



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Úloha fytochromů a fytochromového chromoforu v regulaci
aniontových kanálů během vývoje a růstu rostlin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Martina Pasecká**

Studijní program: B1501 Experimentální biologie

Studijní obor: Experimentální biologie

Forma studia: Prezenční

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

Termín odevzdání práce: 2023

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Martina Pasecká
Název práce	Úloha fytochromů a fytochromového chromoforu v regulaci aniontových kanálů během vývoje a růstu rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	<p>Předkládaná bakalářská práce se zabývá úlohou fytochromové signalizace v regulaci aniontových kanálů během vývoje a růstu modelové rostliny rajčete jedlého (<i>Solanum lycopersicum</i> L.). Teoretická část práce shrnuje dosavadní poznatky o rostlinných fotoreceptorech a aniontových kanálech. V experimentální části práce byl využit genetický a farmakologický přístup. Byly analyzovány růstové a vývojové reakce dvou fotomorfoenních mutantů <i>aurea</i> (<i>au^w</i>) a <i>yellowgreen-2</i> (<i>yg-2</i>) v přítomnosti inhibitorů aniontových kanálů SITS a NPPB. Zároveň byly rostliny pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, červené, modré světlo). Z výsledků vyplývá, že aniontové kanály zapojené do růstu rajčete jsou efektivně blokovány inhibitorem NPPB. Je pravděpodobné, že světlo má prostřednictvím fytochromu vliv na aktivitu NPPB-senzitivních kanálů a jejich aktivitu významně ovlivňuje gen pro fytochromobilin syntázu.</p>
Klíčová slova	Aniontové kanály, fytochrom, fytochromobilin, NPPB, SITS, <i>Solanum lycopersicum</i> , světlo
Počet stran	61
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Martina Pasecká
Title of thesis	Role of phytochromes and phytochrome chromophore in regulation of anion channels during plant development and growth
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D
The year of presentation	2023
Abstract	<p>This bachelor thesis deals with the role of phytochrome signalling in the regulation of anion channels during the development and growth of the model plant tomato (<i>Solanum lycopersicum</i> L.). The theoretical part of the thesis summarizes the existing knowledge of plant photoreceptors and anion channels. In the experimental part of the thesis, genetic and pharmacological approaches were used. The growth and developmental responses of two photomorphogenic mutants of <i>aurea</i> (<i>au^w</i>) and <i>yellowgreen-2</i> (<i>yg-2</i>) in the presence of the anion channel inhibitors SITS and NPPB were analysed. At the same time, plants were grown under different light conditions (dark, red, blue light). The results elucidate that the anion channels involved in tomato growth are effectively blocked by the NPPB inhibitor. It is likely that light influences the activity of NPPB-sensitive channels via phytochrome, and their activity is significantly influenced by the phytochromobilin synthase gene.</p>
Keywords	Anion channels, light NPPB, phytochrome, phytochromobilin, SITS, <i>Solanum lycopersicum</i>
Number of pages	61
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

.....

V Olomouci dne

.....

Podpis

Poděkování

Ráda bych poděkovala především svému vedoucímu práce prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D za odborné vedení bakalářské práce, podnětné rady a věnovaný čas. Děkuji také za ochotu, vstřícnost a lidský přístup. Dále bych chtěla poděkovat Skupině molekulární fyziologie za příjemné pracovní prostředí.

Obsah

Seznam zkratk	8
1 Úvod a cíle práce	11
2 Současný stav řešené problematiky	12
2.1 Světlo	12
2.2 Fotoreceptory	13
2.2.1 Fytochromy	13
2.2.1.1 Struktura fytochromu	15
2.2.2 Kryptochromy	17
2.2.3 Fototropiny	19
2.2.4 ZTL, FKF1, LKP2	20
2.3 Aniontové kanály	21
2.3.1 Aniontové kanály typu S a R	21
2.3.2 Chloridové kanály	23
2.3.3 Světlem aktivované aniontové kanály	23
2.3.4 Mechanicky aktivované aniontové kanály	23
2.4 Regulace aniontových kanálů světlem	24
2.5 Inhibitory iontových kanálů	27
2.5.1 NPPB	28
2.5.2 SITS	29
2.6 Mutanti rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i> L.)	30
3 Materiál a metodika	32
3.1 Rostlinný materiál	32
3.2 Příprava kultivačního média	32
3.3 Sterilizace a výsev semen	33
3.4 Přenos semen	33
3.5 Hodnocení růstu rostlin	35
4 Výsledky	36
4.1 Vliv inhibitoru SITS na růst mutantu <i>au^w</i>	36
4.2 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu <i>au^w</i>	40
4.3 Vliv inhibitoru SITS na růst mutantu <i>yg-2</i>	44
4.4 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu <i>yg-2</i>	46
5 Diskuze	51
5.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu <i>au^w</i>	51
5.2 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu <i>yg-2</i>	53

6 Závěr.....	55
Citovaná literatura.....	56

Seznam zkratek

9-AC	kyselina antracen-9-karboxylová
ABA	kyselina abscisová
ALA	kyselina levulinová
ALTM	ALUMINIUM-ACTIVATED MALAT TRANSPORTER 1
ARAC	ARABIDOPSIS ROOT ANION CHANNEL
BL	blue light (modré světlo)
BV IX α	biliverdin IX α
CCE	C-koncová doména
CLC	chloridové kanály
COP1	CONSTITUTIVE PHOTOMORPHOGENIC 1
CRY	krytochrom
DASH	<i>Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, human</i>
DIDS	kyselina 4,4'- diisothiocyantostilbene-2,2'-disulfonová
FAD	flavinadenindinukleotid
FKF1	F-BOX 1
FMN	flavinmononukleotid
FR	far-red light (dlouhovlnné červené světlo)
GAF	cGMP fosfodiesterázy/adenylylcyklázy/FhlA
GCAC1	GUARD CELL ANION CHANNEL 1
HAAC	HYPERPOLARIZATION-ACTIVATED ANION CHANNEL
HKRD	HISTIDIN KINASE-RELATED DOMAIN
IAA-94	kyselina indanyl-oxyoctová
LFR	low fluence responses (reakce na nízké záření)
LKP2	LOV KELCH PROTEIN 2
LOV	LIGHT OXYGEN VOLTAGE doména

MS médium	Murashige Skoog médium
MTHF	methylnetrahydrofolát
NIF	kyselina niflumová
NPPB	kyselina 5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)benzoová
NTE	N-koncová doména
PA	kyselina fosfatidová
PAR	fotosynteticky aktivní záření
PAS	Per/Arnt/Sim proteinová doména
PHOT	phototropin (fototropin)
PHR	photolyase homology region
PHY	phytochrome (fytochrom)
PIF	PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR _s
PIN	PIN-FORMED
PKS1	PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE 1
PP1	protein fosfatáza 1
PP2A	protein fosfatáza 2A
PΦB	fytochromobilin
PSM	fotosenzorický modul
PYL	PYRABACTIN 1-LIKE
PYR	PYRABACTIN RESISTANCE
QUAC1	QUICK-ACTIVATING ANION CHANNEL 1
RCAR	REGULATORY COMPONENTS OF ABA RECEPTOR
RL	red light (červené světlo)
SCF	SKP, CULLIN, F-BOX
SD	standardní odchylka
SITS	4-acetamido-4' - isothiocyanozilbene-2,2'-disulfonate

SLAC1	SLOW ANION CHANNEL 1
SPA	SUPPRESSOR OF PHYA-105
UV	ultraviolet light (ultrafialové záření)
UVR8	UV RESPONSE LOCUS 8
VLFR	very low fluence response (reakce na velmi nízkou ozářenost)
ZTL	ZEITLUPE

1 Úvod a cíle práce

Světlo má zásadní význam ve vývoji rostlin a ovlivňuje mnoho fyziologických procesů. Umožňuje přisedlým rostlinám optimalizovat svůj růst a vývoj a přizpůsobit se tak okolním podmínkám. Světelný signál je vnímán specifickými fotoreceptory, které reagují na konkrétní vlnové délky světelného spektra: červené a dlouhovlnné červené světlo je vnímáno fytochromy, modré světlo/UV-A záření fototropiny, kryptochromy a proteiny Zeitlupe rodiny a UV-B záření zaznamenávají UVR8 receptory. Z těchto receptorů jsou fytochromy zdaleka nejrozsáhleji studovány.

Fytochromy řídí různé vývojové procesy rostlin, včetně klíčení, prodlužování internodií, řízení cirkadiánních hodin a kvetení. Ačkoli samotný fytochromový receptor, stejně jako fyziologické projevy jeho aktivace jsou dobře charakterizovány, mezistupně v kaskádě přenosu signálu stále nejsou plně známy. Tato práce se zaměřuje na pochopení úlohy fytochromů v regulaci aniontových kanálů, což přispívá k rozšíření povědomí o komplexních mechanismech, které stojí za fyziologickými odezvami rostlin na světelné stimuly.

Cílem této bakalářské práce bylo zkoumat vliv fytochromů na aktivitu aniontových kanálů během vývoje a růstu rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) prostřednictvím farmakologického a genetického přístupu. Teoretická část práce se zaměřila na analýzu relevantní literatury týkající rostlinných fotoreceptorů a aniontových kanálů rostlin. Experimentální část se zaměřila na studium citlivosti růstových a vývojových reakcí fotomorfogenních mutantů *au^w*, *yg-2* rajčete k inhibitorům aniontových kanálů NPPB a SITS v závislosti na světelných podmínkách. Experimenty byly prováděny ve Skupině molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů, společného pracoviště UP Olomouc a Ústavu experimentální botaniky AV ČR.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Světlo

Světlo kromě své role primárního zdroje energie pro fotosyntézu působí jako klíčový environmentální signál, který zásadně ovlivňuje různé růstové a vývojové procesy v rostlinách. Rostliny jsou citlivé zejména na změny množství (intenzity), kvality (vlnové délky) a směru světla a regulují svůj růst v závislosti na nich.

Při pěstování ve tmě vykazují semenáčky skotomorfogenezi a stávají se etiolovanými. Etiolované rostliny mají výrazné nápadné charakteristiky: dlouhé a vřetenovité stonky a bledě žlutou nebo bílou barvu (Obr. 1). V této vývojové strategii je alokace zdrojů zaměřena na prodlužování hypokotylu na úkor vývoje listenu a kořene. Rychlé prodlužování poskytuje semenáčkům možnost vyhledávat světlo. Složený vrcholový háček umožňuje snadný průchod půdou nebo jinými substráty a chrání malé rozvinuté listeny a pod nimi ležící meristematickou oblast před poškozením. Tato růstová strategie zajišťuje, že omezené zásoby semen jsou hospodárně využity rostlinou k vyhledávání světla, což je předpokladem přežití fotoautotrofů (Josse and Halliday, 2008; Campbell, 2015).



Obr. 1: Semenáčky kukuřice (*Zea mays*) (A a B) a fazolu (*Phaseolus vulgaris*) (C a D) rostoucí buď na ve tmě (A a C), nebo na světle (B a D) (upraveno a převzato z Taiz and Zeiger, 2002).

Při vystavení vyvíjejících se rostlin světlu se uskutečňuje proces zvaný fotomorfogeneze a dochází k výrazným morfologickým změnám (Lee *et al.*, 2017). Semenáčky pěstované na světle vykazují relativně krátké embryonální stonky, ztrácejí apikální háček, vyvíjejí se u nich rozšířené zelené listeny a na vrcholovém meristému výhonů se rychle zahajuje vývoj listů a internodií (Obr. 1) (Campbell, 2015). Tyto

morfogenní znaky přispívají k fotoautotrofnímu růstu a chrání mladé semenáčky před fotooxidačním poškozením; schopnost přepnout ze skotomorfogenního na fotomorfogenní vývoj je tedy nezbytná pro přežití semenáčků (Josse and Halliday, 2008; Lee *et al.*, 2017).

2.2 Fotoreceptory

Rostliny mají řadu fotoreceptorů, molekul citlivých na světlo, které po absorpci světelné energie podléhají strukturální, energetické nebo konformační změně. Úkolem fotoreceptorů je detekovat přítomnost světla a poté prostřednictvím propojené signální transdukční kaskády iniciovat příslušnou vývojovou reakci.

V rostlinách existuje několik různých rodin fotoreceptorů, které jsou díky své odlišné molekulární struktuře citlivé na světlo různých vlnových délek. Na červenou složku světla (600–700 nm) a červené světlo o větší vlnové délce (700–750 nm) reagují převážně fytochromy. Reakce na modré světlo (390–500 nm) a UVA (320–390 nm) zprostředkovávají tři různé třídy fotoreceptorů: kryptochromy, fototropiny a proteiny Zeitlupe rodiny. K regulaci jak vývojových, tak ochranných procesů se u rostlin uplatňuje receptor zvaný UV rezistence 8 (UVR8), který zaznamenává záření UV-B (280–315 nm) (Christie *et al.*, 2015).

2.2.1 Fytochromy

Rodina fytochromů (PHY) jsou reverzibilní fotochromní biliproteiny (Franklin and Quail, 2010). Reagují zejména na červené a dlouhovlnné červené světlo a řídí různé vývojové procesy rostlin, včetně klíčení, prodlužování internodií, vyhýbání se stínu, řízení cirkadiálních hodin, kvetení a de-etiolizace (Lack and Evans, 2005; Franklin and Quail, 2010; Buchanan *et al.*, 2015).

U většiny fytochromů je část absorbující světlo fotoreverzibilní a mění se mezi dvěma formami v závislosti na vlnové délce světla, kterému je vystavena. Ve své absorpční formě Pr fytochrom maximálně absorbuje červené světlo (666 nm) a přeměňuje se na absorpční formu Pfr pohlcující dlouhovlnné červené světlo (730 nm) (Lack and Evans, 2005; Klose *et al.*, 2020). Pfr je forma fytochromu, která spouští mnoho fyziologických reakcí rostliny na světlo, a proto je označována jako aktivní forma fytochromu (Smith *et al.*, 2010). K návratu Pfr do neaktivního stavu Pr může dojít buď

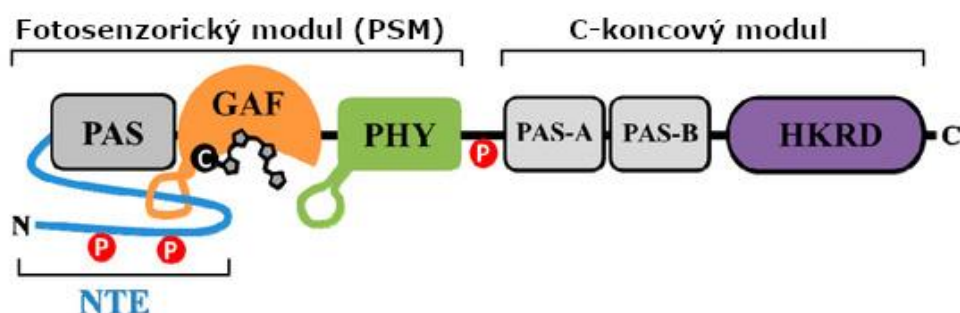
absorpcí dlouhovlnného červeného světla (far-red; FR), nebo relaxačním procesem nezávislým na světle, označovaným jako temnostní reverze (Klose *et al.*, 2020).

Rostliny obsahují více druhů fytochromů, jež se řadí do skupin podle genů kódujících jejich apoproteiny. V rámci nahosemenných rostlin jsou konzervovány tři samostatné geny kódující apoproteiny PHYA-PHYC a další apoproteinové geny byly identifikovány u dvouděložných rostlin (Franklin and Quail, 2010). Genom rostliny *Arabidopsis thaliana* kóduje pět různých fytochromových apoproteinů (PHYA, PHYB, PHYC, PHYD a PHYE) a stejný počet se vyskytuje u rajčete (PHYA, PHYB1, PHYB2, PHYE a PHYF) (Smith *et al.*, 2010; Abdellatif *et al.*, 2022).

Hlavní fotoreceptor PHYA označovaný taky jako fytochrom "typu I" vykazuje na rozdíl od ostatních fytochromů rychlou fotolabilitu ve formě Pfr a je zodpovědný za vnímání FR světla (Franklin and Quail, 2010; Hoang *et al.*, 2019). Fytochrom PHYA je převládajícím fytochromem v etiolovaných semenáčcích, ale po přenosu rostliny na světlo je rychle degradován na mnohem nižší hladiny, a tím umožňuje rychlou podporu de-etiolizace po vzejití z půdy. Vysoce citlivé, nevratné funkce PHYA v reakci na nízké množství světla se označují jako reakce na velmi nízkou intenzitu světla (Very Low Fluence Response, VLFR) (Franklin and Quail, 2010). Fotoreverzibilní reakce jsou zprostředkovány fytochromy "typu II" (PHYB-E), které vykazují relativní stabilitu ve formě Pfr a jejich reakce se označují jako reakce na nízké záření (Low Fluence Responses, LFR) a hrají roli ve fotomorfogenním vývoji zprostředkovaném červeným světlem (Franklin and Quail, 2010; Hoang *et al.*, 2019).

2.2.1.1 Struktura fytochromu

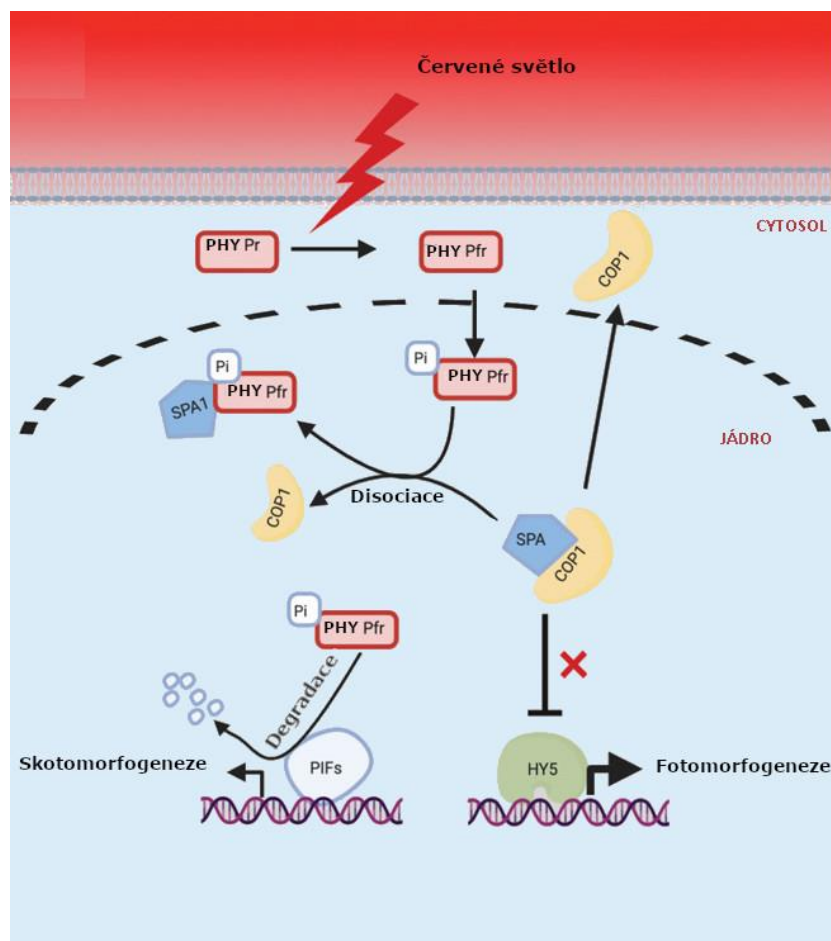
Molekula fytochromu má dvě složky: proteinovou část (apoprotein) a chromofor fytochromobilin (PΦB). Apoprotein nese N-terminální fotosenzorický modul spojený se strukturně prodlouženým C-koncovým modulem (Obr. 2) (Hoang *et al.*, 2019). Fotosenzorický modul (PSM) se skládá z N-terminálního konce (NTE), domény Per/Arnt/Sim (PAS), cGMP fosfodiesterázy/adenylylcyklázy/FhlA (GAF) a fytochromově specifické domény (PHY). C-koncový modul obsahuje dvojici PAS repetitiv (PAS-A, PAS-B) a doménu související s histidinkinázou (HKRD). V doméně GAF se nachází cysteinový zbytek, na který se váže fytochromobilin (PΦB) (Hoang *et al.*, 2019).



Obr. 2: Struktura rostlinných fytochromů: Fotosenzorický modul (PSM) se skládá z N-terminálního fotosenzorického modulu (PSM) a C-koncového modulu. PSM obsahuje fotosenzorického jádra (PAS/GAF/PHY) a N-terminální prodloužení (NTE). C-koncový modul obsahuje dvojici PAS repetitiv (označených jako PAS-A a PAS-B) a doménu související s histidinkinázou (HKRD). PSM a C-modul jsou navzájem propojeny oblastí zvanou hinge. Lasso knot motiv v doméně GAF a vlásenkový motiv v doméně PHY jsou označeny oranžovými, resp. zelenými smyčkami. V doméně GAF je znázorněn cysteinový zbytek, na který se váže fytochromobilin. Místa fosforylace rostlinných fytochromů byla zaznamenána v oblastech NTE a v místě propojení (upraveno a převzato z Hoang *et al.*, 2019).

Absorpce světla fytochromobilinem způsobuje jeho izomerizaci a následné změny absorpčního spektra chromoforu i konformace proteinu fytochromu (Taiz and Zeiger, 2002; Buchanan *et al.*, 2015). Je známo, že se fytochrom po světelné aktivaci v cytoplazmě přesouvá do jádra a interaguje s transkripčním faktorem PIF3 (Smith *et al.*, 2010). Tato interakce indukuje fosforylaci PIF a jeho následnou degradaci prostřednictvím ubikvitinové proteazomové dráhy. Degradací PIF dochází k regulaci transkripce cílových genů a tím k zprostředkování reakcí na světlo (Obr. 3) (Smith *et al.*, 2010; Hoang *et al.*, 2019). Existuje několik dalších kandidátů na substrátové proteiny interagujících s fytochromy jako jsou kryptochromy, komplexy FHY1/FHL

a COP1/SPA (Hoang *et al.*, 2019). Fytochromy PHYA a PHYB také působí jako signál v cytoplazmě, nezávisle na svém vlivu na transkripci jaderných genů. Taková cytoplazmatická signalizace může probíhat prostřednictvím substrátových proteinů jako PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1) (Smith *et al.*, 2010).



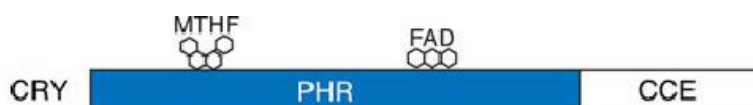
Obr. 3: Model znázorňující červeným světlem zprostředkované signální dráhy zahrnující fotoreceptory a klíčové navazující signální komponenty. Reakcí na červené světlo se PHY přemění na aktivní formu Pfr a přemístí se do jádra. Po fosforylaci v jádře aktivní PHY Pfr interaguje se SPA1 a brání mu ve vazbě na COP1, čímž inaktivují komplex COP1/SPA1. COP1 následně transportován do cytosolu. Tím se stabilizuje akumulace HY5, který pozitivně reguluje expresi genů fotomorfogeneze. Naopak ve tmě je komplex COP1/SPA1 aktivní a podílí se na degradaci HY5 a zabraňuje fotomorfogenezi. Aktivní PHY navíc zprostředkovává degradaci PIF v proteasomu 26S, čímž potlačuje skotomorfogenezi. Fytochromy tedy zprostředkovávají fotomorfogenický vývoj inhibicí funkce negativních regulátorů fotomorfogeneze, tj. komplexů PIF a COP1/SPA. První z nich je v přítomnosti fytochromů degradován a druhý je disociován vazbou s fytochromy (převzato a upraveno z Yadav *et al.*, 2020).

2.2.2 Kryptochromy

Rostlinné kryptochromy (CRY) jsou fotoreceptory UV-A/modrého světla, které hrají klíčovou roli v regulaci fyziologických reakcí zprostředkovaných modrým světlem (Yang *et al.*, 2017). Jedná se o flavoproteiny sekvenčně podobné fotolyázám, enzymům původně charakterizovaným u bakterií, které fungují jako fotoreceptory a zprostředkovávají opravy UV zářením poškozené DNA (Cashmore *et al.*, 1999; Smith *et al.*, 2010; Lin and Todo, 2005).

Fotolyáza a CRY spolu tvoří nadrodinu fotolyáz/kryptochromů, ale mají odlišné biochemické a fyziologické funkce (Lin and Todo, 2005). Fotolyázy katalyzují opravnou reakci DNA, kdežto rostlinné a živočišné CRY během evoluce ztratily svou DNA opravnou aktivitu. Místo toho získaly regulační funkce, ačkoli se zdá, že CRY-DASH (podle *Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Homo*) hraje roli při opravě cyklobutanových pyrimidinových dimerů (Yang *et al.*, 2017; Rredhi *et al.*, 2021).

Citlivosti na světlo je dosaženo prostřednictvím chromoforů navázaných na bílkovinnou kostru (apoprotein) (Procopio *et al.*, 2016). Apoprotein kryptochromu obsahuje dvě domény, N-koncovou doménu PHR (Photolyase-Homologous Region) o délce přibližně 500 reziduí a C-koncovou doménu CCE (Cryptochrome C-terminal Extension) o různé délce a sekvenci (Obr. 4) (Liu *et al.*, 2011). U CRY-DASH C-koncová doména zcela chybí (Facella *et al.*, 2006). PHR je chromofor vázící doména, která se nekovalentně váže na flavin adenindinukleotid (FAD), případně na anténní pigment methyltetrahydrofolát (MTHF) (Liu *et al.*, 2011).



Obr. 4: Struktura rostlinného kryptochromu (CRY). Skládá se z N-koncové domény (PHR) a C-koncové domény (CCE). PHR váže dva typy chromoforu: flavin adenindinukleotid (FAD) nebo methyltetrahydrofolát (MTHF) (převzato a upraveno z Yang *et al.*, 2017).

Fotoaktivace rostlinných kryptochromů začíná fotoexcitací nebo absorpcí fotonu a fotoredukci chromoforu FAD, což vede ke konformačním změnám, jako je rozpojení domén PHR a CCE a tvorba homooligomerů kryptochromu, které interagují s dalšími proteiny a mění expresi genů (Wang and Lin, 2020).

Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje tři geny pro kryptochrom, *CRY1*, *CRY2* a *CRY3* (Liu *et al.*, 2011). Gen kódující *CRY1* byl izolován screeningem mutovaných populací *Arabidopsis* se sníženou inhibicí prodlužování hypokotyly při působení modrého světla. Tyto mutantní populace se označují jako *cry1* a mají prodloužené hypokotyly při klíčení na modrém světle. *CRY2* byl následně identifikován v sekvenci genomu *Arabidopsis*, jelikož je sekvenčně blízce příbuzný s *CRY1*. *CRY1* a *CRY2* primárně zprostředkovávají světlem řízenou de-etiolizaci a programovanou buněčnou smrt (řízenou hlavně *CRY1*), případně fotoperiodickou kontrolu doby kvetení (řízenou hlavně *CRY2*), ačkoli u *Arabidopsis* zprostředkovávají i další světelné reakce (Yu *et al.*, 2010; Fantini *et al.*, 2019). Gen kódující *CRY3* byl identifikován později a je s *CRY1* a *CRY2* méně příbuzný, než jsou tyto geny navzájem (Smith *et al.*, 2010). *CRY1* a *CRY2* jsou rozpustné proteiny nacházející se v jádře, zatímco *CRY3* je *CRY-DASH* protein, který lze detekovat v chloroplastech a mitochondriích. Fyziologická funkce *CRY3* zůstává nejasná, protože mutant *cry3* nevykazoval žádné zjevné fenotypové změny při pěstování v různých podmínkách viditelného nebo UV světla. Byla však zjištěna biochemická aktivita *CRY3* při opravě ssDNA a tak se pravděpodobně podílí na ochraně organelárních genomů v *Arabidopsis* před poškozením UV zářením (Yu *et al.*, 2010).

Geny *CRY1* a *CRY2* byly naklonovány také z rajčete a příbuzné sekvence jsou známy u hořčice (*Sinapis alba*) a zelené řasy *Chlamydomonas* (Srivastava, 2002). Rajče obsahuje čtyři typy kryptochromů: *CRY1a*, *CRY1b*, *CRY2* a *CRY3*. *CRY1b* kóduje zkrácenou kopii *CRY1a* (postrádá většinu C-koncového prodloužení) a vznikl během triplikace celého genomu, která proběhla u společného předka *Solanaceae*. Není jasné, zda *CRY1b* kóduje funkční protein, nicméně není schopen doplňovat mutanty *cry1a*, kteří vykazují jasné mutantní fenotypy při pěstování na modrém světle (Fantini *et al.*, 2019).

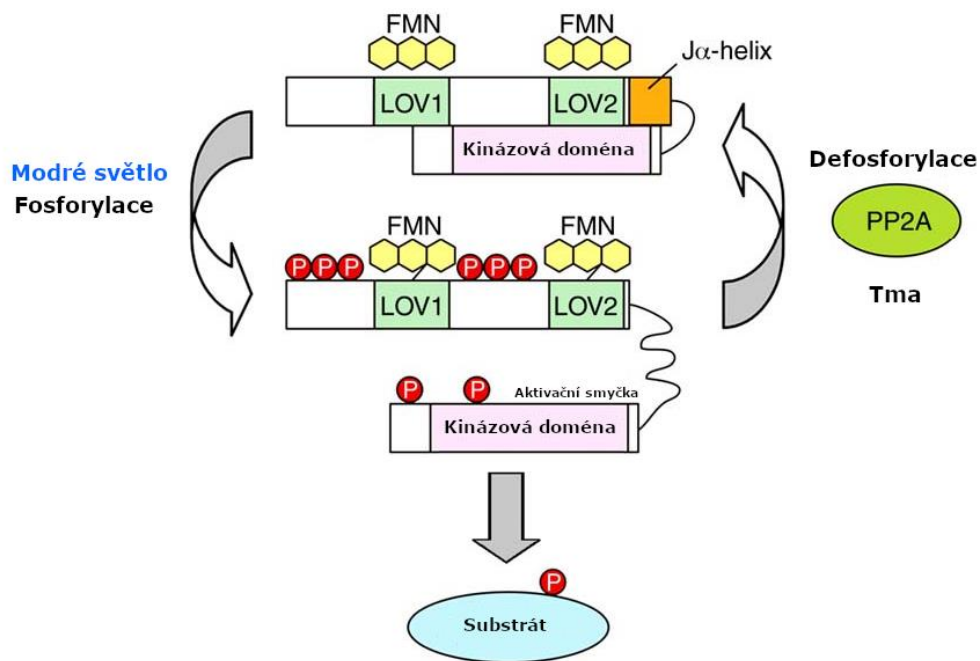
2.2.3 Fototropiny

Fototropiny (PHOT) jsou proteinkinázy aktivované UV-A a modrým světlem a jsou asociované s plazmatickou membránou (Salomon *et al.*, 2000; Buchanan *et al.*, 2015).

Fototropin byl původně identifikován díky mutantu *Arabidopsis* s poruchou fototropismu *nph1* (*nonphototropic hypocotyl*) (Briggs and Olney, 2001). Následně byly fototropiny identifikovány u několika dalších rostlinných druhů, od zelené řasy *Chlamydomonas reinhardtii* až po vyšší rostliny. U vyšších rostlin byly dosud popsány dva druhy fototropinů, PHOT1 a PHOT2, které mají společnou sekvenční homologii (Sharma *et al.*, 2014). Tyto fototropiny mají částečně překrývající se funkce, ale vykazují různou fotosenzitivitu; na nízkou intenzitu modrého světla reaguje pouze PHOT1 a na vyšší intenzitu světla reagují oba fototropiny (Sullivan *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2014). Jak PHOT1, tak PHOT2 zprostředkovávají nejen fototropismus, podle něhož byly pojmenovány, ale také další fyziologické reakce vyvolané modrým světlem, jako je pohyb chloroplastů, pohyb jádra, otevírání průduchů, rozpínání listů a kotyledonů, polohování listů, fotomorfogeneze listů a rychlá inhibice prodlužovacího růstu etiolovaných hypokotylů (Briggs and Christie, 2002; Sullivan *et al.*, 2008).

Sekvence rostlinných fototropinů lze rozdělit na dva segmenty, na N-koncovou oblast složenou ze dvou fotosenzorických domén LOV (Light, Oxygen, or Voltage) a serin/threoninkinázovou doménu na C-konci. Fotosenzorické domény jsou označeny jako LOV1 a LOV2. Tyto domény fungují jako senzory modrého světla a vážou flavin mononukleotid (FMN) jako chromofor, ale vykazují různé fotochemické vlastnosti a funkční role (Briggs and Olney, 2001; Sullivan *et al.*, 2008).

Působení modrého světla způsobuje tvorbu aduktů mezi FMN a zbytkem Cys v doménách LOV, a to vede k fosforylaci fototropinu, což je považováno za primární krok ve fototropinové signalizaci (Obr. 5) (Sharma *et al.*, 2014). Následná signální transdukce vede k redistribuci PIN proteinů řídících polární transport auxinů, který je nezbytný pro orientovaný růst, a ke změnám toků iontů v plazmatické membráně, které regulují turgor průduchových buněk (Adamowski and Friml, 2015; Buchanan *et al.*, 2015).



Obr. 5: Model struktury fototropinu. Fototropiny mají dvě fotosenzorické domény LOV1 a LOV2 na N-konci a na Ser/Thr kinázovou doménu na C-konci. Ve tmě se doména LOV2 spojuje s kinázovou doménou a inhibuje tak kinázovou aktivitu. Modré světlo disociuje doménu LOV2 od kinázové domény. Dochází ke konformačním změnám jak u domény LOV2, tak i $J\alpha$ -helixu a kinázová doména je tím aktivována. Aktivovaná kináza fosforyluje substrátové proteiny. Místa fosforylace jsou označena jako P. Fosforylovaná místa jsou ve tmě defosforylována proteinfosfatázou typu 2A (PP2A) (upraveno a převzato z Inoue *et al.*, 2010).

2.2.4 ZTL, FKF1, LKP2

Proteiny skupiny ZEITLUPE (ZTL), FLAVIN-BINDING, KELCH REPEAT, F-BOX 1 (FKF1) a LOV KELCH PROTEIN 2 (LKP2) se rovněž podílejí na regulaci růstu a vývoje rostlin jako receptory modrého světla (BingJie *et al.*, 2019). Tyto proteiny byly identifikovány před relativně krátkou dobu a je známo, že se podílejí na regulaci cirkadiálních hodin a fotoperiodického kvetení u *Arabidopsis* (Zoltowski and Imaizumi, 2014). Nedávno bylo navíc zjištěno, že se tato rodina proteinů podílí i při reakci rostlin na stres (BingJie *et al.*, 2019).

Tato rodina proteinů má jedinečnou kombinaci domén: doménu LOV absorbující modré světlo spolu s doménami podílejícími se na degradaci proteinů (F-box a doména s Kelch repetitivními). Prostřednictvím těchto domén funguje rodina proteinů ZTL/FKF1/LKP2 v rostlinách jako SCF ubikvitin ligázy a zprostředkovává degradaci cílových proteinů v závislosti na modrém světle, čímž reguluje růst a vývoj rostlin (Ito *et al.*, 2012; BingJie *et al.*, 2019).

2.3 Aniontové kanály

Aniontové kanály jsou iontové kanály přítomné v eukaryotických i prokaryotických buňkách (Roberts, 2006). Jedná se o integrální membránové proteiny umožňující rychlý transport aniontů přes membránu a hrají tak zásadní roli v regulaci turgoru, stabilizaci membránového napětí, signální transdukci, toleranci toxických kovů, získávání živin a rostlinné osmoregulaci (Thomine *et al.*, 1997a; Thomine *et al.*, 1997b). Byly popsány ve všech rostlinných membránách včetně plazmatické membrány, tonoplastu, membrány endoplazmatického retikula, mitochondrií a chloroplastů, přičemž kanály plazmatické membrány jsou zdaleka nejlépe charakterizovány ve srovnání s těmi, které se nacházejí na ostatních membránách (Roberts, 2006). Na plazmatické membráně bylo charakterizováno několik typů aniontových kanálů. Člení se do tří tříd dle jejich závislosti na napětí, světle a napnutí membrány (Roberts, 2006).

2.3.1 Aniontové kanály typu S a R

Nejrozsáhleji charakterizované aniontové kanály jsou depolarizací aktivované kanály označované jako R-typ (Rapid-activating) a S-typ (Slow-activating). Aniontový kanál typu R může být plně aktivován a rychle inaktivován během milisekund, zatímco aktivace aniontového kanálu typu S trvá až několik desítek sekund, po níž následuje pomalá kinetika inaktivace (Roberts, 2006).

Aniontové kanály se liší nejen svou kinetikou, ale i propustností pro různé anionty. Kanál typu R je vysoce propustný pro dusičnanový anion (NO_3^-). Zajímavá je i vysoká propustnost pro síranový anion (SO_4^{2-}), který je obvykle považován za slabě propustný přes membrány. V menší míře je kanál typu R selektivní také pro chloridy, uhličitany a malát (Diatloff *et al.*, 2010). Aniontové kanály typu S jsou vysoce propustné pro NO_3^- , dále jsou propustné pro halogenidové anionty a vykazují relativně malou propustnost pro malát (Roberts, 2006; Wang *et al.*, 2018). I přes to, že se propustnost aniontových kanálů liší mezi různými druhy rostlin, jsou kanály typu S vždy nepropustné pro síranové anionty (Diatloff *et al.*, 2010). Takže vysoká propustnost pro NO_3^- a nepropustnost pro SO_4^{2-} patří mezi základní charakteristiku aniontových kanálů typu S (Diatloff *et al.*, 2010). Avšak je třeba poznamenat, že propustnost aniontových kanálů může být ovlivněna různými faktory, včetně koncentrace iontů, změn pH, napětí a liší se mezi jednotlivými rostlinnými druhy (Roberts, 2006; de Angeli *et al.*, 2007).

Aniontové kanály typu S i R byly nalezeny u různých druhů rostlin, jako jsou *Vicia faba*, *Nicotiana sp.*, *Arabidopsis thaliana* a v různých orgánech, jako jsou svěrací buňky průduchů, suspenzní buňky, epidermální buňky hypokotylu a kořene (de Angeli *et al.*, 2007).

U *Arabidopsis* bylo odhaleno, že kanál typu R je členem rodiny transportérů ALTM (Aluminium Activated Malate Transporter). U *Arabidopsis* je ve velkém množství exprimován AtALTM12/QUAC1 ve svěracích buňkách průduchů a následně je alokován do plazmatické membrány (Tavares *et al.*, 2011). U rajčete bylo objeveno 16 proteinů rodiny ALMT. Dva geny *SLALMT* (*SLALMT4* a *SLALMT5*) jsou exprimovány především v cévních svazcích plodů během vývoje rajčete a oba proteiny mají funkci malátového efluxu (Sasaki *et al.*, 2022).

Geny rodiny *ALMT* se podílejí na mnoha fyziologických funkcích a vlastnostech; například na pohybu průduchů (otevírání a zavírání), akumulaci organických kyselin v plodech, prodlužování pylových láček a také na toleranci k Al^{3+} u mnoha druhů rostlin (Sasaki *et al.*, 2022).

Kanál typu S spadá do genové rodiny SLAC1 (SLOW Anion Channel associated 1) a bylo zjištěno, že je přednostně exprimován ve svěracích buňkách a je propustný pro malát. Tento protein má zásadní význam pro uzavírání průduchů v reakci na CO_2 , kyselinu abscisovou, ozon, přechod ze světla do tmy, změny vlhkosti, zvýšení cytosolického Ca^{2+} , H_2O_2 a NO (Tavares *et al.*, 2011). Bylo identifikováno sedm členů rodiny genů *SLAC1* u rajčete a na základě jejich umístění na chromozomu byly pojmenovány *SISLAC1-1* až *SISLAC1-7* (Mo *et al.*, 2023).

2.3.2 Chloridové kanály

Proteiny rodiny chloridových kanálů CLC se vyskytují jak u prokaryot, tak u eukaryot (Nedelyaeva *et al.*, 2020). U rostlin se tyto proteiny vyskytují v různých tkáních a rozmanitých intracelulárních membránách a zajišťují mnoho funkcí. Především se jedná o transportní proteiny pro anionty včetně Cl^- a dusičnanů (NO_3^-) a mají zásadní význam pro příjem a transport živin, regulaci buněčného turgoru, stomatální pohyb, přenos signálů a homeostázu Cl^- a NO_3^- při stresu zasolením (Wei *et al.*, 2019).

V genomu *Arabidopsis* se podařilo identifikovat sedm genů *CLC* (*AtCLCa-AtCLCg*) a čtyři z nich (*AtCLCa*, *-b*, *-c* a *-d*) byly dosud klonovány (Marmagne *et al.*, 2007). U rajčete bylo identifikováno 5 genů *CLC* rodiny (Zhang *et al.*, 2021).

Fyziologická charakterizace mutantů *Arabidopsis* naznačila zapojení *AtCLCa* a *AtCLCc* do regulace hladiny dusičnanů v rostlině. Byla prokázána tonoplastická lokalizace *AtCLCa* a jeho role jako nitrát/protonového antiporteru se stechiometrií nitrát/proton 2:1, což je v souladu s jeho fyziologickou funkcí v rostlině (de Angeli *et al.*, 2007). Další proteiny *CLC* z *Arabidopsis* mají různou subcelulární lokalizaci jako Trans-Golgiho síť (*AtCLCd*), chloroplasty (*AtCLCe*) a Golgiho váčky (*AtCLCf*) (de Angeli *et al.*, 2007; Marmagne *et al.*, 2007).

2.3.3 Světlem aktivované aniontové kanály

Aniontové kanály aktivované modrým a bílým světlem byly identifikovány v buňkách hypokotylu *A. thaliana* a v mezofylu *P. sativum*. Modrým světlem aktivované kanály jsou závislé na cytosolické koncentraci Ca^{2+} a hrají roli při zprostředkování membránových depolarizací spojených s inhibicí prodloužení hypokotylu modrým světlem (Roberts, 2006).

2.3.4 Mechanicky aktivované aniontové kanály

Různé mechanicky aktivované aniontové kanály byly popsány u bakterií, archeí a eukaryot bez evoluční příbuznosti. U rostlin byly identifikovány v plazmatické membráně svěřacích buněk *V.faba*, v buňkách suspenzní kultury tabáku a mezofylových buňkách listů *A. thaliana*. Tyto kanály reagují na působení mechanické síly, jako je gravitace, vibrace, dotyk a hyperosmotické podmínky (Kaur *et al.*, 2021; Roberts, 2006)

Mechanicky aktivované aniontové kanály pravděpodobně hrají roli v osmoregulaci během osmotického stresu. Významné rozdíly v jejich biofyzikálních vlastnostech však naznačují, že mají v osmoregulaci odlišné role. Předchozí studie ukázaly jejich zapojení do celé řady fyziologických procesů v rostlinách. Patří k nim mimo jiné růst pylových láček, interakce mezi rostlinou a patogenem, regulace tvaru a velikosti plastidů a růst postranních kořenů (Kaur *et al.*, 2021).

2.4 Regulace aniontových kanálů světlem

Kromě zásadní úlohy světla pro fotosyntézu slouží tyto elektromagnetické vlny také jako signál pro regulaci různých vývojových a fyziologických procesů v rostlinách. Díky této signalizační funkci světlo nejenže podporuje přenos elektronů a iontů na tylakoidní membráně, ale také podporuje aktivitu přenosu iontů v jiných rostlinných membránách.

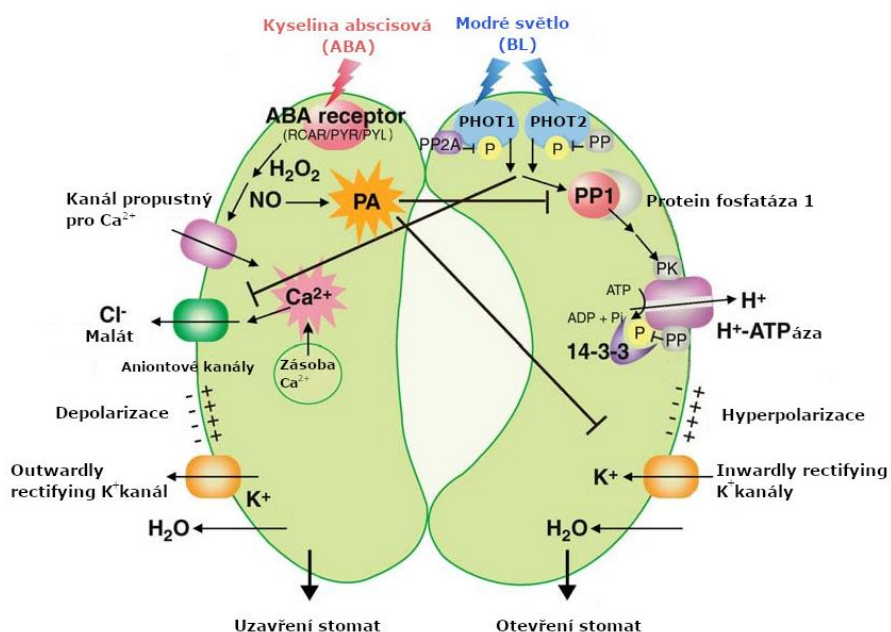
Úloha transportu iontů přes plazmatickou membránu v závislosti na světle byla jednoznačně prokázána při fungování svěracích buněk (Marten *et al.*, 2010). Průduchy na povrchu listu řídí příjem oxidu uhličitého pro fotosyntézu a ztrátu vody transpirací. Otevírání a zavírání průduchů je dáno změnou turgoru svěracích buněk. Otevření průduchů se řídí vnitřními signály (např. cirkadiánními hodinami), biotickými signály a různými faktory prostředí, včetně světla, koncentrace CO₂, teploty a deficitu vody (Yang *et al.*, 2020).

Rostliny otvírají své průduchy především v reakci na modré světlo. Působení modrého světla vede k fosforylaci fotoreceptorů PHOT a vazbě proteinů 14-3-3 na fototropin. Tyto proteiny umožňují fototropinu zůstat v aktivní formě a také se váží na C-koncovou doménu H⁺-ATPázy. Tímto mechanismem se aktivuje H⁺-ATPáza ve svěracích buňkách průduchů. Ta umožní transport H⁺ přes membránu svěrací buňky do apoplastu, vedoucí k okyselení extracelulárního prostoru a následné hyperpolarizaci plazmatické membrány. Hyperpolarizace zprostředkuje příjem draslíkových kationtů přes napěťově řízené kanály umožňující pohyb K⁺ dovnitř buňky (Inwardly rectifying kanály) (Roelfsema and Hedrich, 2005). Akumulované draslíkové kationty snižují osmotický potenciál svěracích buněk a buňky tak přijímají vodu a dochází k otevření průduchů (Obr. 6). (Hlavinka *et al.*, 2013). Uzavření průduchů je naopak dáno pohybem K⁺ a aniontů směrem ven z buňky. Důsledkem ztráty osmoticky aktivních látek dojde ke snížení turgoru a průduchy se uzavřou (Roelfsema and Hedrich, 2005).

K tomu dochází v případě vysoké koncentrace CO_2 nebo při nedostatku vody (Matthews *et al.*, 2020).

Aktivace fototropinů modrým světlem vede nejen k stimulaci H^+ -ATPasy plasmatické membrány, ale také inhibuje aniontové kanály typu S ve svěracích buňkách *Vicia faba* a *Arabidopsis thaliana* (Marten *et al.*, 2007).

Tato reakce na modré světlo je inhibována přítomností fytohormonu kyseliny abscisové (ABA). Tento mechanismus umožňuje rostlinám maximální adaptaci, která zabraňuje ztrátám vody ve dne a usnadňuje příjem CO_2 pro fotosyntézu. ABA indukuje uzavření průduchů prostřednictvím receptorů pro ABA (PYR/PYL/RCAR; Pyrabactin Resistance/Pyrabactin1-Like/Regulatory Components of ABA Receptor) s následnou produkcí H_2O_2 a NO (Inoue *et al.*, 2010). ABA nejen inhibuje H^+ -ATPázu, ale také přechodně aktivuje aniontové kanály plasmatické membrány což má za následek depolarizaci membrány a podporuje otevření průduchů (Obr. 6) (Marten *et al.*, 2007; Inoue *et al.*, 2010).



Obr. 6: Signalizace otevírání průduchů v závislosti na modrém světle (vpravo) a uzavírání průduchů vyvolané ABA (vlevo). Průduchy se otevírají reakcí na modré světlo vnímané fototropiny (PHOT1, PHOT2). Ty dále přes protein fosfatázu 1 (Protein phosphatase 1, PP1) a proteiny 14-3-3 aktivují H^+ ATPázu. Aktivovaná H^+ ATPáza transportuje H^+ přes membránu a zvyšuje záporný elektrický potenciál, čímž pohání tok K^+ přes napětově řízené inwardly rectifying K^+ kanály. Akumulace K^+ usnadňuje přítok vody do svěracích buněk, a to vede k otevření průduchu. Aktivace fototropinů zároveň inhibuje aniontové kanály. ABA indukuje zavírání průduchů prostřednictvím receptorového komplexu PYR/PYL/RCAR. Působením ABA dochází k produkci H_2O_2 a NO a ke změně koncentrace Ca^{2+} , K^+ a aniontů v cytoplazmě svěracích buněk. Aktivace aniontových kanálů vlivem změny koncentrace Ca^{2+} vede k depolarizaci membrány. Depolarizace pohání tok K^+ outwardly rectifying kanály ze svěracích buněk do extracelulárního

prostoru. Změnou osmoticky aktivních látek dochází k odtoku vody a uzavření průduchu. Sekundárním poslem kyselinou fosfatidovou (PA) inhibuje fosforylaci membránových H^+ ATPas a inhibuje K^+ inwardly rectifying kanály (upraveno a převzato z Inoue *et al.*, 2010).

Kromě specifické dráhy modrého světla jsou svěřací buňky průduchů citlivé také na fotosynteticky aktivní záření (PAR). Tato reakce se často označuje jako reakce na červené světlo, ale může být aktivována i modrým světlem při vysokých intenzitách (Roelfsema and Hedrich, 2005). PAR neovlivňuje tok iontů ve svěřacích buňkách přímo, ale zřejmě působí prostřednictvím změn mezibuněčné a vnitrobuněčné koncentrace CO_2 . Fotosyntézou klesá mezibuněčná hladina CO_2 a ta vede k deaktivaci aniontových kanálů plazmatické membrány. Světlo tedy stimuluje H^+ -ATPázy cestou závislou na modrém světle a inhibuje aniontové kanály cestou fotosynteticky aktivního záření (Marten *et al.*, 2007).

Na rozdíl od svěřacích buněk průduchů bylo prokázáno, že modré světlo aktivuje aniontové kanály v hypokotylových buňkách etiolovaných semenáčků *Arabidopsis* (Marten *et al.*, 2007). Reakci etiolovaných semenáčků na modré světlo lze rozdělit na dvě fáze. První z nich je započata přibližně po 30 sekundách a je zprostředkována receptorem pro UVA/modré světlo (Cosgrove, 1981). Druhá fáze začíná 45-60 minut po expozici modrému světlu a je závislá na fotoreceptoru CRY1 (Folta and Spalding, 2001). Obě reakce jsou doprovázeny depolarizací plazmatické membrány, která je způsobena aktivací aniontových kanálů. Aniontové kanály tedy hrají důležitou roli v průběhu fotomorfogeneze (Spalding, 2000). U etiolovaných hypokotylů *Cucumis sativus* L. se ukázalo, že mechanismus zodpovědný za depolarizaci vyvolanou modrým světlem zahrnuje, mimo aktivaci aniontových kanálů, i inhibici H^+ -ATPázy (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).

Fotoreceptor CRY1 se také účastní signální transdukce vedoucí ke smršťování protoplastů izolovaných z buněk hypokotylu *Arabidopsis* v reakci na modré světlo. Po zaznamenání světla fotoreceptorem se aktivují aniontové kanály. Aktivovanými kanály je transportován Cl^- ven z buňky a plazmatická membrána se depolarizuje. Poté se aktivují kanály, které umožňují tok K^+ z buňky, a dochází k repolarizaci plazmatické membrány. Cl^- (a případně další anionty) a K^+ nadále unikají kanály, což vede k poklesu objemu protoplastu (Wang and Iino, 1998).

Aktivace aniontových kanálů světlem byla také prokázána v plazmatické membráně mezofylu *P. sativum*. Bílé světlo aktivovalo Ca^{2+} dependentní aniontové kanály. Po osvětlení docházelo opět k iontovým tokům a depolarizaci membrány (Elzenga and Van Volkenburgh, 1997).

2.5 Inhibitory iontových kanálů

Inhibitory aniontových kanálů se používají v rostlinné fyziologii ke zkoumání funkcí a úlohou aniontových kanálů v biologických procesech. Mohou být využity ke studiu přenosu iontů přes membrány rostlinných buněk, otevírání a uzavírání průduchů, reakcí rostlin na stres, příjmu a distribuci základních živin. Poskytují tedy poznatky o tom, jak rostliny reagují na podněty prostředí a regulují přenos iontů pro růst, vývoj a adaptaci na stres.

Je známo několik inhibitorů aniontových kanálů. Mezi nejčastěji využívané se řadí 9-AC (kyselina antracen-9-karboxylová), DIDS (kyselina 4,4'-diisothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonová), NPPB (kyselina 5-nitro-2,3-phenylpropylaminobenzoová) a SITS (4-acetamido-4' - isothiocyanatostilbene-2,2'-disulfonát). V experimentální části práce byly využity inhibitory NPPB a SITS a budou podrobněji charakterizovány.

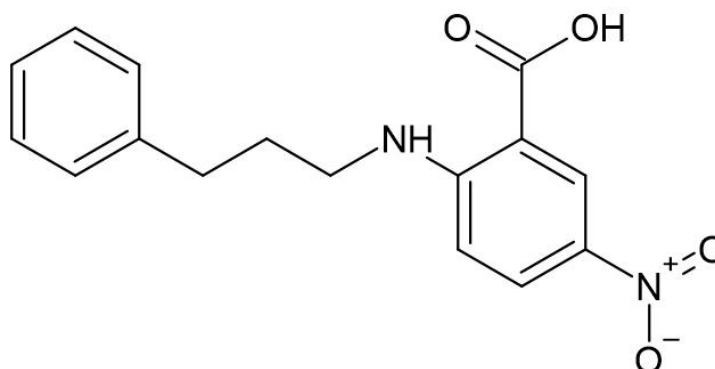
Kanály typu R a typu S se liší nejen ve svých základních charakteristikách, ale také ve svém farmakologickém profilu. Kanály typu R jsou blokovány deriváty stilbenu, jako je DIDS, zatímco kanály typu S jsou vůči DIDS necitlivé. Kanály typu S jsou blokovány NPPB, 9-AC (kyselina anthracen-9-karboxylová), NIF (kyselina niiflumová) a IAA-94 (kyselina indanyl-oxyoctová). Tyto blokátory nejsou však specifické, protože inhibují také aniontové kanály typu R a kanály umožňující tok K^+ ve směru ven z buňky (Outwardly rectifying kanály) (Roelfsema and Hedrich, 2005). Zároveň existují molekulární rozdíly mezi aniontovými kanály jednotlivých druhů rostlin, a tak reagují různě na inhibitory aniontových kanálů. Příkladem lze uvést, aniontové kanály typu S ve svěracích buňkách *V. faba*, které jsou ireverzibilně inhibovány kyselinou niiflumovou, reverzibilně 9-AC, IAA-94 a NPPB, ale nejsou ovlivněny DIDS (Schroeder *et al.*, 1993; Schwartz *et al.*, 1995). NPPB ani kyselina niiflumová nebyly však stejně účinné při použití na aniontové kanály u *Arabidopsis* (White and Broadley, 2001).

2.5.1 NPPB

Inhibitor NPPB (Obr. 7) patří mezi blokátory aniontových kanálů typu S i typu R. Je účinným blokátorem aniontových kanálů typu S ve svěracích buňkách průduchů u *V. faba* a *N. tabacum*, zatímco u *Arabidopsis* nebyl zaznamenán žádný účinek NPPB na tyto aniontové kanály (Roberts, 2006; Tavares *et al.*, 2011). Kanály typu R NPPB účinně blokuje v epidermálních buňkách hypokotylu *Arabidopsis*, zatímco na aniontové kanály typu S v epidermálních buňkách byl účinný méně (White and Broadley, 2001; Tavares *et al.*, 2011). Dále blokuje aniontové kanály (TSAC) v protoplastech ze suspenzní kultury tabáku, které zaujímají podobné charakteristiky jako aniontové kanály typu R (White and Broadley, 2001). Tento inhibitor má též účinek na aniontové kanály v kořenech. Inhibuje aniontové kanály typu R (ARAC) v epidermálních buňkách kořene *Arabidopsis* a kanály umožňující tok K^+ ve směru ven z buňky (Outwardly rectifying kanály) v

Inhibitor aniontových kanálů NPPB je také účinný na modrým světlem aktivované Ca^{2+} dependentní aniontové kanály. Působí proti depolarizaci plazmatické membrány hypokotylových buněk indukované modrým světlem a je schopen částečně působit proti inhibici elongace hypokotylu (Thomine *et al.*, 1997a). Inhibuje i modrým světlem vyvolané smršťování protoplastů izolovaných z hypokotylu *Arabidopsis* a koleoptile kukuřice (Wang and Iino, 1998).

Aplikace inhibitoru NPPB byla také využita při zkoumání role aniontových kanálů při uzavírání průduchů. Data Schroedera *et al.*, 1993 ukázala, že NPPB zcela ruší uzavírání průduchů vyvolané kombinovaným působením ABA a malátu na svěrací buňky průduchů *V. faba* epidermálních buňkách kořene *T. aestivum* (Roberts, 2006).



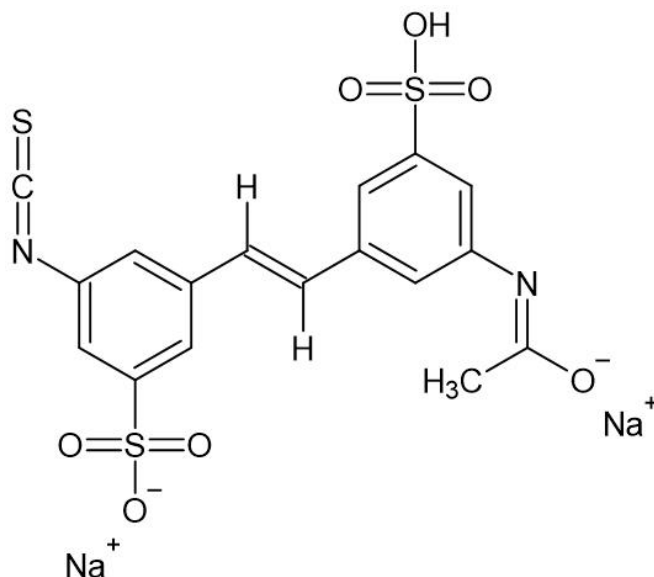
Obr. 7: Chemická struktura kyseliny 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoové (NPPB) (vytvořeno v programu ChemSketch).

2.5.2 SITS

Inhibitor SITS (Obr. 8) se řadí mezi deriváty stilbenu. Účinně blokuje aniontové kanály typu R svěracích buněk průduchů (GCAC1) a tím umožňuje jejich odlišení od aniontových kanálů typu S svěracích buněk (White and Broadley, 2001). Zároveň bylo prokázáno, že SITS působí i na aniontové kanály typu S v epidermálních buňkách hypokotylu *Arabidopsis*, ale působí na ně s nižší účinností než inhibitor DIDS (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).

Inhibitor SITS působí také na hyperpolarizací aktivované aniontové kanály (HAAC). Tyto kanály byly identifikovány u několika rostlin včetně *P. sativum*, *A. thaliana*, *Amaranthus tricolor* a *D. carota*. HAAC jsou částečně inhibovány aplikací SITS, kdežto k dalšímu derivátu stilbenu, DIDS, citlivé nejsou (Roberts, 2006).

Tento inhibitor byl také využit při výzkumu možného podílu aniontových kanálů na inhibici prodlužování buněk hypokotylu auxiny. Inhibitor byl schopen působit proti inhibici a dezintegraci vyvolanou auxiny. Tato interference se zdá být specifická pro auxiny a nedochází k ní, když je prodlužování hypokotylu inhibováno jinými růstovými regulátory, jako jsou ethylen nebo cytokininy (Thomine *et al.*, 1997b).

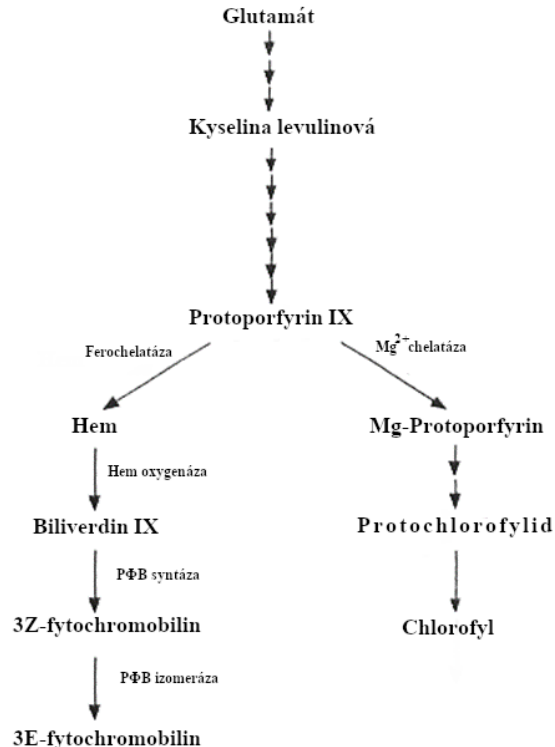


Obr. 8: Chemická struktura 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonátu (SITS). (Vytvořeno v programu ChemSketch.)

2.6 Mutanti rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)

Ke zkoumání funkční úlohy fytochromů v rostlinách lze využít jejich mutanty s poruchou biosyntézy fytochromů nebo přenosu signálu prostřednictvím fytochromů. Tito mutanti mohou být užiteční při určování aktivity fytochromů a jejího vztahu k morfofyziologickým reakcím. U rostlin rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) má mutant *aurea* (*au^w*) a *yellow-green-2* (*yg-2*) nedostatek fytochromového chromoforu.

Fytochromový chromofor 3(E)-fytochromobilin je syntetizován v plastidech tetrapyrrolovou biosyntetickou drahou (Obr. 9). Biosyntetická dráha se skládá ze dvou hlavních větví vedoucí buď k chlorofylu nebo k fytochromobilinu (PΦB). Společným prekurzorem je kyselina levulinová (ALA) a její syntéza je limitujícím krokem této syntézy (Ryberg and Terry, 2002). *Au^w* postrádá PΦB syntázovou aktivitu a nedochází tak k redukci biliverdinu IXα (BV IXα) na 3E-fytochromobilin (3E-PΦB), který je izomerázou dále přeměňován na 3Z-fytochromobilin (3Z-PΦB) (Terry *et al.*, 1995). *Yg-2* je blokován v předchozím kroku syntézy; má defekt v enzymu hem oxygenáza a není tedy schopen oxidace hemu na biliverdin IXa (Terry and Kendrick, 1999).



Obr. 9: Syntéza fytochromobilinu a chlorofylu (upraveno a převzato z Terry, 1997)

Fenotypy mutantů s nedostatkem chromoforu jsou obecně velmi podobné a odpovídají silnému snížení funkčního fytochromu. Rostliny mutantů rajčete *aurea* (*au*) a *yellow-green-2* (*yg-2*) jsou protáhlé pod RL, FR a WL, se sníženým obsahem antokyaninů a sníženou hladinou chlorofylu, což má za následek bledě zelené nebo žlutě vypadající rostliny (Terry and Kendrick, 1996; Terry, 1997).

3 Materiál a metodika

3.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla využita semena recesivního mutanta *au^w* (*aurea*) a *yg-2* (*yellow-green 2*) rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. a semena příslušných izogenních kontrolních linií. Mutant *au^w* byl odvozen od kultivaru MM (cv. Money Maker) a mutant *yg-2* od kultivaru Kokomo. Semena mutantů byla poskytnuta C. M. Rick, TGC: Tomato Genetics Cooperative, University of Florida, Gainesville, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>).

3.2 Příprava kultivačního média

Na přípravu základního kultivačního média MS (Murashige and Skoog, 1962) byl nejprve do 3litrové Erlenmeyerovy baňky nalit přibližně 1 litr destilované vody. Do baňky bylo vloženo magnetické míchadlo a baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Za stálého míchání bylo do Erlenmeyerovy baňky přidáno 20 g sacharózy, 8,6 g MS média (Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Prod. No.: M0221.0100) a 390,4 mg pufru MES (2- (N-morpholino) ethanesulfonic acid)). Následně byl objem roztoku doplněn destilovanou vodou na objem 2 litry. Po plném rozpuštění látek bylo upraveno pH na hodnotu 6,1 postupným přidáváním 1 M hydroxidu draselného. Do každé z pěti 0,5l láhví se šroubovacím uzávěrem bylo naváženo 2,8 g fytoagaru (Dufecha Biochemie, Nizozemsko, Prod. No.: P1001.1000). Připravený roztok byl do nádob následně rozlit po 400 ml. Láhve byly poté uzavřeny víčkem a aluminiovou fólií. Na svrchní část byla nalepena autoklávovací páska, láhev byla označena barevnou páskou a popsána (datem a jménem). Médium bylo sterilizováno v parním autoklávu při teplotě 121 °C a tlaku 101,3 kPa, a po vychladnutí uchováváno v lednici.

3.3 Sterilizace a výsev semen

Povrchová sterilizace semen probíhala ve sterilním prostředí flowboxu. Bylo použito 300 semen každého genotypu rajčete. Semena byla sterilizována v 50ml plastové centrifugační zkumavce typu Falcon roztokem chlornanu sodného obsahujícím 2,8 % aktivního chloru (SAVO 0,6 l: destilovaná H₂O 0,4 l) po dobu 25-30 minut za občasného promíchání. Během sterilizace bylo rozeřháto připravené základní MS médium a bylo nachystáno 12 sterilních plastových Petriho misek (průměr 90 mm). Do misek bylo médium rozlito po 20 ml a bylo necháno ztuhnout. Po uplynutí uvedené doby sterilizace semen byl roztok chlornanu ze zkumavky 10 ml automatickou pipetou odebrán a byla přidána sterilní destilovaná voda. Tento postup promytí byl opakován ještě 5x. Při posledním promytí bylo přidáno 5 ml destilované vody. Po zatuhnutí média bylo na každou misku vyseto přibližně 50 semen pomocí sterilní pinzety. Misky byly popsány genotypem, oblepeny po obvodu dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Cat. no. 1320103112, Batist Medical a.s., Česká republika) a zabaleny do aluminiové folie označené páskou se jménem a datem výsevu. Semena v miskách (ve vertikální poloze) byla následně kultivována v růstové komoře Microclima 1000E (Snijders Scientific, Nizozemsko) při teplotě 23 °C po dobu 3 dnů.

3.4 Přenos semen

Po 3-4 dnech byl proveden přenos vyklíčených semen na médium s přídatkem inhibitoru aniontových kanálů SITS (4-acetamido-4'-isothiocyano-stilbene-2,2'-disulfonate) nebo NPPB (kyselina 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoová) v laminárním flowboxu. Nejprve bylo připraveno v 300ml Erlenmeyerově baňce 120 ml média bez přídatku inhibitoru a následně bylo připraveno 120 ml média obsahující inhibitor SITS o koncentracích 10, 100, 200 a 300 $\mu\text{mol l}^{-1}$ nebo inhibitor NPPB o koncentracích 20, 40, 100 a 140 $\mu\text{mol l}^{-1}$ (Tab. 1, Tab. 2). Připravená média byla následně rozlita po 20 ml do 6 Petriho misek (dva genotypy, tři světelné podmínky). Po ztuhnutí média bylo do každé misky přeneseno sterilní pinzetou na povrch média přibližně 10 rostlin stejné velikosti. Poté byly misky po obvodu oblepeny páskou z netkané textilie (2 vrstvy; viz výše), označeny genotypem a vertikálně umístěny do příslušné růstové komory (modré a červené světlo). Zdrojem kontinuálního modrého světla byla zářivka Philips TLD-

36W/18-Blue s maximální svítivostí $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 440 nm. Zdrojem kontinuálního červeného světla byla žárovka Philips TLD36W/15-Red s maximální svítivostí $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při vlnové délce 660 nm. Misky s klíčovými semeny určenými k inkubaci ve tmě byly zabaleny do aluminiové folie a byly též umístěny vertikálně do růstové komory (do spodní části). Rostliny byly pěstovány po dobu 7 dní při teplotě 23°C .

Tab. 1: Použité koncentrace inhibitoru SITS a množství inhibitoru (zásobní roztok o koncentraci $10^{-2} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) přidaného do 120 ml média.

Požadovaná koncentrace SITS [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Objem zásobního roztoku SITS přidaný do 120 ml média [ml]
0	0
10	0,12
100	1,20
200	2,40
300	3,60

Tab. 2: Použité koncentrace inhibitoru NPPB a množství inhibitoru (zásobní roztok o koncentraci $10^{-2} \text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) přidaného do 120 ml média.

Požadovaná koncentrace NPPB [$\mu\text{mol l}^{-1}$]	Objem zásobního roztoku NPPB přidaný do 120 ml média [ml]
0	0
20	0,240
40	0,480
80	0,960
100	1,200

3.5 Hodnocení růstu rostlin

Po týdenním pěstování semenáčků v různých světelných podmínkách byla měřena celková délka kořene a hypokotylu jednotlivých rostlin pomocí pravítka s přesností na 1 mm. Hodnoty měření byly zaznamenány do tabulky, která obsahovala genotyp mutanta, použitý inhibitor, koncentraci inhibitoru a světelné podmínky pěstování. Dále byla data zpracována pomocí programu Microsoft Excel. Z dat byl vypočítán průměr, standardní chyba a směrodatná odchylka. Z průměru byla spočítána průměrná inhibice růstu a případně bylo provedeno statistické zpracování pomocí studentova t-testu.

Inhibice růstu byla počítána podle následujícího vzorce:

$$\% \text{ Inhibice} = \frac{\bar{I}_A - \bar{I}_B}{\bar{I}_A} \cdot 100 (\%)$$

\bar{I}_A ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při nulové koncentraci inhibitoru

\bar{I}_B ... průměrná délka hypokotylu nebo kořene při koncentraci inhibitoru, u které chceme zjistit inhibiční účinek na růst

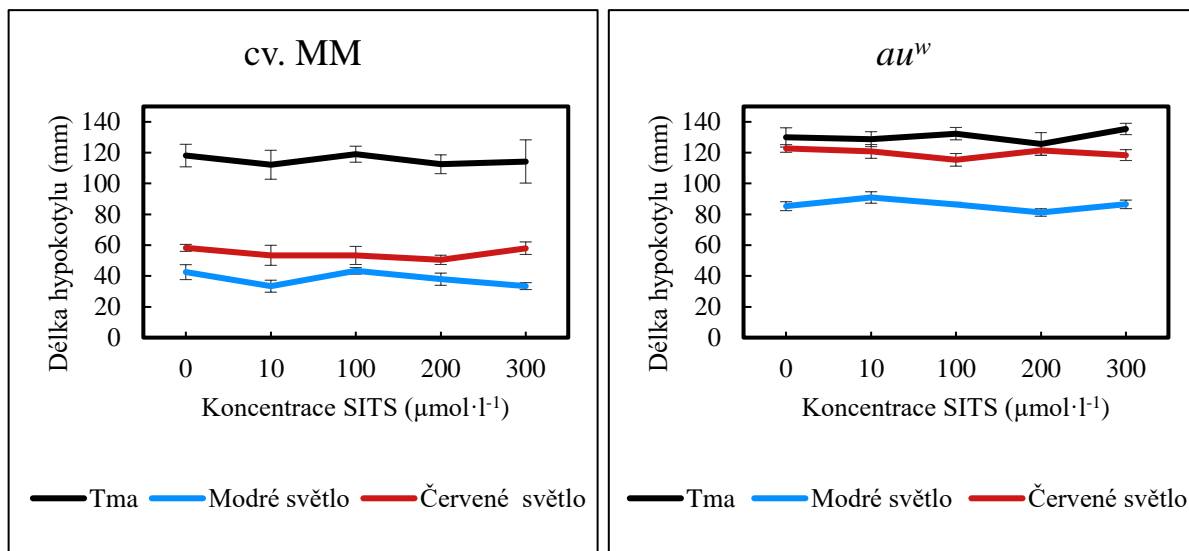
4 Výsledky

Cílem této bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály zapojeny v růstu a vývoji rajčete. K tomu bylo využito inhibitorů iontových kanálů NPPB a SITS a byl sledován vliv těchto inhibitorů na růst hypokotylu a kořene *Solanum lycopersicum*. Druhým cílem bylo zjistit, zda může být případné zapojení aniontových kanálů v růstu rostlin ovlivněno světlem. Vliv inhibitorů NPPB a SITS na růst rajčete byl tedy studován ve tmě, na modrém a červeném světle. Třetím cílem bylo zjistit, zda případný vliv světla na funkci aniontových kanálů je zprostředkován fotoreceptory fytochromy. K tomu byly využity mutantní genotypy rajčete s defekty ve fytochromovém chromoforu, které byly odvozeny od odpovídajících kultivarů. Růst byl studován u dvou fotomorfogenních mutantů, *au^w* a *yg-2* s defekty v syntéze fytochromového chromoforu. Experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodice. Byl sledován růst rostlin ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci inhibitorů SITS (0,10, 100, 200, 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo NPPB (0, 20, 40, 100, 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) přidaných do kultivačního média. Po sedmi dnech byl zaznamenán růst kořene a hypokotylu rostlin a vypočítána inhibice růstu.

4.1 Vliv inhibitoru SITS na růst mutantu *au^w*

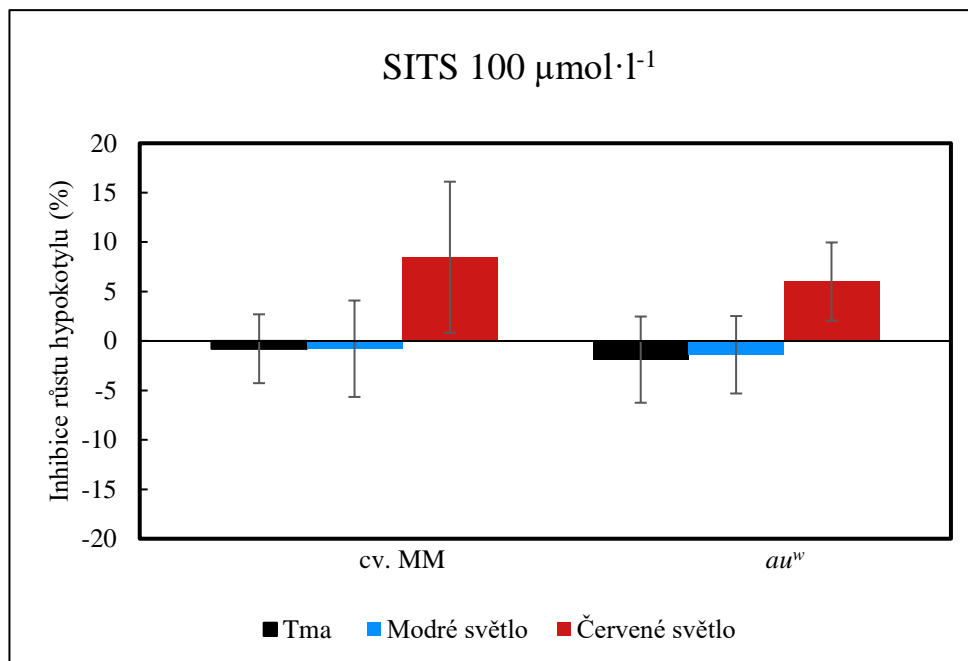
Klíčící semena genotypu *au^w* a kontrolního genotypu cv. MM rajčete jedlého byla pěstována na MS médiu s koncentrací inhibitoru SITS 0, 10, 100, 200 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v různých světlených podmínkách. Naměřené hodnoty délek hypokotylu po 7 dnech růstu rostlin byly vyneseny do grafů na obr. 10. Etiolované hypokotylы rostlin cv. MM na médiu bez přítomnosti inhibitoru SITS dosahovaly v průměrné délky 118,2 mm a byly výrazně delší než hypokotylы rostlin rostoucích na modrém světle (64 % inhibice růstu) a na červeném světle (51 % inhibice růstu). Etiolované hypokotylы mutantu *au^w* byly na základním médiu také delší než hypokotylы mutantních rostlin pěstovaných na modrém a červeném světle. Na modrém světle došlo k 34 % inhibici růstu hypokotylů a na červeném světle pouze k 6 % inhibici růstu oproti etiolovaným hypokotylům.

Z grafů na obr. 10 vyplývá, že inhibitor SITS při všech testovaných koncentracích neměl výrazný vliv na stimulaci či inhibici prodloužení hypokotylů, a to podobně u obou genotypů nezávisle na světelných podmínkách.



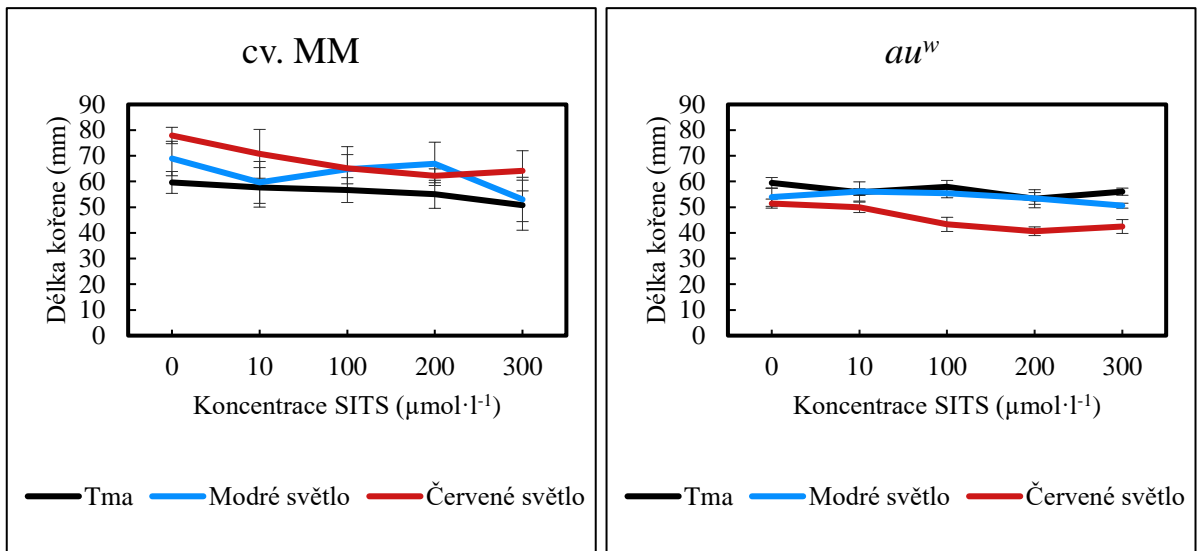
Obr. 10: Grafy závislosti délky hypokotylů cv. MM a genotypu *au*^w na koncentraci SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 7 (0, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 6 (200 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$), 5 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo 4 nezávislých experimentů (300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$).

Pro porovnání inhibice růstu hypokotylu genotypů cv. MM a *au*^w vlivem SITS byla zvolena koncentrace 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ v kultivačním médiu z důvodu častého využití této koncentrace ve vědeckých publikacích a nejvyššího počtu nezávislých experimentů. Rozdíly v růstu rostlin byly vyjádřeny jako relativní inhibice růstu (Obr. 11). Růst hypokotylu cv. MM byl na červeném světle inhibován vlivem SITS asi o 9 %. Mutant *au*^w vykazoval na červeném světle mírně nižší inhibici růstu než cv. MM (6 % inhibice). Úroveň inhibice růstu etiolovaných hypokotylů a hypokotylů na modrém světle byla prakticky nulová a mezi genotypy se výrazně nelišila.



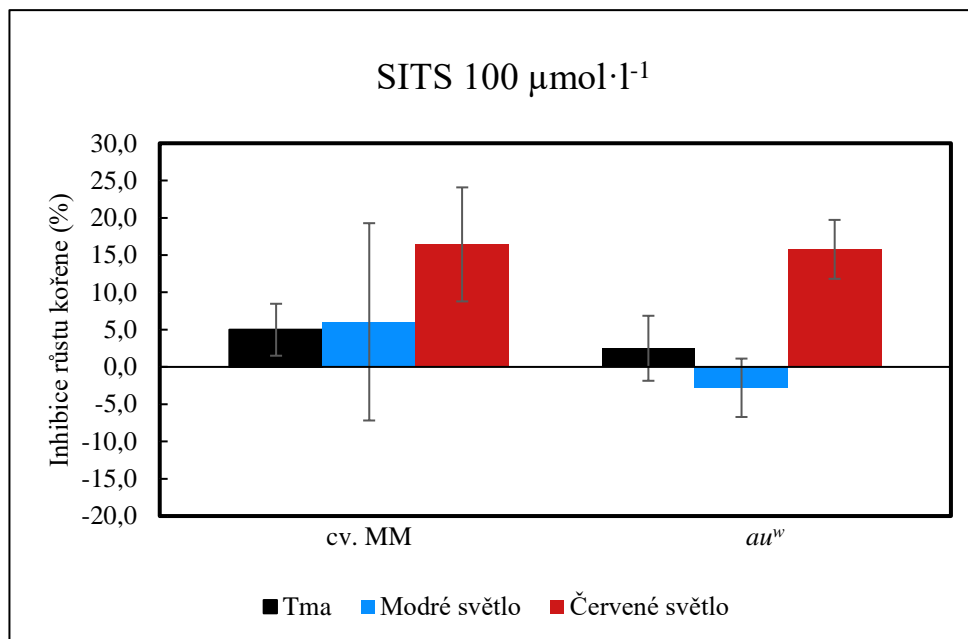
Obr. 11: Graf průměrné inhibice růstu hypokotyly cv. MM a genotypu *au^w* při koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotyly a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 7 nezávislých experimentů.

Naměřené hodnoty délek kořene u mutantu *au^w* a kontrolního genotypu cv. MM byly vyneseny do grafů na obr. 12. Světlo mělo u cv. MM přirozeně stimulační účinky na růst kořene. Rostliny rostoucí ve tmě bez přítomnosti inhibitoru dosahovaly průměrné délky kořene 59,6 mm, zatímco při pěstování rostlin na modrém světle kořeny dosahovaly průměrné délky 68,9 mm (16 % stimulace růstu) a na červeném 70,8 mm (31 % stimulace růstu). Mutant *au^w* se lišil ve svých růstových odezvách k modrému i červenému světlu. U mutantního genotypu *au^w* nedocházelo k stimulaci růstu kořene světlem. Rostliny pěstované ve tmě bez přídavku inhibitoru dosahovaly průměrné délky kořene 59,5 mm. U rostlin pěstovaných na červeném světle byla zjištěna 14 % inhibice růstu kořene a u rostlin pěstovaných na modrém světle byla inhibice růstu kořene 9 %. Zároveň z dat v grafu vyplynulo, že inhibitor SITS výrazně neovlivnil délku kořenu u obou genotypů.



Obr. 12: Grafy závislosti délky kořenu cv. MM a genotypu *au^w* na koncentraci SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek kořenů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 7 (0, 100 μmol·l⁻¹), 6 (200 μmol·l⁻¹), 5 (10 μmol·l⁻¹) nebo 4 nezávislých experimentů (300 μmol·l⁻¹).

Pro porovnání inhibice růstu kořene genotypů MM a *au^w* byla zvolena koncentrace stejná koncentrace SITS v kultivačním médiu jako pro porovnání inhibice růstu hypokotylu (100 μmol·l⁻¹). Rozdíly v růstu byly vyjádřeny jako relativní inhibice (Obr. 13). Inhibice růstu kořenů byla srovnatelná u obou genotypů při pěstování rostlin ve tmě a na červeném světle. Na modrém světle byla úroveň inhibice růstu kořene mutantu *au^w* nižší než inhibice růstu hypokotylů cv. MM a u kultivaru MM docházelo k mírné stimulaci růstu kořene.

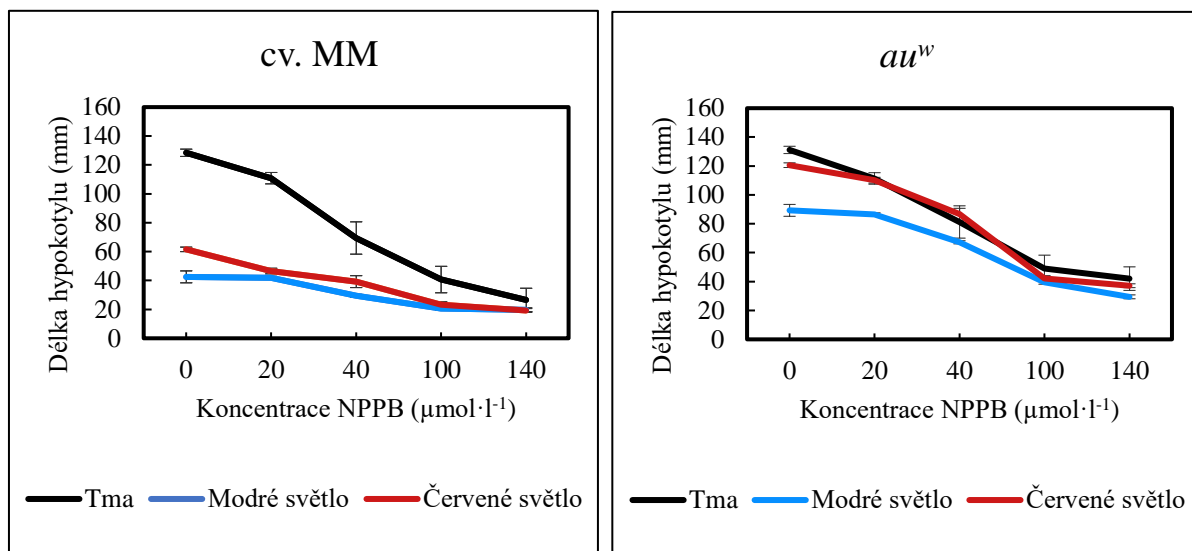


Obr. 13: Graf průměrné inhibice růstu kořene cv. MM a genotypu *au^w* při koncentraci $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafch jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu kořene a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 7 nezávislých experimentů.

4.2 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu *au^w*

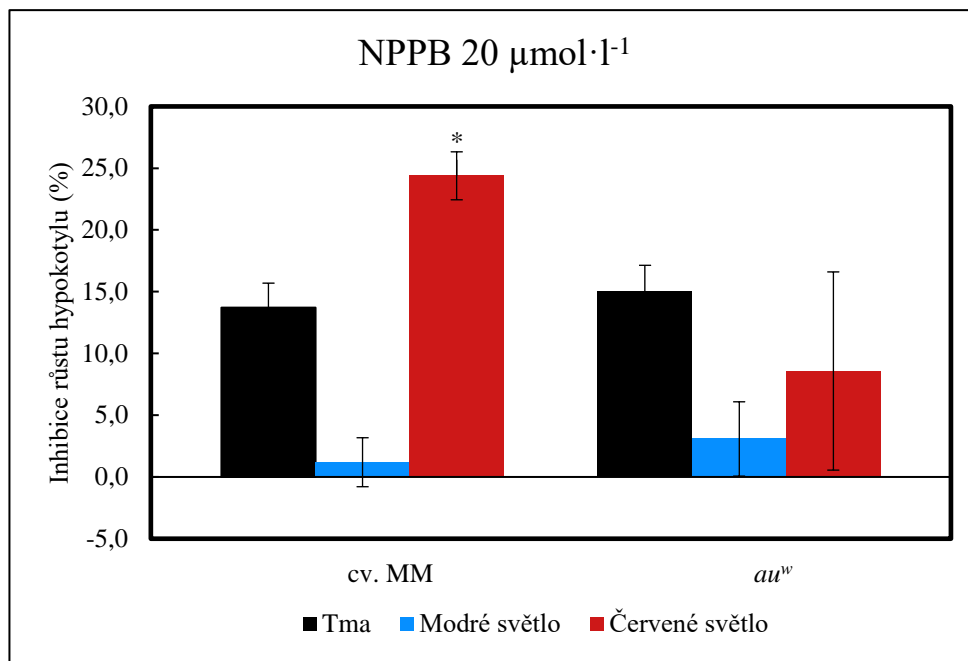
Dále bylo u mutantního genotypu *au^w* a kontrolního genotypu cv. MM testováno působení inhibitoru NPPB v koncentracích 0, 20, 40, 100 a $140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naměřené hodnoty délek hypokotyly u mutantu *au^w* a kontrolního genotypu cv. MM byly vyneseny do grafů na Obr. 14. Byl opět patrný inhibiční účinek modrého a červeného světla na délku hypokotyly u genotypu cv. MM při nulové koncentraci inhibitoru. Červené světlo inhibovalo délku hypokotyly o 52 % a modré světlo o 67 %. U mutantního genotypu byl výrazně inhibován růst hypokotyly při růstu na modrém světle (32 % inhibice), zatímco červené světlo inhibovalo růst hypokotyly méně (16 % inhibice).

Z grafů dále vyplynulo, že se zvyšující se koncentrací použitého inhibitoru NPPB v médiu byla délka hypokotyly silně redukována jak u cv. MM, tak i u mutantní rostliny *au^w*. K inhibici růstu hypokotyly došlo ve všech testovaných světelných podmínkách. Výrazná redukce růstu hypokotyly byla pozorovatelná do koncentrace $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vyšší koncentrace NPPB ($140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) zvyšovaly inhibiční účinek už pouze mírně.



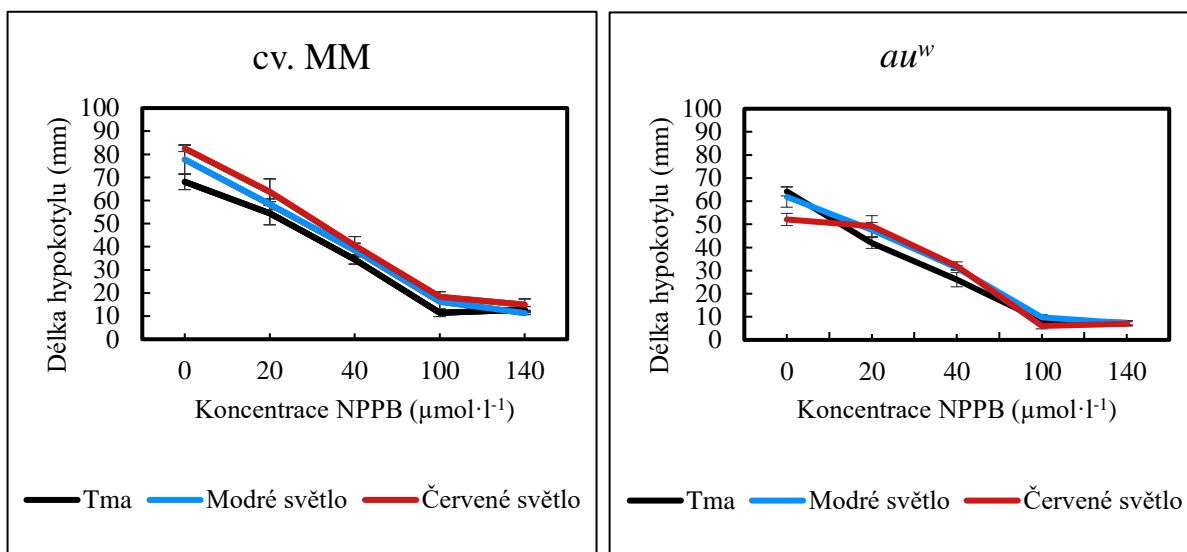
Obr. 14: Grafy závislosti délky hypokotylu cv. MM a genotypu *au*^w na koncentraci NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 (20, 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo 4 (0, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nezávislých experimentů.

Pro porovnání inhibice růstu hypokotylu genotypů cv. MM a *au*^w byla zvolena koncentrace 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Obr. 15). Z dat vyplynulo, že inhibice růstu u genotypu cv. MM a *au*^w byly podobné při pěstování rostlin ve tmě a na modrém světle. U kontrolního genotypu cv. MM inhibitor NPPB ve tmě redukoval délku hypokotylu o 14 % zatímco na modrém světle byla inhibice pouze 1 %. Na červeném světle byla inhibice růstu hypokotylu cv. MM nejvyšší (24 % inhibice) a významně se lišila od inhibice růstu cv. MM ve tmě. U mutantního genotypu byla na červeném světle relativní citlivost hypokotylů k inhibitoru NPPB nižší (9 % inhibice) v porovnání s kontrolním genotypem. Tento rozdíl však nebyl statisticky významný.



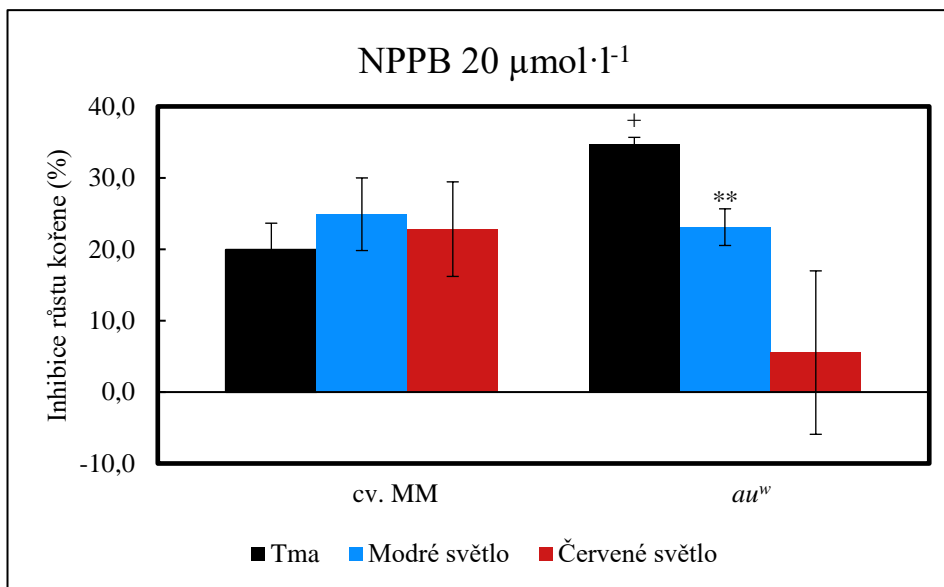
Obr. 15: Graf průměrné inhibice růstu hypokotylu cv. MM a genotypu *au^w* při koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu kořene a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi inhibicí růstu hypokotylu ve tmě a na červeném světle v rámci stejného genotypu je označen hvězdičkou (t-test, $P = 0,05$).

Závislost délky kořenů kontrolního genotypu cv. MM a mutantního genotypu *au^w* na koncentraci inhibitoru NPPB byla vynesena do grafů na obr. 16. Při absenci NPPB bylo možné u kontrolního genotypu opět pozorovat stimulaci růstu kořenu modrým a červeným světlem. Na modrém světle byl růst kořene stimulován o 14 % a na červeném světle o 21 %. Naopak u mutantního genotypu nebyla stimulace kořenu červeným ani modrým světlem při nulové koncentraci inhibitoru pozorována, a naopak docházelo k jeho inhibici. Z obr. 16 vyplývá, že se stoupající koncentrací inhibitoru NPPB docházelo k redukci růstu kořene u obou genotypů ve všech světelných podmínkách. Inhibitor NPPB o vysokých koncentracích ($100, 140 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měl podobný inhibiční účinek na růst kořene, stejně jako u hypokotylu.



Obr. 16: Grafy závislosti délky kořene cv. MM a genotypu *au^w* na koncentraci NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 (20, 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nebo 4 (0, 40, 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) nezávislých experimentů.

Pro porovnání inhibice růstu hypokotylu genotypů cv. MM a *au^w* byla zvolena koncentrace 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ SITS v kultivačním médiu, jelikož při ní byly zaznamenány nejzřetelnější rozdíly v inhibici růstu. Tyto rozdíly byly vyjádřeny jako relativní inhibice růstu (Obr. 17). U kontrolního genotypu cv. MM inhibitor NPPB způsobil srovnatelnou inhibici růstu kořene jak ve tmě, tak na červeném a modrém světle. Na rozdíl od cv. MM, u mutanta *au^w* červené světlo výrazně snižovalo citlivost kořenů k inhibičnímu účinku NPPB. Zatímco inhibice růstu kořene *au^w* ve tmě činila 35 %, na modrém světle to bylo 23 % a na červeném světle pouze 6 %. Signifikantně významný rozdíl v inhibici růstu kořene byl zjištěn mezi rostlinami cv. MM a *au^w* pěstovanými ve tmě a dále mezi rostlinami *au^w* pěstovanými ve tmě a na modrém světle (Obr. 17).

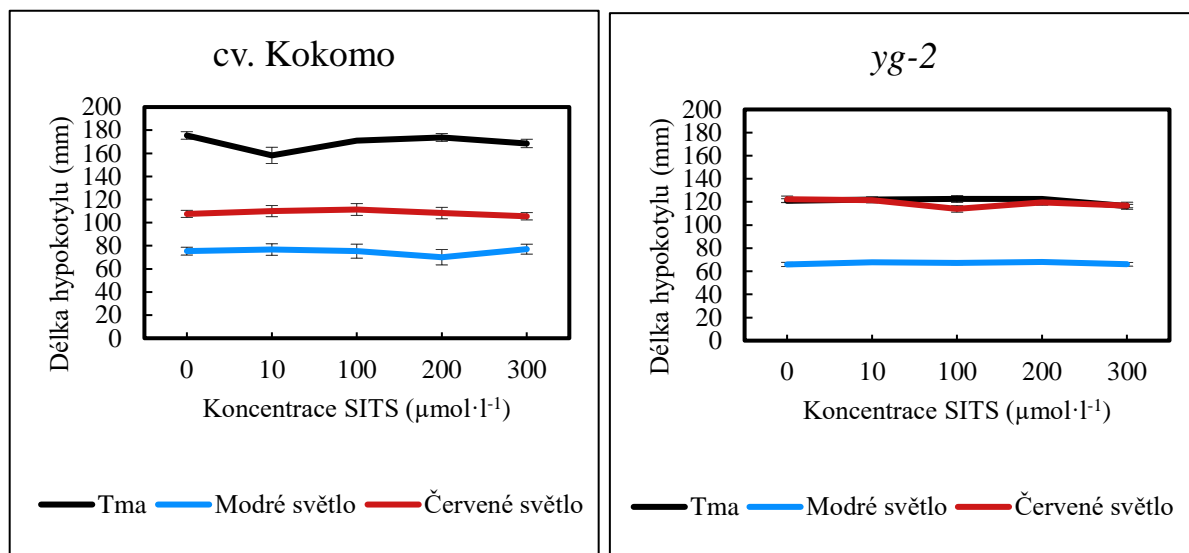


Obr. 17: Graf průměrné inhibice růstu kořene cv. MM a genotypu *au^w* při koncentraci $20 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu kořene a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi inhibicí růstu kořene ve tmě a na modrém v rámci stejného genotypu je označen 2 hvězdičkami (t-test, $P = 0,01$). Statisticky významný rozdíl mezi inhibicí hypokotylů cv. MM a *au^w* při stejných světelných podmínkách je značen plus (t-test, $P = 0,05$).

4.3 Vliv inhibitoru SITS na růst mutantu *yg-2*

Klíčící semena genotypu *yg-2* a kontrolního genotypu Kokomo rajčete jedlého byla pěstována na MS médiu s koncentrací inhibitoru SITS 0, 10, 100, 200 a $300 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naměřené hodnoty délek hypokotyly u mutantu *yg-2* a kontrolního genotypu cv. Kokomo byly vyneseny do grafů na obr. 18. U genotypu cv. Kokomo byly délky hypokotylů etiolovaných rostlin při nulové koncentraci inhibitoru výrazně větší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém světle (57 % inhibice) a na červeném světle (39 % inhibice). Mutantní genotyp *yg-2* vykazoval na základním médiu podobné růstové odezvy jako mutant *au^w*. Na červeném světle byly jeho hypokotyly protáhlé a průměrnou délkou odpovídaly etiolovaným hypokotylům. Při pěstování rostlin *yg-2* na modrém světle byly hypokotyly značně kratší (45 % inhibice). Etiolované hypokotyly *yg-2* byly zároveň o 31 % kratší při porovnání s hypokotylu kontrolního genotypu.

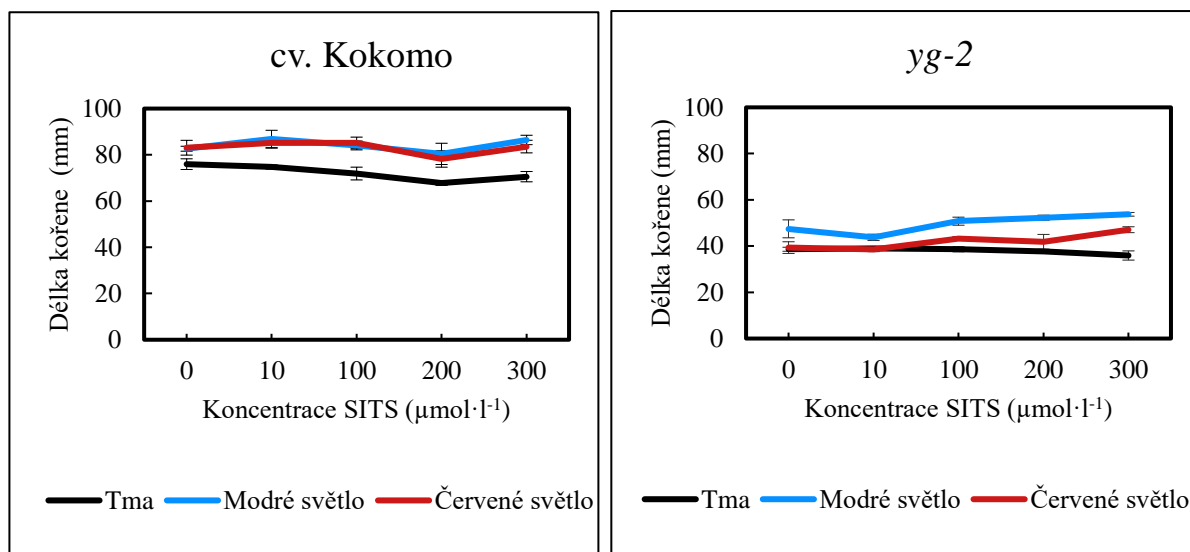
Z dat vyplynulo, že inhibitor SITS ve zvolených koncentracích výrazně neovlivnil růst hypokotylu u obou genotypů. Účinek inhibitoru nebyl pozorován ani při pěstování rostlin ve tmě, na červeném a na modrém světle.



Obr. 18: Grafy závislosti délky hypokotylu cv. Kokomo a genotypu *yg-2* na koncentraci SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů.

Závislost délky kořenů kontrolního genotypu cv. Kokomo a mutantního genotypu *yg-2* na koncentraci inhibitoru SITS je zobrazena na obr. 19. Při nulové koncentraci SITS světlo přirozeně stimulovalo růst kořene cv. Kokomo. Na modrém světle a červeném došlo k 9 % stimulaci růstu. Kořeny rostlin *yg-2* pěstovaných ve tmě byly mnohem kratší při porovnání s kontrolním genotypem. Kořeny etiolovaných rostlin *yg-2* byly stejně dlouhé jako kořeny rostlin *yg-2* pěstovaných na červeném světle. Modré světlo stimulovalo růst kořene mutantního genotypu (23 % stimulace). Touto reakcí kořenů k modrému a červenému světle se lišily rostliny *yg-2* od mutantu *au^w*, u kterého docházelo k inhibici růstu kořene na základním médiu při pěstování na modrém a červeném světle. Z dat v grafu bylo možné vyvodit, že aplikované koncentrace inhibitoru SITS neměly

výrazný vliv na inhibici růstu kořene. Úroveň inhibice růstu byla velmi nízká a mezi genotypy a světelným i podmínkami se výrazně nelišila.

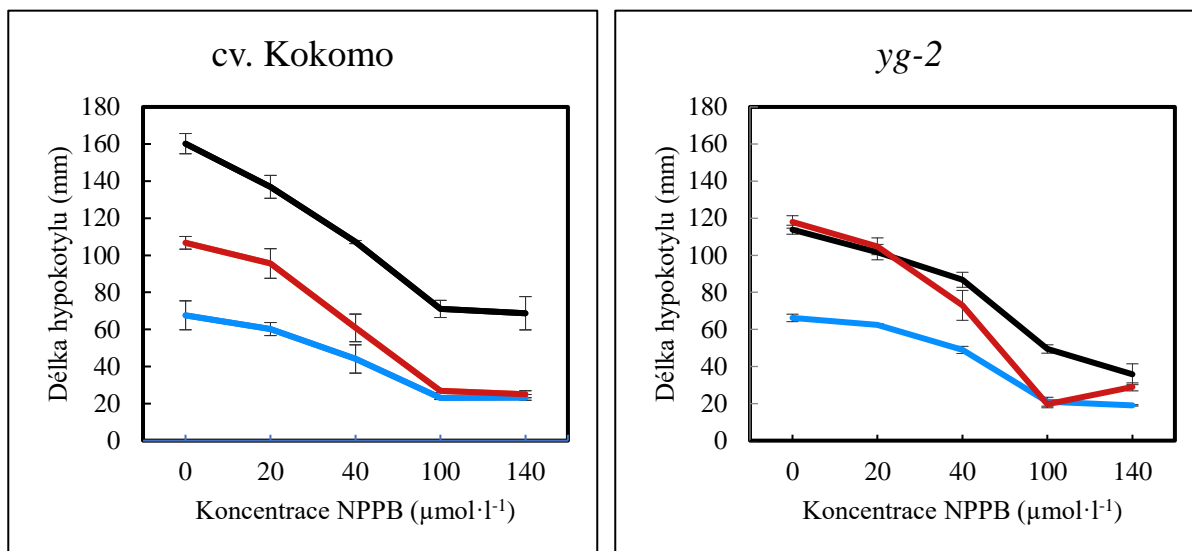


Obr. 19: Grafy závislosti délky hypokotylu cv. Kokomo a genotypu *yg-2* na koncentraci SITS v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů.

4.4 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutanta *yg-2*

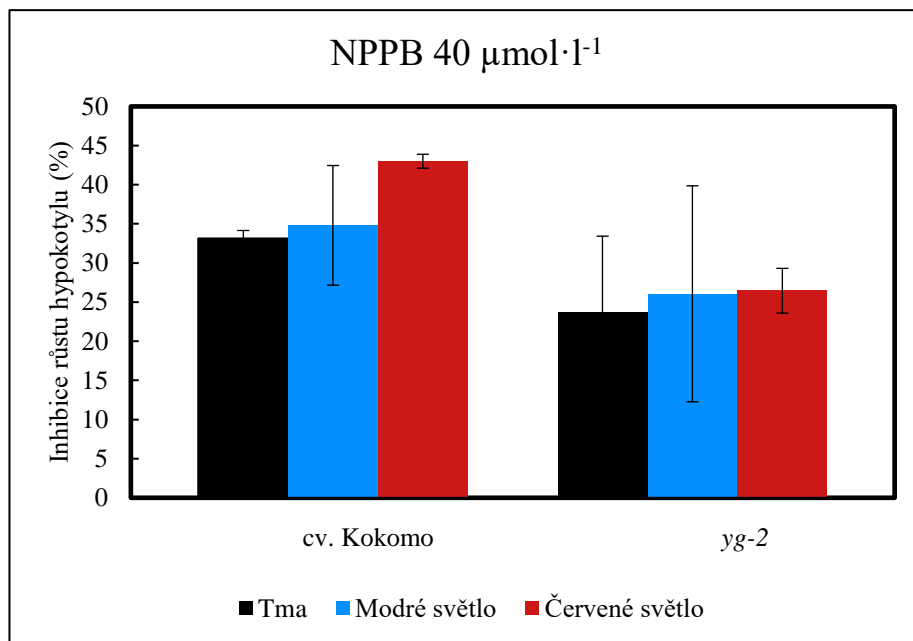
Klíčící semena genotypu *yg-2* a kontrolního genotypu cv. Kokomo rajčete jedlého byla pěstovaná na MS médiu s koncentrací inhibitoru NPPB 0, 20, 40, 100 a 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Naměřené hodnoty délek hypokotylu u mutanta *yg-2* a kontrolního genotypu cv. Kokomo jsou vyneseny v grafech na obr. 20. U kultivaru Kokomo byly hypokotyly nejdelší při pěstování ve tmě. Na modrém světle byly zkráceny asi 58 % a při pěstování na červeném světle byly kratší o 33 % než hypokotyly etiolovaných rostlin. U kultivaru *yg-2* byly hypokotyly rostlin pěstovaných ve tmě a na červeném světle srovnatelně dlouhé. Na modrém světle byly hypokotyly výrazně kratší (42 % inhibice). Z grafů lze dále vyvodit, že se vzrůstající koncentrací inhibitoru NPPB byl růst hypokotylu silně inhibovaný, a to u obou genotypů a ve všech testovaných světelných podmínkách.

Nejvyšší inhibiční účinek na růst hypokotylu byl zaznamenán při pěstování rostlin na médiu s 100 μM a 140 μM NPPB.



Obr. 20: Grafy závislosti délky hypokotylu cv. Kokomo a genotypu *yg-2* na koncentraci NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů

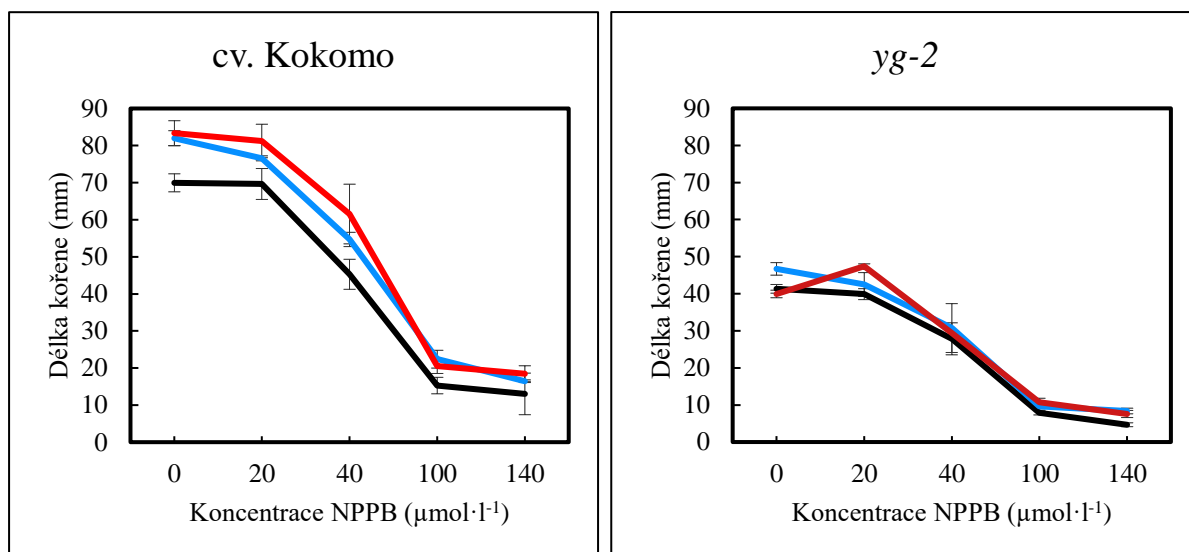
Pro porovnání inhibice růstu hypokotylu genotypů Kokomo a *yg-2* byla zvolena koncentrace 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPPB v kultivačním médiu, jelikož při ní byly zaznamenány nejznatelnější rozdíly v inhibici růstu u *yg-2*. Tyto rozdíly byly vyjádřeny jako relativní inhibice růstu (Obr. 21). Při této testované koncentraci NPPB vykazoval kontrolní genotyp vyšší inhibice růstu hypokotylu než mutantní genotyp *yg-2* a úroveň inhibice se příliš neměnila v závislosti na světelných podmínkách. U mutantního genotypu byla při všech testovaných světelných podmínkách inhibice růstu hypokotylu přibližně o 10 % nižší než u cv. Kokomo (Obr. 21). Vyšší koncentrace NPPB (100, 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) měly silnější účinek na inhibici růstu hypokotylu, ale úroveň inhibice růstu byly srovnatelné u obou genotypů a ve všech světelných podmínkách.



Obr. 21: Graf průměrné inhibice růstu hypokotylu cv. Kokomo a genotypu *yg-2* při koncentraci $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu kořene a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů.

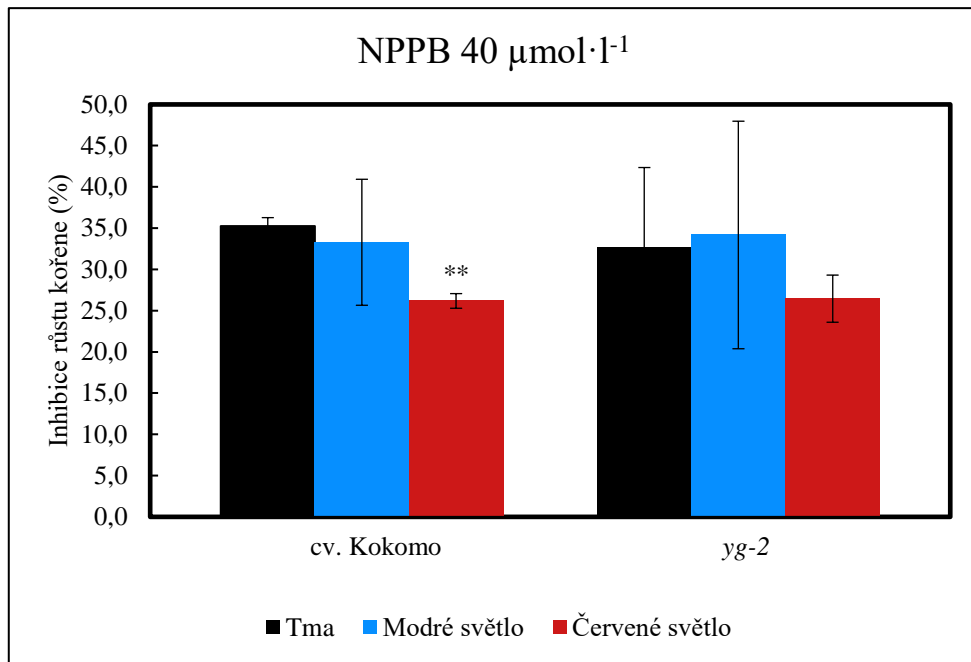
Závislost průměrné délky kořene kultivaru Kokomo a *yg-2* na koncentraci inhibitoru NPPB byla vynesena do grafů na obr. 22. Růst kořene kultivaru Kokomo byl na základním médiu stimulovaný na modrém i na červeném světle. Působením modrého světla došlo k 17 % stimulaci a působením světla červeného k 19 % stimulaci růstu. Naopak u genotypu *yg-2* byl růst kořene stimulován pouze modrým světlem (13 % stimulace). Inhibitor aplikovaný ve zvolených koncentracích výrazně redukoval délku kořene u cv. Kokomo ve všech světelných podmínkách. Nejvyšší inhibice růstu kořene cv. Kokomo a mutanta *yg-2* nastala při aplikaci inhibitoru NPPB v koncentraci

100 a 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. U genotypu *yg-2* byla na červeném světle pozorována 19 % stimulace růstu kořene při aplikaci 20 μM NPPB.



Obr. 22: Grafy závislosti délky kořene cv. Kokomo a genotypu *yg-2* na koncentraci NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty délek hypokotylů a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) ze 3 nezávislých experimentů.

Procentuální inhibice růstu kořene při koncentraci inhibitoru 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byla vynesena do grafu na obr. 23. Z grafu vyplývá, že inhibitor NPPB redukoval délku kořene jak u cv. Kokomo, tak u mutantního genotypu *yg-2*. Procentuální inhibice byly u obou kultivarů srovnatelné. U cv. Kokomo však bylo na červeném světle pozorováno signifikantní snížení inhibice růstu kořene vlivem NPPB ve srovnání s inhibicí ve tmě. Úroveň inhibice růstu kořenů *yg-2* vlivem NPPB se výrazně nelišila ve všech testovaných světelných podmínkách. Při ostatních testovaných koncentracích NPPB vykazovaly kořeny mutantu *yg-2* a cv. Kokomo podobnou citlivost k inhibičním účinkům NPPB.



Obr. 23: Graf průměrné inhibice růstu kořene cv. Kokomo a genotypu *yg-2* při koncentraci 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NPPB v kultivačním médiu. Rostliny byly po dobu 7 dní pěstovány v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). V grafech jsou vyneseny průměrné hodnoty inhibice růstu kořene a chybové úsečky znázorňující směrodatnou odchylku (SD) 3 nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi inhibicí růstu kořene ve tmě a na červeném světle v rámci stejného genotypu je označen dvěma hvězdičkami (t-test, $P = 0,01$).

5 Diskuze

V experimentální části bakalářské práce byly zkoumány růstové reakce mutantů *au^w* a *yg-2* rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v přítomnosti zvolených koncentrací inhibitorů aniontových kanálů (SITS a NPPB) a v různých světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Cílem bylo zjistit, zda aniontové kanály citlivé na testované inhibitory hrají roli v růstových procesech rostlin rajčete a zda se jejich citlivost liší v závislosti na světelných podmínkách.

Analyzovali jsme dva fotomorfogenní mutanty *aurea* (*au^w*) a *yellow green-2* (*yg-2*), abychom zjistili, zda tyto mutace ovlivňují regulaci aniontových kanálů v růstu rostlin. Mutanti *au^w* i *yg-2* mají defekt v tetrapyrrolové biosyntetické dráze vedoucí k syntéze fytochromového chromoforu. Mutant *au^w* je specificky deficientní v PΦB syntáze, zatímco fenotypově nerozlišitelný *yg-2* je blokován v předchozím kroku biosyntetické dráhy a není schopen syntetizovat biliverdin IX α z hemu. Důsledkem mutací v syntéze fytochromového chromoforu je negativně ovlivněna aktivita fytochromů a fytochromová signalizace.

5.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu *au^w*

Mutantní rostlina *au^w* vykazovala fenotypové znaky, které potvrzovaly poruchu fytochromové signalizace. Rostlina měla při pěstování na červeném světle protáhlé křehké hypokotyly a bledé zbarvení a na modrém světle vykazovala delší hypokotyly oproti kontrolnímu genotypu. Mutace *au^w* ovlivnila i růstové reakce kořene. Kořeny byly při pěstování rostlin na modrém a červeném světle kratší než kořeny rostlin rostoucích ve tmě. Růst kořene *au^w* tedy nebyl stimulován při pěstování na světle jako u kontrolního genotypu cv. MM. Ukázala se tak důležitost zapojení fytochromu v inhibici elongace hypokotyly a v prodlužování kořene na červeném i modrém světle.

Zapojení aniontových kanálů do vývoje a růstu rajčete bylo testováno použitím inhibitorů aniontových kanálů. Jak již bylo popsáno inhibitor SITS se řadí mezi deriváty stilbenu a účinně blokuje aniontové kanály typu R svěřacích buněk průduchů (White and Broadley, 2001). Tento inhibitor byl testován v koncentracích 10, 100, 200 a 300 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Výsledky pokusů prováděných na mutantu *au^w* a kontrolním genotypu

cv. MM prokázaly zanedbatelný inhibiční účinek SITS na růst kořene i hypokotyly obou genotypů.

Inhibiční účinek se neměnil v závislosti na světelných podmínkách a nebyla prokázána ani změna citlivosti mutanta *au^w* k použitému inhibitoru oproti kontrolnímu genotypu. To naznačuje, že u těchto rostlin nejsou SITS-senzitivní aniontové kanály zapojeny v růstových procesech kořene a hypokotyly rajčete. Z toho se dá usuzovat, že růst kořene a hypokotyly rajčete byl zprostředkován aniontovými kanály, které nebyly inhibovány SITS. Výsledky dále ukazují, že fytochromy pravděpodobně neovlivňují aniontové kanály citlivé k inhibitoru SITS.

Dalším testovaným inhibitorem aniontových kanálů byl NPPB v koncentracích 20, 40, 100 a 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Tento inhibitor patří mezi blokátory aniontových kanálů typu S i typu R a působí proti depolarizaci plazmatické membrány hypokotylových buněk indukované modrým světlem (Thomine *et al.*, 1997a). Analýzou růstu rostlin na médiu s inhibitorem bylo zjištěno, že k inhibici růstu kořene a hypokotyly mutanta *au^w* a cv. MM vlivem NPPB docházelo při všech testovaných koncentracích inhibitoru a ve všech světelných podmínkách. Tyto výsledky proto naznačují, že kanály citlivé k inhibitoru NPPB jsou zapojeny v růstových procesech kořenů a hypokotylů rostlin rajčete.

Při pěstování kontrolního genotypu cv. MM na médiu s 20 μM NPPB byla zaznamenána vyšší inhibice růstu hypokotyly na červeném světle oproti etiolovaným hypokotylům (signifikantní rozdíl). Naopak na modrém světle byla úroveň inhibice hypokotyly 20 μM NPPB nižší oproti hypokotylům ve tmě (nesignifikantní rozdíl). Výsledky tedy naznačují, že světlo nějakým způsobem ovlivňuje aktivitu NPPB-senzitivních kanálů v hypokotylech rajčete. Změna v citlivosti k NPPB byla pozorována i u mutantního genotypu *au^w*. Na modrém světle byla citlivost hypokotylů k NPPB nižší než ve tmě, podobně jako u cv. MM, kdežto na červeném světle byla také nižší než ve tmě, přičemž však rozdíl nebyl signifikantní. Výsledky tedy vedou k závěru, že červené světlo prostřednictvím fytochromů může zvyšovat citlivost aniontových kanálů k NPPB.

Úrovně inhibice kořene cv. MM 20 μM NPPB byly podobné při pěstování v různých světelných podmínkách. To by poukazovalo na to, že v případě kořenů světlo výrazným způsobem neovlivňuje fungování NPPB-citlivých aniontových kanálů.

Při pěstování mutovaných rostlin *au^w* ve tmě byl však růst kořenů inhibován vlivem NPPB výrazně více než růst kořenů cv. MM (signifikantní rozdíl). Citlivost kořenů *au^w* k inhibitoru NPPB byla tedy ve tmě zesílena. Je tedy zřejmé, že mutace v biosyntéze fytochromového chromoforu nějakým způsobem ovlivňuje aktivitu NPPB-citlivých aniontových kanálů v kořeni. Na rozdíl od cv. MM se citlivost kořenů *au^w* k NPPB na modrém světle (signifikantně) a na červeném světle (nesignifikantně) snížila. Z výše uvedených informací lze usoudit, že světlo prostřednictvím fytochromů má určitý vliv na aktivitu NPPB-senzitivních kanálů. Jeden z možných mechanismů je, že světlo mohlo přímo ovlivňovat samotné aniontové kanály prostřednictvím regulace genové exprese. Mohlo by například vlivem světla docházet ke zvýšení počtu NPPB-senzitivních kanálů u mutanta *au^w*. Při vyšším počtu NPPB-senzitivních aniontových kanálů by tedy bylo potřeba vyšší koncentrace NPPB, aby bylo dosaženo stejné inhibice jako u kontrolního genotypu. Důležité je rovněž brát v úvahu i možnost, že akumulace meziproductů v biosyntetické dráze fytochromového chromoforu mohla ovlivnit zkoumané parametry. A právě u mutanta *au^w* mohla akumulace biliverdinu ovlivnit jeho odezvu na světlo.

Je však třeba zmínit, že při vyšších koncentracích inhibitoru NPPB (40, 100, 140 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) vykazovaly hypokotyly i kořeny *au^w* a cv. MM podobnou citlivost k NPPB. Při vyšších koncentracích inhibitoru se tedy rozdíl mezi mutantem a kontrolním genotypem v citlivosti k NPPB na testovaných světelných podmínkách smazávaly. Při dalším studiu mechanismů vlivu fytochromů na aktivitu aniontových kanálů bude tedy nutno pracovat s nižšími koncentracemi inhibitoru NPPB.

5.2 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutanta *yg-2*

Mutant *yg-2* vykazoval stejné fenotypové znaky hypokotyly jako mutantní rostlina *au^w*. Zásadně se lišil od mutanta *au^w* v růstových odezvách kořene. V první řadě bylo pozorováno, že mutace *yg-2* vedla k výraznému zkracování kořene. Je tedy evidentní, že defekt v hem oxygenáze negativně ovlivňuje růst kořene rajčete. Růst kořene byl stejně jako u kontrolního genotypu cv. Kokomo stimulován modrým světlem, ale na rozdíl od cv. Kokomo nebyl stimulován světlem červeným. Tyto výsledky potvrzují, že poloha mutace v biosyntetické dráze fytochromového chromoforu má výrazný vliv na růstové reakce kořene.

Podobně jako u mutantu *au^w*, mutant *yg-2* byl testován pro svoji citlivost k inhibitoru SITS. Analýza růstu hypokotylu a kořene prokázala minimální vliv inhibitoru SITS na růst hypokotylu a kořene. Výsledky naznačují, že aniontové kanály citlivé k SITS nehrají pravděpodobně významnou úlohu v růstu hypokotylu a kořene rajčete. Účinek SITS zůstal neměnný při všech testovaných světelných podmínkách (červené světlo, modré světlo a tma). Tyto výsledky ukazují, že kvalita světla pravděpodobně nemění citlivost aniontových kanálů k inhibitoru SITS.

Redukce růstu kořene a hypokotylu cv. Kokomo a mutantu *yg-2* inhibitorem NPPB byla pozorována při všech testovaných koncentracích tohoto inhibitoru a za všech testovaných světelných podmínkách. Tato zjištění naznačují, že kanály citlivé k inhibitoru NPPB se účastní růstových procesů kořene a hypokotylu rajčete. Inhibice růstu kořene i hypokotylu mutantu *yg-2* byla srovnatelná s inhibicí růstu obou orgánů u cv. Kokomo, a to ve všech testovaných světelných podmínkách. Je tedy evidentní, že mutace v genu pro hem oxygenázu pravděpodobně neovlivňuje aktivitu NPPB-senzitivních aniontových kanálů. Bylo rovněž pozorováno, že modré ani červené světlo výrazně neovlivňovalo citlivost kořenů i hypokotylů k inhibitoru NPPB. Z výsledků se dá tedy usuzovat, že u cv. Kokomo a rostlin *yg-2* světlo nemělo výrazný vliv na aktivitu aniontových kanálů citlivých k NPPB při růstových reakcích kořene a hypokotylu.

6 Závěr

Experimentálním cílem této bakalářské práce byla analýza citlivosti růstových a vývojových reakcí fotomorfogenních mutantů *au^w* a *yg-2* rajčete k inhibitorům aniontových kanálů NPPB a SITS v závislosti na světelných podmínkách (tma, červené a modré světlo).

Výsledky bakalářské práce přinesly informace o tom, že SITS-senzitivní kanály nejsou pravděpodobně zapojeny ve vývoji a růstu rajčete a nejsou regulovány aktivitou fytochromů. Naopak bylo prokázáno, že kanály citlivé na inhibitor NPPB by mohly být v růstu rajčete pozitivně zapojeny. U kontrolního genotypu cv. MM byl pozorován různý inhibiční účinek NPPB v závislosti na světelných podmínkách. Světlo tedy určitým způsobem ovlivňovalo aktivitu těchto aniontových kanálů. Analýzou růstu hypokotylů mutantu *au^w* bylo zjištěno, že na červeném světle dochází k snížení citlivosti k inhibitoru NPPB oproti kontrolnímu genotypu. Na základě těchto zjištění lze předpokládat, že světlo prostřednictvím fytochromu má vliv na aktivitu aniontových kanálů hypokotylu citlivých k NPPB. U kořene cv. MM inhibiční účinek NPPB světlem ovlivněn nebyl. U mutantu *au^w* aplikace inhibitoru vedla k výraznému snížení citlivosti kořene k NPPB v přítomnosti červeného světla a ke zvýšení citlivosti ve tmě oproti kontrolnímu genotypu. Lze tedy usuzovat, že v případě kořene mutace v pozdním kroku biosyntézy fytochromového chromoforu vedla k ovlivnění NPPB-senzitivních aniontových kanálů. U mutantu *yg-2* byla pozorovaná srovnatelná inhibice růstu obou orgánů vlivem NPPB s kontrolním genotypem a světlo výrazně neměnilo tento inhibiční účinek. Je tedy evidentní, že NPPB-senzitivní kanály jsou v růstu zapojeny, ale mutace v genu pro hem oxygenázu mutantu *yg-2* pravděpodobně neovlivňuje jejich aktivitu. To nasvědčuje tomu, že gen pro fytochromobilin syntázu (a jeho produkt) pravděpodobně hraje roli v regulaci aniontových kanálů na červeném světle.

S ohledem na zajímavé výsledky při použití 20 μ M NPPB by bylo vhodné provést rozšiřující experimenty s menším koncentračním rozsahem inhibitoru. Dále by pro širší pochopení studovaných mechanismů mohly být využity další inhibitory aniontových kanálů nebo případně i další mutantní rostliny s defekty ve fytochROMEch. Pro určení, které konkrétní aniontové kanály jsou v růstu rajčete inhibovány vlivem NPPB, by bylo nutno provést molekulárně genetické studie.

Citovaná literatura

- Abdellatif IMY, Yuan S, Na R, Yoshihara S, Hamada H, Suzaki T, Ezura H, Miura K. (2022). Functional Characterization of Tomato Phytochrome A and B1B2 Mutants in Response to Heat Stress. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(3): 1681 doi: 10.3390/ijms23031681
- Adamowski M, Friml J. (2015). PIN-Dependent Auxin Transport: Action, Regulation, and Evolution. *The Plant Cell*, 27(1): 20–32. doi: 10.1105/tpc.114.134874
- de Angeli A, Thomine S, Frachisse JM, Ephritikhine G, Gambale F, Barbier-Brygoo H. (2007). Anion Channels and Transporters in Plant Cell Membranes. *FEBS Letters*, 581(12): 2367–2374. doi:10.1016/j.febslet.2007.04.003
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse JM, Maurel C. (2000). Anion Channels in Higher Plants: Functional Characterization, Molecular Structure and Physiological Role. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1–2): 199–218. doi: 10.1016/S0005-2736(00)00139-5
- BingJie Z, JinDong Y, Piao Y, Juan Z, XinMei Z, XiaoYing Z. (2019). Progress of Function Studies of ZTL/FKF1/LKP2 Proteins Family in Arabidopsis. *Chinese Journal of Bioinformatics*, 17(3): 145–150. doi: 10.12113/j.issn.1672-5565.201901003
- Briggs W, Christie J. (2002). Phototropins 1 and 2: Versatile Plant Blue-light Receptors. *Trends in Plant Science*, 7 (5): 204–10. doi: 10.1016/S1360-1385(02)02245-8
- Briggs WR, Olney MA. (2001). Photoreceptors in Plant Photomorphogenesis to Date. Five Phytochromes, Two Cryptochromes, One Phototropin, and One Superchrome. *Plant Physiology*, 125(1): 85–88. doi: 10.1104/pp.125.1.85
- Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. (2015). *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd ed., Wiley Blackwell. ISBN 9780470714218
- Campbell NA. (2015). *Biology: A Global Approach*. 10th ed., Pearson. ISBN 9781292008653
- Cashmore AR, Jarillo JA, Wu Y, Liu D. (1999). Cryptochromes: Blue Light Receptors for Plants and Animals. *Science*, 284(5415): 760–765. doi: 10.1126/science.284.5415.760
- Christie JM, Blackwood L, Petersen J, Sullivan S. (2015). Plant Flavoprotein Photoreceptors. *Plant & Cell Physiology*, 56(3): 401–413. doi: 10.1093/pcp/pcu196
- Cosgrove D. J. (1981). Rapid Suppression of Growth by Blue Light. *Plant Physiology*, 67(3): 584–590. doi: 10.1104/pp.67.3.584

Diatloff E, Peyronnet R, Colcombet J, Thomine S, Barbier-Brygoo H, Frachisse JM. (2010). R Type Anion Channel, *Plant Signaling & Behavior*, 5(11): 1347–1352. doi: 10.4161/psb.5.11.12921

Elzenga JTM, Van Volkenburgh E. (1997). Characterization of a Light-Controlled Anion Channel in the Plasma Membrane of Mesophyll Cells of Pea. *Plant Physiology*, 113 (4): 1419-1426. doi: 10.1104/pp.113.4.1419

Facella P, Lopez L, Chiappetta A, Bitonti MB, Giuliano G, Perrotta G. (2006). CRY-DASH Gene Expression is under the Control of the Circadian Clock Machinery in Tomato. *FEBS Letters*, 580(19): 4618–4624. doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.044

Fantini E, Sulli M, Zhang L, Aprea G, Jiménez-Gómez JM, Bendahmane A, Perrotta G, Giuliano G, Facella P. (2019). Pivotal Roles of Cryptochromes 1a and 2 in Tomato Development and Physiology. *Plant Physiology*, 179(2): 732–748. doi:10.1104/pp.18.00793

Folta KM, Spalding EP. Unexpected Roles for Cryptochrome 2 and Phototropin Revealed by High-resolution Analysis of Blue Light-mediated Hypocotyl Growth Inhibition. *The Plant Journal* 26(5):471-8. doi: 10.1046/j.1365-313x.2001.01038.x

Franklin KA, Quail PH. (2010). Phytochrome Functions in Arabidopsis Development. *Journal of Experimental Botany*, 61(1): 11–24. doi: 10.1093/jxb/erp304

Hlavinka J, Nauš J, Fellner M. (2013). Spontaneous Mutation *7B-1* in Tomato Impairs Blue Light-induced Stomatal Opening. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 209: 75–80. doi: 10.1016/j.plantsci.2013.04.010

Hoang QTN, Han YJ, Kim JI. (2019). Plant Phytochromes and their Phosphorylation. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(14): 3450. doi: 10.3390/ijms20143450.

Inoue S, Takemiya A, Shimazaki K. (2010). Phototropin Signaling and Stomatal Opening as a Model Case. *Current Opinion in Plant Biology*, 13(5): 587–593. doi: 10.1016/j.pbi.2010.09.002

Ito, S., Song, Y.H. and Imaizumi, T. (2012) ‘LOV Domain-Containing F-Box Proteins: Light-Dependent Protein Degradation Modules in Arabidopsis’, *Molecular Plant*, 5(3), pp. 47–56. Available at: <https://doi.org/10.1093/mp/sss013>

Josse EM, Halliday KJ. (2008). Skotomorphogenesis: The Dark Side of Light Signalling. *Current Biology*, 18(24): 1144–1146. doi: 10.1016/j.cub.2008.10.034

Kaur A, Madhu, Upadhyay SK. (2021) Mechanosensitive Ion Channels in Plants. Calcium Transport Elements in Plants, (Editor Upadhyay SK; 1st ed.). Academic Press, 267-279. doi: 10.1016/B978-0-12-821792-4.00005-9

Klose C, Nagy F, Schäfer E. (2020). Thermal Reversion of Plant Phytochromes, *Molecular Plant*, 13(3): 386–397. doi: 10.1016/j.molp.2019.12.004

Lack A, Evans D. (2005). Plant Biology. 2nd ed., Taylor & Francis. ISBN 0415356431

- Lee HJ, Park YJ, Ha JH, Baldwin IT, Park CM. (2017). Multiple Routes of Light Signaling During Root Photomorphogenesis. *Trends in Plant Science*, 22(9): 803–812. doi: 10.1016/j.tplants.2017.06.009
- Lin C, Todo T. (2005). The Cryptochromes, *Genome Biology*: 6(5): 220. doi: 10.1186/gb-2005-6-5-220
- Liu H, Liu B, Zhao C, Pepper M, Lin C. (2011). The Action Mechanisms of Plant Cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16(12): 684–691. doi: 10.1016/j.tplants.2011.09.002
- Marmagne A, Vinauger-Douard M, Monachello D, de Longevialle AF, Charon C, Allot M, Rappaport F, Wollman FA, Barbier-Brygoo H, Ephritikhine G. (2007). Two Members of the Arabidopsis CLC (Chloride Channel) Family, AtCLCe and AtCLCf, are Associated with Thylakoid and Golgi Membranes, Respectively. *Journal of Experimental Botany*, 58(12): 3385–3393. doi: 10.1093/jxb/erm187
- Marten H, Hedrich R, Roelfsema MRG. (2007). Blue Light Inhibits Guard Cell Plasma Membrane Anion Channels in a Phototropin-Dependent Manner. *The Plant Journal*, 50(1): 29–39. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2006.03026.x
- Marten I, Deeken R, Hedrich R, Roelfsema MRG. (2010). Light-induced Modification of Plant Plasma Membrane Ion Transport. *Plant Biology*, 12(1): 64–79. doi: 10.1111/j.1438-8677.2010.00384.x
- Matthews JSA, Vialet-Chabrand S, Lawson T. (2020). Role of Blue and Red Light in Stomatal Dynamic Behaviour. *Journal of Experimental Botany*, 71(7): 2253–2269. doi: 10.1093/jxb/erz563
- Mo F, Xue X, Meng L, Zhang Y, Cui Y, Liu J, Cheng M, Wang P, Lv R, Meng F, Qi H, Qiu Y, Wang A. (2023). Genome-wide Identification and Expression Analysis of SLAC1 Gene Family in Tomato (*Solanum Lycopersicum*) and the Function of SLSLAC1–6 Under Cold Stress. *Scientia Horticulturae*, 313: 111904. doi: 10.1016/j.scienta.2023.111904
- Murashige T, Skoog F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473–497. doi: 10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x
- Nedelyaeva O, Shuvalov A, Balnokin Y. (2020). Chloride Channels and Transporters of the CLC Family in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 67: 767–784. doi: 10.1134/S1021443720050106
- Procopio M, Link J, Eagle D, Witczak J, Ritz T, Ahmad M. (2016). Kinetic Modeling of the Arabidopsis Cryptochrome Photocycle: FADH Accumulation Correlates with Biological Activity, *Frontiers in Plant Science*, 7: 888. doi: 10.3389/fpls.2016.00888
- Roberts SK. (2006). Plasma Membrane Anion Channels in Higher Plants and their Putative Functions in Roots. *New Phytologist*, 169(4): 647–666. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01639.x

- Roelfsema MRG, Hedrich R. (2005). In the Light of Stomatal Opening: New Insights into “The Watergate”. *New Phytologist*, 167(3): 665–691. doi: 10.1111/j.1469-8137.2005.01460.x
- Rredhi A, Petersen J, Schubert M, Li W, Oldemeyer S, Li W, Westermann VW, Kottke T, Mittag M. (2021). DASH Cryptochrome 1, a UV-A Receptor, Balances the Photosynthetic Machinery of *Chlamydomonas Reinhardtii*. *New Phytologist*, 232(2): 610–624. doi: 10.1111/nph.17603
- Ryberg M, Terry MJ. (2002). Analysis of Protochlorophyllide Reaccumulation in the Phytochrome Chromophore-deficient Aurea and Yg-2 Mutants of Tomato by in Vivo Fluorescence Spectroscopy. *Photosynthesis Research*, 74(2): 195–203. doi: 10.1023/A:1020911727791
- Salomon M, Christie JM, Knieb E, Lempert U, Briggs WR. (2000). Photochemical and Mutational Analysis of the FMN-Binding Domains of the Plant Blue Light Receptor, Phototropin. *Biochemistry*, 39(31): 9401–9410. doi: 10.1021/bi000585
- Sasaki T, Ariyoshi M, Yamamoto Y, Mori IC. (2022). Functional Roles of ALMT-type Anion Channels in Malate-induced Stomatal Closure in Tomato and Arabidopsis. *Plant, Cell & Environment*, 45(8): 2337–2350. doi: 10.1111/pce.14373
- Schroeder JI, Schmidt C, Sheaffer J. (1993). Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *The Plant Cell*, 5(12): 1831–1841. doi: 10.1105/tpc.5.12.1831
- Schwartz A, Ilan N, Schwarz M, Scheaffer J, Assmann SM, Schroeder JI. (1995). Anion-Channel Blockers Inhibit S-Type Anion Channels and Abscisic Acid Responses in Guard Cells. *Plant Physiology*, 109(2): 651–658. doi: 10.1104/pp.109.2.651
- Sharma S, Kharshiing E, Srinivas A, Zikihara K, Tokutomi S, Nagatani A, Fukayama H, Bodanapu R, Behera RK, Sreelakshmi Y, Sharma R. (2014). A Dominant Mutation in the Light-Oxygen and Voltage2 Domain Vicinity Impairs Phototropin1 Signaling in Tomato. *Plant Physiology*, 164(4): 2030–2044. doi: 10.1104/pp.113.232306
- Smith AM, Coupland G, Dolan L, Harberd N, Jones J, Martin C, Sablowski R, Amey A. (2010). *Plant Biology*. Garland Science. ISBN 9780815340256
- Spalding EP. (2000). Ion Channels and the Transduction of Light Signals. *Plant, Cell and Environment*, 23: 665-674. doi: 10.1046/j.1365-3040.2000.00594.x
- Srivastava LM. (2002). Photoperception and Signaling (chapter 26). *Plant Growth and Development. Hormones and Environment* (Editor: Srivastava LM; 1st ed.). Academic Press, 665–716. doi:10.1016/B978-012660570-9/50170-2
- Sullivan S, Thomson CE, Lamont DJ, Jones MA, Christie JM. (2008). In Vivo Phosphorylation Site Mapping and Functional Characterization of Arabidopsis Phototropin 1. *Molecular Plant*, 1(1): 178–194. doi: 10.1093/mp/ssm017

Taiz L, Zeiger E. (2002). *Plant Physiology*, 3rd ed., Sunderland, Sinauer Associates. ISBN 0878938230

Tavares B, Domingos P, Dias PN, Feijo 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(7): 2273–2298. doi: 10.1093/jxb/err036

Terry MJ. (1997). Phytochrome Chromophore-deficient Mutants. *Plant, Cell & Environment*, 20(6):740–745. doi: 10.1046/j.1365-3040.1997.d01-102.x

Terry MJ, Kendrick RE. (1996). The Aurea and Yellow-green-2 Mutants of Tomato are Deficient in Phytochrome Chromophore Synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271(35): 21681–21686. doi: 10.1074/jbc.271.35.21681

Terry MJ, Kendrick RE (1999). Feedback Inhibition of Chlorophyll Synthesis in the Phytochrome Chromophore-Deficient Aurea and Yellow-green-2 Mutants of Tomato, *Plant Physiology*, 119(1): 143–152. doi: 10.1104/pp.119.1.143

Terry MJ, McDowell MT, Lagarias JC. (1995). (3Z)- and (3E)-Phytochromobilin are Intermediates in the Biosynthesis of the Phytochrome Chromophore. *Journal of Biological Chemistry*, 270(19): 11111–11118. doi: 10.1074/jbc.270.19.11111

Thomine S, Lelievre F, Boufflet M, Guern J, Barbier-Brygoo H. (1997a). Anion-channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-grown Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Physiology*, 115(2): 533–542. doi: 10.1104/pp.115.2.533

Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H. (1997b). Voltage-Dependent Anion Channel of Arabidopsis Hypocotyls: Nucleotide Regulation and Pharmacological Properties. *The Journal of Membrane Biology*, 159(1): 71–82. doi: 10.1007/s002329900270

Wang C, Zhang J, Wu J, Brodsky DE, Schroeder JI. (2018). Cytosolic Malate and Oxaloacetate Activate S-type Anion Channels in Arabidopsis Guard Cells. *New Phytologist*, 220(1): 178–186. doi: 10.1111/nph.15292

Wang Q, Lin C. (2020). Mechanisms of Cryptochrome-Mediated Photoresponses in Plants. *Annual Review of Plant Biology*, 71: 03–129. doi: 10.1146/annurev-arplant-050718-100300

Wang X, Iino M. (1998). Interaction of Cryptochrome 1, Phytochrome, and Ion Fluxes in Blue-Light-Induced Shrinking Of Arabidopsis Hypocotyl Protoplasts. *Plant Physiology*, 117: 1265–1279. doi: 10.1104/pp.117.4.1265

Wei P, Che B, Shen L, Cui Y, Wu S, Cheng C, Liu F, Li MW, Yu B, Lam HM. (2019). Identification and Functional Characterization of the Chloride Channel Gene, GsCLC-c2 From Wild Soybean. *BMC Plant Biology*, 19(1): 121. doi: 10.1186/s12870-019-1732-z

White PJ, Broadley MR. (2001). Chloride in Soils and its Uptake and Movement Within the Plant: A Review. *Annals of Botany*, 88(6): 967–988. doi: 10.1006/anbo.2001.1540

- Yadav A, Singh D, Lingwan M, Yadukrishnan P, Masakapalli SK, Datta S. (2020). Light Signaling and UV-B-mediated Plant Growth Regulation. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62(9):1270–1292. doi: 10.1111/jipb.12932
- Yang J, Li C, Kong D, Guo F, Wei H. (2020). Light-Mediated Signaling and Metabolic Changes Coordinate Stomatal Opening and Closure. *Frontiers in Plant Science*, 11: 601478. doi: 10.3389/fpls.2020.601478
- Yang Z, Liu B, Su J, Liao J, Lin C, Oka Y. (2017). Cryptochromes Orchestrate Transcription Regulation of Diverse Blue Light Responses in Plants. *Photochemistry and Photobiology*, 93(1): 112–127. doi: 10.1111/php.12663
- Yu X, Liu H, Klejnot J, Lin C. (2010). The Cryptochrome Blue Light Receptors. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, 8: tab.0135. doi: 10.1199
- Zhang H, Jin J, Xu G, Li Z, Zhai N, Zheng Q, Lv H, Liu P, Jin L, Chen Q, Cao P, Zhou H. (2021). Reconstruction of the Full-length Transcriptome of Cigar Tobacco Without a Reference Genome and Characterization of Anion Channel/transporter Transcripts. *BMC Plant Biology*, 21. doi: 10.1186/s12870-021-03091-6
- Zoltowski, BD, Imaizumi, T. (2014). Structure and Function of the ZTL/FKF1/LKP2 Group Proteins in Arabidopsis. *The Enzymes*, 35: 213–239. doi: 10.1016/B978-0-12-801922-1.00009-9