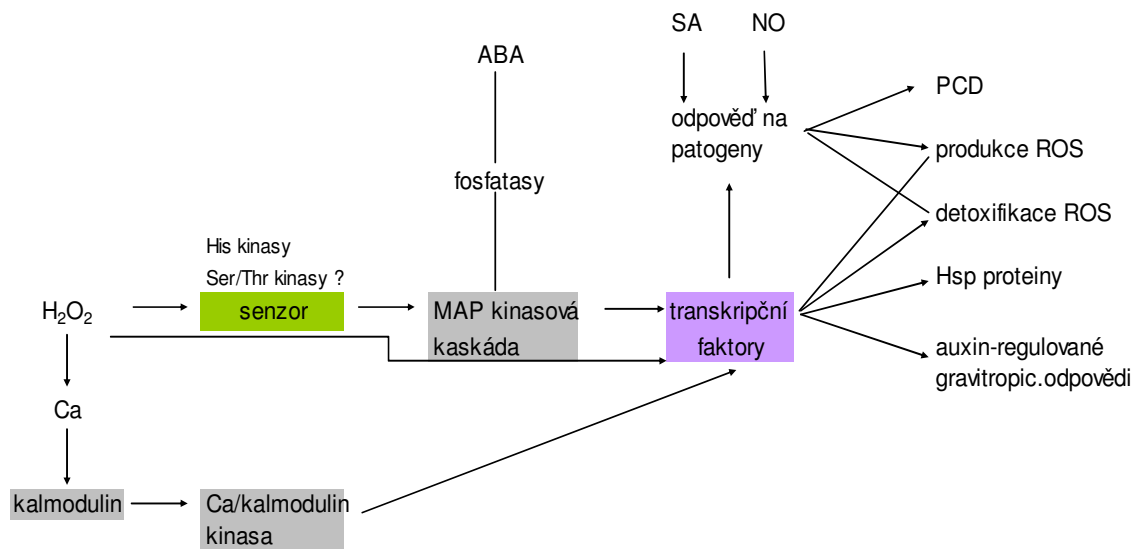
ROS vykazují u rostlin dvojí úlohu, jedná se o toxické sloučeniny a dále se mohou podílet na signalizaci. Existují dva různé mechanismy regulace vnitrobuněčné koncentrace ROS. První umožňuje správně modulovat nízkou hladinu ROS pro signální účely (zapojení APX), zatímco další reguluje nadměrné množství ROS za stresových podmínek (účast CAT). Hlavní rostlinné ROS-odstraňující dráhy se nacházející v různých buněčných kompartmentech (Mittler 2002) (Obr.41).





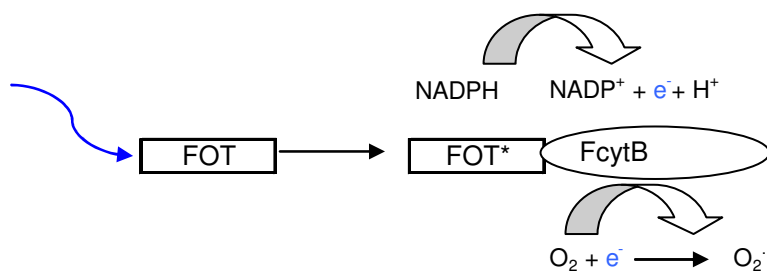
Obr.41 Dráhy odstraňující ROS v rostlinách. (a) Zapojení SOD. (b) Askorbát-glutathionový cyklus. (c) Glutathionperoxidásový (GPX) cyklus. (d) Katalasa (CAT). SOD působí jako první linie obrany přeměňující O_2^- na H_2O_2 . APX, GPX a CAT dále detoxifikují H_2O_2 . Ve srovnání s CAT (d), APX a GPX potřebuje askorbát (AsA) a glutathion (GSH) regenerující cyklus (a-c). Tento cyklus používá elektrony přímo z fotosyntetického aparátu (a) nebo NAD(P)H (b,c) jako redukující sílu. ROS jsou označeny červeně, antioxidanty modře a ROS-odstraňující enzymy zeleně. Zkratky: DHA – dehydroaskorbát, DHAR – DHA reductasa, Fd – ferredoxin, GR – glutathionreduktasa, GSSG – oxidovaný glutathion, MDA – monodehydroaskorbát, MDAR – MDA reductasa, PSI – fotosystém I, tAPX – tylakoid-vázající APX (převzato a upraveno z Mittler, 2002).

Nejstabilnější forma ROS je H_2O_2 , jehož hladina kolísá místně i časově vlivem okolních změn, je se účastní signálního přenosu. H_2O_2 jako signální molekula ovlivňuje expresi genů kódujících proteiny s různou funkcí účastnících se např. řady metabolických drah, produkce energie, cílení proteinu a transportu, buněčné organizace a biogeneze, buněčné ochrany a transkripce (Hung et al., 2005). Schéma signalizace H_2O_2 je na Obr.42.



Obr.42 Model signalizace H_2O_2 při oxidativním stresu. H_2O_2 se při oxidativním stresu tvoří díky NADPH oxidase vázané na plasmatickou membránu, která se aktivuje po příjmu Ca^{2+} iontů. Detekce H_2O_2 histidinkinasami nebo 2C serin/threonin fosfatase vede v aktivaci kaskády MAP kinas a skupiny transkripčních faktorů kontrolující různé buněčné dráhy. Zachycení H_2O_2 je také spojeno se změnami v hladině Ca^{2+} a kalmodulinu a s aktivací nebo indukci Ca^{2+} - kalmodulin kinas, která může aktivovat nebo potlačovat aktivitu transkripčních faktorů. H_2O_2 také přímo interaguje s cysteinovými residui v proteinech (transkripční faktory) způsobující změnu proteinové konformace, která ovlivňuje proteinovou aktivitu a tím zahajuje buněčnou odpověď. Regulace genové exprese různými transkripčními faktory vede v indukci různých obranných drah jako je detoxifikace reaktivních kyslíkatých sloučenin, heat-shock proteiny (Hsp) a v potlačení některých ROS-produkujících mechanismů a fotosyntézy. Z modelu je vidět také spojení s patogenní signální transdukční dráhou v rostlinách, která může záviset na rozpoznání „gen-gen“mechanismem a může vést k opačnému vlivu na regulaci produkce a detoxifikace ROS a k aktivaci programované buněčné smrti (PCD). Oxid dusnatý (NO) a kyselina salicylová (SA) jsou klíčovými regulátory této odpovědi. H_2O_2 má také roli v přenosu ABA signálu prostřednictvím negativní regulace aktivity 2C serin/threonin proteinfosfatas, což může ovlivňovat otvírání průduchů a genovou expresi (převzato a upraveno z Mitler, 2002; Hung et al., 2005).

Laloraya a spol. potvrdili, že formy ROS, konkrétně superoxidový radikál a peroxid vodíku mohou být zahrnuty v procesu fototropismu závislém na modrém světle v koleoptilových špičkách (Laloraya et al., 1999). V této studii byl zkoumán efekt vybraných inhibitorů „blue light syndrome“, thiolových blokátorů a redukčních činidel (NADPH) na produkci a inhibici superoxidového radikálu v rostlinách *Sorghum bicolor* a *Tritium vulgare*. NADPH stimuluje tvorbu $O_2^{\cdot-}$ závislou na modrém světle (Obr. 43). Inhibitory „blue light syndrome“ a thiolové blokátory v přítomnosti redukčního činidla inhibují tvorbu $O_2^{\cdot-}$.



Obr.43 Schéma produkce O_2^- indukované modrým světlem. Modré světlo excituje fotoreceptor, který je spojen s membránově-vázaným flavocytochromem b, který v přítomnosti donoru elektronu NADPH redukuje molekulární kyslík na O_2^- . Zkratky: FOT - fotoreceptor Fcyt B – flavocytochrom (převzato z Laloraya et al., 1999).

5 VZTAH SVĚTLA A HEAT SHOCK PROTEINŮ

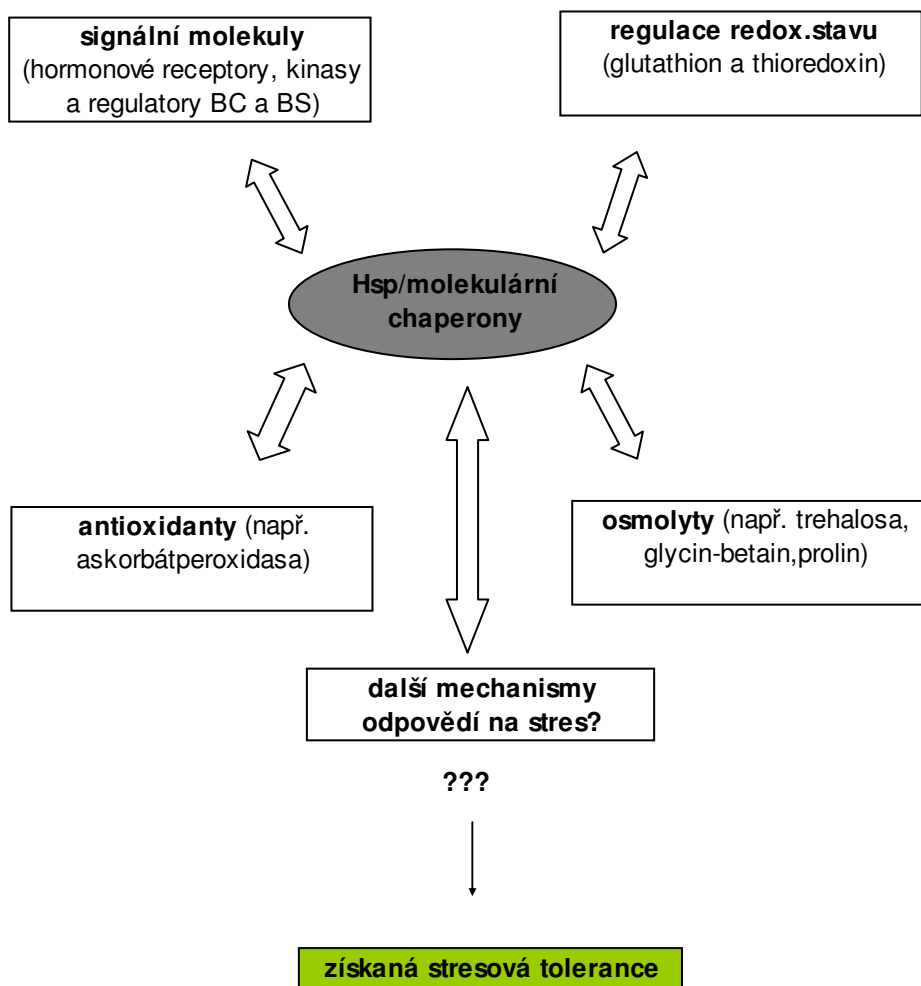
Heat-shock proteiny patří do pětičlenné rodiny Hsp/chaperonů, kam se řadí: rodina Hsp70 (DnaK); chaperoniny (GroEL a Hsp60); rodina Hsp90; rodina Hsp100 (Clp) a rodina malých Hsp (sHsp). Tyto proteiny se nacházejí v mnoha částech buňky podílí na celé řadě dějů: skládání proteinů, translokace a degradace v mnoha buněčných procesech, stabilizace proteinů a membrán a pomoci při znovusložení proteinů za stresových podmínek. Shrnutí vlastností jednotlivých tříd Hsp/chaperonů je znázorněno v tabulce 8. Různé třídy rodiny Hsp/chaperonů spolupracují při ochraně buňky a mají doplňující a překrývající role v ochraně proteinů proti stresu a spojují se s dalšími stresovými odpověďmi (Wang, et al, 2004)(Obr. 44).

Produkce Hsp je ovlivněna nejen teplotou, ale také dalšími typy stresů zahrnujícími rovněž vliv intenzivního světla. Intenzivní světlo vyvolává fotoinhibici vedoucí k omezení fotosyntézy. Dochází k narušení fotosyntetického elektronového transportu a poškození reakčních center. Tento stav může být dále zhoršen vlivem vysoké teploty. Světelná indukce Hsp může pomoci při ochraně rostliny před poškozujícími efekty nadměrného ozáření (Barua & Heckathorn, 2005).

Studie Barua a Heckathorn z roku 2005 potvrzuje, že interakce vysoce intenzivního světla a vysokých šokových teplot způsobuje zvýšení akumulace Hsp proteinů v laboratorních i přirozených podmínkách. Dále bylo zjištěno, že teplotně-nezávislá světelná indukce je specifická jen pro určité typy Hsp proteinů a funkce fotosystému II se snižuje se zvýšenou hladinou světla a teploty.

Tab.8 Pět hlavních tříd rostlinných Hsp/molekulárních chaperonů, jejich lokalizace a funkce (Wang, et.al, 2004).

Třída	Lokalizace	Hlavní funkce
Hsp70	C, CH, M, ER	zabránění agregaci pomoc při znovusložení import a translokace signální přenos transkripční aktivace
Chaperoniny/Hsp60	CH, M, C	skládání a pomoc při znovusložení
Hsp90	C, CH, M, ER	usnadění zrání signální molekuly genetické vyrovnávání
Hsp100/Clp	C, CH, M	desagregace, rozvinutí
sHsp	C, CH, M, ER membrány	zabránění agregaci stabilizace nezralých proteinů
Zkratky: C - cytosol, ER - endoplasmatické retikulum, CH-chloroplast, M - mitochondrie		



Obr. 44: Interakce Hsp/chaperonové sítě s dalšími mechanismy odpovědi na stres. Získaná stresová tolerance v rostlinách je často výsledkem různých mechanismů, které působí koordinovaně nebo součinně při ochraně před buněčným poškozením a při obnovení homeostázy. Hsp/chaperony se podílejí na šíření stresového signálu a genové aktivaci, ale také na regulaci redoxního stavu. Dále interagují s osmolyty a antioxidanty. Zkratky: BC - buněčný cyklus; BSM – buněčná smrt (převzato a upraveno z Wang et al., 2004).

Produkce Hsp je ovlivněna nejen teplotou, ale také dalšími typy stresů zahrnujícími rovněž vliv intenzivního světla. Intenzivní světlo vyvolává fotoinhibici vedoucí k omezení fotosyntézy. Dochází k narušení fotosyntetického elektronového transportu a poškození reakčních center. Tento stav může být dále zhoršen vlivem vysoké teploty. Světelná indukce Hsp může pomoci při ochraně rostliny před poškozujícími efekty nadměrného ozáření (Barua & Heckathorn, 2005).

Studie Barua a Heckathorn z roku 2005 potvrzuje, že interakce vysoce intenzivního světla a vysokých šokových teplot způsobuje zvýšení akumulace Hsp proteinů v laboratorních i přirozených podmínkách. Dále bylo zjištěno, že teplotně-nezávislá světelná indukce je specifická jen pro určité typy Hsp proteinů a funkce fotosystému II se snižuje se zvýšenou hladinou světla a teploty.

EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

6 MATERIÁL A METODY

6.1 Chemikálie

Anti-aktinová (plant, clone 10 B-3) monoklonální protilátka (mouse IgG) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), anti-Hsp70 monoklonální protilátka (mouse IgG) (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), anti-myší imunoglobulin G, konjugát alkalická fosfatasa (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), akrylamid (Bio-Rad, USA), BioSafe Coomassie (Bio-Rad, USA), bromfenolová modř (Lach-Ner, ČR), butanol (Lach-Ner, ČR), butylhydroxytoluen (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), N-cyklohexyl-3-aminopropansulfonová kyselina (Randox, UK), dihydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, ČR), dithiothreitol (Duchefa, Nizozemí), dodecylsulfát sodný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, ČR), dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného (Lach-Ner, ČR), 2,2-difenyl-1-pikryl-hydrazyl (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), ethanol (Lach-Ner, ČR), ethylendiamintetraoctová kyselina (Randox, UK), ethylendiamintetraoctová kyselina (Sigma-Aldrich Chemie, Německo) floroglucinol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), Folin-Ciocalteuovo činidlo, glutathion oxidovaný (Randox, UK), fytoagar (Duchefa, Nizozemí), glycerol (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), glycin (MP Biomedicals, USA), guajakol (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), hovězí sérový albumin (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), hydrogenfosforečnan sodný (Lach-Ner, ČR), hydroxid draselný, (Lach-Ner, ČR) Hsp70 z hovězího mozku (Sigma-Aldrich Chemie, ČR), chlorid sodný (Lach-Ner, ČR), 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium-chlorid (Randox, UK), K-fosfátový pufr (Randox, UK), kyselina askorbová (Duchefa, Nizozemí), kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, ČR), kyselina kávová (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), kyselina fosforečná (Lach-Ner, ČR), kyselina 2-thiobarbiturová (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), kyselina trichloroctová (Lach-Ner, ČR), 2-merkptoethanol (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, Německo), 2-(N-morfolino)ethanolsulfonové kyselina (Duchefa, Nizozemí), methanol (Lachema, ČR), monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného (Lachema, ČR), mořský písek (Lach-Ner, ČR), Murashige & Skoog medium (Duchefa, ČR), nikotinamidadenindinukleotid redukovaný (Randox, UK), NBT-BCIP roztok (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, ČR), N, N'-metylenbisakrylamid (MP Biomedicals, USA), N, N'-methylendiamin (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, ČR), pefabloc (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, ČR), peroxid vodíku 30% (Lach-Ner, Česká republika), persíran amonný (značka Fluka; dodala Sigma-Aldrich Chemie, ČR), polyvinylpyrrolidon (Sigma-Aldrich Chemie, ČR),

sacharosa (Lach-Ner, ČR), syringaldazin (Sigma-Aldrich Chemie, ČR), 1,1,3,3 – tetraethoxypropan (Sigma-Aldrich Chemie, ČR), tris (hydroxymethyl) aminoethan (MP Biomedicals, USA), Triton-X-100 (Koch-light laboratories ltd, UK), Tween 20 (Sigma-Aldrich Chemie, Německo), uhlíčitán sodný (Lach-Ner, ČR), xantin (Randox, UK), xantinoxidasa (Randox, UK), želatina (Sigma-Aldrich Chemie, Německo).

6.2 Přístroje a experimentální vybavení

Akumulátorový vrtací šroubovák (Čína), analytické váhy (Sartorius, Německo), automatické pipety (Eppendorf, Německo), digitální pH metr WTW 526 (InoLab, Německo), digitální předvážky (KERN, Německo), dokumentační systém UVP (MultiSpectral Imaging System, USA), elektrický zdroj POWER PAC 300 (BioRad, USA), elektrický zdroj 1000/500 Power Supply (BioRad, USA), elektromagnetická míchačka IKA (Labortechnik, Německo), chlazená centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), mikrodestičkový spektrofotometr Reader Synergy HT (BioTek Instruments, USA), lightWave II UV-Vis II diode array UV/Visible spectrophotometer (WPA) with portable stirring plates IKA lab disc, kultivační box s bílým světlem, modrým a červeným světlem (Percival, USA), stolní odstředivka (MPV) (Snijders, Nizozemí), třepačka IKA VIBRAX-VXR (Labortechnik, Německo), termoblok (Grant–Boeckel, UK), vortex (STUART, UK).

6.3 Rostlinný materiál

6.3.1 Charakterizace použitých rostlin

Byly studovány dva genotypy *Solanum lycopersicum* Mill., wild-type WT a recesivní „single gene“ mutant *7B-1* (Obr.45). *7B-1* je samčí sterilní mutant závislý na fotoperiodě. Za dlouhých dnů jsou jeho květy male-sterilní a má scvrklé tyčinky a neviditelné spory, zatímco za krátkých dnů je hodně květů fertilní a tvoří normální



tyčinky a viditelné spory. Bylo zjištěno, že *7B-1* mutant je odolný k abiotickému stresu (salinitní, osmotický a nízkoteplotní stres). Dále tento mutant vykazuje sníženou deetiolaci hypokotylu ve srovnání s WT (Fellner et al., 2001).

Obr.45 Fotografie genotypů *S. lycopersicum* WT a *7B-1* (převzato z Fellner et al., 2005).

Před výsevem byla semena sterilizována 3 % roztokem Sava po dobu 20 min a poté několikrát důkladně propláchnuta sterilní vodou. Semena byla pokládána pomocí sterilní pinzety na připravený agar v Petriho miskách (příprava 6.3.2). Všechny tyto procesy byly prováděny ve sterilním prostředí flowboxu. Misky byly zajištěny proti odpařování roztoku páskou a přeneseny do pěstebních boxů.

6.3.2 Pěstování rostlin ve sterilních podmínkách

Médium pro pěstování *S. lycopersicum* obsahovalo 20 g sacharosy, 8,6 g média Murashige & Skoog a 390,4 mg 2-(N-morfolino) ethanolsulfonové kyseliny ve 2 l vody. pH tohoto roztoku bylo upraveno 1 M KOH na hodnotu 6,1. Ke 400 ml takto připraveného živného roztoku bylo přidáno 2,8 g agaru. Láhve s kompletním médiem byly následně vyautoklávovány a uskladněny v lednici.

6.3.3 Podmínky pěstování

Do každé Petriho misky s agarem obsahujícím živné medium bylo vyseto 30 semen, poté byly misky umístěny do pěstebních boxů s bílým, modrým a červeným světlem při teplotě 23°C a vlhkosti 40 %. Část misek byla zabalena do alobalu (příprava etiolovaných rostlin) a uchovány v některém z boxů.

6.3.4 Teplotní stres

Aplikace teplotního stresu byla realizována vystavením 1/2 připravených Petriho misek se semenáčky WT a 7B-1 teplotě 42°C po dobu 2 h. Druhá část misek se semenáčky byla pěstována za standardních teplotních podmínek. Misky se semenáčky *S. lycopersicum* byly vloženy do mikroténových sáčků, poté byly ponořeny do termostatu vyhřátého na 42°C, který byly umístěn v boxech pro bílé, modré a červené světlo. Po dvou hodinách byly misky vytaženy z termostatu, a dále pěstovány za standardních teplotních podmínek.

6.4 Použité metody

6.4.1 Stanovení klíčivosti

Klíčivost semen byla stanovena standardním postupem. Na všech Petriho miskách byla spočítána 10 dnů po výsevu všechna vyklíčená semena *S. lycopersicum* genotypů WT a 7B-1. Ve vztahu k celkovému počtu vyšetřovaných semen byla zjištěna úroveň klíčivosti v procentech.

6.4.2 Stanovení základních popisných parametrů charakterizujících semenáčky

Desátý den po výsevu semen byla stanovena délka kořene, délka stonku a hmotnost celé rostliny. Naměřené hodnoty byly zprůměrovány a vypočítána směrodatná odchylka. Rostliny byly sesbírány, rychle zamrazeny a uloženy při -80 °C.

6.4.3 Stanovení Hsp70 a aktinu

Rostlinné extrakty byly připraveny pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku v „R“ roztoku v poměru 1:2 (v:w). „R“ roztok obsahuje 1 díl pufru pro přípravu vzorků na SDS PAGE, 1 díl 10% SDS a 1 díl 0,1M Tris/HCl pufru, pH 7. Složení pufru pro přípravu vzorků na SDS PAGE je uvedeno v tabulce 9. Extrakt byl centrifugován 20 min při 16 000 g, při 4°C. Supernatant byl odebrán a zamražen při -80°C.

Detekce Hsp70 a aktinu byla provedena metodou Western blot, která umožňuje přenos již rozdělených proteinů (SDS PAGE) z gelu na membránu vlivem jednosměrného proudu. Samotná detekce Hsp70 je založena na interakci proteinu Hsp70 s primární monoklonální myší protilátkou anti-Hsp70. Proteiny byly separovány pomocí elektroforetické metody SDS-PAGE v 7% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a 4% zaostřujícím gelu, pH 6,8. Dělení proteinů v zaostřovacím gelu probíhalo při 120 V a po doputování bromfenolové modři na rozhraní dělicího a zaostřujícího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V. Složení pufrů pro SDS-PAGE je uvedeno v tabulce 9. Rozdělené proteiny byly přeneseny na nitrocelulóзовou membránu (4 gely, 128 mA, 2 h). Po přeblotování proteinů byly membrány inkubovány 16 h ve 3 % želatině v TBS. Následovala inkubace s anti-Hsp70 monoklonální myší protilátkou (detekce Hsp70) (ředění 1:1500) nebo primární anti-aktin monoklonální myší protilátkou (ředění 1:1500)

v 1% želatiny v TBS 2 hodiny. Po 2x promytí roztokem Tween-20 v TBS byly membrány inkubovány 2 hodiny se sekundární anti-myší protilátkou značenou kyselou fosfátovou v 1% želatiny v TBS (ředění 1:3000). Opět proběhlo 2x promytí roztokem Tween-20 v TBS. Hsp70 byly vizualizovány chromogenním roztokem NBT/BCIP po dobu cca 10 min a vyhodnoceny dokumentačním systémem UVP programem pro analýzu a zpracování obrazu.

Tab. 9: Pufry pro SDS-PAGE a Western blot.

Pufr	Složení
Pufr na přípravu vzorků pro SDS- PAGE	0,125 M Tris/HCl, 4% (w/v) SDS, 20% (v/v) glycerol, 0,02% (w/v) bromfenolová modř
Pufr pro dělicí gel	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Pufr pro zaostřovací gel	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Elektrodový pufr	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 0,1 % (w/v) SDS pH, 8,3
Blotovací pufr	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, 20 % (v/v) methanol, pH, 8,3
Pracovní pufr pro imunodetekci TBS	20 mM Tris, 500 mM NaCl, pH 7,5
Pufr pro barvení (NBT/BCIP)	0,1M Tris; 0,1 M NaCl; 0,005 M MgCl ₂ , pH 9,5

6.4.4. Stanovení izoenzymového zastoupení peroxidas

Extrakty byly připraveny homogenizací rostlinného materiálu v 0,1 M K-fosfátovém pufru v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku. Extrakty byly centrifugovány 15 min při 15000 g a 4 °C. Supernatanty byly odebrány a zamraženy při -80 °C. Před použitím byly extrakty smíchány s 60% glycerolem v poměru 3:1 (v:v)

Zastoupení izoenzymů rostlinných peroxidas bylo detekováno metodou diskontinuální elektroforézy za nativních podmínek. Jednotlivé izoenzymy byly separovány v 8% dělicím polyakrylamidovém gelu, pH 8,8 a 4% zaostřujícím gelu, pH 6,8. Dělení proteinů v zaostřovacím gelu probíhalo při 100 V a po doputování bromfenolové modři na rozhraní dělicího a zaostřujícího gelu bylo napětí zvýšeno na 180 V. Složení pufrů pro nativní elektroforézu je znázorněno v tabulce 10. Rozdělené proteiny byly vizualizovány inkubací v roztoku 4-chlor-1-naftolu po dobu cca 10 min a vyhodnoceny dokumentačním systémem UVP programem pro analýzu a zpracování obrazu.

Tab. 10: Pufry pro nativní elektroforézu.

<i>Pufr</i>	<i>Složení</i>
Pufr pro dělicí gel	1,5 M Tris/HCl, pH 8,8
Pufr pro zaostřovací gel	0,5 M Tris/HCl, pH 6,8
Elektrodový pufr	0,025 M Tris, 0,192 M glycin, pH, 8,3

6.4.5 Stanovení guajakolperoxidasové aktivity (GPX)

Extrakce byla provedena pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) v 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7, který obsahuje 1 % polyvinylpyrrolidon (PVPP). Extrakty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatant byl odebrán a použit ke stanovení GPX aktivity. Před aplikací byly vzorky naředěny 0,1 M K-fosfátovým puftrem, pH 7 v poměru 1:2.

Guajakolperoxidasa katalyzuje oxidaci guajakolu v přítomnosti peroxidu vodíku za vzniku žlutohnědého tetraguajakolochinonu s absorbním maximem při 436 nm ($\epsilon = 4500 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). K měření aktivity GPX byl použit UV/Vis spektrofotometr. Reakční směs v kyvetě obsahovala 1ml 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 6, 0,4 ml 65,5 mM guajakolu a 0,3 ml vody (blank) nebo extraktu (teplota 25°C). Reakce byla startována 0,05 ml 175mM peroxidu vodíku. Změna absorbance byla měřena při 436 nm po dobu 1 min.

6.4.6 Stanovení askorbátperoxidasové aktivity (APX)

Extrakce byla provedena pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) v 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7, který obsahuje 1 % PVPP a 2mM kyselinu askorbovou. Extrakty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatant byl odebrán a použit ke stanovení APX aktivity. Před aplikací byly vzorky naředěny 0,1 M K-fosfátovým puftrem, pH 7 v poměru 1:2.

Askorbátperoxidasa katalyzuje redukci askorbátu (AsA) v přítomnosti H_2O_2 na dehydroaskorbát (DHA), což vede k poklesu absorbance při 290 nm ($\epsilon = 2800 \text{ mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$). Aktivita APX byla měřena na UV/Vis spektrofotometru. Reakční směs v kyvetě obsahovala 1 ml 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 7, 0,4 ml 2,18 mM askorbátu a 0,3 ml vody (blank) nebo extraktu, (teplota 25°C). Reakce byla startována 0,05 ml 3,5 mM peroxidu vodíku. Absorbance byla měřena při 290 nm po dobu 2 min.

6.4.7 Stanovení aktivity syringaldazinperoxidasy (SPOX)

Extrakce byla provedena homogenizací v 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7, který obsahuje 1 % PVPP v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku. Homogenáty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatanty byly odebrány a použity ihned k měření.

SPOX je enzym katalyzující oxidaci syringaldazinu za přítomnosti H₂O₂. Syringaldazin je analog monomeru ligninu a tato reakce je zahrnuta v syntéze ligninu. Při 530 nm je detekován nárůst absorbance - růžové zbarvení, což je přímo úměrné aktivitě syringaldazinperoxidasy (Quiroga et al., 2000). Do jamky mikrodestičky bylo aplikováno 100 µl 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 6, 2,5 µl 10,92 mM syringaldazinu a 67,5 µl vody (blank) nebo extraktu (teplota 30°C). Reakce byla startována 5 µl 1,75 mM 1,75 mM H₂O₂. Na mikrodestičkovém readeru byla stanovena změna absorbance při 530 nm ($\epsilon = 27000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

6.4.8 Stanovení aktivity katalasy (CAT)

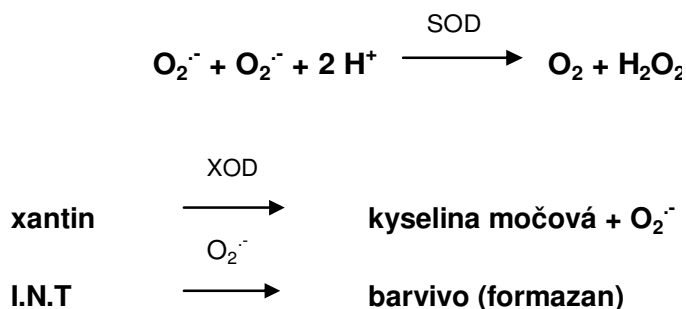
Extrakce byla provedena pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) v 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7, který obsahuje 1 % PVPP. Extrakty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatant byl odebrán a použit ke stanovení CAT aktivity.

Enzym CAT katalyzuje reakci rozkladu peroxidu vodíku na vodu a kyslík. Stanovení CAT aktivity je založeno na detekci poklesu absorbance při 240 nm ($\epsilon = 40\,000 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$). Aktivita CAT byla měřena na UV/Vis spektrofotometru. Reakční směs v kyvetě obsahovala 1 ml 0,1 M K-fosfátového pufru, pH 7, 0,85 ml vody a 0,3 ml extraktu nebo vody (blank). Reakce byla startována 0,05 ml 3,5 mM peroxidu vodíku. Změna absorbance byla měřena při 240 nm po dobu 5 min.

6.4.9 Stanovení aktivity superoxidodismutasy (SOD)

Extrakce byla provedena pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) v 0,1 M K-fosfátovém pufru, pH 7,5, který obsahuje 2mM EDTA-Na⁺, 1 % PVPP, 5 mM 2-merkaptomethanol, 2mM dithiotreitol a 0,5 mM pefabloc. Extrakty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatant byl odebrán a před stanovením aktivity SOD byl naředěn v poměru 1:22.

SOD katalyzuje dismutaci superoxidového radikálu ($O_2^{\cdot-}$) na H_2O_2 a O_2 . $O_2^{\cdot-}$ vzniká při přeměně xantinu na kyselinu močovou za katalýzy xantinoxidasy. Vzniklý radikál reaguje s 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium-chloridem (I.N.T.) za tvorby červeného formazanového barviva. Aktivita SOD je stanovena měřením stupně inhibice této reakce.



K měření byla použita kit-souprava Ransod, jejíž obsah a složení jednotlivých látek je popsán v tabulce 11.

Tab. 11: Roztoky použité pro stanovení aktivity SOD

<i>Látka</i>	<i>Počáteční koncentrace roztoku</i>
Mixovaný substrát	
xantin	0,05 mM
I.N.T	0,025 mM
Pufr	
CAPS	40 mM, pH 10,2
EDTA	0,94 mM
Xantinoxidasa	80 U/l
Standard	4,01 U/ml
Zkratky: CAPS -N-cyclohexyl-3-aminopropansulfonová kyselina; I.N.T - 2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium-chlorid	

Aktivita SOD byla měřena na UV/Vis spektrofotometru. Reakční směs v kyvetě obsahovala 30 μ l blanku (0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7) nebo standardu (S2-S6; tab. 11) nebo vzorku a 1 ml mixovaného substrátu (teplota 37 °C). Reakce byla startována přidávkem 150 μ l xantinoxidasy. Byla stanovena změna absorbance při 505 nm po 30 s a následně po 3 min.

Tab.12: Složení standardů pro stanovení kalibrační křivky

<i>Standard</i>	<i>Objem standardu</i>	<i>0,01 M K-fosfát.pufr</i>
S6	neředěný standard	-
S5	5 ml S6	5 ml
S4	5 ml S5	5 ml
S3	5 ml S4	5 ml
S2	3 ml S3	6 ml

6.4.10 Stanovení aktivity glutathionreduktasy (GR)

Extrakce byla provedena v 0,1 M K-fosfátový pufru, pH 7,5, který obsahuje 2mM EDTA-Na⁺, 1 % PVPP, 5 mM 2-merkaptomethanol, 2mM dithiotreitol a 0,5 mM pefabloc v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr) pomocí akumulátorového vrtacího šroubováku. Extrakty byly centrifugovány 20 min při 16000 g a při 4°C. Supernatant byl odebrán a zamražen na -80°C.

GR katalyzuje redukci glutathionu (GSSG) v přítomnosti NADPH. Stanovení aktivity je založeno na detekci poklesu absorbance při 340 nm ($\epsilon = 6220 \text{ mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).



K měření aktivity GR byla použita kit-souprava (Randox), jejíž obsah a složení jednotlivých látek je popsán v tabulce 12.

Tab.13: Roztoky použité pro stanovení aktivity GR

Látka	Počáteční koncentrace roztoku
Substrát	
GSSG	2,2 mM
Pufr	
fosfát draselný	250 mM, pH 7,3
EDTA	0,5 mM
NADPH	0,17 mM

Aktivita GR byla měřena na UV/Vis spektrofotometru. Reakční směs v kyvetě obsahovala 40 μl deionizované vody (blank) nebo vzorku a 1 ml substrátu (teplota 37°C). Reakce byla startována 200 μl NADPH. Byla stanovena změna absorbance při 340 nm po 5 min.

6.4.11. Stanovení lipidické peroxidace

Extrakty byly připraveny homogenizací rostlinného materiálu v extrakčním pufru v poměru 1:2 (w:v) (rostlinný materiál : extrakční pufr). Extrakční pufr byl 0,1 M K-fosfátový pufr, pH 7, který obsahoval 1% Triton X-100 a 0,01% butyl-hydroxytoluen. Centrifugace byla provedena při 16 000 g po dobu 20 min.

Při lipidické peroxidaci dochází k oxidaci polyneenasycených mastných kyselin, kde sekundárním koncovým produktem tohoto procesu je malondialdehyd (MDA), jeho koncentrace je považována za index lipidické peroxidace. Pro stanovení lipidické peroxidace byla zvolena metoda „thiobarbituric acid-reactive-substances“ (TBARS

assay), která je založena na reakci malondialdehydu (MDA) s kyselinou 2-thiobarbiturovou, která absorbuje při 532 nm (Hodges D. M. et al., 1999).

Pro stanovení lipidické peroxidace byly připraveny zásobní roztoky: činidlo A (20 % kyselina trichloroctová, 0,01 % butyl-hydroxytoluen), činidlo B (20 % kyselina trichloroctová, 0,01 % butyl-hydroxytoluen a 0,65 % 2-thiobarbiturová kyselina) a standard 1 mM 1,1,3,3 – tetraethoxypropan (MDA). Do eppendorfky bylo napipetováno 300 μ l extraktu a 300 μ l činidla A nebo B. Tyto roztoky byly inkubovány 20 min při 60°C, následně ochlazeny a centrifugovány 20 min při 16 000 g. Supernatant byl odpipetován a použit k měření. Do jamky na mikrodestičce bylo aplikováno 200 μ l supernatantu a na mikrodestičkovém readru byla změřena absorbance při 400, 532 a 600 nm. Kalibrace metody byla provedena ředěním 1 mM roztoku MDA (Tab. 14). Do jamky bylo pipetováno 100 μ l roztoku standardu a 100 μ l činidla A nebo B, mikrodestička s roztoky byla inkubována při 60°C 20 min. Následně po ochlazení na pokojovou teplotu byla stanovena absorbance při 400, 532 a 600 nm.

Tab.14 Ředění roztoků MDA pro kalibraci metody TBARS

koncentrace (μ M)	V (1mM MDA)	V (H ₂ O)
10	10 μ l	990 μ l
7.5	7,5 μ l	992,5 μ l
5	5 μ l	995 μ l
2.5	2,5 μ l	997,5 μ l
1	1 μ l	999 μ l
0.5	0,5 μ l	999,5 μ l
0.1	0,1 μ l	999,9 μ l

6.4.12 Stanovení volných fenolů

Rostlinný materiál byl homogenizován v třecí misce v 50% methanolu v poměru 1:6 s mořským pískem. Vzniklá směs byla inkubována v termostatu při teplotě 90°C po dobu 90 min. Vzorky byly centrifugovány 15 min při 14000 g. Supernatant byl odpipetován do nových eppendorfek a připraven k měření.

Detekce volných fenolů je založena na oxidaci fenolů v alkalickém prostředí Folin-Ciocalteuovým činidlem, které mění žluté zbarvení na modré. Alkalické prostředí bylo zajištěno prostřednictvím uhličitanu sodného a jako standardní fenolická látka byla použita kyselina kávová. Absorbance kyseliny kávové byla měřena při 740 nm (Cicco et al., 2009).

Pro toto stanovení byl použit roztok Folin-Ciocalteuova činidla a 5% (w/v) Na₂CO₃. Kalibrace metody byla provedena pomocí koncentrační řady kyseliny kávové (Tab. 15). Do eppendorfky bylo napipetováno 100 μ l vody (blank) nebo

standardu nebo vzorku a 100 μl Folin-Ciocalteuova činidla. Po 2 min bylo přidáno 800 μl 5% Na_2CO_3 a tato směs byla protřepána a inkubována při 40°C po dobu 20 min. Obsah eppendorfek byl zchlazen na ledu a rozpipetován na mikrotitrační destičku. Na mikrodestičkovém readeru byla změřena absorbance kyselina kávové při 740 nm.

Tab. 15: Ředění kyseliny kávové pro kalibraci metody

koncentrace (mg/l)	V (1 mM k. kávová)	V (H_2O)
10	10 μl	990 μl
25	25 μl	975 μl
50	50 μl	950 μl
75	75 μl	925 μl
100	100 μl	900 μl
150	150 μl	850 μl

6.4.13 Stanovení obsahu ligninu

0,1 g rostlinného materiálu bylo homogenizováno ve vařící vodě s mořským pískem. Směs byla centrifugována při 10 000 g 15 min. Po odstranění supernatantu byl pelet promyt v eppendorfci 1 ml 96% ethanolu a vysušen v sušárně. Vysušený zbytek byl rozpuštěn ve 2,5 ml směsi HCl /EtOH v poměru 1:1. Směs byla poté centrifugována a rozpipetována do nových eppendorfek pro měření.

Pro vlastní měření byl připraven roztok 10% (w/v) floroglucinolu ve směsi HCl /EtOH v poměru 1:2. Jedna eppendorfka od každého vzorku byla ponechána jako blank. Do dalších eppendorfek bylo k 1,05 ml extraktu přidáno 20 μl 10% floroglucinolu. Po 12 h inkubaci při pokojové teplotě byla změřena absorbance při 540 nm.

7 VÝSLEDKY

8 DISKUZE

Hlavním cílem předložené diplomové práce bylo studium vlivu světelných podmínek na klíčení semen a vývoj rostliny, aktivaci antioxidantních mechanismů, lignifikaci a produkci Hsp70 u rostlin *S. lycopersicum* WT a *7B-1*. Součástí diplomové práce byla rovněž studie zaměřená na vliv krátkodobého teplotního stresu za daných světelných podmínek na vybrané studované parametry.

8.1 Vliv světelných podmínek

8.1.1 Vliv světla na klíčivost a vývoj rostliny

Rostlina *S. lycopersicum* je zemědělsky významná plodina, jejíž roční produkce byla v roce 2006 až 120 mil. tun a v roce 2008 až 130 mil. tun (Bergougnoux et al. 2009, FAOSTAT - Crop statistics). V rámci diplomové práce byly studovány genotypy *S. lycopersicum* „wild type“ a recesivní „single gene“ mutant *7B-1*, který byl v roce 1990 izolován na základě jeho fotoperiodicky závislé samčí sterilitě (Bergougnoux et al. 2009). Za dlouhých dní (fotoperioda 16/8 h den/noc) byla u rostlin *7B-1* pozorována samčí sterilita, za krátkých dní (fotoperioda 8/16 h den/noc) je *7B-1* fertilní. Mutant *7B-1* má několik specifických znaků lišících se od WT. Normální rostlina *7B-1* je mnohem vyšší (cca 2 m) než WT (cca 0,5 m). Dále jsou semenáčky *7B-1* při klíčení odolné vůči

abiotickému stresu zejména na modrém světle. Vystavení některých druhů rostlin abiotickým stresovým podmínkám (osmotický, salinitní a teplotní stres) je spojeno s následným zvýšením koncentrace ABA (Fellner & Sawhney, 2002), která hraje důležitou roli při obranných reakcích (Mauch-Mani & Mauch, 2005, Mohr & Cahill, 2007). Experimenty dokazují, že semena *7B-1* disponují zvýšeným obsahem ABA, což je pravděpodobně příčinou jejich zvýšené rezistence. Dále byla u *7B-1* prokázána redukce de-etiolace hypokotylu na modrém světle v dlouhých dnech a větší velikost a hmotnost semene (Fellner & Sawhney, 2001; Fellner & Sawhney, 2002; Fellner et al., 2005).

Mnoho fyziologických procesů, jako je klíčení, inhibice růstu hypokotylu, diferenciací chloroplastů, zelenání rostlin, exprese mnoha jaderných a chloroplastových genů, je stimulováno světlem (Bertram & Lercari 1997; Mustili & Bowler, 1997). Klíčení semen u vyšších rostlin je komplexním procesem ovlivněným řadou environmentálních faktorů a genů. Faktory vnějšího prostředí ovlivňující klíčení jsou voda, teplota, kyslík a světelné záření. Klíčení semen mohou ovlivňovat další faktory, jako jsou chemické látky v prostředí, pH, nepropustnost osemení pro CO₂ (Kincl & Krpeš, 1994). Semena rajčete patří mezi typická semena citlivá na světlo, kde světelný požadavek může být substituován kyselinou giberelovou (Gui et al., 1991). Odborné studie prokázaly, že světlo reguluje klíčení semen aktivací fytochromů (Cone & Kendrick, 1986; Casal & Sanchez, 1998). Vliv má intenzita i kvalita záření. V regulaci klíčení však světlo nemá hlavní postavení, působí v souvislosti s dalšími faktory, jako jsou vlhkost, teplota, přístup vzduchu. Jako fotodormantní se označují semena, jež při optimálních podmínkách teploty a hydratace bez světelného signálu neklíčí (Pavlová, 1996). Světlo aktivuje klíčení semen výhradně prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů, které absorbují červené světlo, ale jejich absorpce zasahuje i do modré oblasti (Sullivan & Deng, 2003; Batschauer et al., 1996). Fytochromy mohou na rozdíl od jiných fotoreceptorů indukovat klíčení krátkými pulsy červeného světla, které narušuje tmu (Briggs & Olney, 2001). Na klíčení má vliv červená (R + FR), modrá (B), výjimečně i zelená (VLFR) složka světla. Význam modré složky je zřejmě menší, neboť je více absorbována půdou, porostem a často i oseměním. Dlouhotrvající modré světlo např. inhibuje klíčení semen rostliny *Laportea bulbifera* (Tanno, 1982). Inhibiční účinek modrého světla může být následně zrušen působením velmi vysoké intenzity červeného světla (Raghavan, 1973). Cílem prvního experimentu předložené diplomové práce bylo stanovení vlivu různých světelných podmínek (tma, bílé, modré a červené světlo) na klíčivost rostlin WT a *7B-1 S. lycopersicum*. V případě semen *S. lycopersicum* obou studovaných genotypů WT i *7B-1* byla zaznamenána nejvyšší

klíčivost ve tmě a na červeném světle. U mutantu *7B-1* byl pozorován mnohem menší vliv světelných podmínek na klíčivost v porovnání s WT. Klíčivost na bílém a modrém světle byla v případě WT výrazně nižší v porovnání se *7B-1*. Výsledky studie vlivu světelných podmínek na klíčení semen jsou v případě WT v souladu s výše uvedenými publikovanými daty. V případě *7B-1*, v důsledku mutace a následných změn, je vliv světelných podmínek na klíčení minimalizován, což může být v souvislosti s defektem v detekci a přenosu signálu modrého světla. Snížená citlivost k modrému světlu způsobuje snížení citlivosti ABA receptoru (X) k ABA, což indukuje zvýšení hladiny endogenní ABA. Vysoká hladina ABA v semenech *7B-1* interaguje s mnoha receptory ABA (Y) vedoucí k zesílení exprese genů zahrnutých v produkci osmolytů a tím k zvýšení tolerance k osmotickému stresu (Fellner et al., 2002). Regulace klíčení je zprostředkována phyA a phyB, které detekují červené světlo s různou intenzitou a délkou světla, což vede k různým odezvám v kontrole tohoto procesu. Klíčení *S. lycopersicum* potřebující rehydrataci semen je indukováno slabým pulsem R světla, po vystavení FR světlu dochází k inhibici této odpovědi. Oba typy těchto světél jsou detekovány phyB. Odpovědi R a FR světla jsou omezeny krátkými časovými intervaly od 3 do 16 hodin od počátku rehydratace semen. Dlouhodobé silné R ($30 \mu \text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) světlo detekované phyA na rozdíl od slabého pulsu R světla ($28 \text{nmol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) inhibuje klíčení. Prodloužené (trvajících hodinu) ozařování nahrazuje působení dlouhodobého silného světla. Tyto antagonistické odpovědi jsou zprostředkovány phyA a mohou způsobovat adaptaci semen lokalizovaných na povrchu půdy, zatímco slabé pulzy R mohou odrážet situaci v půdě (Appenroth et al., 2006).

Světlo má významný vliv na vývoj rostliny - regulaci růstu hypokotylu, prodlužování stonku, expansi listů a syntézu chlorofylu (Kendrick & Kronenberg, 1994; Weller et al., 2001). Vliv světla na vývoj rostlin WT a *7B-1* byl stanoven na základě porovnání délky kořene, stonku a hmotnosti 10 denních klíčících rostlin za již zmíněných světelných podmínek. Světelné podmínky výrazně ovlivnily zejména délku stonku. 10-denní semenáčky WT a *7B-1* *S. lycopersicum* měly ve tmě více než 2x delší stonky v porovnání s rostlinami pěstovanými na světle. Výsledky jsou v souladu s daty publikovanými Fellner et al. 2005. Červené světlo mělo stimulační vliv na růst hypokotylu v porovnání s bílým a modrým světlem a to zejména u WT. Jak je známo etiolované rostliny mají dlouhé stonky a uzavřené a nerozptýlené listy. Po přenosu rostlin na světlo dochází k deetiolaci, spojené s inhibicí růstu stonku, listy se zvětšují, zelenají a začíná fotosyntéza (Sullivan & Deng, 2003). Pro správnou regulaci růstu a vývoje je nezbytná spolupráce fotoreceptorů červeného světla phyB a modrého a UV-A světla kryptochromů (Sellaro et al., 2009). Hypokotyl *7B-1*, jak bylo publikováno v práci Fellner et al. (2001), obsahovaly celkově vyšší koncentraci endogenní ABA než

WT, naproti tomu koncentrace hormonů, které ovlivňují růst rostlin (gibereliny – např. GA1, GA3, GA4 a indol-3-octová kyselina (IAA)), byla u *7B-1* nižší ve srovnání s WT. Hypokotylový růst u mutantu *7B-1* ukazuje sníženou deetiolaci, podobnou s WT na bílém a modrém světle v důsledku abiotického stresu (Fellner & Shawney, 2002). U *7B-1* jsme tento jev (porovnání s WT) zaznamenali u rostlin, pěstovaných na modrém světle a bílém světle bez aplikace salinitního nebo osmotického stresu. Délka kořene nebyla u rostlin WT a *7B-1* výrazně ovlivněna rozdílnými světelnými podmínkami. Podobné výsledky se objevily v článku Gabryszewska & Rudnicki, 1997, který popsal shodný vliv bílého, modrého a červeného světla na vývoj kořene rostliny *Ficus benjamina*. Rostliny mutantu *7B-1* měly větší schopnost za všech studovaných světelných podmínek vytvářet více rostlinné hmoty. Vliv světla na váhu celé rostliny byl zaznamenán zejména u etiolovaných rostlin *7B-1* a rostlin pěstovaných na modrém světle.

8.1.2 Vliv světla na antioxidační systémy

Hlavním cílem diplomové práce bylo stanovit vliv světelných podmínek na aktivitu vybraných antioxidačních systémů u 10 denních semenáčků *S. lycopersicum* a následně diskutovat zaznamenané rozdíly a charakterizovat detekované změny u mutantu *7B-1*. Pro danou studii byly zvoleny enzymy s antioxidačním účinkem, jako je GPX, CAT, APX, SOD a GR. Dále byl stanoven obsah volných fenolických látek a lipidická peroxidace.

K tvorbě ROS dochází někdy během normálního růstu a vývoje zvláště v buněčných částech s obrovskou redoxní enzymatickou změnou. Produkce a destrukce ROS jsou v rostlinných buňkách velmi dobře regulovány za kontroly komplexní antioxidační sítě. Antioxidační systém je tvořen především antioxidačními enzymy (např. peroxidasa, APX, GPX, SOD, CAT, GR), které katalyzují elektronový přenos na ROS použitím nízkomolekulárních antioxidantů (např. askorbát, tokoferol, redukovaný glutathion) fungující jako protonové a elektronové donory. Peroxidasa a CAT se podílejí na eliminaci H_2O_2 . Dále CAT, APX a GR se účastní regulace koncentrace endogenního H_2O_2 prostřednictvím askorbát-glutathionového cyklu, který vede k přeměně destruktivních radikálů. V tomto cyklu askorbát a glutathion prochází cyklickým přenosem redukcujících ekvivalentů vedoucí k redukci H_2O_2 na vodu pomocí elektronů pocházejících z NADPH (Saleh & Plieth, 2009; Goel & Sheoran, 2003).

Získané výsledky lze hodnotit jednak ve vztahu k působení rozdílných světelných podmínek a dále porovnat změny v aktivitách testovaných antioxidačních systémů u

dvou studovaných genotypů *S. lycopersicum*. Byl prokázán u obou genotypů výrazný vliv světla na zapojení antioxidantních mechanismů v procesu vývoje klíčících rostlin. V případě GPX byla zaznamenána vyšší aktivita u rostlin *S. lycopersicum* pěstovaných na světle v porovnání s etiolovanými rostlinami, ale v případě CAT, APOX aktivity byla aktivita daných enzymů vyšší u etiolovaných rostlin WT. Na rozdíl od WT *7B-1* rostliny pěstované ve tmě vykazovaly nižší aktivitu GPX a CAT. V důsledku mutace u *7B-1* dochází pravděpodobně za tmy ke snížení schopnosti aktivace výše uvedených antioxidantních mechanismů. U rostlin WT *S. lycopersicum* byly v podmínkách bílého světla detekovány výrazně nižší aktivity CAT, APX, SOD a produkce volných fenolů v porovnání se *7B-1*. Významný podíl na antioxidantní kapacitě u WT za světla bude mít GPX a GR.

Peroxidasa je monomerní hem-obsahující enzym vyskytující se volně (cytoplazma, vakuoly) nebo vázaný (buněčná stěna, plasmatická membrána nebo v organelových membránách) (Siegel, 1993; Chromá et al., 2001). Získané výsledky v rámci diplomové práce korelují s již publikovanými daty - světlo zesiluje aktivitu peroxidasy (Chen et al., 2002). Podobně byla detekována nižší peroxidásová aktivita u etiolovaných semenáčků *Pisum sativum* v porovnání s rostlinami pěstovanými na světle (Luhová et al., 2003, Petřivalský et al., 2007). Snížená peroxidásová aktivita etiolovaných rostlin může mít souvislost se snížením obsahu ligninu (Luhová et al., 2003). Výrazně vyšší aktivita peroxidasy, podobně jako obsah fenolů u WT v porovnání se *7B-1* v podmínkách kultivace za tmy a za modrého světla koresponduje s detekovaným intenzivním procesem lignifikace vedoucí k většímu zpevnění a zesílení stonku WT v porovnání se *7B-1*. Peroxidasy se vyskytují v několika izoformách (izoenzymech). U křenové peroxidasy bylo objeveno pět neutrálních izoform (Aibara et al., 1982). U studovaných genotypů *S. esculentum* byly detekovány 3 izoenzymové formy peroxidasy lišící se pohyblivostí v gelu při nativní elektroforéze. Aktivita jednotlivých izoenzymů se lišila v závislosti na světelných podmínkách a genotypu.

CAT je stejně jako peroxidasa protein obsahující hem, který se vyskytuje hlavně v peroxisomech, a má katalasovou i peroxidasovou aktivitu (Chance et al. 1979). Vlivem viditelného světla dochází v kyanobakteriích, listech, intaktních bunkách nebo tkáních k fotoinaktivaci katalasy. Hemová skupina enzymu funguje jako fotoreceptor zprostředkávající CAT inaktivaci. Stabilní hladina CAT je v zralých listech udržována na základě rovnováhy mezi dlouhodobou fotoinaktivací s následnou degradací a novou syntézou (Hertwig et al., 1992). Katalasová genová rodina v *A. thaliana* zahrnuje 3 geny (*CAT1*, *CAT2*, *CAT3*) kódující jednotlivé podjednotky, jejichž spojení vede k tvorbě nejméně šesti isoenzymů. Tyto 3 geny jsou vysoce příbuzné k dalším dvěma a také k dalším katalasovým genům. Jednotlivé isoenzymy a jednotlivé podjednotky mRNA

ukazují odlišné schéma orgáno-specifické exprese. Nadbytečné množství mRNA *CAT1* a *CAT2* je indukováno světlem, zatímco u *CAT3* je tomu naopak (McClung, 1997). V souladu s výsledky získanými při studiu vlivu světelných podmínek na CAT aktivitu u *P. sativum* byla detekována u WT výrazně vyšší aktivita u etiolovaných rostlin v porovnání s rostlinami pěstovanými za světla (Luhová et al., 2003). U etiolovaných rostlin WT byla podobně jako peroxidasa detekována výrazně vyšší CAT aktivita než u mutantu *7B-1*. U rostlin *7B-1* byla detekována srovnatelná CAT aktivita za tmy a modrého světla. Nejvyšší aktivita byla stanovena u rostlin pěstovaných na bílém světle. Podobný trend byl pozorován v případě, GPX, GR, při stanovení obsahu volných fenolů, intenzity lignifikace.

Klíčovým enzymem v síti antioxidačních mechanismů je APX, která katalyzuje redukci H_2O_2 na vodu s využitím askorbátu jako donoru elektronů (Asada, 1999). APX je lokalizovaná v mnoha buněčných kompartmentech např. v chloroplastech, cytosolu, peroxisomech, mitochondriích atd. (Yoshimura et al., 2000). V práci Fryer et al., 2003, byl studován vztah intenzity světla a exprese genů kódujících cytosolickou APX. Exprese genů pro cytosolickou askorbátperoxidasu (APX2) byla získána 15 min po vystavení světlu s vysokou intenzitou. Transkripční úrovně dalších antioxidačních enzymů např. peroxisomální APX, cytosolická a chloroplastová CuZn-SOD, chloroplastová Fe-SOD, mitochondriální Mn-SOD a GR (Fryer et al., 2003) nebyly vlivem světelného stresu změněny.

Vliv světelných podmínek na aktivitu APX u rostlin *S. lycopersicum* vykazuje určitou analogii s katalasou. APX aktivita byla u rostlin WT celkově nižší než u *7B-1* při kultivaci za všech světelných podmínek. V rámci proteinové analýzy WT a *7B-1* *S. lycopersicum* byl potvrzen vyšší obsah proteinu APX u *7B-1* v porovnání s rostlinami WT pěstovanými za klasických světelných podmínek (Sheoram et al., 2009). V stimulaci exprese APX2 ukazuje roli kyselina abscisová. Vystavení ABA-necitlivých mutantů (*abi1-1*, *abi2-1*) světlu vede ke snížení hladiny exprese APX2. Existuje tedy možnost, že zvýšená hladina ABA *7B-1* by mohla být u asociována s vyšším obsahem APX (Fryer et al., 2003). Na červeném světle byla APX aktivita u WT v porovnání s bílým a modrým světlem výrazně vyšší.

Světlo reguluje akumulaci chloroplastové a cytosolové Cu, Zn SOD v rostlinách (Perl-Treves & Galun, 1990). U studovaných genotypů *S. lycopersicum* nebyl detekován výrazný vliv světelných podmínek na SOD aktivitu. Malá odezva na světelné podmínky byla detekována rovněž u rostlin *Phaseolus vulgaris* vystavených 12-denní fotoperiodě (Cakmark & Marschner, 1992). Rostlina *Marchantia paleacea* obsahuje Mn-SOD v mitochondrii, Fe-SOD v chloroplastu a CuZn-SOD v cytosolu. Za heterotrofních podmínek byl transkript tří SOD genů byl akumulován nezávisle na

světla. Za fotoautotrofních podmínek se hladina transkriptu Fe-SOD a Mn-SOD zvýšena na světle, zatímco CuZn-SOD snížena. Ve tmě dochází k reversi hladiny transkriptu na původní hladinu. Na rozdíl od transkripční úrovně je aktivita všech tří SOD ovlivněna světlem jen nepatrně (Sakaguchi et al., 2004), což odpovídá zmíněným výsledkům.

Redukovaný glutathion je důležitý neenzymatický antioxidant schopný eliminovat hydroxylový a singletový kyslíkový radikál, rozpustný ve vodě. Redukovaný glutathion je generován GR z oxidované formy glutathionu v přítomnosti NADPH (McDonald, 1999; Smith et al. 1989). Aktivita GR je ovlivněna světelnými podmínkami (Hand & Lee, 2005). Vliv světla na GR aktivitu byl detekován u *Phaseolus vulgaris*, kdy světelná intenzita způsobila zvýšení aktivity GR v listech (Cakmak & Marschner, 1992). U rostlin *S. lycopersicum* byla detekována nejvyšší aktivita GR u obou genotypů kultivovaných na bílém světle.

Světlo indukuje a zvyšuje obsah fenolických látek u rostlin (Bakhshi & Arakawa, 2006; Arezki et al. 2001). Fluorescenční spektra fenolických látek ukazují blízký přesah s flavinem, karotenem a pterinem, což podporuje možný přenos energie od fenolů k těmto fotoreceptorům (Chandrakuntal et al., 2006). Obsah volných fenolických látek byl vyšší u rostlin *S. lycopersicum* pěstovaných na světle kromě červeného světla. Nejvyšší hodnoty byly detekovány u WT na modrém a u *7B-1* na červeném světle. Nižší obsah fenolických látek na modrém světle u rostlin *7B-1* v porovnání s WT může být spojen s jeho rezistencí proti abiotickému stresu (Fellner & Shawney, 2002).

Lipidická peroxidace (LP) byla intenzivnější u rostlin WT než *7B-1*. Tyto výsledky korelují s již publikovanými daty Sreenivasulu et al., 1999 - u mutantu rostliny *Setaria italica*, která je odolná vůči osmotickému stresu byl detekován nižší obsah malondialdehydu (nižší stupeň LP) než u WT. Výrazný pokles LP na modrém světle v případě mutantu *7B-1* je v souladu s vysokou resistencí tohoto genotypu vůči osmotickému stresu (Fellner & Shawney, 2002). U obou genotypů byla zaznamenána nižší koncentrace malondialdehydu u etiolovaných rostlin než u rostlin pěstovaných na světle. Další studie potvrzují, že UV světlo vyvolává oxidativní stres vedoucí ke zvýšení LP (Nasibi and Kalantari, 2005; Mahdavian et al., 2008). Zvýšená lipidická peroxidace zprostředkovaná volnými radikály a peroxidy, je jeden z možných zdrojů ztráty životnosti a vitality semen. Stanovení MDA je konvenční metoda kvantifikace zvýšení LP, které je nepřímo podporováno akumulací H₂O₂ (McDonald, 1999; Smith et al., 1989)

8.1.3 Vliv světla na produkci Hsp70

Hsp70 jsou proteiny patřící do skupiny heat shock proteinů a chaperonů, které zajišťují správné skládání, translokaci a degradaci za normálních i stresových podmínek (Wang, 2004). Teplotní šok indukuje výraznou akumulaci mRNA kódující heat shock (hsp) geny. Exprese těchto genů je kromě teplotního šoku indukována po přechodu organismu *Chlamydomonas reinhardtii* ze tmy na světlo. Existují dvě možnosti pro světelnou regulaci exprese hsp genů. Po světelném vystavení rostlin pěstovaných ve tmě může docházet k denaturaci chloroplastových proteinů a jejich zvýšené přeměně na abnormální proteiny spouštějící aktivaci hsp genů. Druhá možnost je, že exprese hsp genů indukovaná světlem může být kontrolována signální dráhou zahrnující fotoreceptory. V tomto případě, separované elementy pro světelnou regulaci mohou být obsaženy na spodních regionech hsp genů. Odlišné regulační elementy, jiné než ty co zprostředkovávají hsp odpovědi byly nalezeny na spodních regionech některých hsp genů (Gromorf et al., 1989).

U rostlin WT i *7B-1* jsme detekovali několikanásobně vyšší obsah Hsp70 u rostlin pěstovaných na světle v porovnání s etiolovanými rostlinami. Vystavení listů nebo chloroplastů vysoké intenzitě světla vede ke ztrátě fotosyntetické aktivity neboli fotoinhibici (Gromorf et al., 1989). Hsp70 vykazují roli v resistenci vůči fotoinhibici (Schroda et al., 1999). Významný nárůst produkce Hsp70 byl zaznamenán u rostlin *7B-1* pěstovaných na modrém světle. Receptor modrého světla fototropin z *Chlamydomonas* se nachází na vnitřní straně plasmatické membrány a po vystavení modrému světle se uvolňuje do cytoplasmy (Huang et al., 2004). Otázkou je možný vztah mutace u *7B-1* a následné zvýšené schopnosti produkce Hsp70 u rostlin vystavených působení modrého světla.

Zajímavý je dále možný vztah mezi aktivitou antioxidantních enzymů a schopnosti produkce Hsp70 za různých světelných podmínek. U WT lze z dosažených výsledků vypožorovat, že etiolované rostliny produkují jen velmi malé množství Hsp70 v porovnání s rostlinami pěstovanými na světle zatímco za tmy byla u rostlin detekována nejvyšší CAT, APX a SOD aktivita a poměrně vysoká aktivita SPOX. Naopak při kultivaci na modrém světle rostliny produkovaly nejvíce Hsp70 a aktivita APX byla nejnižší a aktivity CAT, SOD, GR a SPOX byly poměrně nízké. APX patří mezi nejvýznamnější antioxidantní systémy u rostlin se schopností reagovat již na malé změny ROS v organismu. Tyto výsledky naznačují možnou regulaci produkce Hsp70 zvýšenou koncentrací ROS, kterou lze předpokládat v prostředí s nízkou aktivitou antioxidantních systémů. Podobný trend lze pozorovat u *7B-1*. V případě nejvyšší produkce Hsp70 v podmínkách modrého světla byla detekována poměrně nízká APX,

CAT, GR a SPOX aktivita (rozdíly nejsou tak výrazné jako u WT). Za tmy, kdy je minimální produkce Hsp70, u rostlin *7B-1* byla detekována i poměrně nízká aktivita studovaných antioxidačních systémů. Otázkou zůstává, zda se v tomto případě neprojevuje vliv mutace na chování daného genotypu za tmy. V obou případech byly detekovány rozdílné vlastnosti studovaných genotypů např. v reakci na abiotický stres.

8.1.4 Vliv světla na produkci aktinu

Rostlinný aktinový cytoskeleton je vysoce dynamická, vláknitá struktura nezbytná v mnoha buněčných procesech zahrnující buněčné dělení, cytoplasmické třídění, buněčnou elongaci a změnu orientace chloroplastů v odpovědi na světlo. Cytoskeletální genová rodina zahrnuje 10 aktinových genů, z nichž u 8 je povržena účast v různých vývojových procesech. Aktinové uspořádání může být ovlivněno vnitřními faktory, biotickým a abiotickým stresem prostřednictvím přenosu signálu aktin-vázajících proteinů (Hussey et al., 2002; Meagher et al., 1999). Aktinová vlákna svěřacích buněk ukazují změnu jejich uspořádání v odpovědi na fyziologické stimuly. Po vystavení bílému světlu se otevírají průduchy a aktinová vlákna původně lokalizovaná v kůře svěřacích buněk mění, jsou uspořádána radiálně v průduchovém póru. Ve tmě a v přítomnosti ABA vykazují aktinová vlákna jiné schéma uspořádání zahrnující náhodně orientované a krátké aktinové fragmenty (Eun & Lee, 1997). V rámci detekce rostlinného aktinu byl nejvyšší obsah pozorován u rostlin WT a *7B-1* pěstovaných na bílém a modrém světle. Etiolované semenáčky WT vykazovaly výrazně nižší produkci aktinu než *7B-1*.

8.1.5 Vliv světla na lignifikaci

Intenzivní syntéza ligninu probíhá během diferenciaci buněčné stěny a nebo v důsledku biotického nebo abiotického stresu (Luhová et al., 2003; Rea et al., 1998). Peroxidas katalyzují v buněčné stěně dehydrogenaci monomerických prekurzorů ligninu na fenoxylradikály, které polymerizují a tvoří síť mezi monolignoly, proteiny a polysacharidy (Lee et al., 2007). Bylo zjištěno, že nejefektivnější substrát pro peroxidasu je ligninový analog syringaldazin (Quiroga et al. 2000), proto se pro stanovení úrovně lignifikace používá detekce syringaldazinperoxidase aktivity. *7B-1* vykazuje nižší stupeň lignifikace než WT při kultivaci na bílém a modrém světle. Nejnižší hladina lignifikace byla zaznamenána u etiolovaných rostlin obou genotypů. Výsledky jsou v souladu se studií Luhová et al., 2003 a Su et al., 2005, kdy byl také

prokázán nízký obsah ligninu v etiolovaných rostlinách. Nízký obsah ligninu koreluje s nízkou aktivitou peroxidasy (Angelini et al., 1990).

8.2 Vliv teplotního stresu za různých světelných podmínek

Druhým úkolem předložené diplomové práce bylo stanovení vlivu krátkodobého teplotního stresu na aktivity antioxidantních enzymů SOD, peroxidasy, CAT, APX a GR, produkci volných fenolických látek, na intenzitu lipidické peroxidace a na tvorbu Hsp70. Stanovení vzájemného vztahu produkce Hsp70 a intenzity antioxidantních mechanismů u dvou genotypů *S. lycopersicum* byly diskutovány. Dále byla porovnána reakce rostlin na teplotní stres za různých kultivačních podmínek.

Teplotní stres vedoucí k oxidativnímu poškození indukuje aktivaci mnoha obranných mechanismů, které zahrnují produkci řady nízkomolekulárních a vysokomolekulárních látek včetně heat-shock proteinů (Saleh & Plieth, 2009; Scarpeci et al., 2003). Studie Swindel et al, 2007 ukazuje důkaz, že heat shock transkripční faktory mohou fungovat jako senzory ROS v rostlinách a tím identifikuje spojení mezi signální dráhou teplotního a oxidativního stresu.

Čtyři hodiny po aplikaci TS byla detekována u semenáčků WT a *7B-1* kultivovaných za různých světelných podmínek mnohonásobně zvýšená produkce Hsp70. V případě rostlin WT byl pozorován pozitivní vliv světla na akumulaci Hsp70 po aplikaci teplotního stresu. Vliv mutace u *7B-1* se projevil ztrátou regulačního vlivu světelných podmínek na produkci Hsp70 v podmínkách abiotického stresu (porovnání tma x světlo, výjimkou je červené světlo). Pokles produkce Hsp70 může být u *7B-1* vysvětlen nižší citlivostí k modrému světlu v podmínkách abiotického stresu, což vede ke zvýšení endogenní hladiny ABA, která zvyšuje stresovou toleranci (Fellner & Sawhney, 2002).

Světelné podmínky měly výrazný vliv na změnu aktivit sledovaných antioxidantních systémů. U etiolovaných rostlin obou studovaných genotypů vystavených krátkodobému teplotnímu stresu byla detekována zvýšená aktivita peroxidasy, CAT, APX, SOD a produkce volných fenolů (s výjimkou CAT u WT), změny GR aktivity byly minimální. U rostlin pěstovaných na světle byl převážně po aplikaci TS pozorován pokles aktivit testovaných enzymů. Nejvýraznější změny byly detekovány u WT na modrém světle a to v případě peroxidasy, CAT, GR, SPOX a obsahu volných fenolů. Je zajímavé že současně s poklesem aktivit antioxidantních enzymů u rostlin byl zaznamenán i pokles lipidické peroxidace. V případě mutanta byly nejvýznamnější změny detekovány na červeném světle, naopak na modrém světle byly změny minimální. Tento rozdíl ve schopnosti regulovat změny koncentrace ROS po vystavení

rostlin abiotickému stresu u WT a mutantu *7B-1* pozorované na modrém světle korelují s rozdílnou schopností rostlin reagovat na jiný typ abiotického stresu (salinitní, osmotický stres), tzn. *7B-1* vykazuje vyšší rezistenci na dané abiotické strese na modrém světle (Fellner & Sawhney, 2001; Fellner & Sawhney, 2002; Fellner et al., 2005). U *7B-1* lze předpokládat významnou úlohu antioxidantních systémů peroxidasy CAT, GR, SPOX a schopnosti tvořit volné fenoly ve zvýšení rezistence rostliny.

Po aplikaci teplotního stresu byl u obou genotypů *S. lycopersicum* pěstovaných ve tmě zaznamenán nárůst aktivity peroxidasy v porovnání s kontrolou, podobně jako např. u rostlin *Fragaria ananassa* cv. *Camaros* (jahodník), pěstovaných při režimu (fotoperioda 16/8 h světlo/tma), které byly vystaveny teplotnímu stresu 45°C (Gulen & Eris, 2004). Při kultivaci za optimálních světelných podmínek se projevil dlouhodobý teplotní stres (35°C) u rostlin *S. lycopersicum* poklesem peroxidásové aktivity (Rivero et al., 2001). V souladu s již publikovanými výsledky byl zaznamenán v rámci našich experimentů i po aplikaci krátkodobého TS v případě kultivace za světelných podmínek pokles peroxidásové aktivity (s výjimkou WT za bílého světla). Jak potvrzuje článek Chen et al., 2002 světlo zvyšuje aktivitu peroxidasy, proto by mohl být pokles peroxidásové aktivity u rostlin *7B-1* způsoben jeho mutací snižující citlivost ke světlu (hlavně modrému) (Fellner & Shawney, 2002). Ztráta aktivity peroxidasy byla zaznamenána až při extrémním teplotním stresu (60 a 90°C) a po následné inkubaci při stálé teplotě 30°C byla pozorována reaktivace peroxidasy, kde se na stabilizaci peroxidasy podílí heat-shock protein ClpX (Kroczyńska et al., 2002). Rozdíl mezi WT a *7B-1* byl dále zaznamenán při stanovení izoenzymového zastoupení peroxidasy, kdy byla po aplikaci krátkodobého TS detekována aktivita nového izoenzymu (nejmenší pohyblivost při nativní elektroforéze).

U rostlin *Triticum aestivum* byl prokázán stimulační vliv teplot 30 a 35°C na aktivitu CAT, ale již při teplotě 40°C je enzym značně inaktivován (Dash & Mohanty, 2002). U obou studovaných genotypů *S. lycopersicum* byl zaznamenán výrazný vliv teplotního stresu a rovněž světelných podmínek na aktivitu tohoto enzymu. Zvýšená CAT aktivita byla detekována u WT za bílého světla a u *7B-1* ve tmě a na modrém světle. Zvýšení aktivity CAT v důsledku vysokého teplotního stresu u rostlin (*Morus alba* L.) a *Lepidium sativum* byla prokázána v práci Chaitanya et al., 2001 a Saleh & Plieth, 2009. Teplotní stres $\approx 42^\circ\text{C}$ vede ke zvýšené akumulaci H_2O_2 , což vyvolá nárůst aktivity CAT, která snižuje množství H_2O_2 na netoxickou hladinu (Gur et al., 2010). Naopak snížená aktivita CAT v rámci teplotního stresu byla publikována ve studii Jiang & Huang, 2001 u rostlin (*Festuca arundinacea* L.) and (*Poa pratensis* L.), které byly vystaveny dlouhodobému TS (12 dní). Výrazný pokles aktivity CAT byl detekován v našich experimentech u WT ve tmě a na modrém světle a u *7B-1* na bílém a

červeném světle. Studie Nagesh & Devaraj, 2008 ukázala negativní korelaci u CAT aktivity mezi osmotickým a teplotním stresem: při salinitním stresu byla zaznamenán nárůst, zatímco u TS pokles CAT aktivity u rostlin *Phaseolus vulgaris*.

Cytosolická askorbátperoxidasa (APX1) hraje klíčovou roli v odpovědi na teplo a sucho (Koussevitzky et al., 2008). U buněčných kultur *Nicotiana tabacum* (L. cv. Bright Yellow-2) a rostlin *Gossypium hirsutum* byl při krátkodobém teplotním stresu (35; 38 a 45°C) detekován nárůst aktivity APX (Locato et al., 2009; Gur et al., 2010). Vyšší aktivita APX po TS byla detekována u WT (s výjimkou červeného světla). Mutant *7B-1* se lišil od WT ve změnách aktivity APX zejména v podmínkách bílého a modrého světla, kde byl zaznamenán evidentní pokles aktivity. Pokles aktivity a exprese APX1 po vystavení TS byl detekován u buněčných kultur *Nicotiana tabacum* (Bright-Yellow 2). (Vacca et al., 2004). Ke snížení aktivity a exprese APX dochází při 55°C TS, který spouští procesy vedoucí k programované buněčné smrti. V rané fázi buňky prochází buňky PCD spojené se zvýšením množství ROS, které je regulováno antioxidanty askorbátem a SOD. Pozdní fáze PCD indukuje oxidaci endogenního askorbátu, což vede ke snížení množství a specifické aktivity APX1 (Vacca, et al., 2004).

SOD je enzym účastnící se dismutace superoxidového radikálu na peroxid vodíku a vodu. Podle článku Li et al., 2006, může být nárůst aktivity SOD spojen s tolerancí k vysokému teplotnímu stresu. SOD je významná komponenta ROS-vyčistavajícího systému v chloroplastech a může přispívat k stresové toleranci rostlin (Gupta et al., 1993). U *7B-1* ve tmě a na bílém světle byl zaznamenán po TS nárůst SOD aktivity a při modrém a červeném světle naopak její pokles. Snížená aktivita byla v porovnání s kontrolou zaznamenána u rostlin *Gossypium hirsutum* při 4-denním TS (35°C) a u mikrosporových kultur (*x Triticosecale Wittm.*) při 2h TS (38°C) (Gur et al., 2010, Žur et al., 2009).

V případě GR byly detekovány minimální změny po aplikaci TS u *S. lycopersicum*. U genotypu WT byl pozorován pokles aktivity GR na bílém a modrém světle. Několik studií potvrzuje redukci aktivity GR v důsledku TS (Jiang & Huang, 2001; Nagesh & Devaraj, 2008). Guo et al., 2007 prokázal roli Hsp70 v modulaci aktivity GR. Ve studii Meki et al., 2004, byla po aplikaci aflatoxinu B1 na jaterní buňky krysy ukázána negativní korelace mezi hladinou GR a akumulací Hsp70. Vyšší hladina Hsp70 a nižší aktivita GR u jaterních buněk může poukazovat na možnost, že Hsp70 tvoří kompenzační mechanismus v obraně proti oxidativnímu stresu (Meki et al., 2004). Nárůst aktivit GR u *7B-1* za všech světelných podmínek může potvrzovat studie Chaitanya et al., 2001, kde byly rostliny *Morus Alba* vystaveny krátkodobému TS (40°C). V případě studovaného rostlinného modelu nebyl detekována korelace ve změnách Hsp70 a aktivity GR.

Aplikace krátkodobého TS (42°C) vede u semenáčků *S. lycopersicum* pěstovaných ve tmě a na červeném světle ke zvýšení obsahů volných fenolů ve srovnání s kontrolou. Teplotní stres v rostlinách *S. lycopersicum* aktivoval fenylalaninaamoniumlyasu, enzym který je významným meziproduktem biosyntézy fenolů a inhibici peroxidasy a polyfenoloxidasy podílející se na snižování hladiny fenolů. Rozpustné fenoly se v důsledku TS akumulují jako výsledek aklimatizačního mechanismu na teplo a chlad (Rivero et al., 2001). Tma a červené světlo zřejmě ovlivňují přizpůsobení WT a *7B-1* k teplotnímu stresu. Na bílém a modrém světle byl u semenáčků WT a *7B-1* po vystavení TS zaznamenán pokles obsahu fenolických látek, což bylo potvrzeno také ve studii Fletcher et al., 2005.

Osmotický a teplotní stres vede k peroxidaci membránových lipidů (LP) způsobující zvýšení koncentrace MDA, který funguje jako indikátor mebránového poškození (Nagesh & Devaraj, 2008; Gulen et al., 2008; Sairam et al., 2000). 4 h po aplikaci TS (teplota 42°C) nedochází u semenáčků *S. lycopersicum* téměř k žádným změnám LP ve tmě a na bílém světle. V rostlině *Gossypium hirsutum* byla po vystavení TS (45°C) detekována nepatrná změna obsahu MDA (Gur et al., 2010). Evidentní pokles v obsahu MDA byl pozorován u rostlin WT na modrém světle a u *7B-1* na červeném světle. Pokles intenzity LP byl zaznamenán u rostlin po vystavení dalším stressovým faktorům (unicnazol, arginin nebo putrescin), které pravděpodobně snižují membránové poškození a tím zvyšují toleranci rostliny vůči stresu (Zhou & Leul, 1999; Khalil et al., 2009).

Vliv teplotního stresu na úroveň lignifikace byl určen na základě stanovení obsahu ligninu a aktivity syringaldazinperoxidasy. Na modrém světle byl pozorován u obou parametrů rozdíl v hladině lignifikace mezi oběma genotypy. *7B-1* vykazoval zvýšení, zatímco WT výrazný pokles lignifikace. Biotický a abiotický stres obecně vede ke zvýšení tvorby ligninu v buněčné stěně. Korelace mezi aktivitou SPOX a ligninem byla potvrzena u rostlin *Trifolium repens* vystavených 14-dennímu vodnímu deficitu. Nárůst aktivity peroxidasy může odrážet změnu mechanických vlastností buněčné stěny, která může být spojována s adaptací na sucho (Lee et al., 2007). Podle této studie by zvýšená aktivita peroxidasy a zvýšený obsah ligninu u *7B-1* mohly znamenat vyšší toleranci vůči teplotnímu stresu.

ZÁVĚR

1. V rámci teoretické části byla popsána role fotoreceptorů v různých vývojových procesech rostlin. Dále byly shrnuty poznatky týkající se vlivu interakce světla a teploty na vývoj rostlin a zapojení fotoreceptorů v obraně proti abiotickému a biotickému stresu v rostlinách.
2. V experimentální části byla stanovena aktivita antioxidantních systémů a dalších parametrů (aktin, Hsp70, lignin) u rostlin WT a *7B-1 S. lycopersicum* kultivovaných za různých světelných podmínek. V druhé části experimentu byl studován vliv teplotního stresu na antioxidantní schopnosti a produkci Hsp70 u daného modelového systému opět za různých světelných podmínek.
3. Vliv modrého a bílého světla se negativně projevil při klíčení zejména WT *S. lycopersicum*. Absence světla je optimální pro klíčení. Byla potvrzena inhibice růstu hypokotylu na světle. Hmotnost semenáčků mutantu *7B-1* byla za studovaných světelných podmínek vždy vyšší.
4. Výrazně nižší aktivita antioxidantních mechanismů a intenzita lignifikace byla detekována za tmy u *7B-1*. Za modrého a bílého světla u *7B-1* byly detekovány nižší aktivity enzymů spojených s lignifikací a následně i intenzita lignifikace. Naopak aktivity hlavních enzymů regulujících koncentraci ROS v rostlině (CAT, APX) byly zvýšené.
5. Pro stanovení produkce Hsp70 a aktinu u WT a *7B-1* byla použita metoda Western blot. U obou parametrů byl detekován vliv světelných podmínek zejména v případě WT. Nízká produkce Hsp70 byla charakteristická pro oba etiolované genotypy.
6. Významně vyšší produkce Hsp70 byla detekována u genotypu *7B-1* kultivovaného na modrém světle.
7. Již 4 h po aplikaci krátkodobého teplotního stresu byl detekován významný nárůst Hsp70 a to zejména u *7B-1*. Při teplotním stresu byly zaznamenány výrazné změny ve změnách aktivit antioxidantních systémů za studovaných světelných podmínek u obou genotypů.
8. Teplotní stres měl vliv na změnu aktivity antioxidantních systémů.

LITERATURA

- Ahmad M. (1999) Seeing the world in red and blue: insight into plant vision and photoreceptors. *Current Opinion in Plant Biology* **2**, 230-235.
- Aibara S., Yamashua H., Mori E., Kato M., Morita Y. (1982) Isolation and characterization of five neutral isoenzymes of horseradish peroxidase. *J. Biochem.* **92**, 531-539.
- Angelini R., Manes F., Federico R. (1990) Spatial and functional correlation between diamine-oxidase and peroxidase activities and their dependence upon de-etiolation and wounding in chick-pea stems. *Planta* **182**, 89-96.
- Appenroth K. J., Lenk G., Goldau L., Sharma R. (2006) Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant, Cell and Environment* **29**, 701–709.
- Arezki O., Boxus P., Kevers C., Gaspar T. (2001) Changes in peroxidase activity, and level of phenolic compounds during light-induced plantlet regeneration from *Eucalyptus camaldulensis* Dehn. nodes *in vitro*. *Plant Growth Regulation* **33**: 215–219.
- Asada K. (1999) The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol.* **50** 601–639.
- Bakhshi D., Arakawa O. (2006) Induction of phenolic compounds biosynthesis with light irradiation in the flesh of red and yellow apple. *Journal of Applied Horticulture* **8**, 101-104.
- Barua D., Heckathorn S. A. (2005) The interactive effect of light and temperature on heat-shock protein accumulation in *Solidago altissima* (Asteraceae) in the field and laboratory. *American Journal of Botany* **93**, 102-109.
- Batschauer A., Rocholl M., Kaiser T., Nagatani A., Furuya M., Schäfer E. (1996) Blue and UV-A light-regulated CHS expression in *Arabidopsis* independent of phytochrome A and phytochrome B. *Plant J.* **9**, 63-69.
- Beligni M. V., Lamattina L. (2000) Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyl elongation, three light-inducible responses in plants. *Planta* **210**, 215-221.
- Bergougnoux V., Hlaváčková V., Plotzová R., Novak O., Fellner M. (2009) The 7B-1 mutation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. Tomato. *J Exp Bot.* **60**, 1219-1230.
- Bertram L., Lercari B., (1997) Kinetics of stem elongation in light-grown tomato plants. Responses to different photosynthetically active radiation levels by wild-type and aurea mutant plants. *J Photochem Photobiol.* **66**, 396-403.
- Blokhina O., Virolainen E., Fagerstedt K. V. (2003) Antioxidant, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Annals of Botany* **91**, 179-194.
- Bou-Torrent J., Roig-Villanova I., Martinez-Garcia J. F. (2008) Light signaling: back to space. *Trends Plant Sci.* **13**, 108-114.
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye-binding. *Anal Biochem* **72**, 248-254.
- Briggs W. R., Christie J. M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *TRENDS in Plant Science* **7**, 204-210.
- Briggs W. R., Olney A. O. (2001) Photoreceptors in plant photomorphogenesis to date. five phytochromes, two cryptochromes, one phototropin, and one superchrome. *Plant Physiology* **125**, 85-88.
- Briggs W. R., Spudich J. L. (2005) Handbook of photosensory receptors, pp. 251 Wiley –VCH, Verlag GmbH & Co. KGaA., Weinheim.
- Cakmak I., Marschner H. (1992) Magnesium deficiency and high light intensity enhance activities of superoxide dismutase, ascorbate peroxidase, and glutathione reductase in bean leaves. *Plant Physiology* **98**, 1222-1227.
- Casal J. J., Sanchez R. A. (1998) Phytochrome and seed germination. *Seed Science Research* **8**, 317–329.
- Chaitanya K. V., Sundar D., S. Masilamani S., Reddy A. R. (2001) Variation in heat stress-induced antioxidant enzyme activities among three mulberry cultivars. *Plant Growth Regulation* **00**, 1–6.

- Chance B., Sies H., Boveris A. (1979): Hydroperoxide metabolism in mammalian organs. *Physiol. Rev.*, **59**, 527–605.
- Chandrakuntal K., Thomas N.M, Kumar P. G., Laloraya M., Laloraya M. M. (2006) Fluorescence resonance energy transfer between polyphenolic compounds and riboflavin indicates a possible accessory photoreceptor function for some polyphenolic compounds. *Photochemistry and Photobiology* **82**, 1358-1364.
- Chen M., Chory J., Fankhauser Ch. (2004) Light signal transduction in higher plants. *Annu. Rev. Genet.* **38**, 87–117.
- Chen Y. A., Shin J. W., Liu Z., H (2002) Effect of light on peroxidase and lignin synthesis in mungbean hypocotyls. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 33-39.
- Christie M. J. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu.Rev.Plant Biol.* **58**, 21-45.
- Christie J. M., Briggs W. R (2009) Blue light sensing in higher plants. *Journal of biological chemistry*. www.jbc.org.
- Chroma L., Macek T., Demnerova K., Mackova M. (2002) Decolorization of RBBR by plant cells and correlation with the transformation of PCBs. *Chemosphere* **49**, 739-748.
- Cicco N., Lanorte M. T., Paraggio M., Viggiano M., Lattanzio V. (2009) A reproducible, rapid and inexpensive Folin–Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal* **91**, 107–110.
- Cone J. W., Kendrick R. E. (1986) Photocontrol of seed germination. In *Photomorphogenesis in Plants* (eds R.E. Kendrick &G.H.M. Kronenberg), pp. 443–465. Martinus-Nijhoff Publishers, Dordrecht, the Netherlands.
- Dash S., Mohany N. (2002) Response of seedlings to heat-stress in cultivars of wheat: Growth temperature-dependent differential modulation of photosystem 1 and 2 activity, and foliar antioxidant defense capacity. *Journal of Plant Physiology* **159**, 49-59.
- Deng H., Wang X. W. (2002) The Arabidopsis Book. The American Society of Plant Biologists, The American Society of Plant Biologists, doi: 10.1199/tab.0074.1, <http://www.aspb.org/publications/arabidopsis/>.
- Ellenberger T. (1994) Getting a grip on DNA recognition: structures of the basic region leucine zipper, and the basic region helix-loop-helix DNA-binding domains. *Current Opinion in Structural Biology* **4**,12-21.
- Eun S. O., Lee Y. (1997) Actin filaments of guard cells are reorganized in response to light and abscisic acid. *Plant Physiology* **115**, 1491-1498.
- Falciatore A., Bowler Ch. (2005) The evolution and function of blue and red light photoreceptors. *Current Topics in Developmental Biology* **68**, 317-350.
- Fellner M., A. Franklin J. A., Reid D. M., Sawney V. K. (2005) Increased sensitivity to, and reduced production ethylene in an ABA-overproducing tomato mutant. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **47**, 205–212.
- Fellner M., Sawney V. K. (2001) Seed germination in tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theor Appl Genet.* **102**, 215–221.
- Fellner M., Sawney V. K. (2002) The 7B-1 mutant in tomato shows blue-light-specificresistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* **214**, 675–682.
- Fellner M., Zhang R., Pharis R. P., Sawney V. K (2001) Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous level of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **52**, 725-738.
- Fletcher R. S., Slimmon T., McAuley C. Y., Kott L. S. (2005) Heat stress reduces the accumulation of rosmarinic acid and the total antioxidant capacity in spearmint (*Mentha spicata* L). *Journal of the Science of Food and Agriculture* **85**, 2429 – 2436.
- Fryer M. J., Ball L., Oxborough K., Karpinski S., Mullineaux P. M., Baker N. R. (2003) Control of Ascorbate Peroxidase 2 expression by hydrogen peroxide and leaf water status during excess light stress reveals a functional organisation of Arabidopsis leaves. *The Plant Journal* **33**, 691–705.
- Franklin K. A., Lerner V. S., Whitelam G. C. (2005) The signal transducing photoreceptors of plants. *International Journal of Developmental Biology* **49**, 653-664.
- Franklin K. A. (2009) Light and temperature signal crosstalk in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 63-68.

- Gabryszewska E., Rudnicki R. M. (1997). The effects of light quality on the growth and development of shoots and roots of *Ficus benjamina* *in vitro*. *Acta Horticulturae* **418**, 163-167.
- Goel A., Sheoram I. S. (2003) Lipidic peroxidation and peroxide-scavenging enzymes in cotton seeds under natural ageing. *Biologia plantarum* **46**, 429-434.
- Gromorf E. D., Treier U., Beck C. F. (1989) Three Light-Inducible Heat Shock Genes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular and cellular biology* **9**, 3911-3918.
- Gui M. X., Wang X. M., Huang W. Y. (1991) The effect of light and exogenous gibberellic-acid on respiration pathway during germination of tomato seed. *Physiologia plantarum* **81**, 403-407.
- Gulen H., Cetinkaya C., Kadioglu M., Kesici M., Cansev A., Eris A. (2008) Peroxidase activity and lipid peroxidation in strawberry (*Fragaria X ananassa*) plants under low temperature. *J. Biol. Environ. Sci.* **2**, 95-100.
- Gulen H., Eris A. (2004) Effect of heat stress on peroxidase activity and total protein content in strawberry plants. *Plant Science* **166**, 739-744.
- Guo S., Wharton W., Moseley P., Shi H. (2007) Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress Chaperones* **12**, 245-254.
- Gupta A. S., Heinen J. L., Holaday A.S, Burket J. J, Allen R. D. (1993) Increased resistance to oxidative stress in transgenic plants that overexpress chloroplastic Cu/Zn superoxide dismutase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 1629-1633.
- Gur A., Demirel U., Ozden M., Kahraman A., Çopur O. (2010) Diurnal gradual heat stress affects antioxidant enzymes, proline accumulation and some physiological components in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *African Journal of Biotechnology* **9**, 1008-1015.
- Gyula P., Schafer E., Nagy F. (2003) Light perception and signaling in higher plants. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 446-452.
- Han H. S., Lee K. D. (2005) Plant growth promoting *Rhizobacteria* effect on antioxidant status, photosynthesis, mineral uptake and growth of lettuce under soil salinity. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences* **1**, 210-215.
- Harada A., Shimazaki K. (2007) Phototropins and blue light-dependent calcium signaling in higher plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 102-111.
- Heggie L., Halliday K. J. (2005) The highs and lows of plant life: temperature and light interactions in development. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 675-687.
- Henriques R., Jang I. C., Chua N. H. (2009) Regulated proteolysis in light-related signaling pathways. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 49-56.
- Hertwig B., Streb P., Feierabend J. (1992) Light dependence of catalase synthesis and degradation in leaves and the influence of interfering stress conditions. *Plant Physiol.* **100**, 1547-1553.
- Hodges D. M., DeLong J. M., Forney C. F., Prange R. K. (1999). Improving the thiobarbituric acid-reactive-substances assay for estimating lipid peroxidation in plant tissues containing anthocyanin and other interfering compounds. *Planta* **207**, 607-611.
- Huang K., Kunkel T., Beck C. F. (2004) Localization of the blue-light receptor phototropin to the flagella of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular biology of the cell* **15**, 3605-3614.
- Huang Y., Baxter R., Smith B. S., Partch C. L., Colbert Ch.L., Deisenhofer J. (2006) Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. *Proc Natl Acad Sci USA* **103**, 17701-17706.
- Hudcovska L. (2002) Oxidativní stres v rostlinách - reaktivní radikály a antioxidační ochrana, pp. 5, PřF Masarykova univerzita.
- Hung S. H., Yu C. W., Lin C. H. (2005) Hydrogen peroxide functions as a stress signal in plants. *Bot. Bull. Acad. Sin.* **46**, 1-10.
- Hussey P. J., Allwood E. G., Smertenko A. P. (2002) Actin-binding proteins in the *Arabidopsis* genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins. *Phil. Trans. R. Soc. Lond.* **357**, 791-798.
- Jiang Y., Huang. (2001) Drought and Heat Stress Injury to Two Cool-Season Turfgrasses in Relation to Antioxidant Metabolism and Lipid Peroxidation. *Crop Science* **41**, 436-442.
- Kalluri U. C., DiFazio S. P., Brunner A. M., Tuskan G. A. (2007) Genome-wide analysis of Aux/IAA and ARF gene families in *Populus trichocarpa* *BMC Plant biology* **7**, 59.

- Kendrick R. E., Kronenberg G. H. M (1994) *Photomorphogenesis in Plants*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands.
- Khalil S.I., Bassiouny H. M. S., Hassanein, R. A., Mostafa, H. A., Khawas, S. A., Monem, A. A. (2009) Antioxidant defense system in heat shocked wheat plants previously treated with arginine or putrescine. *Australian Journal of Basic and Applied Science* **3**, 1517-1526.
- Kim D. H., Kang J. G., Yang S. S., Chung K. S., Song P. S., Park C. M. (2002) A phytochrome-associated protein phosphatase 2A modulates light signals in flowering time control in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **14**, 3043-3056.
- Kincl M., Krpeš V. (2000) *Základy fyziologie rostlin*. Montanex, Ostrava.
- Koussevitzky S., Suzuki N., Huntington S., Armijo L., Sha W., Cortes D., Shulaev V., Mittler R. (2008) Ascorbate peroxidase 1 plays a key role in the response of *Arabidopsis thaliana* to stress combination. *The Journal of biological chemistry* **283**, 34197–34203.
- Kreslavski V. D., Carpentier R., Klimov V. V., Allakhverdiev S. I. (2009) Transduction mechanisms of photoreceptor signals in plant cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews* **10**, 63-80.
- Kroczyńska B., Ciesielski A., Sergio L. (2002) Stabilization of heat-induced changes in plant peroxidase preparations by ClpX, a bacterial heat shock protein. *J. Plant Physiol.* **159**, 1295–1299.
- Kunz B. A., Cahill D. M., Mohr P.G., Osmond M. J., Vonarx E. J. (2006) Plant response to UV radiation and links to pathogen resistance. *International Review of Cytology* **255**, 1-40
- Laloraya M. M., Chandra-kuntal K., Kumar G. P., Laloraya M. (1999) Active oxygen species in blue light mediated signal transduction in coleoptile tips. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **256**, 293–298.
- Lee B. R., Kim K. Y., Jung W. J., Avice J. C., Ourry A., Kim T. H. (2007) Peroxidases and lignification in relation to the intensity of water-deficit stress in white clover (*Trifolium repens* L.). *Journal of Experimental Botany* **58**, 1271-1279.
- Li Q. H., Yang H. Q (2007) Cryptochrome signaling in plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 94-101.
- Li Y., Matsubara Y., Miyawaki C., Liu Y., Koshikawa K. (2006) Temperature stress tolerance and increase in antioxidative enzyme activities in mycorrhizal strawberry plant. *Acta Hort.* (ISHS) **774**, 391-395.
- Locato V., de Pintob M. C., De Garaa L. (2009) Different involvement of the mitochondrial, plastidial and cytosolic ascorbate–glutathione redox enzymes in heat shock response. *Physiologia Plantarum* **135**, 296–306.
- Luesse D. R., De Blasio S. L., Hangarter R. P. (2006) Plastid movement impaired 2, new gene involved in normal blue-light-induced chloroplast movements in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **141**, 1328 – 1337.
- Luhová L., Lebeda A., Hedererová D., Peč P. (2003) Activities of amine oxidase, peroxidase and katalase in seedlings of *Pisum sativum* L. under different light condition. *Plant Soil Environ* **49**, 151–157
- Mahdavian K., Ghorbanli M., Kalantari K. M. (2008) The effects of Ultraviolet radiation on the contents of chlorophyll, flavonoid, anthocyanin and proline in *Capsicum annum* L. *Turk J Bo.* **32**, 25-33.
- Mauch-Mani B., Mauch F. (2005) The role of abscisic acid in plant-pathogen interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **8**, 409-414.
- McClung R. (1997) Regulation of Catalases in *Arabidopsis*. *Free Radical Biology and Medicine* **23**, 489-496.
- McDonald M. B. (1999) Seed deterioration: physiology, repair and assessment. *Seed Sci. Technol.* **27**, 177-237.
- Meagher R. B., McKinney E. C., Kandasamy M. K (1999) Isovariant Dynamics Expand and Buffer the Responses of Complex Systems: The Diverse Plant Actin Gene Family. *The Plant Cell* **11**, 995-1005.
- Meki A. R., Esmail Eel-D., Hussein A. A., Hassanein H. M. (2004) Caspase-3 and heat shock protein-70 in rat liver treated with aflatoxin B1: effect of melatonin *Toxicol* **43**, 93-100.
- Mhaweč P. (2005) 14-3-3 proteins—an update. *Cell Research* **15**, 228-236.
- Mittler R. (2002) Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *TRENDS in Plant Science* **7**, 405-410.

- Mohler S. G., Kim Y. S., Kukel T., Chua N. H. (2003) PP7 is a positive regulator of blue light signaling in Arabidopsis. *The Plant Cell* **15**, 1111-1119.
- Mohr P. G., Cahill D. M. (2007) Suppression by ABA of salicylic acid and lignin accumulation and the expression of multiple genes, in Arabidopsis infected with *Pseudomonas syringae* pv. tomato. *Functional and Integrative Genomics* **7**, 181-191.
- Moore B. W., Perez V. J. (1967) Specific acidic proteins of the nervous system. In FD Carlson, ed, *Physiological and Biochemical Aspects of Nervous Integration*. Prentice-Hall, Inc, The Marine Biological Laboratory, Woods Hole, MA, pp 343-359.
- Mustili A. C., Bowler C (1997) Tuning into the signals controlling photoregulated gene expression in plants. *EMBO* **16**, 5801-5806.
- Nagesh B. R., Devaraj V. R. (2008) High temperature and salt stress response in French bean (*Phaseolus vulgaris*). *Australian Journal of Crop Science* **2**, 40-48.
- Nagy F., Schafer E. (2002) Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plant. *Annu. Rev. Plant Biol.* **53**, 329–355.
- Nasibi F., M-Kalantari K. H. (2005) The effect of UV-A, UV-B and UV-C on protein and ascorbate content, lipidic peroxidation and biosynthesis of screening compounds in *Brassica Napus*. *Iranian Journal of Science & Technology, Transaction A* **29**(A1).
- Neil S., Brigit J., Desikan R., Hancock J., Harrison J., Wilson I. (2008) Nitric oxide evolution and perception. *Journal of Experimental Botany* **59**, 25-35.
- Pandey S., Zhang W., Assmann S. M. (2007) Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. *FEBS Letters* **581**, 2325–2336.
- Pavlová L., Daněk L. (2002) Fotomorfogeneze I. Kryptochromy a fototropin. *Biologické listy* **67**, 195-205.
- Pavlová L. (1996) Fotomorfogeneze. Skripta PŘFUK, Karolinum.
- Perl –Treverz R., Galun E. (1990) The tomato Cu,Zn superoxide dismutase genes are developmentally regulated and respond to light and stress. *Plant Molecular Biology* **17**, 745-760.
- Petřivalský M., Brauner F., Luhová L., Gagneul D., Šebela M. (2007) Aminoaldehyde dehydrogenase activity during wound healing of mechanically injured pea seedlings. *Journal of Plant Physiology* **164**, 1410-1418.
- Piterková J., Tománková K., Luhová L., Petřivalský M., Peč P. (2005) Oxidativní stres: lokalizace tvorby aktivních forem kyslíku a jejich degradace v rostlinném organismu. *Chem. Listy* **99**, 455-466.
- Quiroga M., Guerrero C., Botella M. A., Barcelo A., Amaya I., Medina M. I., Alonso F. J., Forchetti S. M., Tigier H., Valpuesta V. (2000). A tomato peroxidase involved in the synthesis of lignin and suberin. *Plant Physiology* **122**, 1119–1127.
- Raghavan V. (1973) Blue light Interference in the phytochrome-controlled germination of the spores of *Cheilanthes farinosa*. *Plant Physiol.* **51**, 306-311.
- Rea G., Laurenzi M., Tranquilli E., D'Ovidio R, Federico R., Angelini R. (1998) Developmentally and wound-regulated expression of the gene encoding a cell wall copper amine oxidase in chickpea seedlings. *FEBS Letters* **437**, 177-182.
- Rivero R. M., Ruiz J. M., Garcia P. C., Luis R. Lopez-Lefebvre L. R., Sanchez E., Romeo L. (2001) Resistance to cold and heat stress: accumulation of phenolic compounds in tomato and watermelon plants. *Plant Science* **160**, 315–321.
- Ruiz-Roldan M. C., Garre V., Guarro J. Marine M., Roncero M. I. G. (2008) Role of the White Collar 1 Photoreceptor in Carotenogenesis, UV Resistance, Hydrophobicity, and Virulence of *Fusarium oxysporum*. *Eukaryotic cell* **7**, 1227–1230.
- Sairam R. K., Srivastava G. C., Saxena D. C. (2000) Increased antioxidant activity under elevated temperatures: a mechanism of heat stress tolerance in wheat genotypes. *Biologia plantarum* **43**, 245-251.
- Sakaguchi S., Fukuda T., Takano H., Ono K., Takio S. (2004) Photosynthetic electron transport differentially regulates the expression of superoxide dismutase genes in Liverwort, *Marchantia paleacea* var. *diptera*. *Plant and Cell Physiology* **45**, 318-324.
- Saleh L., Plieth C. (2009) Fingerprinting antioxidative activities in plants. *Plant Methods* **5**.
- Scarpeci T. E., Maria I Zanol M. I., Valle E. M (2008) Investigating the role of plant heat shock proteins during oxidative stress. *Plant Signal Behav.* **3**, 856–857.

- Schafer E., Bowler C. (2002) Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plant. *EMBO reports* **3**, 1042–1048.
- Sellaro R., Hoecker U., Yanovsky M., Chory J., Casal J. J. (2009) Synergism of red and blue light in the control of Arabidopsis gene expression and development. *Curr Biol.* **19**, 1216-1220.
- Shalitin D., Yu X., Mamon M., Mockler T., Lin C. (2003) Blue light-dependent in vivo and in vitro phosphorylation of Arabidopsis cryptochrome 1. *Plan cell* **15**, 2421-2429.
- Sheoran I. S., Ross A. R. S., Olson D. J. H., Sawhney V.K (2009) Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): A proteomic analysis. *Journal of Proteomics* **71**, 624–636.
- Schroda M., Vallon O. Wollman F.A., Beck C. F. (1999) A Chloroplast-targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *The Plant Cell* **11**, 1165–1178.
- Shinomura, T., Uchida, K., and Furuya, M. (2000) Elementary processes of photoperception by phytochrome A for high-irradiance response of hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* **122**,147-156.
- Siegel B. Z. (1993) Plant peroxidases – an organismic perspective. *Plant Growth Regul.* **12**, 303-312.
- Smith H. (2000) Phytochromes and light signal perception by plants - an emerging synthesis. *Nature* **407**, 585-591.
- Smith I. K., Vierheller, T. L., Thorne C. (1989) Properties and function of glutathione reductase in plant. *Physiol. Plant.* **77**, 449-456.
- Sreenivasulu N., Ramanjulu S., Ramachandra-Kini K., Prakash H. S., Shekar-Shetty H., Savithri H. S., Sudhakar C. (1999) Total peroxidase activity and peroxidase isoforms as modified by salt stress in two cultivars of fox-tail millet with differential salt tolerance. *Plant Science* **141**, 1–9.
- Su G., An Z., Zhang W., Liu Y. (2005) Light promotes the synthesis of lignin through the production of H₂O₂ mediated by diamine oxidases in soybean hypocotyls. *Journal of Plant Physiology* **162**, 1297-1303.
- Sullivan J.A., Deng X.W. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in Arabidopsis development. *Developmental Biology* **260**, 289-297.
- Swindell W. R., Huebner M., Weber A. P. (2007) Transcriptional profiling of Arabidopsis heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics* **8**, 125.
- Taiz L., Zeiger E. (2006) Plant Physiology fourth edition, pp.417-443 *Sinauer Associates*.
- Tanno N. (1982) Blue light induced inhibition of seed germination: The necessity of the fruit coats for the blue light response. *Physiol. Plant.* **58**, 18-20.
- Triantaphylide C., Havaux M. (2009) Singlet oxygen in plants: production, detoxification and signaling. *Trends in Plant Science* **14**, 219-228.
- Vacca R. A., de Pinto M. C., Valenti D., Passarella S., Marra E., De Gara L. (2004) Production of reactive oxygen species, alteration of cytosolic ascorbate peroxidase, and impairment of mitochondrial metabolism are early events in heat shock-induced programmed cell death in tobacco Bright-Yellow 2 cells. *Plant Physiology* **134**, 1100-1112.
- Vranova E., Inzé D., Breusegem F. (2002) Signal transduction during oxidative stress. *Journal of Experimental Botany* **53**, 1227–1236.
- Wang H. (2005) Signaling mechanism of higher plant photoreceptors: structure-function perspective. *Current Topics in Developmental Biology* **68**, 227-261.
- Wang W., Vinocur B., Shoseyov O., Altman A. (2004) Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *TRENDS in Plant Science* **9**, 244-252.
- Weller J. L., Perrotta G., Schreuder M. E. L., Tuinen A., Koornneef M., Giuliano G., Kendrick R. E. (2001) Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *The Plant Journal* **25**, 427-440.
- Wilson I. D., Nelil S. J., Hancock J. T. (2008) Nitric oxide synthesis and signalling in plants. *Plant, Cell and Environment* **31**, 622-631.
- Xu P., Xiang Y., Zhu H., Xu H., Zhang Z., Zhang C., Zhang L., Ma Z. (2009) Wheat cryptochromes: Subcellular localization and involvement in photomorphogenesis and osmotic stress response. *Plant Physiology* **149**, 760–774.

- Yoshimura K., Yabuta Y., Ishikawa T., Shigeoka S. (2000) Expression of spinach ascorbate peroxidase isoenzymes in response to oxidative stresses. *Plant Physiol* **123**, 223-234.
- Zhou W., Leul M. (1999) Uniconazole-induced tolerance of rape plants to heat stress in relation to changes in hormonal levels, enzyme activities and lipid peroxidation. *Plant Growth Regulation* **27**, 99–104.
- Zur I., Dubas E., Golemić E., Szechynska-Hebda M., Golebiowska G., Wedzony M. (2009) Stress-related variation in antioxidative enzymes activity and cell metabolism efficiency associated with embryogenesis induction in isolated microspore culture of triticale (x *Triticosecale* Wittm.) *Plant Cell Rep.* **28**, 1279–1287.

SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
APX	askorbátperoxidasa
ARR4	odpovědný regulátor 4 z <i>A. thaliana</i>
AsA	kyselina askorbová
At-cry3	krytochrom 3 z <i>Arabidopsis thaliana</i>
Aux/IAA	auxin/indol-3-octová kyselina
bHLH	helix –smyčka-helix
bZIP	leucinový zip
CAT	katalasa
CAT	gen katalasy
cGMP	cyklický guanosinmonofosfát
CO ₂	oxid uhličitý
CRY	krytochromový gen
cry	krytochromový protein
Cry-DASH	krytochrom z <i>Drosophila</i> , <i>Arabidopsis</i> , <i>Synechocistis</i> a člověka
CSN	COP9 signalosom
DHA	dehydroaskorbát
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ER	endoplazmatické retikulum
EtOH	ethanol
FR	daleké červené světlo
FYPP	fytochrom asociující proteinfosfatasa
GA	kyselina gibberellová
GA3 ox	GA3 oxidasa
GPX	guajakolová peroxidasa
GR	gluthationreduktasa
GSSG	oxidovaný gluthation
HIR	vysoce intenzivní odpověď
Hsp	"heat shock" proteiny
HY5	protáhlý hypokotyl 5
I.N.T	2-(4-jodofenyl)-3-(4-nitrofenol)-5-fenyltetrazolium-chlorid
IAA	indol-3-octová kyselina
kDa	kilodalton
LDP	dlouhodobní
LFR	málo intenzivní odpověď
LOV	světlo, kyslík a napětí
MAP	mitogen-aktivovaný protein
MDA	malondialdehyd
NLS	jaderná lokalizační sekvence
NO	oxid dusnatý
NPH	nefototropický hypokotyl
NR	nitrátreduktasa

O ₂	molekula kyslíku
PCD	programovaná buněčná smrt
Pfr	forma absorbující FR světlo
phot	fototropin
PHR	DNA fotolyasa-příbuzná doména
phy	fytochromový protein
PHY	fytochromový gen
phy3	fytochrom 3
PIF	fytochrom - interagující faktor
Pr	forma absorbující R světlo
R	blízké červené
RNS	reaktivní formy dusíku
ROS	reaktivní formy kyslíku
<i>S.lycopersicum</i>	<i>Solanum lycopersicum</i>
SDP	krátkodenní
SDS	dodecylsulfát sodný
SDS PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti SDS
Ser	serin
SOD	superoxiddismutasa
SPOX	syringaldazinperoxidasa
TBARS	thiobarbiturová kyselina–reaktivní-látka
Thr	threonin
TS	teplotní stres
ULI3	necitlivý na UVB světlo
UV	ultrafialové
VLFRs	velmi málo intenzivní odpověď
Wc-1	„white collar“