

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Zapojení aniontových kanálů ve
fotomorfogenezi rostlin**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	David Kacr
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph. D.
Termín odevzdání práce:	2016

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení	David Kacr
Název práce	Zapojení aniontových kanálů ve fotomorfogenezi rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph. D.
Rok obhajoby práce	2016
Abstrakt	<p>Cílem předkládané bakalářské práce bylo zjistit, jestli jsou aniontové kanály zapojeny v růstu rostlin a zda mohou být ovlivněny světelnými podmínkami. Použili jsme ve fyziologické analýze běžný kultivar rajčete a mutanta <i>7B-1</i>, který má sníženou citlivost k modrému světlu. V podmínkách <i>in vitro</i> jsme studovali růstové reakce rostlin rajčete k inhibitorům aniontových kanálů DIDS a NIF a také, jakou funkci měla kvalita světla. Výsledky našich experimentů ukázaly, že prodlužovací růst hypokotylu a kořene rajčete u WT cv. Rutgers a mutanta <i>7B-1</i> je vlivem inhibitorů inhibován. Experimenty také potvrdily, že hypokotyl mutanta <i>7B-1</i> má zvýšenou citlivost k inhibitoru NIF ve srovnání s WT na modrém světle. Z výsledků lze odvodit, že jsou kanály zapojeny v signální dráze a inhibice etiolovaných hypokotylů a kořenů je způsobena působením DIDS a NIF. Lze také uvažovat, že specificky na modrém světle dochází ke zvýšení množství nebo citlivosti aniontových kanálů k DIDS a NIF. Na závěr lze vyvodit, že aniontové kanály citlivé k DIDS a NIF jsou zapojeny do prodlužování hypokotylu a kořene rajčete.</p>
Klíčová slova	Aniontové kanály, DIDS, NIF, růst, kořen, hypokotyl, světlo
Počet stran	47
Počet příloh	0
Jazyk	Český (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	David Kacr
Title of thesis	Involvement of anion channels in plant photomorphogenesis
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	doc. RNDr. Martin Fellner, Ph. D.
The year of presentation	2016
Abstract	<p>The aim of the presented bachelor thesis was to elucidate whether the anion channels involved in plant growth and whether they may be affected by the lighting conditions. We used analysis of physiological normal and mutant tomato cultivar <i>7B-1</i>, which has reduced sensitivity to blue light. In conditions <i>in vitro</i>, we studied the growth response of a tomato plant to inhibitors anion channels DIDS and NIF and the effect of light on their function. The results of our experiments have shown that the extension of the hypocotyl and root growth at tomato WT cv. Rutgers and mutant <i>7B-1</i> was inhibited by the inhibitors. Experiments have also confirmed that hypocotyl of mutant <i>7B-1</i> has increased sensitivity to the inhibitor NIF compared with WT in blue light. From the results it can be deduced that the channels are involved in the signaling pathway and inhibition of etiolated hypocotyls and roots is caused by treatment with DIDS and NIF. It can also be considered that specifically blue light increases the amount of anion channels or their sensitivity to DIDS and NIF. In conclusion can be drawn that the anion channels sensitive to DIDS and NIF are involved in elongation hypocotyl and root tomato.</p>
Keywords	Anion channels, DIDS, NIF, growth, root, hypocotyl, light
Number of pages	47

Number of appendices	0
Language	Czech (English)

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením doc. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D., za použití citované literatury.

V Olomouci dne

Rád bych poděkoval Doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné rady, cenné rady, čas a trpělivost, které mi poskytl v průběhu vypracování bakalářské práce. Dále bych také poděkoval Skupině molekulární fyziologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí a paní laborantce Renátě Plotzové za sterilizaci medií pro vlastní experimenty.

OBSAH

SEZNAM ZKRATEK.....	8
1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE.....	9
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1 Aniontové kanály rostlin	10
2.2 Aniontové kanály v kořenech vyšších rostlin	11
2.2.1 Anorganický aniontový transport přes kořeny vyšších rostlin	12
2.2.2 Odtok organických aniontů z vyšších rostlin	12
2.3 Typy aniontových kanálů.....	12
2.4 Geny kódující aniontové kanály R a S-typu.....	13
2.4.1 Skupina proteinů SLAC1	13
2.4.1.1 Transport prostřednictvím pomalého aniontového kanálu SLAC1.....	13
2.4.1.2 Regulační mechanismy transportu prostřednictvím SLAC1.....	14
2.4.2 Chloridové kanály	15
2.4.2.1 Skupina kanálů CLC.....	15
2.5 Inhibitor DIDS	16
2.6 Inhibitor NIF	16
2.7 Růst rostlin.....	17
2.8 Fotomorfogeneze	18
2.9 Skupina fotoreceptorů	18
2.9.1 Fytochromové fotoreceptory.....	18
2.9.2 Kryptochromy.....	19
2.9.3 Fototropiny	19
2.10 Působení světla na aniontové kanály	20
3 MATERIÁL A METODIKA.....	22
3.1 Rostlinný materiál.....	23
3.2 Metodika	23
3.2.1 Příprava kultivačního média	23
3.2.2 Sterilní výsev semen.....	23
3.2.3 Přenos klíčících semen.....	24
3.2.4 Měření kořene a hypokotylu	24
4 VÝSLEDKY	25
4.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na růst rostlin.....	25
5 DISKUZE	38
6 ZÁVĚR	41
7 POUŽITÁ LITERATURA.....	42

SEZNAM ZKRATEK

BL	blue light (modré světlo)
D	dark (tma)
DIDS	kyselina 4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbenedisulfonová
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
MS	Murashige a Skoog
NIF	kyselina niflumová
RL	red light (červené světlo)
WT	wild type

1 ÚVOD A CÍLE PRÁCE

V mé bakalářské práci jsem se zabýval tím, zda se aniontové kanály, v závislosti na světelných podmínkách, zapojují do prodlužování hypokotyly rostlin rajčete.

Aniontové nebo obecně iontové kanály jsou struktury složené z proteinů, které jsou umístěny v membráně buněk rostlin. Iontové kanály slouží k přenosu iontů (kationtů nebo aniontů) z jednoho prostředí do druhého a jsou zapojeny ve všech růstových a vývojových procesech rostlin. Jejich úloha ve fotomorfogenezi rostlin je však málo prozkoumaná. K experimentům byl použit farmakologický přístup, který spočíval v aplikaci inhibitorů aniontových kanálů na klíčící semena rajčete.

Jako experimentální rostliny byly použity mutant *7B-1* a odpovídající kontrolní rostliny cv. Rutgers (WT). Tento mutant je typický tím, že kromě zvýšené tolerance k abiotickým stresům na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002; Piterková et al., 2012) má pravděpodobně defekt v signální dráze modrého světla. Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje růstové reakce hypokotyly a kořene rajčete k inhibitorům aniontových kanálů (NIF, DIDS), a zda jsou tyto reakce ovlivněny mutací *7B-1*. Výsledky experimentů by mohly naznačit zapojení NIF- a DIDS-senzitivních aniontových kanálů v růstu rostlin rajčete a jejich roli ve fotomorfogenezi rostlin rajčete indukované modrým světlem.

Bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky Akademie věd České republiky. Experimenty byly financovány Laboratoří růstových regulátorů.

Teoretická část

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Aniontové kanály rostlin

Aniontové kanály se řadí do skupiny iontových kanálů a slouží k urychlení transportu aniontů přes membránu buněk. Jsou to integrální proteiny zabudované v membráně ve formě pórů. Kromě plasmatické membrány se aniontové kanály vyskytují i v membránových organelách jako jsou například mitochondrie, chloroplasty nebo endoplasmatické retikulum (Schroeder, 1995; Allen and Sanders 1997; Fuks and Homble, 1999; Lurin et al., 2000; White and Broadley, 2001; Clausen et al., 2004). Aniontové kanály se vyskytují i v buňkách různých orgánů rostlin například v kořeni, hypokotylu nebo v listech (Roberts, 2006).

Přenos aniontů pomocí aniontových kanálů je pasivní a je proto označován jako pasivní transport. Není zapotřebí žádná forma energie, protože anionty prochází kanálem na základě koncentračního spádu. Tento transport aniontů je důležitý hlavně k minerální výživě rostliny a také k metabolismu látek. Dále slouží k regulaci turgoru, udržení membránového napětí, otevírání průduchů, růstu a reprodukci buněk. Ve fyziologii rostlin hrají důležitou roli sírany, fosforečnany, dusičnany a z organických aniontů malát a citrát. Metabolismus látek zajišťují právě malát a citrát, které jsou meziprodukty nebo přesněji řečeno jsou to nositelé energie v Krebsově a Calvinově cyklu (Tavares et al., 2011; Lopez-Bucio et al., 2000).

Aniontové kanály hrají důležitou roli v přenosu signálu a regulaci turgoru v buňkách vyšších rostlin (Schroeder and Hedrich, 1989; Ward et al., 1995). Nejvíce prozkoumané aniontové kanály byly popsány ve svěracích buňkách průduchů. Další typy buněk rostlin jsou, co se týká informací o aniontových kanálech, velmi málo prozkoumané.

Svěrací buňky průduchů u rostlin jsou dobrým příkladem pro sledování aniontových kanálů, protože jsou zapojeny do zavírání průduchů působením ABA (kyseliny abscisové) (Schroeder et al., 1993; Schwartz et al., 1995). V plasmatické membráně svěracích buněk se vyskytují dva základní typy aniontových kanálů S-typ (the slow anion channel) a R-typ (the rapid anion channel) (Keller et al., 1989; Schroeder and Hagiwara, 1989). Blokátory chloridových kanálů, které inhibují transport chloridových aniontů u svalů nebo epitelových buněk živočichů (Greger, 1990), se používají k farmakologickému určení typů aniontových kanálů (S-typ a R-typ) (Marten et al., 1992, 1993; Schroeder et al., 1993; Schwartz et al., 1995). Zatímco R-typ aniontových kanálů je katalyzován deriváty stilbene při velmi nízkých koncentracích

(mikromoly) (Marten et al., 1993), tak S-typ aniontových kanálů je katalyzován proudem aniontů, které vedou signál k uzavření průduchů (Schroeder et al., 1993).

Dalším důležitým procesem je růst buňky, který je řízený různými signály. Buňky hypokotylu se prodlužují a dochází k transportu signálů. Aniontové kanály mohou být v buňkách hypokotylu aktivovány právě ztrátou turgorového tlaku, který je důležitý pro buněčný růst (Cleland, 1995). Zablokováním aniontového kanálu můžeme stimulovat růst hypokotylu (Thomine et al., 1997), neboli zabránit inhibici prodlužování hypokotylu působením určitých biologických signálů. Inhibice růstu hypokotylu je způsobena aktivací aniontových kanálů v buňkách hypokotylu rostliny a způsobuje úbytek turgoru buněk. Blokováním aniontových kanálů v hypokotylu můžeme také zabraňovat v šíření signálů pomocí transdukčních cest.

Existují však i látky, rostlinné hormony, které podporují růst hypokotylu jako například ethylen (Ecker, 1995), cytokiny (Chory et al., 1994; Cary et al., 1995), brassinosteroidy (Clouse, 1996) a auxiny (Cleland, 1995). Kromě hormonů růst regulují také signály přijímané z vnějšího prostředí. Patří mezi ně především světlo (Elich and Chory, 1994) nebo mechanické stimulační (Jones and Mitchell, 1989), které regulují prodlužování hypokotylu.

Rostlinný hormon auxin podporující růst hypokotylu způsobuje také prodlužování určitých segmentů rostliny. Pokud dojde k poklesu auxinu, tak dojde k nižšímu prodlužování hypokotylu ve tmě a také ke snížení tvorby adventivních kořenů. Aniontové kanály, které jsou ovlivněny auxinem, se nachází ve svěracích buňkách *Nicotiana tabacum*. U rostliny *Avena sativa* je ukázán přechod ze stavu depolarizace do stavu hyperpolarizace ovlivněním auxinu a dochází tak k zablokování transportu chloridových aniontů pomocí 9-AC blokátoru. Proti chloridovým aniontům existují antagonisté a jsou jimi vápenaté kationty. (Boerjan et al., 1995; King et al., 1995).

Typy aniontových kanálů v hypokotylu se určují pomocí patch-clamp techniky. Pomocí modrého světla dochází k aktivaci kanálů, kterou je možno studovat pomocí typického cell-attached uspořádání. Tyto kanály mohou být blokovány blokátorem NPPB, který blokuje depolarizované hypokotylové buňky ozářené modrým indukovaným světlem a částečně blokuje inhibici prodlužování hypokotylu na modrém světle (Cho and Spalding, 1996).

2.2 Aniontové kanály v kořenech vyšších rostlin

Pomocí studií se zjistilo, že na plasmatické membráně buněk kořene vyskytuje několik druhů aniontových kanálů, které mají různé vlastnosti. Aniontové kanály v kořeni se rozdělují do dvou skupin. První skupina reguluje transport anorganických aniontů přes

kořen, druhá skupina reguluje přenos organických aniontů směrem z kořene. Regulace aniontových kanálů je dána zvýšením koncentrace fosfátů v rhizosféře kořene (Roberts, 2006).

2.2.1 Anorganický aniontový transport přes kořeny vyšších rostlin

Kořeny vyšších rostlin jsou důležité pro transport iontů z roztoku v půdě a následný transport živin pomocí transpiračního proudu do nadzemních částí rostlin. Kořen se skládá z několika skupin buněk, které slouží k vychytávání iontů z půdního roztoku. Specializovaná struktura, která se nachází v kořeni, zajišťuje minerální transport iontů přes kořenové buňky do xylému. Reguluje tak příjem a výdej iontů přes plasmatickou membránu buněk pokožky kořene. Membránové proteiny jsou proto důležité struktury, které umožňují transport iontů přes plasmatickou membránu kořenových buněk a řídí tak pohyb iontů a živin v kořenovém systému rostliny (Roberts, 2006).

2.2.2 Odtok organických aniontů z vyšších rostlin

Výdej organických aniontů z kořenů může vést ke změně půdního složení mikroorganismů a může ovlivnit růst rostliny v daném substrátu. Při masivnějším úbytku organických aniontů z kořenů do prostředí dochází k nedostatku aniontů v rostlině působením těžkých kovů. Ve většině půd je fosfor nejvíce omezujícím prvkem, který je součástí roztoku v půdě. I když je v půdě nízká koncentrace fosforu, tak bývá absorbován minerály v půdě nebo se naváže do nedostupných organických sloučenin. Rostliny si vytvořily určité strategie, aby mohly zvýšit množství přijímaného fosforu například sekrecí organických aniontů z kořenů a pak absorbovat fosfát z půdy při výměně aniontů. K sekreci aniontů dochází v určitých místech kořenového systému a může být přechodná nebo trvalá (Roberts, 2006).

2.3 Typy aniontových kanálů

Aniontové kanály se rozdělují na dva základní typy R-typ (Rapid = rychlý) a S-typ (Slow = pomalý). Oba typy aniontových kanálů byly poprvé objeveny u *Vicia faba* ve svěracích buňkách rostliny. R-typ aniontového kanálu se vyskytuje kromě *Vicia faba*, také v epidermálních buňkách *Arabidopsis thaliana*, nebo v buňkách rostliny *Nicotiana tabacum* (Tavares et al., 2011; Meyer et al., 2010). R-typ aniontového kanálu je schopen se aktivovat během milisekund. Nejčastěji propouští anionty dusičnanů, chloridů a síranů. S-typ aniontového kanálu se vyskytuje ve stejných rostlinách jako R-typ aniontových kanálů a dále ještě v *Xanthium strumarium* a *Coffea arabica* (Tavares et al., 2011; Vahisalu et al., 2008). S-typ aniontových kanálů se aktivuje nebo deaktivuje v rozmezí sekund. Tento typ aniontových kanálů je dobře propustný hlavně

pro dusičnanové anionty a dále ještě propouští chloridový anion a malát, ale jen v menším množství.

R-tyt a S-tyt aniontových kanálů se vyskytuje v některých typech buněk v plasmatické membráně. Hlavní funkcí S-tytu aniontového kanálu je regulace svěřacích buněk v rostlinách, protože tento kanál je aktivován pomocí kyseliny abscisové, která indukuje uzavírání průduchů (Kim et al., 2010). Fyziologická funkce R-tytu aniontového kanálu není zatím objasněna. Příkladem R-tytu aniontového kanálu je skupina proteinů ALMT (aktivovaný hliník malátový přenašeč), konkrétně AtALMT12 se vyskytuje ve svěřacích buňkách. Účinnost tohoto proteinu závisí na proudu aniontů a na hodnotě prahového napětí. Pokud by nebylo dostatek tohoto proteinu, mohlo by dojít k narušení zavírání průduchů tmou, oxidem uhličitým nebo kyselinou abscisovou. Příkladem S-tytu aniontového kanálu je protein SLAC1 (Vahisalu et al., 2008), který se vyskytuje ve svěřacích buňkách a propouští malát. Tento protein je důležitý pro zavírání průduchů působením oxidu uhličitého, kyseliny abscisové, ozonem, střídáním světla a tmy, oxidem dusnatým a dalšími faktory. Při mutaci tohoto genu by došlo ke změně pouze u S-tytu aniontového kanálu při transportu aniontů (Tavares et al., 2011; Vahisalu et al., 2008).

2.4 Geny kódující aniontové kanály R a S-tytu

Řadí se mezi ně geny *TaALMT1* a *AtCLCa* a nacházejí se ve dvou rostlinných genových skupinách *ALMT1* (Sasaki et al., 2004) a *CLC* (De Angeli et al., 2006), kde jejich úkolem je identifikace určitého typu kanálu. Identifikace genové skupiny aniontových kanálů je na molekulární úrovni R-tytu a S-tytu aniontových kanálů (Barbier-Brygoo et al., 2011).

2.4.1 Skupina proteinů SLAC1

Chloridy, dusičnany a malát patří mezi největší část aniontů, kterou rostlina přijímá při osmotických jevech. Anionty spolu s kationty hrají důležitou roli v regulaci turgoru buňky průchodem přes membránu. Nejvhodnější model pro studium aniontových kanálů, transportérů a regulaci turgoru v buňkách představují svěřací buňky průduchů. Patch-clamp je typ analýzy vhodné pro identifikaci aniontových kanálů propustných například pro chloridy, dusičnany, sírany nebo maláty. (Barbier-Brygoo et al., 2011).

2.4.1.1 Transport prostřednictvím pomalého aniontového kanálu SLAC1

Průduchy rostlin obsahují, také aniontové kanály. Uzavření průduchů je způsobeno vnějšími faktory, jako je například sucho, vyšší parciální tlak oxidu uhličitého nebo působení různých patogenů. Aby anionty mohly proudit kanálem SLAC1, musí být

jejich transport nějakým způsobem uspořádaný. Proud aniontů je pomalý, proto se tento typ kanálů označuje jako S-typ. Při jeho aktivaci dochází k depolarizaci, ztrátě aniontů a ke snížení turgoru v buňkách. Tyto všechny faktory vedou k uzavření průduchů. Pokud by však došlo k mutaci *SLAC1* genu u mutantů *Arabidopsis thaliana*, neproběhla by reakce při zvýšení množství oxidu uhličitého nebo citlivosti na ozon. Při nepřítomnosti *SLAC1* genu u mutantních svěřacích buněk dochází k uzavření průduchů působením sucha, tmou, kyselinou abscisovou nebo zvýšením oxidu uhličitého, což je opačná reakce než v předchozím případě. V dalších studiích se zjistilo, že S-typ aniontových kanálů se vyskytuje v několika dalších typech buněk, jako jsou například kortikální buňky hypokotylu nebo typ xylémových buněk (Frachisse et al., 2000; Ghelis et al., 2000; Kohler and Raschke, 2000). U *Arabidopsis thaliana* byly zjištěny čtyři homologní typy *SLAC1* proteinů a to *SLAH1* – *SLAH4*, které se vyskytují v různých částech rostliny. *SLAH1*, 2 a 3 se vyskytují v kořeni a *SLAC1* a *SLAH3* jsou přítomny v listech *Arabidopsis thaliana* (Negi et al., 2008) (Barbier-Brygoo et al., 2011).

2.4.1.2 Regulační mechanismy transportu prostřednictvím *SLAC1*

Podle studií bylo zjištěno, že geny *SLAC1/SLAH* kódují hlavně S-typ aniontového kanálu. Pokud potřebujeme, aby byl S-typ aniontového kanálu aktivní, musí dojít k expresi proteinu *SLAC1/SLAH*. Aktivovaná vodivost aniontů u S-typu aniontového kanálu může vést při depolarizaci membrány a nekontrolovatelnému toku aniontů a k poškození buněk. Aby nedošlo k poškození rostlinných buněk, měly by anionty procházet pomaleji a uspořádaněji.

Na aktivaci S-typu aniontového kanálu se podílejí dva procesy, které byly popsány u průduchů rostlin. Je to aktivace pomocí volného vápníku v cytosolu a fosforylace daného proteinu (Schmidt et al., 1995; Schroeder and Hagiwara, 1989). Oba procesy vedou k indukci tvorby kyseliny abscisové a to způsobí uzavření průduchů (Kim et al. 2010). Ve výzkumu byl objeven také centrální regulátor syntézy kyseliny abscisové, kterým je protein kináza *OST1*. *OST1* se projevuje také jako aktivátor proteinu *SLAC1*.

Pomocí experimentů byly objeveny dvě na vápníku závislé protein kinázy (*CPK21* a *CPK23*), které jej interakcí s proteinem *SLAC1* aktivují. Regulace aniontového toku je dána na vápníku závislou a nezávislou cestou, kdy jsou obě cesty kontrolovány kyselinou abscisovou. Její hladina zase kontrolována 2C *ABI1* fosfatásou a jejími homology (Geiger et al., 2010, 2009; Kim et al. 2010). Pomocí terminální domény byly zbytky *SLAC1* proteinu fosforylovány *OST1* (Vahisalu et al., 2010).

2.4.2 Chloridové kanály

Chloridové kanály se řadí mezi transportní proteiny, které přenášejí chloridové anionty přes plasmatickou membránu bez využití jakékoliv energie. Vykonávají několik důležitých funkcí v rostlinných buňkách. Regulují buněčný objem a turgor buněk, regulují vnitřní pH buňky a regulují tok aniontů u průduchů. Chloridové kanály se vyskytují v různých membránových organelách (Hechenberger et al., 1996).

Nejvíce informací o chloridových kanálech máme ze svěřacích buněk průduchů (Keller et al., 1989; Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992), které slouží k jejich otvírání a zavírání. Aby mohly být chloridové kanály aktivní, je potřeba regulace extracelulárními nebo intracelulárními faktory. Mezi extracelulární faktory patří například hormony, fotosyntetické metabolity a mezi intracelulární faktory se řadí vápenatý kation a nukleotidy (Hedrich et al., 1990; Marten et al., 1991; Hedrich and Marten, 1993).

Hlavní úlohou chloridových kanálů u rostlin je vnímání a přenos různých signálů z vnějšího prostředí, kterými jsou například světlo, hormony a patogeny. Tyto signály mohou způsobit depolarizaci membrány tím, že dochází k odtoku aniontů z buňky (Dangl et al., 1995; Assmann, 1993). Nejvíce se vyskytující aniont v rostlinách je aniont chloridový a je velmi důležitý pro fyziologické procesy v rostlinách. Vakuola je důležitá organela, která udržuje hladinu turgoru v rovnováze, dále slouží, jako uložení důležitých iontů a živin (Plant et al., 1994).

2.4.2.1 Skupina kanálů CLC

CLC je skupina proteinů, které fungují jako chloridové kanály, a které se vyskytují ve všech typech organismů (od bakterií po rostliny a živočichy) (Jentsch, 2008). Tato skupina získala svůj název po chloridovém kanálu, který se vyskytuje u torpédové ryby a byl klonován jako CLC-0 protein (Jentsch et al., 1990). Ke zjištění jejich funkce musely být provedeny studie, a to nejdříve na prokaryotních a bakteriálních proteinech skupiny CLC, poté ještě na živočišných CLC proteinech. Bylo zjištěno, že CLC pracují jako antiporty (Accardi and Miller, 2004), a proto jsou považovány za proteiny, které fungují jako chloridové kanály a transportéry rovněž u rostlin (Barbier-Brygoo et al., 2011).

Geny kódující membránové proteiny CLC se vyskytují v genomu *Arabidopsis thaliana*. Některé rostliny obsahují CLC proteiny, které jsou lokalizovány v intracelulárních organelách (De Angeli et al., 2006; Hechenberger et al., 1996; Teardo et al., 2005; Fecht-Bartenbach, 2007). Protein, který charakterizuje skupinu proteinů CLC je kanál AtCLCa, který se vyskytuje v membráně vakuoly rostliny (De

Angeli et al., 2006). AtCLCa ve vakuole kontroluje koncentraci dusičnanových iontů, která bývá vyšší uvnitř vakuoly než v cytosolu buňky (De Angeli et al., 2006).

Studiemi se zjistilo, že u *Arabidopsis thaliana* čtyři CLC proteiny ze sedmi obsahují glutamát a zbylé tři CLC proteiny jsou schopny kódovat chloridové kanály rostlin (Ward et al., 2008).

2.5 Inhibitor DIDS

Od roku 1970 je DIDS používán jako inhibitor aniontových kanálů a je nejsilnějším inhibitorem aniontových kanálů především ve svěracích buňkách. Pokud je ve formě extracelulárního inhibitoru, tak blokuje R-typ aniontových kanálů v koncentracích 1 – 100 μM . Oproti tomu S-typ aniontových kanálů není inhibován DIDS, tak výrazně, jako R-typ aniontového kanálu. Deaktivace S-typu aniontového kanálu je tím rychlejší, čím se zvyšuje rychlost v průběhu hyperpolarizace a řadí se mezi procesy vratné (Schroeder et al., 1993). Studie dále ukazují, že při hydrolýze DIDS na vodný roztok dochází k polymerizaci na dimery, trimery, tetramery a pentamery. Tetramery a pentamery DIDS působí jako blokátory, které brání průtoku chloridů do CLC proteinů. DIDS a další inhibitory chloridových kanálů mají nízký potenciál a selektivitu.

Vědci se snažili zkoumat stabilitu DIDS, kdy nejprve chtěli vytvořit krystaly DIDS. Z kapalinové chromatografie HPLC, která byla použita na analýzu inhibitoru DIDS připraveného ve vodném roztoku fosfátového pufru, vyšly překvapivé výsledky. Hydrolyzovaná směs DIDS totiž lépe inhibovala CIC-ec 1, než samotný DIDS (v rozmezí koncentrace 5 až 300 μM).

Inhibitor DIDS inhibuje aktivitu ATPasy (Sze, 1982), membránový potenciál (Churchill, 1983) a pH gradient buněk (Churchill and Sze, 1983). DIDS inhibuje hlavně chloridové anionty stimulující aktivitu ATPasy, než draselné kationty, které už neinhibuje (Churchill et al., 1983). Kromě ATPasy DIDS inhibuje také ATP dependentní methylamin při stejné koncentraci jako ATPasu. Pro aktivaci DIDS není důležitá přítomnost chloridových aniontů, protože ji inhibuje se stejným účinkem jako ATPasu stimulovanou chloridovými ionty. Při reakcích se DIDS snažil navázat do aktivačního místa ATPasy, ale přítomnost chloridových aniontů zajistila ochranu před inhibitorem DIDS. Při určité koncentraci (2-10 μM) DIDS je aktivita ATPasy stimulována chloridovými anionty a její inhibice se snižuje, pokud ATPasa není stimulovaná (Churchill and Sze, 1984).

2.6 Inhibitor NIF

Kyselina niflumová (NIF) patří mezi inhibitory aniontových kanálů a neřadí se k inhibitorům, které by inhibovali specifické typy aniontových kanálů jako například

chloridový kanál (Trebacz et al., 1997; Wendehenne et al., 2002). NIF inhibuje více R-
typ aniontových kanálů v plasmatické membráně, než S-
typ aniontových kanálů (White and Broadley, 2001). Pro úplnou inhibici kanálu musí být koncentrace NIF 200 μM , a pokud chceme kanál inhibovat jen částečně (50-60%) je zapotřebí koncentrace 100 μM . NIF je také používán jako inhibitor exocytózy probíhající v živočišných buňkách (Bertrand et al., 2004) a také způsobuje pomocí exocytózy uvolnění ATP z rostlinných buněk (Kim et al., 2006).

2.7 Růst rostlin

Růst rostliny je děj, kdy dochází k dělení, prodlužování a diferenciaci buněk. Existují tři růstové fáze buněk, je to fáze embryonální, prodlužovací a diferenciacní. V embryonální fázi růstu dochází hlavně k neustálému dělení buněk, které se vyskytují především v dělivých pletivech kořene a stonku, konkrétně v jejich vrcholech. Tato fáze trvá o hodně déle, než prodlužovací fáze. V prodlužovací fázi dochází ke zvětšování objemu buněk a následnému prodlužování. Poslední fáze diferenciacní slouží k diferenciaci buněk a poté k rozdělení různých funkcí v rostlině. Růst rostlin je ovlivňován vnitřními nebo vnějšími faktory. K vnitřním faktorům se řadí hlavně hormony a mezi vnější faktory patří teplota, voda, výživa a především světlo.

Mezi významné vnitřní faktory se řadí rostlinné hormony označované také jako fytohormony. Fytohormony, které pomáhají v růstu rostliny, označujeme jako stimulatory a fytohormony brzdící růst nazýváme inhibitory. Mezi stimulatory rostlin patří například auxiny, gibereliny a cytokininy a mezi inhibitory se řadí kyselina abscisová a fenolické látky. Všechny fytohormony se využívají k dělení buněk a k prodlužování nejen buněk ale i částí rostlin se využívají gibereliny a auxiny. Fytohormony se vytvářejí v různých částech rostliny, například auxiny se tvoří ve vzrostném vrcholu stonku, cytokininy jsou v kořenech, gibereliny také v kořenech a mladých listech a inhibitory ve starších listech.

Teplota musí být optimální pro normální růst rostliny. Důležité jsou i dvě krajní hodnoty minimum, kdy rostlina začíná růst a maximum, kdy rostlina zpomaluje růst a ostatní funkce. Voda je další nepostradatelný faktor pro růst rostliny, tak jako pro všechny další organismy. Významným faktorem pro růst rostliny je rovněž množství živin, které rostlina čerpá většinou ze substrátu. Pokud je v půdě nedostatek živin, tak je růst rostliny omezen. Naopak při nadbytku živin dochází ke zvýšení růstu, než je obvyklé. Nepostradatelným vnějším faktorem je světlo, které je důležité k procesu fotosyntézy a vytvoření látky pro výživu rostliny (glukosa) a pro fotomorfogenezi. Pokud rostlina nemá dostatek světla, tak dochází k prodlužování hypokotylu rostliny,

špatnému růstu listů a omezené syntézy chlorofylu a tím má rostlina omezenou schopnost fotosyntetizovat (Brzeska, 2006).

2.8 Fotomorfogeneze

Jedním z nejdůležitějších faktorů pro růst a vývoj rostliny je světlo, které je zdrojem energie pro rostlinu. Světlo však funguje i jako signál, který je přijímán rozmanitými vysoce citlivými fotoreceptory. Světelný signál utváří rostlinu do formy, která je schopná provádět fotosyntézu. Tento proces indukovaný světelným signálem důležitý pro vývoj rostlin se nazývá fotomorfogeneze.

Je známo, že světelné spektrum se skládá z různých vlnových délek a také, že existuje velké množství organismů, které mají odlišné reakce na světlo. Proto existuje několik skupin fotoreceptorů, které absorbují jinou část světelného spektra o rozdílné vlnové délce (Devlin et al., 2007). Fotoreceptory u rostlin se rozdělují na dvě základní skupiny. První skupina jsou fotoreceptory, které absorbují světlo v červené oblasti spektra, kde mají absorpční maxima. Druhá skupina fotoreceptorů absorbuje světlo v modré oblasti spektra s absorpčními maximy (Franklin et al., 2005).

2.9 Skupiny fotoreceptorů

Fotoreceptory, které vnímají červené světlo, se nazývají fytochromy a vyskytují se u sinic, bakterií i vyšších rostlin. Fytochromy slouží ke vnímání kvality a intenzity a délky trvání světelného signálu.

Fotoreceptory, které vnímají modré světlo, mají podobnou funkci, ale jsou tvořeny různými skupinami molekul, tvořící rodinu s podobnými vlastnostmi (Lin, 2002). U některých reakcí může být modré světlo vytvořeno modrým a UV-A světlem, v některých případech je citlivé na modré světlo. Pokud dojde při procesu fotomorfogeneze k různým odpovědím, bude to viditelné na křivkách absorpčního spektra. U fotoreceptorů modrého světla se vyskytují různé chromofory například flavin, pterin a karotenoid, které mají rozdílné funkce. Zmíněné fotoreceptory se vyskytují u nejen krytosemenných rostlin, ale i u prvoků, hub, kapradin a zelených řas. V těchto skupinách organismů byly objeveny genetickými a biochemickými studiemi (Lin, 2002).

2.9.1 Fytochromové fotoreceptory

Fytochrom je tvořen proteinem, na kterém je připojen chromofor pomocí kovalentní vazby. Existuje ve dvou různých konformacích Pfr a Pr, které mají rozdílná absorpční spektra. Pfr absorbuje dlouhovlnné červené světlo (FR, 730 nm), kdežto Pr pohlcuje normální červené světlo (R, 660 nm). Pokud Pr pohltní červené světlo, tak dojde k přeměně na Pfr a jestli Pfr absorbuje více červené světlo, tak se z něj stane Pr.

Fytochrom potom na základě reverzibility k červenému nebo více červenému světlu určitým způsobem reaguje (Mas et al., 2000).

Příkladem jak ovlivňuje červené světlo klíčení semen, je klíčení semen salátu. Když na semena působíme normálním červeným světlem, tak dochází ke stimulaci klíčení. Pokud však semena ozáříme dlouhovlnným červeným světlem, dojde naopak k inhibici klíčení (Mas et al., 2000).

Fytochromy mají řadu fotomorfogenních funkcí jako například zvětšování listů, inhibice prodlužování stonku rostliny či indukce kvetení. Fytochromy hrají rovněž důležitou úlohu v reakci zvané únik ze stínu (shade avoidance), ke které dochází, když je rostlina zastíněna např. jinou rostlinou. V takovém případě listy větších rostlin absorbují červené světlo (R), kdežto propouštějí dlouhovlnné červené světlo (FR). Tím pádem se k zastíněné rostlině dostane méně R a více FR, zmenší se tedy poměr mezi R/FR. Rostlina množstvím R a FR velice intenzivně vnímá fytochromy, což vede k tomu, že se prodlužuje, aby se dostala ze stínu ke světlu (Mas et al., 2000).

Za odlišných světelných podmínek se fytochrom vyskytuje v jiných částech buňky. Pokud se rostlina nachází ve tmě, je fytochrom lokalizován v cytoplasmě. Když se však rostlina vyskytuje na světle, tak se fytochrom přemístí do jádra. Fytochrom pak může interagovat s PIF3 transkripčním faktorem. Proto je PIF3 důležitý pro správný proces fotomorfogeneze, kdy se váže na G-BOX s prvky určitých genů a slouží pak k jejich regulaci (Mas et al., 2000).

2.9.2 Kryptochromy

Kryptochrom 1 (CRY1) byl poprvé objeven u *Arabidopsis thaliana* v roce 1993. Tento protein je tvořen aminokyselinami, které mají podobné sekvence jako prokaryotické DNA fotolázy, ale protein nemá fotolázovou aktivitu. Hypokotyly mutantů s defektem v CRY1 vykazovaly sníženou citlivost na modré světlo při inhibici růstu a sníženou indukci exprese modrým světlem indukovaných genů. Později byl identifikován i druhý receptor CRY2, který se podílí na inhibici prodlužování hypokotylů a tvorbě květů. Na rozdíl od CRY1 je však CRY2 fotolabilní. Je prokázáno, že kryptochrom CRY1 je lokalizován v jádře, kdežto na modrém světle se přemísťuje do jádra. Naproti tomu, CRY2 je lokalizován v jádře bez ohledu na světelné podmínky (Briggs et al., 2001). Na molekulární úrovni bylo zjištěno, že proteiny CRY1 a 2 inaktivují negativní regulátor fotomorfogeneze, COP1 a tím stimulují fotomorfogenezi (Yang et al., 2001).

2.9.3 Fototropiny

Fototropin je receptor, který absorbuje modré světlo nebo UV-A záření a je důležitý pro reakci zvanou fototropismus. Fototropismus je jev, při kterém rostlina roste ve směru

působícího světla. Hypokotyl vykazuje pozitivní fototropismus, roste ke světlu, naopak kořen vykazuje negativní fototropismus, roste opačným směrem než světlo. Působící světlo vede k tvorbě auxinu v pletivu hlavně na straně odvrácené od světla. Rostlina v těchto místech roste rychleji než na osvětlené straně a dochází tak k ohybu hypokotylu na světlo. Existuje však mutant u *Arabidopsis*, který má nefototropní hypokotyl, a tudíž při působení světla se dochází k normální fotomorfogenické reakci. Díky tomuto mutantu byl objeven gen, který kóduje fotoreceptor zvaný photropin1 (PHOT1), který se vyskytuje u *Arabidopsis thaliana* spolu s PHOT2. Fototropiny se skládají z C-terminální oblasti, která zahrnuje serin/threonin kinázu a N-terminální oblast, která obsahuje dvě LOV domény. Každá tato doména je tvořena zhruba 110 aminokyselinami a označují se LOV1 a LOV2. LOV domény mají podobnou sekvenci jako proteiny bakterií a savců a mají funkci světelných, napěťových a kyslíkových senzorů. N-terminální konec váže flavinmononukleotid (FMN), který podléhá autofosforylaci v závislosti na modrém světle. Za tmy je molekula FMN kovalentně vázána k LOV doméně a po působení modrého světla FMN tvoří kovalentní vazbu s cysteinovým zbytkem molekuly fototropinu (Banerjee and Batschauer, 2005).

2.10 Působení světla na aniontové kanály

Modré světlo může způsobit inhibici S-typu aniontových kanálů a jsou aktivovány působením CO₂ (Brearley et al., 1997; Raschke et al., 2003; Roelfsema et al., 2002). Před působením modrého světla dojde ke změně Nernstova potenciálu pro chloridové anionty (Roelfsema et al., 2004). Pro S-typ aniontových kanálů je charakteristická pomalejší deaktivace s membránovým potenciálem 0 mV nebo méně (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992), u svěřacích buněk je membránový potenciál v rozmezí od 0 mV do -100 mV. Pro ochranu buněk, na které působí CO₂ z ovzduší, nebylo pozorováno zapojení aniontových kanálů. Působením modrého světla způsobilo posunutí membránového potenciálu a proud a napětím do kladnějších hodnot. V přítomnosti CO₂ dochází u potenciálů, které jsou nižší než -20 mV, k deaktivaci kinetiky proudů aniontů těchto kanálů (Linder and Raschke, 1992; Schroeder and Keller, 1992). Inhibice aniontových kanálů modrým světlem je proces opačný vypnutí průduchů. Přítomnost CO₂ ještě zvyšuje rozdíl vztahu mezi napětím a proudem a tato změna vede k deaktivaci aniontových kanálů na modrém světle (Marten et al., 2007).

Aniontové kanály hypokotylu u *Arabidopsis thaliana* (Cho and Spalding, 1996) a mezofylové buňky listu hrášku (Elzenga and van Volkenburgh, 1997) aktivuje bílé a modré světlo a v tomto pořadí vykazuje slabou vodivost. Činnost aniontových kanálů je silně závislá na Ca²⁺ v cytosolu, ale příjem světla na něm závislý už není. U

Arabidopsis thaliana jsou aniontové kanály kompletně inhibovány modrým světlem za přítomnosti 20 μM NPPB a 10 mM La^{3+} a jejich úkolem bylo zprostředkovat membránovou depolarizaci, která je spojená s inhibicí prodlužování hypokotylu na modrém světle (Spalding, 2000).

3 MATERIÁL A METODIKA

- Rostlinný materiál:** rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers WT
rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. 7B-1 cv. Rutgers
- Chemikálie:** Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS), Cat. no. M5524, Caisson Lab. USA
Sacharosa p. a., Cat. no. 40135-AP0, Lachner
Morpholinoethane sulfonic acid (MES) analytical grade, Cat. no. 29834.04, Serva
SAVO – komerční roztok, BOCHEMIE a. s., Czech Republic
kyselina niflumová (NIF), Cat. no. N0630, Sigma-Aldrich
kyselina 4,4'-diisothiokyanstilben-2,2'-disulfonová (DIDS), Cat. no. D3514, Sigma-Aldrich
- Pomůcky:** Petriho misky plastové, průměr 90 mm
náplast z netkaného textilu, REF: 1320103112, BATIST
- Přístroje:** laminární box Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific
růstové komory Microclina 1000E, Snijders Scientific, The Netherlands

3.1 Rostlinný materiál

Rostlinný materiál, který jsem používal ve své bakalářské práci, bylo *Solanum lycopersicum* L., neboli rajče jedlé. Ke svým pokusům jsem konkrétně využíval kontrolní genotyp cv. Rutgers (WT), což je kultivar, který není žádným způsobem geneticky upravený. Druhým genotypem byl mutant *7B-1*, odvozený od kultivaru cv. Rutgers, který má spontánní recesivní mutaci v jednom genu *7B-1* a byl poskytnutý V. K. Sawhney (University of Saskatchewan, Saskatoon, Canada) (Sawhney, 1997). Funkce genu *7B-1* není zatím známa, ale pravděpodobně se jedná o mutaci v signální dráze modrého světla. Mutant *7B-1* se vyznačuje zvýšenou tolerancí k abiotickým stresům (osmotický stres, zasolení, nízké teploty), a to specificky na modrém světle (Fellner and Sawhney, 2002).

3.2 Metodika

3.2.1 Příprava kultivačního média

Příprava kultivačního média probíhala následovně. Nejdříve jsem si nachystal Erlenmayerovu baňku, do které jsem nalil 1 litr destilované vody a na dno jsem dal magnetické míchadlo. Pak jsem přidal odvážených 20 g sacharosy na celkové 2 litry média (tj. výsledná koncentrace sacharosy 1%). Následovalo přidání 8,66 g MS média (Murashige and Skoog, 1962; Caisson, USA) na 2 litry, pak jsem přidal MES pufr, kterého bylo 390,4 mg na 2 litry média. Při přidávání zmíněných látek se roztok neustále míchal pomocí míchadla. Po přidání všech látek do Erlenmayerovy baňky jsem roztok doplnil do 2 litrů.

Následně jsem upravil pH roztoku pomocí 1M KOH na hodnotu 6,1. Nyní jsem mohl odvážit do každé varné lahve 2,8 g agaru. K agaru jsem nalil 400 ml média a lahve uzavřel víčkem. Médium bylo poté vysterilizováno v autoklávu a připraveno k použití.

3.2.2 Sterilní výsev semen

Sterilní výsev jsem provedl podle následujícího postupu. Do plastových zkumavek jsem si odpočítal 200 semínek od WT (wild type, cv. Rutgers) a od mutantu *7B-1*. Přidal asi 40 ml připraveného 2,8% roztoku Sava a vody (600 ml Sava a 400 ml vody), nechal jej působit asi půl hodiny (25 min) a po několika minutách jsem zkumavky s roztokem protřepal. Mezitím jsem si rozehl médium v mikrovlnné troubě a do každé sterilní plastové Petriho misky (průměr 90 mm) jsem nalil 20 ml média. Po ukončení sterilizace semínek jsem roztok Sava odstranil pomocí 10 ml pipety a nahradil ho sterilní destilovanou vodou. Toto promytí semínek vodou jsem provedl celkem pětkrát. Poté

jsem pomocí pinzety ožehnuté v plameni kahanu, vysel na každou misku přibližně 50 semínek. Po provedení výsevu jsem popsal Petriho misky a oblepil je páskou z netkané textilie (2 otočky). Petriho misky zabalené do alobalu jsem dal do kultivační komory (Microclima 1000E, Snijders Scientific, Holandsko), kde byla kultivována po dobu 3 dnů a při teplotě 23°C.

3.2.3 Přenos klíčících semen

Přenos klíčících semen na média s inhibitorem aniontových kanálů jsem provedl následujícím způsobem. Zapnul jsem si laminární flowbox a omyl uvnitř povrch 70% ethanolem. Potom jsem si připravil sterilní plastové Petriho misky (průměr 90 mm) s médiem obsahující inhibitor aniontových kanálů NIF o koncentracích 0, 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$ nebo inhibitor aniontových kanálů DIDS o koncentracích 0, 100, 200 a 300 $\mu\text{mol/l}$. Jakmile médium ztuhlo, mohl jsem pomocí vysterilizované pinzety přenášet vyklíčená semínka daného genotypu na médium s danou koncentrací inhibitoru. Vybíral jsem jen semínka vyklíčená a s kořínky přiměřeně dlouhými (1-2 cm max.). Jakmile jsem byl hotov, tak jsem všechny misky oblepil páskou (2 kolečka) a vyznačil si fixou vrch misek pro příští manipulaci. Misky se semínky určené ke kultivaci ve tmě jsem zabalil do alobalu. Další část misek jsem umístil do kultivační komory s modrým světlem (BL) a poslední část misek jsem dal do kultivační komory s červeným světlem (RL). Přenesené rostlinky jsem kultivoval při teplotě 23°C po dobu 7 dnů. Zdrojem modrého světla s maximem ozáření 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 460 nm byly modré zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Phillips, USA). Zdrojem červeného světla s maximem ozáření 10 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 660 nm byly červené zářivky Philips TLD-36W/15-Red (Phillips, USA).

3.2.4 Měření kořene a hypokotylu

Po týdnu kultivace jsem změřil délku hypokotylu a kořene rostlin. Délka těchto orgánů rostlin byla měřena pomocí pravítka na přesnost jednoho milimetru. Naměřené hodnoty jsem zapsal do tabulky. Výsledky pak byly zpracovány a vyneseny do grafů pomocí programu Microsoft Excel.

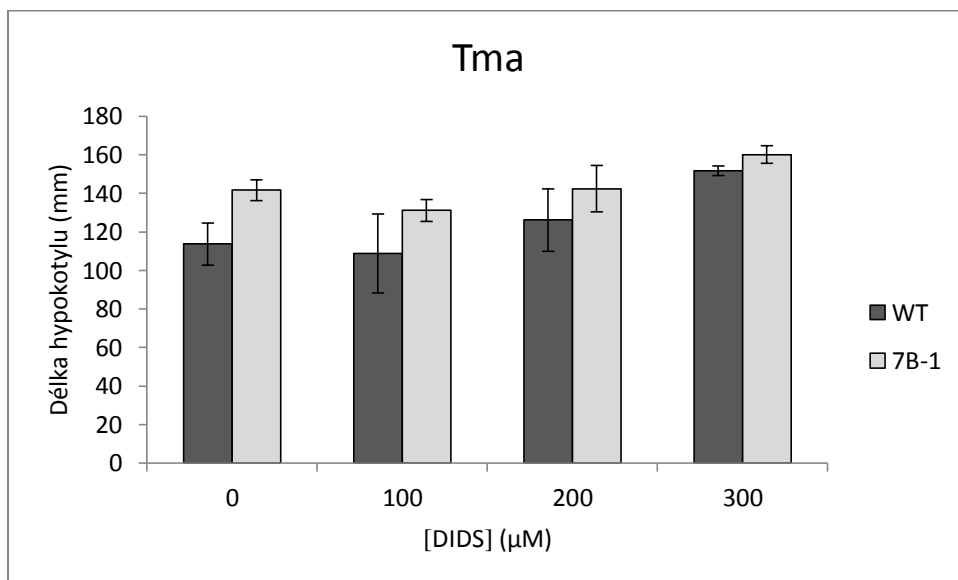
4 VÝSLEDKY

4.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na růst rostlin

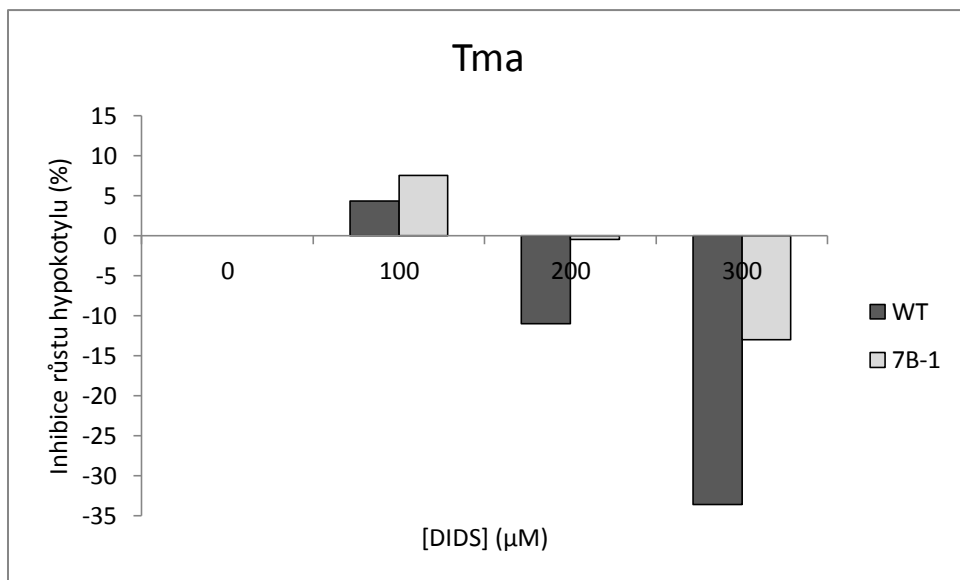
Pro zodpovězení otázky, zda jsou aniontové kanály zapojeny ve fotomorfogenezi rostlin rajčete *Solanum lycopersicum* L. bylo sledováno, jakým způsobem ovlivňují inhibitory aniontových kanálů DIDS a NIF růst rostlin při různých světelných podmínkách. Všechny experimenty byly provedeny podle postupu uvedeného v metodice. Růst rostlin byl studován ve tmě na modrém a červeném světle.

Růst hypokotylu ovlivněný inhibitorem DIDS

Růst hypokotylu *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT) a mutanta *7B-1* byl ovlivněn přidáním inhibitoru DIDS úměrně v závislosti na koncentraci inhibitoru. Konkrétně ve tmě, prodlužování etiolovaných hypokotylů WT bylo stimulováno vlivem DIDS, a to asi o 30% při koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ (Graf 1 a 2). Stimulován byl i růst hypokotylu *7B-1*, ale zřetelně méně než u WT. Konkrétně při nejvyšší použité koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ dosahovala stimulace růstu u *7B-1* asi 13% (Graf 2).

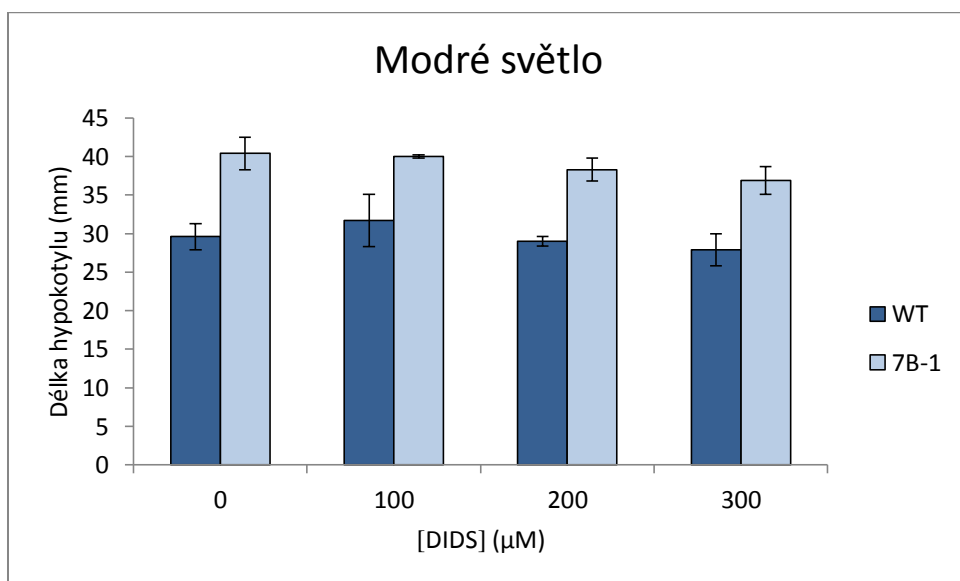


Graf 1: Délky etiolovaných hypokotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta *7B-1* rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky hypokotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



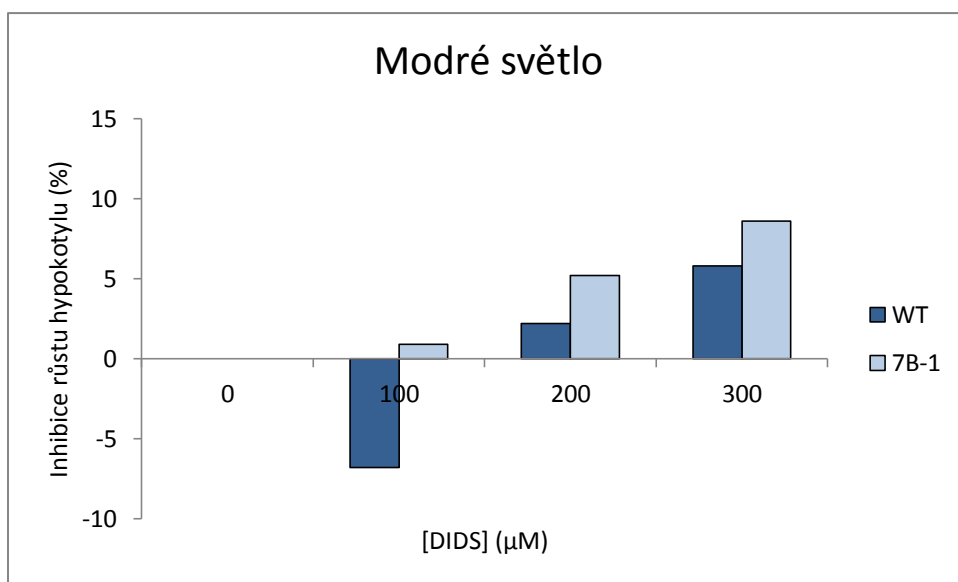
Graf 2: Inhibice růstu etiolovalých hypocotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta *7B-1* po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Podle očekávání modré světlo výrazně inhibovalo růst hypocotylů obou genotypů, přičemž hypocotyl *7B-1* byl výrazně delší než hypocotyl cv. Rutgers (Graf 3). Na rozdíl od etiolovalých hypocotylů, u rostlin rostoucích na modrém světle neměl DIDS výrazný vliv na prodlužování hypocotylů, a to podobně u obou genotypů (Graf 3). Na modrém světle došlo k malé inhibici růstu hypocotylu WT vlivem DIDS, a to asi 6% při koncentraci 300 μmol/l (Graf 4). Inhibice růstu hypocotylu *7B-1* byla o trochu větší než u WT, konkrétně asi 9% při nejvyšší použité koncentraci (Graf 4).



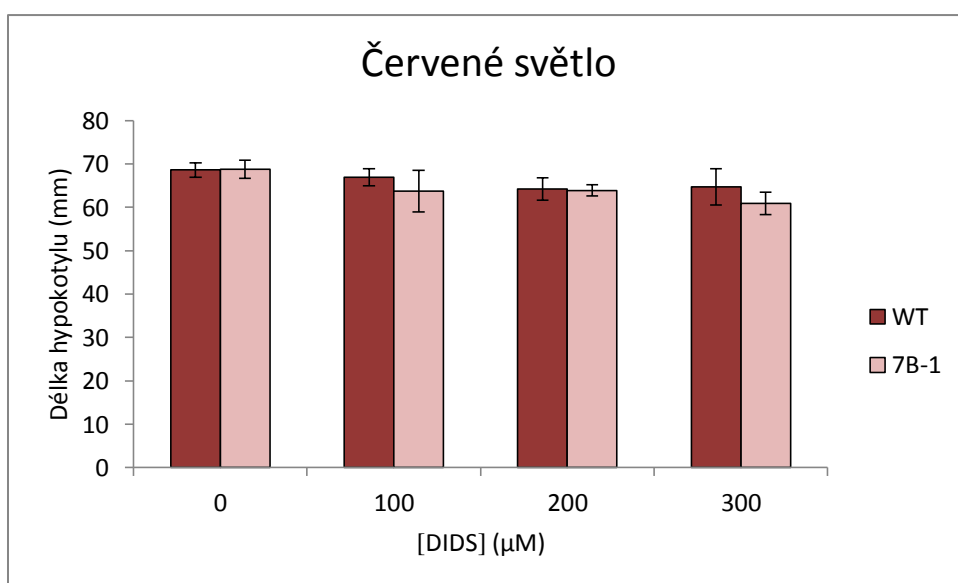
Graf 3: Délky etiolovalých hypocotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta *7B-1* rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky hypocotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS.

Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



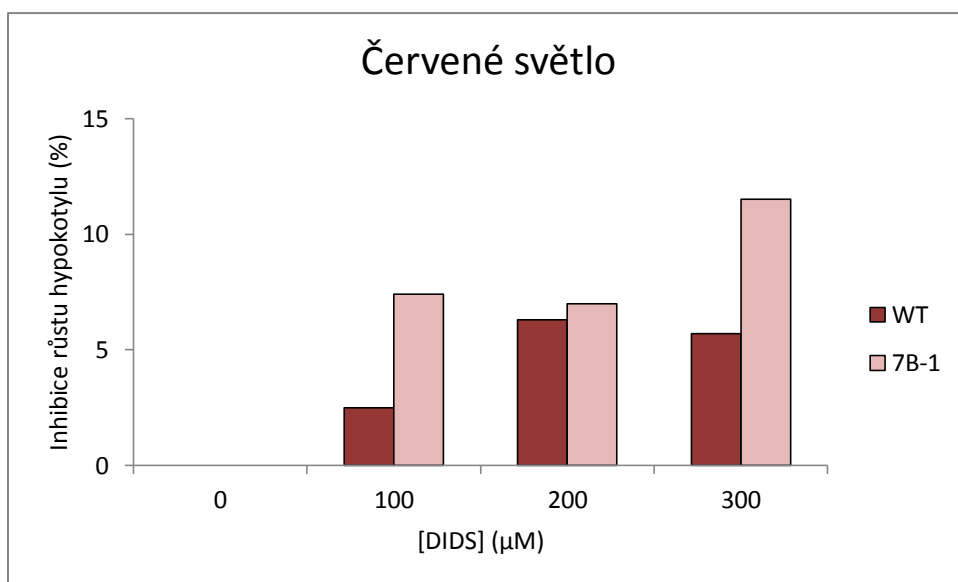
Graf 4: Inhibice růstu etiolovaných hypokotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Červené světlo inhibovalo růst hypokotylů u obou genotypů, přičemž redukce růstu byla zřetelně menší než vlivem modrého světla. Podobně jako u rostlin rostoucích na modrém světle, neměl DIDS v použitých koncentracích výrazný vliv na růst hypokotylů u obou genotypů (Graf 5). Pouze v nejvyšší koncentraci redukoval DIDS růst hypokotylů 7B-1 asi o 12% (Graf 6).



Graf 5: Délky etiolovaných hypokotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky hypokotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS.

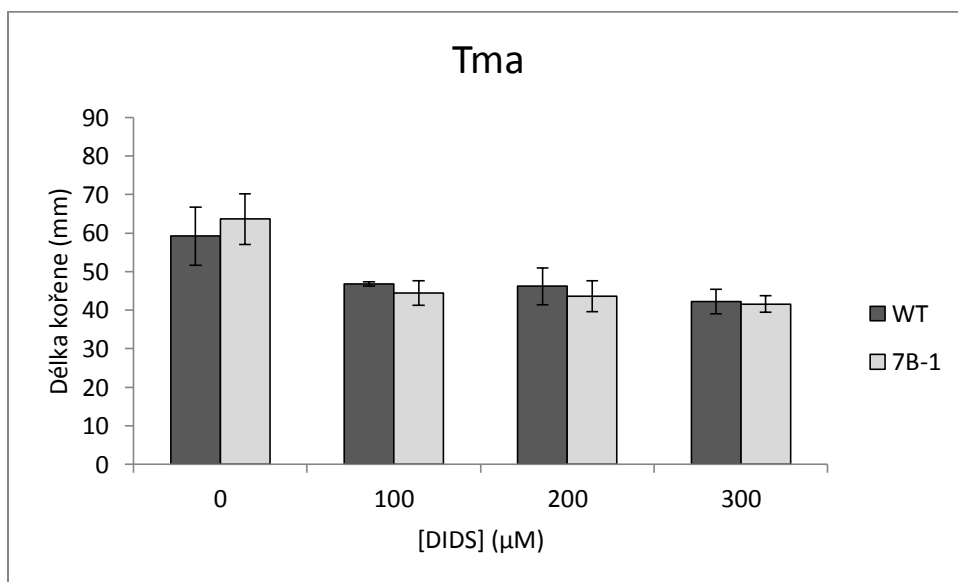
Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotyly \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



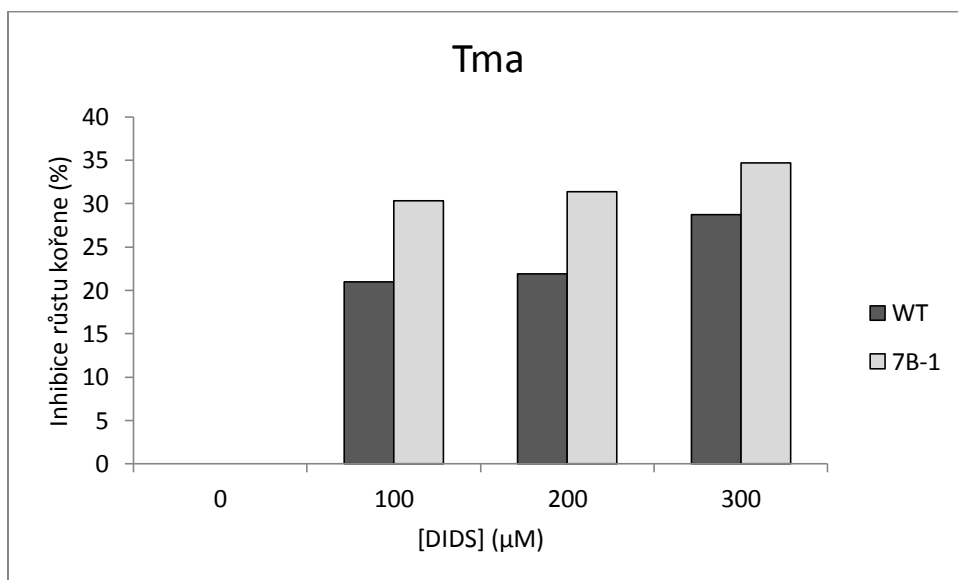
Graf 6: Inhibice růstu etiolovaných hypokotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Růst kořene ovlivněný inhibitorem DIDS

Na rozdíl od hypokotylů měl DIDS v použitých koncentracích téměř výhradně inhibiční účinky na růst kořenů, úměrné koncentraci inhibitoru. Konkrétně ve tmě, byla inhibice kořenů WT a 7B-1 vlivem DIDS podobná (Graf 7), přičemž při nejvyšší testované koncentraci 300 $\mu\text{mol/l}$ dosahovala inhibice růstu kořene asi 29% u WT a 35% u 7B-1 (Graf 8).

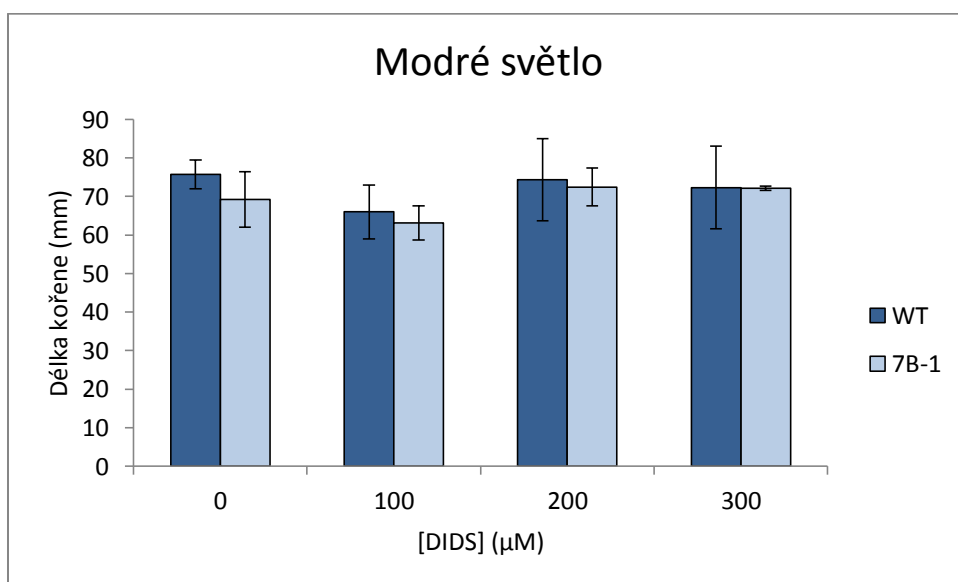


Graf 7: Délky etiolovaných kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene ± SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

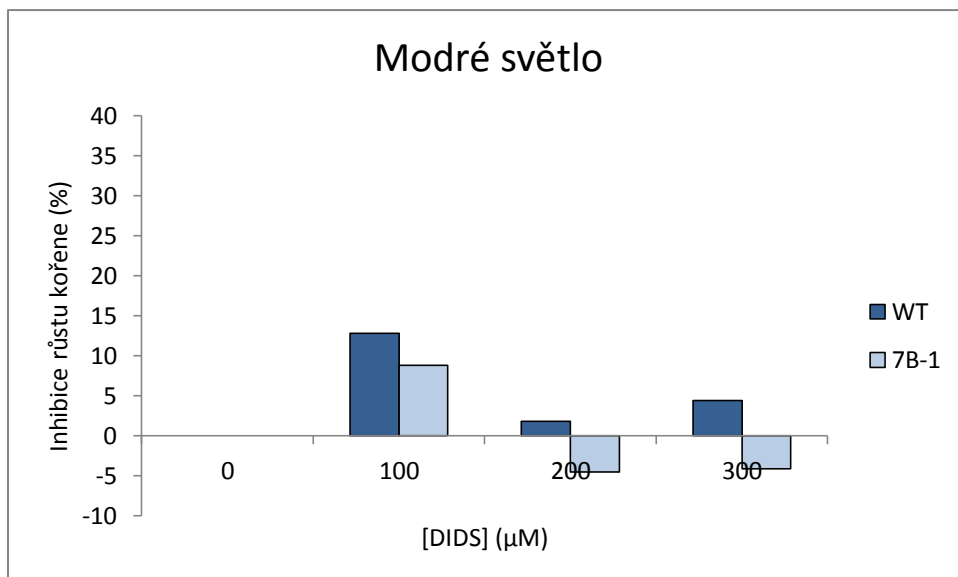


Graf 8: Inhibice růstu etiolovaných kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Na modrém světle byl inhibiční účinek DIDS na růst kořene obou genotypů potlačen a DIDS tak neměl na růst kořene žádný výrazný efekt (Graf 9 a Graf 10).

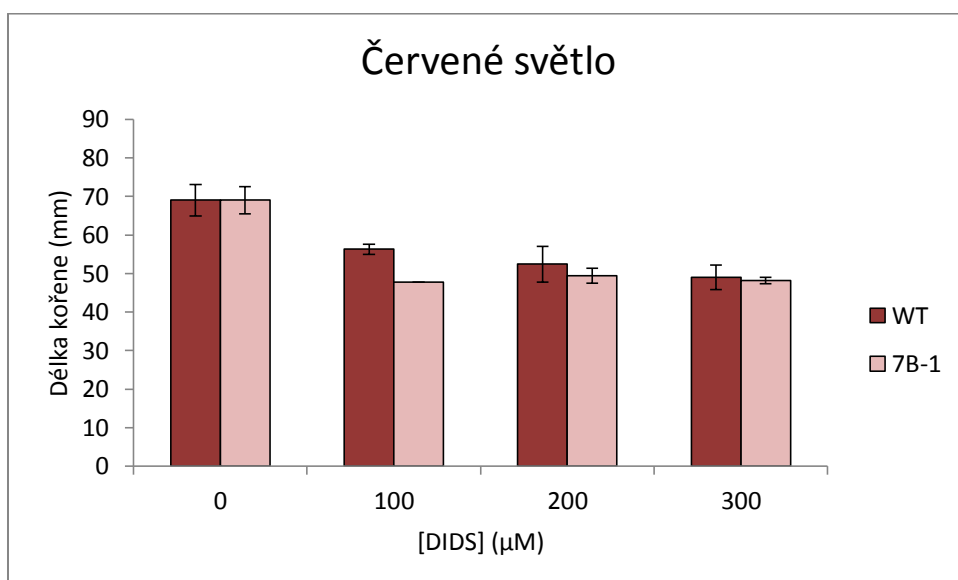


Graf 9: Délky etiolovaných kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene ± SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

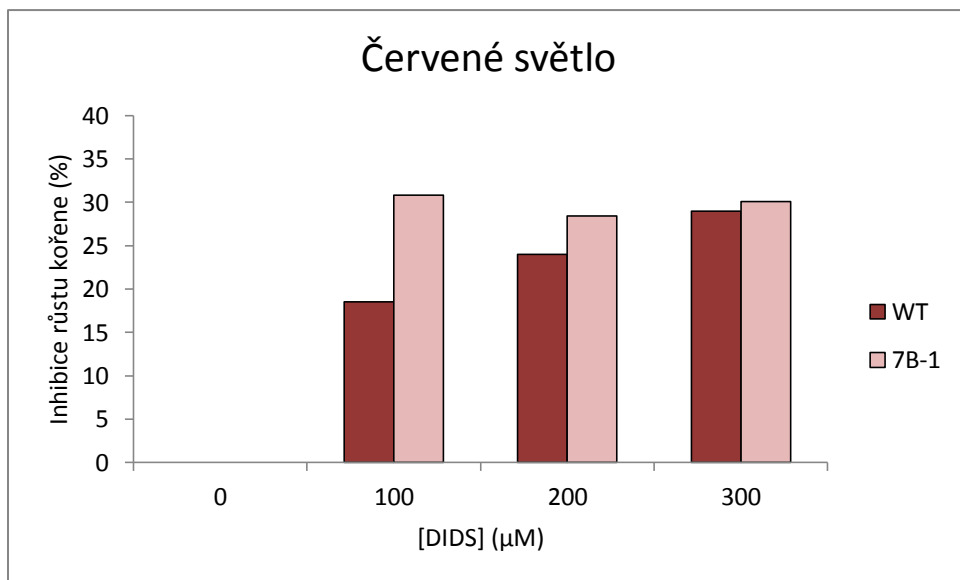


Graf 10: Inhibice růstu etiolovaných kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Překvapivě, na rozdíl od situace na modrém světle, růst kořenů experimentálních rostlin rostoucích na červeném světle byl inhibován inhibitorem DIDS (Graf 11), a to podobně jako u etiolovaných rostlin. Podobně jako ve tmě, byla inhibice růstu kořene mutanta 7B-1 podobná, jako u cv. Rutgers (Graf 12).



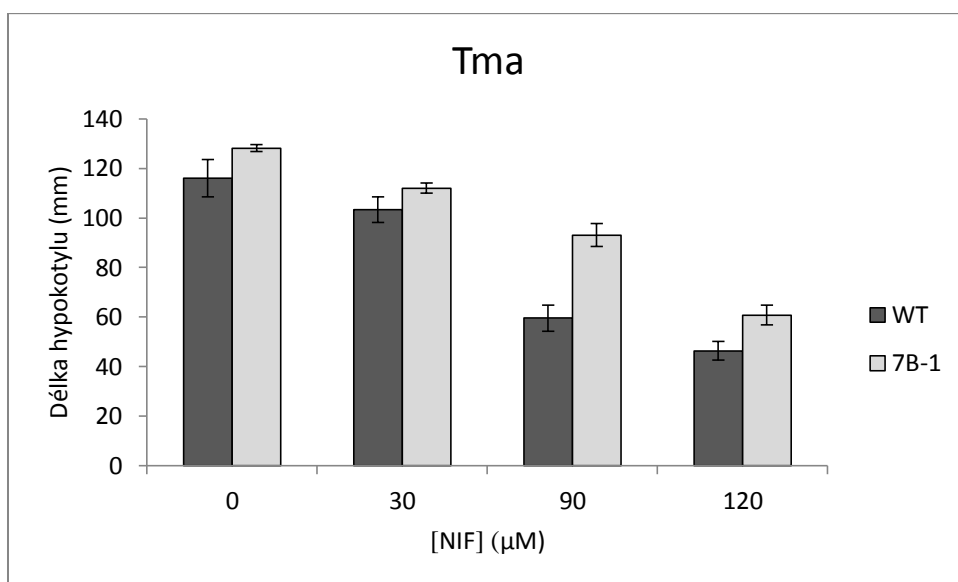
Graf 11: Délky etiolovaných kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů DIDS. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



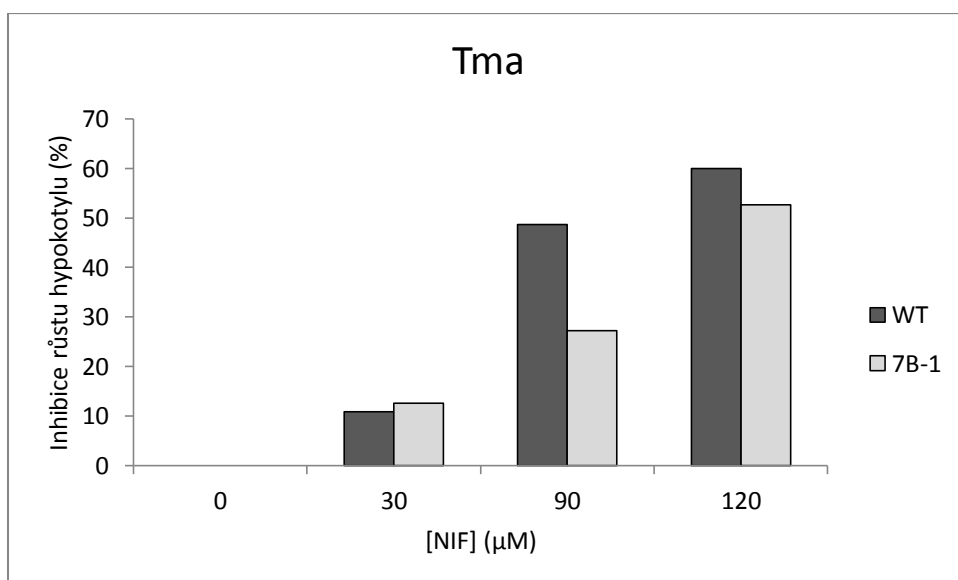
Graf 12: Inhibice růstu etilovaných kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Růst hypokotylu ovlivněný inhibitorem NIF

Druhým použitým inhibitorem byl NIF, který na rozdíl od DIDS ukazoval pouze inhibiční účinky na růst rostlin rajčete bez ohledu na světelné podmínky. Růst hypokotylu cv. Rutgers (WT) byl inhibován úměrně koncentrací inhibitoru NIF (Graf 13). Konkrétně ve tmě, byla inhibice hypokotylu WT vlivem NIF při koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$ 60% (Graf 14). Inhibice hypokotylu 7B-1 vlivem NIF byla celkově o něco nižší než u WT (Graf 14).

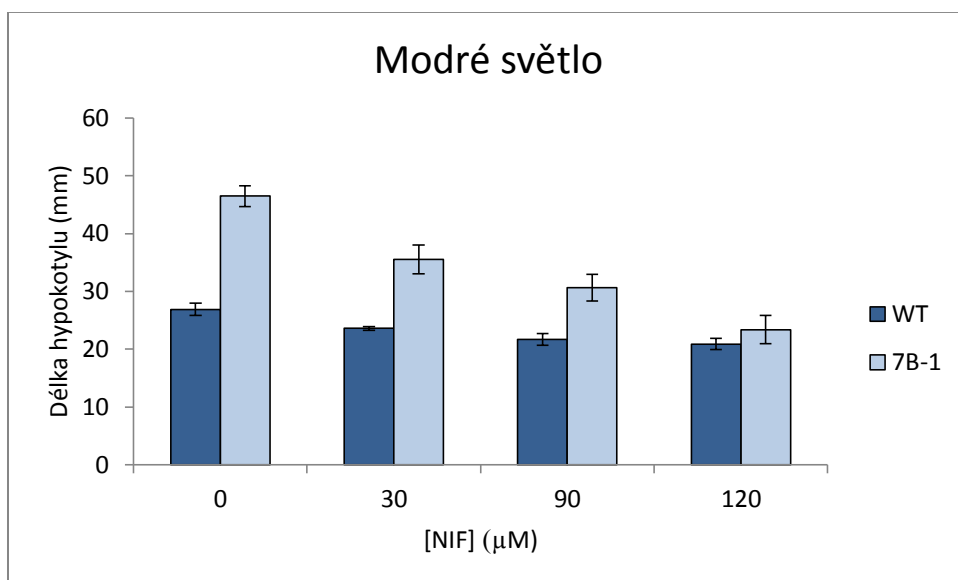


Graf 13: Délky etiolovaných hypokotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutantu 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů NIF. Délky hypokotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

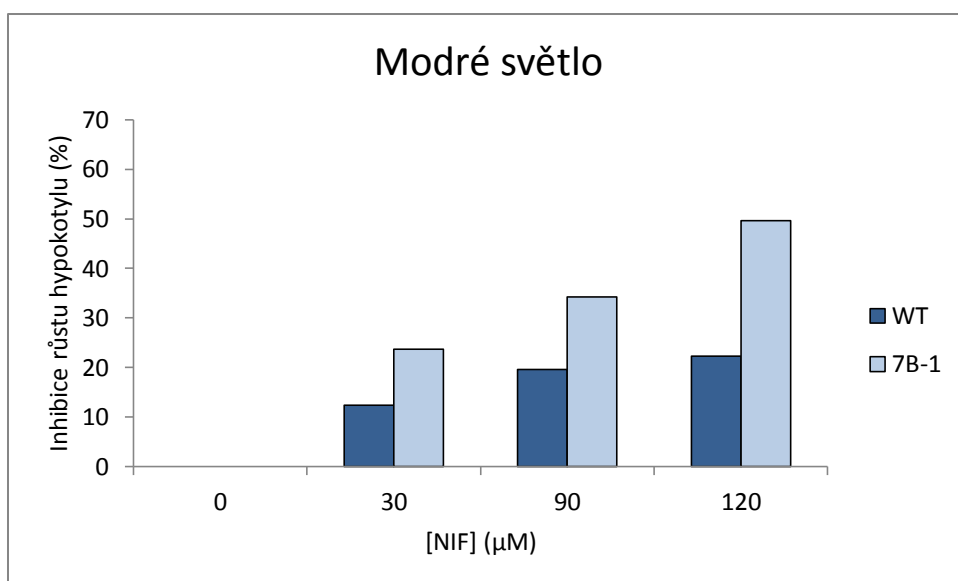


Graf 14: Inhibice růstu etiolovaných hypokotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutantu 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Modré světlo opět výrazně redukovalo délku hypokotylu WT a inhibiční účinek NIF na jeho růst byl mnohem menší než u etiolovaných rostlin (Graf 15). Inhibice hypokotylu WT byla na modrém světle tedy podstatně nižší než u etiolovaných hypokotylů, při nejvyšší koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$ kolem 22% (Graf 16). Podle očekávání byly hypokotyly mutantu *7B-1* na modrém světle výrazně delší (Graf 15). Naproti tomu inhibice prodloužování hypokotylu *7B-1* vlivem NIF byla na modrém světle dvojnásobná než u WT, a to asi 50% při nejvyšší možné koncentraci (Graf 16).

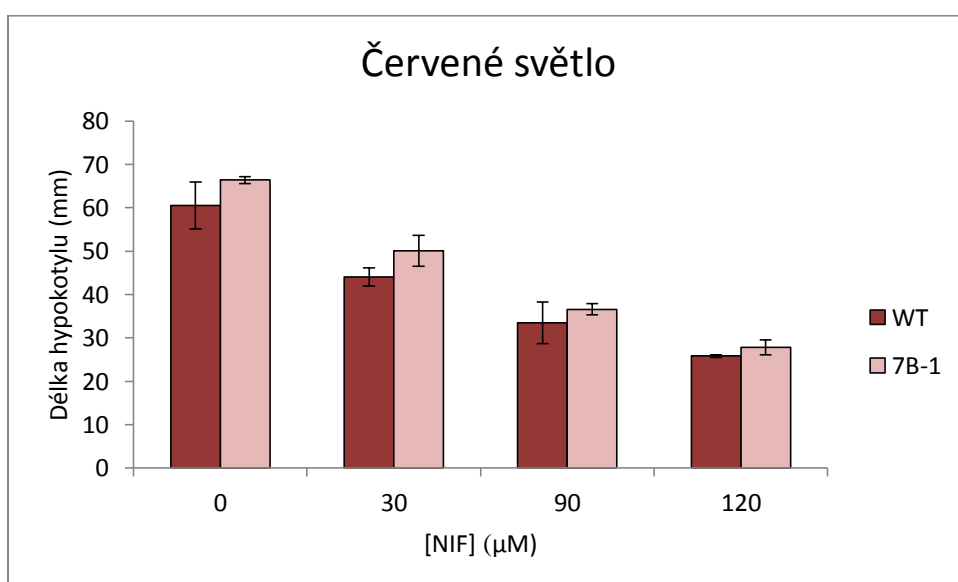


Graf 15: Délky etiolovaných hypokotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutantu *7B-1* rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů NIF. Délky hypokotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

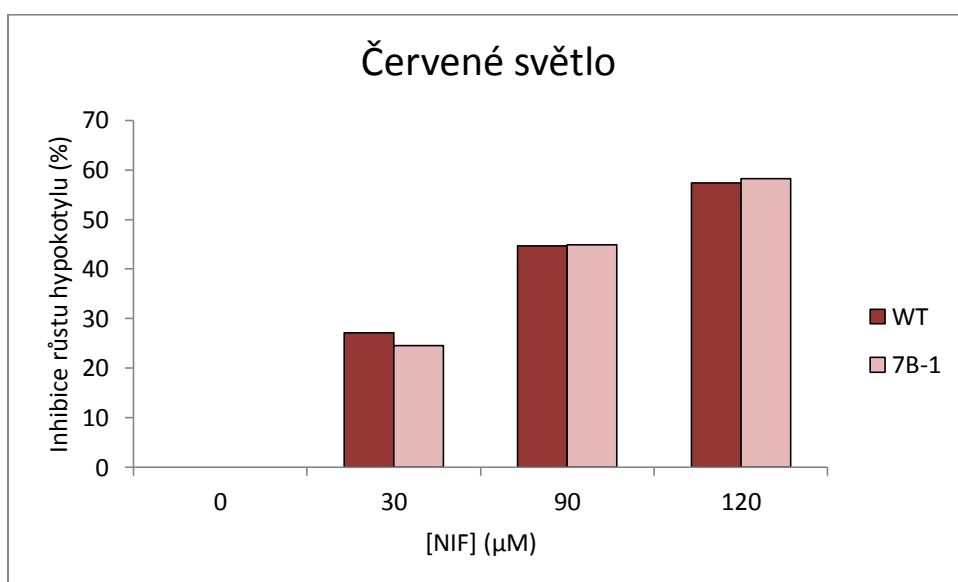


Graf 16: Inhibice růstu etiolovaných hypokotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutantu *7B-1* po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Na rozdíl od modrého světla, červené světlo nemělo na citlivost hypokotylů WT k inhibitoru NIF výrazný vliv a inhibice vlivem NIF byla podobná jako u etiolovaných hypokotylů (Graf 17). Inhibice růstu hypokotylu WT působením NIF dosahovala podobných hodnot, jako u etiolovaných hypokotylů, při nejvyšší koncentraci to bylo zhruba 57% (Graf 18). Na rozdíl od WT, však červené světlo zesilovalo citlivost hypokotylů 7B-1 k NIF, především u nižších koncentrací 30 a 90 $\mu\text{mol/l}$ (Graf 18, srovnání s Grafem 14), při nejvyšší koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$ nedošlo ke změně inhibice (Graf 14).



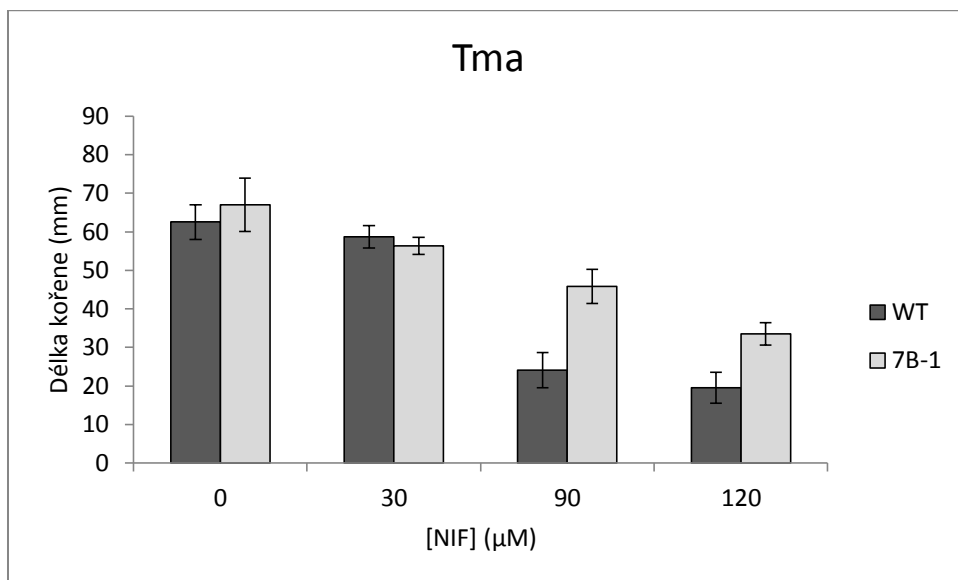
Graf 17: Délky etiolovaných hypokotylů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutantu 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů NIF. Délky hypokotylů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky hypokotylu \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



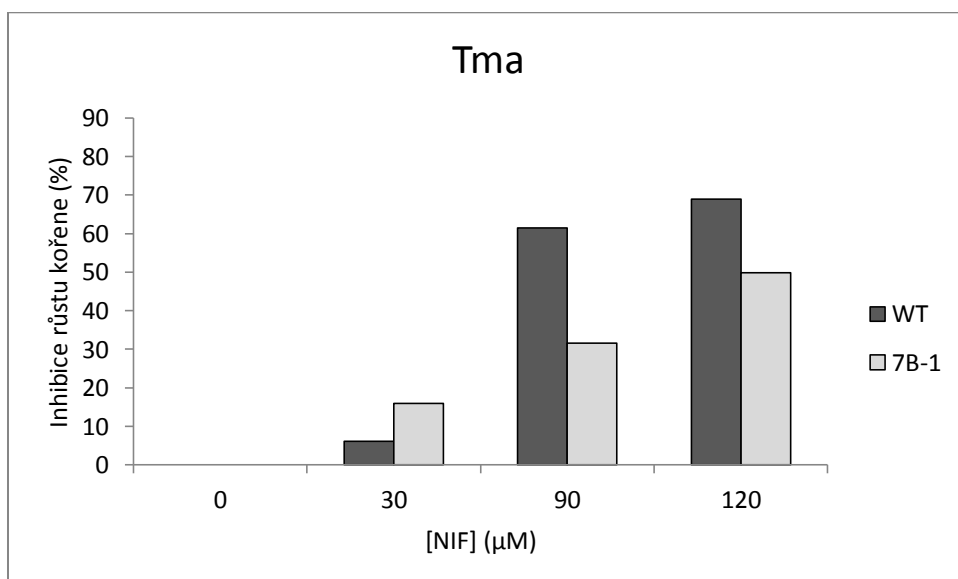
Graf 18: Inhibice růstu etiolovaných hypokotylů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibítoem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Růst kořene ovlivněný inhibítoem NIF

Růst kořene *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers (WT) a mutanta 7B-1 byl přidáním inhibítoem NIF do média výrazně inhibován (Graf 19). Z grafu 20 je však zřetelné, že inhibice prodlužování kořene 7B-1 působením NIF byla ve tmě podstatně nižší než u WT (Graf 20).

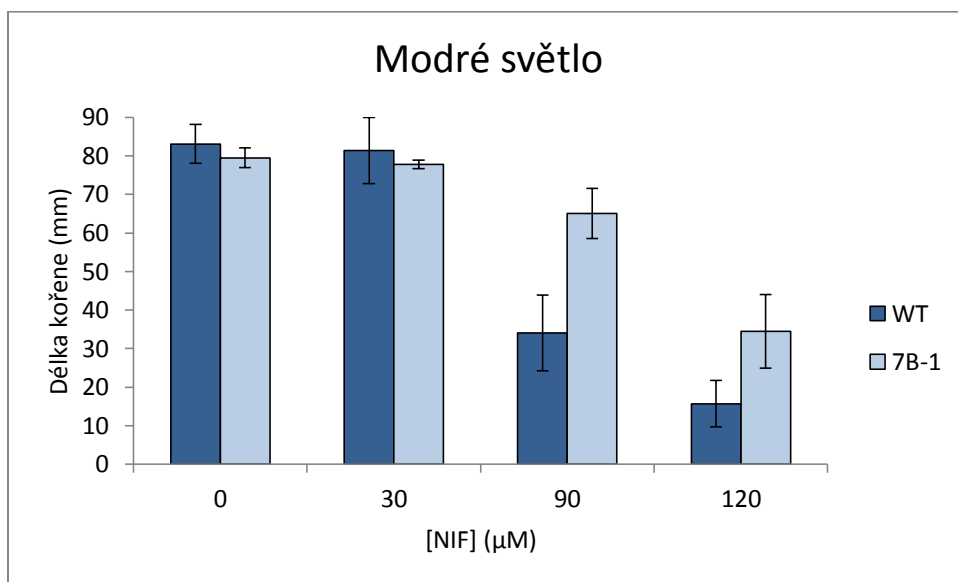


Graf 19: Délky etiolovaných kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibítoem aniontových kanálů NIF. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

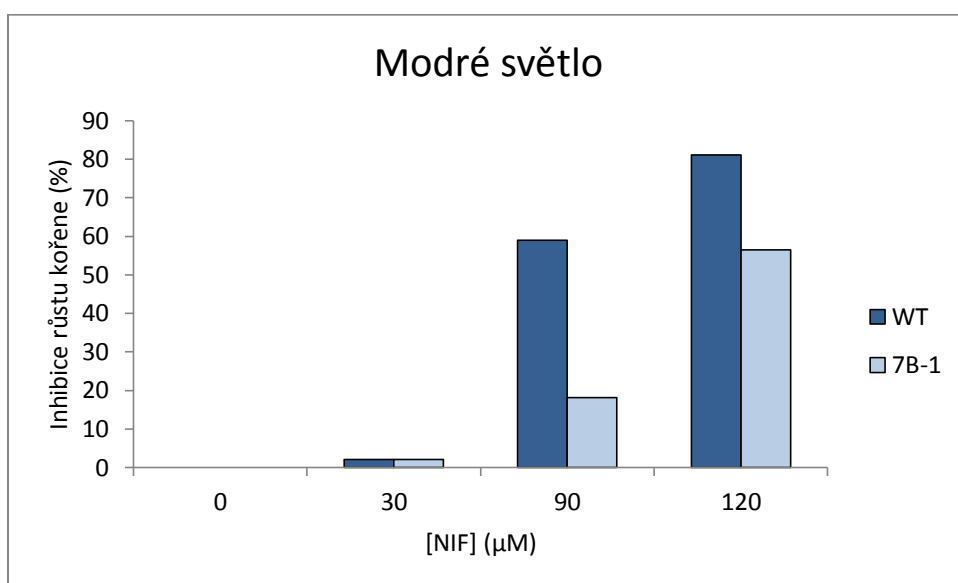


Graf 20: Inhibice růstu etiolovaných kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibítoem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Podobně jako u etiolovaných kořenů, výrazná inhibice růstu vlivem NIF byla pozorována u kořenů obou genotypů rostoucích na modrém světle (Graf 21). Podobně jako ve tmě pak byla citlivost kořenů 7B-1 k NIF na modrém světle znatelně nižší než u WT (Graf 22).

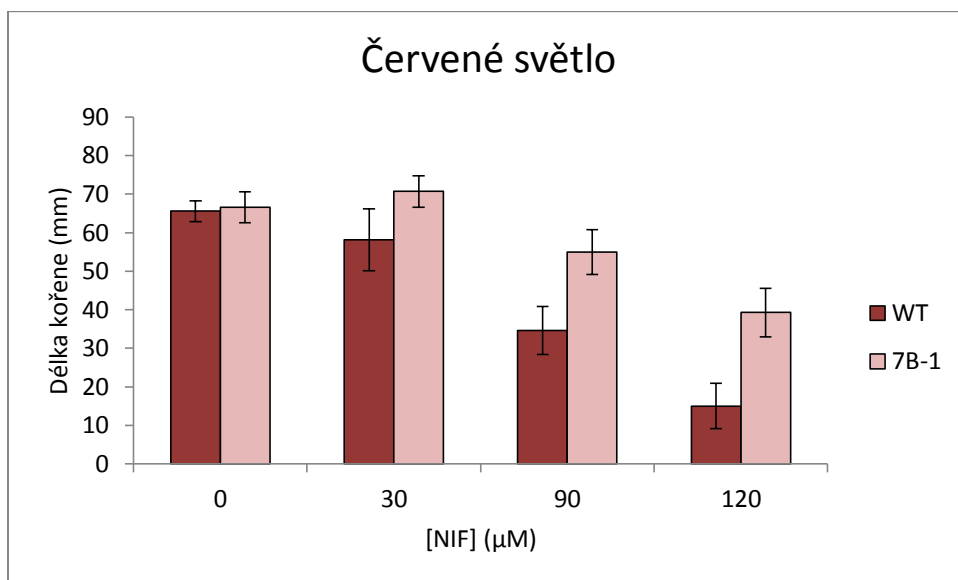


Graf 21: Délky etiolovaných kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů NIF. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene ± SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

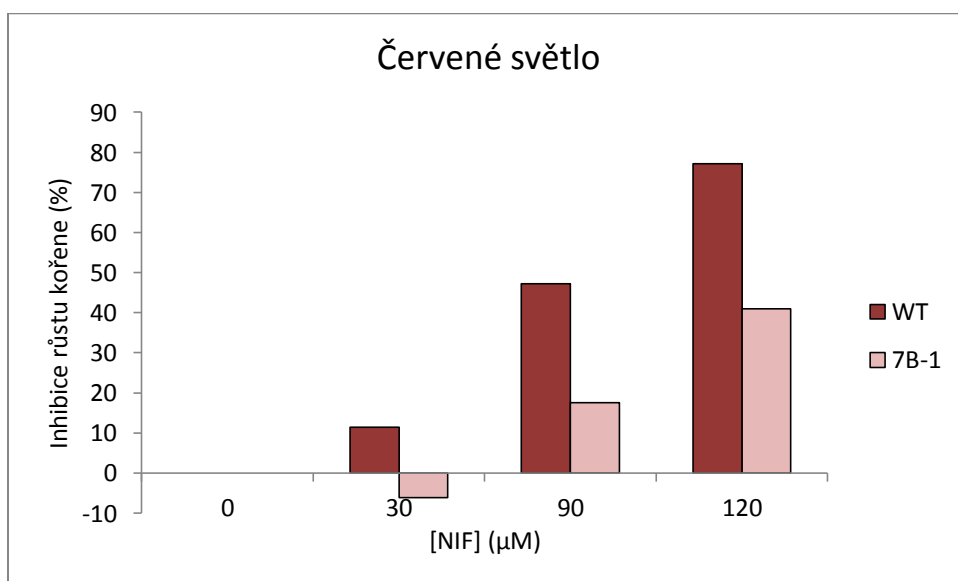


Graf 22: Inhibice růstu etiolovaných kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta 7B-1 po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

Na červeném světle byla inhibice růstu kořenů rostlin WT působením NIF podobná jako ve tmě (Graf 24). Při nejvyšší použité koncentraci 120 $\mu\text{mol/l}$ dosahovala inhibice růstu kořene WT asi 77% (Graf 24). Podobně jako ve tmě a na modrém světle, byly kořeny mutanta *7B-1* méně citlivější k inhibičnímu účinku NIF než kořeny WT (Graf 24).



Graf 23: Délky etiolovalých kořenů rostlin *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta *7B-1* rostoucích na vybraných koncentracích-inhibitoru aniontových kanálů NIF. Délky kořenů byly měřeny 7. den po přenosu klíčících semen na MS médium obsahující NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty délky kořene \pm SE vypočítané ze tří nezávislých experimentů.



Graf 24: Inhibice růstu etiolovalých kořenů *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers a mutanta *7B-1* po ovlivnění inhibitorem aniontových kanálů NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty vypočítané ze tří nezávislých experimentů.

5 DISKUZE

V experimentální části jsem se zabýval tím, zda jsou aniontové kanály zapojeny ve fotomorfogenezi, konkrétně v prodlužování hypokotylu a kořene. K experimentům jsem použil farmakologický přístup, který spočíval v aplikaci inhibitorů aniontových kanálů (DIDS a NIF) na klíčící semena rajčete. Dalším úkolem bylo zjistit, zda zatím neznámý produkt genu *7B-1* může být zapojen v regulaci aktivity aniontových kanálů v průběhu prodlužování hypokotylu a kořene rajčete. K tomu jsem využil genetický přístup, který spočíval ve studiu recesivního mutanta rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) *7B-1* s pravděpodobným defektem v signální dráze modrého světla.

Zapojení DIDS-senzitivních kanálů v růstu hypokotylu a kořene

Inhibitor aniontových kanálů byl aplikován v koncentracích 100, 200 a 300 $\mu\text{mol/l}$ a bylo sledováno prodlužování hypokotylu a kořene WT a mutanta *7B-1* ve tmě, na modrém a červeném světle. Inhibitor DIDS inhibuje R-typ aniontových kanálů ve svěracích buňkách průduchů (Marten et al., 1993). Dále je schopen inhibovat S-typ aniontových kanálů u hypokotylů *Arabidopsis thaliana* (Roberts, 2005), naopak na R-typ aniontových kanálů u hypokotylů *Arabidopsis thaliana* není účinný (Thomine et al., 1997). DIDS slouží především k inhibici S-typu DIDS-senzitivních kanálů u hypokotylu a kořenů. Při experimentu ve tmě bylo pozorováno, že koncentrace 200 a 300 $\mu\text{mol/l}$ stimulovaly prodlužování hypokotylu u obou genotypů, přičemž stimulace hypokotylu mutanta *7B-1* byla výrazně nižší než u WT. Z toho vyplývá, že (1) DIDS-senzitivní kanály nebyly zapojeny do prodlužování hypokotylu, protože nedošlo k jeho inhibici. Tím pádem růst hypokotylu ovlivňovaly jiné kanály, které nemohly být inhibovány inhibitorem DIDS. U *7B-1* ale nedošlo k tak výrazné stimulaci růstu, (2) důvodem je mutace genu *7B-1*, která způsobuje snížený růst hypokotylu rostliny (Fellner et al., 2001).

Na rozdíl od stimulačního vlivu DIDS na růst etiolovaných hypokotylů, na modrém a červeném světle nebyl pozorován výrazný inhibiční nebo stimulační účinek DIDS na prodlužování hypokotylu. Působení modrého světla na S-typ kanálů způsobilo inhibici aktivity kanálů. Ovlivněním DIDS, při vyšších koncentracích, došlo k menší inhibici růstu hypokotylů u obou genotypů. Mohlo, proto dojít buď ke snížení počtu kanálů nebo ke změně citlivosti na inhibitor DIDS. Jak už bylo zmíněno (1) působením modrého světla došlo k inhibici aktivity kanálů (2) a *7B-1* má schopnost rezistence vůči stresům při působení modrého světla. Působením červeného světla došlo, stejně jako u modrého světla, buď ke snížení počtu aniontových kanálů nebo ke změně citlivosti na inhibitor DIDS, kdy k výraznější inhibici došlo jen u nejvyšší koncentrace inhibitoru a

kanály tak mohly být citlivější na DIDS. Růst hypokotylů ale nebyl nějakým výrazným způsobem ovlivněn, protože DIDS-senzitivní kanály nebyly za tmy zapojeny v inhibici růstu hypokotylu. Působením modrého a červeného světla způsobilo zapojení DIDS-senzitivních kanálů v prodlužování hypokotylu, ale přidáním inhibitoru DIDS došlo k jejich inhibici na rozdíl od tmy.

Jak bylo zmíněno výše DIDS inhibuje u kořene především S-tyt aniontových kanálů, než R-tyt aniontových kanálů. DIDS-senzitivní kanály jsou přítomny v kořenových buňkách *Triticum aestivum* (Skerrett and Tyerman, 1994), u kořenových vlásků *Arabidopsis thaliana* (Dauphin et al., 2001) a v kořenu *Hordeum vulgare* XPCs (Kohler and Raschke, 2000). Při experimentu ve tmě bylo pozorováno, že všechny koncentrace inhibovaly růst kořene u obou genotypů, přičemž inhibice kořene u *7B-1* byla vyšší než u WT. Z toho můžeme odvodit, že (1) DIDS-senzitivní kanály, na rozdíl od hypokotylu, byly zapojeny do růstu kořene, protože došlo k jejich inhibici působením DIDS. U *7B-1* byla inhibice vyšší než u WT, poněvadž (2) mutace genu *7B-1* nezpůsobuje snížení růstu kořene a inhibice probíhá jen vlivem DIDS. Na rozdíl od inhibičního účinku DIDS ve tmě, na modrém světle došlo kromě něj i k nepatrnému stimulačnímu účinku růstu kořene u *7B-1*. Mohlo dojít buď ke změně počtu DIDS-senzitivních kanálů nebo se změnila citlivost k inhibitoru DIDS. (1) Působení modrého světla zřejmě způsobilo sníženou aktivitu DIDS-senzitivních kanálů, protože u *7B-1* došlo ke stimulaci růstu a DIDS tyto kanály neinhiboval. (2) *7B-1* je rezistentní vůči stresům na modrém světle a je tak odolný vůči DIDS, který neinhibuje jeho růst. Na rozdíl od částečného stimulačního vlivu DIDS na modrém světle, tak na červeném světle byl účinek DIDS opět inhibiční, stejně jako ve tmě. Mohlo to způsobit buď snížení počtu aniontových kanálů, nebo se změnila citlivost kanálů k inhibitoru DIDS. Při srovnání všech světelných podmínek bych mohl říct, že za tmy a na červeném světle byly DIDS-senzitivní kanály zapojeny v růstu kořene, protože vlivem inhibitoru DIDS došlo k inhibici růstu. Jen modré světlo způsobilo stimulaci růstu kořene, z důvodu nezapojení DIDS-senzitivních kanálů nedošlo k inhibici jeho prodlužování.

Zapojení NIF-senzitivních kanálů v růstu hypokotylu a kořene

Inhibitor aniontových kanálů byl aplikován v koncentracích 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$ a bylo sledováno prodlužování hypokotylu a kořene WT a mutanta *7B-1* ve tmě, na modrém a červeném světle. NIF se řadí mezi všeobecné inhibitory aniontových kanálů, ale neinhibuje specifický typ kanálu například chloridový (Trebacz et al., 1997; Wendehenne et al., 2002). NIF inhibuje R-tyt a S-tyt aniontových kanálů ve svěřacích buňkách *Vicia faba* L. (Schroeder et al., 1993; Marten et al., 1992; Marten et al., 1993;

Schwartz et al., 1995). Vyšší účinnost inhibice má u R-typu aniontových kanálů ve svěracích buňkách než u S-typu aniontových kanálů, které inhibuje s nižší účinností (White and Broadley, 2001). Inhibuje také R-typ aniontových kanálů v epidermálních buňkách *Arabidopsis thaliana* (Thomine et al., 1995, 1997; Frachisse et al., 1999; Diatloff et al., 2004). Při experimentu ve tmě byl pozorován inhibiční účinek hypokotylu u obou genotypů, přičemž vyšší hodnoty inhibice byly u WT. Při použití vyšších koncentrací inhibitoru 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$ došlo ke zvýšení inhibičního účinku při srovnání s nejnižší koncentrací. Může to vést k závěru, že NIF-senzitivní kanály byly zapojeny v růstu hypokotylu a se zvyšující se koncentrací rostla míra inhibice. Působením modrého světla mohlo dojít ke (1) zvýšení aktivity NIF-senzitivních kanálů. (2) Mutace genu *7B-1* způsobuje resistenci při působení modrého světla, ale i přesto byly NIF-senzitivní kanály inhibovány. Při působení červeným světlem došlo opět k inhibičnímu účinku u obou genotypů. Mohlo to způsobit snížení počtu aniontových kanálů nebo změna citlivosti k inhibitoru NIF. K výrazné změně však nedošlo a inhibice obou genotypů byla téměř na stejné úrovni. Při srovnání všech světelných podmínek bych mohl říct, že došlo k inhibičnímu účinku inhibitoru NIF. Za tmy byly více zapojeny NIF-senzitivní kanály u WT kvůli vyšší inhibici, u modrého světla byly naopak v růstu hypokotylu více zapojeny u *7B-1* a u červeného světla byly úrovně inhibice téměř stejné u obou genotypů.

U kořenů při experimentu ve tmě jsem pozoroval inhibiční účinek u obou genotypů, ale vyšší míra inhibice byla u WT, kromě koncentrace 30 $\mu\text{mol/l}$. Proto usuzuji, že u WT byly více zapojeny v růstu kořene NIF-senzitivní kanály a inhibitor NIF způsobil jejich zablokování. Mohlo tudíž dojít buď ke snížení počtu aniontových kanálů, nebo změně citlivosti k NIF. Na modrém světle nedošlo ke změně úrovně inhibice, opět u WT byla míra inhibice vyšší než u *7B-1*. Modré světlo tak nezpůsobilo ovlivnění aktivity NIF-senzitivních kanálů a výsledky byly srovnatelné s tmou. Stejně výsledky byly na červeném světle, kdy opět WT měl vyšší úroveň inhibice než *7B-1* a ani tentokrát světlo neovlivnilo aktivitu NIF-senzitivních kanálů. Jen u koncentrace 30 $\mu\text{mol/l}$ došlo u *7B-1* ke slabému stimulačnímu účinku. Pokud porovnáme výsledky inhibice růstu kořene ve všech světelných podmínkách, tak zjistím, že výsledky se nezměnily působením tmy, modrého a červeného světla. Změny světelných podmínek neovlivnily aktivitu aniontových kanálů.

6 ZÁVĚR

Cílem bakalářské práce bylo studium úlohy aniontových kanálů v růstu rostlin *Solanum lycopersicum* L., a to standartní genotyp cv. Rutgers (WT) a mutanta 7B-1. Pro posuzování vlivu aniontových kanálů v růstu rostlin se hodnotil růst kořene a hypokotylu. Růst byl ovlivněn různými světelnými podmínkami (tma, modré a červené světlo) a přidáním inhibitorů aniontových kanálů (DIDS v koncentracích 100, 150 a 200 $\mu\text{mol/l}$ a NIF v koncentracích 30, 90 a 120 $\mu\text{mol/l}$).

Při experimentech bylo zjištěno u obou genotypů, že hypokotyl roste nejvíce ve tmě a nejméně na modrém světle, kdy dochází k inhibici růstu hypokotylu. U 7B-1 jsou ale hodnoty hypokotylu na modrém světle vyšší než u WT, stejně tak jako ve tmě, ale na červeném světle už nebyly téměř žádné rozdíly v délce hypokotylů. Při růstu kořenů nebyly pozorovány žádné výrazné rozdíly mezi genotypy ve všech světelných podmínkách.

Z testovaných inhibitorů aniontových kanálů (DIDS a NIF) byl zjištěn inhibiční efekt u obou použitých inhibitorů, ale účinnější byl inhibitor NIF. Zajímavé je, že nejvyšší účinek inhibice byl u kořene na modrém světle, důvodem může být to, že modré světlo zesiluje inhibiční účinek inhibitoru. Ve tmě a na červeném světle byl inhibiční nižší než na modrém světle, ale vyšší než u inhibitoru DIDS. Byly proto navrženy dvě hypotézy, které by mohly tu reakci vysvětlit: (1) modré světlo může změnit počet NIF-senzitivních kanálů v rostlinách nebo (2) působením modrého světla nedošlo ke zvýšení citlivosti NIF-senzitivních kanálů v rostlině k inhibitoru. Vyšší inhibiční efekt byl pozorovaný u WT, protože 7B-1 je rezistentní vůči stresu na modrém světle, a proto byl jeho inhibiční efekt nižší.

7 POUŽITÁ LITERATURA

- Accardi A, Miller C.** 2004. Secondary active transport mediated by a prokaryotic homologue of CIC Cl⁻ channels. *Nature* **427**, 803-807.
- Allen GJ, Sanders D.** 1997. Vacuolar ion channels in higher plants. *Advances in Botanical Research*. **25**, 217-252.
- Assmann SM.** 1993. Signal transduction in guard cells. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**, 345-375.
- Banerjee R, Batschauer A.** 2005. Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498-502.
- Barbier-Brygoo H, De Angeli A, Filleur S, Frachisse JM, Gambale F, Thomine S, Wege S.** 2011. Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu. Rev. Plant Biol.* **62**, 25–51.
- Bertrand CA, Danahay H, Poll CT, Laboisse C, Hopfer U, Bridges RJ.** 2004. Niflumic acid inhibits ATP-stimulated exocytosis in a mucin-secreting epithelial cell line. *Am J Physiol Cell Physiol* **286**, C274-255.
- Boerjan W, Cervera M-T, Delarue M, Beeckman T, Dewitte W, Bellini C, Caboche M, Van Onckelen H, Van Montagu M, Inzé D.** 1995. *superroot*, a recessive mutation in Arabidopsis, confers auxin overproduction. *Plant Cell* **7**, 1405–1419.
- Brearley J, Venis MA, Blatt MR.** 1997. The effect of elevated CO₂ concentrations on K⁺ and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta* **203**, 145-154.
- Briggs and Margaret A. Olney.** 2001. Plant Physiology January 1, vol. **125**, 1, 85-88.
- Brzeska P.** 2006. Růst rostlin a faktory růstu. Časopis Trifid 1999/3, 4
- Cary AJ, Liu WN, Howell SH.** 1995. Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiol.* **107**, 1075-1082.
- Clausen C, Ilkavets I, Thomson R, Philippar K, Vojta A, Mohlmann T, Neuhaus E, Fulgosi H, Soll J.** 2004. Intracellular localization of VDAC proteins in plants. *Planta* **220**, 30–37.
- Cleland RE.** 1995. Auxin and cell elongation. In PJ Davies, ed, Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands, 214-227.
- Clouse SD.** 1996. Molecular genetics studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *Plant J* **10**, 1-8.
- Dangl JL, Preuss D, Schroeder JI.** 1995. Talking through walls – signaling in plant development. *Cell* **83**, 1071-1077.
- Dauphin A, El-Maarouf H, Vienney N, Rona JP, Bouteau F.** 2001. Effect of desiccation on potassium and anion currents from young root hairs: implication on tip growth. *Physiologia Plantarum* **113**, 79-84.

- De Angeli A, Monachello D, Ephritikhine G, Frachisse JM, Thomine S, et al.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939-942.
- Devlin PF, Christie JM, Terry MJ.** 2007. Many hands make light work. *J. Exp. Bot.* **58**, 3071-3077.
- Diatloff E, Roberts M, Sanders D, Roberts SK.** 2004. Characterization of anion channels in the plasma membrane of *Arabidopsis* epidermal root cells and the identification of a citrate-permeable channel induced by phosphate starvation. *Plant Physiology* **136**, 4136-4149.
- Ecker JR.** 1995. The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science* **268**, 667-675.
- Elich TD, Chory J.** 1994. Initial events in phytochrome signalling: still in the dark. *Plant Mol Biol* **26**, 1315-1327.
- Elzenga JTM, Van Volkenburgh E.** 1997. Characterization of a light-controlled anion channel in the plasma membrane of mesophyll cells of pea. *Plant Physiology* **113**, 1419-1426.
- Fellner M, Sawhney VK.** 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 RC, Pharis RP, Sawhney VK.** 2001. Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *J. Exp. Bot.* **52**, 725-738.
- Frachisse JM, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H.** 2000. Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **21**, 361-371.
- Frachisse JM, Thomine S, Colcombet J, Guern J, Barbier-Brygoo H.** 1999. Sulfate is both a substrate and an activator of the voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyl cells. *Plant Physiology* **121**, 253-262.
- Franklin KA, Larner JS, Whitelam GC.** 2005. The signal transducing photoreceptors of plants. *Int. J. Dev. Biol.* **49**, 653-664.
- Fuks B, Homble F.** 1999. Passive anion transport through the chloroplast inner envelope membrane measured by osmotic swelling of intact chloroplasts. *Biochimica et Biophysica Acta Biomembranea* **1416**, 361-369.
- Ghelis T, Dellis O, Jeannette E, Bardat F, Cornel D, Miginiac E, Rona J-P, Sotta B.** 2000. Abscisic acid specific expression of RAB18 involves activation of anion channels in *Arabidopsis thaliana* suspension cells. *FEBS Lett* **474**, 43-47.
- Greger R.** 1990. Chloride channel blockers. *Methods Enzymol* **191**, 793-809.
- Greiger D, Scherzer S, Mumm P, Marten I, Ache P, et al.** 2010. Guard cell anion channel SLAC1 is regulated by CDPK protein kinases with distinct Ca²⁺ affinities. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **107**, 8023-8028.

- Greiger D, Scherzer S, Mumm P, Stange A, Marten I, et al.** 2009. Activity of guard cell anion channel SLAC1 is controlled by drought-stress signaling kinase-phosphatase pair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 21425-21430.
- Hedrich R, Busch H, Raschke K.** 1990. Calcium ion and nucleotide dependent regulation of voltage dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *EMBO J.* **9**, 3889-3892.
- Hedrich R, Marten I.** 1993. Malate-induced feedback regulation of plasma membrane anion channels could provide a CO₂ sensor to guard cells. *EMBO J.* **12**, 897-901.
- Hechenberger M, Schwappach B, Fischer WN, Frommer WB, Jentsch TJ, Steinmeyer K.** 1996. A family of putative chloride channels from *Arabidopsis* and functional complementation of a yeast strain with a CLC gene disruption. *J Biol Chem* **271**, 33632–33638
- Cho MH, Spalding EP.** 1996. An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**, 8134-8138.
- Chory J, Reinecke D, Sim S, Washburn T, Brenner M.** 1994. A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **104**, 339-347.
- Churchill KA, Holaway B, Sze H.** 1983. Separation of two types of electrogenic H⁺-pumping ATPases from oat roots. *Plant Physiol* **73**, 921-928.
- Churchill KA, Sze H.** 1983. Anion-sensitive, H⁺-pumping ATPase in membrane vesicles from oat roots. *Plant Physiol* **71**, 610-617.
- Churchill KA.** 1983. Electrogenic, proton-translocating ATPases in membrane vesicles from oat roots. PhD dissertation. University of Kansas, Lawrence.
- Jentsch TJ, Steinmeyer K, Schwarz G.** 1990. Primary structure of *Torpedo marmorata* chloride channel isolated by expression cloning in *Xenopus* oocytes. *Nature* **348**, 510-514.
- Jentsch TJ.** 2008. CLC chloride channels and transporters: from genes to protein structure, pathology and physiology. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* **43**, 3-36.
- Jones RS, Mitchell CA.** 1989. Calcium ion involvement in growth inhibition of mechanically stressed soybean (*Glycine max*) seedlings. *Physiol Plant* **76**, 598–602.
- Keller BU, Hedrich R, Raschke K.** 1989. Voltage-dependent anion channels in the plasma membrane of guard cells. *Nature* **341**, 450-453.
- Kim SY, Sivaguru M, Stacey G.** 2006. Extracellular ATP in plants, visualization, localization, and analysis of physiological significance in growth and signaling. *Plant Physiol* **142**, 984-992.
- Kim TH, Bohmer M, Hu H, Nishimura N, Schroeder JI.** 2010. Guard cell signal transduction network: advances in understanding abscisic acid, CO₂, and Ca²⁺ signaling. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 561-591.

- King JJ, Stimart DP, Fisher RH, Bleecker AB.** 1995. A mutation altering auxin homeostasis and plant morphology in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **7**, 2023-2037.
- Kohler B, Raschke K.** 2000. The delivery of salts to the xylem: three types of anion conductance in the plasmalemma of the xylem parenchyma of roots of barley. *Plant Physiol.* **122**, 243-254.
- Lin C.** 2002. Blue light receptors and signal transduction. *The Plant Cell* **14**, S207-S225.
- Linder B, Raschke K.** 1992. A slow anion channel in guard cells, activating at large hyperpolarization, may be principal for stomatal closing. *FEBS Lett.* **313**, 27-30.
- Lopez-Bucio J, de La Vega OM, Guevara-Garcia A, Herrera-Estrella L.** 2000. Enhanced phosphorus uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnology* **18**, 450-453.
- Lurin C, Guclu J, Cheniclet C, Carde JP, Barbier-Brygoo H, Maurel C.** 2000. CLC-Nt1, a putative chloride channel protein of tobacco, co-localizes with mitochondrial membrane markers. *Biochemical Journal* **348**, 291-295.
- Marten H, Hedrich R, Roelfsema MRG.** 2007. Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *Plant J.* **50**, 29–39.
- Marten I, Busch H, Raschke K, Hedrich R.** 1993. Modulation and block of the plasma membrane anion channel of guard cells by stilbene derivatives. *Eur. Biophys. J. Biophys. Lett.* **21**, 403-408.
- Marten I, Lohse G, Hedrich R.** 1991. Plant growth hormones control voltage-dependent activity of anion channels in plasma membrane of guard cells. *Nature* **353**, 758-762.
- Marten I, Zeilinger C, Redhead C, Landry DW, Al-Awqati Q, Hedrich R.** 1992. Identification and modulation of a voltage-dependent anion channel in the plasma membrane of guard cells by high-affinity ligands. *EMBO J*, **11**, 3569–3575.
- Mas P, Devlin PF, Panda S, Kay SA.** 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**, 207-211.
- Matulef K, Howery AE, Tan L, Kobertz WR, Du Bois J, Maduke M.** 2008. Discovery of potent CLC chloride channel inhibitors *ACS Chem. Biol.* **3**, 419-428.
- Meyer S, Mumm P, Imes D, Endler A, Weder B, Al-Rasheid KA, Geiger D, Marten I, Martinoia E, Hedrich R.** 2010. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Journal* **63**, 1054–1062.
- Negi J, Matsuda O, Nagasawa T, Oba Y, Takahashi H, et al.** 2008. CO₂ regulator SLAC1 and its homologues are essential for anion homeostasis in plant cells. *Nature* **452**, 483-486.

- Piterková J, Luhová L, Hofman J, Turečková V, Novák O, Petřivalský M, Fellner M.** 2012. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. *Annals of Botany*. **110**, 767-776.
- Plant PJ, Gelli A, Blumwald E.** 1994. Vacuolar chloride regulation of an anion-selective tonoplast channel *J. Membr. Biol.* **140**, 1-12.
- Quail PH.** 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Curr. Opin. Cell Biol.* **14**, 180–188.
- Raschke K, Shabahang M, Wolf R.** 2003. The slow and the quick anion conductance in whole guard cells: their voltage-dependent alternation, and the modulation of their activities by abscisic acid and CO₂. *Planta* **217**, 639-650.
- Roberts SK.** 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytol.*, **169**, 647–666.
- Roelfsema MRG, Hanstein S, Felle HH, Hedrich R.** 2002. CO₂ provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *Plant J.* **32**, 65-75.
- Roelfsema MRG, Levchenko V, Hedrich R.** 2004. ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. *Plant J.* **37**, 578-588.
- Sasaki T, Yamamoto Y, Ezaki B, Katsuhara M, Ahn SJ, et al.** 2004. A wheat gene encoding an aluminum-activated malate transporter. *Plant J.* **37**, 645-653.
- Schmidt C, Schelle I, Liao YJ, Schroeder JI.** 1995. Strong regulation of slow anion channels and abscisic acid signaling in guard cells by phosphorylation and dephosphorylation events. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**, 9535–9539.
- Schroeder JI, Hagiwara S.** 1989. Cytosolic calcium regulates ion channels in the plasma membrane of *Vicia faba* guard cells. *Nature* **338**, 427-430.
- Schroeder JI, Hedrich R.** 1989. Involvement of ion channels and active transport in osmoregulation and signaling of higher plant cells. *Trends Biochem Sci* **14**, 187-192.
- Schroeder JI, Keller BU.** 1992. Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89**, 5025-5029.
- Schroeder JI, Schmidt C, Scheaffer J.** 1993. Identification of high-affinity slow anion channel blockers and evidence for stomatal regulation by slow anion channels in guard cells. *Plant Cell* **5**, 1831–1841.
- Schroeder JI.** 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**, 353-361.
- Schwartz A, Ilan N, Schwarz M, Scheaffer J, Assmann SM, Schroeder JI.** 1995. Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiol.* **109**, 651–658.

- Skerrett M, Tyerman SD.** 1994. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* **192**, 295-305.
- Spalding EP.** 2000. Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell and Environment* **23**, 665-674.
- Sze H.** 1982. Characterization of nigericin-stimulated ATPase from sealed microsomal vesicles of tobacco callus. *Plant Physiol* **70**, 498-505.
- Tavares B, Domingos P, Dias PN, Feijó JA, Bicho A.** 2011. The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *J. Exp. Bot.* **62**, 2273–2298.
- Teardo E, Frare E, Segalla A, De Marco V, Giacometti GM, Szabo I.** 2005. Localization of a putative ClC chloride channel in spinach chloroplasts. *FEBS Lett.* **579**, 4991-4996.
- Thomine S, Guern J, Barbier-Brygoo H.** 1997. Voltage-dependent anion channel of *Arabidopsis* hypocotyls: nucleotide regulation and pharmacological properties. *Journal of Membrane Biology* **159**, 71-82.
- Thomine S, Lelievre F, Boufflet M, Guern J, Barbier-Brygoo H.** 1997. Anion-Channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-Grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiol.* **115**, 533-542.
- Thomine S, Zimmermann S, Guern J, Barbier-Brygoo H.** 1995. ATP-dependent regulation of an anion channel at the plasma membrane of protoplasts from epidermal cells of *Arabidopsis* hypocotyls. *The Plant Cell* **7**, 2091-2100.
- Trebacz K, Simonis W, Schonknecht G.** 1997. Effects of anion channel inhibitors on light-induced potential changes in the liverwort *Conocephalum conicum*. *Plant Cell Physiol* **38**, 550-557.
- Vahisalu T, Kollist H, Wang YF, Nishimura N, Chan WY, et al.** 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**, 487-491.
- Vahisalu T, Puzorjova I, Brosche M, Valk E, Lepiku M, et al.** 2010. Ozone-triggered rapid stomatal response involves the production of reactive oxygen species, and is controlled by SLAC1 and OST1. *Plant Journal.* **62**, 442-453.
- Von der Fecht-Bartenbach J, Bogner M, Krebs M, Stierhof YD, Schumacher K, Ludewig U.** 2007. Function of the anion transporter AtCLC-d in the *trans*-Golgi network. *Plant J.* **50**, 466-474.
- Ward JM, Pei Z-M, Schroeder JI.** 1995. Roles of ion channels in initiation of signal transduction in higher plants. *Plant cell* **7**, 833-844.
- Wendehenne D, Lamote O, Frachisse J, Barbier-Brygoo H, Pugin A.** 2002. Nitrate efflux is an essential component of the cryptogein signaling pathway leading to defense responses and hypersensitive cell death in tobacco. *Plant Cell* **14**, 937-951.

White PJ, Broadley MR. 2001. Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany* **88**, 967-988.

Yang H-Q, Tang R-H, Cashmore AR. 2001. The Signaling Mechanism of Arabidopsis CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *Plant Cell* **13**, 2573-2587.