

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA  
KATEDRA BUNĚČNÉ BIOLOGIE A GENETIKY

# **Úloha světelných signálních drah v aktivitě iontových kanálů**

Diplomová práce

Autor:	Jana Balarynová
Studijní program, studijní obor:	Biologie, Botanika
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	5.8.2010

Prohlašuji, že jsem zadanou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s použitím citované literatury.

V Olomouci dne 5.8.2010

## **Poděkování**

Mé poděkování patří především vedoucímu práce Doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za všechen čas, podporu a cenné rady, které mi poskytl během práce na diplomové práci. Ráda bych také poděkovala celé Laboratoři molekulární fyziologie na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci, která mi umožnila zadanou práci vypracovat.

## BIBLIOGRAFICKÁ IDENTIFIKACE

Jméno a příjmení autora: Jana Balarynová  
Název práce: Úloha světelných signálních drah v aktivitě iontových kanálů.  
Typ práce: Diplomová práce  
Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky PřF UP  
Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  
Rok obhajoby práce: 2010

### Abstrakt:

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů prostředí působících na rostlinu. Je známo, že modrým světlem indukované aniontové kanály jsou zapojeny v růstu hypokotylu kontrolovaném modrým světlem, ale doposud není nic známo o zapojení těchto kanálů v klíčení semen. Cílem diplomové práce bylo studovat možné mechanismy, kterými jsou iontové kanály zapojeny v klíčení semen. Pokusy byly prováděny na semenech rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Použiti byli následující mutanti a k nim odpovídající kontrolní rostliny (WT): mutant *7B-1* (WT cv. Rutgers) a mutanti v kryptochromu1 (CRY1) *cry1-1* a *cry1-2* (WT cv. Moneymaker). Sledován byl vliv rostoucí koncentrace inhibitoru aniontových (9-AC, NPPB) či draselných kanálů (tolbutamid) a kvality světla (tma, modré světlo, červené světlo) na klíčení semen. Výsledky experimentů potvrdily, že modré světlo (BL) je schopno inhibovat klíčení semen rajčete a naznačují, že protein 7B-1 funguje jako negativní regulátor klíčení na BL. Důležitým zjištěním bylo, že funkční fotoreceptor CRY1 není nezbytný pro klíčení semen rajčete a že BL nutné k inhibici klíčení není přijímáno tímto fotoreceptorem. Ukázalo se, že pro klíčení semen rajčete na BL a RL (červené světlo) jsou důležité aniontové kanály citlivé k 9-AC a NPPB a draselné kanály citlivé k tolbutamidu.

Klíčová slova: klíčení, rajče, iontové kanály, světlo, *7B-1*, CRY1  
Počet stran: 55  
Počet příloh: 0  
Jazyk: Čeština

## BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Autor's first name and surname : Jana Balarynová  
Title: Role of light signalling pathways in the activity of ion channels  
Type of thesis: Master thesis  
Department: Department of Cell Biology and Genetics, Palacký University, Olomouc  
Supervisor: Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  
The year of presentation: 2010

### Abstract:

Light is one of the most important environmental factors. It's know, that BL-induced anion channels are involved in BL-controlled hypocotyl growth, but nothing is know about activity of these channels during seed germination. Aim of this thesis was to study possible mechanisms of involvement of ion channels in seed germination. Experiments were conducted with tomato seeds (*Solanum lycopersicum* L.). The following tomato mutants and their corresponding WT's were used: *7B-1* mutant (WT cv. Rutgers) and *cry1-1* and *cry1-2* mutants in cryptochrome1 (CRY1) (WT cv. Moneymaker). The effect of increasing concentration of anion channel blockers (9-AC, NPPB) or inhibitor of potassium channel (tolbutamide) and light quality (dark, blue light, red light) on seed germination were observed. The results confirmed, that blue light is able to inhibit the germination of tomato seeds and they suggest that 7B-1 protein serves as a negative regulator of germination in BL. Important finding was that functional photoreceptor CRY1 is not required for tomato seed germination and that CRY1 doesn't serve as BL receptor during BL-induced inhibition of seed germination. It also shows that NPPB-sensitive and 9-AC-sensitive anion channels and tolbutamide-sensitive K<sup>+</sup> channels are required for tomato seed germination in BL and RL.

Keywords: germination, tomato, ion channels, light, *7B-1*, CRY1  
Number of pages: 55  
Number of appendices: 0  
Language: Czech

# OBSAH

<b>SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK .....</b>	<b>7</b>
<b>1 ÚVOD.....</b>	<b>9</b>
<b>2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>10</b>
2.1 Klíčení.....	10
2.2 TRANSPORT PŘES MEMBRÁNY .....	14
2.2.1 <i>Funkce iontových kanálů</i> .....	15
2.2.2 <i>Aniontové kanály</i> .....	15
2.2.3 <i>CLC proteiny</i> .....	17
2.2.4 <i>Iontové kanály a světelné signály</i> .....	18
2.2.5 <i>Vliv modrého světla na aniontové kanály zapojené v klíčení</i> .....	19
2.3 VLIV SVĚTLA NA RŮST A VÝVOJ ROSTLIN .....	20
2.3.1 <i>Fytochromy</i> .....	22
2.3.2 <i>Kryptochromy</i> .....	24
2.3.3 <i>Fototropiny</i> .....	26
<b>3 MATERIÁL A METODIKA .....</b>	<b>28</b>
3.1 PROVÁDĚNÉ POKUSY .....	28
3.2 ROSTLINNÝ MATERIÁL .....	28
3.3 PŘÍPRAVA MS MÉDIA .....	29
3.4 STERILIZACE SEMEN .....	29
3.5 KULTIVACE SEMEN .....	29
3.6 SČÍTÁNÍ KLÍČÍCÍCH SEMEN A VÝPOČTY .....	30
<b>4 VÝSLEDKY.....</b>	<b>32</b>
4.1 KLÍČENÍ SEMEN MUTANTA RAJČETE 7B-1 A CV. RUTGERS .....	32
4.2 KLÍČENÍ SEMEN MUTANTŮ RAJČETE CRY1-1 A CRY1-2 A CV. MM.....	35
4.2.1 <i>Klíčení semen mutantů cry1-1 a cry1-2 a cv. MM v přítomnosti 9-AC</i> .....	35
4.2.2 <i>Klíčení semen mutantů cry1-1 a cry1-2 a cv. MM v přítomnosti NPPB</i> .....	38
4.2.3 <i>Klíčení semen mutantů cry1-1 a cry1-2 a cv. MM v přítomnosti tolbutamidu</i> .....	42
<b>5 DISKUSE .....</b>	<b>45</b>
<b>6 ZÁVĚR.....</b>	<b>50</b>
<b>7 POUŽITÁ LITERATURA .....</b>	<b>51</b>

## SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ABA	kyselina abscisová
BL	modré světlo
bHLH	basic helix-loop-helix
CLC	napětím řízené chloridové kanály
COP1	constitutive photomorphogenesis 1
CPD	cyklobutanové pyrimidinové dimery
CRY	krytochrom
D	tma
DASH	<i>Drosophila, Arabidopsis, Synechocystis, human</i>
FAD	flavinadenindinukleotid
FMN	flavinmononukleotid
FR	dlouhovlnné červené záření, 710-740 nm
HY5	hypocotyl 5
LOV	light-oxygen-voltage
MES	2-(N-morfolino)ethan sulfonová kyselina
MS médium	Murashige a Skoog médium
NDPK2	nucleoside diphosphate kinase 2
PHOT	fototropin
Phy	fytochrom
Pfr	forma fytochromu absorbující FR
Pr	forma fytochromu absorbující R
PIF3	phytochrome interacting factor 3
PKS1	phytochrome kinase substrate 1
R	krátkovlnné červené záření, 650-680 nm
RL	červené světlo

NPPB	5-nitro-2,3-fenylpropylaminobenzoová kyselina
TIP	tonoplast intrinsic protein
UV	ultrafialové záření
UV-A	320-400 nm UV
UV-B	280-320 nm UV
WT	wild-type, kontrolní rostlina
XET	xyloglukanendotransglykosyláza
9-AC	kyselina antracen-9-karboxylová



# 1 ÚVOD

Moje diplomová práce byla řešena v Laboratoři molekulární fyziologie na Katedře buněčné biologie a genetiky Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci v rámci Výzkumného záměru financovaného MŠMT (grant č. MSM6198959215) a projektu Kontakt financovaného MŠMT (grant č. ME10020).

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů prostředí působících na rostlinu. Světlo je pro rostliny jednak zdrojem energie (fotosyntéza), ovlivňuje také pohyby a ohýbání rostlin směrem k nebo od světla (fototropismus) a konečně světlo také kontroluje růst, vývoj a diferenciaci rostlin (fotomorfogeneze) (Schäfer et Nagy, 2006). Světlo je zachycováno fotoreceptory, z nichž nejvýznamnější jsou fytochromy (absorbují červené světlo), kryptochromy a fototropiny (zachycující modré světlo a UV-A).

U některých rostlin (salát, *Arabidopsis*) světlo hraje důležitou roli také v klíčení, přičemž v regulaci klíčení jsou zapojeny především fytochromy (Reed et al., 1994). Na klíčení může mít vliv také modré světlo, které například u rajčete a *Arabidopsis* inhibuje klíčení a navíc může také zvyšovat inhibiční účinek osmotického stresu na klíčení (Fellner et al., 2007). Je známo, že v inhibici růstu hypokotylu kontrolované modrým světlem jsou zapojeny modrým světlem indukované aniontové kanály (Cho et Spalding, 1996), ale dosud není nic známo o zapojení těchto aniontových kanálů v klíčení.

Cílem předkládané diplomové práce bylo studovat možné mechanismy, kterými jsou iontové kanály zapojeny v klíčení semen rajčete. Strategie experimentů spočívala v aplikaci inhibitorů aniontových či draselných kanálů na klíčení. V případě aniontových kanálů byly použity různé koncentrace inhibitorů 9-AC a NPPB, v případě draselných kanálů byl aplikován tolbutamid. Dále bylo studováno, zda a jak může být funkce zmiňovaných kanálů ovlivněna kvalitou světla. Klíčení semen bylo tedy sledováno ve tmě nebo na modrém a červeném světle.

Experimenty byly prováděny na semenech rajčete *Solanum lycopersicum* L. a jeho mutantech. Použit byl mutant *7B-1* s dosud neznámým defektem v signální dráze modrého světla (Fellner et Sawhney, 2002) a také mutanti *cry1-1* a *cry1-2* s defektem v genu kódujícím fotoreceptor modrého světla kryptochrom1 (CRY1; Weller et al., 2001). Odpovídající kontrolní rostlinou v případě mutantu *7B-1* byl cv. Rutgers a v případě mutantů *cry1-1* a *cry1-2* cv. Moneymaker (cv. MM).

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Klíčení

Klíčení je vývojový proces, kterým se embryo mění v klíčnou rostlinu (Luštinec et Žárský, 2005) a je zahájeno příjmem vody suchým semenem a dokončeno je po proražení osemení radikulou. Klíčovou roli hraje především embryo, které jednak spouští svůj vlastní růst a jednak poskytuje signály endospermu vedoucí k oslabení fyzikálního omezení vyvolaného jeho působením na embryo (Tatematsu et al., 2008).

V první fázi klíčení semeno bobtná (přijímá vodu), což je často doprovázeno prasknutím osemení (testy). Příjem vody semenem je třífázový děj – první fáze (fáze I) je charakteristická rychlým počátečním příjmem vody, dále následuje plató fáze (fáze II), v třetí fázi dochází k dalšímu zvýšení příjmu vody a to v období prodlužování embryonální osy (Kucera et al., 2005) (Obr. 1).

V důsledku rychlého příjmu vody suchým semenem v průběhu první fáze klíčení dochází k dočasným strukturním poruchám v semeni, především membránách, což vede k vytékání rozpuštěných látek a metabolitů nízké molekulární hmotnosti do okolí. Během rehydratace se však membrány postupně stabilizují a vytékání látek je omezeno. Dosud není příliš známo, jak dochází k opravám poškození vzniklých v průběhu vysušení a následné rehydratace. Nicméně se předpokládá, že by v tomto procesu mohl být zapojen N-acetylfosfatidylethanolamin, což je fosfolipid stabilizující membrány (Bewley, 1997).

Příjem vody v průběhu imbibice dochází k obnovení metabolické aktivity semene. Enzymy potřebné k opětovnému zahájení metabolismu jsou patrně přítomny již v suchém semeni a musí být tedy schopny překonat období vysušení. Jednou z prvních změn v průběhu imbibice je obnovení respirace. V průběhu první fáze klíčení dochází rovněž k obnovení glykolýzy, pentózofosfátové dráhy i Krebsova cyklu (Bewley, 1997). V prvních etapách klíčení (asi do 24-36 hodin) převažuje u všech semen anaerobní typ dýchání, o čemž svědčí i vysoká aktivita alkoholdehydrogenázy (Procházka et al., 1998). Časový průběh hlavních dějů spojených s klíčením je naznačen v Obr. 1.

V další takzvané růstové fázi klíčení dochází k dlouhivému růstu v embryu prudkým zvýšením rychlosti respirace a mobilizací zásobních látek, které se účastní gibereliny. Gibereliny indukují syntézu enzymů, jež hydrolyzují a tím mobilizují zásobní látky v endospermu nebo v dělohách. Produkty hydrolyzy zásobních látek slouží jako živiny

pro vyvíjející se embryo (Luštinec et Žárský, 2005). Za vyklíčené je považováno semeno, u něhož radikula prorazila testu, což závisí především na růstu embrya řízeným příjmem vody (Kucera et al., 2005). Proražení testy je jedním z důležitých okamžiků klíčení, dochází k němu v místě někdejší mikropyle. Toto umožní embryu kontakt s vnějším prostředím (Pavlová, 2005).

Prodlužování radikuly je procesem řízeným turgorem, který vyžaduje, aby stěny buněk nacházejících se mezi kořenovou čepičkou a bází hypokotylu byly pružné. Existují tři možná vysvětlení zahájení růstu radikuly. První předpokládá, že s postupujícím klíčením se osmotický potenciál buněk radikuly stává více záporný v důsledku akumulace rozpuštěných látek, vzniklých hydrolyzou polymerů zásobních látek obsažených v buňkách radikuly. Pokles vodního potenciálu pak vede ke zvýšenému příjmu vody, čímž se zvyšuje turgor buněk a dochází k jejich prodlužování. Bohužel ale neexistuje odpovídající důkaz změn osmotického potenciálu buněk v průběhu klíčení. Druhá alternativa předpokládá, že prodlužování buněk radikuly je umožněno roztažitelností jejich stěn. „Rozvolňování“ buněčných stěn může být výsledkem štěpení a propojování molekul xyloglukanů, které mezi sebou provazují mikrofibrily celulózy. Avšak aktivita enzymu schopného reverzibilně štěpit molekuly xyloglukanů, xyloglukanendotransglykosylázy (XET), se u semen kukuřice zvyšuje během prodlužování, ale až po dokončení klíčení. Dalšími kandidáty schopnými rozvolňovat buněčné stěny jsou expansiny, které jsou schopné přerušovat vodíkové vazby mezi polymery buněčných stěn. Prokázáno je zapojení těchto proteinů v prodlužování hypokotylu okurky. Nicméně žádný z těchto proteinů nebyl zaznamenán v klíčících semenech. Navíc je aktivita XET a expansinů zvyšována auxiny, které jsou obecně považovány za neúčinné v působení na klíčení semen. U kukuřice se pak dále ukázalo, že aktivita XET je zesilována rovněž kyselinou abscisovou (ABA), která je známa jako silný inhibitor prodlužování kořínků embrya. Třetím možným vysvětlením zahájení prodlužování radikuly je, že pletiva semene obklopující špičku radikuly postupně ochabují, což umožní její prodlužování. Turgor umožňuje prodlužování buněk radikuly jen pokud nejsou, popřípadě jsou jen slabě, omezeny v růstu okolními pletivy (Bewley, 1997), viz dále.

Při růstu radikuly jsou velmi významná fyzikální omezení vytvářená působením vrstev kryjících semeno. V případě semen bez endospermu či semen *Arabidopsis* (v semeni je jen jedna vrstva buněk endospermu) je embryo kryto pouze osemením, které může

(například v případě *Arabidopsis*) či nemusí (jako například u hrachu) představovat omezení pro růst radikuly. U semen s endospermem přibývá další omezující struktura, a to právě endosperm. Pro úspěšné klíčení semen *Asteraceae* (třeba salátu), *Solanaceae* (rajče) a *Rubiaceae* je hlavním limitujícím faktorem právě porušení endospermu, což se děje enzymatickou hydrolýzou (Tatematsu et al., 2008). Jen pro doplnění, endosperm je pletivo v semeni zajišťující přenos živin z mateřských pletiv do embrya. Embryo a endosperm jsou geneticky identické až na stupeň ploidie, embryo je obvykle diploidní a endosperm triploidní. Už více než sto let je známo, že endosperm vzniká jako výsledek dvojitého plození, ale jeho evoluční původ je stále neznámý. Mohl se patrně vyvinout z nadpočetného embrya nebo ze samičího gametofytu (Gehring et al., 2004).

Na regulaci klíčení se podílí řada rostlinných hormonů, vedle giberelinů také kyselina abscisová, ethylen a brasinosteroidy. Gibereliny uvolňují semena z dormance a podporují klíčení semen. Mimo to jsou potřeba také pro prodlužování buněk embrya, k překonání fyzikálních omezení vyvolaných působením vrstev kryjících semeno a také pro indukci „oslabování“ endospermu. Spolu s brasinosteroidy a ethylenem, které rovněž podporují klíčení, působí proti účinkům kyseliny abscisové, přičemž ve většině případů brasinosteroidy a ethylen působí až po přerušení dormance gibereliny. ABA indukuje a udržuje dormanci semen a negativně reguluje klíčení (Kucera et al., 2005). Hladina ABA na počátku imbibice prudce klesá, na čemž se podílí hlavně endodermis a endosperm vylučováním ABA hydroxyláz (Tatematsu et al., 2008). Zajímavé je působení ethylenu a ABA, kdy v průběhu klíčení ethylen působí proti inhibičnímu účinku ABA tím, že ruší její signalizaci. Naopak ale oba tyto hormony inhibují růst kořene klíčící rostliny. Antagonismus ABA a ethylenu poukazuje na to, že reakce a interakce hormonů jsou rozdílné v klíčících semenech a vegetativních pletivech (Kucera et al., 2005).

Nynější studie klíčení semen *Arabidopsis* naznačují, že ke spuštění aktivity genů spojených s klíčením je zapotřebí cis-elementu Up1, jehož aktivita je zvyšována dalším takovým elementem označovaným jako Up2. Up1 je téměř identický s cílovými motivy TCP transkripčních faktorů. Rozhodujícím činitelem v růstu embrya během klíčení je především gen *AtTCP14*, jehož transkripce se nápadně zvyšuje po zahájení imbibice. Produkty tohoto genu se nacházejí především ve vodivých pletivech embrya. Exprese genu *AtTCP14* je regulována hormonálně, gibereliny a ABA (Tatematsu et al., 2008).

Světlo většinou není podmínkou klíčení. Některá semena však klíčí na světle rychleji než ve tmě (Procházka et al., 1998). Semena, jejichž klíčení je řízeno světlem, se označují jako fotoblastická. Semena mohou být kladně (světlo klíčení stimuluje) či záporně fotoblastická (světlo klíčení inhibuje). Kladně fotoblastická semena obvykle obsahují málo zásobních látek a klíčící rostlina musí být brzy schopna fotosyntézy (například semena salátu či tabáku). Klíčení záporně fotoblastických semen je naopak světlem inhibováno. Tento typ semen obsahuje značné množství zásobních látek (Pavlová, 2005). Záporně fotoblastická jsou kupříkladu semena laskavce či tykve. Fotoblastické chování semen má adaptační význam (Procházka et al., 1998). Světelný signál je zprostředkován fytochromy a kryptochromy (Pavlová, 2005).

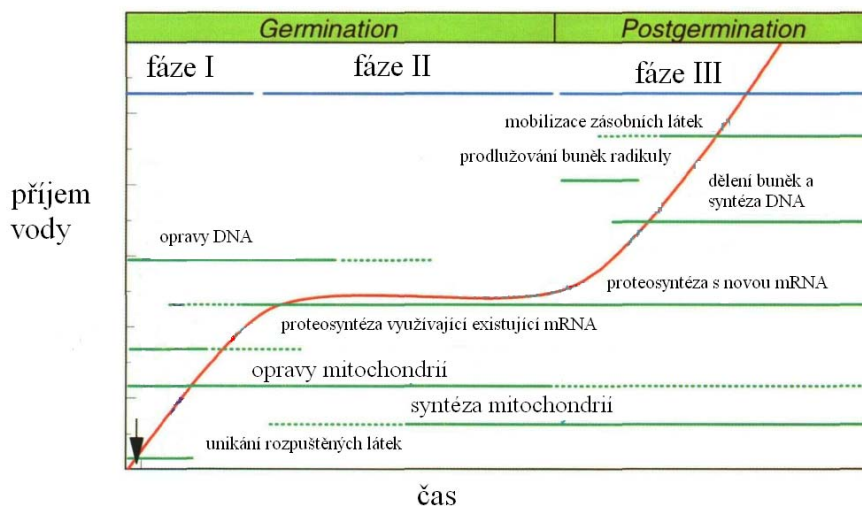
Kontrola klíčení R a FR byla jedním z prvních zaznamenaných procesů zprostředkovaných fytochromy. Antagonistické působení R a FR bylo poprvé demonstrováno na klíčení semen salátu. Bylo zjištěno, že efekt střídavého ozařování R a FR závisí na tom, které světlo bude použito jako poslední. Semena salátu, jež byla naposledy ozářena R, téměř všechna vyklíčila. Ale pokud byla semena jako poslední ozářena FR, bylo jejich klíčení silně inhibováno (Taiz et Zeiger, 2006).

V regulaci klíčení jsou zapojeny především fytochromy a to fytochrom A a fytochrom B, přičemž fytochrom A podporuje a fytochrom B inhibuje klíčení semen při působení dlouhovlnného červeného záření (FR). Ve tmě kontroluje klíčení semen fytochrom B. V podmínkách krátkovlnného červeného záření (R) oba zmiňované fytochromy podporují klíčení, a to prostřednictvím svých Pfr forem (Reed et al, 1994). Analýza kombinací triple-mutantů *phyAphyBphyD* a *phyAphyBphyE* umožnila odhalit, že významnou roli v klíčení hraje také fytochrom E (Franklin et al., 2005). Novější analýzy mutantů deficientních v kombinaci fytochromů A, B a E odhalily, že světelná regulace klíčení semen *Arabidopsis* je ovlivňováno také teplotou okolí. Za vyšších teplot (vyšších než 22°C) má hlavní roli v klíčení fytochrom B, který je pak následován fytochromem A a fytochromem E. Za nižších teplot (pod 16°C) však přebírá vedoucí postavení fytochrom E a fytochrom B plní jen přídatnou funkci (Franklin et Quail, 2010).

Svou roli v klíčení hrají rovněž akvaporiny, což jsou proteiny tvořící kanály vyskytující se v plazmatické membráně i intracelulárních membránách rostlinných buněk. Akvaporiny jsou zapojeny v růstu embrya, kdy dodávají vodu expandujícím buňkám.

Během klíčení byla zjištěna zvýšená exprese především akvaporinů TIP1 a TIP2 (Tonoplast Intrinsic Protein)(Willigen et al., 2006).

**Obr. 1:** Načasování hlavních událostí spojených s klíčením a následným růstem. Křivka znázorňuje příjem vody semenem. Šipkou je označen okamžik zahájení respirace a proteosyntézy. Upraveno podle Bewley, 1997.



## 2.2 Transport přes membrány

Vnitřní prostor fosfolipidové dvourstvy membrán je hydrofóbní a brání průchodu téměř všech molekul rozpustných ve vodě, ale pro přežití buňky je nutné přivádět živiny, odvádět odpadní látky a rovněž upravovat koncentrace především iontů  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $K^+$  a  $Ca^{2+}$ . Pouze několik málo z těchto látek je schopno prostě difundovat lipidovou dvourstvou (například oxid uhličitý a kyslík), ale velká většina pro buňku potřebných látek tuto schopnost nemá. Z toho důvodu je pro přenos těchto iontů nezbytná existence transportních proteinů. Obecně rozlišujeme dva hlavní typy membránových transportních proteinů – přenašečové proteiny a kanálové proteiny. Přenašečové proteiny fungují tak, že na jedné straně membrány váží přenašenou látku a tu poté transportují dovnitř změnou své konformace. Naopak kanálové proteiny svými polypeptidovými řetězci mnohokrát protínají membránu a tím vytvářejí tunel, kterým mohou malé hydrofilní molekuly procházet bez toho, aniž by se dostaly do přímého kontaktu s hydrofóbním prostředím lipidové dvourstvy. Většinou těchto kanálů mohou procházet pouze anorganické ionty, proto se tyto proteiny označují jako iontové kanály. Protože jsou ionty elektricky nabitě, mohou jejich pohyby vyvolat mohutné elektrické síly působící napříč membránou (Alberts et al., 1998).

Iontové kanály mají dvě důležité vlastnosti. Zaprvé, vykazují iontovou selektivitu, která závisí na průměru a tvaru kanálu a dále pak také na rozdělení nabitých aminokyselin v jeho stěnách. Za druhé, iontové kanály nejsou stále otevřené, ale většina je uzavíratelná. K jejich otvírání a zavírání dochází změnou konformace, což je regulováno podmínkami uvnitř a vně buňky. Podle způsobu regulace otvírání a zavírání, rozlišujeme několik základních typů kanálů. Jsou to

kanály řízené napětím (otvírání regulováno membránovým potenciálem), kanály řízené určitým ligandem, jež se navazuje na kanálový protein či mechanicky aktivované kanály, které jsou otvírány mechanickou silou působící na kanál (Alberts et al., 1998).

Hnací silou membránového transportu je elektrochemický potenciál, který má dvě hlavní složky – koncentrační gradient a membránový potenciál. Rostliny, stejně jako houby a bakterie, používají jako pohon membránového transportu gradient protonů (ve srovnání s živočichy, kteří využívají gradient sodíkových iontů vytvářený sodno-draselnou pumpou).  $H^+$ -ATPáza využívá energii uvolněnou hydrolýzou ATP k odčerpávání protonů z buňky. Odlišný typ se nachází také v membráně vakuoly, kde čerpá protony z cytoplasmy do vakuoly (Alberts et al., 1998). U rostlin právě protonová ATPáza určuje velmi záporný potenciál plazmatických membrán buněk (pohybuje se od -100 do -200 mV) (Barbier-Brygoo et al., 2000).

Iontové kanály mají ve srovnání s přenašečovými proteiny velkou výhodu ve vysoké rychlosti transportu (jedním kanálem projde více než milion iontů za minutu). Na druhé straně však kanály nemohou spřáhnout tok iontů se zdrojem energie a uskutečňovat tak aktivní transport. Kanály pouze učiní membránu přechodně propustnou pro vybrané anorganické ionty, přičemž těmto iontům umožní rychle difundovat ve směru jejich elektrochemického gradientu. Tok iontů změní membránový potenciál a ten změní elektrochemické hnací síly, které působí transmembránový pohyb všech ostatních iontů. Membránový potenciál na jedné straně reguluje činnost kanálů, ale na straně druhé rovněž kanály mohou regulovat membránový potenciál (Alberts et al., 1998). Rostliny využívají k depolarizaci membrány a šíření elektrických signálů aniontové kanály řízené napětím (Barbier-Brygoo et al., 2000).

### **2.2.1 Funkce iontových kanálů**

Podobně jako v živočišných buňkách plní také v buňkách rostlin iontové kanály tři hlavní fyziologické funkce – osmoregulační, signalizační a také kontrolují membránový potenciál. Iontové kanály jsou zapojeny v řadě významných fyziologických procesů jako je například otevírání a zavírání stomat, tvorba membránového potenciálu, regulace prodlužování buněk hypokotylu, tolerance ke kovům, transport živin či metabolismus. Iontové kanály mají rozhodující úlohu v počátečních fázích signálních drah vedoucích nejruznějším vývojovým a adaptivním reakcím rostlin (Barbier-Brygoo et al., 2000).

### **2.2.2 Aniontové kanály**

Aniontové kanály představují rozmanitou skupinu iontových kanálů vyskytujících se v rostlinných i živočišných buňkách. Setkáme se s nimi ve všech rostlinných membránách, přičemž nejlépe jsou prostudovány aniontové kanály plazmatické membrány, především plazmatické membrány svěracích buněk průduchů a buněk hypokotylu. Tyto kanály byly

primárně charakterizovány využitím nejrůznějších elektrofyziologických metod (Roberts, 2006).

Aniontové kanály rostlin mohou být na základě své kinetiky a závislosti na napětí rozděleny do tří skupin:

- a) aniontové kanály aktivované depolarizací – tento typ kanálu zprostředkovává odtok aniontů z buňky (R a S typ kanálů) i vtékání aniontů do buňky
- b) aniontové kanály aktivované hyperpolarizací – transportují anionty ven z buňky
- c) aniontové kanály aktivované světlem nebo mechanicky

Rozlišujeme dva typy iontových kanálů – R-kanály (rapid-activating) a S-kanály (slow-activating). Oba typy těchto kanálů byly nalezeny v různých rostlinách (například u *Arabidopsis thaliana*, *Vicia faba*) a nejrůznějších orgánech (svěracích buňkách, buňkách hypokotylu, epidermálních buňkách kořene apod.). R-kanály jsou selektivní pro  $\text{NO}_3^-$  a v menší míře také pro  $\text{Cl}^-$  a malát. Jedná se o kanály řízené napětím (de Angeli et al., 2007). Za klidového potenciálu (hyperpolarizace) jsou uzavřené a při depolarizaci se otvírají. Typická je pro ně rychlá kinetika aktivací a deaktivací (řádově v milisekundách). Ale i při dlouhotrvající depolarizaci dochází k postupné inaktivaci (10-70 s) těchto kanálů. R-kanály zajišťují přechodný odtok aniontů (Roberts, 2006). S-kanály jsou rovněž vysoce propustné pro  $\text{NO}_3^-$ , avšak nepropouští  $\text{SO}_4^{2-}$ . Tyto kanály jsou aktivovány fosforylací (de Angeli et al., 2007). Ve srovnání s R-kanály jsou účinné za širšího rozmezí hodnot napětí. S-kanály vykazují pomalou kinetiku aktivací a deaktivací (až 1 minutu) (Roberts, 2006).

Koncentrace aniontů v rostlinné buňce kolísá v závislosti na fyziologických a vnějších podmínkách, avšak největší koncentrace aniontů jsou ve vakuole, která představuje jejich zásobárnu, zatímco koncentrace v cytoplazmě bývají udržovány v poměrně stálém několika milimolárním rozmezí. Rostliny musí potřebné anionty aktivně přijímat z okolí, k čemuž využívají anion/protonového symportu. K hlavním minerálním aniontům v rostlinných pletivech patří dusičnany, chloridy, sírany a fosforečnany (Barbier-Brygoo et al., 2000), přičemž pro rostlinu mají největší význam dusičnany ( $\text{NO}_3^-$ ). Dusičnany vstupují do buňky díky protonovým symportním transportérům ze skupin NNP (nitrate-nitrite transporter) a PTR (peptide transporter) a poté jsou akumulovány ve vakuolách (zde je asi 25krát vyšší koncentrace těchto aniontů než



v cytoplasmě), což vyžaduje existenci aktivního transportního systému. Předpokládá se, že tento systém funguje jako protonový antiporter, přičemž protony jsou čerpány z vakuoly a dusičnany do vakuoly. Doposud však byly nalezeny pouze dva proteiny zajišťující transport dusičnanů ve vakuolách – transportér dusičnanů ze skupiny NNP (AtNRT 2.7, téměř výlučně exprimovaný v semenech) a anion/protonový antiporter ze skupiny CLC (AtCLC-a) (de Angeli et al., 2009, Chopin et al., 2007). Pro řadu buněčných procesů jsou rozhodující také chloridové anionty, například pro depolarizaci membrány, regulaci objemu buňky, rezistenci k zasolení či kovům a reakci k patogenům. Dosud ale nebyly identifikovány proteiny zodpovědné za transport chloridů v buňce, ale nejžhavějšími kandidáty pro tuto funkci jsou CLC proteiny (Zifarelli et Pusch, 2010).

### 2.2.3 CLC proteiny

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* bylo dosud objeveno sedm homologů CLC proteinů, které jsou označovány jako AtCLC-a až AtCLC-g, přičemž proteiny AtCLC-a až AtCLC-d a AtCLC-g představují samostatnou evoluční větev a jsou nejvíce podobné savčím CLC proteinům, zatímco AtCLC-e a AtCLC-f jsou více příbuzné spíše s bakteriálním zástupci CLC proteinů (Zifarelli et Pusch, 2010). Přehled rozmístění v buňce a transportních vlastností jednotlivých CLC proteinů je uveden v tabulce č. 1. V tabulce jsou vedle CLC proteinů *Arabidopsis thaliana* uvedeny také CLC proteiny nalezené u rýže a sóji, opět s uvedením transportních vlastností a lokalizací v buňce.

Nejdůkladněji prozkoumaným rostlinným CLC proteinem je AtCLC-a. Překvapivým zjištěním při výzkumech funkce tohoto proteinu bylo, že hraje roli v transportu  $\text{NO}_3^-$  a nikoli  $\text{Cl}^-$  jako ostatní zástupci CLC proteinů. Tento zásadní rozdíl oproti bakteriálním a živočišným CLC proteinům je dán především přítomností aminokyseliny prolinu místo serinu v oblasti transportéru rozhodující o jeho selektivitě. AtCLC-a je umístěn v membráně vakuoly, kde slouží jako  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  antiporter (vazebný poměr  $\text{NO}_3^-/\text{H}^+$  je 2:1). Rovněž AtCLC-b, -c a -g jsou vázány na membránu vakuoly. Na základě přítomnosti různých aminokyselinových zbytků v selektivní oblasti se předpokládá, že AtCLC-b je selektivní pro  $\text{NO}_3^-$ , zatímco AtCLC-c a -g spíše pro  $\text{Cl}^-$ , viz tabulka č. 1. Proteiny AtCLC-b a AtCLC-c fungují jako antiportery a AtCLC-g patrně jako chloridový kanál, který se účastní procesu otvírání a zavírání stomat (Zifarelli et Pusch, 2010).

**Tabulka č. 1 :** Přehled rozmístění a transportních vlastností rostlinných CLC proteinů. Dosud nejsou k dispozici údaje o aniontové selektivitě proteinů AtCLC-b a AtCLC-g. Upraveno podle Zifarelli et Pusch 2010.

rostlina	protein	vnitrobuněčná lokalizace proteinu	aniontová selektivita
<i>Arabidopsis thaliana</i>	AtCLC-a	vakuola	NO <sup>3-</sup>
	AtCLC-b	vakuola	?
	AtCLC-c	vakuola	NO <sup>3-</sup> /Cl <sup>-</sup>
	AtCLC-d	Golgiho aparát	Cl <sup>-</sup>
	AtCLC-e	chloroplast	NO <sup>3-</sup>
	AtCLC-f	Golgiho aparát	Cl <sup>-</sup>
	AtCLC-g	vakuola	?
<i>Oryza sativa</i>	OsCLC-1	vakuola	Cl <sup>-</sup>
	OsCLC-2	vakuola	Cl <sup>-</sup>
<i>Glycine max</i>	GmCLC-1	vakuola	Cl <sup>-</sup>

#### 2.2.4 Iontové kanály a světelné signály

Studie zabývající se vnímáním světla odhalily, že důležitou roli v tomto procesu hrají právě iontové kanály. Inhibice růstu modrým světlem u *Arabidopsis thaliana* se skládá ze dvou fází. První rychlá inhibice prodlužování je zprostředkována fotoreceptorem fototropinem1 (PHOT1) a následuje asi po 30 sekundové lag fázi (Folta et Spalding, 2001). Druhá fáze pak závisí na fotoreceptoru kryptochromu1 (CRY1) a projevuje se asi 45-60 minut po expozici modrému světlu. Inhibici růstu předchází rozsáhlá, i když jen přechodná, depolarizace membrány, která je patrně způsobena vytékáním chloridových aniontů z buňky a inhibicí protonové pumpy. Iontové kanály zapojené v depolarizaci plazmatické membrány jsou aktivovány excitací fotoreceptoru CRY1 modrým světlem. Hlavní otázkou zůstává, jak je CRY1 během několika málo minut schopen aktivovat kanály. Nejprve bylo navrženo, že aniontové kanály jsou spuštěny zvýšením koncentrace vápenatých iontů v cytoplasmě. Pozdější studie však ukázaly, že před, během ani po aktivaci kanálů indukované modrým světlem nedochází k významným změnám koncentrace iontů vápníku. Proto je za nejpravděpodobnější mechanismus považována řada redoxních reakcí, jež je spuštěna přenosem elektronů z excitovaného flavoproteinu kryptochromu1 na další dosud neznámou molekulu (možná samotný aniontový kanál) (Spalding et Cosgrove, 1989).

Rovněž fytochromy uplatňují některé ze svých účinků změnou aktivity iontových kanálů. Série výzkumů prováděných na mechu *Physcomitrella patens* ukázala, že červené světlo během několika sekund indukuje vnitřní proud vápenatých iontů

do cytoplazmy, který zahajuje depolarizaci membrány (Ermolayeva et al., 1996, Ermolayeva et al., 1997). Jsou aktivovány aniontové kanály a také kanály draselné. Otvírání draselných kanálů se patrně podílí na repolarizaci membrány. Tento model lze v některých případech aplikovat rovněž na kvetoucí rostliny, protože podobná i když menší depolarizace indukovaná červeným světlem byla pozorována také v koleoptilu a motorických buňkách pulvinia ovsa. Bohužel však nebyla pozorována změna koncentrace vápenatých iontů působením červeného světla v cytoplazmě buněk hypokotylu *Arabidopsis thaliana*. Proto bylo navrženo, že ke zvýšení koncentrace cytoplazmatického vápníku dochází v důsledku fotokonverze fytochromů. Změny této koncentrace pak mohou být výsledkem jak změn v toku iontů napříč membránou, tak uvolnění z vnitřních zásobáren, jakou je například vakuola (Spalding, 2000).

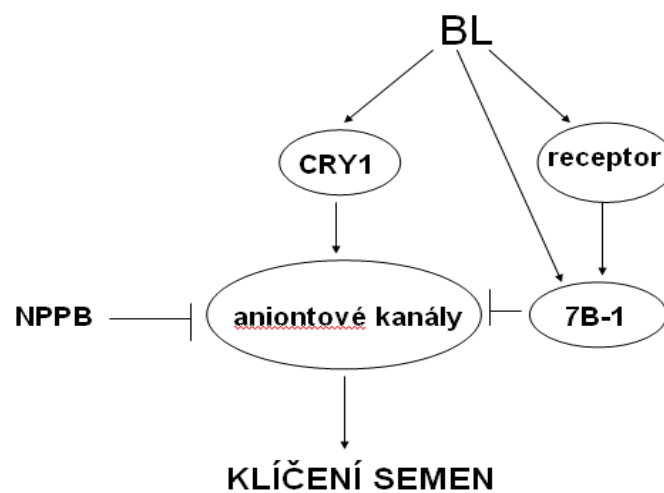
### **2.2.5 Vliv modrého světla na aniontové kanály zapojené v klíčení**

Jak již bylo řečeno výše, modrým světlem indukované aniontové kanály jsou zapojeny v růstu hypokotylu kontrolovaném modrým světlem (Cho et Spalding, 1996), ale dosud není nic známo o zapojení těchto aniontových kanálů v klíčení. Je známo, že u některých rostlin (*Arabidopsis*, rajče) modré světlo inhibuje klíčení semen a navíc zvyšuje inhibiční účinek osmotického stresu na průběh klíčení. V signální dráze kontrolující inhibici klíčení vyvolanou modrým světlem je s největší pravděpodobností zapojen gen *7B-1*, přičemž výsledky naznačují, že může redukovat aktivitu či množství aniontových kanálů a akvaporinů a fungovat tedy jako negativní regulátor klíčení (Fellner et al., 2007). Bohužel není známo, jak modré světlo mění aktivitu těchto kanálů (Fellner et al., 2008a). V této signální dráze se nepředpokládá zapojení kryptochromu1 (Fellner et al., 2007), ale funkční *CRY1* patrně spíše podporuje klíčení na modrém světle. Funkce genu *7B-1* se zdá být specifická pro klíčení. Ve stádiu výzkumu je zatím odhalení, zda je gen *7B-1* odlišný od genu *CRY1* a nebo jde pouze o rozdílnou alelu tohoto genu (Fellner et al., 2008a).

Na základě studia mutantů rajčete v kryptochromu1 (*cry1-1*, *cry1-2*) a genu *7B-1* (mutant *7B-1*)(viz metodika) byla vytvořena hypotéza, která předpokládá, že inhibice klíčení modrým světlem je dána snižováním aktivity či množství NPPB-citlivých aniontových kanálů (Fellner et al., 2008a), draselných kanálů citlivých k tolbutamidu a kanálů citlivých k rtuti modrým světlem (možná jde o akvaporiny) (Fellner et al., 2008b). To se děje prostřednictvím genu *7B-1*, který specificky v průběhu klíčení může

sloužit jako fotoreceptor modrého světla nebo je článkem signální dráhy modrého světla. Na druhé straně ale modré světlo také aktivuje či zvyšuje množství dalších NPPB citlivých kanálů nutných ke klíčení, což se děje prostřednictvím kryptochromu1 (Fellner et al., 2008a), viz Obr. 2. To znamená, že produkt funkčního genu *7B-1* by mohl fungovat jako negativní regulátor aktivity či množství iontových a vodních kanálů potřebných ke klíčení, což patrně uskutečňuje tím, že inaktivuje transkripční faktory ovlivňující expresi těchto kanálů (Fellner et al., 2008b).

**Obr. 2:** Schéma předpokládané inhibice klíčení semen rajčete modrým světlem podle Fellner et al. 2008a.



### 2.3 Vliv světla na růst a vývoj rostlin

Světlo je jedním z nejdůležitějších faktorů prostředí působících na rostlinu. Jako světlo je obvykle chápáno viditelné záření a pohybuje se zhruba v rozmezí vlnových délek 380-740 nm (Pavlová, 2005). Světlo je pro rostliny jednak zdrojem energie (fotosyntéza), ovlivňuje také pohyby a ohýbání rostlin směrem k nebo od světla (fototropismus) a konečně světlo také kontroluje růst, vývoj a diferenciaci rostlin (fotomorfogeneze) (Schäfer et Nagy, 2006). Světlo tedy plní v rostlinách jednak funkci nutriční (fotosyntéza) a jednak funkci signálu, jež informuje rostlinu o světelných podmínkách stanoviště. Jako signál vystupuje světlo ve fotomorfogenezi, fototropismu a fotoperiodismu (Luštinec et Žárský, 2005).

Obecně lze říct, že oblasti spektra s nejsilnějším vlivem na vývoj jsou – modrá (BL) (pohybující se v rozmezí vlnových délek 400-500 nm), krátkovlnná červená (R) (650-680 nm) a dlouhovlnná červená (FR) (710-740 nm) (Weller et al., 2001, Taiz et

Zeiger, 2006). R a FR světlo je zachycováno fotoreceptory fytochromy, přičemž fytochromy jsou schopny absorbovat rovněž světlo modré. Specifickými receptory modrého světla jsou pak kryptochromy, fototropiny a zeaxantin (Taiz et Zeiger, 2006). Nejnovější studie ukazují, že vývoj rostlin je ovlivněn také zeleným světlem a UV-B, ale mechanismy vnímání, které jsou základem těchto reakcí, dosud nebyly objasněny. Předpokládá se, že zelené světlo působí prostřednictvím signálních drah závislých i nezávislých na kryptochromech (Facella et al., 2008). Rovněž fotoreceptory UV-B a zeleného světla dosud nebyly identifikovány (Kaiserli et al., 2009).

Jakmile semena uložená v půdě klíčí a začínají růst, procházejí obdobím vývoje označovaným jako skotomorfogeneze. Klíčící rostliny prodávající vývoj ve tmě jsou tzv. etiolované a jsou charakteristické především nápadně prodlouženým stonkem, složenými dělohami a tím, že neobsahují chlorofyl (Taiz et Zeiger, 2006). V okamžiku, kdy klíčící rostlina pronikne k povrchu půdy a je vystavena působení světla, nastává velmi rychlý přechod k fotomorfogenezi, což je spojeno se zpomalením růstu hypokotylu, rozevřením a zvětšováním děloh a vývojem chloroplastů. K tomu, aby mohlo dojít ke spuštění fotomorfogeneze je samozřejmě nezbytné, aby klíčící rostlina měla vyvinuty potřebné fotoreceptory a byla schopná změnit expresi genů ve prospěch genů spojených s fotomorfogenezí. To se patrně děje mechanismem regulované proteolýzy. Velmi zjednodušeně se dá říct, že po zachycení příslušného signálu fotoreceptorem a jeho přenesení do jádra, kde reguluje degradaci klíčových transkripčních faktorů, nastává taková změna exprese genů, která umožní přechod na fotomorfogenetický vývoj (Schäfer et Nagy, 2006).

Pro všechny fotomorfogenické reakce obecně platí, že jsou iniciovány pouze po fotoexcitaci holoproteinu daného fotoreceptoru. Holoproteiny se většinou skládají ze dvou komponent – polypeptidu a malého ligandu absorbujícího světlo zvaného chromofor. Rostliny mají vyvinutu řadu fotoreceptorů detekujících barvu, intenzitu, směr a periodicitu světla (Schäfer et Nagy, 2006). V regulaci růstu rostlin jsou zapojeny tři hlavní skupiny fotoreceptorů:

- a) kryptochromy a fototropiny absorbující modré světlo a UV-A
- b) R a FR absorbující fytochromy, viz dále (Franklin et Quail, 2010).

### 2.3.1 Fytochromy

Fytochromy jsou modré rozpustné proteinové pigmenty vytvářející dimery (Taiz et Zeiger, 2006). V elektronovém mikroskopu mají molekuly dimeru tvar písmene Y (Schäfer et Nagy, 2006). Fytochromy většinou vytvářejí homodimery, což neplatí pro fytochromy C a E, které jsou v rostlinách přítomny jako heterodimery s fytochromy B a D (Clack et al., 2009). Každý dimer se skládá ze dvou podjednotek, přičemž každá z podjednotek je tvořena chromoforem a apoproteinem (Taiz et Zeiger, 2006). Chromofor je u vyšších rostlin lineární tetrapyrol zvaný fytochromobilin, u bakterií je chromoforem biliverdin (Schäfer et Nagy, 2006). Fytochromy jsou schopny absorbovat světlo pouze pokud je apoprotein kovalentně spojen s fytochromobilinem. Fytochromobilin je odvozen od hemu a je syntetizován v plastidech. Z plastidů je transportován do cytoplazmy, kde je spojen s apoproteinem (Taiz et Zeiger, 2006). Fytochromobilin se váže na cysteinový zbytek apoproteinu, což je společné pro fytochromy všech vyšších rostlin (Schäfer et Nagy, 2006). Kompletace chromoforu s apoproteinem je autokatalytická. V cytoplazmě vytvořené monomery fytochromů dimerizují v inaktivní Pr formu. Po absorpci světla dochází k izomeraci a vzniká fyziologicky aktivní Pfr forma fytochromu. Následně dochází k přesunu molekul fytochromů z cytoplazmy do jádra, kde regulují genovou expresi. Malá část fytochromu zůstává v cytoplazmě. Fytochromy v cytoplazmě se uplatňují při regulaci membránového potenciálu a toku iontů v závislosti na R a FR světle (Taiz et Zeiger, 2006).

Celková zásoba fytochromu není nikdy zcela přeměněna na Pr nebo Pfr formu, protože absorpční spektra obou těchto forem se částečně překrývají. To znamená, že když jsou molekuly Pr vystaveny červenému světlu, většina z nich absorbuje fotony a je konvertována na Pfr. Ale část molekul Pfr rovněž absorbuje toto záření a je přeměňována zpět na Pr. Podobně je také forma Pr schopna absorbovat malé množství FR, což znemožňuje přeměnit veškerou zásobu Pfr na Pr. Namísto toho je ustanoveno ekvilibrium 97% Pr a 3% Pfr. Toto ekvilibrium je označováno jako fotostacionární stav (Taiz et Zeiger, 2006). Jak Pr, tak Pfr absorbují vedle R a FR rovněž UV-B a modré světlo a podílejí se na zprostředkování reakcí k modrému světlu. (Schäfer et Nagy, 2006) Modré světlo může dokonce vyvolat konverzi Pr na Pfr a naopak. To, zda jsou v reakci na modré světlo zapojeny fytochromy či jiné specifické receptory modrého světla, se dá snadno určit a to díky schopnosti FR zvrátit vyvolanou reakci, protože

pouze reakce indukované fytochromy je možné zvrátit účinkem FR (Taiz et Zeiger, 2006).

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* jsou fytochromy kódovány pětici genů označovaných jako *PHYA*, *PHYB*, *PHYC*, *PHYD* a *PHYE*, ale například u rýže či kukuřice (jednoděložné rostliny) jsou to geny pouze tři *PHYA*, *PHYB* a *PHYC* (Takano et al., 2009). Dle dohody jsou fytochromy vyšších rostlin pojmenovávány na základě jejich homologie s geny *Arabidopsis* (Taiz et Zeiger, 2006).

Chromofor je u všech fytochromů stejný, jednotlivé druhy fytochromů se liší svou proteinovou částí. Proteiny fytochromů dělíme na základě mechanismu jejich působení a stability na světle do dvou rozlišných skupin (Taiz et Zeiger, 2006):

1. fytochromy typu I
2. fytochromy typu II

Fytochromy typu I jsou fotolabilní, na světle dochází k jejich poměrně rychlé degradaci, což je dáno nestabilitou jejich Pfr formy. Často bývá tato skupina označována také jako skupina fytochromů typická pro etiolovaná pletiva (Schäfer et Nagy, 2006). Do skupiny fytochromů typu I patří pouze fytochrom A, který zprostředkovává reakce k FR (Clack et al., 2009). Fytochromy typu II jsou naopak fotostabilní, často označovaná také jako fytochromy zelených pletiv (Schäfer et Nagy, 2006). Tyto fytochromy zajišťují tzv. shade avoidance reakci a R/FR reverzibilní reakce (Clack et al., 2009). Fytochromy této skupiny kódují geny *PHYB-PHYE* (Kevei et al., 2007).

Na počátku signálních drah v rostlinách regulovaných fytochromy je absorpce světla pigmentem. Absorpcí světla se změni molekulární vlastnosti fytochromu, což ovlivňuje vzájemné interakce proteinové části fytochromu s dalšími buněčnými komponentami (Taiz et Zeiger, 2006). Fytochromy jsou schopny jak autofosforylace, tak i fosforylace dalších látek, například PKS1 (Phytochrome Kinase Substrate 1) či NDPK2 (Nucleoside Diphosphate Kinase 2). Kromě toho mohou fytochromy přímo interagovat s transkripčními faktory skupiny bHLH (basic helix-loop-helix), nejprozkoumanějším je PIF3, a tím kontrolovat expresi řady genů zapojených ve fotomorfogenezi (Franklin et al., 2005). PIFs se přednostně váží na fytochromy v Pfr formě (Clack et al., 2009).

Světlo rovněž reguluje fotomorfogenezi prostřednictvím degradace proteinů a to cestou ubikvitinace. Jedním z klíčových regulátorů tohoto procesu je *COPI* (Constitutive

Photomorphogenesis 1), který vedle fytochromů interaguje i s kryptochromy, blíže v části o kryptochromech (Franklin et al., 2005).

Interakce mezi jednotlivými fytochromovými proteiny je komplexní. Účinky phyB, D a E jsou zpravidla synergické, zatímco působení phyA a phyB může být jak synergické tak antagonistické, závisí na typu reakce a pletiva. Komplexní interakce fytochromů umožňuje rostlině pozorně monitorovat a reagovat na každou změnu světla v prostředí (Taiz et Zeiger, 2006).

Fytochromy hrají velmi důležitou roli v klíčení semen a de-etiolizaci, regulují dělení a rozvoj buněk a díky tomu kontrolují velikost děloh, listů a stonků. Pomáhají rostlině vnímat a reagovat na zastínění a na sousední rostliny. Fytochromy jsou rovněž zapojeny v regulaci denních rytmů a ovlivňují načasování kvetení. Mimoto fytochromy kontrolují senescenci (Schäfer et Nagy, 2006).

### **2.3.2 Kryptochromy**

Kryptochromy jsou fotoreceptory zachycující modré světlo, zelené světlo a UV-A (Xu et al., 2009). Kryptochromy byly poprvé objeveny u rostlin a to u *Arabidopsis thaliana*, kde regulují růst a vývoj. Později byly objeveny také u živočichů, včetně člověka, a bakterií (Selby et Sancar, 2006). U živočichů a bakterií jsou kryptochromy zapojeny v regulaci denních rytmů (Huang et al., 2006). Kryptochromy jsou flavoproteiny sekvenčně i strukturálně podobné enzymům fotolyásam. Fotolyázy se účastní reparace DNA poškozené pyrimidinovými dimery, které vznikají v důsledku expozice UV-B záření. Kryptochromy však přes svou podobnost k fotolyásam postrádají schopnost reparace DNA (Schäfer et Nagy, 2006).

Ve struktuře kryptochromů můžeme rozlišit dvě funkčně odlišné domény – C-terminální doménu a N-terminální doménu. C-terminální doména zajišťuje signalizaci a váže se k dalším signálním partnerům (např. COP1). Tato doména se nevyskytuje u fotolyás a není sekvenčně podobná žádné známé proteinové doméně. N-terminální doména je sekvenčně podobná fotolyásam a u receptoru CRY1 zajišťuje tvorbu homodimerů nezbytných pro aktivaci C-terminální domény. Homodimery se vytvářejí nezávisle na světle. Dimer se patrně liší svými vlastnostmi na světle a ve tmě. K modifikaci dimeru dochází po percepci modrého světla flavinem, který se však nachází v C-terminální doméně, což vede k postupné změně vlastností C-terminální domény, popřípadě k její aktivaci. Mutace v N-terminální doméně eliminuje možnost



dimerizace. To má za následek neschopnost zprostředkovávat správnou změnu C-domény nezbytnou pro její aktivaci (Sang et al., 2005).

Krytochrom1 se vyskytuje ve třech vzájemně přeměnitelných redoxních formách – FAD (plně oxidovaná forma), semichinon (FADH<sup>•</sup>) a FADH<sup>-</sup> (plně redukováná forma). Ve tmě se akumuluje inaktivní CRY1 obsahující oxidovaný flavin. Modré světlo vyvolává fotoredukci flavinu a vytváří se fotoekvilibrum, kdy je podporována semichinonová forma před FAD a FADH<sup>-</sup>. Semichinonová forma je signální formou receptoru. Krytochrom ve formě semichinonu je mnohem stabilnější než tato forma fotolyás (Bouly et al., 2007).

Je možné, že podobný způsob světelné aktivace, zahrnující fotoredukci oxidovaného flavinu, se vyvinul kromě rostlinných fotoreceptorů také u živočišných fotoreceptorů. Naopak CRY-DASH krytochromy neakumulují po světelné aktivaci flavinový radikál, ale namísto toho prochází rychlou fotokonverzí na plně redukovanou formu flavinu, podobně jako fotolyázy (Bouly et al., 2007).

Krytochromy se dělí do tří skupin – rostlinné krytochromy, živočišné krytochromy a DASH krytochromy. Jak již bylo řečeno, krytochromy nejsou schopny reparace DNA, avšak nedávno byla prokázána schopnost DASH krytochromů opravovat jednovláknovou DNA (Bouly et al., 2007).

U *Arabidopsis thaliana* byly dosud popsány tři krytochromy – CRY1, CRY2 a CRY3 (Taiz et Zeiger, 2006). CRY1 zprostředkovává inhibici prodlužování hypokotylu, růst děloh a akumulaci antokyanů. (Sang et al., 2005). Mutant *cry1* (dříve označovaný jako *hy4*) je typický dlouhým hypokotylem při růstu na modrém světle, což znamená, že se u něj neprojevuje modrým světlem stimulovaná inhibice prodlužování (Schäfer et Nagy, 2006). U *Arabidopsis* byl později také objeven krytochrom2 (CRY2). Tento krytochrom je zapojen v regulaci inhibice růstu světlem a fotoperiodické regulaci iniciace kvetení. CRY2 je narozdíl od CRY1 na světle degradován. Jeho degradace probíhá postupně za kontinuálního osvětlení modrým světlem. Degradován je pouze fosforylovaný CRY2. K fosforylaci, ubiquitinaci a následné degradaci CRY2 dochází v jádře (Yu et al., 2007). Nejvýznamnějším znakem mutanta *cry2* je pozmeněná doba kvetení (Schäfer et Nagy, 2006). Oba zmiňované krytochromy se účastní indukce kvetení a regulace denních rytmů (Taiz et Zeiger, 2006). V roce 2003 byl u *Arabidopsis* popsán další krytochrom a to CRY3. Jeho produkt je kódován v jádře, ale lokalizován

je v mitochondriích a chloroplastech (Schäfer et Nagy, 2006). Transport proteinu CRY3 do mitochondrií a chloroplastů je zajištěn jeho N-terminální doménou. Protein CRY3 patří do skupiny CRY-DASH proteinů (Huang et al., 2006).

Krytochromy CRY1 a CRY2 jsou lokalizovány v jádře, ale CRY1 je v závislosti na světle transportován mezi jádrem a cytoplazmou. Toto nebylo u CRY2 zaznamenáno (Yu et al., 2007).

Hlavním signálním mechanismem krytochromů je interakce s COP1, který se váže na C-terminální doménu CRY1 a CRY2. COP1 je zinc finger protein mající vlastnosti E3-ubikvitinligázy. Ve tmě usnadňuje degradaci proteinů pozitivně regulujících fotomorfogenezi v proteázomech, například transkripčního faktoru HY5. V tomto ohledu je tedy negativním regulátorem fotomorfogeneze. Tato negativní regulace je pak tlumena světlem (Schäfer et Nagy, 2006). Na světle je COP1 transportován z jádra do cytoplazmy, což mu znemožňuje vázat se na zmíněné transkripční faktory. Ty se pak mohou vázat na promotory genů zprostředkovávajících fotomorfogenezi (Taiz et Zeiger, 2006).

Krytochromy se v průběhu evoluce patrně vyvinuly několikrát, nezávisle z odlišných fotolyasových předků. Klasické rostlinné krytochromy (jako CRY1 a CRY2 *Arabidopsis*) vznikly z CPD fotolyas prvního typu, zatímco živočišné krytochromy (jako například krytochromy octomilky a savců) se vyvinuly z 6-4 fotolyas. Krytochromy skupiny DASH se vyvinuly nezávisle z ještě jiného fotolyasového předka (Bouly et al., 2007).

### **2.3.3 Fototropiny**

Fototropiny jsou další ze skupiny specifických receptorů modrého světla a UV-A. Původně byly fototropiny popsány jako fotoreceptory pro fototropismus (Christie et al., 1998). Fototropiny však hrají také roli v pohybu chloroplastů, otevírání stomat, rozložení listů, rychlé inhibici růstu etiolovaných klíčnicích rostlin a patrně také v pohybech za sluncem (Schäfer et Nagy, 2006).

Jedná se o proteiny obsahující ve své C-terminální části serin/threonin kinázu (Ser/Thr kinázu) a v N-terminální části dvě vazebná místa pro chromofor, jímž je flavinmononukleotid (FMN), které se označují jako LOV1 a LOV2. Každá LOV doména váže jeden FMN (Schäfer et Nagy, 2006). LOV domény jsou nápadně podobné motivům nacházejícím se v nejrůznějších proteinech eukaryot i prokaryot zajišťujících

vnímání světla (light), kyslíku (oxygen) či napětí (voltage), odtud zkratka LOV (Jones et Christie, 2008).

I když se LOV domény fototropinů vyznačují vysokým stupněm sekvenční podobnosti a téměř stejnou terciální strukturou, mají odlišné fotochemické vlastnosti a také jiné funkce v regulaci aktivity fototropinů. LOV2 doména je nezbytná pro světlem aktivovanou autofosforylaci a ve tmě patrně působí jako represor kinasové aktivity fototropinů (Kaiserli et al., 2009). Ke snížení represe dochází po fotoexcitaci, která vede k autofosforylaci fototropinu (Jones et Christie, 2008). Ve srovnání s LOV2 doménou je funkce LOV1 domény stále nejasná (Kaiserli et al., 2009). LOV1 patrně zajišťuje dimerizaci receptoru a/nebo reguluje fotoreaktivitu LOV2 (Jones et Christie, 2008).

Ačkoli jsou fototropiny silně hydrofilní, jsou svým výskytem vázány na plazmatickou membránu. U *Arabidopsis* bylo pozorováno, že po ozáření modrým světlem se část PHOT1 uvolňuje z membrány, zatímco PHOT2 se spojuje s Golgiho aparátem (Kaiserli et al., 2009).

Ve tmě každá LOV doména nekovalentně váže jeden FMN. Působením modrého světla dochází ke kovalentnímu navázání FMN na cysteinový zbytek každé LOV domény, což vyvolá změnu konformace proteinu a tím i změnu jeho kinasové aktivity (Goh, 2009). Výsledkem je autofosforylace, která je nezbytným předpokladem pro signalizaci fototropinů (Kaiserli et al., 2009).

Většina rostlin obsahuje dva fototropiny a to fototropin 1 (PHOT1) a fototropin 2 (PHOT2) (Matsuoka et Tokutomi, 2005) mající překrývající se i rozdílné funkce. Oba regulují fototropismus, otevírání stomat, zvětšování listů a akumulaci reakci chloroplastů za nízkých intenzit světla, ale liší se svou citlivostí ke světlu. Zatímco PHOT1 zprostředkovává rychlou inhibici růstu hypokotylu po přenosu klíčnicích rostlin rostoucích ve tmě na světlo, PHOT2 odpovídá za vyhýbavou reakci chloroplastů za vysokých intenzit světla a zajišťuje akumulaci reakci na bázi buněk ve tmě (Kaiserli et al., 2009). PHOT2 patrně není zapojen v rychlé inhibici růstu, což může vysvětlovat jeho velmi nízká exprese v etiolovaných rostlinách. Zvýšení exprese PHOT2 vyžaduje fototransformaci phyA červeným světlem (Schäfer et Nagy, 2006).

## 3 MATERIÁL A METODIKA

### 3.1 Prováděné pokusy

Byly prováděny následující pokusy:

- 1) Studium klíčení semen mutanta rajčete *7B-1* a odpovídající kontrolní rostliny v podmínkách *in vitro* v přítomnosti exogenně aplikovaného inhibitoru aniontových kanálů 9-AC v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo, červené světlo). Inhibitor byl použit v následujících koncentracích 0, 1, 5, 10 a 30  $\mu\text{mol}$  (viz níže).
- 2) Studium klíčení semen mutantů rajčete *cry1-1* a *cry1-2* a odpovídající kontrolní rostliny (kultivar MoneyMaker) v podmínkách *in vitro* v přítomnosti exogenně aplikovaného inhibitoru aniontových kanálů 9-AC v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo, červené světlo). Byly použity následující koncentrace inhibitoru: 0, 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$  a dále také koncentrace 30  $\mu\text{mol}$  (bližší informace níže).
- 3) Studium klíčení semen mutantů rajčete *cry1-1* a *cry1-2* a odpovídající kontrolní rostliny v podmínkách *in vitro* v přítomnosti exogenně aplikovaného inhibitoru aniontových kanálů NPPB v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo, červené světlo). Inhibitor byl použit v koncentracích 0, 20, 40 a 80  $\mu\text{mol}$ .
- 4) Studium klíčení semen mutantů rajčete *cry1-1* a *cry1-2* a odpovídající kontrolní rostliny v podmínkách *in vitro* v přítomnosti exogenně aplikovaného inhibitoru draselných kanálů tolbutamidu v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo, červené světlo). Inhibitor byl použit v koncentracích 0, 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$ .

### 3.2 Rostlinný materiál

Pokusy byly prováděny na semenech rajčete *Solanum lycopersicum* L. a jeho mutantech. V experimentech byli použiti následující mutanti rajčete a jim odpovídající standardní rostliny (wild-type, WT). Recesivní „single gene“ mutant *7B-1* s dosud neznámým defektem v signální dráze modrého světla (Fellner et Sawhney, 2002), který byl vyselektován na základě samčí sterility závislé na fotoperiodě. Za dlouhých dní (fotoperioda 16 hodin světlo, 8 hodin tma) vykazují rostliny samčí sterilitu. Naopak za krátkého dne (fotoperioda 8 hodin světla, 16 hodin tma) jsou rostliny fertillní. Odpovídajícím WT tohoto mutanta je kultivar Rutgers (Sawhney, 1997, Fellner et

Sawhney, 2001). Mutant *7B-1* byl poskytnut na základě licence V. K. Sawhney z University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada. Dále pak byli použiti mutanti *cryI-1* a *cryI-2* s defektem v genu kódujícím kryptochrom1 (CRY1; Weller et al., 2001). Tito mutanti byli vytvořeni ozářením  $\gamma$ -paprsky a k nim odpovídající WT je kultivar MoneyMaker (cv. MM). Tito mutanti byli laskavě poskytnuti R. E. Kendrickem z Wageningen University, Wageningen, The Netherlands.

### **3.3 Příprava MS média**

Pro přípravu 2 l MS pevného (agarového) kultivačního MS média (Murashige et Skoog, 1962) bylo potřeba 20 g 1% sacharózy, 8,6 g MS média, 0,3904 g 1mM MES pufru a 2,8 g 0,7% fytoagaru. V Erlenmayerově baňce bylo postupně rozpuštěno v 1 l destilované vody navážené množství sacharózy, MS média a MES pufru. Po důkladném promíchání byl objem doplněn na 2 l. Poté pomocí pH metru bylo pH roztoku před autoklávováním upraveno na hodnotu 6,1 přidáním 1M KOH. Nakonec do pěti připravených sklenic s fytoagarem bylo nalito 400 ml připraveného roztoku. Sklenice s připraveným médiem byly vyautoklávovány a po zchlazení uloženy do lednice.

### **3.4 Sterilizace semen**

Na jeden pokus bylo potřeba napočítat přibližně 380 semen každého genotypu. Napočítaná semena byla v uzavřených plastových centrifugačních zkumavkách s označením genotypu za občasného protřepání sterilizována v 3% roztoku Sava po dobu asi 20 minut. Poté byla semena pomocí 10 ml pipety alespoň šestkrát promyta sterilizovanou destilovanou vodou. Všechny operace se semeny byly nadále prováděny ve flow-boxu za sterilních podmínek.

### **3.5 Kultivace semen**

Semena byla vysazována do Petriho misek na pevné MS médium s různou koncentrací inhibitoru iontových kanálů. Misky s různou koncentrací inhibitoru byly připravovány tak, že do rozehřátého média (po rozvaření v mikrovlnné troubě bylo potřeba nechat médium zchladit na pokojovou teplotu) bylo přidáno potřebné množství zvoleného inhibitoru iontových kanálů. Koncentrace zásobního roztoku inhibitoru 9-AC byla  $10^{-2}$  mol/l. V případě mutanta *7B-1* a WT bylo potřeba na přípravu Petriho misek s jednou koncentrací inhibitoru celkem 120 ml média (20 ml na jednu misku). Požadované koncentrace inhibitoru byly 0 (tedy médium bez inhibitoru), 1, 5, 10  $\mu$ mol,

popř. 30  $\mu\text{mol}$  a proto tedy bylo pro přípravu inhibitoru o dané koncentraci potřeba 12, 60, 120 a 360  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku 9-AC (viz tabulka č. 2). Miska bez inhibitoru sloužila jako kontrola. V případě mutantů *cry1-1*, *cry1-2* a kontrolní rostliny cv. MM bylo potřeba na jednu koncentraci inhibitoru 180 ml média. Potřebné koncentrace inhibitoru 9-AC byly rovněž 0 (tedy médium bez inhibitoru), 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$ , popř. 30  $\mu\text{mol}$ . Pro přípravu požadovaných koncentrací bylo tedy potřeba 18, 90, 180 a 540  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku inhibitoru (viz tabulka č. 2). U genotypů *cry1-1*, *cry1-2* a MM byly vedle pokusů s 9-AC prováděny také pokusy s NPPB. Pro použité koncentrace (0, 20, 40 a 80  $\mu\text{mol}$ ) bylo potřeba 0, 360, 720 a 1440  $\mu\text{l}$  zásobního roztoku inhibitoru (koncentrace zásobního roztoku  $10^{-2}$  mol/l). U genotypů *cry1-1*, *cry1-2* a cv. MM byly dále prováděny také experimenty s inhibítorem tolbutamidem. Pro přípravu použitých koncentrací, tj. 0, 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$ , bylo potřeba 0, 18, 90 a 180  $\mu\text{mol}$  zásobního roztoku inhibitoru (koncentrace zásobního roztoku byla rovněž  $10^{-2}$  mol/l).

Na každou misku s 20 ml média bylo vysazeno 30 semen daného genotypu. Výsadba semen probíhala s pomocí pinzety. Po vysazení byly misky dvakrát obtočeny páskou z netkané textilie (Urgopore) a umístěny do plně automatických růstových komor (Microclima 1000E, Snijders Scientific B. V., The Netherlands). Semena byla inkubována při teplotě 23°C ve tmě, na kontinuálním modrém (BL) nebo červeném světle (RL). Zdrojem modrého světla s maximem ozáření při 460 nm byly modré zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Phillips, USA). Zdrojem červeného světla s maximem ozáření při 660 nm byly červené zářivky Phillips TLD-36W/15-Red (Phillips, USA). Celkový fotonový proud (total photon fluence rate) modrého i červeného světla byl 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Fotonový proud byl měřen přenosným spektrometrem (model LI-1800; Li-Cor; Lincoln, NE) kalibrovaným na Katedře Biofyziky na Univerzitě Palackého v Olomouci. Misky se semeny určenými pro inkubaci ve tmě byly před umístěním do komory zabaleny do alobalu.

### **3.6 Sčítání klíčících semen a výpočty**

Semena zpravidla začínala klíčit 2-3 den po vysazení, proto také 2-3 den od výsadby bylo zahájeno sčítání klíčících semen, které trvalo asi do 10-11 dne od vysazení (stanoveno jako dostatečné řadou předchozích pokusů).

Ze získaných hodnot klíčení byly vypočítány průměrné hodnoty klíčení a standardní chyby (SE) pomocí programu MS Excel.

**Tabulka č. 2:** Množství zásobního roztoku inhibitorů 9-AC a tolbutamidu (koncentrace zásobního roztoku je  $10^{-2}$  mol/l) použité pro přípravu média s požadovanou koncentrací inhibitoru (1, 5, 10, 30  $\mu$ mol). Přepočítáno na 120 či 180 ml média, viz závorka pod názvem inhibitoru.

koncentrace inhibitoru [ $\mu$ mol]	potřebný objem inhibitoru [ $\mu$ l]		
	9-AC (120 ml)	9-AC (180 ml)	tolbutamid (180 ml)
1	12	18	18
5	60	90	90
10	120	180	180
30	360	540	-

## 4 VÝSLEDKY

Cílem práce bylo studovat možné mechanismy, jakými jsou iontové kanály zapojeny v klíčení, což bylo zjišťováno nepřímo aplikací inhibitorů iontových kanálů (9-AC, NPPB, tolbutamidu), a jak je funkce iontových kanálů ovlivněna kvalitou světla (studium efektu inhibitoru v závislosti na kvalitě světla). Pokusy byly prováděny na semenech mutantů rajčete *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2* a k nim odpovídajících kontrolních rostlin (cv. Rutgers a cv. Moneymaker).

Byl sledován vliv vzrůstající koncentrace inhibitorů na klíčení v závislosti na kvalitě světla (tma, modré světlo a červené světlo). Z hodnot klíčení stanovených 11. den od vysazení byl pro každý genotyp sestaven graf průměrného klíčení v závislosti na kvalitě světla a koncentraci inhibitoru. Dále pak byly pro jednotlivé koncentrace inhibitorů sestaveny grafy dynamiky klíčení zaznamenávající průměrné procentuální klíčení v jednotlivých dnech sčítání klíčících semen daného genotypu.

### 4.1 Klíčení semen mutanta rajčete *7B-1* a cv. Rutgers

Mutant *7B-1* je recesivní „single gene“ mutant s dosud neznámým defektem v signální dráze modrého světla (Fellner et Sawhney, 2002). U některých rostlin, například u rajčete, modré světlo inhibuje klíčení a to patrně prostřednictvím genu *7B-1*, který snižuje aktivitu či množství iontových kanálů zapojených v klíčení (Fellner et al., 2008a, Fellner et al., 2008b).

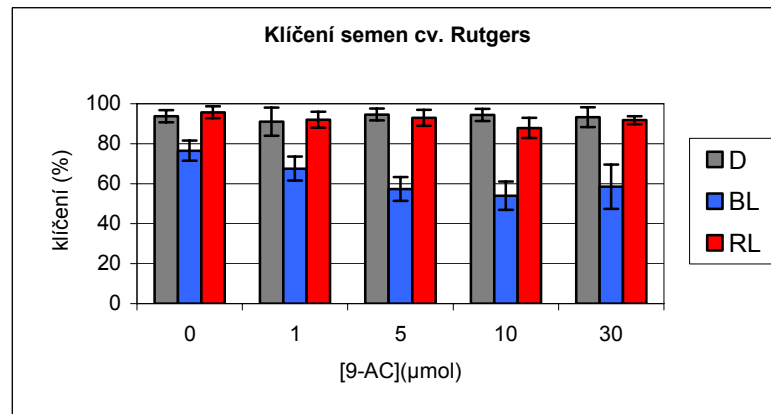
S mutantem *7B-1* a cv. Rutgers byly prováděny čtyři pokusy s inhibitorem aniontových kanálů 9-AC o koncentracích 0, 1, 5, 10  $\mu\text{mol}$ . Jelikož se účinek inhibitoru při koncentraci 1  $\mu\text{mol}$  výrazně neprojevoval, byla zvolena nová kombinace koncentrací a to 0, 5, 10 a 30  $\mu\text{mol}$ . S těmito koncentracemi inhibitoru byly provedeny další čtyři experimenty.

V grafu znázorňujícím průměrné procento klíčení semen cv. Rutgers (graf č. 1) lze vidět, že semena tohoto kultivaru ve tmě velice dobře klíčí (klíčení se pohybuje v rozmezí 90-95 %). Klíčení ve tmě není výrazně ovlivněno ani vzrůstající koncentrací inhibitoru 9-AC. Totéž platí i pro klíčení cv. Rutgers na červeném světle (klíčení se pohybuje od 88 do 96 %). Modré světlo a 9-AC nápadně inhibují klíčení tohoto genotypu, přičemž s rostoucí koncentrací inhibitoru je inhibice klíčení vyšší. Naopak klíčení semen *7B-1* (graf č. 2) není výrazně ovlivněno modrým světlem ani

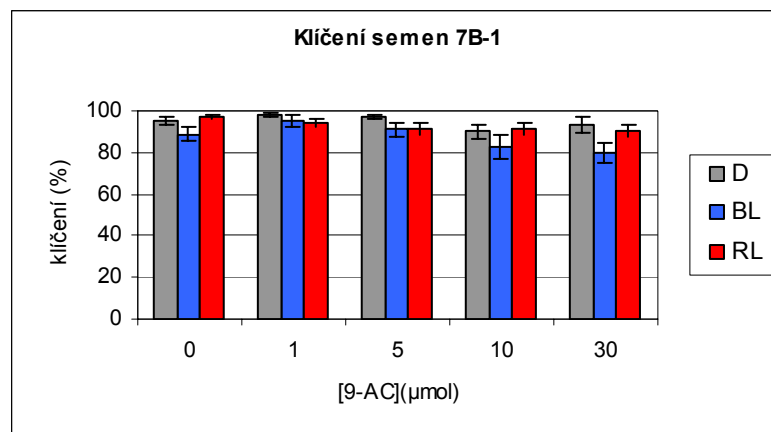


aplikovaným inhibítozem. Klíčení *7B-1* je podobné ve tmě, na modrém i červeném světle.

**Graf č. 1:** Průměrné procento klíčení semen rajčete cv. Rutgers na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů 9-AC ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4 až 8, průměrný počet semen v experimentu: 30).



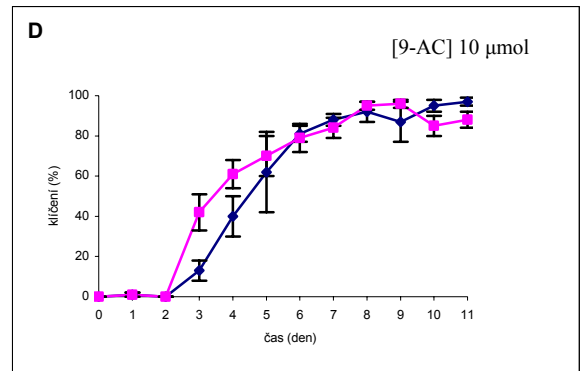
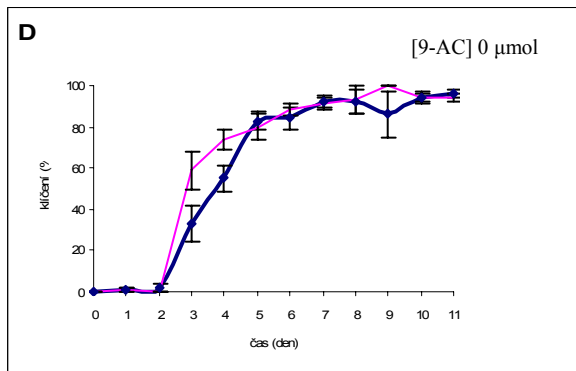
**Graf č. 2:** Průměrné procento klíčení semen rajčete *7B-1* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů 9-AC ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4 až 8, průměrný počet semen v experimentu: 30).



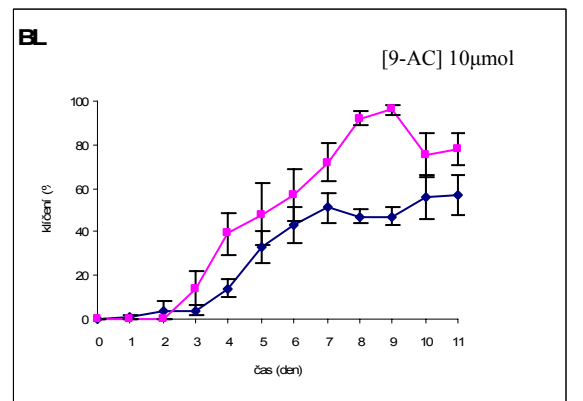
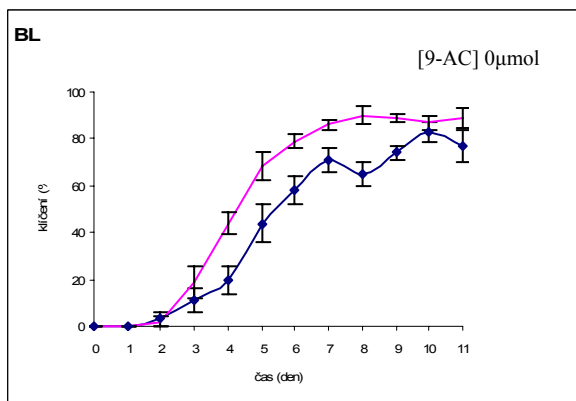
Dynamika klíčení cv. Rutgers a *7B-1* ve tmě (graf č. 3) je podobná, přičemž semena *7B-1* klíčí rychleji než semena kontrolní rostliny. Působením inhibitoru dochází ke zpomalení rychlosti klíčení obou genotypů v počátečních fázích klíčení, přičemž konečná hodnota klíčení při různých koncentracích inhibitoru se zhruba neliší. Na modrém světle (graf č. 4) dochází k nápadnému zpomalení klíčení především ve dnech nástupu klíčení jak u WT, tak u *7B-1* a to již při klíčení na médiu bez inhibitoru. S rostoucí koncentrací inhibitoru 9-AC dochází u WT k dalšímu

zpomalení klíčení, které se projevuje i v poklesu celkového procenta klíčení semen. K tomuto u *7B-1* nedochází. Dynamika klíčení na červeném světle (graf č. 5) obou testovaných genotypů je stejná a podobá se dynamice klíčení ve tmě (graf č. 3). S rostoucí koncentrací inhibitoru se počátek klíčení opět zpožďuje, ale celkové procento klíčení při jednotlivých koncentracích inhibitoru se nápadně neliší.

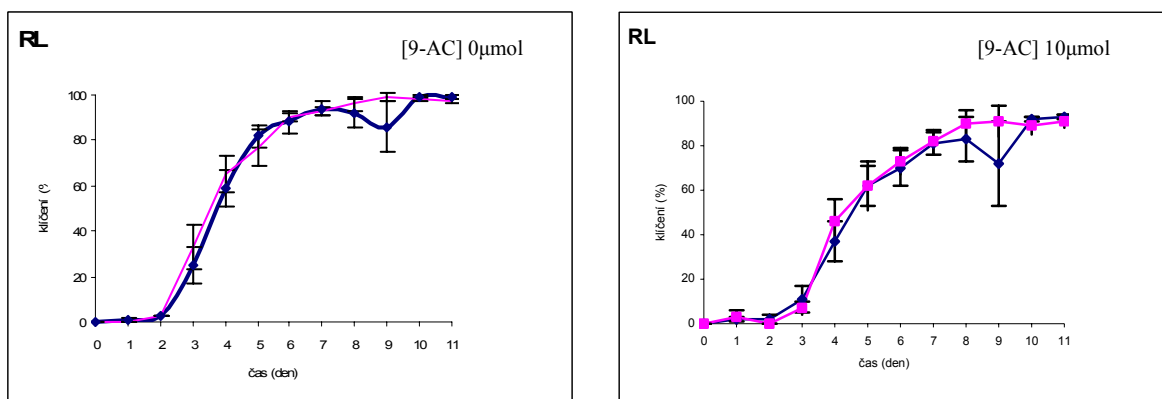
**Graf č. 3:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. Rutgers (*modrá*) a *7B-1* (*růžová*) ve tmě při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafch je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 8, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 4:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. Rutgers (*modrá*) a *7B-1* (*růžová*) na modrém světle při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafch je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 8, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 5:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. Rutgers (modrá) a 7B-1 (růžová) na červeném světle při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 8, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



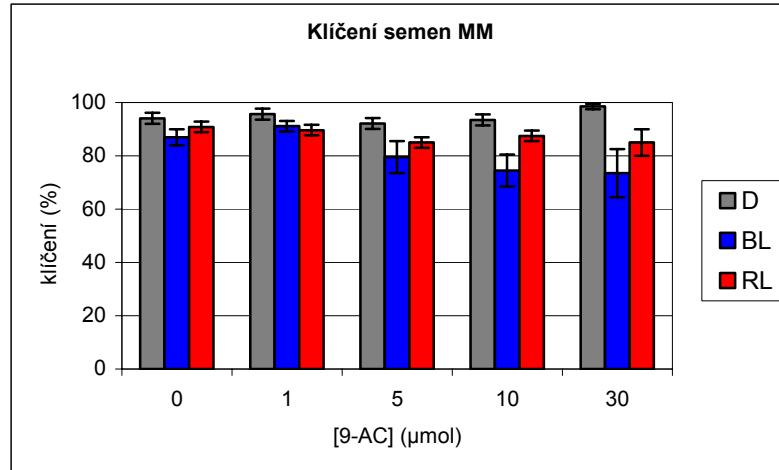
## 4.2 Klíčení semen mutantů rajčete *cry1-1* a *cry1-2* a cv. MM

Mutanti rajčete *cry1-1* a *cry1-2* se vyznačují defektem v genu kódujícím fotoreceptor modrého světla kryptochrom1 (CRY1; Weller et al., 2001). Předpokládá se, že funkční CRY1 podporuje klíčení na modrém světle a to patrně tím, že zvyšuje aktivitu, množství popřípadě expresi iontových kanálů nutných ke klíčení (Fellner et al., 2008a). Semena těchto genotypů byla kultivována v přítomnosti různých koncentrací inhibitorů aniontových (9-AC a NPPB) či draselných kanálů (tolbutamid).

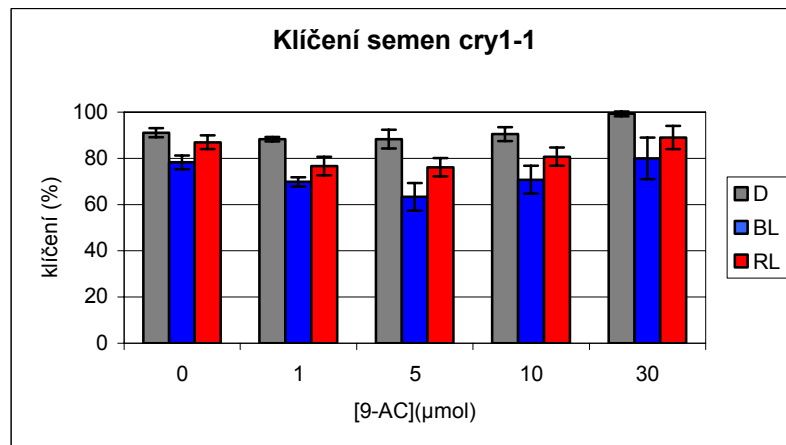
### 4.2.1 Klíčení semen mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a cv. MM v přítomnosti 9-AC

Semena mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a odpovídající kontrolní rostliny cv. MM byla kultivována na médiu s různými koncentracemi inhibitoru aniontových kanálů 9-AC. Nejprve byla prováděna série šesti pokusů s koncentracemi inhibitoru 0, 1, 5, 10  $\mu\text{mol}$ . Následně byly provedeny dva pokusy s koncentracemi 0 a 30  $\mu\text{mol}$  pro ujasnění chování klíčení při vyšší koncentraci 9-AC. Nakonec byly pokusy doplněny pro zvýšení počtu opakování dvěma experimenty s koncentracemi 0, 10 a 30  $\mu\text{mol}$ . Celkově byly pokusy s koncentracemi inhibitoru 0  $\mu\text{mol}$  opakovány desetkrát, s koncentracemi 1 a 5  $\mu\text{mol}$  šestkrát, s koncentrací 10  $\mu\text{mol}$  osmkrát a s koncentrací 30  $\mu\text{mol}$  čtyřikrát.

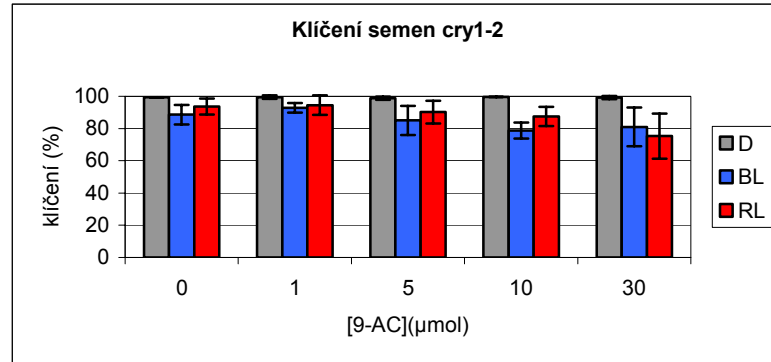
**Graf č. 6:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu MM na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů 9-AC ve tmě, na červeném a modrém světle 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4 až 10, průměrný počet semen v experimentu: 30).



**Graf č. 7:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-1* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů 9-AC ve tmě, na červeném a modrém světle 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4 až 10, průměrný počet semen v experimentu: 30).

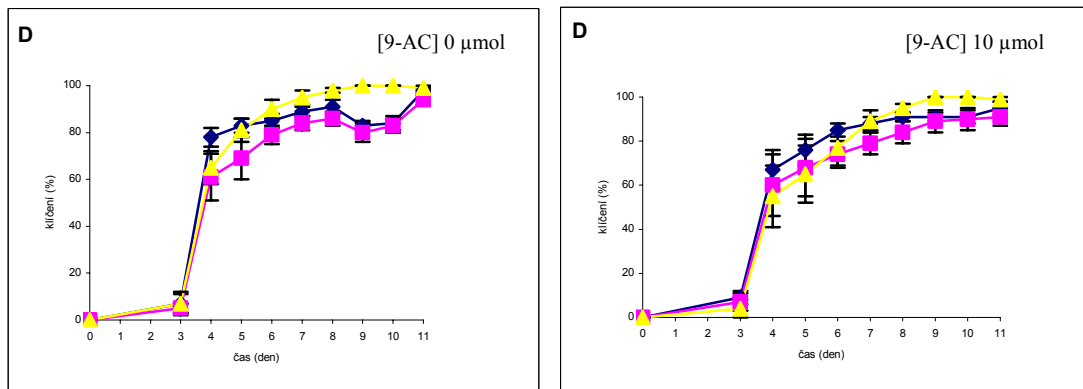


**Graf č. 8:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-2* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů 9-AC ve tmě, na červeném a modrém světle 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4 až 10, průměrný počet semen v experimentu: 30).

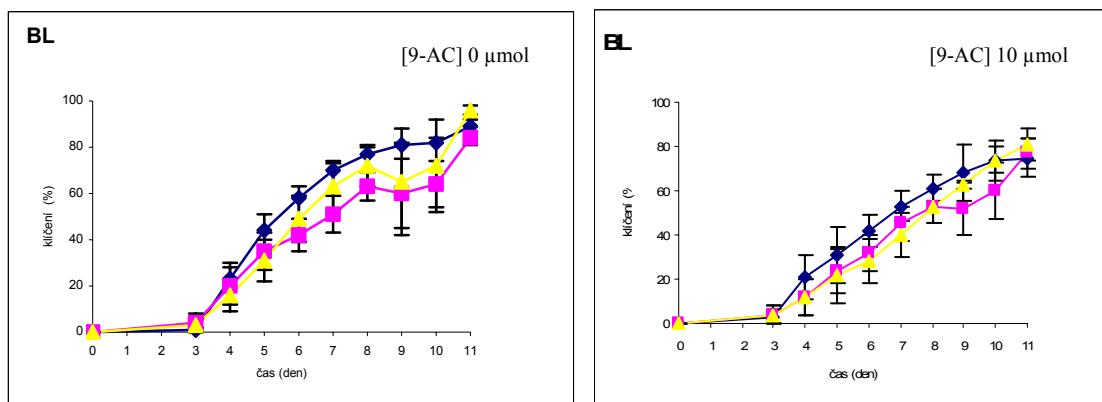


Z grafu průměrného klíčení cv. MM (tj. graf č. 6) je patrné, že modré světlo mírně inhibuje klíčení, přičemž však rozdíly v klíčení semen inkubovaných ve tmě a na modrém světle nejsou statisticky významné. Graf rovněž ukazuje, že na červeném světle semena cv. MM klíčila podobně jako ve tmě. Totéž platí pro průměrné klíčení semen mutanta *cry1-2* (graf č. 8). Zajímavá je situace u genotypu *cry1-1* (graf č. 7), kdy při koncentraci inhibitoru 9-AC 5  $\mu\text{mol}$  je klíčení na modrém světle výrazně inhibováno. Při ostatních koncentracích inhibitoru není opět inhibice významná. Rovněž rozdíly v klíčení mezi jednotlivými genotypy nejsou významné. Pro všechny testované genotypy tedy platí, že jejich klíčení není významně ovlivněno kvalitou světla ani vzrůstající koncentrací inhibitoru, s výjimkou koncentrace 5  $\mu\text{mol}$  u mutanta *cry1-1* (viz graf č. 7).

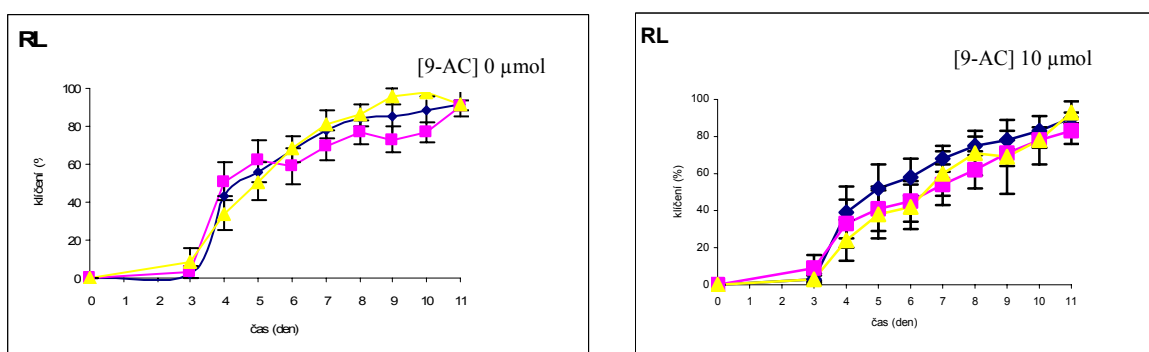
**Graf č. 9:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) ve tmě při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 10:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) na modrém světle při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 11:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) na červeném světle při koncentracích inhibitoru 9-AC 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



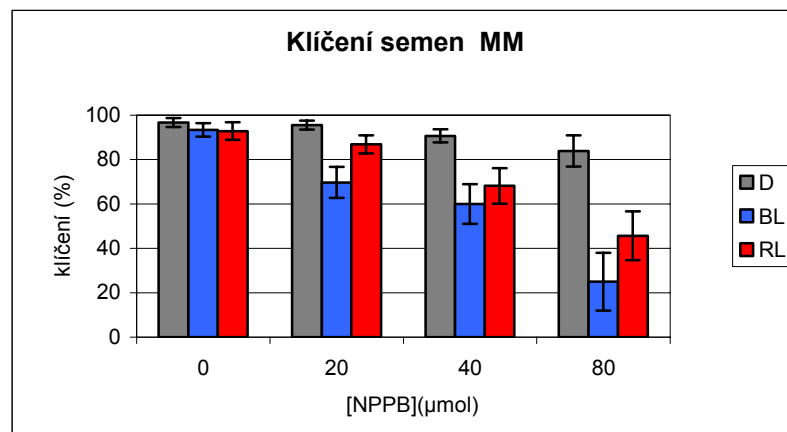
V grafech dynamiky klíčení je možno vidět, že dynamika klíčení ve tmě (graf č. 9) není nápadně ovlivněna vyšší koncentrací 9-AC. Naopak na modrém (graf č. 10) a červeném (graf č. 11) světle se zdá, že inhibitor zpomaluje klíčení, ale z pohledu celkového klíčení to není významné, protože celkově vyklíčí zhruba stejné procento semen.

#### 4.2.2 Klíčení semen mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a cv. MM v přítomnosti NPPB

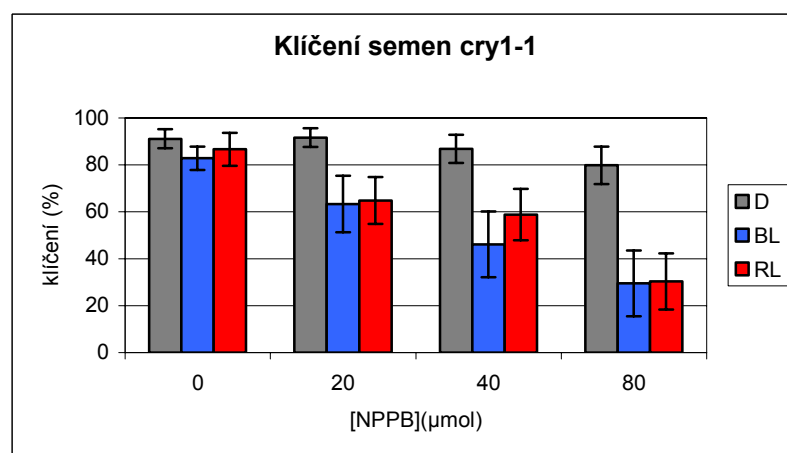
Semena mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a odpovídající kontrolní rostliny cv. MM byla kultivována ve tmě, na modrém světle a červeném světle rovněž na médiu s různými koncentracemi inhibitoru aniontových kanálů NPPB. Inhibitor byl použit v koncentracích 0, 20, 40, 80  $\mu\text{mol}$ . Celkem bylo provedeno šest pokusů s každou ze zmiňovaných koncentrací.

Z průměrného procenta klíčení semen (graf č. 12, č. 13 a č. 14) všech tří genotypů je patrné, že semena klíčí nejlépe ve tmě, přičemž na klíčení ve tmě nemá vliv rostoucí koncentrace inhibitoru NPPB. Na modrém světle je situace opačná. U testovaných genotypů se s rostoucí koncentrací NPPB zvyšuje inhibice klíčení. Podobný trend lze pozorovat i při klíčení na červeném světle, kdy opět s rostoucí koncentrací inhibitoru klesá klíčení, a to u všech tří zkoumaných genotypů.

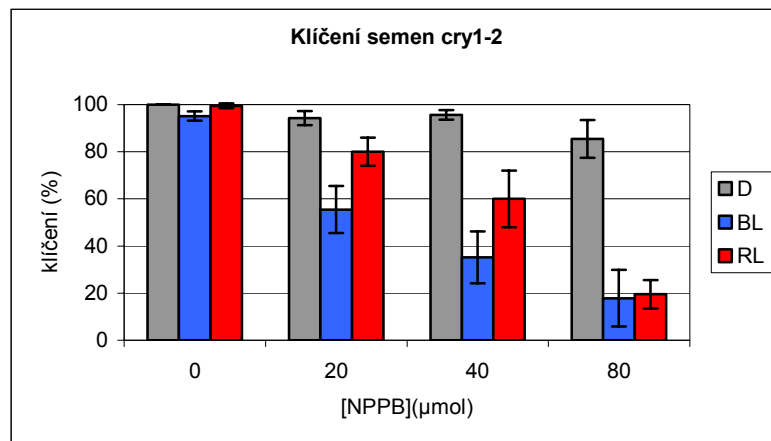
**Graf č. 12:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu MM na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů NPPB ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, průměrný počet semen v experimentu: 30).



**Graf č. 13:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-1* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů NPPB ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, průměrný počet semen v experimentu: 30).



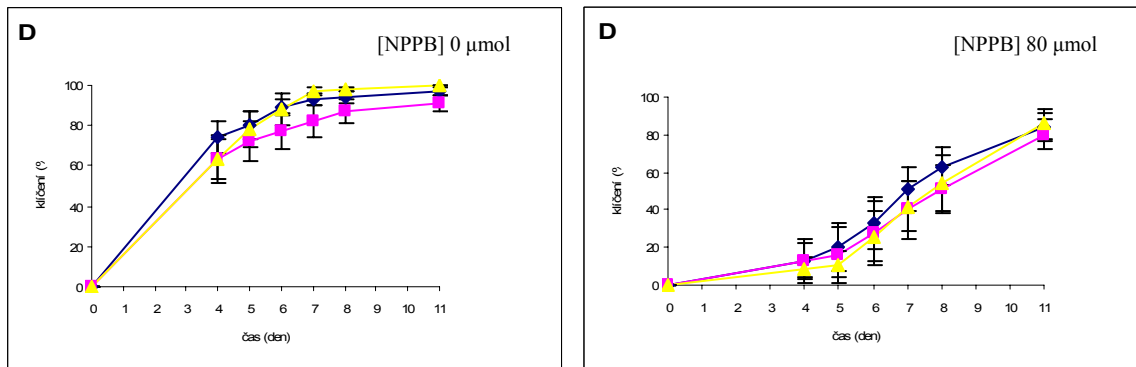
**Graf č. 14:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-2* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru aniontových kanálů NPPB ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, průměrný počet semen v experimentu: 30).



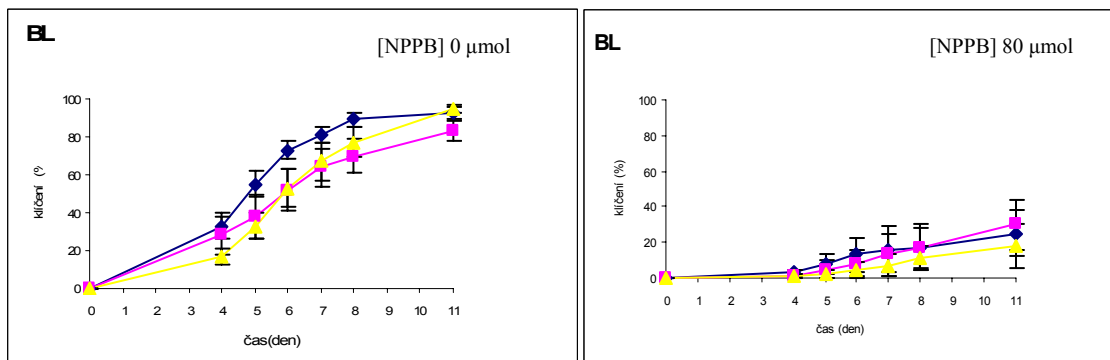
V grafech dynamiky klíčení semen cv. MM a mutantů *cry1-1* a *cry1-2* je při porovnání průběhu jednotlivých klíčení na médiu bez inhibitoru zřejmé, že již při klíčení bez působení inhibitoru dochází ke zpomalení klíčení na modrém (graf č. 16) i na červeném světle (graf č. 17) ve srovnání s dynamikou klíčení ve tmě (graf č. 15). Tato inhibice je v tomto případě vyvolána pouze činností světla, ale není patrná v konečné hodnotě klíčení při porovnání s klíčením za tmy. Když se k působení světla připojí ještě činnost inhibitoru NPPB je zpomalení klíčení ještě nápadnější, viz grafy dynamiky klíčení při koncentraci NPPB 80  $\mu\text{mol}$  (graf č. 16 a 17). Vlivem inhibitoru dochází ke zpomalení dynamiky klíčení také ve tmě, ale výsledek inhibice není patrný v konečném výsledku klíčení. Naopak zpomalení klíčení na modrém a červeném světle se projevuje také v konečném procentu klíčení semen. Všechny tři testované genotypy reagují na vliv světla a inhibitoru podobně.



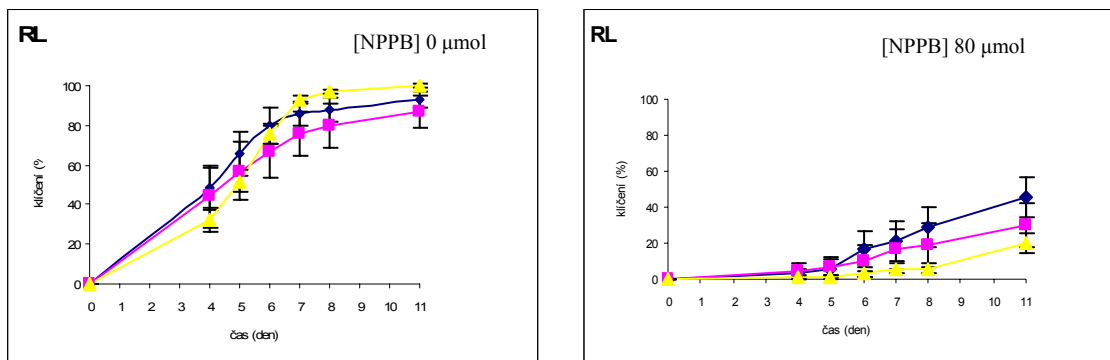
**Graf č. 15:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cryI-1* (růžová) a *cryI-2* (žlutá) ve tmě při koncentracích inhibitoru NPPB 0 a 80  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 16:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cryI-1* (růžová) a *cryI-2* (žlutá) na modrém světle při koncentracích inhibitoru NPPB 0 a 80  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



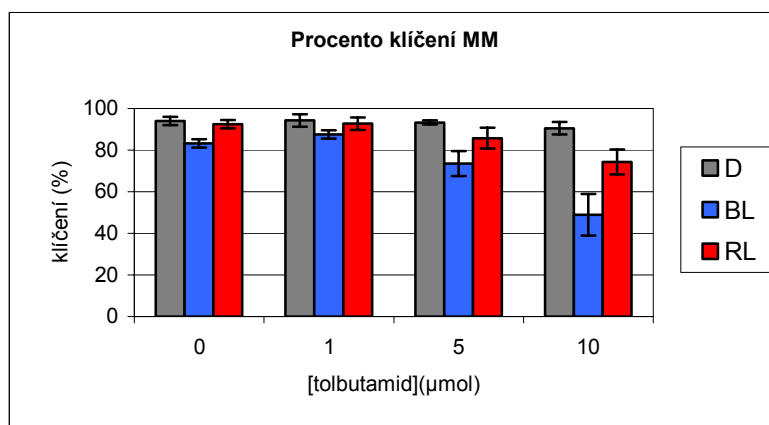
**Graf č. 17:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cryI-1* (růžová) a *cryI-2* (žlutá) na červeném světle při koncentracích inhibitoru NPPB 0 a 80  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 6, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



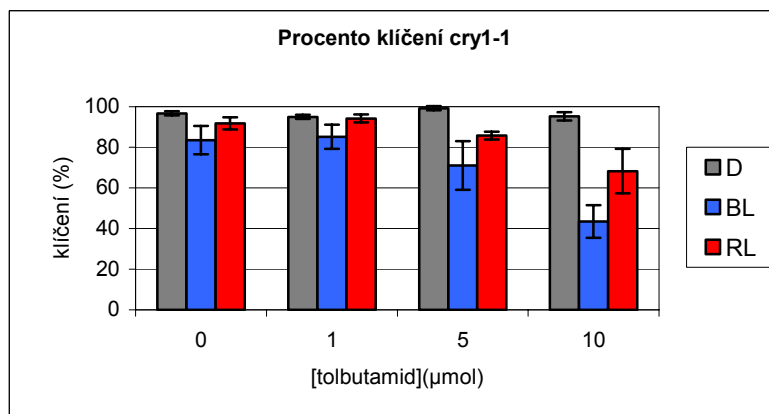
### 4.2.3 Klíčení semen mutantů *cry1-1* a *cry1-2* a cv. MM v přítomnosti tolbutamidu

Poslední řada pokusů s mutanty *cry1-1* a *cry1-2* a cv. MM byla prováděna s inhibítorem draselných kanálů tolbutamidem, který byl použit v koncentracích 0, 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$ . Celkově byly provedeny čtyři pokusy s každou koncentrací.

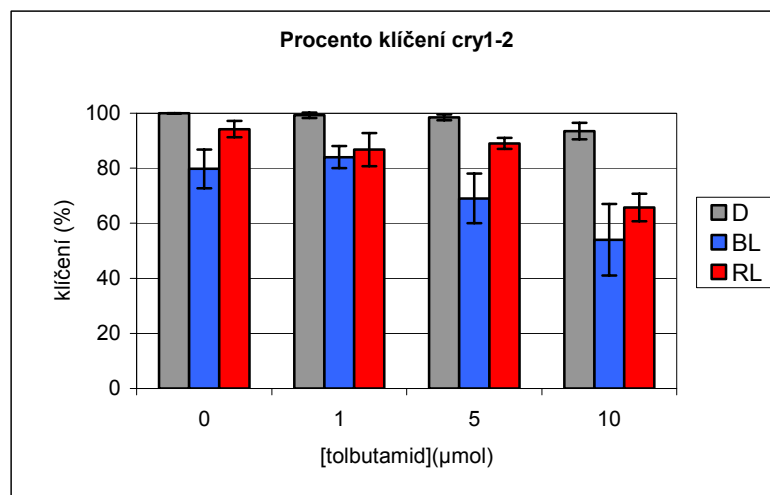
**Graf č. 18:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu MM na médiu s rostoucí koncentrací inhibítora draselných kanálů tolbutamidu ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibítora ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, průměrný počet semen v experimentu: 30).



**Graf č. 19:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-1* na médiu s rostoucí koncentrací inhibítora draselných kanálů tolbutamidu ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibítora ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, průměrný počet semen v experimentu: 30).



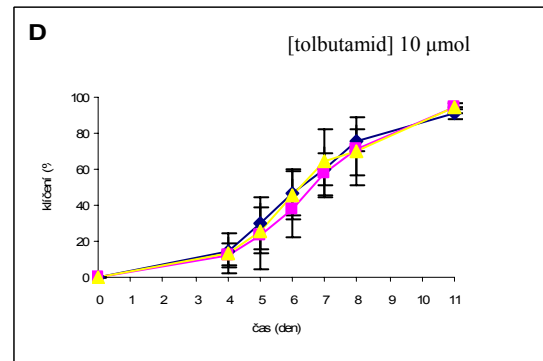
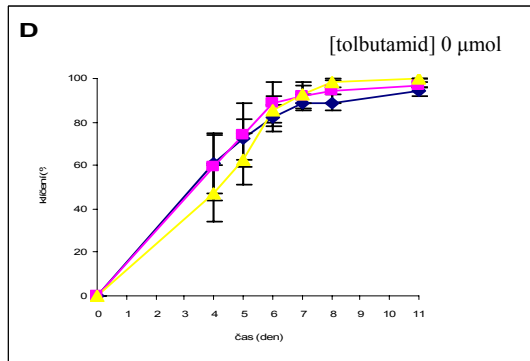
**Graf č. 20:** Průměrné procento klíčení semen rajčete genotypu *cry1-2* na médiu s rostoucí koncentrací inhibitoru draselných kanálů tolbutamidu ve tmě (D), na modrém (BL) a červeném světle (RL) 11. den od výsevu. Na ose x jsou uvedeny použité koncentrace inhibitoru ( $\mu\text{mol}$ ) a osa y udává počet vyklíčených semen v procentech. Hodnoty v grafu ukazují průměrné klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, průměrný počet semen v experimentu: 30).



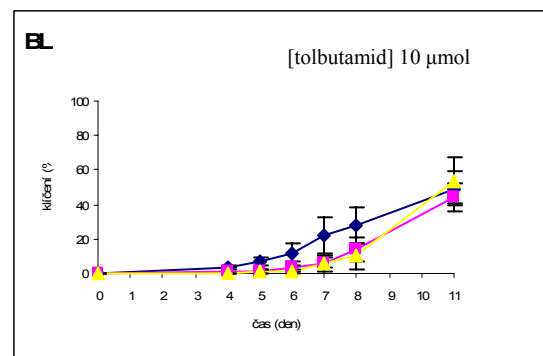
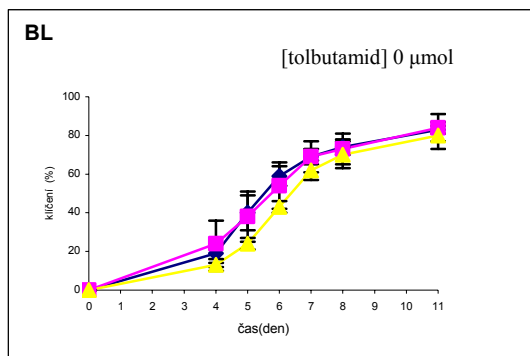
V grafech průměrného procenta klíčení semen (graf č. 18, 19 a 20) lze vidět, že testované genotypy rajčete se opět v reakci na světlo a tolbutamid chovají podobně. Nejlépe jejich semena klíčí ve tmě, přičemž klíčení ve tmě není ovlivněno rostoucí koncentrací inhibitoru. Při klíčení na modrém světle je patrná inhibice klíčení, která se zvyšuje s rostoucí koncentrací aplikovaného inhibitoru. Klíčení je ovlivněno rovněž na červeném světle, kdy se opět s rostoucí koncentrací tolbutamidu snižuje klíčení.

Dynamiky klíčení jsou na modrém (graf č. 22) a červeném světle (graf č. 23) již při klíčení bez inhibitoru zpomalené v porovnání s dynamikou klíčení bez inhibitoru ve tmě (graf č. 21), přičemž nápadnější je zpomalení na modrém světle. S rostoucí koncentrací tolbutamidu se postupně zpomaluje také dynamiky klíčení ve tmě (graf č. 21), ale to se neprojeví v konečném procentu klíčení. Oproti tomu zpoždování klíčení na modrém (graf č. 22) a červeném světle (graf č. 23) s rostoucí koncentrací tolbutamidu je patrné taky z hodnot konečného klíčení ve srovnání s klíčením ve tmě. Současné nebyly v dynamice klíčení pozorovány rozdíly mezi jednotlivými genotypy.

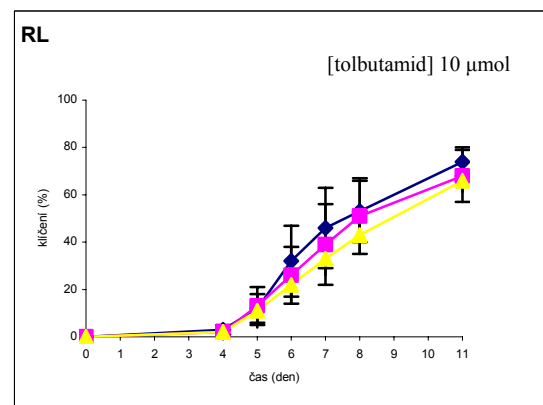
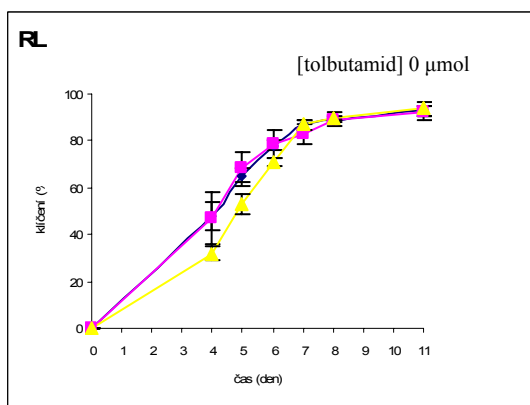
**Graf č. 21:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) ve tmě při koncentracích inhibitoru tolbutamidu 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 22:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) na modrém světle při koncentracích inhibitoru tolbutamidu 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



**Graf č. 23:** Dynamika klíčení semen rajčete cv. MM (modrá), *cry1-1* (růžová) a *cry1-2* (žlutá) na červeném světle při koncentracích inhibitoru tolbutamidu 0 a 10  $\mu\text{mol}$ . V grafech je uvedeno průměrné procento klíčení  $\pm$  SE (počet opakování 4, počet semen na misce 30). Osa x představuje jednotlivé dny klíčení a osa y počet vyklíčených semen v procentech.



## 5 DISKUSE

Je známo, že modrým světlem indukované aniontové kanály jsou zapojeny v růstu hypokotylu kontrolovaném modrým světlem (Cho et Spalding, 1996), ale dosud není mnoho známo o zapojení iontových kanálů v klíčení (Fellner et al., 2007). Cílem diplomové práce bylo studovat možné mechanismy, kterými jsou iontové kanály zapojeny v klíčení semen. Pokusy byly prováděny na semenech rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), přičemž byli použiti následující mutanti a k nim odpovídající kontrolní rostliny (WT): mutant *7B-1* (WT cv. Rutgers) a mutanti *cry1-1* a *cry1-2* (WT cv. Moneymaker). Strategie experimentů spočívala v aplikaci inhibitorů aniontových (9-AC, NPPB) či draselných kanálů (tolbutamid) a sledování vlivu rostoucí koncentrace zvoleného inhibitoru a kvality světla (tma, modré světlo, červené světlo) na klíčení semen daného genotypu.

Nejprve byly prováděny experimenty sledující vliv inhibitoru aniontových kanálů 9-AC (použité koncentrace 0, 1, 5, 10 a 30  $\mu\text{mol}$ ) na klíčení semen mutantu *7B-1* a cv. Rutgers. Jak již bylo řečeno, mutant *7B-1* je recesivní „single gene“ mutant s dosud neznámým defektem v signální dráze modrého světla (Fellner et Sawhney, 2002). Je známo, že u některých rostlin (rajče, *Arabidopsis*) modré světlo inhibuje klíčení semen (Fellner et al., 2007). K inhibici klíčení semen rajčete modrým světlem patrně dochází prostřednictvím genu *7B-1*, který pravděpodobně snižuje aktivitu či množství iontových kanálů zapojených v klíčení (Fellner et al., 2008a). Gen *7B-1* by mohl specificky v průběhu klíčení sloužit jako fotoreceptor modrého světla nebo být alespoň článkem signální dráhy modrého světla. Na druhé straně ale modré světlo také aktivuje či zvyšuje množství dalších iontových kanálů nutných ke klíčení a to prostřednictvím kryptochromu1 (CRY1) (Fellner et al., 2008a).

Experimenty ukázaly, že na klíčení semen cv. Rutgers ve tmě nemá vliv rostoucí koncentrace inhibitoru 9-AC. Červené světlo patrně nemá vliv na klíčení, nebo spíše podporuje klíčení, protože klíčení opět nebylo výrazně ovlivněno v porovnání s klíčením ve tmě. To ukazuje, že kanály citlivé k 9-AC nejsou potřeba pro klíčení semen ve tmě a na červeném světle, popřípadě se vyskytují ve velké množství. Zajímavá byla situace na modrém světle, kdy s rostoucí koncentrací 9-AC docházelo k inhibici klíčení semen cv. Rutgers. To znamená, že inhibitor aniontových kanálů

9-AC inhibuje klíčení u WT specificky na modrém světle, což naznačuje, že kanály citlivé k 9-AC jsou potřeba pro klíčení na modrém světle. Naopak klíčení semen mutanta *7B-1* nebylo ovlivněno kvalitou světla ani inhibitorem, bylo podobné ve tmě, na modrém i červeném světle. Klíčení semen *7B-1* je tedy necitlivé k inhibičnímu účinku modrého světla i k inhibičnímu účinku inhibitoru 9-AC. To může ukazovat na to, že funkční produkt genu *7B-1* by mohl negativně regulovat aktivitu či množství k 9-AC citlivých aniontových kanálů zapojených v klíčení. Výsledky tedy podporují představu, že produkt genu *7B-1* funguje jako negativní regulátor klíčení (Fellner et al., 2007, Fellner et al., 2008a, Fellner et al., 2008b)

Podrobnější pohled na průběh klíčení nám poskytly grafy dynamiky klíčení. Dynamika klíčení cv. Rutgers a *7B-1* ve tmě a na červeném světle byla podobná. Působením inhibitoru docházelo ke zpomalení klíčení obou genotypů v počátečních fázích klíčení, přičemž konečná hodnota klíčení při různých koncentracích inhibitoru se zhruba nelišila. Na modrém světle docházelo u obou genotypů ke zpomalení klíčení a to již při klíčení na médiu bez inhibitoru. S rostoucí koncentrací inhibitoru 9-AC nastávalo u WT další zpoždění klíčení, které se projevilo i v poklesu celkového procenta klíčení semen. K tomuto pokles však nedocházelo u *7B-1*. Dynamika klíčení ukázala, že působením inhibitoru, popřípadě kombinace inhibitoru a modrého světla, dochází ke zpomalení klíčení a to hlavně v jeho počátcích. To znamená, že dochází ke snížení aktivity iontových kanálů, které se buď projevuje (u WT) či neprojevuje (u *7B-1*) v konečné hodnotě klíčení semen. Je rovněž možné, že u *7B-1* dochází k neustálé syntéze aniontových kanálů, kdežto u WT je syntéza omezena. To se u WT může následně projevit ve snížení konečné hodnoty klíčení. Omezení syntézy aniontových kanálů u semen WT může být redukováno právě působením modrého světla. Vzhledem ke snížené citlivosti *7B-1* k modrému světle, může být redukce syntézy aniontových kanálů v semenech tohoto genotypu omezena.

Efekt inhibitoru aniontových kanálů 9-AC byl studován také na klíčení semen mutantů *cry1-1*, *cry1-2* a cv. Moneymaker. Mutanti rajčete *cry1-1* a *cry1-2* se vyznačují defektem v genu kódujícím fotoreceptor modrého světla kryptochrom1 (CRY1; Weller et al., 2001). Předpokládá se, že funkční receptor CRY1 podporuje klíčení na modrém světle a to patrně tím, že zvyšuje aktivitu, popřípadě množství, iontových kanálů nutných ke klíčení (Fellner et al., 2008a). Výsledky experimentů ukázaly, že pro všechny testované genotypy (MM, *cry1-1*, *cry1-2*) platí, že jejich klíčení není

významně ovlivněno kvalitou světla ani vzrůstající koncentrací inhibitoru (byly použity koncentrace 0, 1, 5, 10 a 30  $\mu\text{mol}$ ). Výjimkou byla koncentrace 5  $\mu\text{mol}$  9-AC u semen *cry1-1*, kdy docházelo k nápadné inhibici klíčení modrým světlem. Bohužel je těžké určit, co tato odchylka znamená, k tomu bude potřeba provést další experimenty.

V grafech dynamiky klíčení je možno vidět, že klíčení ve tmě nebylo nápadně ovlivněno vyšší koncentrací 9-AC. Naopak na modrém a červeném světle docházelo k nápadnému zpomalení klíčení ve srovnání s klíčením ve tmě, a to již na médiu bez inhibitoru. Zdá se, že inhibitor spolu se světlem zpomalují klíčení, ale z pohledu celkového klíčení to není významné, protože celkově vyklíčilo zhruba stejné procento semen. Působením inhibitoru a světla opět docházelo ke zpomalení aktivity iontových kanálů především na počátku klíčení.

U genotypů *cry1-1*, *cry1-2* a MM byly vedle pokusů s 9-AC prováděny také pokusy s inhibitorem aniontových kanálů NPPB (použit byl v koncentracích 0, 20, 40 a 80  $\mu\text{mol}$ ). Semena všech tří testovaných genotypů klíčila nejlépe ve tmě. Klíčení ve tmě nebylo ovlivněno ani rostoucí koncentrací inhibitoru NPPB. K nápadné inhibici klíčení docházelo na modrém i červeném světle, kdy u všech tří genotypů se s rostoucí koncentrací NPPB zvyšovala inhibice klíčení. To ukazuje, že k NPPB citlivé aniontové kanály jsou důležité pro klíčení semen, ale jejich aktivita může být inhibována modrým a červeným světlem a také inhibitorem aniontových kanálů NPPB. Inhibice kanálů se patrně děje prostřednictvím fytochromů, protože mutanti *cry1-1* a *cry1-2* mající defekt v genu kódujícím kryptochrom1 reagovali k modrému a červenému světlu podobně jako semena cv. MM.

Grafy dynamiky klíčení ukazují, že u všech tří testovaných genotypů docházelo vlivem NPPB ke zpomalení klíčení ve tmě, což se ale neprojevalo v konečné hodnotě klíčení. Naopak na modrém a červeném světle bylo v porovnání s tmou klíčení zpomalené již na médiu bez inhibitoru. Když se k působení světla připojila ještě činnost inhibitoru NPPB, bylo zpomalení klíčení ještě nápadnější a projevilo se i v konečném procentu klíčení. To znamená, že společné působení světla a inhibitoru NPPB vede k nápadnému snížení aktivity aniontových kanálů, což ovlivní i celkové klíčení.

Posledním z inhibitorů aplikovaných na semena cv. MM, *cry1-1* a *cry1-2* byl inhibitor draselných kanálů tolbutamid, který byl použit v koncentracích 0, 1, 5 a 10  $\mu\text{mol}$ . Testované genotypy rajčete se v reakci na tolbutamid opět chovaly podobně. Nejlépe klíčila semena všech genotypů ve tmě, a to bez ohledu na rostoucí koncentraci inhibitoru, který klíčení ve tmě nijak neovlivňoval. Při klíčení na modrém a červeném světle byl podobně jako v případě NPPB patrný trend snižování klíčení s rostoucí koncentrací aplikovaného inhibitoru. Výsledky experimentů s tolbutamidem naznačují, že draselné kanály citlivé k tomuto inhibitoru hrají důležitou roli v klíčení a že jejich aktivita je pravděpodobně inhibována modrým a červeným světlem a také tolbutamidem. V inhibici kanálů by opět mohly být zapojeny fytochromy.

Dynamiky klíčení na modrém a červeném světle byly již při klíčení bez tolbutamidu zpomalené v porovnání s dynamikou klíčení bez inhibitoru ve tmě, přičemž nápadnější bylo zpomalení na modrém světle. Ve tmě se s rostoucí koncentrací tolbutamidu postupně zpomalovala také dynamika klíčení, ale bez toho, aniž by došlo ke snížení celkové hodnoty klíčení. Oproti tomu zpoždění klíčení na modrém a červeném světle s rostoucí koncentrací tolbutamidu bylo patrné taky z hodnot konečného klíčení. Vlivem inhibitoru a světla patrně dochází ke snižování aktivity draselných kanálů a tím také ke zpožděnému nástupu klíčení semen.

Výsledky experimentů provedených v rámci diplomové práce potvrdily dřívější pozorování, že modré světlo je schopno inhibovat klíčení semen rajčete. Výsledky dále ukazují, že mutace v neznámém genu *7B-1* snižuje inhibiční účinek modrého světla na klíčení semen. To znamená, že funkční produkt genu *7B-1* by mohl negativně regulovat aktivitu či množství aniontových kanálů citlivých k 9-AC zapojených v klíčení. Výsledky tedy podporují představu, že protein 7B-1 funguje jako negativní regulátor klíčení na modrém světle. Na základě získaných výsledků lze rovněž usoudit, že funkční fotoreceptor CRY1 není nezbytný pro klíčení semen rajčete, protože klíčení mutantů *cry1* nevykazuje výrazné rozdíly v porovnání s klíčením semen kontrolní rostliny. Důležitý je rovněž poznatek, že modré světlo nutné k inhibici klíčení semen není přijímáno fotoreceptorem CRY1. To tedy naznačuje, že gen *7B-1* nemusí být totožný s genem CRY1, což by podporovalo dosud nepublikované výsledky Véronique Bergougnoux z Laboratoře molekulární fyziologie. Je tedy možné, že modré světlo redukující klíčení semen rajčete je přijímáno jiným receptorem modrého světla než je



CRY1. Mohou to být např. fotoreceptor kryptochrom2, fototropiny, zeaxantin nebo dosud neznámý fotoreceptor, kterým by mohl být i 7B-1. Je však rovněž pravděpodobné, že modré světlo pro redukci klíčení může být přijímáno receptory červeného světla. Výsledky v diplomové práci zároveň naznačují, že pro klíčení semen rajčete na modrém a červeném světle jsou důležité aniontové kanály citlivé k NPPB a 9-AC a draselné kanály citlivé k tolbutamidu. Všechny tyto kanály naopak nejsou důležité pro klíčení semen rajčete ve tmě.

## 6 ZÁVĚR

- Výsledky experimentů ukázaly, že červené světlo nemá vliv na klíčení nebo spíše podporuje klíčení semen rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), zatímco modré světlo inhibuje klíčení WT rajčete.
- Pokusy dále ukazují, že pro klíčení semen rajčete na modrém a červeném světle jsou důležité aniontové kanály citlivé k 9-AC a NPPB a draselné kanály citlivé k tolbutamidu. Tyto aniontové a draselné kanály naopak nejsou důležité pro klíčení semen rajčete ve tmě.
- Klíčení semen *7B-1* nebylo významně ovlivněno kvalitou světla ani inhibitorem aniontových kanálů 9-AC. To znamená, že klíčení mutanta v genu *7B-1* je necitlivé k inhibičnímu účinku modrého světla. Mutant *7B-1* má patrně větší množství nebo více aktivní kanály citlivé k 9-AC.
- Pokusy provedené se semeny cv. Rutgers a *7B-1* podporují představu, že produkt genu *7B-1* negativně reguluje množství či aktivitu k 9-AC citlivých aniontových kanálů.
- Pokusy s rostlinami rajčete cv. MM a mutanty v kryptochromu1 (*cry1-1*, *cry1-2*) ukázaly, že mutace v genu *CRY1* nemá vliv na citlivost klíčení semen k testovaným inhibitorům, protože dané genotypy reagovaly na použitý inhibitor podobně.
- Výsledky experimentů rovněž naznačují, že modré světlo nutné k inhibici klíčení semen není přijímáno receptorem CRY1.

## 7 POUŽITÁ LITERATURA

**Alberts B., Bray D., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. et Walter P.** (1998): *Základy buněčné biologie. Úvod do molekulární biologie buňky.* - Espero Publishing, Ústí nad Labem, 630 p.

**Barbier-Brygoo H., Vinauger M., Colcombet J., Ephritikhine G., Frachisse J. et Maurel Ch.** (2000): Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. – *Biochimica et Biophysica Acta* 1465: 199-218.

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

**Bouly J. P., Schleicher E., Dionisio-Sese M., Vandenbussche F., Van Der Straeten D., Bakrim N., Meier S., Batschauer A., Galland P., Bittl R. et Ahmad M.** (2007): Cryptochrome Blue Light Photoreceptors Are Activated through Interconversion of Flavin Redox State. – *Journal of Biological Chemistry*, 282 (13): 9383-9391.

**Clack T., Shokry A., Moffet M., Liu P., Faul M. et Sharrock R. A.** (2009): Obligate Heterodimerization of Arabidopsis Phytochromes C and E and Interaction with the PIF3 Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factor. – *The Plant Cell*, 21: 786-799.

**de Angeli A., Monachello D., Ephritikhine G., Frachisse J. M., Thomine S., Gambale F. et Barbier-Brygoo H.** (2009): CLC-mediated anion transport in plant cells. - *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B: Biol. Sci.*, 364: 195–201.

**de Angeli A., Thomine S., Frachisse J., Ephritikhine G., Gambale F. et Barbier-Brygoo H.** (2007): Anion channels and transporters in plant cell membranes. – *FEBS Letters*, 581 (12): 2367-2374.

**Ermolayeva E., Hohmeyer H., Johannes E. et Sanders D.** (1996): Calcium-dependent membrane depolarisation activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. – *Planta*, 199: 352-358.

**Ermolayeva E., Sanders D. et Johannes E.** (1997): Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarisation in caulonemal side branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*. – *Planta*, 201: 109-118.

**Facella P., Lopez L., Carbone F., Galbraith D. W., Giuliano G. et Perrotta G.** (2008): Diurnal and Circadian Rhythms in the Tomato Transcriptome and Their Modulation by Cryptochrome Photoreceptors. – *PloS ONE*, 3(7): e2798.

**Fellner M., Čermáková K., Sagot E., Ossipova E., Zaoralová J., Hloušková R., Pospíšilová K., Hlaváčková V. et Novák O.**: Possible interaction between blue light and anion and/or water channels during plant responses to abiotic stresses. – 3rd International Symposium on Plant Neurobiology, Štrbské Pleso, 14-18.5. 2007.

**Fellner M., Plotzová R. et Pospíšilová K.**: Anion channels can play a role in blue light-specific tolerance of seed germination to osmotic stress. – Vliv abiotických a biotických stresorů na vlastnosti rostlin 2008, Praha, 12.-13.2. 2008a.

**Fellner M., Pospíšilová K., Plotzová R., Zaoralová J., Dvořáková B. et Chmelařová A.**: Role of ion and water channels in blue light-specific tolerance of seed germination to osmotic stress – putative function of 7B-1. – 25th Annual Missouri Plant Biology Symposium, International Plant Photobiology Meeting, Columbia, 28.5-1.6. 2008b.

**Fellner M. et Sawhney V. K.** (2001): Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. - *Theor Appl Genet*, 102:215-221.

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

**Franklin K. A., Larner V. S. et Whitelam G. C.** (2005): The signal transducing photoreceptors of plants. – *Int. J. Dev. Biol.*, 49: 653-664.

**Franklin K. A. et Quail P. H.** (2010): Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. – *Journal of Experimental Botany*, 61 (1): 11-24.

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

**Gehring M., Choi Y. et Fischer R. L.** (2004): Imprinting and Seed Development. - *The Plant Cell*, 16: 203-213.

**Goh C. H.** (2009): Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling. - *Plant Signaling & Behavior*, 4(8): 693-695.

**Huang Y., Baxter R., Smith B. S., Partch C. L., Colbert C. L. et Deisenhofer J.** (2006): Crystal structure of cryptochrome 3 from *Arabidopsis thaliana* and its implications for photolyase activity. – *PNAS*, 103 (47): 17701-17706.

- Cho M. H. et Spalding E.P. (1996):** An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. – Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 8134-8138.
- Chopin F., Orsel M., Dorbe M. F., Chardon F., Truong H. N., Miller A.J., Krapp A. et Daniel-Vedele F. (2007):** The *Arabidopsis* ATNRT2.7 nitrate transporter controls nitrate content in seeds. - Plant Cell, 19:1590–1602.
- Christie J. M., Reymond P., Powell G., Bernasconi P., Reibekas A. A., Liscum E. et Briggs W. R. (1998):** *Arabidopsis* NPH1: a flavoprotein with the properties of a photoreceptor for phototropism. – Science, 282: 1698-1701.
- Jones M. A. et Christie J. M. (2008):** Phototropin receptor kinase activation by blue light. – Plant Signaling & Behavior, 3(1): 44-46.
- Kaiserli E., Sullivan S., Jones M. A., Feeney K. A. et Christie J.M. (2009):** Domain Swapping to Assess the Mechanistic Basis of *Arabidopsis* Phototropin 1 Receptor Kinase Activation and Endocytosis by Blue Light. – The Plant Cell, 21: 3226-3244.
- Kevei E., Schäfer E. et Nagy F. (2007):** Light-regulated nucleo-cytoplasmic partitioning of phytochromes. - Journal of Experimental Botany, 58(12):3113-3124.
- Kucera B., Cohn M. A. et Leubner-Metzger G. (2005):** Plant hormone interactions during seed dormancy and release and germination. – Seed Science Research, 15: 281-307.
- Luštinec J. et Žárský V. (2005):** Úvod do fyziologie vyšších rostlin. – Karolinum, Praha, 261p.
- Matsuoka D. et Tokutomi S. (2005):** Blue light-regulated molecular switch of Ser/Thr kinase in phototropin. – PNAS, 102 (37): 13337-13342.
- Murashige T. et Skoog A. (1962):** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. – Physiol Plant, 15: 473-497.
- Pavlová L. (2005):** Fyziologie rostlin. – Karolinum, Praha, 253p.
- Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J. a kolektiv (1998):** Fyziologie rostlin. – Academia, Praha, 484p.
- Reed J. W., Nagatani A., Elich T. D., Fagan M. et Chory J. (1994):** Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. – Plant Physiology, 104: 1139-1149.

- Roberts S. K.** (2006): Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. – *New Phytologist*, 169: 647-666.
- Sang Y., Li Q. H., Rubio V., Zhang Y. C., Mao J., Deng X. W. et Yang H. Q.** (2005): N-Terminal Domain-Mediated Homodimerization Is Required for Photoreceptor Activity of Arabidopsis CRYPTOCHROME 1. – *The Plant Cell*, 17: 1569-1584.
- Sawhney V.K.** (1997) In: Shivanna K.R., Sawhney V.K., ed, *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*, Cambridge University Press, Cambridge, UK, pp. 183-198.
- Selby C. P. et Sancar A.** (2006): A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. – *PNAS*, 103 (47): 17696-17700.
- Schäfer E. et Nagy F.** (2006): *Photomorphogenesis in plants and bacteria*, 3rd ed.. - Springer, Dordrecht, 662p.
- Spalding E.P.** (2000): Ion channels and the transduction of light signals. – *Plant, Cell and Environment*, 23: 665-674.
- Spalding E. P. et Cosgrove D. J.** (1989): Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. – *Planta*, 178: 407-410.
- Taiz L. et Zeiger E.** (2006): *Plant physiology*, 4th Ed.. – Sinauer Associates, Inc., USA, 623p.
- Takano M., Inagaki N., Xie X., Kiyota S., Baba-Kasai A., Tanabata T. et Shinomura T.** (2009): Phytochromes are the sole photoreceptors for perceiving red/far-red light in rice. – *PNAS*, 106 (34): 14705-14710.
- Tatematsu K., Nakabayashi K., Kymiya Y. et Nambara E.** (2008): Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. – *The Plant Journal*, 53: 42-52.
- Weller J. L., Perrotta G., Schreuder M. E. L., van Tuinen A., Koornneef M., Giuliano G. et Kendrick R. E.** (2001): Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. - *The Plant Journal*, 25 (4): 427-440.

**Willigen C. V., Postaire O., Tournaire-Roux C., Boursiac Y. et Maurel C. (2006):** Expression and Inhibition of Aquaporins in Germinating *Arabidopsis* Seeds. – *Plant Cell Physiology*, 47 (9): 1241-1250.

**Xu P., Xiang Y., Zhu H., Xu H., Zhang Z., Zhang C., Zhang L. et Ma Z. (2009):** Wheat Cryptochromes: Subcellular Localization and Involvement in Photomorphogenesis and Osmotic Stress Responses. - *Plant Physiology*, 149: 760-774.

**Yu X., Klejnot J., Zhao X., Shalitin D., Maymon M., Yang H., Lee J., Liu X., Lopez J. et Lin C. (2007):** Arabidopsis Cryptochrome 2 Completes Its Posttranslational Life Cycle in the Nucleus. – *The Plant Cell*, 19: 3146-3156.

**Zifarelli G. et Pusch M. (2010):** CLC transport proteins in plants. - *FEBS Lettets*, 584 (10): 2122-2127.