



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Interakce modrého světla a aniontových  
kanálů v růstu a vývoji rostlin**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

|                         |  |
|-------------------------|--|
| Autor:                  | <b>Natálie Ulitzková</b>                 |
| Studijní program:       | B1501 Experimentální biologie            |
| Studijní obor:          | Experimentální biologie                  |
| Forma studia:           | Prezenční                                |
| Vedoucí práce:          | <b>prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b> |
| Termín odevzdání práce: | 2023                                     |

## Bibliografická identifikace

|                         |   |
|-------------------------|---|
| Jméno a příjmení autora | Natálie Ulitzková   |
| Název práce             | Interakce modrého světla a aniontových kanálů v růstu a vývoji rostlin  |
| Typ práce               | Bakalářská  |
| Pracoviště              | Laboratoř růstových regulátorů  |
| Vedoucí práce           | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.   |
| Rok obhajoby práce      | 2023  |
| Abstrakt                | <p>V teoretické části bakalářské práce byla zpracována literární rešerše zabývající se problematikou fotomorfogeneze, fotoreceptorů a aniontových kanálů rostlin. V experimentální části bylo zkoumáno zapojení aniontových kanálů v růstu a vývoji rostlin <i>Solanum lycopersicum</i> L. Byly sledovány růstové reakce kořenů a hypokotylů rostlin k inhibitorům aniontových kanálů (NIF, 9-AC a NPPB) v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Byl analyzován mutant <i>cry1-2</i> odvozený od kultivaru Money Maker s mutací v genu kódujícím fotoreceptor CRY1 a mutant <i>7B-1</i> odvozený od kultivaru cv. Rutgers s defektem ve fototropinové signální dráze. Z výsledků bakalářské práce vyplývá, že aniontové kanály, citlivé ke všem testovaným inhibitorům, jsou zapojeny v růstových procesech a je pravděpodobné, že do jejich regulace světlem je zapojen genový produkt <i>7B-1</i> a signální dráha CRY1.</p> |
| Klíčová slova           | Aniontové kanály, růst, kořen, hypokotyl, modré světlo, NIF, 9-AC, NPPB   |
| Počet stran             | 56  |
| Počet příloh            | 0   |
| Jazyk                   | Český   |

## **Bibliographical identification**

|                                |  |
|--------------------------------|--|
| Autor's first name and surname | Natálie Ulitzková  |
| Title of thesis                | Interaction of blue light and anion channels in plant growth and development   |
| Type of thesis                 | Bachelor   |
| Department                     | Laboratory of Growth Regulators  |
| Supervisor                     | prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.  |
| The year of presentation       | 2023   |
| Abstract                       | <p>In the theoretical part of the bachelor thesis knowledge about photomorphogenesis, photoreceptors and plant anion channels were summarized. In the experimental part, the involvement of anion channels in the growth and development of <i>Solanum lycopersicum</i> L. was investigated. The growth responses of the root and hypocotyl of plants to anion channels blockers (NIF, 9-AC and NPPB) as a function of light conditions (dark, blue light, red light) was monitored. Mutant <i>cry1-2</i> derived from cultivar Money Marker with mutation in the gene coding photoreceptor CRY1 and mutant <i>7B-1</i> derived from cultivar cv. Rutgers with defect in phototropin signaling pathway were analyzed. The results show that anion channels sensitive to all tested blockers are involved in plant growth and it is likely that their regulation by light includes <i>7B-1</i> gene product and CRY1 signaling pathway.</p> |
| Key words                      | Anion channels, growth, root, hypocotyl, blue light, NIF, 9-AC, NPPB   |
| Number of pages                | 56   |
| Number of appendices           | 0  |
| Language                       | Czech  |

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

V Olomouci dne 7.5. 2023

Ráda bych poděkovala Skupině molekulární fyziologie, především prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph. D, za cenné rady, čas, trpělivost, ochotu a vstřícnost, které mi poskytl v průběhu vypracování této bakalářské práce.

## Obsah

|  |    |
|--|----|
| SEZNAM ZKRATEK.....  | 8  |
| 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE .....                                      | 9  |
| 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....                      | 10 |
| 2.1 Fotomorfogeneze.....                                       | 10 |
| 2.2 Fotoreceptory .....  | 11 |
| 2.2.1 Fytochromy .....   | 11 |
| 2.2.2 Kryptochromy .....                                       | 14 |
| 2.2.3 Fototropiny .....  | 15 |
| 2.3 Iontové kanály vyšších rostlin.....                        | 16 |
| 2.3.1 Aniontové kanály .....                                   | 17 |
| 2.3.1.1 Typy aniontových kanálů.....                           | 18 |
| 2.3.1.2 Vliv světla na aktivitu aniontových kanálů.....        | 19 |
| 2.4 Inhibitory aniontových kanálů .....                        | 22 |
| 2.4.1 Inhibitor NIF .....                                      | 22 |
| 2.4.2 Inhibitor 9-AC.....                                      | 23 |
| 2.4.3 Inhibitor NPPB.....                                      | 24 |
| 3 MATERIÁL A METODIKA .....                                    | 25 |
| 3.1 Rostlinný materiál .....                                   | 25 |
| 3.2 Roztoky a chemikálie.....                                  | 25 |
| 3.3 Seznam použitých přístrojů.....                            | 25 |
| 3.4 Příprava MS média.....                                     | 26 |
| 3.5 Výsev semen .....  | 26 |
| 3.6 Přenos klíčících semen.....                                | 27 |
| 3.7 Měření délky kořene a hypokotylu .....                     | 29 |
| 4 VÝSLEDKY .....   | 30 |
| 4.1 Růstové reakce mutantu <i>7B-1</i> .....                   | 30 |
| 4.1.1 Vliv inhibitoru NIF na růst mutantu <i>7B-1</i> .....    | 30 |
| 4.1.2 Vliv inhibitoru 9-AC na růst mutantu <i>7B-1</i> .....   | 33 |
| 4.1.3 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu <i>7B-1</i> .....   | 36 |
| 4.2 Růstové reakce mutantu <i>cry1-2</i> .....                 | 39 |
| 4.2.1 Vliv inhibitoru NIF na růst mutantu <i>cry1-2</i> .....  | 39 |
| 4.2.2 Vliv inhibitoru 9-AC na růst mutantu <i>cry1-2</i> ..... | 42 |

|       |   |    |
|-------|---|----|
| 4.2.3 | Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu <i>cryI-2</i> .....          | 45 |
| 5     | DISKUZE.....  | 48 |
| 5.1   | Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu <i>7B-1</i> .....   | 48 |
| 5.2   | Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu <i>cryI-2</i> ..... | 50 |
| 6     | ZÁVĚR .....   | 52 |
|       | CITOVANÁ LITERATURA.....  | 53 |

## SEZNAM ZKRATEK

|           |  |
|-----------|--|
| 9-AC      | kyselina antracen-9-karboxylová                  |
| ABA       | kyselina abscisová                               |
| ATP       | adenosintrifosfát                                |
| CCE       | C-terminální doména                              |
| CRY1      | kryptochrom 1                                    |
| CRY2      | kryptochrom 2                                    |
| CRY3      | kryptochrom 3                                    |
| FAD       | flavinadenindinukleotid                          |
| FMN       | flavinmononukleotid                              |
| LOV1      | light-oxygen-voltage doména 1                    |
| LOV2      | light-oxygen-voltage doména 2                    |
| MS médium | Murashige a Skoog médium                         |
| NIF       | kyselina niflumová                               |
| NLS       | nuclear localization signal                      |
| NPPB      | kyselina 5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoová |
| Pfr       | phytochrome far-red                              |
| PHOT1     | fototropin 1                                     |
| PHOT2     | fototropin 2                                     |
| PHR       | photolyase homology region                       |
| PHY       | fytochrom  |
| Pr        | phytochrome red                                  |
| WT        | wild type (divoký typ)                           |



# 1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

Vyšší rostliny využívají sluneční energii nejen na vytváření energie chemické během fotosyntézy, ale využívají světla také jako signálu k regulaci svých fyziologických procesů, známých jako fotomorfogeneze. V tomto případě je světlo rostlinami pohlcováno prostřednictvím speciálních fotoreceptorů, v závislosti na jeho vlnové délce.

V rostlinných buňkách mají transportní procesy přes membránu veliký význam. Tyto procesy zprostředkovávají integrální membránové proteiny, zvané iontové kanály. Podílejí se na řadě buněčných procesů, jako udržování membránového potenciálu a přenosu signálu. Iontové kanály přecházejí působením různých faktorů z otevřeného stavu do uzavřeného. Přes otevřený kanál dochází k toku iontů podle elektrochemického gradientu. Aniontové kanály jsou zapojeny v mnoha růstových a vývojových procesech. Zajišťují fyziologické funkce rostlin, mezi které patří výživa rostlin, buněčná signalizace a osmoregulace. Inhibitory aniontových kanálů jsou např. 9-AC, NIF a NPPB.

Teoretickým cílem bakalářské práce bylo zpracování literární rešerše týkající se problematiky fotomorfogeneze, fotoreceptorů rostlin, aniontových kanálů a jejich zapojení v růstových a vývojových procesech rostlin. Pro experimenty byl využit genetický přístup spočívající v analýze mutantů. Konkrétně byli použiti mutanti rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), *7B-1* a *cry1-2*. Mutant *7B-1* je odolný vůči abiotickým stresům specificky na modrém světle a má defekt v reakcích zprostředkovaných fototropiny. Mutant *cry1-2* má defekt ve fotoreceptoru CRY1 pro modré světlo. Cílem experimentální části bakalářské práce bylo analyzovat růst hypokotylů a kořenů uvedených mutantů v závislosti na koncentraci inhibitorů aniontových kanálů (NIF, NPPB, 9-AC) a v závislosti na vybraných světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Na základě získaných výsledků pak bylo cílem určit, zda mohou být aniontové kanály, citlivé k použitým inhibitorům, zapojeny v růstu a vývoji rostlin rajčete, a zda mohou být ovlivněny světelnými podmínkami. Analýza mutantů *7B-1* a *cry1-2* by měla objasnit, zda je do případné regulace aniontových kanálů, citlivých k testovaným inhibitorům, zapojen genový produkt *7B-1* a signalizace kryptochromu CRY1.

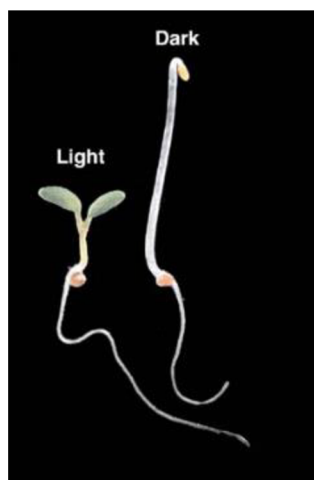
Experimenty byly prováděny v rámci pracovní Skupiny molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů, společného pracoviště UP Olomouc a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

## 2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1 Fotomorfogeneze

Vyšší rostliny v procesu zvaném fotosyntéza přeměňují energii získanou ze slunce na energii chemickou. Světlo je však pro rostliny nejen zdrojem energie, ale také zdrojem informací (Kami *et al.*, 2010). Rostliny jsou mimořádně citlivé na měnící se světelné podmínky prostředí a světlo je hlavním činitelem ovlivňujícím vývoj rostlin a jejich fyziologické funkce, mezi které patří např. klíčení semen, směr a rychlost růstu rostlin a jejich kvetení (Nemhauser and Chory, 2002). Procesy vyvolané světlem mohou být reverzibilní nebo nevratné. Mezi reverzibilní procesy se řadí např. pohyb průduchů. Nevratným procesem je např. růst rostlin (Kami *et al.*, 2010). Při procesu fotomorfogeneze dochází prostřednictvím světla, jakožto signálu, ke změně vývoje rostlin tak, že pro další růst je světlo využito jako energie (Taiz and Zeiger, 2010).

Spektrální složení světla, jeho intenzita a doba trvání jsou dány zeměpisnou šířkou a mění se v závislosti na ročním období (Kami *et al.*, 2010). Pokud rostlina není v procesu růstu vystavena světelnému záření, projeví se u ní etiolizovaný růst. Proces růstu je při těchto podmínkách omezen, což se projevuje velmi dlouhým hypokotylem, nevyvinutými děložními lístky, zkrácením délky kořene a absencí chlorofylu (Obr. 1). V opačném případě, například při pěstování rostliny *Arabidopsis thaliana* pod jasným a přímým bílým světlem, jsou naopak pro rostlinu charakteristické krátké a pevné hypokotyly, otevřené kotyledony, dlouhý a rozvětvený kořenový systém a syntéza chlorofylu (Obr. 1). Kvetení rostlin pěstovaných při těchto podmínkách nastává předčasně a pravé listy se objevují dříve (Nemhauser and Chory, 2002).



**Obr. 1:** Rostliny *Arabidopsis* rostoucí na světle (deetiolizované) vlevo a ve tmě (etiolizované) vpravo (převzato a upraveno podle Nemhauser and Chory, 2002).

Rostliny na světlo reagují také změnou směru růstu. Rostoucí hypokotyl rostliny se orientuje v reakci na nejvyšší intenzitu světla, ve snaze maximalizovat jeho absorpci. Změna orientace růstu rostliny může rovněž nastat ve snaze vyhnout se stínu. Tuto reakci můžeme pozorovat u vybraných rostlinných druhů (Devlin, 2007). Rostliny jsou schopny absorbovat světlo, jehož vlnové délky leží od ultrafialové až do dlouhovlnné červené oblasti viditelného spektra, tedy do 700 až 800 nm. Ve viditelné oblasti spektra bývá nejvíce absorbováno světlo modré a červené spektrální oblasti, v menší míře zelené (Huché-Thélier *et al.*, 2016). Rostliny obsahují mnoho pigmentů, které jsou součástí fotoreceptorů a podílejí se na fotomorfogenezi rostlin. Nejdůležitějšími z těchto pigmentů jsou ty, které pohlcují modré a červené světlo (Taiz and Zeiger, 2010).

## **2.2 Fotoreceptory**

Světlo, jež ovlivňuje fyziologické funkce rostlin, je absorbováno molekulami proteinu, které jsou označovány jako fotoreceptory (Möglich *et al.*, 2010). Jsou to tedy proteiny, zprostředkávající i proces fotomorfogeneze (Christie, 2007). Z důvodu, že polypeptidové kostry fotoreceptorů spolu s postranními řetězci aminokyselin světlo ve viditelné oblasti spektra neabsorbují, je součástí fotoreceptoru pigment chromofor. Chromofor je organická a neproteinová složka fotoreceptoru, ve které dochází k primární absorpci fotonu. Mezi rostlinné chromofory patří např. flavinadenindinukleotid (FAD), který pohlcuje vlnové délky modré oblasti spektra nebo tetrapyrrolový fytochromobilin (PB), který absorbuje červené světlo (Möglich *et al.*, 2010).

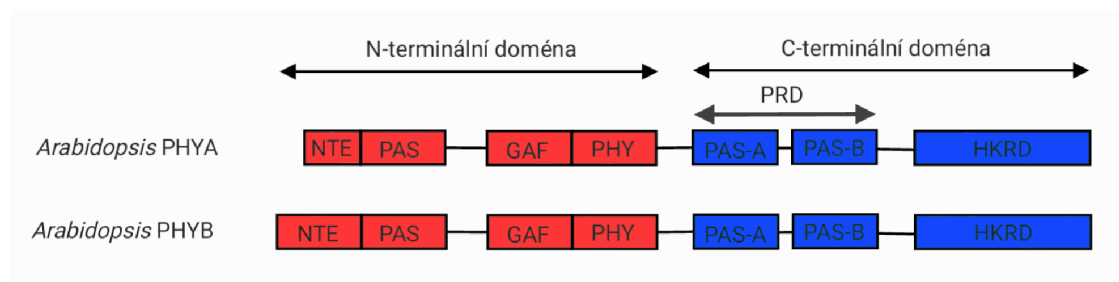
Fotoreceptory jsou děleny do několika skupin. Světlo je jimi absorbováno ve dvou spektrálních oblastech. V červené oblasti spektra absorbují fytochromy. V modré oblasti spektra je světlo absorbováno především kryptochromy a fototropiny, ale rovněž i fytochromy (Taiz and Zeiger, 2010).

### **2.2.1 Fytochromy**

Fytochromy jsou fotoreceptory, jež pohlcují červené světlo (620-700 nm), dlouhovlnné červené světlo (710-750 nm), ale rovněž světlo modré (460 nm). Poprvé byly objeveny u kvetoucích rostlin. Můžeme je rovněž najít např. u cyanobakterií, bakterií nebo hub (Taiz *et al.*, 2018). Fytochromy zajišťují velkou část fotomorfogenních reakcí a regulují procesy závislé na světle (Christie, 2007).

Fytochrom je rozpustný protein s molekulovou hmotností kolem 250 kDa. Vyskytuje se ve formě dimeru, složeného ze dvou podjednotek. Součástí podjednotek je pigment pohlcující světlo s názvem chromofor. Podjednotky tvoří rovněž apoprotein, který se skládá z polypeptidových řetězců. Podjednotky chromoforu a apoproteinu společně tvoří holoprotein. Chromofor se u vyšších rostlin nachází v podobě lineárního tetrapyrrolu, který je označován jako fytochromobilin. Samotný apoprotein fytochromu není schopen pohltit červené nebo dlouhovlnné červené světlo. K absorpci světla dochází pouze ve spojení s fytochromobilinem.

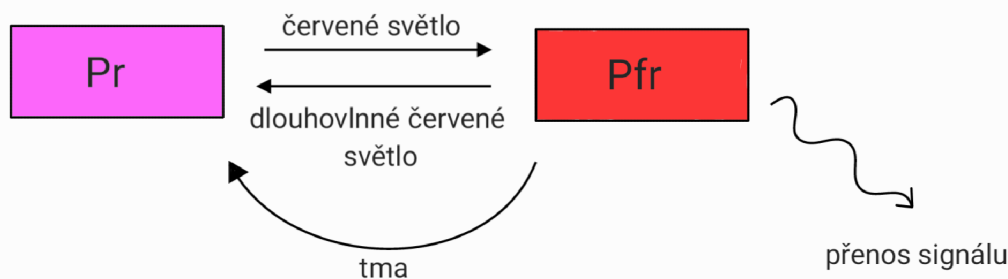
Fytochrom je složen z několika funkčních domén (Obr. 2), mezi které patří PAS (Per: period circadian protein, Arnt: Ah receptor nuclear translocator protein, Sim: single-minded protein) doména a GAF (cGMP-stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclases, *Escherichia coli* FhlA) doména s bilin-lyasovou aktivitou. Součástí je rovněž PHY doména, která rozděluje fytochrom na jeho N-terminální a C-terminální polovinu a umožňuje přechod mezi neaktivní Pr formou a aktivní Pfr formou fytochromu. Další strukturou fytochromu je doména PRD (per-arnt-sim (PAS)-related domain), jež je zapojena do procesu dimerizace fytochromu. Její součástí jsou dvě jaderné lokalizační sekvence s označením NLS. Složkou fytochromu je také doména HKRD (histidine kinase-related domain), která je nepostradatelná pro proces autofosforylace fytochromu (Taiz and Zeiger, 2010).



**Obr. 2:** Doménová struktura fytochromu PHYA (fytochrom A) a PHYB (fytochrom B) rostliny *Arabidopsis*. NTE, N-terminal extension; PAS, Per (period circadian protein), Arnt (Ah receptor nuclear translocator protein), Sim (single-minded protein); GAF, cGMP-stimulated phosphodiesterase, *Anabaena* adenylate cyclases, *Escherichia coli* FhlA; PHY, fytochrom; PRD, PAS-related domain; HKRD, histidine kinase-related domain (vytvořeno podle Li *et al.*, 2011).

U etiolizovaných rostlin se fytochrom nachází v inaktivní Pr formě, jež pohlcuje červené světlo. Absorpcí červeného světla dochází k přechodu z inaktivní Pr formy fytochromu do aktivní Pfr formy, která absorbuje dlouhovlnné červené světlo (Obr. 3). Aktivní Pfr forma může ve tmě pomalým procesem reverzibilně přecházet do inaktivní Pr formy. Fytochrom přechází z Pfr formy na Pr formu ihned po ozáření dlouhovlnných

červeným světlem. Tento proces je označován jako fotoreverzibilita a je charakteristickou vlastností fytochromu (Taiz *et al.*, 2018).



**Obr. 3:** Fytochromový fotocyklos, fotoreverzibilita fytochromu. Pr (phytochrome red) a Pfr (phytochrome far-red) znázorňují konformace fytochromu absorbující červené světlo a dlouhovlnné červené světlo, které jsou reverzibilní v závislosti na světelných podmínkách (vytvořeno podle Schäfer and Bowler, 2002).

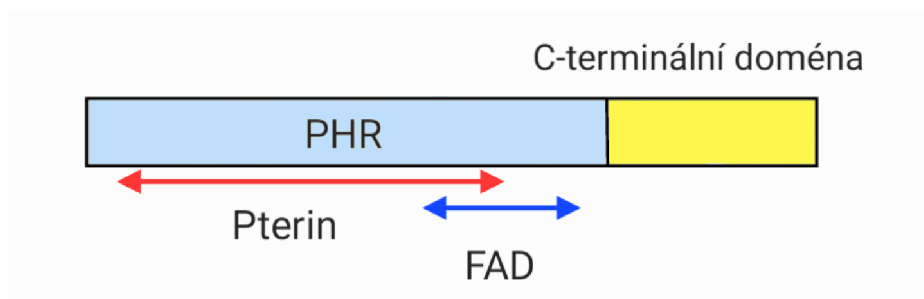
U rostliny *Arabidopsis* se vyskytuje pět druhů fytochromů, kterými jsou PHYA, PHYB, PHYC, PHYD a PHYE. Fytochromy se od sebe odlišují zejména fotochemií a rychlostí translokace do jádra. Fytochromy PHYA a PHYB jsou nejvýznamnějšími fytochromy, jež výrazně regulují mnohé procesy podílející se na vývoji a růstu rostlin. Fytochromy PHYA se akumulují ve tmě a při ozáření dlouhovlnným červeným světlem, zatímco působením červeného světla jsou rychle degradovány. Naproti tomu PHYB a ostatní fytochromy jsou výrazně stabilnější.

Akumulace všech skupin fytochromů v jádře je závislá na světle. Při růstu semenáčků ve tmě dochází k výskytu fytochromů v cytoplazmě v Pr formě. Po působení červeného světla nastává akumulace PHYA i PHYB v jádře buněk. Tento proces se odehrává během několika minut. Hromadění fytochromů v buněčném jádře je základní regulační mechanismus fytochromové signalizace. Přesun PHYB do jádra buněk je regulován odkrytím NLS. Fytochrom PHYB se při působení červeného světla nachází v Pfr formě. V této formě není interakce mezi N-terminální a C-terminální doménou tak silná, jako v konformaci Pr. Fotoaktivace spouští pohyb těchto domén, odkrytí NLS a následnou akumulaci PHYB v buněčném jádře. U fytochromu PHYA se doména NLS nenachází. Přesun PHYA do jádra se uskutečňuje prostřednictvím vazby na proteiny FHY1 (far-red elongated hypocotyl 1) a FHL (FHy-1-Like). Součástí těchto proteinů je NLS doména, pomocí které dochází k přesunu PHYA do jádra, což umožňuje signalizaci (Chen and Chory, 2011).

## 2.2.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou fotoreceptory, které absorbují modré světlo s vlnovou délkou 390-500 nm a UV-A záření s vlnovou délkou 320-390 nm. Byly poprvé objeveny u rostliny *Arabidopsis*. Později byly nalezeny také u cyanobakterií, řas, kapradin nebo lidí. Účastní se procesu depolarizace membrány, růstu řapíku, produkce antokyanů, regulace cirkadiálního rytmu, podporují růst děložních lístků a potlačují růst hypokotylu (Taiz and Zeiger, 2010). Můžeme je na základě jejich sekvenčního složení rozdělit na rostlinné kryptochromy, živočišné kryptochromy a CRY-DASH (kryptochrom-*Drosophila*, *Arabidopsis*, *Synechocystis*, *Human*) proteiny (Lin and Todo, 2005).

Kryptochromy se váží na FAD a pterin methylhydrofolát (MTHF). Pterin methylhydrofolát je derivátem pteridinu, jehož úkolem je absorpce světla a následný přenos světelné energie chromoforu FAD (Taiz and Zeiger, 2010). Chromofor FAD je nekovalentně navázán na oblast PHR (Obr. 4). Funguje jako primární světelný senzor. Oblast PHR se skládá z N-terminální  $\alpha/\beta$  domény a C-terminální domény  $\alpha$  (CCE). Tyto dvě domény jsou navzájem propojeny sedmdesáti sedmi aminokyselinami (Christie *et al.*, 2015).



**Obr. 4:** Schématické znázornění typického proteinu nadrodiny fotolyázy/kryptochromu, zobrazující oblast PHR (photolyase homology region) s navázaným pterinem a FAD (flavinadenin nukleotid) a C-terminální doménu (vytvořeno podle Lin and Todo, 2005).

Sekvence párů bází kryptochromů vykazuje podobnosti s DNA fotolyázami. DNA fotolyázy jsou enzymy, jejichž úkolem je oprava poškození v sekvencích DNA, vyvolaných působením UV světla. UV světlo indukuje tvorbu pyrimidinových dimerů. Fotolyázy s využitím modrého světla vzniklé pyrimidinové dimery likvidují. Kryptochromy však touto schopností nedisponují.

U *Arabidopsis* byly objeveny tři druhy kryptochromů, které jsou kódovány geny *CRY1*, *CRY2* a *CRY3* (Liu *et al.*, 2011). Největším rozdílem mezi kryptochromy *CRY1* a *CRY2* je jejich stabilita. Kryptochrom *CRY2* je po ozáření modrým světlem brzy degradován, zatímco *CRY1* je mnohem více stabilní (Taiz and Zieger, 2010).

Krytochromy CRY1 a CRY2 jsou využívány především v buněčném jádře, zatímco CRY3 je aktivní v chloroplastech a mitochondriích buňky. Krytochromy CRY1 a CRY2 se účastní procesu deetiolizace zprostředkovaném modrým světlem. Jsou také zapojeny v procesu kvetení, otevírání průduchů, reakci na rostlinné patogenní mikroorganismy a mnoha dalších procesech, čímž se významně podílejí na správném růstu a vývoji rostlin (Liu *et al.*, 2011).

Krytochrom CRY1 se vyznačuje schopností vázat oxidovanou formu FAD, která pohlcuje modré světlo. Ozářením oblasti PHR dochází k tvorbě semi-redukovaného radikálu FAD, označovaného jako FADH<sup>·</sup>. Vzniká procesem fotoredukce a následné protonace FAD, následkem čehož je fotoreceptor aktivován. Tvorba FADH<sup>·</sup> se odehrává v řádu mikrosekund. Je však nestabilní a může během několika minut přecházet zpátky do své oxidované formy FAD. Předpokládá se, že doména PHR spolu s CCT tvoří ve tmě neaktivní konformaci. Působením modrého světla na doménu PHR poté dochází k přechodu CCT do aktivního konformačního stavu, následkem čehož je spuštěna signalizační kaskáda. Krytochrom je schopen vázat ATP. Navázáním ATP se prodlužuje existence formy FADH<sup>·</sup>. Fosforylace CCT rovněž úzce souvisí s fotoaktivací krytochromu (Christie *et al.*, 2015).

### 2.2.3 Fototropiny

Fototropiny jsou fotoreceptory rostlin, jež pohlcují modré světlo o vlnové délce 390-500 nm a ultrafialové světlo UV-A s vlnovou délkou 320-390 nm. Působením modrého světla dochází ke spuštění různých dějů v rostlině. Mezi tyto rostlinné procesy patří otevírání průduchů, migrace chloroplastů, raná fáze inhibice prodlužovacího růstu a fototropismus. Fototropismus je rostlinný mechanismus, který vyvolává ohýbání rostlinných orgánů za světlem nebo naopak od něj. Zmíněné rostlinné mechanismy indukované modrým světlem jsou zprostředkovány fototropiny 1 (PHOT1) a fototropiny 2 (PHOT2). Fototropiny PHOT1 jsou zřejmě zapojeny do procesu inhibice růstu stonku rostlin a vychytávání vápníku, vyvolaného modrým světlem. Rovněž hrají roli v depolarizaci plazmatické membrány, vyvolané působením světla (Briggs and Christie, 2002).

Součástí fotoreceptorů PHOT1 a PHOT2 je N-terminální fotosyntetická doména, tvořena z domén LOV1 a LOV2 (Obr. 5). Jejich součástí je rovněž C-terminální Ser/Thr kinázová doména. Domény LOV1 a LOV2 se ve tmě váží s flavinmononukleotidem (FMN). Působením modrého světla vzniká kovalentní vazba mezi FMN a cysteinovým

zbytkem fototropinových domén. Vznik vazby způsobuje konformační změny fotoreceptoru, následkem čehož je rovněž ovlivněna kinázová aktivita (Goh, 2009).



**Obr. 5:** Proteinové struktury receptorů modrého světla rostliny *Arabidopsis*, PHOT1 (fototropin 1) a PHOT2 (fototropin 2). Domény LOV1 (light-oxygen-voltage doména 1) a LOV2 (light-oxygen-voltage doména 2) jsou zobrazeny zeleně. Kinázové domény, které katalyzují fosforylaci proteinů na specifických aminokyselinových zbytcích (v tomto případě threonin a serin), jsou znázorněny červeně (vytvořeno podle Briggs and Christie, 2002).

Domény LOV jsou tvořeny pěti antiparalelními listy a několika šroubovicemi. Domény se váží na neaktivní oxidovanou formu FMN a pohlcují modré světlo. Mezi C(4a) uhlíkem FMN a sírou blízkého cysteinového zbytku domény LOV dochází ke vzniku kovalentní vazby. Vazba vzniká v reakci na ozáření domény modrým světlem a její vytvoření se odehrává v řádu mikrosekund. Vznik vazby znamená přechod fotoreceptoru do aktivního stavu. Působením tmy dochází k rozpadu vazby mezi FMN a cysteinovým zbytkem v řádu desítek až tisíců sekund. Předpokládá se, že N-terminální fotosenzorická oblast fototropinu, součástí které jsou domény LOV1 a LOV2, ve tmě vytváří s C-terminální kinázovou doménou neaktivní nebo uzavřenou konformaci. V této formě je aktivita kinázy fototropinu potlačena. Působení modrého světla na doménu LOV2 způsobuje změnu v konformaci, což má za následek vazbu ATP na kinázovou doménu a iniciaci autofosforylace fototropinu a tím i jeho aktivaci. Fosforylace probíhá převážně na serinových zbytcích.

Jednou z nejlépe popsáných signálních drah je mechanismus regulace otevírání průduchů působením modrého světla, při kterém hrají zásadní roli draselné kanály a  $H^+$ -ATPáza. Fototropin pohlcením modrého světla vyvolává aktivaci  $H^+$ -ATPázy, jež vede k hyperpolarizaci plazmatické membrány svěřacích buněk průduchů, příjmu draselných iontů skrze draselné kanály a následně příjmu vody, což vede ke zvětšování svěřacích buněk a tím k otevření průduchů (Christie *et al.*, 2015).

### 2.3 Iontové kanály vyšších rostlin

Iontové kanály jsou integrální proteiny, které vytvářejí póry v membránách buněk a zprostředkovávají tak pasivní transport kationtů a aniontů přes membránu. U vyšších



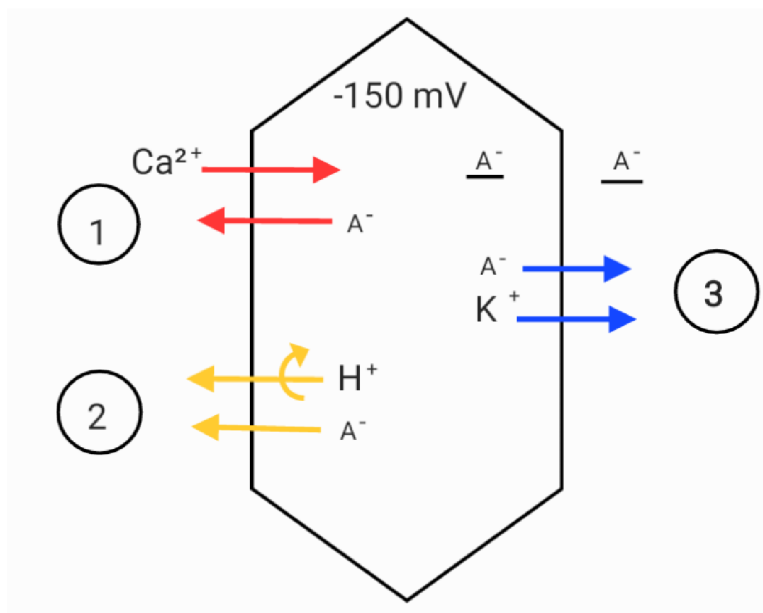
rostlin zajišťují iontové kanály nepostradatelné buněčné procesy, jimiž jsou především minerální výživa, metabolismus uhlíku a dusíku a s tím spojený růst a vývoj rostliny. Nejdůležitějšími funkcemi, které jsou zprostředkovány iontovými kanály jsou buněčná osmoregulace, buněčná signalizace a šíření elektrických signálů. Zajišťují rovněž přenos sekundárních posílů a řízení membránového potenciálu. Jsou součástí plazmatických, plastidových a mitochondriálních membrán. Rovněž se vyskytují v tonoplastu a endoplazmatickém retikulu (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).

### 2.3.1 Aniontové kanály

Role aniontů v rostlinných buňkách se v mnohém liší od jejich funkce v buňkách živočišných. V rostlinných buňkách jsou anionty uloženy převážně ve vakuole. Koncentrace aniontů v cytosolu je výrazně nižší (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000). Ve všech buňkách se nacházejí volné anionty, které mají široké spektrum chemických a regulačních funkcí. Buněčný obsah se dá přirovnat k vodnému roztoku, ve kterém jsou aniony nezbytné pro udržování celkové elektroneutality v buňce. Pro mnoho fyziologických procesů, probíhajících v rostlinných buňkách, je přítomnost aniontů nezbytná. Jejich transport kanály reguluje buněčnou osmolaritu. Aniontové kanály udržují osmolaritu ve většině buněk konstantní. Výjimkou jsou svěrací buňky průduchů, ve kterých regulují jejich otevírání a zavírání (Tavares *et al.*, 2011).

Rostlinné buňky obsahují mnoho různých aniontů, jako jsou chloridové, dusičnanové, síranové, fosforečnanové nebo organické anionty, jimiž jsou především citrát, malát a další (Kollist *et al.*, 2011). Význam těchto aniontů v buňkách je různý. Dusičnany, fosforečnany a sírany jsou využívány jako živiny. Jejich uplatnění spočívá rovněž v poskytnutí dusíku, síry a fosforu při procesu syntézy biomolekul. Malát a citrát se vyznačují přítomností karboxylových skupin a tím i slabě kyselým charakterem, proto jejich úloha spočívá v regulaci pH (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Různé druhy aniontů v rostlinných buňkách znamenají rozdílné funkce aniontových kanálů, jež tyto anionty transportují. Aniontové kanály jsou vysoce selektivní. V závislosti na jejich selektivitě mají široké spektrum funkcí. Kanály selektivní pro chloridy hrají roli v toleranci vůči soli. Kanály selektivní pro nitráty zase v homeostáze dusíku. Kanály selektivní pro organické látky se podílejí na metabolismu uhlíku a regulaci pH (Kollist *et al.*, 2011). Aniontové kanály mají také vliv na regulaci turgoru v buňce, příjem živin, udržování membránového napětí a na šíření signálu buňkou (Schroeder, 1995; White and Broadly, 2001).

Kanály přecházejí mezi otevřeným a uzavřeným stavem. Kdyby byly aniontové kanály buněk permanentně otevřeny, docházelo by k neustálému úniku aniontů a depolarizaci plazmatické membrány, což by vedlo k zániku rostlinné buňky. Když je aniontový kanál otevřen, dochází k toku aniontů ve směru elektrochemického gradientu (Obr. 6). Otevření aniontových kanálů v plazmatické membráně má za následek tok aniontů obsažených v cytoplazmě do extracelulárního prostoru, což vyvolává depolarizaci plazmatické membrány buněk (Kollist *et al.*, 2011). Následkem těchto dějů mohou být aktivovány napětím řízené kanály, jako jsou například kanály specifické pro  $\text{Ca}^{2+}$ . To vede k ovlivnění aktivity  $\text{H}^+$ -ATPasy a toku vodíkových kationtů přes plazmatickou membránu. Tyto děje regulují procesy otevírání průduchů (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).



**Obr 6:** Hlavní buněčné funkce aniontových kanálů plazmatické membrány. Kvůli vysoce negativnímu transmembránovému potenciálu a aniontovému gradientu směřujícímu směrem ven přes plazmatickou membránu, vede otevření aniontových kanálů k uvolnění aniontů z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Aktivita aniontových kanálů je spojena také s aktivitou dalších proteinů, jako je  $\text{H}^+$ -ATPasa,  $\text{Ca}^{2+}$  kanály nebo  $\text{K}^+$  kanály, což přispívá ke třem hlavním funkcím: 1. elektrická signalizace a signalizace vápníku, 2. řízení membránového potenciálu a pH gradientu, 3. osmoregulace (vytvořeno podle Barbier-Brygoo *et al.*, 2000)

### 2.3.1.1 Typy aniontových kanálů

Aniontové kanály jsou přítomny v eukaryotických i prokaryotických buňkách. Jsou děleny na základě závislosti na napětí na depolarizací aktivované kanály a na kanály aktivované hyperpolarizací (Schroeder, 1995; White and Broadly, 2001). Depolarizací aktivované kanály můžeme dále dělit na kanály rychle se aktivující (R-ty) a na kanály pomalu se aktivující (S-ty). Další skupinou jsou kanály aktivované světlem a roztažitelností membrány (De Angeli *et al.*, 2007).

Kanály rychle se aktivující (R-typ) byly studovány především u rostlin *A. thaliana*, *Nicotina tabacum* a *Vicia faba*. Jsou propustné pro dusičnany, sírany a chloridy. Funkce tohoto typu kanálu ještě stále nebyla plně objasněna (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2011). R-typ kanálu je rychle aktivován depolarizací. Hyperpolarizace naopak způsobuje deaktivaci kanálu (Meyer *et al.*, 2010). Jsou kódovány geny z rodiny *ALMT* (aluminium activated malate transporter) (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011).

Kanály pomalu se aktivující (S-typ) byly popsány u *A. thaliana*, *N. tabacum*, *V. faba*, *Xanthium strumarium* a *Coffea arabica*. Jsou charakterizovány pomalou aktivací nebo deaktivací a malou závislostí na napětí. Jsou propustné pro chloridy, malát a dusičnany. Tyto kanály se uplatňují při uzavírání průduchů. Jsou aktivovány kyselinou abscisovou (ABA) (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011; Tavares *et al.*, 2011). Jedním z těchto typů kanálů je protein s názvem SLAC1 (slow anion channel-associated 1), který je exprimován ve svěřacích buňkách průduchů a je propustný pro malát. Jeho funkcí je regulace otevírání a zavírání průduchů v závislosti na kyselině abscisové, oxidu uhličitém, koncentraci vápenatých iontů, vlhkosti, ozonu a dalších podmínkách (Vahisalu *et al.*, 2008).

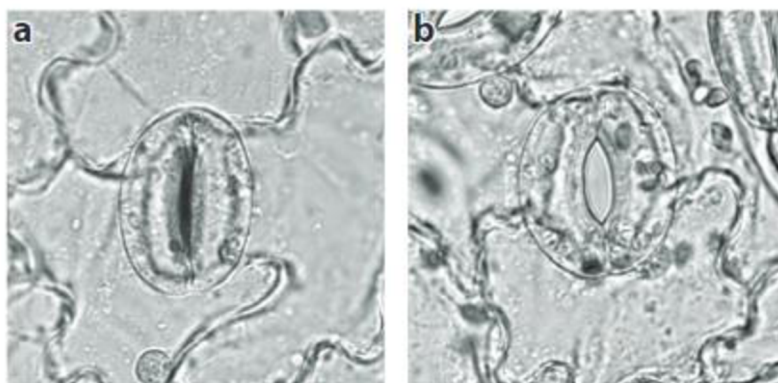
### **2.3.1.2 Vliv světla na aktivitu aniontových kanálů**

Na růst a vývoj rostlin mají zásadní vliv světelné podmínky (Barbier-Brygoo *et al.*, 2011). Aniontové kanály na světelné podmínky reagují svým otevíráním nebo naopak zavíráním. Ve tmě dochází k intenzivnímu růstu hypokotylů etiolizovaných semenáčků. Působením modrého světla však nastává inhibice jejich růstu. Pokusy na *A. thaliana* ukázaly, že inhibice růstových procesů modrým světlem se skládá ze dvou fází. První je zapříčiněna fotoreceptorem specifickým pro UV-A záření a pro modré světlo. Druhá fáze je zprostředkována fotoreceptorem CRY1. První fáze se dostaví do 30 vteřin, zatímco fáze druhá nastává za 45 až 60 minut (Spalding, 2000).

Modré světlo aktivuje aniontové kanály plazmatické membrány a inhibuje prodlužování hypokotylu jako součást deetiolizačního procesu. Modré světlo vyvolává depolarizaci plazmatické membrány, následkem čehož dochází k inhibici elongace hypokotylu. V rostlinných buňkách mívá klidový potenciál zápornější náboj než rovnovážný potenciál vápenatých, chloridových a obvykle také draselných iontů zajišťovaný  $H^+$ -ATPasou. V reakci na modré světlo může docházet k aktivaci kanálů specifických pro výše zmíněné ionty, přičemž aktivace chloridových kanálů a inhibice

H<sup>+</sup>-ATPasy je nejzásadnější. Aktivace těchto kanálů má za následek depolarizaci plazmatické membrány a následnou inhibici růstu hypokotylu (Cho and Spalding, 1996).

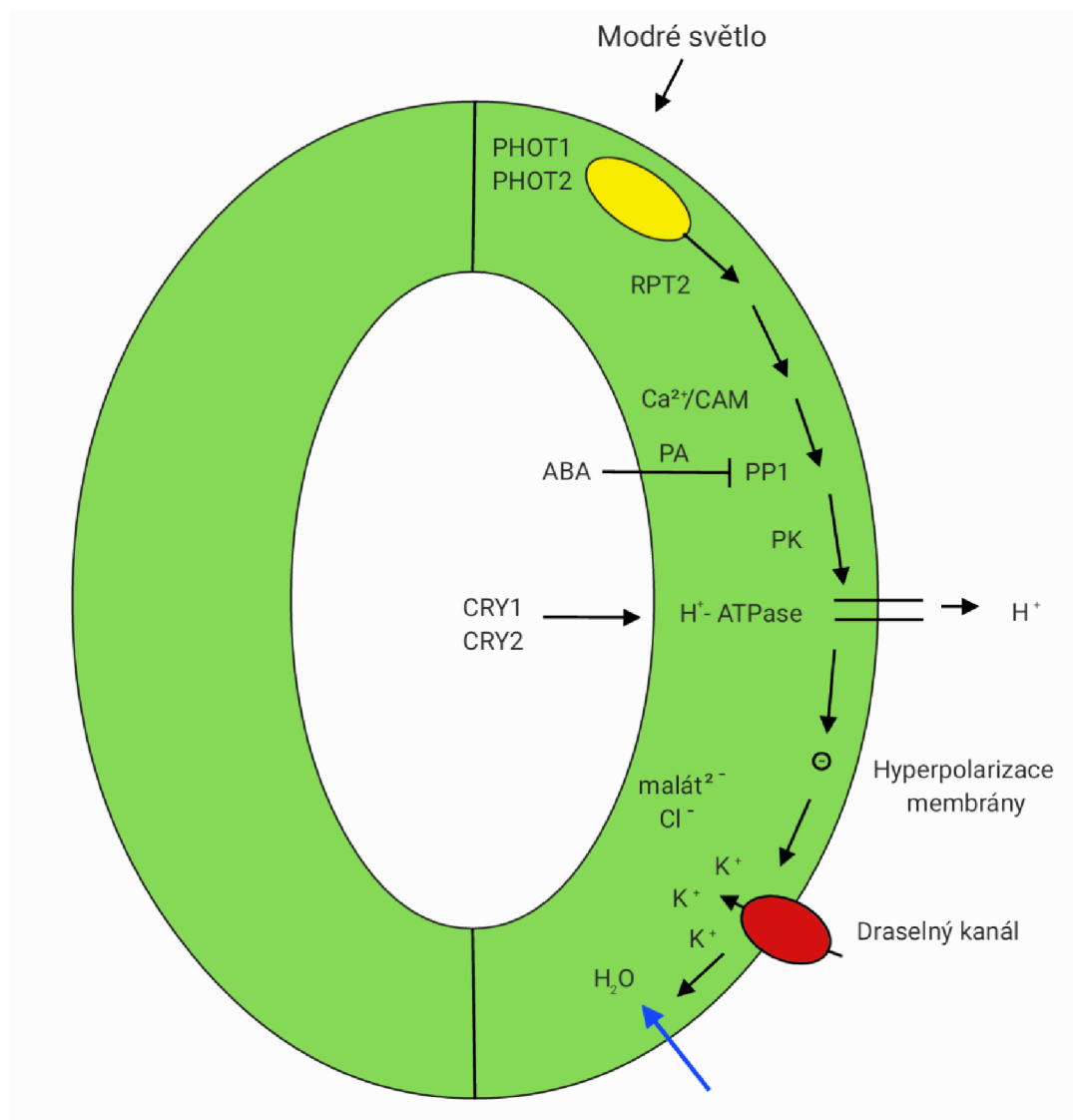
Modré světlo má rovněž zásadní vliv na otevírání a zavírání průduchů (Obr. 7), díky čemuž dochází k výměně plynů listy rostlin. Stomata se na světle otevírají za účelem příjmu oxidu uhličitého, který je potřebný pro fotosyntetickou fixaci uhlíku (Marten *et. al.*, 2007). Pohyb průduchů po působení modrého světla je rychlý a lokalizovaný pouze v jednom typu buněk, a to ve svěracích buňkách průduchů. Svěrací buňky regulují pohyb průduchů, a tím také výměnu plynů mezi rostlinou a prostředím. Působením modrého světla na svěrací buňky dochází ke dvěma reakcím, kterými jsou fotosyntéza v chloroplastech svěracích buněk a specifická odpověď na modré světlo (Taiz and Zeiger, 2010).



**Obr. 7:** (a) Uzavřený průduch v listu *Vicia faba*. (b) Otevřený průduch v listu *V. faba* (převzato z Ward *et. al.*, 2009).

Modré světlo aktivuje H<sup>+</sup>-ATPasy ve svěracích buňkách. Aktivace H<sup>+</sup>-ATPasy způsobuje tok vodíkových protonů přes membránu a následnou hyperpolarizaci plazmatické membrány svěracích buněk. Dochází rovněž ke snížení pH v apoplastickém prostoru kolem svěracích buněk (Taiz and Zeiger, 2010). Do buňky jsou následně transportovány draselné kationty prostřednictvím draselných kanálů. Shromážděné draselné kationty v buňce zvyšují osmotický potenciál ve svěracích buňkách průduchů. To má za následek přítok vody do svěracích buněk s následným zvýšením buněčného turgoru a otevřením stomat (Obr. 8) (Hlavinka *et al.*, 2013). Uzavření průduchů je naopak způsobeno uvolněním draselných kationtů a aniontů ze svěracích buněk průduchů, což vede k odtoku vody a snížení buněčného turgoru, následkem čehož je průduch uzavřen. Dochází k tomu při zvýšené koncentraci oxidu uhličitého, při suchu a ve tmě (Ward *et. al.*, 2009).

Ve svěracích buňkách průduchů se nachází fotoreceptory modrého světla, fototropiny PHOT1 a PHOT2 (Taiz and Zeiger, 2010). Po aktivaci fototropinů světlem dochází současně k inhibici S-typu aniontových kanálů, jako jsou například chloridové kanály nebo kanály specifické pro malát, což vede k otevření průduchů. Některé mechanismy otevírání průduchů prostřednictvím modrého světla využívají mimo fototropiny PHOT1 a PHOT2 také kryptochromy CRY1 a CRY2 (Hlavinka *et al.*, 2013).



**Obr. 8:** Otevírání průduchů indukované modrým světlem, včetně souvisejících signálních komponent. Fototropiny (PHOT1 a PHOT2), H<sup>+</sup>-ATPasa zakotvená v plazmatické membráně a draselné kanály zprostředkovávající tok draselných kationtů dovnitř buňky jsou klíčové komponenty pro otevírání stomat. Kyselina abscisová (ABA) inhibuje otevírání průduchů indukované modrým světlem skrze inhibici PP1. PA je přímý inhibitor PP1. Kryptochromy CRY1 a CRY2 pravděpodobně působí spolu s fototropiny při otevírání průduchů v reakci na modré světlo. RPT2, root phototropism 2; CaM, kalmodulin; PP1, type 1 protein phosphatase; PA, kyselina fosfatidilová; PK, plasma membrane-localized protein kinase; CRY, kryptochrom (vytvořeno podle Kinoshita and Hayashi, 2011).

Na otevírání průduchů má vliv jak modré, tak i červené světlo (Assmann and Jegla, 2016). Ve srovnání s otevíráním průduchů vyvolané působením modrého světla, není červené světlo tak efektivní. Bylo předpokládáno, že chlorofyl má zásadní vliv na otevírání průduchů v reakci na červené světlo. Studie však ukazují, že reakce průduchů na červené světlo je na fotosyntéze svěřacích buněk nezávislá, a že zahrnuje fytochromovou signalizaci (Hlavinka *et al.*, 2013).

## **2.4 Inhibitory aniontových kanálů**

Aniontové kanály vyšších rostlin hrají klíčovou roli v přenosu signálu uvnitř buněk a udržování turgoru. Buněčný turgor je udržován tokem kationtů a aniontů iontovými kanály, což má vliv na prodlužování hypokotylových buněk rostlin. Tyto funkce aniontových kanálů jsou zkoumány převážně ve svěřacích buňkách průduchů.

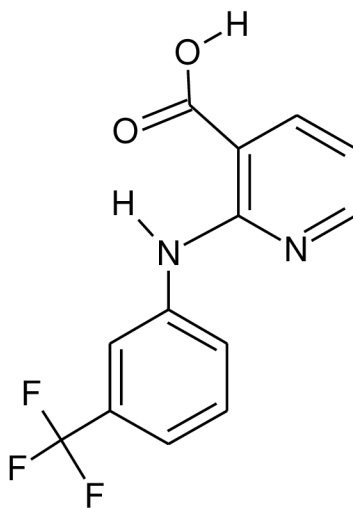
Na cytoplazmatické membráně svěřacích buněk se nachází S-typ a R-typ aniontových kanálů. S-typ aniontových kanálů se podílí na uzavírání průduchů (Thomine *et al.*, 1997). Proces uzavírání průduchů je zprostředkován funkcí aniontových kanálů. Inhibitory aniontových kanálů tyto procesy blokují, čímž silně regulují otevírání průduchů a výrazně ovlivňují stomatální signalizační dráhu (Hlavinka *et al.*, 2013). Na základě informací ohledně regulace otevírání stomat se předpokládá, že otevření aniontového kanálu zabraňuje otevření průduchů, a naopak napomáhá jeho uzavření ztrátou osmoticky aktivních iontů. Otevření aniontového kanálu vede rovněž k depolarizaci membrány. Na základě těchto informací vznikla myšlenka, že inhibitory aniontových kanálů mohou napomáhat otevírání průduchů, a naopak inhibovat jejich uzavírání. Některé inhibitory blokují S-typ aniontových kanálů, jiné R-typ (Schwartz *et al.*, 1995). Aktivace aniontových kanálů v buňkách hypokotylu by mohla vést k regulaci jejich růstu kvůli poklesu turgoru v buňce. Na základě toho by inhibitory aniontových kanálů měly stimulovat prodlužování hypokotylů rostlin (Thomine *et al.*, 1997).

### **2.4.1 Inhibitor NIF**

Inhibitor NIF (kyselina niflumová) (Obr. 9) blokuje S-typ aniontových kanálů. Při experimentech prováděných na *V. faba* L. se ukázalo, že NIF zabraňuje toku iontů S-typem aniontových kanálů v buňkách průduchů, stejně jako inhibitor 9-AC. Rovněž působí podobně jako 9-AC proti inhibici otevírání průduchů u *V. faba* L. a *Commelina communis* L. (Schwartz *et al.*, 1995). Mezi inhibitorem NIF a 9-AC se však objevují

rozdíly v inhibici jednotlivých typů kanálů. Inhibitor NIF reverzibilně inhibuje R-typ aniontového kanálu více, ve srovnání s inhibitorem 9-AC. S-typ aniontového kanálu je naopak více inhibován 9-AC. Dokazuje to fakt, že při experimentech prováděných na *A. thaliana* s oběma inhibitory, pouze 9-AC vyvolal otevření průduchů ve tmě.

Otevírání průduchů ovlivňuje ABA. ABA je rostlinný hormon, jež se akumuluje v rostlině, která je vystavena stresu. Způsobuje uzavření průduchů vazbou na receptor, což spouští produkci peroxidu vodíku a oxidu dusnatého. Následné děje vedou k toku draselných kationtů ze svěřacích buněk průduchů a k aktivaci aniontových kanálů transportujících anionty z buňky. Následuje depolarizace cytoplazmatické membrány a uzavření průduchů. Působením modrého světla může dojít k zabránění uzavírání stomat vyvolaného vlivem ABA, která inhibuje fosforylaci  $H^+$ -ATPázy a vychytávání draselných kationtů. Použití inhibitoru NIF při experimentech s *V. faba* L. a *C. communis* L. mělo za následek zabránění inhibice otevírání průduchů vyvolané ABA. Stejně tomu je při použití inhibitoru 9-AC. Při experimentech prováděných na *A. thaliana* L. a *C. communis* došlo působením inhibitoru 9-AC ke zrušení působení ABA na světle, v případě inhibitoru NIF byl pozorován stejný účinek pouze u *A. thaliana* L. (Hlavinka *et al.*, 2013).

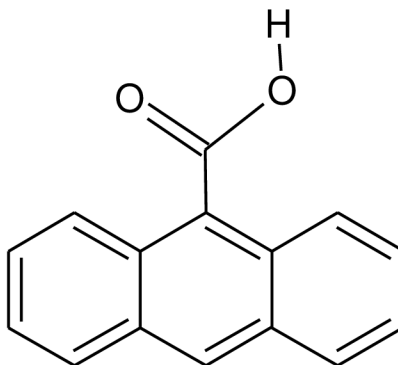


**Obr. 9:** Chemická struktura kyseliny niflumové (NIF)  
(vytvoreno v programu ChemSketch)

#### 2.4.2 Inhibitor 9-AC

Inhibitor 9-AC (kyselina antracen-9-karboxylová) (Obr. 10) zabraňuje toku aniontů přes S-typ aniontových kanálů svěřacích buněk *V. faba* L. a tím ruší inhibici otevírání průduchů vyvolanou ABA (Schwartz *et al.*, 1995). Aniontové kanály se pravděpodobně účastní také auxinové signalizace. Inhibitory aniontových kanálů jako 9-AC se účastní

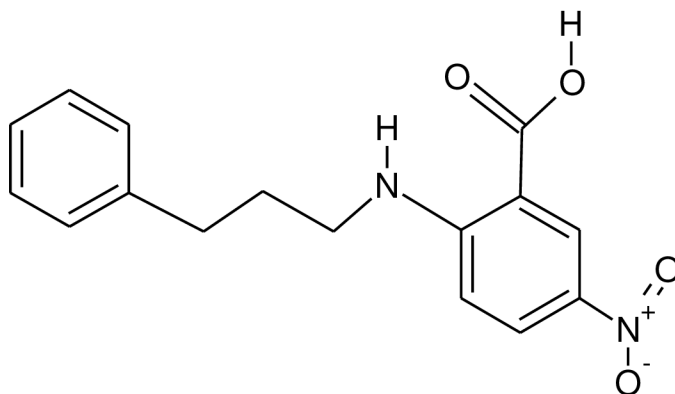
prodlužování hypokotylových buněk pouze mírně, ale působí výrazně proti inhibici vyvolané auxiny. Při aplikaci samostatného 9-AC má inhibitor malý vliv na vývoj hypokotylu. U *A. thaliana* při aplikaci s auxinem zeslabuje reakci hypokotylu na auxin a působí proti jeho inhibičnímu účinku (Thomine *et al.*, 1997).



**Obr. 10:** Chemická struktura kyseliny antracen-9-karboxylové (9-AC) (vytvořeno v programu ChemSketch)

### 2.4.3 Inhibitor NPPB

Inhibitor NPPB (kyselina 5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoová) (Obr. 11) je účinným blokátorem S-typu aniontových kanálů plazmatické membrány svěřacích buněk průduchů (Schroeder *et al.*, 1993). Působí proti depolarizaci plazmatické membrány hypokotylových buněk, vyvolané účinkem modrého světla. Působí proti inhibici elongace buněk hypokotylu, rovněž vyvolané modrým světlem (Thomine *et al.*, 1997). Inhibitor zcela ruší uzavírání průduchů vyvolané ABA a malátem (Barbier-Brygoo *et al.*, 2000).



**Obr. 11:** Chemická struktura kyseliny 5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoové (NPPB) (vytvořeno v programu ChemSketch)



### 3 MATERIÁL A METODIKA

#### 3.1 Rostlinný materiál

K experimentům byla použita semena rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.), a to konkrétně recesivního mutanta *7B-1* odvozeného od kultivaru cv. Rutgers, který byl poskytnut prof. V. K. Sawhney (University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada). Jako kontrolní genotyp byl použit cv. Rutgers (wild-type, WT). Mutant *7B-1* se vyznačuje tolerancí k abiotickým stresům (zasolení, osmotický stres, nízká teplota), a to specificky na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002), a má defekt v reakcích zprostředkovaných fototropiny (Hlavinka *et al.*, 2013; Fellner, nepublikované výsledky). Pro další sérii experimentů byl použit recesivní mutant *cry1-2* odvozený od kultivaru Money Maker, který byl poskytnut prof. R. E. Kendrickem (Wageningen University, Wageningen, The Netherlands). Jako kontrolní genotyp byl použit Money Maker (wild-type, WT). Mutant *cry1-2* má defekt ve fotoreceptoru CRY1 pro modré světlo (Weller *et al.*, 2001).

#### 3.2 Roztoky a chemikálie

MS (Murashige and Skoog) médium (Cat. no. M0221.0100, Duchefa Biochemie, Nizozemsko) (Murashige and Skoog, 1962)

1 M hydroxid draselný (KOH)

MES (morpholinoethane sulfonic acid) (Cat. no. 29834.02, Serva, Německo)

Destilovaná voda

Sterilní destilovaná voda (dH<sub>2</sub>O)

Sacharóza (Cat. no. 40135, Lach-Ner, s. r. o., Česká republika)

Phytoagar (Cat. no. P1001.1000, Duchefa Biochemie, Nizozemsko)

96% a 70% ethanol

Ředěný roztok Savo (chlornan sodný) obsahující 2,8 % aktivního chloru

10<sup>-2</sup> M 9-AC (kyselina antracen-9-karboxylová)

10<sup>-2</sup> M NIF (kyselina niiflumová)

10<sup>-2</sup> M NPPB (kyselina 5-nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoová)

#### 3.3 Seznam použitých přístrojů

Růstové komory Microclima 1000E (Snijders Scientific B.V, Nizozemsko)

Analytické váhy

Laminární flowbox (Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific)

pH metr

Předvážky

Lednice

Mrazicí box

Parní tlakový autokláv

Mikrovlnná trouba

Magnetická míchačka

### **3.4 Příprava MS média**

Do 2l Erlenmeyerovy baňky byl nalit 1 l destilované vody a vloženo magnetické míchadlo. Baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Na předvážkách bylo na váženice naváženo 20 g sacharózy a 8,6 g MS média, které byly přidány do baňky. Na analytických vahách bylo na váženice naváženo 390,4 mg pufru MES, který byl rovněž přidán do baňky. Objem v Erlenmeyerově baňce byl doplněn pomocí odměrného válce na 2 l. Elektroda pH metru byla omyta destilovanou vodou a ponořena do roztoku v Erlenmeyerově baňce. Roztok byl stále míchán. Do Erlenmeyerovy baňky byl postupně přidáván 1 M hydroxid draselný (KOH) Pasteurovou pipetou až do vyrovnání pH na hodnotu 6,1. Na předvážkách bylo na váženice naváženo 3,5 g phytoagaru, který byl přidán do termoláhve se šroubovacím uzávěrem. Pomocí odměrného válce bylo odměřeno 500 ml média z Erlenmeyerovy baňky a přelito do láhve. Takto byly připraveny 4 láhve. Láhve byly uzavřeny, popsány a jejich uzávěry byly překryty hliníkovou fólií. Na uzávěr překrytý hliníkovou fólií byla nalepena autoklávovací páska. Připravené médium bylo předáno ke sterilizaci v parním tlakovém autoklávu.

### **3.5 Výsev semen**

Pro první sérii experimentů bylo na papíře napočítáno 300 semen kultivaru cv. Rutgers a 300 semen recesivního mutanta *7B-1* odvozeného od kultivaru cv. Rutgers. Pro druhou sérii experimentů bylo na papíře napočítáno 300 semen kultivaru cv. MM a 300 semen recesivního mutanta *cry1-2* odvozeného od kultivaru cv. MM. Semena obou genotypů byla dána do nesterilních 50 ml centrifugačních zkumavek. K semenům byl přidán roztok SAVO a centrifugační zkumavky byly protřepány. Další práce probíhala za sterilních podmínek. Po 25 až 30 minutách byl sterilizační roztok SAVO

z centrifugačních zkumavek odpipetován. K semenům byla přidána sterilní destilovaná voda a roztok byl opět protřepán. Destilovaná voda byla následně odpipetována tak, aby nedošlo k nasátí jednotlivých semen špičkou automatické pipety. Tento postup byl u každého genotypu pětkrát zopakován. Po dokončení promytí bylo k semenům přidáno 5 ml sterilní destilované vody.

Ztuhlé kultivační MS médium bylo dáno do mikrovlnné trouby a rozežháno (čirý roztok). Byl zapnut laminární box a pracovní deska byla očištěna 70% ethanolem. Rozehřáté kultivační médium bylo nalito do dvanácti plastových sterilních kulatých Petriho misek (průměr 90 mm) vždy po 20 ml, které byly odměřeny sterilní centrifugační zkumavkou. Po ztuhnutí média bylo do šesti Petriho misek vyseto na povrch média pomocí dlouhé pinzety vždy 50 semen jednoho genotypu. Pinzeta byla předtím ponořena do 96% ethanolu a ožehnuta nad plamenem lihového kahanu. Všechny Petriho misky byly následně popsány a oblepeny dvěma vrstvami fixační pásky z netkané textilie (Softpore; výrobce Batist medical, a.s., ČR). Petriho misky se semeny byly zvlášť zabaleny do hliníkové fólie, aby k semenům nepronikalo světlo. Na balíčky s Petriho miskami byla přilepena barevná lepící páska s popiskem a misky byly ve vertikální poloze (kořenem dolů) umístěny do automatické růstové komory. Semena byla v komoře kultivována po dobu 3 až 4 dní při teplotě 23 °C.

### **3.6 Přenos klíčících semen**

Kultivační MS médium bylo vloženo do mikrovlnné trouby, ohřáto a postupně protřepáváno až do úplného rozežhání (čirý roztok). Byl zapnut laminární box a pracovní deska byla očištěna 70% ethanolem. Byly připraveny Petriho misky vybraných koncentrací inhibitorů (9-AC, NIF, NPPB). Nejprve byly připraveny kontrolní misky bez inhibitoru. Rozehřáté kultivační médium bylo pomocí sterilní centrifugační zkumavky nalito do šesti Petriho misek vždy po 20 ml. Následně byly postupně připraveny misky s médiem obsahujícím inhibitor 9-AC o koncentracích 0, 50, 75, 150, 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *7B-1* a kontrolní genotyp cv. Rutgers a o koncentracích 0, 50, 100, 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *cryI-2* a kontrolní kultivar cv. MM. Stejným způsobem byly připraveny misky obsahující inhibitor NIF o koncentracích 0, 30, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *7B-1* a cv. Rutgers a o koncentracích 0, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *cryI-2* a cv. MM. Podobně byly připraveny misky obsahující inhibitor NPPB o koncentracích 0, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *7-B1* a cv. Rutgers a o koncentracích 0, 40, 60, 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  pro genotyp *cryI-2* a cv. MM. Pro přípravu misek o

dané koncentraci bylo pomocí 50 ml sterilní centrifugační zkumavky do Erlenmeyerovy baňky nalito 120 ml MS média a pomocí automatické pipety přidán zásobní roztok daného inhibitoru o koncentraci  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Tab. 1). Roztok v Erlenmeyerově baňce byl promíchán a nalit do šesti Petriho misek vždy po 20 ml pomocí sterilní centrifugační zkumavky.

**Tab. 1:** Použité koncentrace inhibitoru NIF, NPPB a 9-AC a množství inhibitoru (zásobní roztok o koncentraci  $10^{-2} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) přidaného do 120 ml MS média pro experimenty prováděné s mutanty *7B-1* a *cryI-2*.

| Inhibitor | použité koncentrace inhibitoru [ $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ] |     |     |      |      |      |
|-----------|--|-----|-----|------|------|------|
| NIF       | 0  | 30  | 60  | 90   | 120  |      |
| NPPB      | 0  | 10  | 20  | 40   | 60   | 80   |
| 9-AC      | 0  | 50  | 75  | 100  | 150  | 250  |
|           | použité množství inhibitoru na 120 ml MS média [ $\mu\text{l}$ ]     |     |     |      |      |      |
| NIF       | 0  | 360 | 720 | 1080 | 1440 |      |
| NPPB      | 0  | 120 | 240 | 480  | 720  | 960  |
| 9-AC      | 0  | 600 | 900 | 1200 | 1800 | 3000 |

Petriho misky s naklíčenými semeny byly vytaženy po třech až čtyřech dnech z kultivační komory a fixační náplastí z netkané textilie na všech Petriho miskách byly rozříznuty skalpelem. Pinzetou sterilizovanou v 96% ethanolu a ožehnutou nad plamenem lihového kahanu byla naklíčená semena přenesena na média obsahující jeden z inhibitorů. Do dvanácti Petriho misek s médiem o daných koncentracích inhibitoru (tři misky pro každou koncentraci) bylo umístěno vždy 7-10 klíčících semen kultivaru cv. Rutgers nebo cv. MM. Semena byla umístěna pinzetou do jedné řady uprostřed Petriho misky, kořenem směrem dolů. Stejným způsobem byla do misek přenesena klíčící semena dalšího genotypu, mutanta *7B-1* nebo *cryI-2*. Všechny misky byly opět přelepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie. Misky s oběma genotypy byly následně rozděleny do tří částí tak, že každá část obsahovala vždy Petriho misky se semeny obou genotypů umístěných na MS médiu se všemi připravenými koncentracemi inhibitoru. Pro kultivaci ve tmě byla jedna část Petriho misek obalena hliníkovou fólií, byla na ni umístěna barevná lepící páska s popiskem a misky byly ve vertikální poloze (kořenem dolů) umístěny do spodní části růstové komory. Druhá část misek byla popsána lihovým fixem a misky byly umístěny do speciálního stojanu, aby byly rovněž ve vertikální poloze. Stojany s miskami byly umístěny do kultivační komory s

kontinuálním modrým světlem. Třetí část byla popsána lihovým fixem, dána do stojanu na Petriho misky a umístěna do kultivační komory s kontinuálním červeným světlem. Zdrojem kontinuálního modrého a červeného světla byly trubice Philips TLD-36W/18-Blue a TLD-36W/15-Red. Maximální svítivost modrého světla při 440 nm byla  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Maximální svítivost červeného světla při 660 nm byla  $10 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ . Semena byla v komoře kultivována po dobu sedmi dní při teplotě 23 °C.

### **3.7 Měření délky kořene a hypokotylu**

Délky kořene a hypokotylu rostlin byly změřeny po týdenní kultivaci. Rostlina byla přenesena pomocí pinzety z Petriho misky na černý papír a její rozměry byly změřeny pravítkem s přesností na jeden milimetr. Hodnoty byly zapsány do tabulek a zpracovány do formy grafů v programu Microsoft Excel. Součástí byla rovněž statistická analýza dat. Každý experiment byl třikrát zopakován.

## 4 VÝSLEDKY

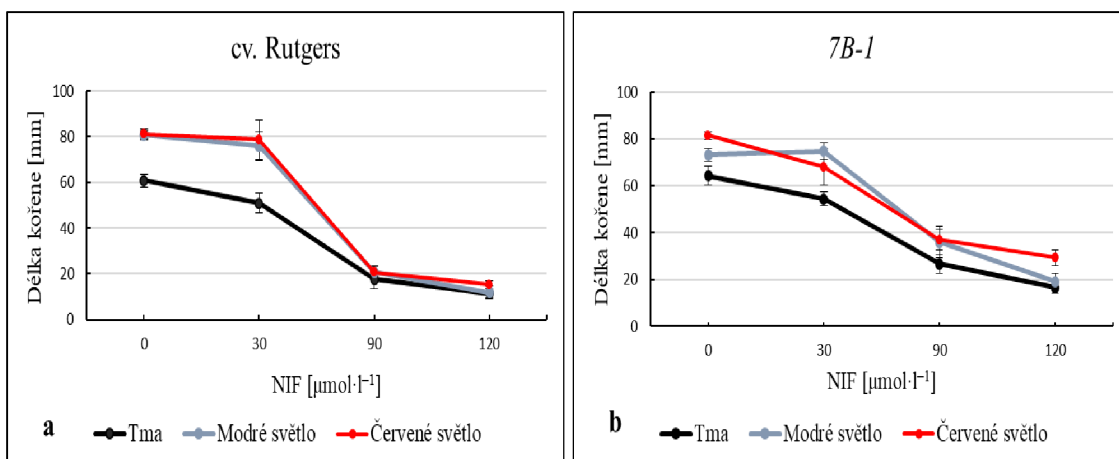
### 4.1 Růstové reakce mutantu *7B-1*

V první sérii experimentů byl sledován růst kořene a hypokotylu mutantu *7B-1* rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na koncentraci inhibitoru aniontových kanálů NIF (0, 30, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 9-AC (0, 50, 75, 150, 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a NPPB (0, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) přidaných do kultivačního média a na vybraných světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Jako kontrolní genotyp (WT) byl použit cv. Rutgers, od kterého byl mutant *7B-1* odvozen. Experiment byl pro každý inhibitor třikrát zopakován.

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály zapojeny v růstu rostlin rajčete, a zda je jejich aktivita případně ovlivňována světlem. Analýza mutantu *7B-1* by pak měla odpovědět na otázku, zda se na případné regulaci aniontových kanálů světlem podílí funkční produkt genu *7B-1*.

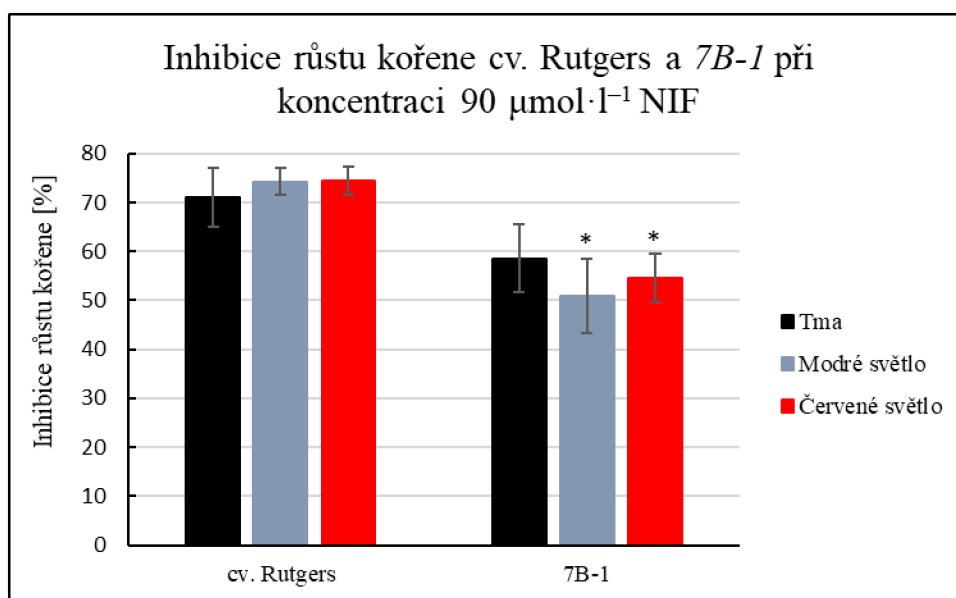
#### 4.1.1 Vliv inhibitoru NIF na růst mutantu *7B-1*

Etiolizované kořeny rostlin cv. Rutgers na médiu bez přítomnosti NIF byly výrazně kratší než kořeny rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 12a). U mutantu *7B-1* byly etiolizované kořeny na základním médiu rovněž kratší než na modrém a červeném světle, avšak na rozdíl od cv. Rutgers byly kořeny *7B-1* na modrém světle kratší než na světle červeném (Obr. 12b). Inhibitor NIF redukoval délku etiolizovaných kořenů cv. Rutgers (Obr. 12a) a mutantu *7B-1* (Obr. 12b) úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru, přičemž při koncentraci 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byly kořeny obou genotypů výrazně zkráceny, a to u rostlin rostoucích na všech testovaných světelných podmínkách (Obr. 12a, b).



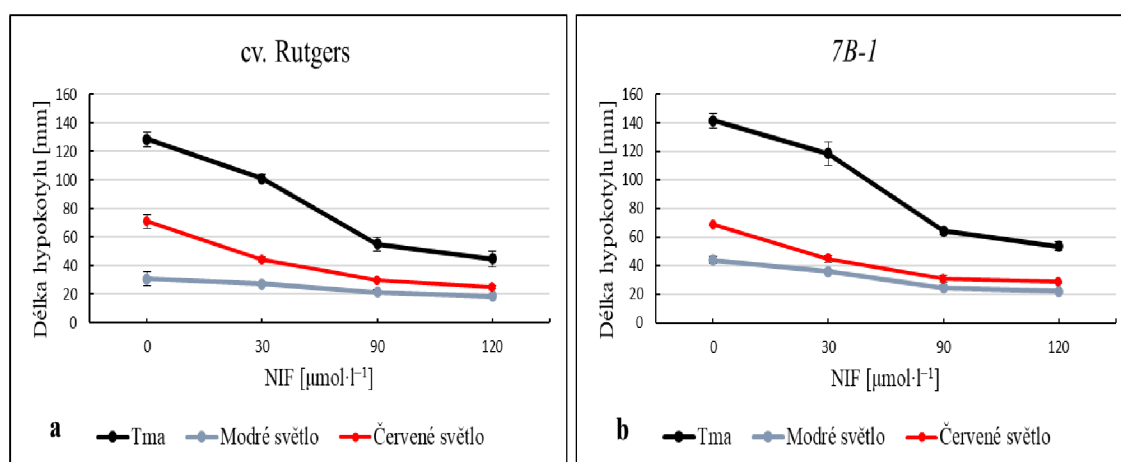
**Obr. 12:** Průměrná délka kořenů cv. Rutgers (a) a mutanta 7B-1 (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NIF (0, 30, 90, 120 μmol·l<sup>-1</sup>). Data ukazují průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu kořenů cv. Rutgers a mutanta 7B-1 při koncentraci inhibitoru NIF 90 μmol·l<sup>-1</sup> byla odlišná (Obr. 13). Mutant 7B-1 vykazoval ve všech světelných podmínkách výrazně nižší inhibici růstu kořene než cv. Rutgers, přičemž na modrém a taktéž na červeném světle byl rozdíl v citlivosti kořenů k inhibičnímu účinku NIF signifikantní. Kořeny mutanta 7B-1 vykazovaly sníženou citlivost k NIF i při nižších testovaných koncentracích (neukázáno). Úroveň inhibice růstu kořene u cv. Rutgers se výrazně nelišila na testovaných světelných podmínkách.



**Obr. 13:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutanta 7B-1 a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NIF o koncentraci 90 μmol·l<sup>-1</sup>. Data ukazují průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi cv. Rutgers a mutantem 7B-1 při stejných světelných podmínkách je označen hvězdičkou (t-test, P = 0,05).

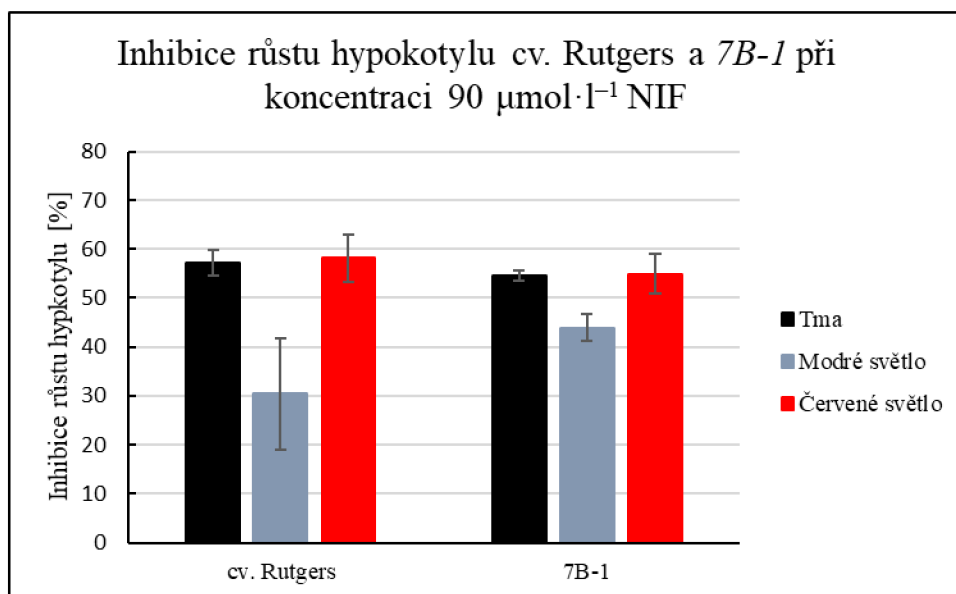
Etiolizované hypokotyly rostlin cv. Rutgers na základním médiu byly výrazně delší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 14a). Etiolizované hypokotyly mutantu *7B-1* na médiu bez přítomnosti NIF byly rovněž delší než na modrém a červeném světle (Obr. 14b). Hypokotyly obou genotypů rostoucích na základním médiu byly po působení modrého světla kratší než hypokotyly rostoucí na světle červeném (Obr. 14a, b). Inhibitor NIF redukoval délku hypokotylů cv. Rutgers (Obr. 14a) a mutantu *7B-1* (Obr. 14b) úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru.



**Obr. 14:** Průměrná délka hypokotylů cv. Rutgers (a) a mutantu *7B-1* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NIF (0, 30, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu hypokotylů cv. Rutgers a mutantu *7B-1* při koncentraci inhibitoru NIF 90  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla mezi genotypy odlišná na modrém světle (Obr. 15). Mutant *7B-1* vykazoval na modrém světle mírně vyšší inhibici růstu než cv. Rutgers, přičemž inhibice růstu byla u obou genotypů na modrém světle nižší než při ostatních světelných podmínkách. Úroveň inhibice růstu etiolizovaných hypokotylů a hypokotylů na červeném světle se mezi genotypy výrazně nelišila. Při ostatních testovaných koncentracích inhibitoru NIF nebyly rozdíly v inhibici růstu hypokotylů *7B-1* a cv. Rutgers zřejmé (neukázáno).

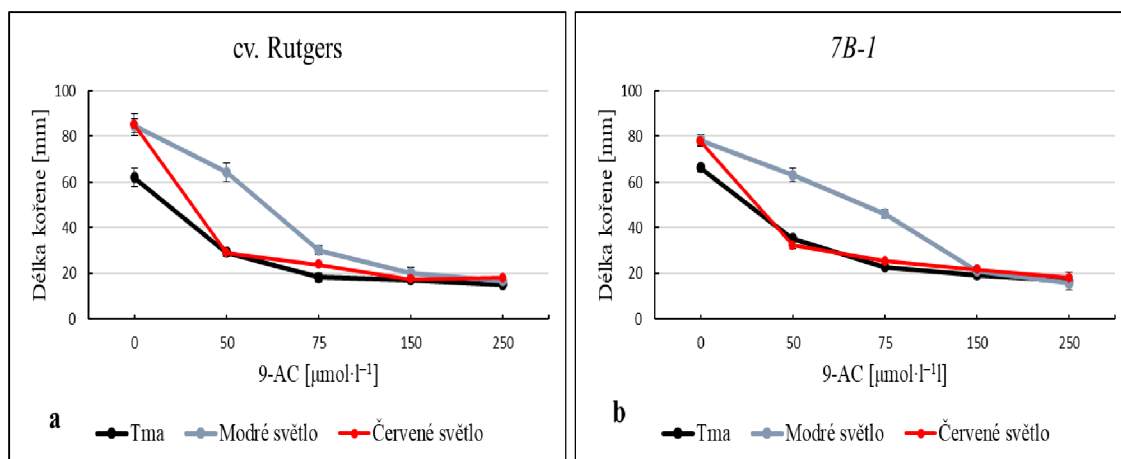




**Obr. 15:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotylů mutantu *7B-1* a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NIF o koncentraci  $90 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

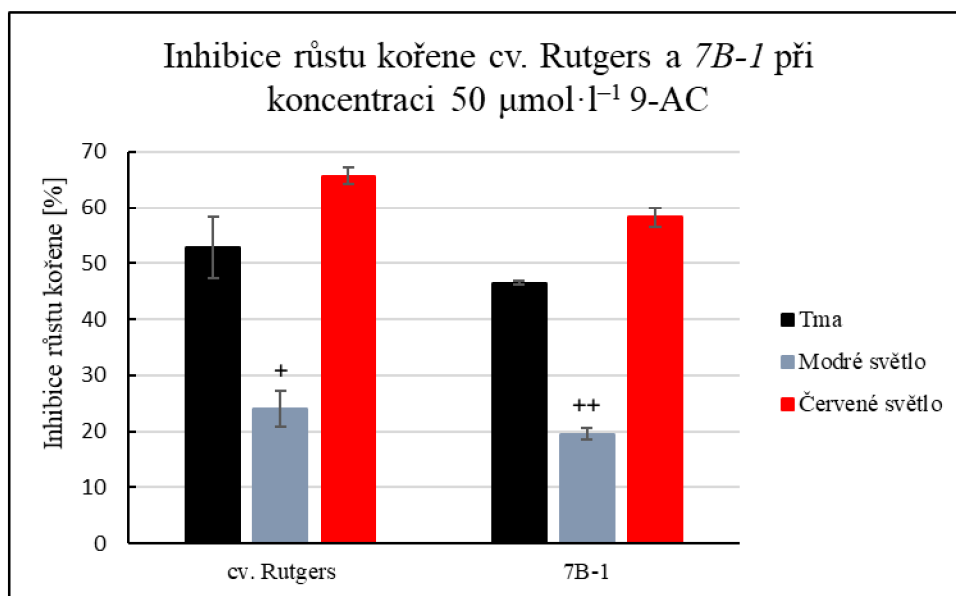
#### 4.1.2 Vliv inhibitoru 9-AC na růst mutantu *7B-1*

Etiolizované kořeny cv. Rutgers na médiu bez přítomnosti inhibitoru 9-AC byly výrazně kratší než kořeny rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 16a). V případě mutantu *7B-1* byly etiolizované kořeny na základním médiu taktéž kratší než na modrém a červeném světle (Obr. 16b). Kořeny rostoucí na médiu bez přítomnosti inhibitoru byly na modrém a na červeném světle stejně dlouhé, a to u obou genotypů (Obr. 16a, b). Inhibitor 9-AC redukoval délku kořenů cv. Rutgers úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru, přičemž při koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byly kořeny rostoucí na modrém světle výrazně delší než při ostatních světelných podmínkách (Obr. 16a). Kořeny mutantu *7B-1* na modrém světle byly rovněž při koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , ale také při koncentraci  $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , výrazně delší než při ostatních světelných podmínkách (Obr. 16b).



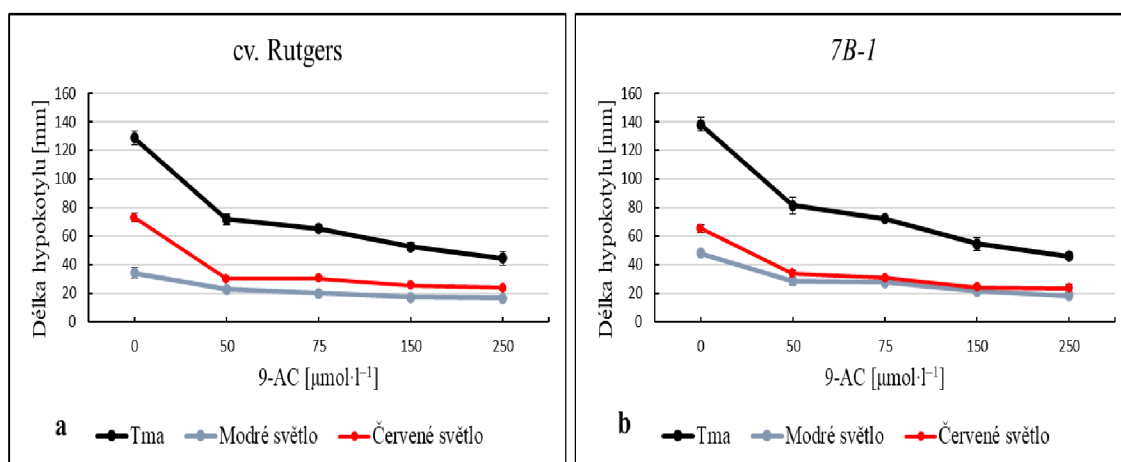
**Obr. 16:** Průměrná délka kořenů cv. Rutgers (a) a mutanta *7B-1* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci 9-AC (0, 50, 75, 150, 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu kořenů cv. Rutgers a mutanta *7B-1* při koncentraci inhibitoru 9-AC 50  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla mezi genotypy podobná při všech světelných podmínkách (Obr. 17). Na modrém světle vykazovaly oba testované genotypy výrazně nižší inhibici růstu kořene než za ostatních světelných podmínek, přičemž byl tento rozdíl od inhibice etiolizovaných kořenů signifikantní. Při vyšších testovaných koncentracích inhibitoru 9-AC byly rozdíly v inhibici růstu kořene mezi světelnými podmínkami méně výrazné (neukázáno). Inhibice růstu kořene se mezi genotypy lišila pouze při aplikaci 9-AC v koncentraci 75  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdy vykazoval mutant *7B-1* sníženou citlivost k 9-AC na modrém světle (neukázáno).



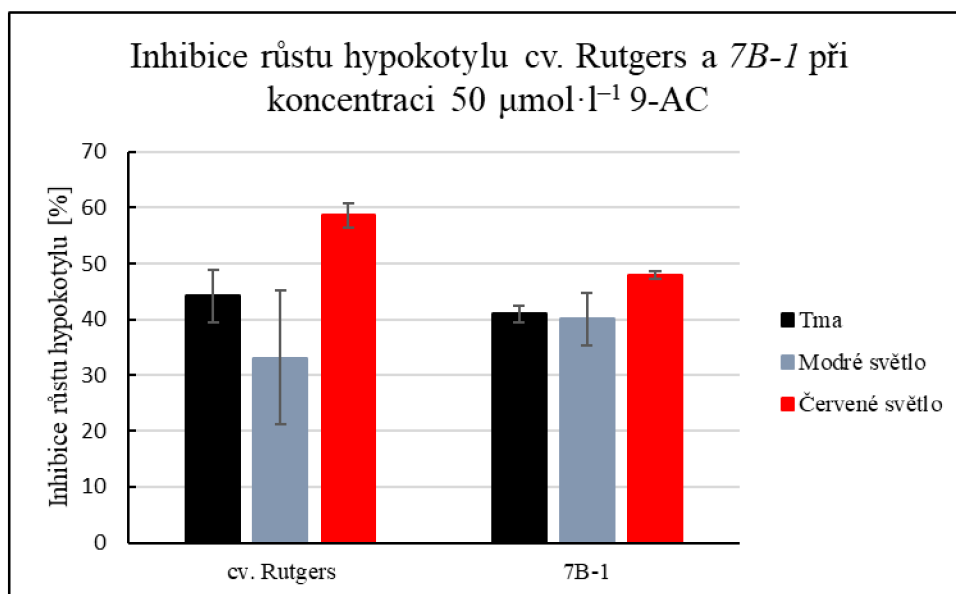
**Obr. 17:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutantu *7B-1* a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru 9-AC o koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl od inhibice etiolizovaných kořenů každého kontrolního genotypu je označen znamením plus (t-test,  $P = 0,05$ ), případně dvěma znameními plus (t-test,  $P = 0,01$ ).

Etiolizované hypokotyly rostlin cv. Rutgers na základním médiu byly výrazně delší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 18a). U mutantu *7B-1* byly hypokotyly rostlin rostoucích ve tmě na základním médiu také delší než na modrém nebo na červeném světle (Obr. 18b). Hypokotyly obou genotypů rostoucích na základním médiu byly po působení modrého světla kratší než hypokotyly rostoucí na světle červeném (Obr. 18a, b). Inhibitor 9-AC redukoval délku hypokotylů cv. Rutgers (Obr. 18a) a mutantu *7B-1* (Obr. 18b) úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru.



**Obr. 18:** Průměrná délka hypokotylů cv. Rutgers (a) a mutantu *7B-1* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci 9-AC (0, 50, 75, 150, 250  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

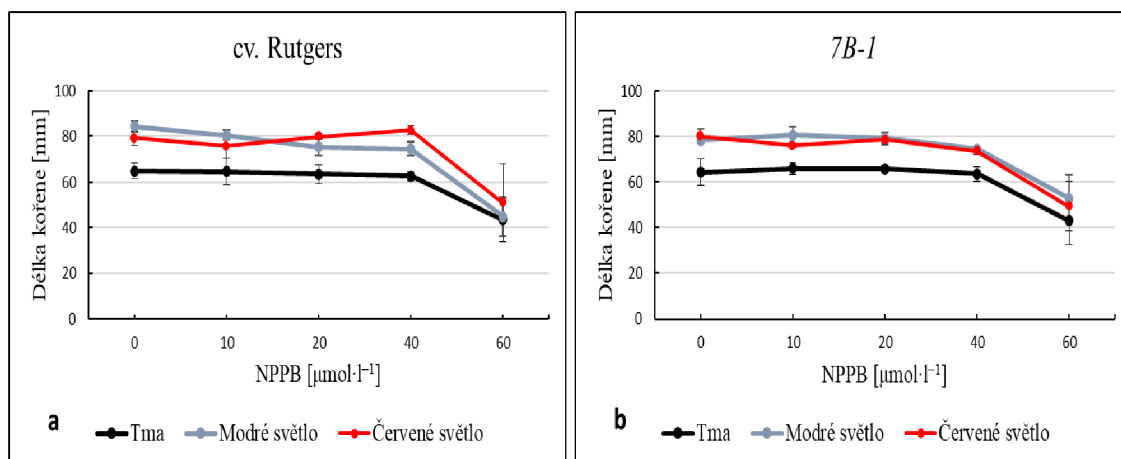
Inhibice růstu hypokotylů mutantu *7B-1* byla ve tmě a na modrém světle srovnatelná s inhibicí cv. Rutgers při aplikaci inhibitoru 9-AC v koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 19). Na červeném světle byla inhibice růstu hypokotylů mutantu *7B-1* pouze mírně nižší než inhibice růstu hypokotylů cv. Rutgers. I při ostatních testovaných koncentracích vykazovaly hypokotyly mutantu *7B-1* a cv. Rutgers podobnou citlivost k inhibičním účinkům 9-AC (neukázáno). Úroveň inhibice růstu hypokotylů cv. Rutgers byla na červeném světle mírně zvýšená (Obr. 19).



**Obr. 19:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotylů mutantu *7B-1* a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru 9-AC o koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

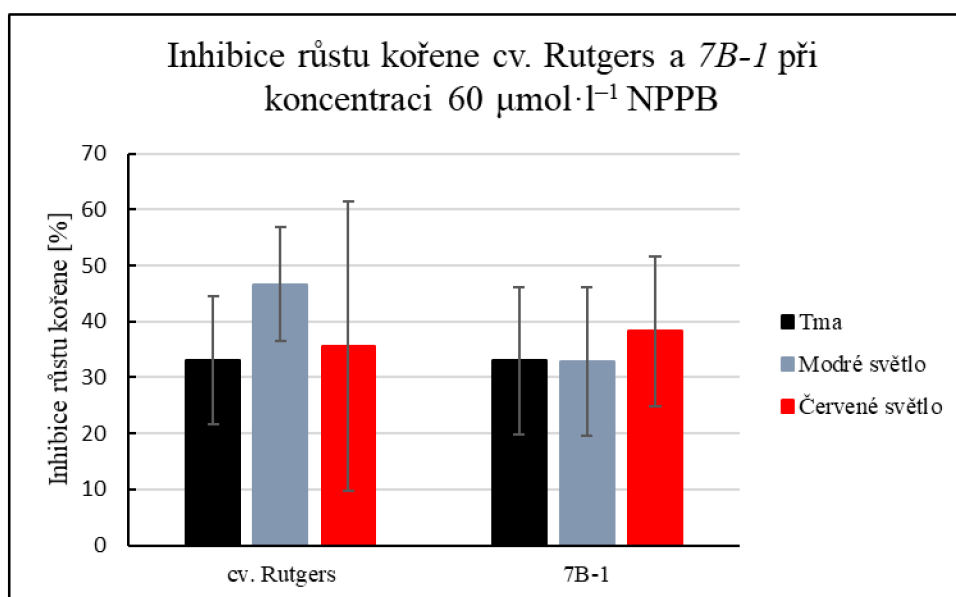
#### 4.1.3 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutantu *7B-1*

Etiolizované kořeny rostlin cv. Rutgers na médiu bez přítomnosti inhibitoru NPPB byly výrazně kratší než kořeny rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 20a). Podobně tomu bylo i u mutantu *7B-1* (Obr. 20b). Kořeny *7B-1* rostoucí na médiu bez přítomnosti inhibitoru byly na modrém i na červeném světle přibližně stejně dlouhé (Obr. 20b). K výraznější redukci délek kořenů docházelo u obou genotypů pouze při aplikaci NPPB v nejvyšší testované koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to u rostlin rostoucích ve všech světelných podmínkách.



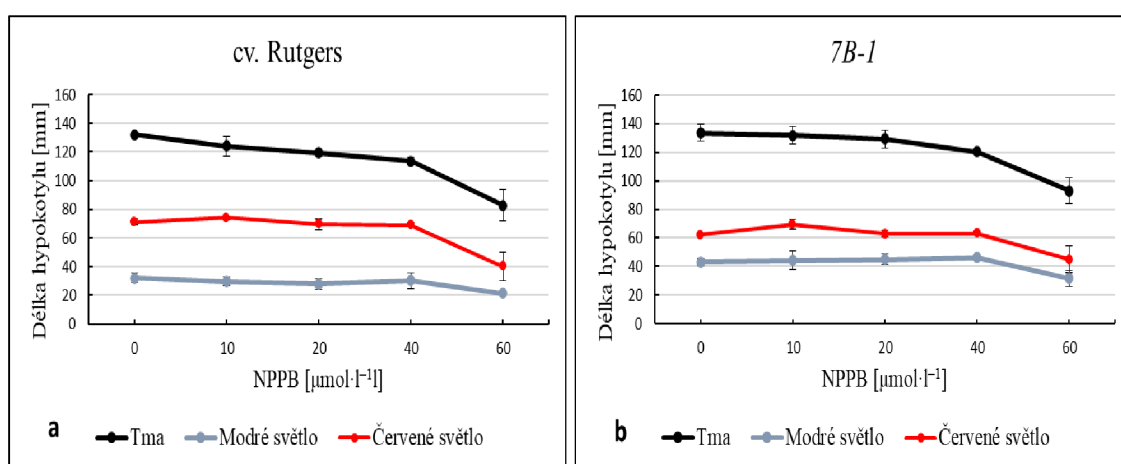
**Obr. 20:** Průměrná délka kořenů cv. Rutgers (a) a mutanta 7B-1 (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NPPB (0, 10, 20, 40, 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Výrazná inhibice růstu kořenů nastala u cv. Rutgers a mutanta 7B-1 pouze při aplikaci inhibitoru NPPB v nejvyšší testované koncentraci 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 21). Mutant 7B-1 vykazoval při této koncentraci na modrém světle mírně nižší inhibici růstu kořenů než cv. Rutgers. Při ostatních aplikovaných koncentracích inhibitoru k inhibici růstu kořenů obou genotypů prakticky nedocházelo (neukázáno).



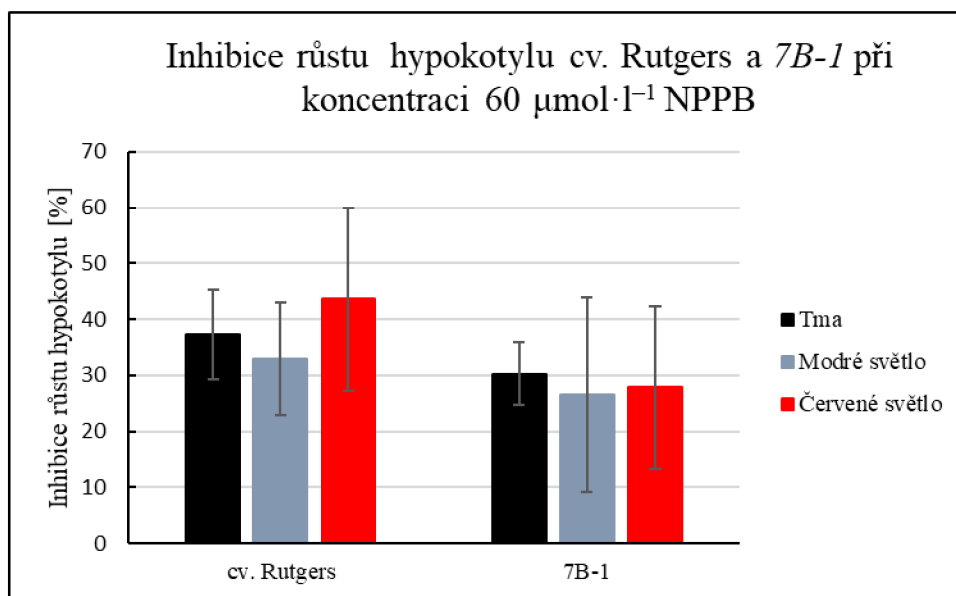
**Obr. 21:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutanta 7B-1 a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NPPB o koncentraci 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Etiolizované hypokotyly rostlin cv. Rutgers (Obr. 22a) i mutanta *7B-1* (Obr. 22b) na médiu bez přítomnosti inhibitoru NPPB byly výrazně delší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém či červeném světle. Hypokotyly obou genotypů rostoucích na základním médiu a na modrém světle byly kratší než hypokotyly rostoucí na světle červeném (Obr. 22a, b). K výrazné redukci délek hypokotylů docházelo u obou genotypů pouze při aplikaci NPPB v nejvyšší testované koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , a to u rostlin rostoucích ve všech světelných podmínkách (Obr. 22a, b).



**Obr. 22:** Průměrná délka hypokotylů cv. Rutgers (a) a mutanta *7B-1* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NPPB (0, 10, 20, 40,  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Nejvyšší inhibice růstu hypokotylů cv. Rutgers a mutanta *7B-1* nastala při aplikaci inhibitoru NPPB v koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 23). Při této testované koncentraci vykazoval mutant *7B-1* po působení červeného světla nižší inhibici růstu hypokotylů než cv. Rutgers. Úroveň inhibice růstu hypokotylů u cv. Rutgers i u *7B-1* se výrazně nelišila v závislosti na světelných podmínkách. Při ostatních aplikovaných koncentracích inhibitoru byla inhibice růstu hypokotylů obou genotypů zanedbatelná (neukázáno).



**Obr. 23:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotylů mutantu *7B-1* a cv. Rutgers rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NPPB o koncentraci  $60 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

## 4.2 Růstové reakce mutantu *cryI-2*

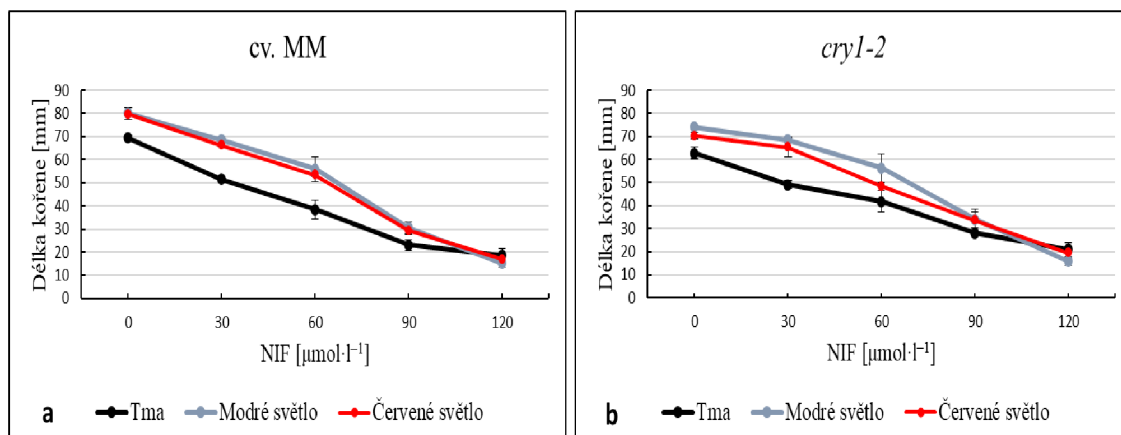
Ve druhé sérii experimentů byl sledován růst kořene a hypokotylu mutantu *cryI-2* rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na koncentraci inhibitoru aniontových kanálů NIF (0, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ), 9-AC (0, 50, 100, 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) a NPPB (0, 40, 60, 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) přidaných do kultivačního média a na vybraných světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Jako kontrolní genotyp (WT) byl použit Money Marker (cv. MM), od kterého byl mutant *cryI-2* odvozen. Experiment byl pro každý inhibitor třikrát zopakován.

Cílem těchto experimentů bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály zapojeny v růstu rostlin rajčete, a zda je jejich aktivita případně ovlivňována světlem. Analýza mutantu *cryI-2* by pak měla odpovědět na otázku, zda případná regulace aniontových kanálů světlem zahrnuje kryptochromovou signalizaci.

### 4.2.1 Vliv inhibitoru NIF na růst mutantu *cryI-2*

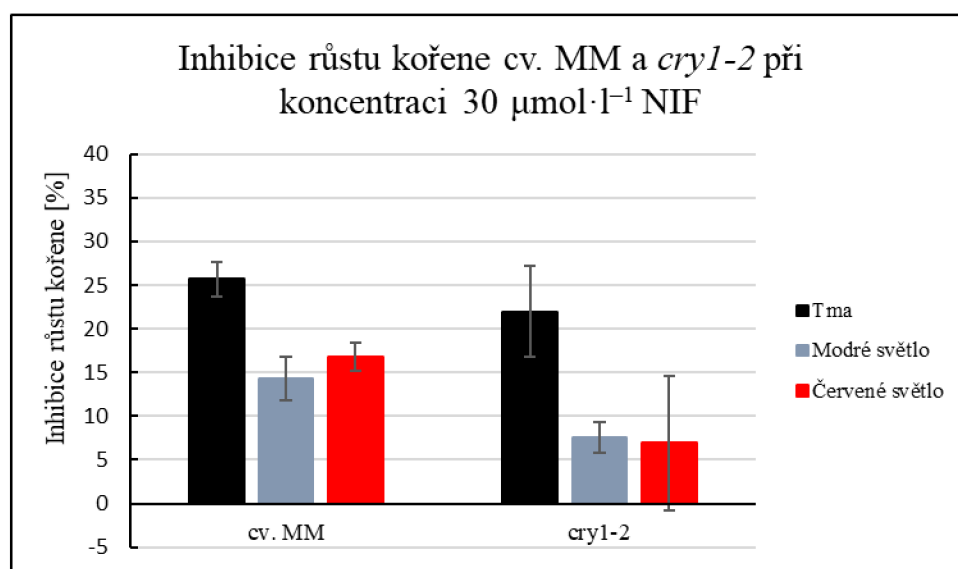
Délka etiolizovaných kořenů rostlin cv. MM (Obr. 24a) a mutantu *cryI-2* (Obr. 24b) na médiu bez inhibitoru NIF dosahovala ve srovnání s kořeny rostlin rostoucích na modrém či červeném světle výrazně nižších hodnot. Kořeny cv. MM rostoucí na základním médiu byly na modrém a na červeném světle přibližně stejně dlouhé (Obr. 24a), zatímco kořeny mutantu *cryI-2* byly na modrém světle mírně delší než

na světle červeném (Obr. 24b). K redukci délek kořenů obou genotypů vlivem NIF docházelo úměrně se zvyšující se koncentraci inhibitoru (Obr. 24a, b).



**Obr. 24:** Průměrná délka kořenů cv. MM (a) a mutanta *cry1-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NIF (0, 30, 60, 90, 120 μmol·l<sup>-1</sup>). Data ukazují průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů.

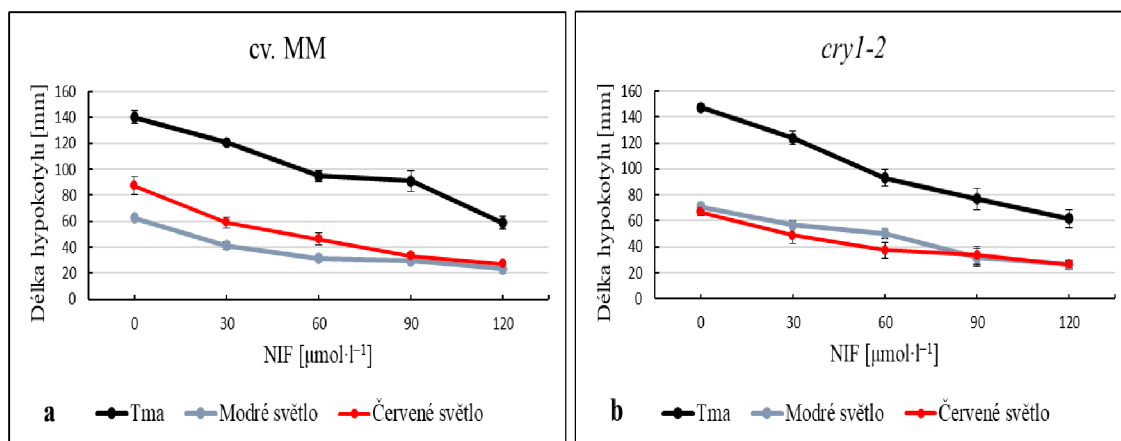
Inhibice růstu kořenů cv. MM a mutanta *cry1-2* byla při koncentraci inhibitoru NIF 30 μmol·l<sup>-1</sup> u etiolizovaných kořenů vyšší, než u kořenů rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 25). Mutant *cry1-2* současně vykazoval na červeném světle mírně nižší inhibici růstu kořenů než cv. MM. Podobné výsledky byly pozorovány i při aplikaci inhibitoru NIF v koncentraci 90 μmol·l<sup>-1</sup>, kdy byla inhibice růstu kořenů cv. MM kultivovaného ve tmě a na červeném světle vyšší než inhibice mutanta *cry1-2* (neukázáno).



**Obr. 25:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutanta *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NIF o koncentraci 30 μmol·l<sup>-1</sup>. Data ukazují průměrné hodnoty ± SE získané ze tří nezávislých experimentů.

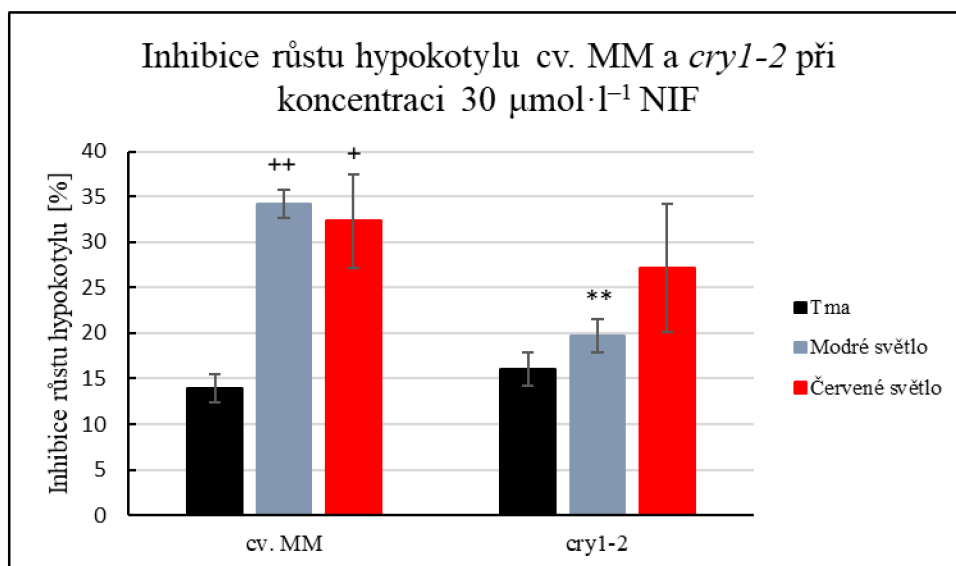


Etiolizované hypokotyly rostlin cv. MM (Obr. 26a) a mutanta *cry1-2* (Obr. 26b) na médiu bez přítomnosti inhibitoru NIF byly výrazně delší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém nebo červeném světle. Hypokotyly cv. MM rostoucí na médiu bez inhibitoru byly na červeném světle delší než na světle modrém (Obr. 26a), zatímco hypokotyly mutanta *cry1-2* byly na modrém a červeném světle přibližně stejně dlouhé (Obr. 26b). Inhibitor NIF redukoval délku hypokotylů obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací (Obr. 26a, b).



**Obr. 26:** Průměrná délka hypokotylů cv. MM (a) a mutanta *cry1-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NIF (0, 30, 60, 90, 120  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

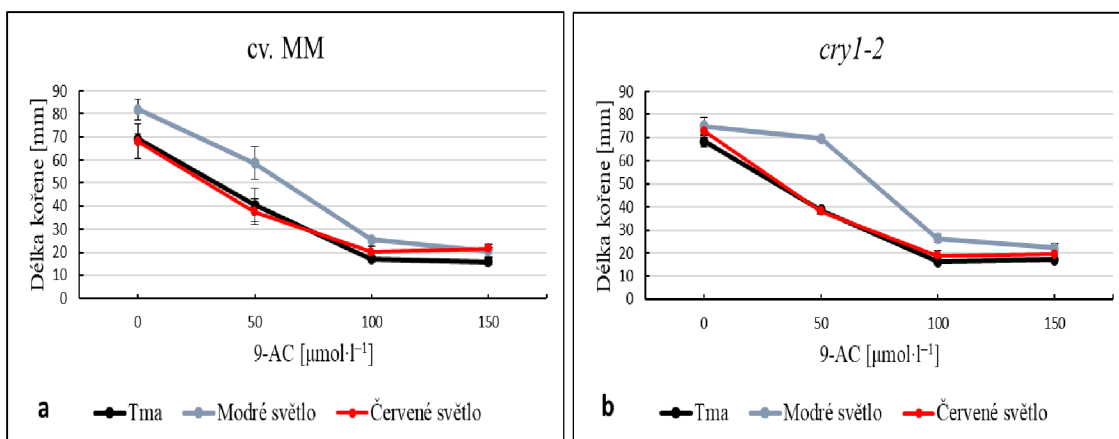
Inhibice růstu hypokotylů u cv. MM a mutanta *cry1-2* byla při koncentraci inhibitoru NIF 30  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  odlišná (Obr. 27). Mutant *cry1-2* vykazoval na modrém světle výrazně nižší inhibici růstu hypokotylů vlivem NIF než cv. MM, přičemž byl tento rozdíl signifikantní. Inhibice růstu etiolizovaných hypokotylů cv. MM byla výrazně nižší než inhibice hypokotylů rostoucích na modrém či červeném světle. Tento rozdíl v citlivosti k inhibičnímu účinku NIF byl na modrém i na červeném světle signifikantní. U mutanta *cry1-2* k tomuto jevu nedocházelo. Podobných výsledků bylo dosaženo také při aplikaci inhibitoru NIF v koncentraci 60  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ , kdy byla inhibice růstu hypokotylů mutanta *cry1-2* rostoucího na modrém světle výrazně nižší než inhibice růstu hypokotylů cv. MM (neukázáno).



**Obr. 27:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotylů mutantu *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NIF o koncentraci  $30 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů. Statisticky významný rozdíl mezi cv. MM a mutantem *cry1-2* při stejných světelných podmínkách je označen dvěma hvězdičkami (t-test,  $P = 0,01$ ). Statisticky významný rozdíl od inhibice etiolizovaných hypokotylů cv. MM je označen znaménkem plus (t-test,  $P = 0,05$ ), případně dvěma znaménky plus (t-test,  $P = 0,01$ ).

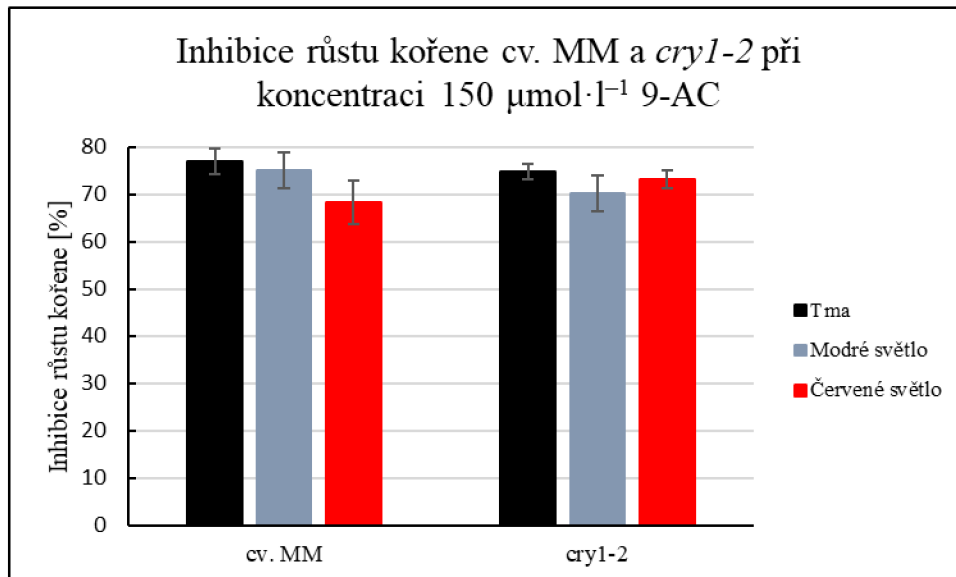
#### 4.2.2 Vliv inhibitoru 9-AC na růst mutantu *cry1-2*

Kořeny cv. MM rostoucí na červeném světle a ve tmě na médiu bez přítomnosti inhibitoru 9-AC byly stejně dlouhé a zároveň výrazně kratší než kořeny rostlin rostoucích na modrém světle (Obr. 28a). Kořeny mutantu *cry1-2* rostoucí na základním médiu byly podobně dlouhé ve všech světelných podmínkách, přičemž etiolizované kořeny byly pouze mírně kratší (Obr. 28b). Inhibitor 9-AC redukoval délku kořenů obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací, avšak rozdíl v délkách kořenů při vyšších koncentracích inhibitoru 9-AC ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  a  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ) již nebyl výrazný (Obr. 28a, b). Kořeny mutantu *cry1-2* rostoucí na modrém světle byly při koncentraci  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  výrazně delší než při ostatních světelných podmínkách (Obr. 28b).



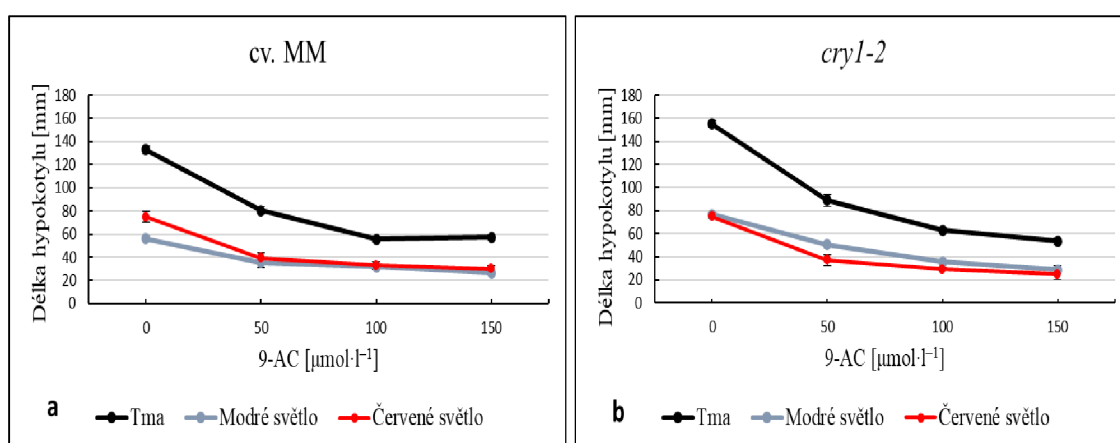
**Obr. 28:** Průměrná délka kořenů cv. MM (a) a mutanta *cry1-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci 9-AC (0, 50, 100, 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu kořenů cv. MM a mutanta *cry1-2* při koncentraci inhibitoru 9-AC 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla srovnatelná při všech světelných podmínkách (Obr. 29). Úroveň inhibice růstu kořenů se u obou genotypů nelišila v závislosti na světelných podmínkách. Při ostatních testovaných koncentracích inhibitoru 9-AC nebyly zřejmé rozdíly v inhibici růstu kořenů *cry1-2* a cv. MM a úroveň inhibice byla rovněž podobná při všech světelných podmínkách (neukázáno).



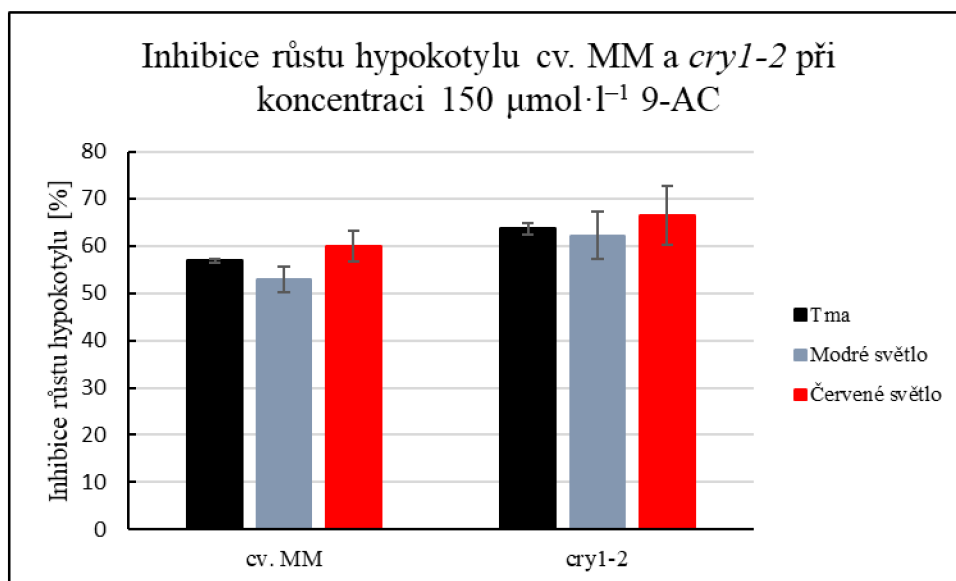
**Obr. 29:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutanta *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru 9-AC o koncentraci 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Etiolizované hypokotyly rostlin cv. MM (Obr. 30a) a mutanta *cryI-2* (Obr. 30b) na médiu bez přítomnosti inhibitoru 9-AC byly výrazně delší než hypokotyly rostlin rostoucích na modrém či červeném světle. Hypokotyly cv. MM rostoucí na základním médiu byly po působení modrého světla kratší než hypokotyly rostoucí na červeném světle (Obr. 30a), zatímco hypokotyly mutanta *cryI-2* rostoucí na médiu bez inhibitoru byly na modrém a na červeném světle stejně dlouhé (Obr. 30b). Inhibitor 9-AC redukoval délku hypokotylů obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací (Obr. 30a, b).



**Obr. 30:** Průměrná délka hypokotylů cv. MM (a) a mutanta *cryI-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci 9-AC (0, 50, 100, 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

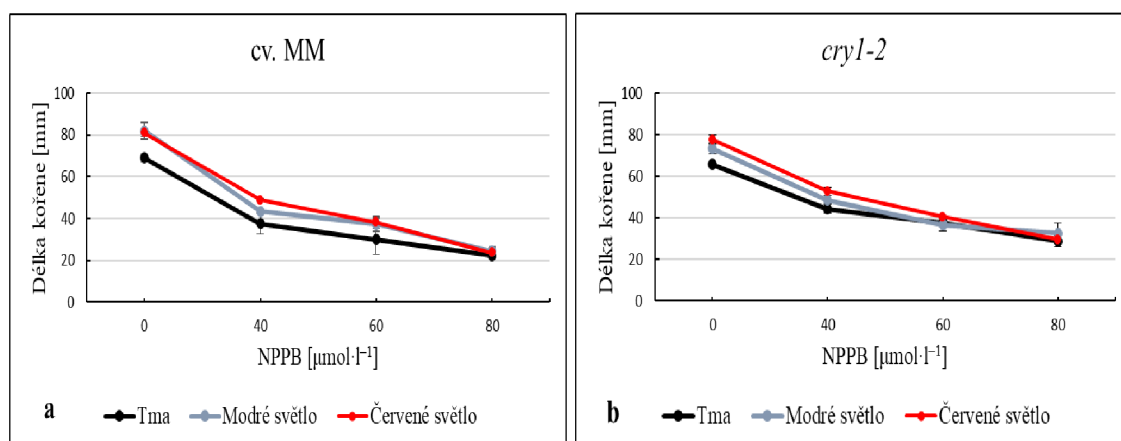
Inhibice růstu hypokotylů *cryI-2* byla při všech světelných podmínkách srovnatelná s inhibicí cv. MM při aplikaci inhibitoru 9-AC v koncentraci 150  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (Obr. 31). Úroveň inhibice růstu hypokotylů se rovněž výrazně neměnila v závislosti na světelných podmínkách. Při ostatních testovaných koncentracích inhibitoru 9-AC rovněž nebyly pozorovány výrazné rozdíly mezi inhibicí růstu hypokotylů cv. MM a *cryI-2* (neukázáno).



**Obr. 31:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypokotylů mutanta *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru 9-AC o koncentraci  $150 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

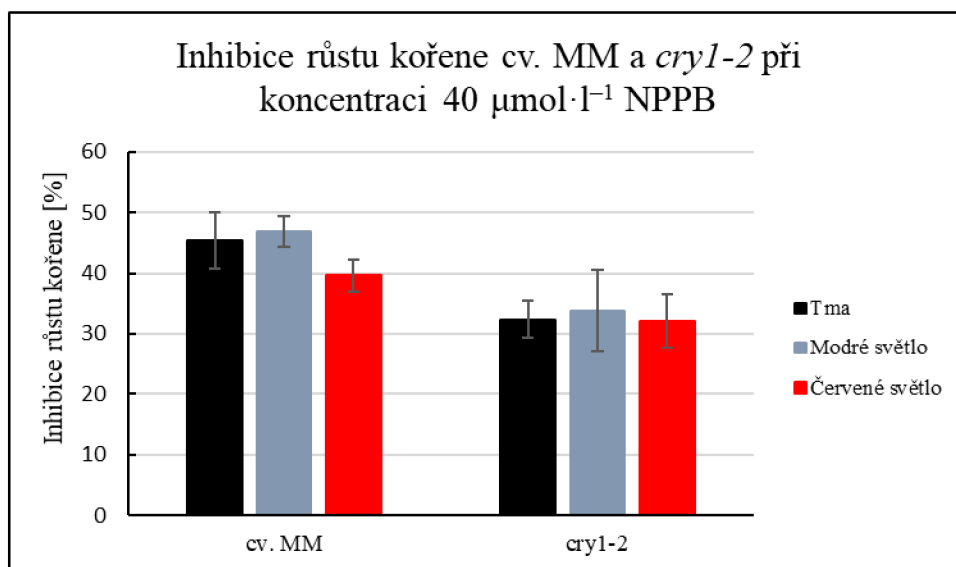
#### 4.2.3 Vliv inhibitoru NPPB na růst mutanta *cry1-2*

Etiolizované kořeny rostlin cv. MM na médiu bez přítomnosti inhibitoru NPPB byly zřetelně kratší než kořeny rostlin rostoucích na modrém či červeném světle, přičemž délka kořenů rostoucích na modrém a na červeném světle byla stejná (Obr. 32a). U mutanta *cry1-2* byly etiolizované kořeny na základním médiu rovněž kratší než na modrém a červeném světle, kořeny rostoucí na červeném světle byly mírně delší než na světle modrém (Obr. 32b). Inhibitor NPPB redukoval délku kořenů obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací inhibitoru (Obr. 32a, b).



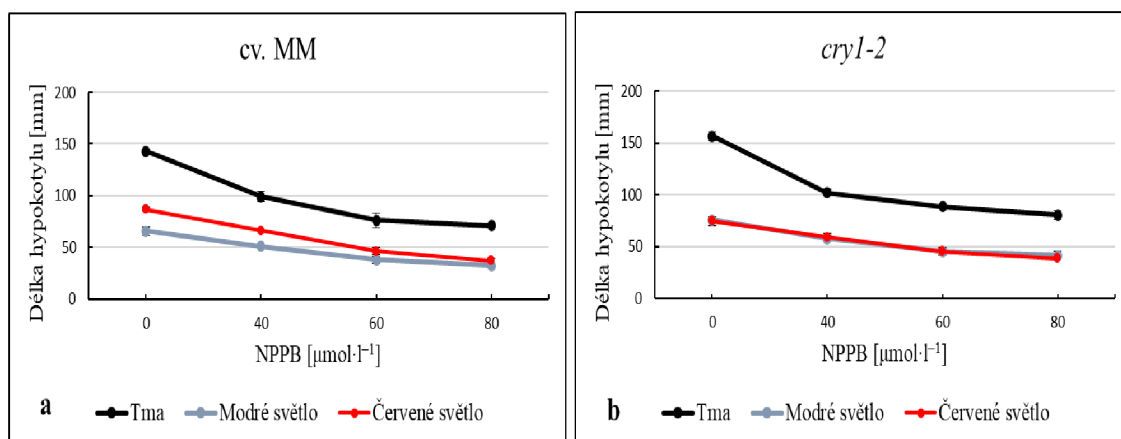
**Obr. 32:** Průměrná délka kořenů cv. MM (a) a mutanta *cry1-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NPPB ( $0, 40, 60, 80 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu kořenů cv. MM a mutanta *cry1-2* při koncentraci inhibitoru NPPB  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla mírně odlišná (Obr. 33). Mutant *cry1-2* vykazoval zejména ve tmě a na modrém světle mírně nižší inhibici růstu kořenů než cv. MM. Úroveň inhibice etiolizovaných kořenů a kořenů rostoucích na modrém světle se mezi genotypy mírně lišila i při ostatních testovaných koncentracích NPPB (neukázáno). Ani u jednoho genotypu se inhibice růstu kořene výrazně nelišila v závislosti na světelných podmínkách (Obr. 33).



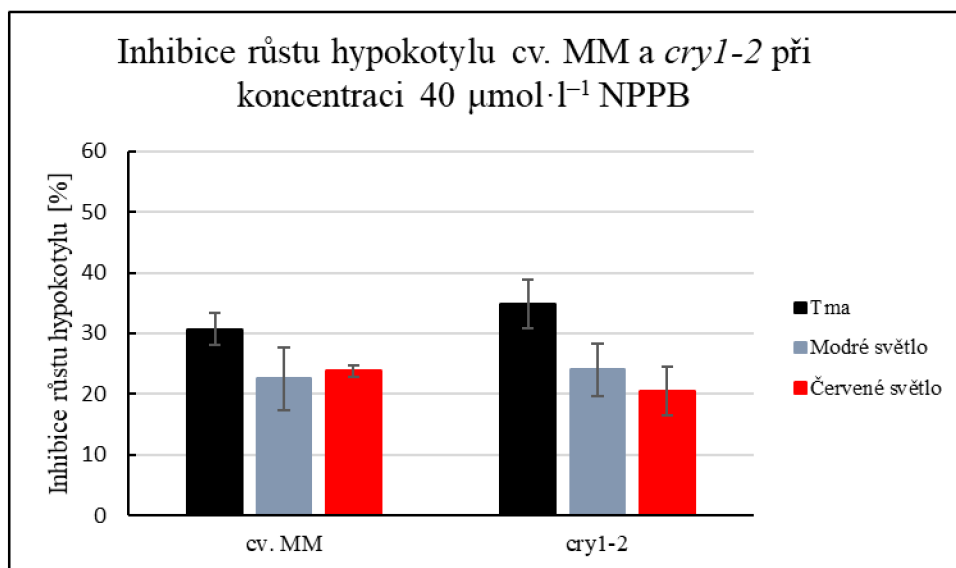
**Obr. 33:** Průměrné hodnoty inhibice růstu kořenů mutanta *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NPPB o koncentraci  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Délky etiolizovaných hypokotylů cv. MM na médiu bez přítomnosti inhibitoru NPPB byly výrazně větší než délky hypokotylů rostlin rostoucích na modrém či červeném světle (Obr. 34a). U mutanta *cry1-2* byly etiolizované hypokotyly na základním médiu rovněž výrazně delší než na modrém a červeném světle (Obr. 34b). Hypokotyly cv. MM rostoucí na základním médiu byly po působení modrého světla kratší než hypokotyly rostoucí na červeném světle (Obr. 34a), zatímco hypokotyly *cry1-2* rostoucí na základním médiu byly po působení červeného nebo modrého světla stejně dlouhé (Obr. 34b). Inhibitor NPPB redukoval délku hypokotylů obou genotypů úměrně se zvyšující se koncentrací (Obr. 34a, b). Hypokotyly mutanta *cry1-2* rostoucí na médiu s přidaným inhibitorem na červeném světle dosahovaly stejné délky jako hypokotyly rostoucí na světle modrém (Obr. 34b).



**Obr. 34:** Průměrná délka hypocotylů cv. MM (a) a mutanta *cry1-2* (b) rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle v závislosti na koncentraci NPPB (0, 40, 60, 80  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ ). Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

Inhibice růstu hypocotylů cv. MM a mutanta *cry1-2* při koncentraci NPPB 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  byla u obou genotypů podobná (Obr. 35). Inhibice růstu etiolizovaných hypocotylů cv. MM a *cry1-2* byla pouze mírně vyšší v porovnání s inhibicí za ostatních světelných podmínek. Při ostatních aplikovaných koncentracích inhibitoru byly výsledky podobné (neukázáno).



**Obr. 35:** Průměrné hodnoty inhibice růstu hypocotylů mutanta *cry1-2* a cv. MM rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) inkubovaného po dobu 7 dní ve tmě, na modrém světle a na červeném světle za přítomnosti inhibitoru NPPB o koncentraci 40  $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ . Data ukazují průměrné hodnoty  $\pm$  SE získané ze tří nezávislých experimentů.

## 5 DISKUZE

V experimentální části bakalářské práce byly zkoumány růstové reakce mutantů *7B-1* a *cry1-2* rostliny rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na koncentraci inhibitorů aniontových kanálů (NIF, NPPB, 9-AC) a na vybraných světelných podmínkách (tma, modré světlo, červené světlo). Úkolem bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály, jež jsou citlivé k testovaným inhibitorům, zapojeny v růstových procesech rostlin rajčete. Dalším cílem bylo určit, zda se jejich aktivita může lišit v závislosti na světelných podmínkách. Analýza mutantů *7B-1* a *cry1-2* by měla odpovědět na otázku, zda je do případné regulace aniontových kanálů zapojen genový produkt *7B-1* a kryptochromová signalizace.

Mutant *7B-1* má defekt v signalizační dráze modrého světla a je tolerantní k biotickým a abiotickým stresům, a to především na modrém světle (Fellner and Sawhney 2001, 2002; Fellner *et al.*, 2001; Bergougnoux *et al.*, 2009). Tato mutace postihuje fototropinovou signalizaci (Hlavinka *et al.*, 2013). Mutant *cry1-2* má mutaci v genu kódujícím receptor modrého světla, CRY1 (Weller *et al.*, 2001).

### 5.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutantu *7B-1*

Jak již bylo zmíněno v teoretické části, kyselina niflumová (NIF) je inhibitorem S-typu aniontových kanálů (Schwartz *et al.*, 1995) a rovněž reverzibilně inhibuje R-typ aniontových kanálů (Hlavinka *et al.*, 2013). K inhibici růstu kořene a hypokotylu testovaného mutantu *7B-1* a cv. Rutgers docházelo při všech použitých koncentracích inhibitoru NIF a všech světelných podmínkách. Můžeme tedy říci, že kanály specifické pro inhibitor NIF jsou určitým způsobem zapojeny v růstových procesech kořenů i hypokotylů rostlin rajčete. Kořeny mutantu *7B-1* byly na modrém a červeném světle inhibovány vlivem NIF výrazně méně než kořeny cv. Rutgers (rozdíly signifikantní). Citlivost kořenů mutantu *7B-1* k inhibitoru NIF byla tedy výrazně nižší než u cv. Rutgers. Protože mutace *7B-1* ovlivňuje fototropinovou signální dráhu (Hlavinka *et al.*, 2013), můžeme se domnívat, že funkční produkt genu *7B-1* na modrém a červeném světle zvyšuje reakci kořenů rajčete k inhibitoru NIF. Snížená citlivost kořenů k inhibitoru NIF na červeném světle pak naznačuje, že fototropinová signalizace může ovlivňovat signální dráhu červeného světla. Tím by bylo možné vysvětlit sníženou citlivost kořenů *7B-1* k inhibitoru jak na modrém, tak i na červeném světle. Podobných výsledků dosáhl ve své bakalářské práci David Kacr, který s růstovými reakcemi *7B-1*



k NIF započal (Kacr, 2016). Jeho výsledky tedy tuto teorii potvrzují. Na rozdíl od kořenů, hypokotyly mutanta *7B-1* a kontrolního genotypu cv. Rutgers vykazovaly podobnou reakci k inhibičnímu účinku NIF. Fototropinová signální dráha v hypokotylech tedy pravděpodobně neovlivňuje aktivitu NIF senzitivních aniontových kanálů. Současně bylo zjištěno, že inhibice růstu hypokotylů cv. Rutgers a mutanta *7B-1* byla na modrém světle snižena, rozdíly však nebyly signifikantní. Je tedy možné, že modré světlo snižuje růstové reakce hypokotylu k inhibitoru NIF, ale k potvrzení tohoto závěru by bylo potřeba provést více experimentů. Současně je však evidentní, že gen *7B-1* není v těchto procesech zapojen.

Inhibitor 9-AC blokuje S-typ aniontových kanálů svěracích buněk (Schwartz *et al.*, 1995). R-typ aniontových kanálů inhibuje o poznání méně (Hlavinka *et al.*, 2013). K inhibici růstu kořene a hypokotylu obou genotypů docházelo při všech použitých koncentracích inhibitoru a všech světelných podmínkách. Můžeme tedy říci, že kanály specifické pro inhibitor 9-AC jsou zapojeny v růstových procesech kořenů i hypokotylů rostlin rajčete. Na modrém světle byla v případě obou genotypů pozorována snižena inhibice růstu kořene vlivem 9-AC. Tento jev byl nejvíce evidentní při koncentraci 9-AC  $50 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  (rozdíl signifikantní), při vyšších koncentracích inhibitoru však byl zřetelný méně. Současně se úroveň inhibice růstu kořene mezi cv. Rutgers a mutantem *7B-1* lišila pouze při koncentraci 9-AC  $75 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$  na modrém světle, kdy mutant vykazoval k 9-AC sníženou citlivost. Při ostatních testovaných koncentracích inhibitoru 9-AC však tento jev nebyl pozorován. Tyto výsledky tedy naznačují, že modré světlo snižuje reakci kořenů k 9-AC. Současně je však málo pravděpodobné, že je v tomto procesu zapojen produkt genu *7B-1*. Pro potvrzení obou těchto závěrů je však rovněž potřeba provést více experimentů. V případě hypokotylů se mezi genotypy nevyskytoval zásadní rozdíl v citlivosti k 9-AC, a to za žádných testovaných světelných podmínek. Můžeme tedy říci, že u hypokotylů aktivita 9-AC senzitivních kanálů není ovlivňována genovým produktem *7B-1*.

Inhibitor NPPB blokuje S-typ aniontových kanálů svěracích buněk (Schroeder *et al.*, 1993). Brání depolarizaci plazmatické membrány buněk hypokotylu vyvolanou modrým světlem a rovněž působí proti inhibici prodlužování hypokotylových buněk vyvolané modrým světlem (Thomine *et al.*, 1997). K inhibici růstu kořene a hypokotylu obou genotypů vlivem NPPB docházelo pouze při nejvyšší testované koncentraci inhibitoru. Při nižších koncentracích nebyly inhibiční účinky NPPB na růst kořenů a hypokotylů pozorovány. Je tedy možné, že při nižších koncentracích (do  $40 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ )

nemá NPPB vliv na aktivitu aniontových kanálů. Z výsledků získaných při aplikaci inhibitoru NPPB v nejvyšší koncentraci můžeme předpokládat, že kanály senzitivní pro NPPB jsou zapojeny v růstových procesech rostlin rajčete. Ze získaných výsledků se můžeme rovněž domnívat, že světlo nemá vliv na citlivost kořene ani hypokotylu k inhibitoru, a že gen *7B-1* neovlivňuje aktivitu aniontových kanálů citlivých k NPPB. Pro hlubší analýzu efektu NPPB bych však navrhovala studium růstových reakcí při vyšších koncentracích inhibitoru.

## 5.2 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na mutanta *cry1-2*

K inhibici růstu kořene a hypokotylu cv. MM a mutanta *cry1-2* vlivem NIF docházelo při všech testovaných koncentracích inhibitoru a všech světelných podmínkách. Tyto výsledky potvrzují, že kanály specifické pro NIF jsou zapojeny v růstových procesech kořenů a hypokotylů rostlin rajčete. U obou genotypů bylo pozorováno, že pouze při nízkých koncentracích NIF modré a červené světlo inhibiční účinky NIF na růst kořenů mírně snižovalo (rozdíl nesignifikantní), přičemž kořen mutanta *cry1-2* na červeném světle vykazoval ve srovnání s cv. MM pouze mírně (rozdíl nesignifikantní) sníženou citlivost k inhibitoru NIF. Mutant *cry1-2* má mutaci v genu kódujícím receptor modrého světla CRY1, a proto vykazuje defekt ve vnímání modrého světla (Weller *et al.*, 2001). Naše výsledky tedy jednoznačně neukazují, že by se na citlivosti kořenů k NIF podílel fotoreceptor CRY1. Naproti tomu hypokotylы mutanta *cry1-2* vykazovaly ve srovnání s cv. MM na modrém světle výrazně nižší citlivost k inhibičnímu účinku NIF (rozdíl signifikantní). Navíc, modré světlo výrazně zvyšovalo u cv. MM citlivost hypokotylu k NIF (rozdíl signifikantní), zatímco hypokotylы mutanta *cry1-2* tuto zvýšenou citlivost k inhibičnímu účinku na světle nevykazovaly. Výsledky tedy mohou vést k závěru, že modré světlo zvyšuje citlivost hypokotylů k inhibičnímu účinku NIF prostřednictvím kryptochromu CRY1. Působením modrého světla mohlo dojít k ovlivnění aktivity aniontových kanálů specifických pro NIF a citlivost k inhibitoru mohla být modrým světlem zvýšena. Dalším možným vysvětlením je, že modré světlo mohlo snížit expresi genů kódujících NIF-senzitivní aniontové kanály.

K inhibici růstu kořene a hypokotylu obou genotypů vlivem 9-AC docházelo při všech testovaných koncentracích a všech světelných podmínkách. Výsledky nám opět potvrzují, že kanály specifické pro 9-AC jsou nějakým způsobem zapojeny v prodlužovacích procesech kořenů a hypokotylů rostlin rajčete. Inhibice růstu kořene a rovněž hypokotylu mutanta *cry1-2* byla při všech světelných podmínkách srovnatelná

s inhibicí cv. MM. Inhibice růstu kořenů a hypokotylů cv. MM i mutantu *cry1-2* vlivem 9-AC nebyla ovlivněna ani modrým ani červeným světlem. Můžeme se tedy domnívat, že světlo nemá na citlivost růstových reakcí kořene a hypokotylu k inhibitoru 9-AC zásadní vliv, a že signální dráha CRY1 pravděpodobně neovlivňuje aktivitu aniontových kanálů senzitivních k 9-AC.

K inhibici růstu kořene a hypokotylu obou genotypů vlivem NPPB docházelo při všech použitých koncentracích inhibitoru a všech světelných podmínkách. Z těchto výsledků plyne, že kanály specifické pro NPPB jsou zapojeny v prodlužovacích procesech kořenů a hypokotylů rostlin rajčete. Kořeny mutantu *cry1-2* vykazovaly ve srovnání s cv. MM mírně sníženou citlivost k NPPB ve tmě, na modrém, a i na červeném světle. Rozdíly však nebyly signifikantní. Je tedy možné, že CRY1 může zvyšovat reakce kořenů rajčete k NPPB. Tento závěr by však bylo potřeba podpořit dodatečnými experimenty. Inhibice růstu kořene cv. MM ani mutantu *cry1-2* nebyla závislá na světelných podmínkách. Můžeme se tedy domnívat, že světlo nemá na citlivost kořene k inhibitoru NPPB významný vliv. V případě hypokotylů obou genotypů nebyl pozorován vliv světla na citlivost k NPPB. U obou genotypů nebyl rovněž pozorován ani významný rozdíl v citlivosti k NPPB, jak ve tmě, tak na světle. Z toho můžeme vyvodit závěr, že světlo neovlivňuje citlivost hypokotylů k inhibičnímu účinku NPPB a je tedy možné, že v hypokotylech rajčete signální dráha CRY1 neovlivňuje aktivitu NPPB senzitivních aniontových kanálů.

## 6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou aniontové kanály, citlivé k inhibitorům aniontových kanálů NIF, 9-AC a NPPB, zapojeny v růstových procesech rostlin rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L). Rovněž byla zkoumána jejich aktivita v závislosti na světelných podmínkách. V experimentální části byli využiti mutanti *7B-1* a *cry1-2* s defekty v signálních drahách modrého světla. Cílem experimentů bylo otestovat růstové reakce těchto rostlin k vybraným inhibitorům a pokusit se tak objasnit, zda regulace aniontových kanálů může zahrnovat signalizaci kryptochromu CRY1, a zda se na regulaci podílí funkční produkt genu *7B-1*.

Na základě experimentů se potvrdilo, že aniontové kanály, citlivé ke všem testovaným inhibitorům, jsou pravděpodobně zapojeny v růstových procesech kořenů i hypokotylů rostlin rajčete. Z výsledků můžeme rovněž vyvodit závěry, že na modrém a červeném světle funkční produkt genu *7B-1* zvyšuje reakci kořenů rajčete k inhibitoru NIF. Výsledky dále naznačují, že modré světlo snižuje citlivost hypokotylů k inhibitoru NIF. Na tomto procesu se však pravděpodobně funkční produkt genu *7B-1* nepodílí. Modré světlo rovněž snižuje růstové reakci kořenů k 9-AC, na čemž se pravděpodobně produkt genu *7B-1* nepodílí. Na podpoření těchto závěrů by však bylo potřeba provést více experimentů. Na základě výsledků můžeme rovněž usuzovat, že světlo zvyšuje citlivost hypokotylů k inhibičnímu účinku NIF prostřednictvím kryptochromu CRY1.

Pro potvrzení těchto závěrů bych navrhovala studium aniontových kanálů citlivých k testovaným inhibitorům na molekulární úrovni. Studována by mohla být exprese genů, kódujících tyto kanály, v závislosti na světelných podmínkách. Pro experimenty by bylo možné využít metodu PCR (polymerázová řetězová reakce). Dále by mohly být zkoumány produkty těchto genů, např. za pomoci metody Western blotting.

## CITOVANÁ LITERATURA

- Assmann, S. M., & Jegla, T. (2016). Guard cell sensory systems: recent insights on stomatal responses to light, abscisic acid, and CO<sub>2</sub>. *Current Opinion in Plant Biology*, 33, 157–167.
- Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J., & Maurel, C. (2000). Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1465(1-2), 199–218.
- Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J. M., Gambale, F., Thomine, S., & Wege, S. (2011). Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annual Review of Plant Biology*, 62, 25–51.
- Bergougnoux, V., Hlaváčková, V., Plotzova, R., Novák, O., & Fellner, M. (2009). The *7B-1* mutation in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) confers a blue light-specific lower sensitivity to coronatine, a toxin produced by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. *Journal of Experimental Botany*, 60(4), 1219-1230.
- Briggs, W. R., & Christie, J. M. (2002). Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science*, 7(5), 204–210.
- De Angeli, A., Thomine, S., Frachisse, J. M., Ephritikhine, G., Gambale, F., & Barbier-Brygoo, H. (2007). Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Letters*, 581(12), 2367–2374.
- Devlin, P. F., Christie, J. M., & Terry, M. J. (2007). Many hands make light work. *Journal of Experimental Botany*, 58(12), 3071–3077.
- Fellner, M., & Sawhney, V. K. (2001). Seed germination in a tomato male-sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low-temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics*, 102, 215-221.
- Fellner, M., & 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.
- Fellner, M., Zhang, R., Pharis, R. P., & Sawhney, V. K. (2001). Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany*, 52(357), 725-738.

- Goh C. H. (2009). Phototropins and chloroplast activity in plant blue light signaling. *Plant Signaling & Behavior*, 4(8), 693–695.
- Hlavinka, J., Nauš, J., & Fellner, M. (2013). Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, 209, 75-80.
- Huché-Théliér, L., Crespel, L., Le Gourrierc, J., Morel, P., Sakr, S., & Leduc, N. (2016). Light signaling and plant responses to blue and UV radiations-Perspectives for applications in horticulture. *Environmental and Experimental Botany*, 121, 22-38.
- Chen, M., & Chory, J. (2011). Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology*, 21(11), 664–671.
- Cho, M. H., & Spalding, E. P. (1996). An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(15), 8134–8138.
- Christie, J. M. (2007). Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology*, 58, 21-45.
- Christie, J. M., Blackwood, L., Petersen, J., & Sullivan, S. (2015). Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant & Cell Physiology*, 56(3), 401–413.
- Kacr, D. (2016). Zapojení aniontových kanálů ve fotomorfogenezi rostlin. Bakalářská práce, Přírodovědecká fakulta UP Olomouc, Laboratoř růstových regulátorů.
- Kami, C., Lorrain, S., Hornitschek, P., & Fankhauser, C. (2010). Light-regulated plant growth and development. *Current Topics in Developmental Biology*, 91, 29–66.
- Kinoshita, T., & Hayashi, Y. (2011). New insights into the regulation of stomatal opening by blue light and plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *International Review of Cell and Molecular Biology*, 289, 89–115.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K., & Thomine, S. (2011). Anion channels in plant cells. *The FEBS Journal*, 278(22), 4277–4292.
- Li, J., Li, G., Wang, H., & Wang Deng, X. (2011). Phytochrome signaling mechanisms. *The Arabidopsis Book*, 9.
- Lin, C., & Todo, T. (2005). The cryptochromes. *Genome Biology*, 6(5), 220.
- Liu, H., Liu, B., Zhao, C., Pepper, M., & Lin, C. (2011). The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science*, 16(12), 684–691.

- Marten, H., Hedrich, R., & Roelfsema, M. R. G. (2007). Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *The Plant Journal*, 50(1), 29-39.
- Meyer, S., Mumm, P., Imes, D., Endler, A., Weder, B., Al-Rasheid, K. A., Geiger, D., Marten, I., Martinoia, E., & Hedrich, R. (2010). AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 63(6), 1054–1062.
- Möglich, A., Yang, X., Ayers, R. A., & Moffat, K. (2010). Structure and function of plant photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 21–47.
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology*, 15, 473-497.
- Nemhauser, J., & Chory, J. (2002). Photomorphogenesis. *The Arabidopsis Book*, 1.
- Schäfer, E., & Bowle, C. (2002). Phytochrome-mediated photoperception and signal transduction in higher plants. *EMBO Reports*, 3(11), 1042–1048.
- Schroeder, J. I., Schmidt, C., & Sheaffer, J. (1993). Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *The Plant Cell*, 5(12), 1831–1841.
- Schroeder J. I. (1995). Anion channels as central mechanisms for signal transduction in guard cells and putative functions in roots for plant-soil interactions. *Plant Molecular Biology*, 28(3), 353–361.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwarz, M., Scheaffer, J., Assmann, S. M., & Schroeder, J. I. (1995). Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiology*, 109(2), 651–658.
- Spalding E. P. (2000). Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell & Environment*, 23(7), 665–674.
- Taiz, L., & Zeiger, E. (2010). *Plant Physiology*, 5th ed., Sunderland, Mass: Sinauer Associates.
- Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M. & Murphy, A. (2018). *Plant Physiology and Development*, 6th ed., New York; Sinauer Associates; Oxford: Oxford University Press.

- Tavares, B., Domingos, P., Dias, P. N., Feijó, J. A., & Bicho, A. (2011). The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany*, *62*(7), 2273–2298.
- Thomine, S., Lelièvre, F., Boufflet, M., Guern, J., & Barbier-Brygoo, H. (1997). Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiology*, *115*(2), 533–542.
- Vahisalu, T., Kollist, H., Wang, Y. F., Nishimura, N., Chan, W. Y., Valerio, G., Lamminmäki, A., Brosché, M., Moldau, H., Desikan, R., Schroeder, J. I., & Kangasjärvi, J. (2008). SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature*, *452*, 487–491.
- Ward, J. M., Mäser, P., & Schroeder, J. I. (2009). Plant ion channels: gene families, physiology, and functional genomics analyses. *Annual Review of Physiology*, *71*, 59–82.
- Weller, J. L., Perrotta, G., Schreuder, M. E., Van Tuinen, A., Koornneef, M., Giuliano, G., & Kendrick, R. E. (2001). Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *The Plant Journal*, *25*(4), 427–440.
- White, P. J., & Broadley, M. R. (2001). Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*, *88*(6), 967–988.