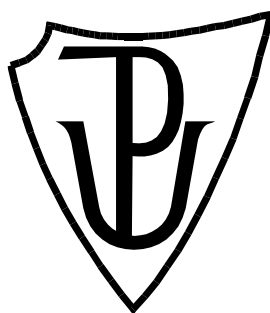


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Funkce fototropinů a kryptochromů v klíčení semen
prostřednictvím regulace aniontových kanálů**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Aneta Rotterová
Studijní program:	Biotechnologie a genové inženýrství
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok:	2019

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl/a jsem seznámen/a s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....
Aneta Rotterová

Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, PhD. za odbornou pomoc, cenné rady, trpělivost, ochotu a čas, který mi věnoval během psaní této bakalářské práce.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Aneta Rotterová
Název práce	Funkce fototropinů a kryptochromů v klíčení semen prostřednictvím regulace aniontových kanálů
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	<p>V této bakalářské práci jsem se zabývala studiem citlivosti klíčení semen kontrolních genotypů <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heynh a jejich fotomorfogenních mutantů k inhibitoru aniontových kanálů 9-AC při kultivaci za různých světelných podmínek. Cílem této práce bylo zjistit, zda aniontové kanály hrají roli v klíčení semen a zda jejich funkce může být ovlivněna světlem prostřednictvím některým z fotoreceptorů modrého světla. Pro experimentální provedení byly použity mutanti <i>cry1-1</i>, <i>cry2-1</i>, <i>phot1</i>, <i>phot2</i> a <i>phot1/2</i>. Výsledky práce ukázaly, že inhibitor 9-AC inhibuje klíčení semen <i>Arabidopsis thaliana</i> a že světlo snižuje citlivost semen k inhibitoru 9-AC. Z výsledků bylo vyvozeno, že funkční CRY1 redukuje inhibiční efekt 9-AC na klíčení semen inkubovaných na červeném světle a funkční CRY2 snižuje citlivost semen k 9-AC za všech světelných podmínek. U fototropinů naopak výsledky vedly k závěru, že fototropiny nejsou pravděpodobně v citlivosti semen k 9-AC zapojeny.</p>
Klíčová slova	aniontové kanály, fotoreceptory, klíčení, 9-AC
Počet stran	52
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Aneta Rotterová
Title	Role of phototropins and cryptochromes in seed germination via regulation of anion channels
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	In this bachelor thesis I have studied the sensitivity of seed germination in <i>Arabidopsis thaliana</i> (L.) Heyh. Responses of seeds to an anion channel inhibitor 9-AC as a function of light conditions was studied in photomorfogenic mutants and their corresponding ecotypes. The aim of this work was to find out whether 9-AC sensitive anion channels play a role in seed germination and if their function can be affected by light through any of the blue photoreceptors. <i>Cry1-1</i> , <i>cry2-1</i> , <i>phot1</i> , <i>phot2</i> and <i>phot1/2</i> mutants were used for experiments. The results of the work showed that the 9-AC inhibitor inhibits the germination of <i>Arabidopsis thaliana</i> seeds and that light reduces seed sensitivity to the 9-AC blocker. The results suggest that functional CRY1 reduces the 9-AC inhibitory effect to seed germination incubated in red light and that functional photoreceptor CRY2 reduces seeds sensitivity to 9-AC under all light conditions tested. On the other hand, the results led to conclusion that phototropins do not play any important role in the seed sensitivity to 9-AC.
Keywords	anion channels, photoreceptors, germination, 9-AC
Number of pages	52
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	10
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY.....	11
2.1 Záření.....	11
2.1.1 Červené záření a fytochromy	12
2.1.2 Modré záření a receptory modrého světla	13
2.1.2.1 Kryptochromy	13
2.1.2.2 Fototropiny	15
2.1.3 Rozdílné role kryptochromů a fototropinů v reakci na modré světlo.....	16
2.1.4 Zapojení COP1 proteinů ve zprostředkování světelného signálu	17
2.2 Membránové transportní proteiny	18
2.2.1 Aktivní přenos	19
2.2.1.1 Pumpy.....	19
2.2.1.2 Transportéry	19
2.2.2 Kanálové proteiny	20
2.2.2.1 Typy aniontových kanálů	21
2.2.2.2 Inhibitory chloridových aniontových kanálů	22
2.3 Klíčení semen	22
2.3.1 Vnější podmínky prostředí na klíčení semene	24
2.3.1.2 Vliv světla na klíčení rostlin.....	24
2.3.2 Vnitřní faktory ovlivňující klíčení semene.....	25
2.3.3 Důvody nevyklíčení semene v podmínkách vhodných pro klíčení.....	26
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1 Materiál a metody.....	27
3.1.1 Rostlinný materiál	27
3.1.2 Příprava MS média	27
3.1.3 Použité koncentrace inhibitoru	27
3.1.4 Klíčení semen	28
4 VÝSLEDKY	29
4.1 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta <i>cry1-1</i>	29
4.2 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta <i>cry2-1</i>	32
4.3 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta <i>phot1</i>	35
4.4 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta <i>phot2</i>	39
4.5 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta <i>phot1/2</i>	41
5. DISKUZE.....	45
6. ZÁVĚR.....	48
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....	49

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	51
-----------------------------------	----

CÍLE PRÁCE

Cílem mé bakalářské práce bylo pomocí farmakologického přístupu vyšetřovat, zda jsou aniontové kanály zapojeny v klíčení semen *Arabidopsis thaliana* a zda aktivita těchto kanálů může být regulována modrým světlem prostřednictvím fotoreceptorů modrého světla.

V teoretické části měly být shromážděny literární zdroje týkající se problematiky klíčení semen, světelných signálních drah a aniontových kanálů. Na základě poznatků z nich získaných měla být vypracována literární rešerše na dané téma.

V experimentální části měly být v podmínkách *in vitro* provedeny experimenty klíčení semen *Arabidopsis thaliana* v závislosti na koncentraci vybraných inhibitorů aniontových kanálů a v závislosti na kvalitě světla.

Práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů PřF UP Olomouc a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

1. ÚVOD

Světlo a jeho vnímání rostlinou je pro růst a vývoj rostliny velice důležité. Rostliny jsou závislé na absorpci energie fotosynteticky aktivního záření. Rostliny neustále vnímají kvalitu světla, směr dopadajícího záření, dobu jeho působení (tzv. fotoperiodu) a množství záření. Podle toho, v jakých světelných podmínkách se rostlina nachází, dochází k ovlivňování růstu a vývoje rostliny, k tzv. fotomorfogenezi. Pro vnímání záření mají rostliny specifické receptory. Informace z oblasti červené (640 až 700 nm) i dlouhovlnné červené (700 až 740 nm) přináší fytochromy. Kryptochromy zaznamenávají informace z modré části spektra (425 až 490 nm) s přesahem do UV-A oblasti (320 až 400 nm) a oblasti zelené (490 až 56 nm). Fototropiny zprostředkovávají informace také z modré oblasti světla, mimo to přináší i informace o pozici zdroje záření. Odpověď rostlin na světlo se projevuje např. ve změně směru růstu rostliny nebo při indukci kvetení. Dobře prozkoumaná je jeho role při otevírání průduchů. Světlo je také pravděpodobně součástí odpovědi rostlin k abiotickým stresům.

Iontové kanály jsou struktury z proteinů umístěné v membráně buněk rostlin a v membráně vakuol. Složí k přenosu iontů z jednoho prostředí do druhého. Jsou zapojeny v řadě fyziologických procesů, jako je otevírání a zavírání průduchů, tvorba membránového potenciálu, regulace prodlužování buněk hypokotylu, transport živin či metabolismus. Jejich úloha v klíčení semen je však zatím málo prozkoumaná. Z tohoto důvodu jsem se ve své bakalářské práci zaměřila na studium toho, jak inhibitor aniontových kanálů 9-AC (anthracen-9-karboxylová kyselina) ovlivňuje klíčení semen a zda fotoreceptory modrého světla hrají roli v ovlivnění citlivosti klíčení semen *Arabidopsis thaliana* k inhibitoru aniontových kanálů 9-AC. Použitím genetického přístupu, spočívajícím v analýze mutantů s defekty ve fotoreceptorech kryptochomech a fototropinech jsem se snažila zjistit, zda tyto fotoreceptory jsou zapojeny v ovlivnění klíčení a citlivosti semen rostlin *Arabidopsis thaliana* k inhibitoru 9-AC.

Výsledky experimentů ukázaly možné zapojení kryptochromů v regulaci funkce 9-AC citlivých aniontových kanálů při klíčení rostlin. Výsledky rovněž naznačují, že signální dráhy zapojené v regulaci exprese 9-AC citlivých aniontových kanálů by mohly být propojeny se signálními drahami fytochromů.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Záření

Viditelné záření, jehož vlnová délka je v rozmezí 400 až 750 nm, je nejdůležitějším vnějším faktorem pro růst a vývoj rostlin, fotoautotrofních přisedlých organismů. Nejzákladnějším procesem, ve kterém je záření využíváno, je fotosyntéza. Světlo využívané pro fotosyntézu rostliny vnímají fotosyntetickými pigmenty. Kromě fotosyntézy mohou rostliny vnímat světlo jako signál, kterým řídí svůj vývoj. Tento proces se nazývá fotomorfogeneze, při kterém světlo jako signál změní vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii (Taiz a Zeiger, 2010).

Rostliny jsou schopny zaznamenat záření (světelný signál) v oblasti viditelného záření a v oblasti blízkého záření ultrafialového, tedy záření v rozmezí vlnových délek 300 až 750 nm. Jsou na něj schopny reagovat morfologickými změnami. K tomu, aby rostlina mohla reagovat na záření, obsahují její buňky specifické receptory. Tyto receptory však reagují pouze na záření určitých délek. Nejvýznamněji pak na oblast červeného (625 až 740 nm) a modrého záření (430 až 500 nm). Rostliny obsahují dva základní typy fotoreceptorů, pro červené světlo a pro modré světlo (a UV) (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová and Fisher, 2011).

Fytochromy jsou fotoreceptory, které zaznamenávají červenou oblast spektra (640 až 700 nm) a oblast dlouhovlnného červeného záření (700 až 740 nm). Druhou skupinou jsou fotoreceptory pro modrou oblast spektra. Kryptochrom zaznamenává informace z oblasti modrého (420 až 490 nm), blízkého ultrafialového (320 až 400 nm) a z oblasti zeleného záření (490 až 560 nm). Fototropiny také zprostředkovávají informace z modré oblasti záření a jsou schopny, na rozdíl od kryptochromů, zaznamenat i pozici zdroje záření (Pavlová and Fisher, 2011).

Fotoreceptory jsou chromoproteiny. Díky chromoforu vázanému na proteinovou složku jsou schopny absorbovat záření. Při absorpci záření dochází ke strukturální změně fotoreceptoru, což umožňuje přenos signálu. Spustí se signální reakce, která typicky zahrnuje druhé posly a fosforylační kaskády. Významnou reakcí, ke které dochází při přenosu signálu je regulace transkripce. Jedná se o klíčovou reakci při regulaci fotomorfogeneze. Transkripce více než 20 % jaderného genomu je regulováno světelným signálem (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová and Fisher, 2011).

2.1.1 Červené záření a fytochromy

Fytochromy jsou fotoreceptory pro oblast červeného záření. Jedná se o fotoreverzibilní chromoprotein. Proteinová složka váže chromofor a vytváří monomer. Funkční fytochrom je dimer. Jako chromofor se váže lineární tetrapyrol. Ten v závislosti na vlnové délce, která ji ozáří, mění svoji konformaci a tím i svoji biologickou aktivitu. Fytochrom tedy reaguje na signál vratnou změnou své struktury (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová and Fisher, 2011).

Fytochromy obsahují buňky všech rostlinných orgánů nahosemenných i krytosemenných rostlin. Nalezneme je i v rostlinách etiolovaných, u zelených řas, mechů a kaprad'orostů. Molekulární lokalizace fytochromu je v cytoplazmě, často se však nachází na membránových preparátech a v izolovaných organelách (např. v jádrech, plastidech, mitochondriích). Fytochromy ovlivňují klíčení některých semen, zakládání listů a kořenů, dlouhivý růst stonku. Jeho neméně důležitou funkcí je účast na fotoperiodizmu (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová and Fisher, 2011).

Fytochromy se dělí na dva typy – fytochromy typu I (phyA) a fytochromy typu II (phyB až E). Hladina fytochromu I je vysoká u zelených rostlin, které se nachází několik hodin ve tmě a u rostlin etiolovaných. Při vystavení těchto rostlin na světlo dochází k jeho degradaci a poklesu jeho hladiny. Fytochromy typu II se naopak vyskytují ve vyšší hladině na světle (jsou fotostabilní) a jejich hladina klesá ve tmě (Pavlová 2005; Pavlová and Fisher, 2011).

Důležitou vlastností fytochromů je jejich fotoreverzibilita, v závislosti na kvalitě světla dochází k jejich přeměně z formy označované Pr na formu označovanou Pfr a naopak. Syntéza fytochromů probíhá do formy Pr, která má absorpční maximum v oblasti krátkovlnného červeného světla (640 až 700 nm). Pokud tato forma absorbuje foton, mění se na formu Pfr a absorpční maximum této formy se posune do oblasti dlouhovlnného červeného světla (700 až 740 nm). Při absorpci fotonu formou Pfr dochází zpět k přeměně na formu Pr. Forma Pfr fytochromu je fyziologicky (fotomorfogenní) aktivní. Fytochromy ve formě Pfr jsou schopny autofosforylace. To jim umožňuje fosforylovat i jiné proteiny nebo s nimi interagovat. Tento jev je důležitým mechanismem přenosu signálu. Fytochromy ve formě Pfr jsou translokovány do jádra. V jádře se vážou na struktury nazývané nukleární tělíska. V těchto místech se vyskytují i ostatní proteiny zapojené do přenosu světelného signálu (Pavlová and Fisher, 2011).

Fytochromy se nemohou přímo vázat na DNA. Ke zprostředkování odpovědi na světelný signál potřebují další složky. Jednou ze složek zapojených ve zprostředkování odpovědi na světelný signál fytochromem je transkripční faktor HY5 (z anglického *long hypocotyl 5*). Ten ovlivňuje pozitivně transkripci genů, které jsou řízeny fytochromem. Další důležitou složkou ke zprostředkování reakce na světelný signál pomocí fytochromu je protein COP1, který funguje jako E3 ubikvitinová ligáza. Označuje k odbourání proteiny, které mají fotomorfogenní funkci, např. HY5 transkripční faktor. Ve tmě jsou COP1 proteiny lokalizovány v jádře a na světle jsou z jádra transportovány do cytosolu. Jejich aktivita je ovlivňována v jádře i v cytosolu. Kromě fytochromů interagují i s dalšími proteiny zapojenými v odpovědi rostliny na světlo, např. s kryptochromy (Pavlová and Fisher, 2011).

2.1.2 Modré záření a receptory modrého světla

Mezi nejznámější účinky záření z modré oblasti spektra patří fototropismus, regulace prodlužovacího růstu stonku, otevírání průduchů nebo pohyb chloroplastů. Je známo mnoho případů, při kterých dochází k interakci modrého a červeného záření, např. při fotoperiodických reakcích ovlivňuje fytochrom citlivost rostlin k působení modrého záření. Pro vnímání modrého záření jsou u rostlin známy dva hlavní typy fotoreceptorů, kryptochromy a fototropiny. Kryptochromy mají hlavní regulační roli v rostlinné fotomorfogenezi. Primární funkcí fototropinů je regulace fototropismu, pohybu chloroplastů, otevírání průduchů a rané inhibice růstu hypokotylu (Pavlová, 2005; Pavlová and Fisher, 2011).

2.1.2.1 Kryptochromy

Kryptochromy byly původně objeveny v *Arabidopsis thaliana*, ale později byl zjištěn jejich výskyt i v jiných rostlinách, mikroorganismech a zvířatech. Hlavní funkcí kryptochromů je zajištění inhibice prodlužování hypokotylu a fotoperiodická kontrola začátku kvetení. Kromě toho jsou kryptochromy zapojeny v další řadě světelných reakcí, jako je tropický růst, otevírání průduchů, vývoj svěracích buněk průduchů, vývoj kořene, odpověď na bakteriální a virové patogeny a odpověď na abiotické stresy (Procházka *et al.*, 1998).

Kryptochromy se skládají ze dvou hlavních domén. Na N-konci obsahují PHR doménu a na C-konci CCE doménu. PHR doména se váže na chromofor flavin adenin dinukleotid

(FAD) a je sekvenčně velmi podobná DNA fotolyázám. CCE doména slouží jako efektorová doména, pravděpodobně je nestrukturovaná a reguluje funkci kryptochromů.

Pokud se kryptochromy nachází ve tmě, jejich chromofor se vyskytuje ve stavu FAD. Pokud dojde k absorpci fotonu modrého záření, chromofor se redukuje na formu FADH a je fotomorfo-geneticky aktivní. Tato redukce je spojena s konformační změnou CCE domény, což umožňuje přenos signálu. Kryptochromy jsou tedy fosforylovány nebo ubikvitovány v závislosti na modrém záření. Takto se mohou vázat na signalizační partnerské proteiny, čímž mění genovou expresi na transkripční i posttranskripční úrovni. Konformační změny CCE domény mohou vest k inaktivaci COP1 ubikvitinové ligázy. CCE doména může interagovat s COP1 proteiny ve tmě i na světle, ale pouze na světle je inaktivuje. Funkce COP1 proteinů je ovlivněna i fytochromy (Pavlová, 2005; Pavlová and Fisher, 2011).

Arabidopsis obsahuje tři typy kryptochromů – kryptochrom 1 (ozn. CRY1), kryptochrom 2 (ozn. CRY2) a kryptochrom 3 (ozn. CRY3). Geny *Arabidopsis* pro kryptochrom 1 a kryptochrom 2 se vyskytují ve všech buněčných typech a orgánech. Exprese kryptochromové mRNA není nijak dramaticky ovlivněna modrým světlem. Avšak promotory pro CRY1 i CRY2 jsou pod kontrolou cirkadiálních hodin, kdy vrcholu dosahují ve světelné fázi a minima ve tmě. CRY3 se vyznačuje fotolyázovou aktivitou (Procházka *et al.*, 1998).

CRY1 i CRY2 z *Arabidopsis* jsou rozpustné bílkoviny hromadící se v jádře. CRY1 se navíc může vyskytovat i v cytosolu semenáčků. Podle výskytu v buňce se pak liší jeho funkce. Jaderně lokalizovaný CRY1 zprostředkovává inhibici prodloužení hypokotylu modrým světlem a depolarizaci cytoplazmatické membrány po vystavení modrému světlu, zatímco CRY1 cytosolický protein je zodpovědný za stimulaci růstu kotyledonu a prodloužení kořenů v reakci na modré světlo. CRY2 se vyskytuje pouze v jádře a jeho funkcí je zprostředkování počátku kvetení a inhibice růstu hypokotylu (Wu a Spalding, 2007; Pavlová and Fisher, 2011).

Hlavní funkcí kryptochromů je jejich zapojení v deetiolaci semenáčků. Deetiolaci nazýváme fyziologické změny, které nastávají při přechodu sazeniček z tmy pod půdou na světlo. Pro tento proces jsou charakteristické některé morfologické změny jako zastavení růstu hypokotylu, rozvoj kotyledonu a rozvoj chloroplastů. Tyto morfologické změny nastávají v reakci na modré světlo a jsou zprostředkovány fytochromy i kryptochromy (Procházka *et al.*, 1998).

Inhibici prodlužování buněk hypokotylu zprostředkovávají oba kryptochromy, avšak jejich zapojení v tomto procesu je závislé na intenzitě osvětlení semenáčků modrým světlem. V raném vývoji semenáčků, kdy jsou semenáčky ozařovány pouze zářením nízké intenzity, přispívají oba kryptochromy (CRY1 i CRY2) k inhibici způsobené modrým světlem. Při vysokých intenzitách záření jsou reakce modrého světla zprostředkovány především CRY1 a role CRY2 je téměř zanedbatelná. CRY2 není zapojen do zprostředkování reakce na vysoké intenzity modrého světla kvůli tomu, že je fotolabilní. Proto jeho hladina při vysoké intenzitě modrého záření klesá. K poklesu dochází, protože exprese CRY2, na rozdíl od CRY1, podléhá rychlé degradaci modrým zářením (Lin *et al.*, 1998).

Při inhibici růstu hypokotylu modrým zářením dochází k aktivaci aniontových kanálů, což vede k depolarizaci plazmatické membrány a inhibici prodloužení buněk. Jaderný CRY1 je zodpovědný za aktivaci aniontových kanálů v plazmatické membráně buněk a zprostředkovává tak inhibici prodlužování buněk hypokotylu modrým světlem (Spalding, 2000; Wu a Spalding, 2007).

Kromě inhibice prodlužování buněk hypokotylu jsou kryptochromy zapojeny i do stimulace růstu kotyledonu modrým světlem. Na rozdíl od inhibice růstu hypokotylu zprostředkovávají tento proces CRY1 nacházející se v cytosolu. Úloha CRY2 je i v tomto procesu omezena pouze na nízké intenzity modrého záření (Lin *et al.*, 1998; Wu a Spalding, 2007).

Další významnou funkcí kryptochromů je jejich zapojení ve stimulaci vývoje plastidů indukovaných modrým světlem. Základním mechanismem, který zodpovídá za vývoj plastidů během deetiolace je změna genové exprese indukovaná modrým světlem. Právě kryptochromy zprostředkovávají změny genové exprese způsobené modrým světlem (Procházka *et al.*; 1998; Pavlová, 2005).

2.1.2.2 Fototropiny

Fototropiny jsou fotoreceptory modrého záření přinášející informace o poloze jeho zdroje. Jejich odpověď na modré záření je tedy nejčastěji vyjádřena usměrněnými pohyby reagujícími na zdroj záření. Tyto pohyby se nazývají tropismy. Fototropiny hrají důležitou roli i při přemísťování chloroplastů při vysokých intenzitách ozáření, při otevírání průduchů a v některých růstových reakcích (např. růstu listů do plochy při nízké intenzitě ozáření, nebo při ranní inhibici růstu hypokotylu) (Procházka *et al.*, 1998; Pavlová and Fisher, 2011).

Fototropiny mají na své N-doméně dvě sekvence, které se označují LOV1 sekvence a LOV2 sekvence (z angl. *light oxygen voltage*). Tyto sekvence jsou schopny interagovat s flaviny a jsou známé i u řady jiných proteinů. U fototropinů jsou to místa schopná interagovat s chromoforem. Chromofor fototropinů je flavinmononukleotid (ozn. FMN). Na jeden apoprotein jsou navázány dvě molekuly FMN. C-doména fototropinů je zodpovědná za katalytickou proteinkinázovou aktivitu (Pavlová and Fisher, 2011).

Adice chromoforů na LOV sekvence probíhá až po absorpci světla. Excitovaný flavinmononukleotid se váže na zbytek cysteinu v sekvenci LOV. Takto vzniklý komplex je stabilní a k jeho rozpadu dochází až ve tmě. Vznik komplexu vede ke konformačním změnám proteinu, které mají za následek získání serinthreoninové transkinázové aktivity a schopnosti autofosforylace. Ve tmě dochází k interakci sekvence LOV s katalytickou oblastí C-domény, což vede k inhibici transkinázové aktivity (Pavlová and Fisher, 2011).

Jsou známé dva druhy fototropinů – fototropin 1 (ozn. Phot1) a fototropin 2 (ozn. Phot2), které jsou do určité míry funkčně zastupitelné. Transkripce genu pro Phot1 nepodléhá regulaci světlem. Transkripce genu pro Phot2 je světlem stimulována. Proteiny fototropinů se ve tmě vyskytují asociovány s plazmatickou membránou. Na světle se jejich určité množství uvolní do cytoplazmy (Pavlová and Fisher, 2011).

2.1.3 Rozdílné role kryptochromů a fototropinů v reakci na modré světlo

Kryptochromy jsou známy především z jejich zapojení do fotomorfogenních odpovědí, zatímco fototropiny regulují světlem indukované pohyby. Fotomorfogenní odpovědi jsou pomalé a nevratné. Můžeme mezi ně zařadit inhibici elongace hypokotylu, rozvoj kotyledonů. Světlem indukované pohyby jsou rychlé a vratné. Jedná se o fototropismus, otevírání stomat a pohyby chloroplastů (Ohgishi *et al*, 2003).

Kryptochromy mohou být umístěny v jádře, což jim umožňuje regulovat expresi genů indukovaných modrým světlem. Fototropiny jako kinázy lokalizované v oblasti membrány mohou mít pouze přídatnou roli v ovlivnění transkripce genů. Jejich funkce je především regulace fotoindukovaných pohybů, kdy se jedná o relativně rychlé, snadno pozorovatelné odezvy (Ohgishi *et al*, 2003; Pavlová and Fisher, 2011).

Byly však zjištěny některé výjimky. Např. Phot1 je zapojen v počátku inhibice prodlužování hypokotylu modrým světlem, jako fotomorfogenní odpovědi. Stejně tak bylo zjištěno, že kryptochromy jsou schopny indukovat ohyby hypokotylu při absenci fototropinů. Ovšem signální dráha, kterou kryptochromy tyto indukované pohyby

zprostředkovávají je sdílena i fytochromy. Také bylo zjištěno, že ve většině odpovědí na modré světlo, funguje každý z receptorů nezávisle na těch ostatních (Ohgishi *et al.*, 2003).

2.1.4 Zapojení COP1 proteinů ve zprostředkování světelného signálu

Jedním z mechanismů, který je zapojený v signální dráze světelných receptorů je regulace exprese genů pomocí COP1 proteinů. Tyto proteiny fungují jako E3 ubikvitinová ligáza. Označují k odbourání transkripční faktory, které se vážou na promotory genů řízených světlem. Jejich funkcí je tedy negativní regulace fotomorfogeneze. Lokalizace COP1 proteinů na světle je v cytosolu. Ve tmě dochází k transportu COP1 proteinů do jádra buňky, kde plní svoji funkci. V jádře se COP1 přímo vážou na transkripční faktory a znemožňují tak expresi daných genů. COP1 působí jako přepínač mezi fotomorfogenním vývojem rostlin na světle a etiolizací ve tmě (Pavlová and Fisher, 2011).

Jedním z genů, který podléhá regulaci řízené zářením je gen pro chalkon syntetázu (CHS). Exprese tohoto genu je typická pro procesy probíhající při de-etiolizaci. Na promotor tohoto genu se váže HY5 transkripční faktor a na světle pozitivně ovlivňuje jeho expresi. Ve tmě se na HY5 váže COP1 a účinně tak potlačuje expresi tohoto genu (Ang *et al.*, 1998).

HY5 je transkripční faktor, který působí jako pozitivní regulátor fotomorfogeneze. Mutant *hy5* vykazuje prodloužený hypokotyl na modrém, dlouhovlnném a krátkovlnném červeném světle i bílém světle, což ukazuje na zapojení tohoto transkripčního faktoru v signalizační dráze phyA, phyB a CRY1. Transkripční faktor HY5 je lokalizovaný v jádře, proto změny v množství jaderného COP1 mohou účinně regulovat jeho funkci. Ve tmě je množství COP1 v jádře nejvyšší, a tak účinně potlačuje fotomorfogenezi. S narůstající světelnou intenzitou a snižujícím se množstvím COP1, klesá i inhibiční efekt COP1 na aktivitu transkripčního faktoru HY5. K tomu, aby došlo k přechodu do vývoje etiolizace je potřeba vystavení semenáčků do tmy na déle jak 14 hodin, aby se mohlo v jádru nahromadit vysoké množství COP1 proteinu. Pokud je úroveň COP1 nízká, nestačí k potlačení fotomorfogenního vývoje, ale může být dostatečná pro ovlivnění funkcí během normálního vývoje (Koornneef *et al.*, 1980; Arnim *et al.*, 1994; Ang *et al.*, 1998).

COP1 se váže na HY5 přímo a specificky. Přímá vazba HY5 na obojí, COP1 i na promotor genu CHS by mohla představovat molekulární kaskádu, která zprostředkovává světelnou kontrolu genové exprese. Vazba COP1 na HY5, ale není

jediným mechanismem, který by mohl ovlivňovat změny mezi etiolovanou rostlinou a rostlinou rostoucí na světle. Ve studii s mutantem *cop1* došlo k vývoji, který je typický pro rostliny rostoucí na světle u rostlin rostoucích ve tmě. Při této studii také zjistili, že ve tmě dochází k expresi světlem regulovaných genů (např. genů pro CAB, chlorofyl a/b vazebného proteinu a RBCS, karboxyláza/oxygenáza malé jednotky ribulóza-1,5-bisfosfátu). Proto lze předpokládat, že ve tmě COP1 proteiny potlačují funkci i transkripčních faktorů těchto genů (Deng *et al.*, 1991; Ang *et al.*, 1998).

2.2 Membránové transportní proteiny

Biologické membrány fungují jako selektivně propustné bariéry obklopující buněčné části nebo celé buňky. Jejich důležitou funkcí je zajištění výměny látek skrz membránu. Je nutný odchod látek odpadních a vstup esenciálních živin do buňky. K tomu, aby tento usměrněný pohyb látek mohl být uskutečněný, musí být udržováno různé složení látek na vnitřní a vnější straně membrány. Rozdílné složení látek uvnitř a vně buňky vede k tvorbě koncentračního gradientu a membránového (elektrického) potenciálu. Koncentrační gradient je vytvořen rozdílnou koncentrací látek na membráně. Tyto látky jsou pak schopny pasivně procházet díky difúzi po směru koncentračního gradientu. Pokud je potřeba jejich transport proti směru koncentračního gradientu, je k tomu využívána energie a transport se označuje jako aktivní. Membránový potenciál je naopak vytvářen rozdílnou hodnotou náboje látek uvnitř a vně buňky. Pokud látky prochází přes membránu, ať už po nebo proti koncentračnímu gradientu a nesou si určitý náboj, dochází také ke změnám membránového potenciálu (Lodish *et al.*, 2008).

Kombinace rozdílu náboje na membráně a rozdílu koncentrací látek na membráně je nazýván jako elektrochemický gradient. Elektrochemický gradient je vytvářen a využíván membránovými transportními proteiny. Slouží pro buňku jako zásobárna potenciální energie a umožňuje širokou škálu procesů probíhajících v buňce. Ovlivňuje transport látek přes membránu, může sloužit k produkci energie nebo signalizaci mezi buňkami v pletivu a mezi pletivy a orgány (Lodish *et al.*, 2008).

Membránové transportní proteiny jsou proteiny zapuštěné v membránách, které jsou schopny selektivního přenosu látek přes membránu. Cytoplazmatická membrána na povrchu buňky je tvořena fosfolipidovou dvojvrstvou, jejíž vnější část je hydrofobní. Z tohoto důvodu složí jako skvělá bariéra pro látky polárního charakteru, látky hydrofilní a pro velké biomolekuly. Samovolně tedy prochází přes membránu pouze některé plyny (např. O₂ a CO₂) a malé nenabitě molekuly (např. močovina a ethanol). Tyto látky

prochází přes membránu prostou difúzí. Pokud rychlost přenosu není dostatečná, může být jejich přenos také urychlován speciálními proteiny. Ostatní látky jako jsou ionty, aminokyseliny, cukry a ostatní ve vodě rozpustné látky přes membránu nejsou schopny samovolně projít a musí být přeneseny pomocí membránových transportních proteinů, které jsou velmi selektivní vůči konkrétnímu druhu látek, který přenáší. Membránové transportní proteiny lze rozdělit na transportéry, pumpy a kanály. Pumpy vytváří a udržují koncentrační gradient, kterého poté využívají ke své činnosti kanály. Kanály jsou svou činností velice rychlé a jsou schopny generovat rychlé změny membránového potenciálu (Lewin *et al.*, 2006; Lodish *et al.*, 2008; Roelfsema *et al.*, 2012).

2.2.1 Aktivní přenos

Aktivní přenos látek přes membránu probíhá proti koncentračnímu gradientu dané látky, a proto vyžaduje dodání energie. Tato energie může být dodána v různých formách – ve formě ATP, ve formě volné energie uložené v elektrochemickém gradientu nebo v dalších formách zásob energie. Aktivní přenos látek přes membránu je dvojího typu – primární a sekundární. Primární přenos je zprostředkován pumpami, sekundární přenos je zprostředkován transportéry (Lewin *et al.*, 2006; Lodish *et al.*, 2008).

2.2.1.1 Pumpy

Pumpy, zprostředkovávající primární aktivní přenos, jsou ATPasy využívající energii uloženou v ATP k přenosu látek proti jejich koncentračnímu gradientu. Pohánějí akumulaci energeticky méně příznivých substrátů nebo k pohonu výtokových cest. Pomáhají tak koncentrační gradient na membráně udržovat. Příkladem je H⁺-ATPasová (protonová) pumpa (Lewin *et al.*, 2006; Lodish *et al.*, 2008).

2.2.1.2 Transportéry

Transportéry jsou proteiny, které umožňují přenos velkého spektra iontů a molekul přes membránu. K tomuto přenosu je využívána přímá vazba dané látky na transportérový protein, která umožňuje její přenos. Transportéry využívají k tomuto přenosu energii uloženou v elektrochemickém gradientu. Transportéry jsou trojího typu: symportery, uniportery a antiportery. Uniportery zprostředkovávají transport pouze jednoho typu molekul po koncentračním gradientu, jedná se o tzv. usnadněnou difúzi. Oproti tomu antiportery a symportery zprostředkovávají pohyb jednoho typu molekul proti koncentračnímu spádu díky pohybu jedné nebo více molekul po jejich koncentračním

spádu. Tato molekula může být transportována stejným (symporter) nebo odlišným (antiporter) směrem. Např. lysin je transportován do buňky činností Na^+ /lysin symporteru. Antiportery a symportery se někdy souhrnně nazývají jako kotransportery. Přenos zprostředkovaný kotransportery se také nazývá jako sekundární aktivní přenos, protože nevyužívá energii ATP přímo, ale využívá energii uloženou v elektrochemickém gradientu vytvořeném primárním aktivním transportem (Lewin *et al.*, 2006; Lodish *et al.*, 2008).

2.2.2 Kanálové proteiny

Kanály jsou proteiny umožňující transport vody, specifických iontů a malých hydrofobních molekul po koncentračním spádu. Část kanálu, kterou prochází roztoky daných látek, se nazývá pór. Kanály mohou mít různé konformace. Může se jednat o jednotlivé proteiny, které formují celý pór uvnitř membrány. Nebo se mohou vyskytovat jako oligomery, složené ze dvou a více podjednotek, které společně formují pór (Lewin *et al.*, 2006).

Některé kanály jsou neustále otevřené, tzv. neuzavřené kanály. Avšak většina kanálů je uzavřených a otevírají se pouze v odpovědi na určitý chemický nebo elektrický signál. Regulátory, které řídí otevření nebo uzavření kanálu, mění konformaci kanálových proteinů, což má za následek otevření nebo uzavření póru. Regulace otevírání a zavírání kanálu je velice rychlá, proto mohou být tyto procesy zapojeny do signalizace (Lewin *et al.*, 2006; Lodish *et al.*, 2008).

Elektrochemický gradient udává směr toku iontů přes kanál. Roztok iontů prochází kanálem v energeticky příznivém směru, tedy po koncentračním gradientu. V tomto druhu transportu nedochází ke spotřebování energie, proto je také označován jako pasivní transport (Lewin *et al.*, 2006).

Kanálové proteiny jsou velice selektivní a rychlost průtoku iontů přes ně je vysoká. Pohybuje se až 10^8 za sekundu, což jsou hodnoty blízko maximální rychlosti difúze iontů ve vodě. Rychlost transportu přes iontové kanály je tedy daleko vyšší než transport pomocí pump a přenašečů (Lewin *et al.*, 2006).

Prostředí kanálového póru je podobné pórům naplněným vodou, proto ionty, které prochází kanálem, musí být alespoň částečně hydratovány. Hydratační obal iontů částečně neutralizuje jejich náboj a umožňuje tak lepší průchod kanálem. Menší ionty, které na sobě mají větší hydratační vrstvu, prochází kanálem rychleji než velké ionty se stejným nábojem (Lewin *et al.*, 2006).

2.2.2.1 Typy aniontových kanálů

Můžeme rozlišit minimálně dva typy aniontových kanálů. První typ je kódován geny ALMT a je nazýván tzv. rychlým typem kanálů (R-typ). Druhý, tzv. pomalý typ kanálů (S-typ) je kódován geny SLAC/SLAH (Roelfsema *et al.*, 2012).

Tyto dva typy kanálů se od sebe liší především v rychlosti aktivace a deaktivace závislé na napětí. Aktivace R-typu kanálu je zhruba 1000x rychlejší oproti aktivaci S-typu aniontového kanálu. R-typ je aktivován během 50 ms a potřebuje k aktivaci pozitivnější potenciál než S-typ aniontových kanálů. S-typ je aktivován extrémně pomalu (1 až 2 minuty), ale zato může vykazovat aktivaci po dlouhou dobu, i více jak 60 minut. Pro aktivaci mu stačí negativnější membránový potenciál. A také jej není možné úplně inaktivovat. Oba projevují nižší stupeň aktivity při negativním membránovém potenciálu a aktivují se, když se potenciál stává pozitivnějším. Oba typy jsou také stimulovány kyselinou abscisovou. S-typ a R-typ aniontových kanálů, ale vykazují odlišné fyziologické funkce. Ve svěracích buňkách průduchů mohou být jejich funkce jasně odděleny. Nevíce byly aniontové kanály studovány ve svěracích buňkách průduchů rostlin, na kterých je lehce viditelný účinek při zavření a otevření průduchu. Regulace otevření a uzavření průduchů je ovlivněna jak fotosynteticky aktivním zářením, tak modrým světlem. Fotosynteticky aktivní záření způsobuje změny v intracelulárním obsahu CO₂. Tyto změny pak aktivují S-typ kanálů. Nemohou ho však aktivovat přímo. Tato aktivace je závislá na OST1 protein kináze, která je schopná fosforylovat SLAC1 kanály svěracích buněk, čímž je aktivuje. OST1 protein kináza je také zapojena ve zprostředkování odpovědi na aktivaci aniontových kanálů pomocí kyseliny abscisové. Při její nízké koncentraci dochází k inhibici OST1. Při vyšších koncentracích kyselina abscisová způsobuje uvolnění této inhibice a OST1 může fosforylovat N-terminální konec SLAC1 aniontových kanálů, což má za důsledek jejich aktivaci (Schroeder *et al.*, 1993; Roelfsema *et al.*, 2012).

Odpovědi aniontových kanálů ve svěracích buňkách na modré světlo jsou zprostředkovány fototropiny. Fototropiny inhibují S-typ aniontových kanálů a stimulují H⁺-ATPasu. V důsledku redukce uvolňování aniontů a zlepšování extruze H⁺ se hyperpolarizuje plazmatická membrána a dochází k příjmu K⁺ iontů. Akumulace K⁺ iontů je spojena s přítokem aniontů a zvětšením svěracích buněk, což má za následek otevření průduchů (Roelfsema *et al.*, 2012).

2.2.2.2 Inhibitory chloridových aniontových kanálů

Chloridové kanály (Cl^- kanály) jsou typem integrovaných membránových proteinů, které formují póry v membráně umožňující průchod iontů skrz membránu. Chlór patří mezi mikronutrienty rostlin, je přítomen především ve formě Cl^- . Chlorid je hlavní osmotickou látkou ve vakuole, je zapojen v udržení turgoru a do osmoregulace. V cytoplazmě může významně regulovat aktivitu enzymů. Kromě toho Cl^- tok má významnou roli při stabilizaci membránového potenciálu, regulaci intracelulárního pH a elektrické vodivosti. Cl^- kanály jsou propustné i pro jiné typy iontů než jsou Cl^- . R-typ kanálů je propustný pro SCN^- , NO_3^- , Br^- , F^- , I^- , Cl^- a malát²⁻ (seřazeny od nejvyšší propustnosti po nejnižší propustnost). S-typ kanálů je propustný pro NO_3^- , Br^- , F^- , I^- , Cl^- , malát²⁻ (seřazeny od nejvyšší propustnosti po nejnižší propustnost). Aktivita chloridových kanálů může být ovlivněna extracelulárním přídatkem různých efektorů. Jejich účinek závisí na typu chloridového kanálu (White and Broadley, 2001).

R-typ Cl^- kanálů je vratně inhibován extracelulárním přídatkem kyseliny etakrynové, antracen-9-karboxylové kyseliny (9-AC), niflumové kyseliny (NIF), kyseliny [(6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-2-methyl-1-oxo-1H-inden-5-yl) oxy] octové (IAA-94) a (5-nitro-2-(3-fenylpropylamino) benzoové kyseliny (NPPB). Tyto sloučeniny snižují velikost proudů aniontů skrz R-typ Cl^- kanálů a posouvají vztah I/V k negativnějšímu napětí. Např. 9-AC a NPPB účinně inhibují výtok Cl^- iontů z buňky (Tavares *et al*, 2011; White and Broadley, 2001).

S-typ Cl^- kanálů ve svěracích buňkách *Vicia faba* je nevratně inhibován niflumovou kyselinou, vratně inhibován při extracelulární aplikaci 9-AC, IAA-94 a NPPB a není ovlivněn DIDS. IAA-94 je při tom fyziologicky účinnější inhibitor aniontových kanálů S-typu oproti typu R-typu. Při inhibici aniontových kanálů *Arabidopsis thaliana* však nejsou NPPB ani kyselina niflumová tak účinné. S-typ aniontových kanálů je také inhibován difenylamin-2-karboxylovou kyselinou (DPC) a glibenclamidem. Tyto inhibice jsou zvráceny vystavením kyselině abscisové (White and Broadley, 2001; Tavares *et al*, 2011).

2.3 Klíčení semen

Klíčení semene je proces, při kterém se semeno dostává z dormance a obnovují se jeho metabolické a růstové aktivity. Z embrya se tak stává klíčící rostlina. Při tomto procesu se začínají prodlužovat buňky radikuly (kořínku) a hypokotylu (podděložního článku).

Klíčení začíná příjmem vody suchým semenem a končí momentem, kdy kořínek prorazí osemení (Pavlová and Fisher, 2011).

U dvouděložných rostlin rozlišujeme dva druhy klíčení. Klíčení nadzemní, tzv. epigeické, se vyznačuje tím, že dělohy semene a vzrůstový vrchol jsou prodlužujícími se buňkami hypokotylu vyneseny až nad povrch půdy. Dělohy zezelenají a jsou tedy pro rostlinu prvními asimilačními orgány. Růst buněk epikotylu (článku nadděložního), vzrůstového vrcholu a listů začíná až později. Dělohy většinou poté odpadávají. U klíčení podzemního, tzv. hypogeického, dochází k prodlužování buněk epikotylu a dělohy tak zůstávají v zemi a slouží jako zdroj zásobních látek. Mezi rostliny, které klíčí epigeicky patří např. huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), len setý (*Linum usitatissimum*) a tykev jedlá (*Cucurbita pepo*). Mezi rostliny hypogeicky klíčící patří např. hrách setý (*Pisum sativum*) a vikev bob (*Vicia faba*) (Luštinec and Žárský, 2003; Pavlová and Fisher, 2011).

Vliv na vyklíčení semene má mnoho faktorů. Je nutný dostatek vody, kyslíku a vhodná teplota. U některých semen mají významnou roli i světelné podmínky. Důležitý vliv mají i vnitřní hladiny rostlinných hormonů. Nejdůležitější roli pak má kyselina abscisová (ABA) a kyselina gibberelová (GA₃). Klíčivost semen nejvíce ovlivňuje rovnováha mezi těmito dvěma hormony. Tyto hormony vykazují opačný vliv na klíčení a dormanci semen a vzájemně negativně ovlivňují biosyntézu toho druhého (Pavlová and Fisher, 2011; Guillaume *et al.*, 2017).

ABA působí jako pozitivní regulátor dormance a negativní regulátor klíčení semen. GA₃ působí jako negativní regulátor dormance, ale pozitivně ovlivňuje klíčení semen. Při nízkých teplotách během zimy se dormance zvyšuje. Je to způsobeno zvyšováním exprese ABA syntetizujících genů a GA₃ katabolických genů. Za takovýchto podmínek narůstá endogenní množství ABA v semenech. Také dochází ke zvýšené hladině transkriptů signálních genů ABA. Naopak vyšší teploty na jaře a v létě mají za následek snížení dormance. Dochází k poklesu endogenního množství ABA doprovázeného poklesem transkripční úrovně ABA signálních genů. Na rozdíl od nich dochází k nárůstu exprese ABA katabolických genů a genů syntetizujících GA₃ (Kucera *et al.*, 2005; Guillaume *et al.*, 2017).

ABA a GA₃ mají sice hlavní roli v regulaci dormance a klíčení semen, ale nejsou to jediné hormony zapojené v těchto procesech. Důležitý je také ethylen nebo brassinosteroidy. Oba typy těchto hormonů podporují klíčení semene a potlačují efekty ABA (Kucera *et al.*, 2005).

2.3.1 Vnější podmínky prostředí na klíčení semene

K tomu, aby byla překonána dormance semene je často potřeba nízká teplota, která slouží k poklesu inhibičních látek v embryu. Nízké teploty se také využívá v praxi při procesu stratifikace. Semena se nechají v chladu nabobtnat, aby se urychlilo a synchronizovalo jejich klíčení (Pavlová and Fisher, 2011).

Nabobtnání semene je pro klíčení nezbytné. Obnovují se při něm transportní a selekční funkce membrán. Voda je navíc nezbytná pro dlouhivý růst buněk a hydrolýzu zásobních látek. Je to transportní médium a umožňuje naředění a vyplavení látek inhibičního charakteru (Procházka *et al.*, 1998).

Kyslík má významnou roli při získání energie pomocí respirace. Při respiraci se získá energie ze zásobních látek ve formě ATP a také metabolity pro tvorbu nových látek (Pavlová and Fisher, 2011).

Vliv světla na klíčení se nazývá fotoblastismus. Rozlišujeme fotoblastismus kladný, záporný a neutrální. O fotoblastismu neutrálním hovoříme u rostlin, které klíčí bez ohledu na světlo. Pokud jsou rostliny ke klíčení světlem stimulovány, jedná se o fotoblastismus kladný. Pokud světlo klíčení inhibuje, mluvíme o fotoblastismu negativním. Aby bylo možné vliv světla na klíčení pozorovat, musí být semeno již do určitého stupně hydratované. Celkový vzhled rostliny pak odpovídá světelným podmínkám panujícím na stanovišti. Tyto informace jsou zpracovány a interpretovány pomocí fotoreceptorů nazývaných fytochromy, kryptochromy a fototropiny (Pavlová, 2005; Pavlová and Fisher, 2011).

2.3.1.2 Vliv světla na klíčení rostlin

Klíčení fotoblastických semen podléhá regulaci zářením. Obecně lze říci, že ke klíčení semen dochází při ozáření v rozmezí 640 nm až 670 nm. Záření inhibující klíčení se pohybuje v rozmezích vlnových délek od 720 až do 750 nm (Pavlová and Fisher, 2011).

Hlavním mechanismem zapojeným v regulaci klíčení světlem je zprostředkování této reakce pomocí fytochromů. Červené záření má na klíčení rostlin obecně stimulační účinek, ale záleží na typu a délce ozáření semen. Z fytochromů jsou do regulace klíčení zapojeny především phyA a phyB. Jejich funkce v regulaci klíčení světlem jsou oddělitelné. PhyA řídí klíčení vyvolané ultrafialovým, viditelným a červeným zářením při velmi nízkém ozáření. Klíčení zprostředkované phyA není fotoreverzibilní. PhyB řídí odpovědi vyvolané červeným světlem při nízké ozářenosti. Jeho účinky jsou fotoreverzibilní. V počátečních fázích klíčení je množství phyA velice nízká. Proto phyB

řídí počáteční fáze klíčení semen. Při delším vystavení klíčících semen tmě dochází k akumulaci phyA v semenech a phyA přebírá funkci ve zprostředkování klíčení vyvolaného světlem (Shinomura *et al.*, 1996).

Regulační dráha, kterou jsou schopny fytochromy vyvolat klíčení semen, zahrnuje ovlivnění množství ABA v semenech. Bylo zjištěno, že při ozáření červeným světlem dochází ke stimulaci exprese GA₃-biosyntetických genů. Regulace metabolismu ABA pomocí fytochromů je zprostředkována GA₃ závislými i nezávislými mechanismy. Regulace klíčení je sice zprostředkována především fytochromy, ale je známé i zapojení kryptochromů do regulace klíčení (Swada *et al.*, 2008; Barrero *et al.* 2014).

Modré světlo může také ovlivňovat expresi genů zapojených do regulace hladiny ABA během inhibice klíčení. Např. v částečně zralých zrnech ječmene byla zjištěna inhibice klíčení zrn na modrém světle způsobené zvýšenou hladinou ABA zprostředkovaná CRY1 (Poppe, 1998).

U *Arabidopsis thaliana* dochází při klíčení semen na modrém světle k vzájemné interakci mezi phyA, phyB a CRY1. V této vzájemné kooperaci hraje rozhodující roli množství ozáření. Při nízké ozáření modrým světlem indukuje klíčení pouze phyA. Při vysoké ozáření semen modrým světlem má CRY1 nejdůležitější funkci. U *Arabidopsis thaliana* bylo také prokázáno, že modré světlo může potlačovat klíčivost semen, které předtím byly vystaveny modrému světle. Tato reakce, ale není závislá na CRY1, ale zprostředkovává ji phyB (Shinomura *et al.*, 1996; Poppe, 1998).

2.3.2 Vnitřní faktory ovlivňující klíčení semene

Stěžejní účinek na klíčení semene mají gibereliny. Jedná se o cyklické diterpeny syntetizované především v rostoucích pletivech. Účinek giberelinů na klíčení semen je stimulační. Gibereliny se za vhodných podmínek syntetizují v embryu a jsou transportovány do aleuronové vrstvy, kde vyvolávají syntézu amyláz a hydrolytických enzymů. Tyto enzymy štěpí zásobní látky v endospermu a poskytují tak živiny pro vyvíjející se embryo. Opačný účinek má ABA. Ta navozuje dormanci semen a semeno v dormanci udržuje. Při dormanci semene se vyskytuje v největším množství v dělohách. Ke snížení jejího obsahu dochází při vystavení semene nízkým teplotám nebo při jeho přílišné dehydrataci (Procházka *et al.*, 1998; Luštinec and Žárský, 2003; Née *et al.*, 2017).

2.3.3 Důvody nevyklíčení semene v podmínkách vhodných pro klíčení

Semena někdy nevyklíčí, i když mají vhodné vnější podmínky ke klíčení. Jedním z důvodů je dormance samotného embrya. Takové embryo obsahuje velké množství ABA a nízký obsah giberelinů. Ke klíčení semene nedojde ani v případě, že se v endospermu, perispermu nebo obalových vrstvách semene budou nacházet látky inhibičního charakteru. Klíčení mohou bránit i pletiva obklopující embryo. Pokud budou obsahovat vosky nebo např. sklerenchym (mechanické pletivo), stanou se nepropustnými pro vodu a plyny. Některé velmi pevné obaly semene mohou prodlužovat jeho dormanci, tím že brání kořínku prolomit osemení. V přírodě dochází k narušení takto pevných obalů v trávicím traktu živočichů, působením saprofytických mikroorganismů a vystavením semene velmi vysokým nebo naopak velmi nízkým teplotám. Odstranění pevných obalů lze v praxi provést mechanicky, např. tlakem nebo třením s abrazivou nebo působením kyseliny. Takto pevné obaly semene, bránící klíčení nalezneme např. u jasanu (*Fraxinus*), řepně (*Xanthium*) a růží (Pavlová and Fisher, 2011).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Rostlinný materiál

Pokusy byly prováděny na semenech huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) a jeho mutantech. V experimentech byli použiti recesivní fotomorfogenní mutanti s defekty ve fotoreceptorech CRY1 a CRY2. Fotomorfogenní mutant *cry1-1* byl generován rychlými neutrony v ekotypu Ler (Landsberg erecta) a fotomorfogenní mutant *cry2-1* byl generovaný v ekotypu Col (Columbia). Semena mutantů *cry1-1* a *cry2-1* byla získána prostřednictvím TAIR a poskytnuta ABRC (*Arabidopsis* Biological Research Center, Ohio State University, USA). Dále byli použiti recesivní recesivní mutanti *phot1*, *phot2* a dvojitý mutant *phot1/2* odvození od genotypu *glabra-1* (*gl-1*). Mutace byla indukovaná chemicky pomocí EMS. Semena byla laskavě poskytnuta Winslow R. Briggs (Carnegie Institution of Washington, Stanford, California, USA).

3.1.2 Příprava MS média

Klíčení semen bylo studováno na pevném (agarovém) kultivačním médiu MS (Murashige and Skoog 1962), které obsahovalo makro a mikro elementy (4,3 g/l, Duchefa Biochemie; Cat. No. M0221.0050), 1% sacharózy (10 g/l), pufr MES (195,2 mg/l). Pomocí 1M KOH bylo upraveno pH média na 6,1, po sterilizaci média autoklávováním klesne na požadovanou hodnotu pH 5,7. Připravené médium se rozlilo po 400 ml do pěti skleněných lahví s uzavíratelným plastovým vrškem, do každé láhve bylo přidáno 2,8 g fytoagaru (finální koncentrace 0,7%). Takto připravené médium bylo vysterilizováno autoklávováním.

3.1.3 Použité koncentrace inhibitoru

V experimentu byl použit inhibitor aniontových kanálů 9-AC (anthracen-9-karboxylová kyselina). Inhibitor byl používán ve čtyřech zvolených koncentracích 0, 100, 150 a 200 $\mu\text{mol/l}$. Pro každou koncentraci bylo připraveno 120 ml média, což je objem potřebný pro jeden experiment testující oba genotypy ve všech světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Testované koncentrace a pipetovaná množství zásobního roztoku 9-AC (10^{-2} M) jsou uvedeny v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Použité koncentrace zásobního roztoku 9-AC a pipetované množství zásobního roztoku 9-AC na 120 ml použitého média.

Testovaná koncentrace [μmol]	Množství zásobního roztoku na 120 ml média [ml]
0	0
100	1,2
150	1,8
200	2,4

3.1.4 Klíčení semen

Pro každý pokus bylo potřeba přibližně 400 semen od každého z testovaných genotypů. Potřebné množství semen bylo naváženo (8 mg přibližně odpovídá 400 semenům) tři dny před zahájením pokusu. Semena byla namočena do destilované vody a uložena do tmy do lednice (teplota kolem $+5\text{ }^{\circ}\text{C}$) za účelem stratifikace. V den zahájení pokusu byla semena povrchově vysterilizovaná v 1,5 ml mikrozkumavce pomocí 1,5 % roztoku Sava po dobu 25 minut. Během sterilizace byla semena v mikrozkumavce protřepávána a nakonec pětkrát promyta sterilní destilovanou vodou v laminárním boxu pomocí automatické pipety o objemu 100-1000 μl . Na sterilní kulaté Petriho misky (průměr 90 mm) s MS médiem obsahujícím požadovanou koncentraci inhibitoru 9-AC byla v laminárním flowboxu pomocí automatické pipety o objemu 2-20 μl vysázena sterilní semena. Na každou Petriho misku bylo vysázeno zhruba 40 semen. Po výsevu byly misky oblepeny po svém obvodu ve dvou vrstvách lepicí páskou z netkané textilie (Softpore nebo Urgopore) a umístěny ve vertikální poloze do růstových komor (Microclima 1000E Snijders Scientific, The Netherlands) s modrým nebo červeným světlem. Zdrojem modrého světla s maximální ozářeností $10\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ při 440 nm byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue, zdrojem červeného světla s maximální ozářeností $10\ \mu\text{mol m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$ při 660 nm byla zářivka Philips TLD36W/15-Red. Petriho misky určené pro pokusy ve tmě byly zabaleny do alobalu a takto také umístěny do růstové komory. Semena byla kultivována při teplotě $+23\text{ }^{\circ}\text{C}$. Hodnoty klíčivosti semen byly sledovány vždy od 3. nebo 4. dne od vysetí až po 7. den od vysetí. Ze tří až čtyř opakování daného experimentu byly hodnoty zprůměrovány a vyneseny do grafu.

4 VÝSLEDKY

Ke zhodnocení zapojení aniontových kanálů a fotoreceptorů modrého světla v klíčení semen *Arabidosis thaliana* byla sledována inhibice klíčení v závislosti na množství přidaného inhibitoru. Experimenty byly prováděny podle postupu uvedeného v metodice. Klíčení bylo pozorováno ve tmě, na modrém a na červeném světle za různého přídavku inhibitoru 9-AC do kultivačního média.

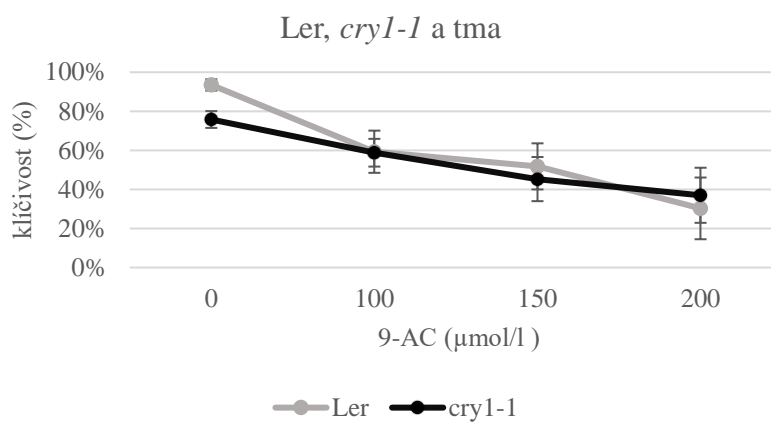
4.1 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta *cryI-1*

Klíčivost semen ekotypu Ler po 7 dnech inkubace ve tmě dosahovala hodnot kolem 94 %. Inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média inhiboval postupně klíčení semen, přičemž největší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl pozorován při jeho koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$. Podobně jako u Ler 9-AC inhiboval ve tmě klíčení semen mutanta *cryI-1*, přičemž citlivost semen obou genotypů k 9-AC dosahovala podobných hodnot (Obr. 1, Obr. 2).

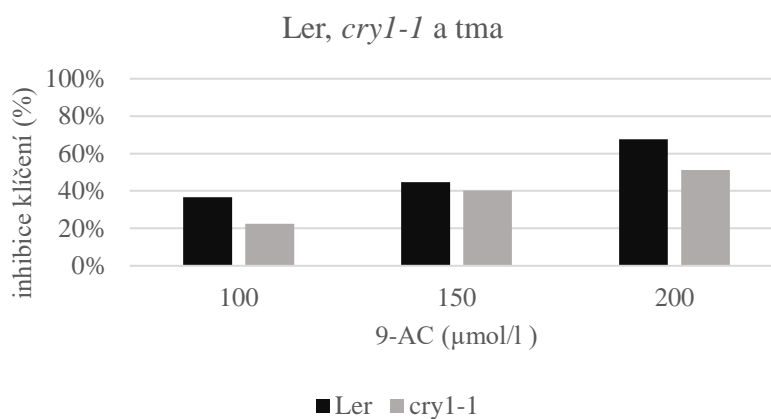
Klíčivost semen ekotypu Ler inkubovaných na modrém světle po dobu 7 dní dosahovala hodnot okolo 97 %. Inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média v různých koncentracích inhiboval postupně klíčení semen (Obr. 3). Nejvyšší inhibiční efekt byl pozorován při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC (Obr. 4). Míra inhibice vyvolaná při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC na modrém světle byla u ekotypu Ler snížena oproti míře inhibice vyvolané inhibitorem 9-AC ve tmě ze zhruba 15 % na 11 %. Podobně jako u Ler 9-AC inhiboval klíčení semen mutanta *cryI-1*, přičemž citlivost obou genotypů k 9-AC dosahovala podobných hodnot (Obr. 3, Obr. 4).

Klíčivost semen ekotypu Ler po 7 dnech inkubace na červeném světle dosahovala hodnot okolo 94 %. Přídavky inhibitoru 9-AC do kultivačního média inhibovaly postupně klíčení semen (Obr. 5). Nejvyšší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl pozorován při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 6). Míra inhibice způsobená inhibitorem 9-AC na červeném světle byla snížena oproti míře inhibice vyvolané inhibitorem 9-AC ve tmě. U mutanta *cryI-1*, podobně jako Ler, byl pozorován inhibiční efekt inhibitoru 9-AC na klíčení semen (Obr. 5). Hodnoty inhibice vyvolané inhibitorem 9-AC u klíčení semen mutanta *cryI-1* byly rovněž sníženy na červeném světle oproti hodnotám zaznamenaným u semen mutanta *cryI-1* ve tmě. Avšak citlivost obou genotypů k 9-AC se lišila. Mutant *cryI-1* vykazoval zvýšenou citlivost k inhibitoru 9-AC oproti Ler na červeném světle při všech použitých koncentracích inhibitoru (Obr. 6). Inhibice klíčení semen u mutanta *cryI-1* na červeném světle dosahovala hodnot okolo 21 % při použité koncentraci

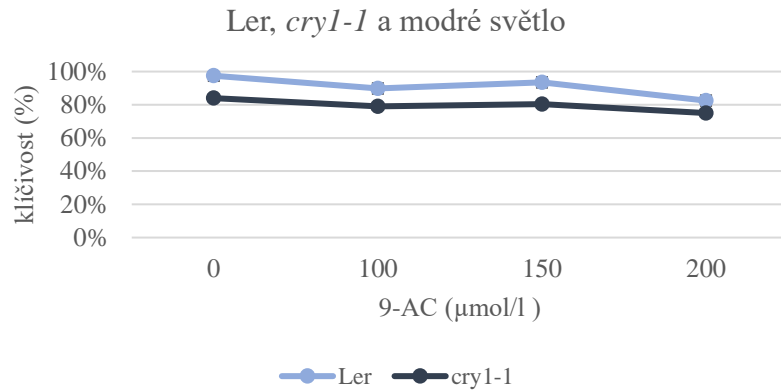
200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC, zatímco inhibice klíčení semen u ekotypu Ler na červeném světle dosahovala hodnot okolo 7 % při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC (Obr. 6).



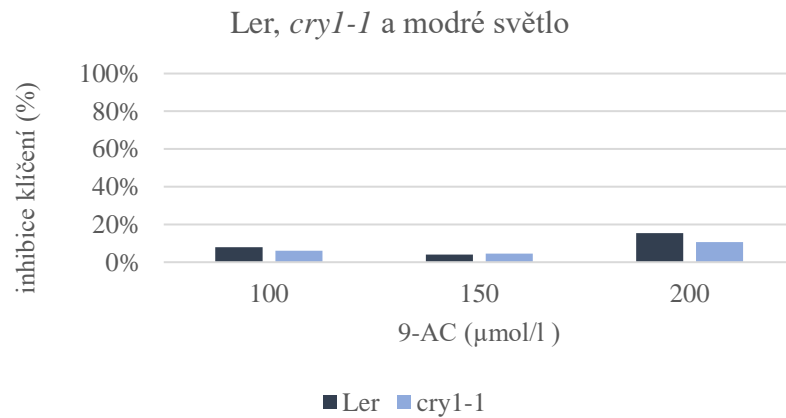
Obr. 1: Klíčivost semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze čtyř nezávislých experimentů.



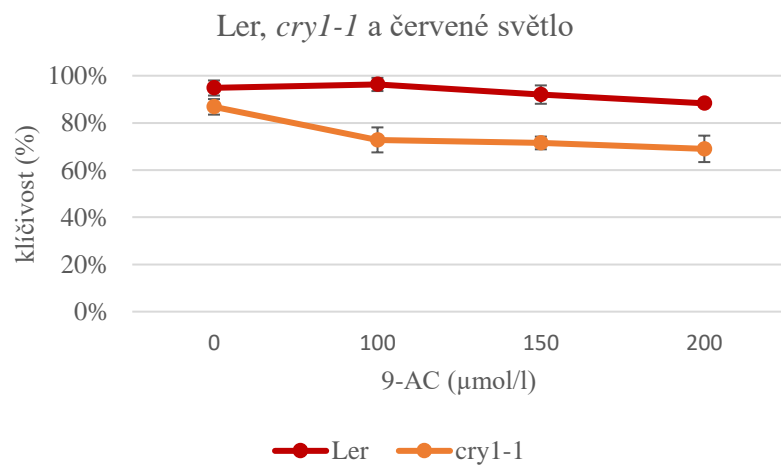
Obr. 2: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



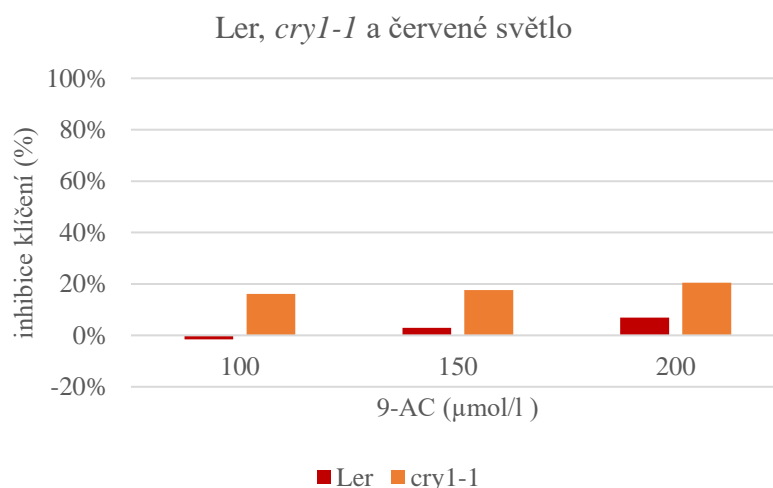
Obr. 3: Klíčivost semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze čtyř nezávislých experimentů.



Obr. 4: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



Obr. 5: Klíčivost semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze čtyř nezávislých experimentů.



Obr. 6: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Ler) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.

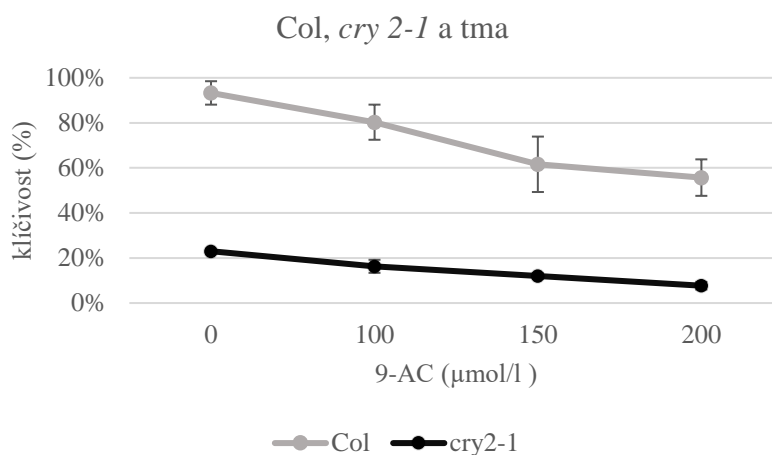
4.2 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta *cry2-1*

Klíčovost semen ekotypu Col po 7 dnech inkubace ve tmě dosahovala hodnot okolo 93 % (Obr. 7). Přidavky inhibitoru 9-AC do kultivačního média v různých koncentracích postupně inhibovaly klíčení semen, přičemž největší inhibiční efekt byl pozorován při koncentraci 200 µmol/l (Obr. 8). Klíčivost semen mutanta *cry2-1* dosahovala po 7 dnech inkubace ve tmě daleko nižších hodnot, zhruba 23 %. Inhibitor 9-AC při různých přidavcích do kultivačního média inhiboval růst mutanta *cry2-1* ve tmě (Obr. 7). Naměřené hodnoty inhibice způsobené 9-AC však dosahovaly vyšších hodnot u mutanta *cry2-1* než u Col. Např. při použité koncentraci 200 µmol/l 9-AC se hodnota inhibice u mutanta *cry2-1* ve tmě pohybovala okolo 67 %, zato u Col se pohybovala okolo 40 % (Obr. 8).

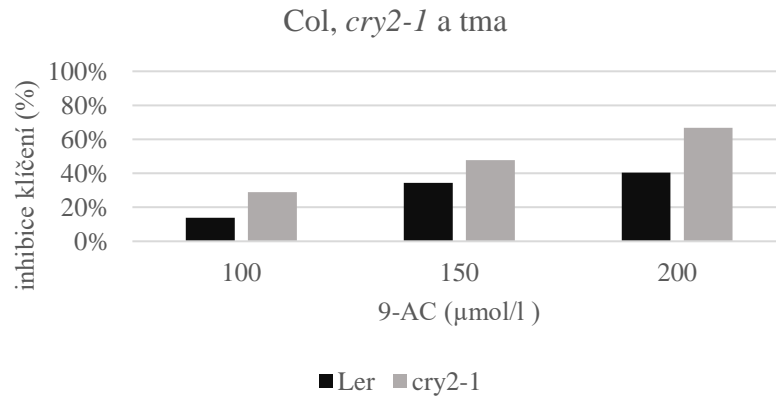
Klíčovost semen ekotypu Col po 7 dnech inkubace na modrém světle dosahovala hodnot okolo 91 % (Obr. 9). Inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média inhiboval klíčení semen, přičemž nejvyšší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl pozorován při koncentraci 150 µmol/l (Obr. 10). Hodnoty inhibice semen Col inkubovaných na modrém světle byly nižší než hodnoty inhibice semen Col naměřené ve tmě. Klíčivost semen mutanta *cry2-1* inkubovaná na modrém světle po dobu 7 dní dosahovala hodnot okolo 42 % a přidavky inhibitoru 9-AC inhibovaly klíčení semen *cry2-1* (Obr. 9). Nejvyšší inhibiční efekt 9-AC byl pozorován při koncentraci 150 µmol/l (Obr. 10). Míra inhibice vyvolaná u mutanta *cry2-1* inhibitorem 9-AC na modrém světle dosahovala vyšších

hodnotu než míra inhibice vyvolaná u ekotypu Col inhibitorem 9-AC na modrém světle. Např. při použité koncentraci 150 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC byly zaznamenány hodnoty inhibice u mutanta *cry2-1* okolo 78 %, u ekotypu Col 10 % (Obr. 10).

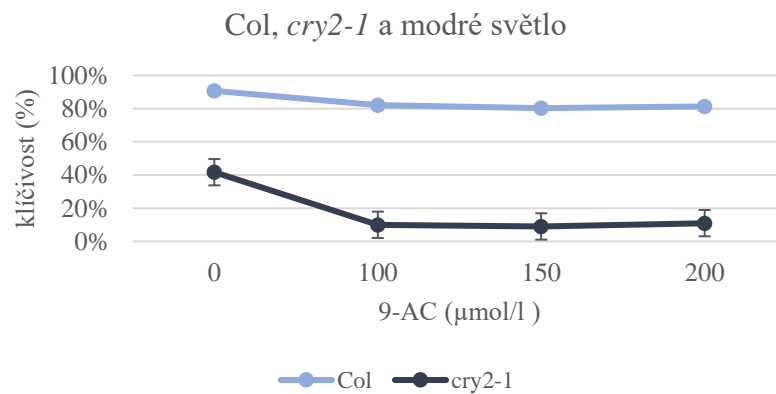
Klíčivost semen ekotypu Col po 7 dnech inkubace na červeném světle dosahovala hodnot okolo 94 %. Inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média inhiboval postupně klíčení semen (Obr. 11). Jeho nejvyšší inhibiční efekt byl pozorován při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 12). Hodnoty inhibice klíčení semen zaznamenané na červeném světle u ekotypu Col byly nižší než hodnoty inhibice klíčení semen ve tmě. U mutanta *cry2-1* dosahovala klíčovost semen na červeném světle hodnot okolo 40 % a inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média inhiboval postupně klíčení semen *cry2-1* (Obr. 11), přičemž největší inhibiční efekt byl pozorován při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 12). Mutant *cry2-1* vykazoval vyšší citlivost k inhibitoru 9-AC na červeném světle než ekotyp Col. Např. při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ se hodnoty inhibice pohybovaly okolo 65 % u mutanta *cry2-1*, zatímco u Col okolo 21 % (Obr. 12).



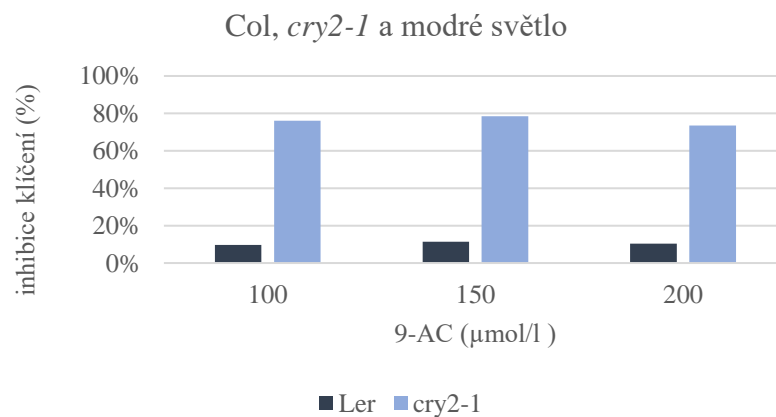
Obr. 7: Klíčivost semen mutanta *cry2-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



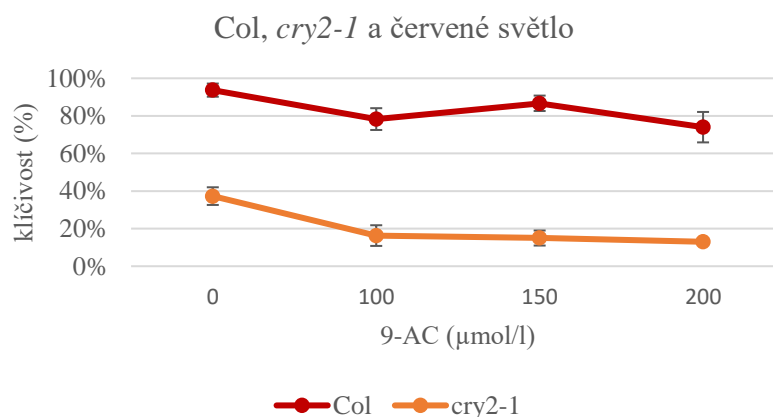
Obr. 8: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry2-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



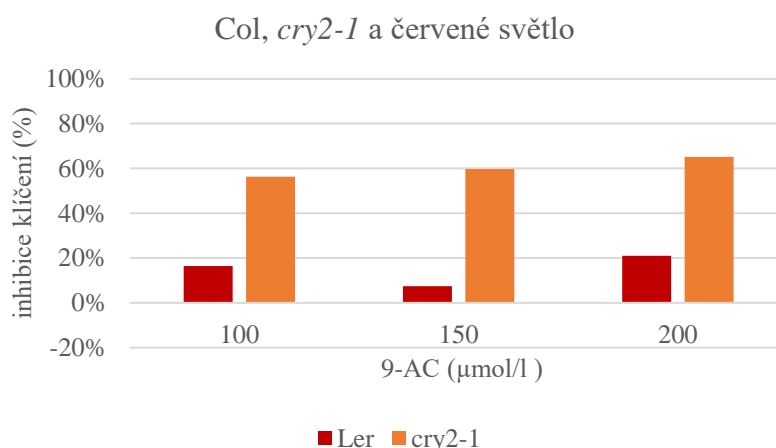
Obr. 9: Klíčivost semen mutanta *cry2-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 10: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry2-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



Obr. 11: Klíčivost semen mutanta *cry1-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen ± SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 12: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *cry2-1* a odpovídajícího WT (Col) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.

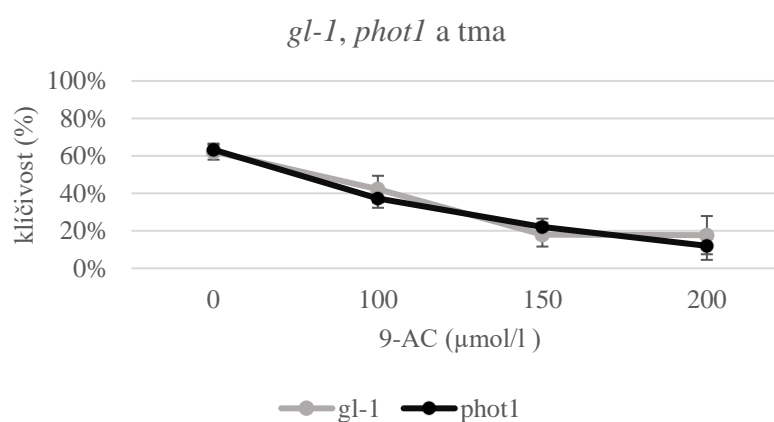
4.3 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta *phot1*

Klíčivost semen genotypu *gl-1* po 7 dnech inkubace ve tmě dosahovala hodnot okolo 62 %. Přidávky inhibitoru 9-AC do kultivačního média postupně inhibovala klíčení semen (Obr. 13). Největší inhibiční efekt 9-AC byl pozorován při použité koncentraci 200 μmol/l (Obr. 14). Podobně jako u *gl-1* přidavek 9-AC do kultivačního média inhiboval klíčení semen ve tmě i u mutanta *phot1* (Obr. 13). Citlivost semen obou genotypů k 9-AC dosahovala podobných hodnot (Obr. 14).

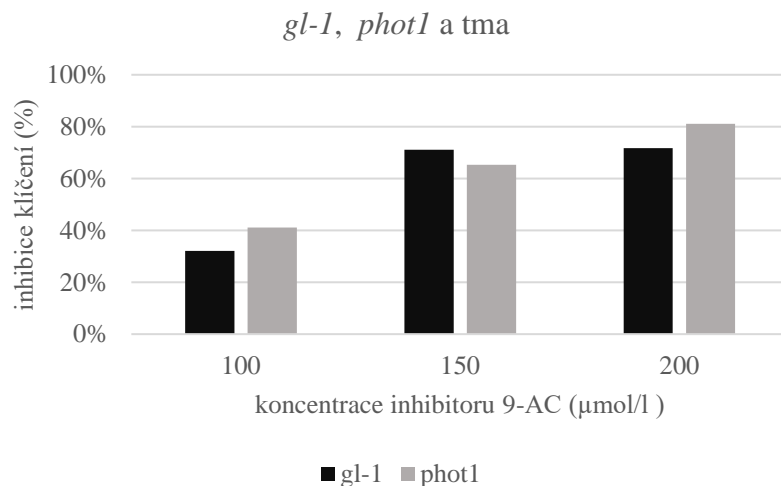
U semen genotypu *gl-1* kultivovaných 7 dní na modrém světle dosahovala klíčivost hodnot okolo 78 %. Přidavek inhibitoru 9-AC do kultivačního média postupně inhiboval

klíčení semen *gl-1* na modrém světle (Obr. 15), přičemž největší inhibiční účinek byl pozorován při použité koncentraci inhibitoru 9-AC 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 16). Hodnoty inhibice *gl-1* způsobené přidavkem 9-AC na modrém světle byly sníženy oproti hodnotám pozorovaným ve tmě. U mutanta *phot1* byl pozorován podobný inhibiční účinek 9-AC jako u *gl-1* (Obr. 15). U obou genotypů inkubovaných na modrém světle byly zaznamenány podobné hodnoty inhibice způsobené přidavkem 9-AC do kultivačního média. U mutanta *phot1* bylo rovněž pozorováno snížení citlivosti k inhibitoru 9-AC na modrém světle oproti tmě (Obr. 16).

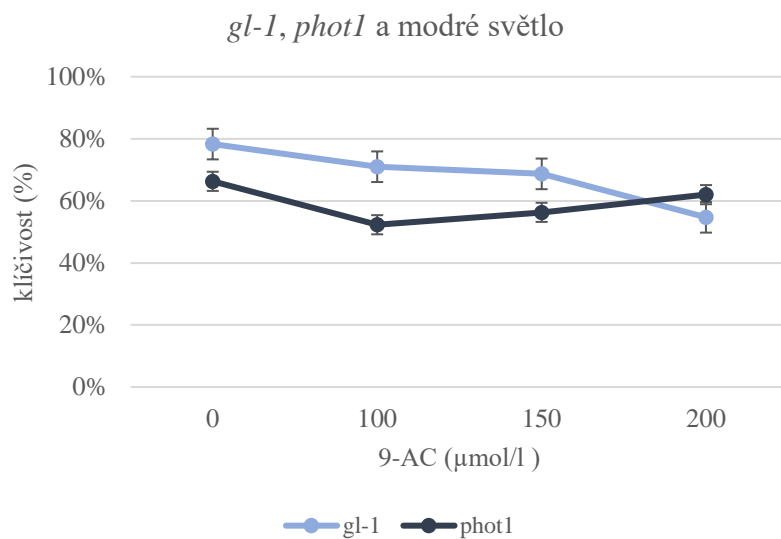
Klíčivost semen genotypu *gl-1* po 7 dnech inkubace na červeném světle dosahovala hodnot okolo 80 %. Přidavky inhibitoru 9-AC do kultivačního média inhibovaly postupně klíčení semen (Obr. 17), přičemž nejvyšší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl pozorován při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 18). Hodnoty klíčivosti semen mutanta *phot1* na červeném světle a za přítomnosti 9-AC byly podobné klíčivosti semen *gl-1* (Obr. 17). Hodnoty relativní inhibice klíčivosti semen *phot1* dosahovaly podobných hodnot jako relativní inhibice *gl-1* (Obr. 18).



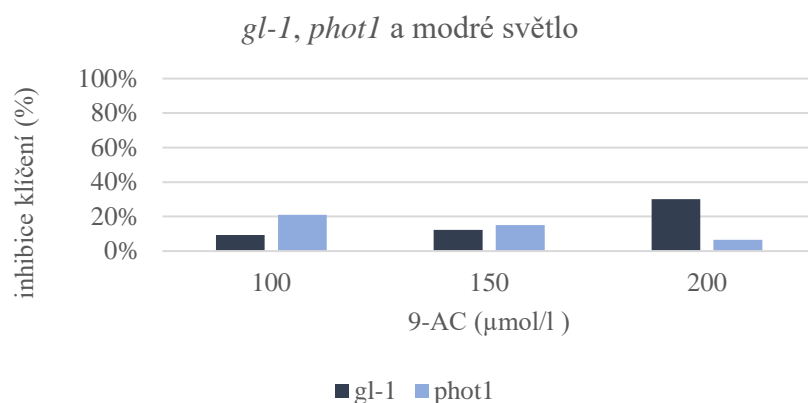
Obr. 13: Klíčivost semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



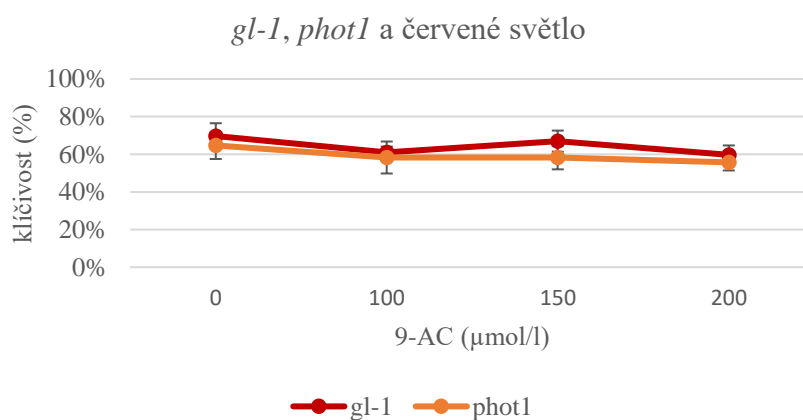
Obr. 14: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



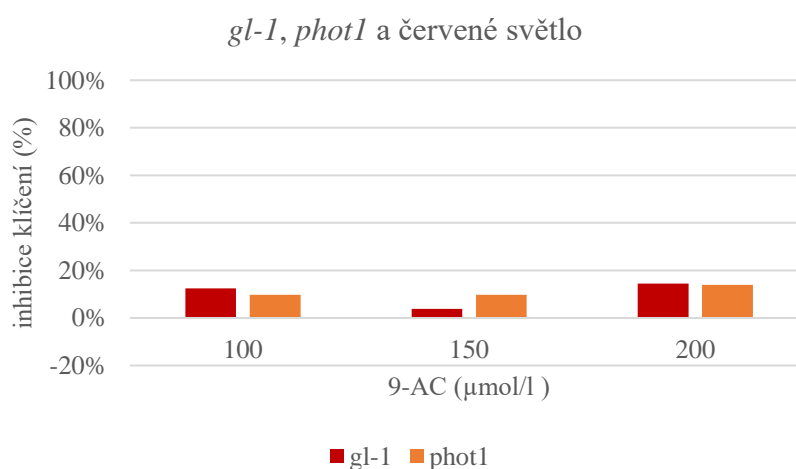
Obr. 15: Klíčivost semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 16: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



Obr. 17: Klíčivost semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



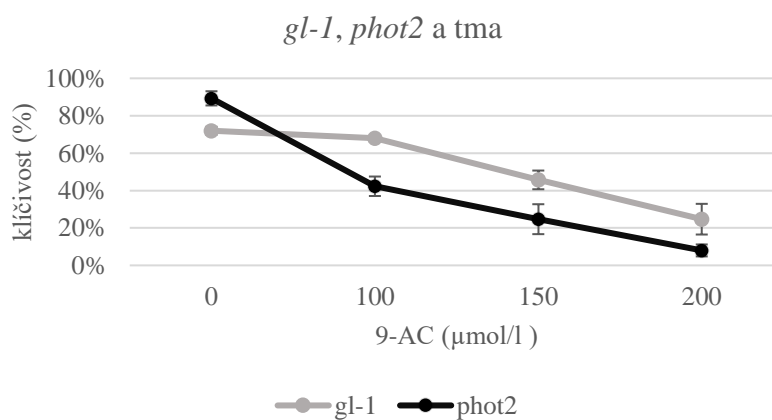
Obr. 18: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.

4.4 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta *phot2*

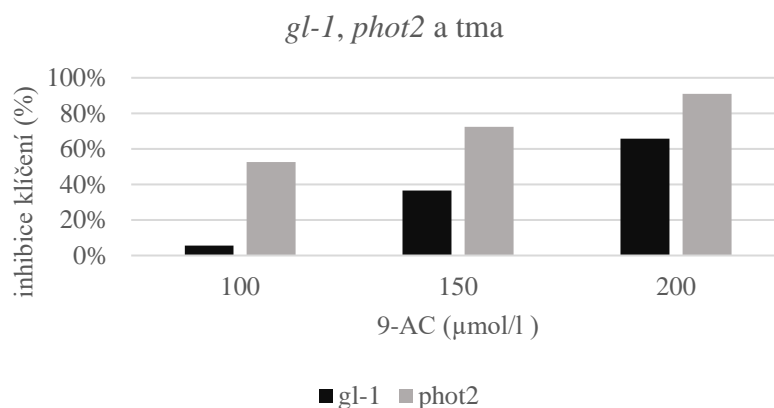
Klíčivost semen genotypu *gl-1* po 7 dnech inkubace ve tmě dosahovala hodnot okolo 72 %. Inhibitor 9-AC přidaný do kultivačního média postupně inhiboval klíčení semen (Obr. 19), přičemž největší inhibiční efekt 9-AC byl pozorován při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr 20). Podobně jako u *gl-1* přidavek 9-AC do kultivačního média inhiboval klíčení semen ve tmě i u mutanta *phot2* (Obr. 19). Citlivost mutanta *phot2* k inhibitoru 9-AC byla zvýšena oproti citlivosti *gl-1*. Např. při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC byly zjištěny u *phot2* hodnoty inhibice klíčivosti okolo 91 %, zatímco u *gl-1* okolo 66 % (Obr. 20).

Klíčivost semen genotypu *gl-1* inkubovaných 7 dní na modrém světle dosahovala hodnot okolo 84 % a přidavek inhibitoru 9-AC do kultivačního média postupně inhiboval klíčení semen *gl-1* na modrém světle (Obr. 21), přičemž největší inhibiční účinek byl pozorován při použité koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC (Obr. 22). Citlivost *gl-1* k přidavku 9-AC na modrém světle byla snížena oproti citlivosti pozorované ve tmě. Podobně jako u *gl-1*, u mutanta *phot2* byl pozorován podobný inhibiční účinek 9-AC. Oba genotypy dosahovaly podobné citlivosti k inhibitoru 9-AC (Obr. 22).

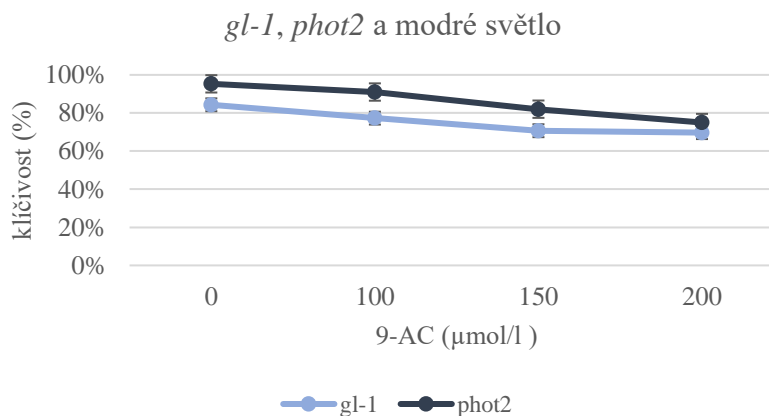
Semena genotypu *gl-1* inkubovaná 7 dní na červeném světle dosahovala hodnot klíčivosti okolo 83 %. Přidávky inhibitoru 9-AC do kultivačního média postupně inhibovaly klíčivost semen (Obr. 23), přičemž nejvyšší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl zaznamenán při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 24). Citlivost *gl-1* k inhibitoru 9-AC na červeném světle byla snížena oproti citlivosti vyvolané při inkubaci ve tmě. Podobně jako u *gl-1*, u mutanta *phot2* byla pozorována inhibice klíčení semen způsobená přidávkou 9-AC, přičemž hodnoty inhibice u obou genotypů byly podobné (Obr. 24).



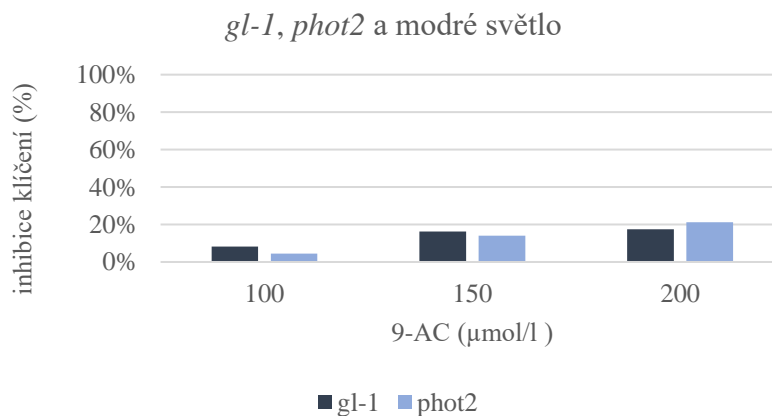
Obr. 19: Klíčivost semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



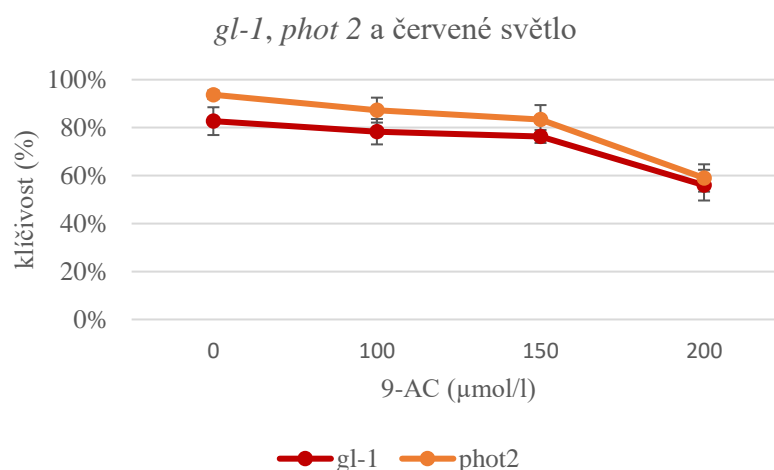
Obr. 20: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



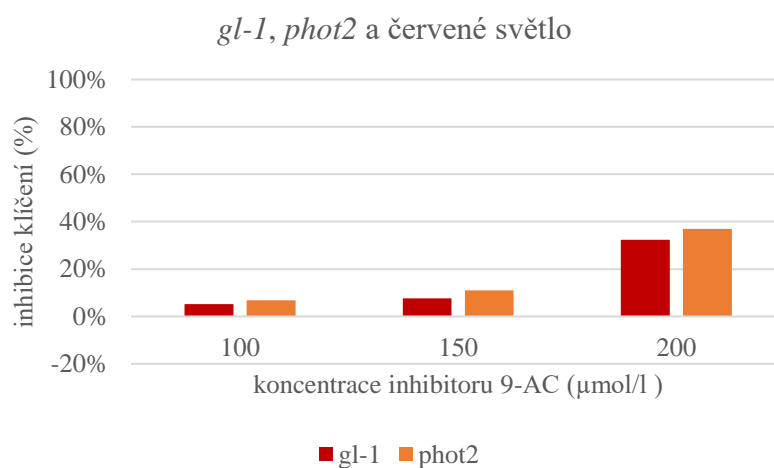
Obr. 21: Klíčivost semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 22: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



Obr. 23: Klíčivost semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



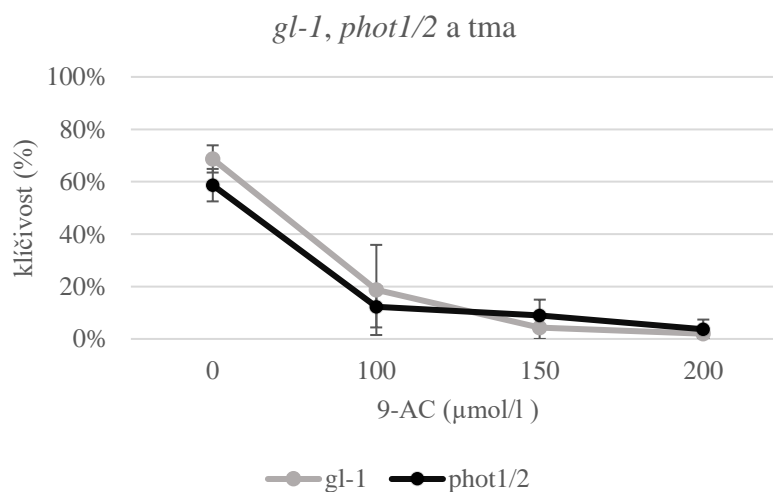
Obr. 24: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.

4.5 Vliv inhibitoru 9-AC na klíčení semen mutanta *phot1/2*

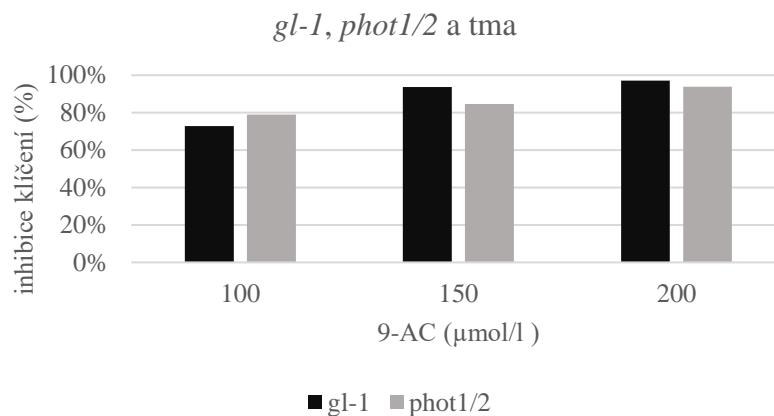
Klíčovost semen genotypu *gl-1* po 7 dnech inkubace ve tmě dosahovala hodnot okolo 69 %. Inhibitor 9-AC přidáný do kultivačního média postupně inhiboval klíčení semen (Obr. 25). Největší inhibiční efekt 9-AC byl pozorován při použité koncentraci 200 µmol/l (Obr. 26). Podobně jako u *gl-1* přidavek 9-AC do kultivačního média inhiboval klíčení semen ve tmě i u mutanta *phot1/2*, přičemž inhibice klíčení semen způsobená inhibitorem 9-AC u obou genotypů dosahovala podobných hodnot (Obr. 26).

Semena genotypu *gl-1* kultivována 7 dní na modrém světle dosahovala klíčivosti okolo 72 % a přidavek inhibitoru 9-AC do kultivačního média postupně inhiboval klíčení semen *gl-1* na modrém světle (Obr. 27). Největší inhibiční účinek byl pozorován při použité koncentraci inhibitoru 200 $\mu\text{mol/l}$ (Obr. 28). Hodnoty inhibice *gl-1* způsobené přidavkem 9-AC na modrém světle byly sníženy oproti hodnotám pozorovaným ve tmě. U mutanta *phot1/2* byl také pozorován inhibiční účinek 9-AC (Obr. 27). Citlivost mutanta *phot1/2* byla oproti citlivosti *gl-1* byla pouze mírně zvýšena. Např. při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC se inhibice klíčení semen u mutanta *phot1/2* pohybovala okolo 41 % a u genotypu *gl-1* okolo 35 % (Obr. 28).

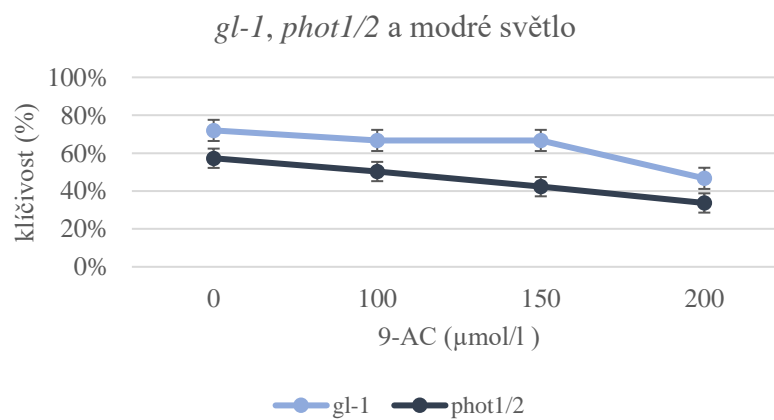
Semena genotypu *gl-1* inkubovaná 7 dní na červeném světle dosahovala hodnot klíčivosti okolo 80 %. Přidavek inhibitoru 9-AC v různých koncentracích postupně inhibovala klíčivost semen (Obr. 29), přičemž nejvyšší inhibiční efekt inhibitoru 9-AC byl zaznamenán při koncentraci 200 $\mu\text{mol/l}$ 9-AC (Obr. 30). Citlivost *gl-1* k inhibitoru 9-AC na červeném světle byla snížena oproti citlivosti vyvolané při inkubaci ve tmě. Podobně jako u *gl-1*, u mutanta *phot1/2* byla pozorována inhibice klíčení semen způsobená přidavky 9-AC. Citlivost mutanta *phot1/2* k 9-AC byla vůči citlivosti k *gl-1* výrazně zvýšena při všech testovaných koncentracích 9-AC (Obr. 30).



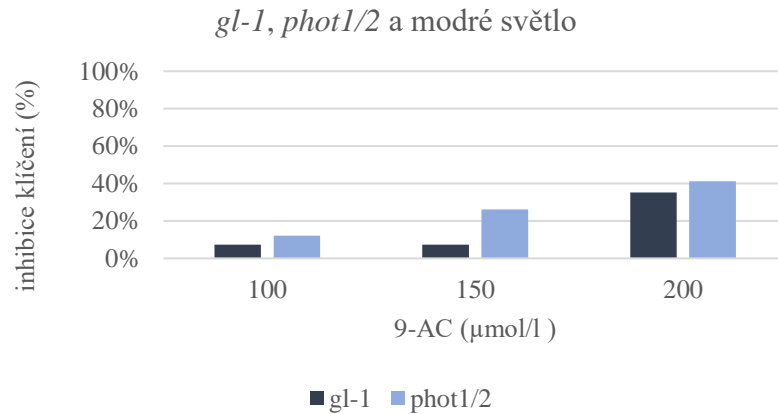
Obr. 25: Klíčivost semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7 den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



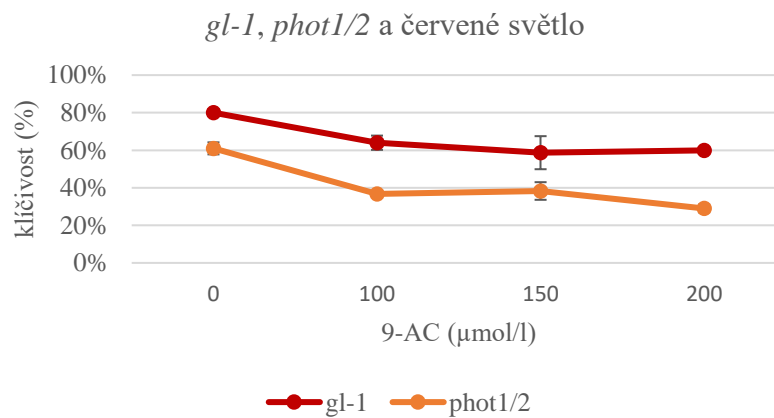
Obr. 26: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných ve tmě při různém přídávku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



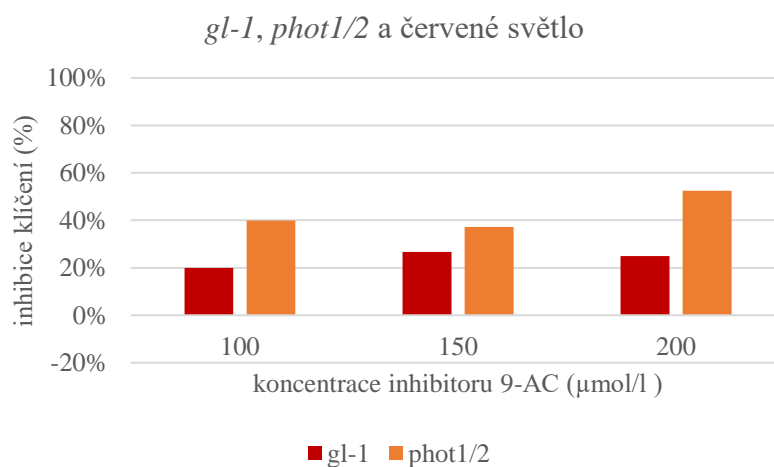
Obr. 27: Klíčivost semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přídávku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 28: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na modrém světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.



Obr. 29: Klíčivost semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou klíčivost semen \pm SE 7. den po výsevu získanou ze tří nezávislých experimentů.



Obr. 30: Inhibice klíčení (%) semen mutanta *phot1/2* a odpovídajícího WT (*gl-1*) kultivovaných na červeném světle při různém přidavku inhibitoru 9-AC. Hodnoty ukazují průměrnou inhibici vypočtenou z průměrných hodnot klíčivosti 7. den po výsevu.

5. DISKUZE

Při pokusech prováděných se semeny kontrolních genotypů (Ler, Col, *gl-1*) studovaných rostlin byla po přidavku inhibitoru 9-AC do kultivačního média pozorována různá míra inhibice klíčení semen, přičemž inhibice klíčení se postupně zvyšovala v závislosti na použité koncentraci inhibitoru. Z těchto výsledků lze vyvodit závěr, že kanály citlivé k inhibitoru 9-AC hrají pozitivní úlohu v procesu klíčení semen.

Inhibiční vliv 9-AC na klíčení semen rostlin byl ovlivněn světlem. Všechna semena inkubovaná na světle (na modrém i na červeném) se projevovala sníženou mírou inhibice klíčení oproti semenům kultivovaným ve tmě. Toto snížení inhibičního účinku by mohlo být způsobeno snížením citlivosti 9-AC citlivých kanálů k 9-AC světlem nebo stimulací exprese genů pro tvorbu 9-AC citlivých kanálů.

Semena mutanta *cry1-1* inkubovaná ve tmě nevykazovala změnu citlivosti k 9-AC oproti citlivosti zaznamenané u ekotypu Ler. Ani výsledky pokusů prováděných na modrém světle nebyly neukázaly změny citlivosti k 9-AC u mutanta *cry1-1* oproti ekotypu Ler. Při inkubaci na červeném světle se však semena mutanta *cry1-1* vyznačovala zvýšenou citlivostí k inhibitoru 9-AC oproti semenům ekotypu Ler inkubovaných za stejných světelných podmínek. Tyto výsledky naznačují, že funkční CRY1 zprostředkuje vliv červeného světla na potlačení inhibičního účinku 9-AC na klíčení semen. CRY1 je protein nacházející se převážně v jádře, který je schopen ovlivnit expresi některých fotomorfogenních genů (Ohgishi et al, 2003). Jedním z genů, jehož expresi by mohl ovlivňovat je i gen pro tvorbu 9-AC citlivých kanálů. Mutant, který funkční CRY1 postrádá, by tedy obsahoval menší počet 9-AC citlivých kanálů a docházelo by k vyšší inhibici klíčení. Jelikož však ke snížení inhibice dochází pouze na červeném světle, nemůže být v tomto procesu zapojen přímo CRY1. Možným vysvětlením by mohla být určitá interakce mezi fytochromy a CRY1. Interakce mezi fytochromy a kryptochromy v jádře je známá. Tyto dva typy fotoreceptorů mohou v jádře plnit své funkce odděleně, ale mohou spolu také vzájemně kooperovat a zprostředkovávat odpověď na světelné signály (Pavlová and Fisher, 2011). Na modrém světle byla popsána vzájemná interakce PhyA, PhyB a CRY1 v inhibici klíčení rostlin (Poppe *et al*, 1998). Dle našich výsledků lze tedy spekulovat, že k podobné interakci mezi fytochromy a CRY1 dochází i na červeném světle v reakci ovlivňující expresi 9-AC citlivých kanálů.

Semena mutanta *cry2-1* inkubovaná ve tmě se projevovala zvýšenou citlivostí k inhibitoru 9-AC ve srovnání s citlivostí pozorovanou u ekotypu Col. Zvýšená citlivost

k inhibitoru 9-AC semen *cry2-1* oproti Col byla pozorována i v pokuse prováděných na modrém i červeném světle. Tyto výsledky naznačují, že funkční CRY2 redukuje citlivost semen k 9-AC, a to bez ohledu na světelné podmínky. CRY2 může být např. zapojený do regulace exprese genů pro 9-AC citlivé kanály, jak na světle, tak ve tmě. CRY2 je protein nacházející se neustále v jádře. Je zapojený do regulace fotomorfogenních genů. Jedním z mechanismů, kterými fotomorfogenní geny CRY2 může regulovat, je jeho kooperace s COP1 proteiny. Ve tmě se COP1 proteiny hromadí v jádře a ubiquitinují transkripční faktory fotomorfogenních genů, čímž potlačují jejich expresi. Zvýšená inhibice klíčení semen mutanta *cry2-1* oproti semenům ekotypu Col na červeném světle by navíc mohla naznačovat, že funkční CRY2 by mohl dráhou závislou na COP1 ovlivňovat expresi 9-AC citlivých kanálů. Navíc by mohla být tato signální dráha propojena se signální dráhou fytochromů. Ve tmě by neaktivovaný CRY2 mohl být v blízké vazbě na transkripční faktory genů pro 9-AC citlivé kanály a tím ovlivňovat expresi těchto genů.

Výsledky pokusů prováděných na semenech mutanta *phot1* ve tmě neukázaly žádnou změnu citlivosti k použitému inhibitoru 9-AC mutanta *phot1* oproti kontrolnímu genotypu *gl-1*. Stejně tak semena mutanta *phot1* a *gl-1* ukazovaly podobnou citlivost k inhibitoru 9-AC na modrém i na červeném světle. Tyto výsledky naznačují, že funkční fotoreceptor Phot1 nehraje pravděpodobně důležitou roli v ovlivňování citlivosti klíčení semen k 9-AC.

Při pokusech prováděných s mutantem *phot2* byla zaznamenána zvýšená citlivost mutanta *phot2* k inhibitoru klíčení 9-AC oproti genotypu *gl-1* při inkubaci ve tmě. Při pokusech prováděných na modrém a červeném světle nevykazoval mutant *phot2* změnu citlivosti k 9-AC oproti *gl-1*. Phot2 je protein vyskytující se na plazmatické membráně buněk, k jehož aktivaci dochází až po ozáření světlem. To, že bylo pozorováno zvýšení citlivosti semen mutanta *phot2* k 9-AC pouze ve tmě, může nasvědčovat tomu, že Phot2, i když není aktivovaný, může snižovat reakci aniontových kanálů citlivých k 9-AC citlivých. Tyto závěry by se daly vysvětlit např. tím, že neaktivovaný Phot2 by se mohl vyskytovat na membráně v blízké vazbě k 9-AC citlivých kanálů a tato vazba by mohla ovlivňovat jejich funkci.

Výsledky pokusů s mutantem *phot1/2* ukázaly, že semena mutanta *phot1/2* se ve tmě a na modrém světle projevovaly stejnou citlivostí k inhibitoru 9-AC jako semena genotypu *gl-1*. Při inkubaci na červeném světle docházelo ke zvýšení inhibice klíčení semen vlivem 9-AC u mutanta *phot1/2* oproti inhibici zaznamenané u semen *gl-1*.

Z těchto výsledků lze usuzovat, že pokud rostlina obsahuje funkční oba fototropiny (Phot1 i Phot2), může u ní na červeném světle docházet ke snížení citlivosti aniontových kanálů k 9-AC. Tyto výsledky naznačují, že fototropiny nějakým způsobem interagují se signálními dráhami červeného světla.

Podobnou problematikou se ve své diplomové práci zabývala Jana Balarynová (2010), která ve své práci zkoumala zapojení 9-AC citlivých kanálů, NPPB citlivých kanálů a draselných kanálů citlivých k tolbutamidu v klíčení semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) a možné ovlivnění funkce těchto kanálů pomocí fotoreceptorů modrého světla. Ve své práci zjistila, že produkty genu 7B-1 by mohly negativně regulovat množství či aktivitu 9-AC citlivých kanálů. Také zjistila, že CRY1 není zapojený v inhibičním účinku 9-AC na klíčení semen rajčete. Oproti těmto výsledkům, moje výsledky naznačují, že u *Arabidopsis thaliana* sice CRY1 pravděpodobně sám o sobě není zodpovědný za ovlivnění citlivosti semen k 9-AC, ale jeho signální dráha by mohla být propojena se signální dráhou fytochromů a tato vzájemná kooperace by mohla vést ke snížení citlivosti semen *Arabidopsis thaliana* k 9-AC.

Bylo by zajímavé provést další studie využívající mutanty defektní ve fytochrorech k možnému potvrzení propojení signálních drah receptorů modrého světla a fytochromů v reakci na inhibitor 9-AC. V dalších studiích by bylo potřeba identifikovat v semenech *Arabidopsis thaliana* kanály citlivé k 9-AC a studovat jejich expresi a aktivitu v semenech mutantů a kontrolních rostlin v závislosti na světelných podmínkách.

6. ZÁVĚR

Cílem mé bakalářské práce bylo studovat zapojení světla a receptorů modrého kryptochromů a fototropinů v klíčení rostlin a zapojení aniontových kanálů citlivých k 9-AC v tomto procesu. Ke zjištění funkce kryptochromů a fototropinů bylo použito genetického přístupu, spočívajícího v použití mutantů *cry1-1*, *cry2-1*, *phot1*, *phot2* a dvojitého mutantu *phot1/2* se sníženou citlivostí k modrému světlu. Výsledky experimentů ukázaly, že aplikovaný inhibitor 9-AC způsobuje inhibici klíčení semen *Arabidopsis thaliana*. Také bylo zjištěno, že světlo obecně snižuje inhibiční vliv 9-AC na klíčení rostlin. Výsledky tedy v prvé řadě ukázaly, že aniontové kanály citlivé k 9-AC jsou nutné pro klíčení semen *Arabidopsis*. Ze získaných výsledků je možné také dedukovat, že funkční CRY1 redukuje inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen na červeném světle, což naznačuje jeho možné propojení se signální dráhou fytochromů a také možné ovlivnění exprese genů pro 9-AC citlivé kanály. Výsledky experimentů dále naznačily, že funkční CRY2 by mohl být zapojen do exprese genů pro 9-AC citlivé kanály, a to způsobem závislým na COP1. I v tomto případě lze předpokládat propojení signálních drah CRY2 a fytochromů. Výsledky bakalářské práce naznačují, že funkční CRY2 snižuje míru inhibice klíčení semen způsobené inhibitorem 9-AC za všech světelných podmínek.

U fototropinů nebyl pozorován žádný výrazný účinek na citlivost klíčení semen k inhibitoru 9-AC. Výsledky však naznačují, že ve tmě by funkční Phot2 mohl redukovat inhibici klíčení způsobenou 9-AC ve tmě, takže je schopen ovlivnit citlivost 9-AC kanálů, i když není aktivovaný světlem. Výsledky také naznačují, že pokud jsou oba fototropiny (Phot1 i Phot2) funkční, tak by mohly zasahovat do signální dráhy červeného světla.

K potvrzení těchto závěrů by bylo nutné provést další molekulárně-genetické studie.

7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Ang L.-H., Chattopadhyay S., Wei N., Oyama T., Okada K., Batschauer A., Deng X.-W. (1998): Molecular Interaction between COP1 and HY5 Defines a Regulatory Switch for Light Control of *Arabidopsis* Development. *Molecular Cell* **1**, 213-222.
- Balarynová J. (2010): *Úloha světelných drah v aktivitě iontových kanálů*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Olomouc, Česká Republika.
- Barrero J. M., Downie A. B., Xu Q., Gubler F. (2014): A Role for Barley CRYPTOCHROME1 Light Regulation of Grain Dormancy and Germination. *The Plant Cell American Society of Plant Biologists* **26**, 1094–1104.
- Deng, X.-W., Caspar, T., and Quail, P.H. (1991): COP1: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Development* **5**, 1172–1182.
- Koornneef, M., Rolff, E., and Spruit, C.J.P. (1980): Genetic control of light-inhibited hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **100**, 147–160.
- Kucera B., Cohn M. A. et Leubner-Metzger G. (2005): Plant hormone interactions during seed dormancy and release and germination. *Seed Science Research* **15**, 281-307.
- Lewin B., Cassimeris L., Lingappa V. R., Plopper G. (2006): Transport of ions and small molecules across membranes. In: *Cells*. (Lewin B., et al), Jones and Bartlett Publishers, Sudbury, Massachusetts, 31-96.
- Lin C., Yang H., Guo H., Mockler T., Chen J., Cashmore A.R. (1998): Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95(5)**, 2686–2690.
- Lodish H., Berk A., Kaiser Ch., Krieger M., Scott M. P., Bretscher A., Ploegh H., Matsudaira P. (2008): Transmembrane transport of ions and small molecules. In: *Molecular cell biology*. 6th ed., (Ahr K., Tontonoz M., Frost E. P., Rice E.), W. H. Freeman and Company, New York, 438-478.
- Luštinec J., Žárský V. (2003): *Úvod do fyziologie vyšších rostlin*. 1st ed., Karolinum, Praha, 261 stran.
- Née G., Xiang Y., Soppe W. JJ. (2017): The release of dormancy, a wake-up call for seeds to germinate. *Current Opinion in Plant Biology* **35**, 8–14.
- Ohgishi M., Saji K., Okada K., Sakai T. (2003): Functional analysis of each blue light receptor, *cry1*, *cry2*, *phot1*, and *phot 2*, by using combinatorial multiple mutants in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101(8)**, 2223–2228.
- Pavlová L. (2005): *Fyziologie rostlin*. Karolinum, Praha, 253 stran.
- Pavlová L., Fisher L. (2011): *Růst a vývoj rostlin*. Vydání 1, Karolinum, Praha, 325 stran.
- Poppe C. (1998): The blue-light receptor cryptochrome 1 can act independently of phytochrome A and B in *Arabidopsis thaliana* *Plant Journal* **16**, 465-471.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. (1998): *Fyziologie rostlin*. 1st ed., Academia, Praha, 484 stran.
- Roelfsema M. R. G., Hedrich R., Geiger D. (2012): Anion channels: master switches of stress responses. *Trends in Plant Science*, 1–9.
- Sawada Y, Aoki M, Nakaminami K, Mitsunashi W, Tatematsu K, Kushiro T, Toshiba T, Kamila Y, Inoue Y, Nambara E, Toyomasu T (2008): Phytochrome- and Gibberellin-Mediated Regulation of Abscisic Acid Metabolism during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiology* **146(3)**, 1386-1396.
- Schroeder J.I., Schmidt C., Scheaffer J. (1993): Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* **5**, 1831–1841.
- Shinomura T., Nagatani A., Hanzawa H., Kubota M., Watanabe M., Fuyra M. (1996): Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology* **93**, 8129-8133.

- Spalding E.P. (2000): Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell and Environment* **23**, 665-674.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant Physiology*. 2nd ed., Sinauer Associates Inc., Publishers Sunderland, Massachusetts, USA, 782 stran.
- Tavares B., Domingos P., Dias PN., Feijó JA., Bicho A. (2011): The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2273–2298.
- von Arnim A. G., Osterlund M. T., Kwok S. F., Deng X-W. (1997): Genetic and Developmental Control of Nuclear Accumulation of COP1, a *Repressor of Photomorphogenesis in Arabidopsis*. *Plant Physiology* **114**, 779-788.
- White, P., Broadley, M. (2001): Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* **88(6)**, 967-988.
- Wu G., Spalding E. P., (2007): Separate functions for nuclear and cytoplasmic cryptochrome 1 during photomorphogenesis of Arabidopsis seedlings. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104(47)**, 18813–18818.

8. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
ALMT	<i>aluminum-activated malate transporter</i>
CAB	chlorofyl a/b vazebný protein
CCE	<i>cruciform cutting endonuclease</i>
CHS	chalkon syntetáza
COP1	<i>constitutive photomorphogenesis 1</i>
Col	Columbia
CRY	kryptochrom
DPC	difenylamin-2-karboxylová kyselina
EMS	ethylmethansulfonát
FAD/FADH	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
GA ₃	kyselina gibberelová
<i>gl-1</i>	<i>glabra-1</i>
HY5	<i>long hypocotyl 5</i>
IAA-94	kyselina [(6,7-dichloro-2-cyclopentyl-2,3-dihydro-2-methyl-1-oxo-1H-inden-5-yl) oxy] octová
Ler	Landsberg erecta
LOV	light oxygen voltage
MES	kyselina 2-(N-morfolino)-ethansulfonová
MS médium	Murashige and Skoog médium
NIF	kyselina niiflumová
NPPB	(5-nitro-2-(3-fenylpropylamino) benzoová kyselina
OST1	<i>dolichyl-diphosphooligosaccharide-protein glycosyltransferase subunit 1 (oligosaccharyl transferase subunit 1)</i>
Pfr	forma fytochromu absorbující v oblasti vzdáleného červeného světla
PHR	deoxyribodipyrimidin fotolyáza
Pr	forma fytochromu absorbující v oblasti červeného světla
Phot	fototropin
phy	fytochrom
RBCS	karboxyláza/oxygenáza malé jednotky ribulóza-1,5-bisfosfátu

SE	standardní chyba
SLAC	S-typ aniontových kanálů ozn. SLAC ve svěřacích buňkách
SLAH	S-typ aniontových kanálů ozn. SLAH
UV	ultrafialové záření
UV-A	320 nm až 400 nm oblast ultrafialového záření
9-AC	anthracen-9-karboxylová kyselina