



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Fytochromy a jejich role v regulaci aquaporinů v  
průběhu klíčení semen**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Eliška Hlaváčová
Studijní program:	B1406 - Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok:	2019

## **Prohlášení**

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

V Olomouci dne .....

## **Poděkování**

Mé poděkování patří vedoucímu práce prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, trpělivost a ochotu, kterou mi v průběhu bakalářské práce poskytoval.

Také chci poděkovat členům skupiny Molekulární fyziologie za cenné rady a pomoc.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eliška Hlaváčová
Název práce	Fytochromy a jejich role v regulaci aquaporinů v průběhu klíčení semen
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D
Rok obhajoby práce	2019

### Abstrakt

Předložená bakalářská práce pojednává o studiu citlivosti klíčení semen fotomorfogenních mutantů *Solanum lycopersicum* L. k inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> v závislosti na světelných podmínkách v *in vitro* prostředí. Zkoumanými rostlinami byli recesivní mutanti rajčete s defekty ve fotoreceptorech. Konkrétně se jednalo o mutanty deficientní ve phyA nebo phyB1, či o mutanta, který vykazuje zesílené fytochromové reakce a zesílený fototropismus. Cílem práce bylo zjistit, jestli jsou akvaporiny zapojeny v klíčení semen rajčete, zda světlo může regulovat aktivitu akvaporinů během klíčení semen a pokud ano, zda se tak může dít prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů. Byly použity dvě strategie – farmakologický a genetický přístup. Výsledky experimentů ukázaly, že akvaporiny jsou zapojeny do procesu klíčení semen, a to jak ve tmě, tak při působení modrého i červeného světla. Dále se zjistilo, že působení světla zvyšuje citlivost semen k inhibitoru a že je tato citlivost zprostředkována PhyA, PhyB a proteinem DDB1.

Klíčová slova	klíčení, fytochrom, akvaporin, HgCl <sub>2</sub> , světlo
Počet stran	42
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eliška Hlaváčová
Title	Phytochromes and their role in regulation of aquaporins during seed germination
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D
The year of presentation	2019

### Abstract

The submitted bachelor thesis is focused on the study of sensitivity seed germination in photomorphogenic mutants of *Solanum lycopersicum* L. to an inhibitor of aquaporines HgCl<sub>2</sub> and depending on the light conditions in conditions *in vitro*. Examined plants were recessive mutants of tomato with defects in phytochromes. Mutants with deficient phyA or phyB were used, or mutant with reinforced phytochrome responses and attenuated phototropism was used. The aim of the thesis was find out whether aquaporins are involved in seed germination, whether light could regulate the activity of aquaporins during process of seed germination and if so, whether it could happen through photoreceptors phytochromes. Two strategies – pharmacological and genetic approach were used in the bachelor thesis. The results of experiments showed that the aquaporins are involved in the process of seed germination in the dark, in blue and red light. Furthermore, it was found that the effect of light increases sensitivity of seeds to HgCl<sub>2</sub> and that the sensitivity to the inhibitor is mediated by phytochromes PhyA, PhyB1 and by the protein DDB1.

Keywords	germination, phytochrome, aquaporin, HgCl <sub>2</sub> , light
Number of pages	42
Language	Czech

# Obsah

<b>Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>Klíčení semen</b> .....	<b>7</b>
Faktory ovlivňující klíčení .....	7
Voda.....	8
Teplota .....	8
Kyslík.....	8
Světlo.....	8
<b>Fotoreceptory</b> .....	<b>10</b>
Fytochromy .....	11
Fytochrom A .....	12
Fytochrom B.....	13
Receptory modrého světla .....	13
Kryptochromy .....	13
Fototropiny .....	14
<b>Akvaporiny</b> .....	<b>15</b>
Struktura .....	16
Rozdělení.....	17
Regulace.....	18
Mechanismus inhibice aktivity akvaporinu vlivem HgCl <sub>2</sub> .....	19
<b>Materiál a metody</b> .....	<b>21</b>
Rostlinný materiál.....	21
Pracovní postupy.....	21
Příprava kultivačního média .....	21
Koncentrace HgCl <sub>2</sub> v MS médiu.....	22
Sterilní výsev semen.....	22
Vyhodnocování klíčivosti semen .....	23
<b>Výsledky</b> .....	<b>24</b>
Působení světelných podmínek a HgCl <sub>2</sub> na klíčení semen mutanta tri1.....	24
Působení světelných podmínek a HgCl <sub>2</sub> na klíčení semen mutanta fri1.....	27
Působení světelných podmínek a HgCl <sub>2</sub> na klíčení semen mutanta hp.....	31
<b>Diskuze</b> .....	<b>34</b>
<b>Závěr</b> .....	<b>37</b>
<b>Seznam zkratk</b> .....	<b>38</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>39</b>

## Úvod

Existence rostlin je již od počátku lidstva alfou a omegou života. Lidé a živočichové jsou závislí na rostlinách, které pro ně představují jak potravu, tak i nástroj, díky němuž rostliny přeměňují sluneční energii na organickou hmotu a kyslík. Jejich nenahraditelný význam je ve schopnosti regulovaně zadržovat a uvolňovat vodu.

Regulovaný rozvod vody a jiných malých molekul je uskutečněn velmi specifickými membránovými proteiny, které vytvářejí kanál v cytoplazmatické membráně nebo v membráně vakuoly. Tyto membránové proteiny dostaly název akvaporiny a řadu let jsou středem zájmu mnoha vědců.

Klíčení je naprosto zásadní fází životního cyklu rostliny, jelikož ovlivňuje její další vývoj. Světlo a voda jsou stěžejními faktory, které regulují klíčení rostlin. Rostliny vnímají intenzitu, kvalitu a směr záření pomocí fotoreceptorů. Ty jsou rozděleny na základě toho, jakou část světelného spektra registrují. V předložené práci je pozornost soustředěna na fytochromy, což jsou fotoreceptory registrující červené a dalece červené světlo.

Cílem této práce je zjistit, zda světlo reguluje aktivitu akvaporinů během klíčení semen rajčete, a pokud ano, zda se tak děje prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů. Pro dosažení cíle byly zvoleny dvě strategie. První z nich je farmakologický přístup, kdy byl použit inhibitor akvaporinů  $HgCl_2$  a druhým je genetický přístup, ve kterém byly použity mutanti rajčete s defekty ve fytochomech. Konkrétně se jednalo o mutanty s deficiencí buď ve fytochromu A, fytochromu B1, anebo o mutanta vykazující zvýšenou citlivost ve fytochomech a zvýšený fototropismus.

Experimenty praktické části bakalářské práce byly provedeny na pracovišti Laboratoř růstových regulátorů PřF UP a AVČR ve skupině Molekulární fyziologie pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.



## Klíčení semen

Klíčením se označuje děj, při kterém se během různých procesů přeměňuje semeno rostliny. Jedná se o jednu z nejpodstatnějších fází vývoje rostliny, kdy se obnovuje metabolická aktivita semene. Potom, co semeno dozraje a naroste, přechází ze stavu aktivního do latentního. Při tomto ději semena přichází o vodu a téměř neprobíhá látková výměna. Důvodem je schopnost semen přežít dlouhodobě nepříznivé podmínky pro klíčení, které mohou trvat i několik let. Maximální doba klíčivosti semen se liší druh od druhu, například semeno rajčete je schopno přežít až 8 let (Procházka *et al.*, 1998).

Klíčení začíná v momentě, kdy semeno přijme vodu a začne bobtnat. Tento proces je nazýván imbibice a probíhá jak u živých, tak i u mrtvých semen. Příjem vody je rozdělen do tří etap. V první etapě se postupně výrazně zvyšuje obsah vody, což může mít za následek přeměny struktury buněčných membrán. Druhou etapou je stabilizace, někdy nazývána jako plató etapa. Třetí etapa nastává při konci klíčení, kdy je opět zvýšen příjem vody a prodlužuje se embryonální osa rostliny (Bewley, 1997). Během klíčení startuje enzymatická aktivita, dochází ke štěpení bílkovin na aminokyseliny a škrobu na jednoduché cukry.

Při klíčení hrají důležitou roli jak endogenní, tak exogenní faktory. K endogenním faktorům se řadí účinek fytohormonů, největší vliv má kyselina abscisová, brasinosteroidy a gibereliny. Dalším důležitým, ne však nezbytným exogenním faktorem lze označit světlo (viz následující kapitola).

U dvouděložných rostlin je pozorováno klíčení dvojího typu. Může být buď nadzemní (epigeické), kdy hypokotyl vyrůstá nad povrchem půdy a vynáší tak dělohy nad zem, nebo podzemní (hypogeické), u kterého dělohy zůstávají pod půdou. Jednoděložné rostliny klíčí jednou dělohou, druhá zakrněla (Freeman, 2005).

Jako vyklíčené semeno je označováno takové, u kterého radikula již prorazila testu v místě nazývaném mikropyle. Tomuto klíčení se říká viditelné.

## Faktory ovlivňující klíčení

Klíčení semen nezávisí jen na samotné predispozici semene ke klíčení, ale je ovlivněno řadou fyzikálních a chemických podmínek. Pokud je tento komplex podmínek vhodný, semena začnou klíčit. Je nastartována aktivita fytohormonů, konkrétně auxinů a giberelinů, díky kterým je klíček schopen růstu. Každý druh rostliny vyžaduje pro klíčení a samotný růst jiný komplex podmínek (Lack & Evans, 2005). Obecně lze však říct, že

faktory, které ovlivňují klíčení, a které jsou pro klíčení nepostradatelné, jsou voda, teplota, kyslík, specificky pak světlo.

### **Voda**

Voda hraje v životě rostliny zásadní roli. Je nepostradatelná ještě před klíčením semene a je obsažena ve všech buňkách. Suchá semena s obsahem vody okolo 12 % po nasátí bobtnají a je tím zahájeno klíčení. Nejenom, že voda zahajuje klíčení semene, také jej urychluje. Díky ní se vyplavují látky způsobující inhibici klíčení a urychlují se biochemické procesy. Nejvyšší obsah vody, okolo 60 %, je u embryí rostlin.

### **Teplota**

Počátek klíčení je ovlivněn nejdůležitějším abiotickým faktorem, kterým je teplota (Fenner & Thomson, 2005). Rozmezí teploty, při kterém většina semen rostlin nejlépe klíčí, se nazývá teplotní optimum a pohybuje od 15 °C do 30 °C. Teplotní minimum je nejnižší možná teplota, při které jsou rostliny schopné klíčit, a teplotní maximum je nejvyšší možná teplota. Teplotní optimum pro klíčení se liší od teplotního optima pro růst a zpravidla bývá tato teplota nižší.

### **Kyslík**

Dalším faktorem ovlivňujícím klíčení je kyslík. Kyslík je důležitý pro dýchání semene, při příjmu vody a při startu klíčení je potřeba dodat semenu energii ve formě ATP, kterou kyslík přináší. Pozastavení klíčení může nastat v případě, kdy dojde k nahromadění oxidu uhličitého. Pokud nárůst překročí pomyslnou hranici, semena mohou uhynout (Jablonský, 2005). Výjimku tvoří rostliny klíčící na bažinném podloží, například rýže, které kyslík nepotřebují. Nutnou energii získávají z glykolýzy.

### **Světlo**

Světlo, oproti předchozím faktorům, není vždy nutnou podmínkou pro klíčení. Rostliny se v závislosti na světelnou reakci dělí do dvou skupin. První tvoří rostliny pozitivně fotoblastické, tedy takové, u nichž světlo klíčení stimuluje. Semena reagující na světlo vnímají jeho vlnovou délku, dobu trvání nebo například intenzitu (Georghiou & Kendrick, 1991). Druhá skupina obsahuje rostliny negativně fotoblastické. Jsou to

rostliny, které reagují záporně na světlo a je jím inhibováno klíčení (Procházka *et al.*, 1998).

Klíčení semen je ovlivněno především modrým a červeným zářením. Tato záření jsou zachycována specifickými čidly – fotoreceptory.

## Fotoreceptory

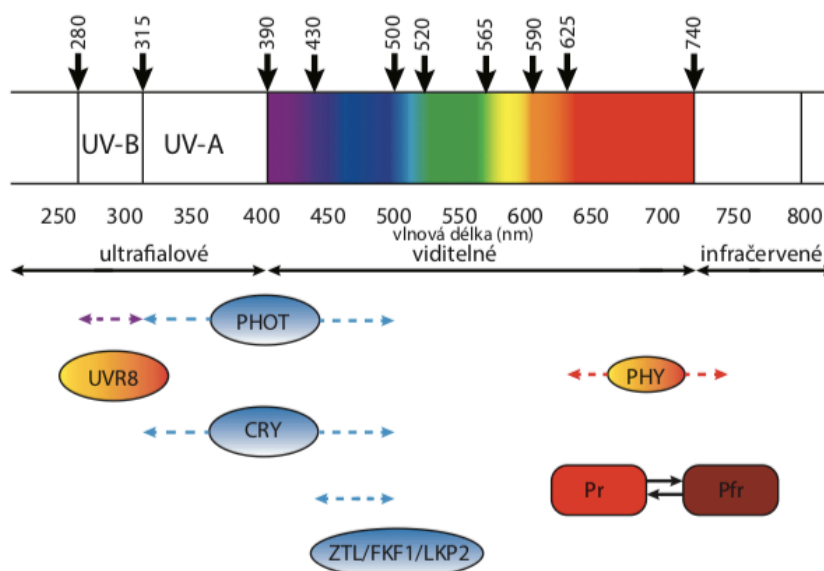
Pokud je rostlina vystavena působení světla, probíhá aktivace exprese specifických genů. Aktivace exprese a změny v expresi způsobí začátek fotomorfogeneze (Taiz & Zeiger, 2010). Fotomorfogeneze začíná již při minimálním působení světla, neboť etiolovaná rostlina je vůči světlu velmi citlivá. Záleží především na kvalitě a kvantitě, délce a směru záření. Fotomorfogeneze je proces, při kterém světlo jako signál změni vývoj rostliny tak, aby mohla pro svůj další růst využít světlo jako energii. Během fotomorfogeneze dochází ke zpomalení růstu hypokotylu, tvorbě chlorofylu (rostlina zelená), aktivita apikálního meristému je nastartována a začínají se vyvíjet první zelené lístky. Fotomorfogeneze je tedy souhrn procesů, při kterých rostlina získává díky světlu svou vnější morfologickou strukturu i vnitřní anatomickou strukturu. Dokáže díky ní regulovat pohyb organel a orgánů, také ontogenetický vývoj a vlastní metabolismus.

Mezi další procesy růstu a vývoje rostliny, které jsou regulované světlem, se řadí vyhnutí se stínu, pohyb chloroplastů, otevírání průduchů, cirkadiánní rytmus, nebo například fototropismus (Montgomery & Lagarias, 2002).

Růst rostliny může také probíhat bez přítomnosti světla, ve tmě. Proces růstu těchto rostlin se nazývá skotomorfogeneze (Daněk & Pavlová, 2002). Můžeme ji typicky pozorovat u klíčících rostlin či u rostlin, které nemají žádný zdroj světla. Tyto etiolované rostliny jsou velmi bledé kvůli menšímu obsahu rostlinných barviv, především chlorofylu, mají křehký delší stonek a aktivita apikálního meristému je zde potlačena (Taiz & Zeiger, 2015).

Signály vyvolané světlem (jeho kvalita, intenzita a směr) vnímá rostlina s pomocí fotoreceptorů. Rostlinné fotoreceptory jsou molekuly citlivé na světlo, jež po absorpci světelné energie tuto energii nijak nemění ani nepředávají, zato mění svoji konformaci a strukturu. Získané signály zpracují a informují rostlinu o vnějším prostředí. Na základě schopnosti vnímat světlo o určité vlnové délce jsou fotoreceptory rozděleny do tří skupin (Obr. 1) – fytochromy absorbující červené záření RL (640-700 nm), dlouhovlnné červené záření FR (700-740 nm) i část modrého spektra, kryptochromy a nedávno objevené ZTL/FKF1/LKP2 proteiny absorbující UV-A a modré záření BL (425-490 nm) a fototropiny reagující na modré záření BL (Zoltowski & Imaizumi, 2014; Takemiya *et al.*, 2005; Russel *et al.*, 2013). Poměrně nedávno byl také popsán receptor absorbující UV-B záření s názvem UVR8, jež je stále předmětem bádání (Carvalho, 2011). Mechanismus účinku kryptochromu je post-translační, jelikož narušuje degradaci transkripčního aktivátoru. K degradaci dochází v proteasomu, který je přímo navázán na E3 ubiquitin

ligázu. Množství transkripčního aktivátoru je tím pádem vyšší, a proto je pozorována i vyšší exprese cílového genu. Naopak účinek fytochromů byl pozorován již při transkripci. Díky vazbě fytochromů na transkripční regulátor jsou signály světla směřovány přímo na fotorezponzivní promotory (Quail, 2002)



Obr. 1 Rostlinné fotoreceptory zachycující světelné záření. UVR8 – receptor pro UV-B záření, PHOT – fototropiny, CRY – kryptochromy, ZTL/FKF1/LKP2 proteiny pro modré světlo a UV-A, PHY – fytochromy pro červené světlo. Převzato od Albrechtová *et al.*, 2017.

## Fytochromy

První objevené fotoreceptory, které detekují červené a dlouhovlnné červené záření jsou fytochromy. Patří mezi regulátory klíčení semen při působení světla (Shinomura *et al.*, 1994). Z chemického hlediska se řadí mezi proteiny. Fytochromy jsou poměrně velké homodimery obsahující polypeptidový řetězec apoprotein o velikosti asi 120 kDa a na něj navázaný chromofor (Parks, 2003). Jedná se o lineární tetrapyrrol (fytochromobilin), který je ve všech fytochomech stejný (Franklin & Quail, 2009). Tato část fytochromu je zodpovědná za zachycení světla a podléhá pak izomerizaci.

Buňka rostliny obsahuje dvě stabilní formy fytochromů, které jsou vzájemně reverzibilní. Konformace se mění po absorpci světelného záření určité vlnové délky. Konformace  $P_r$ , která je biologicky neaktivní, se mění po absorpci RL na konformaci  $P_{fr}$ , která biologicky aktivní je. Rozdílnost konformace fytochromů je dána jejich životností, která je u formy  $P_r$  asi týden a u formy  $P_{fr}$  okolo hodiny a půl (Chen & Chory, 2011). Forma  $P_{fr}$  je znovu přeměněna na formu  $P_r$  po ozáření infračerveným světlem. Proces změny formy  $P_r$  na formu  $P_{fr}$  se nazývá fototransformace. Jedná se o velmi rychlý souběh

signálních kaskádovitých biochemických reakcí, které dohromady trvají pouhou 1 ps. Opačný děj, tedy přeměna formy  $P_{fr}$  na formu  $P_r$ , se nazývá fotokonverze, na jejímž konci je forma  $P_r$  znovu schopna absorbovat foton červeného záření. Při přeměně nastává odbourávání  $P_{fr}$  a jeho úbytek je nahrazen syntézou fytochromu *de novo* ve formě  $P_r$ . Inaktivní forma je stálá, zatímco aktivní forma se v důsledku nedostatku světla rychle mění zpět na formu inaktivní. Tento proces je nazýván jako temnostní reverze.

U vyšších rostlin můžeme nalézt více než jeden druh fytochromu. Fytochromy se od sebe navzájem liší složením apoproteinu. U *Solanum lycopersicum* L. bylo charakterizováno pět genů: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* kódujících stejnojmenné apoproteiny a vytvářející fytochromy phyA, phyB1, phyB2, phyE a phyF (Hauser *et al.* 1995; Pratt *et al.* 1997). Fytochromy se dále dělí do dvou skupin na základě jejich fotostability. Fytochromy typu I jsou fotolabilní, na světle podléhají degradaci a vyskytují se v etiolovaných pletivech. Mezi tyto fytochromy řadíme phyA. Fytochromy typu II jsou fotostabilní, vyskytující se v zelených pletivech a řadíme sem zejména phyB, ale také jiné fytochromy (Parks, 2003). Světelné podmínky mají tak velký vliv na množství fytochromu typu I nebo typu II. Mezi nejlépe prozkoumané fytochromy patří phyA a phyB, u kterých byla prokázána reakce i na BL (Taiz & Zeiger, 2015).

### **Fytochrom A**

Fytochrom A je fotolabilní fotoreceptor reagující na dlouhovlnné červené záření. Jedná se o nejdůležitější fotoreceptor, jelikož jako jediný dokáže o tomto záření předat informace a je tak nezastupitelný (Weller *et al.*, 2004). Citlivost fytochromu A vůči FR je důležitá při ději úniku ze stínu, kdy na zkoumanou rostlinu nedopadá díky vzrostlejšími rostlinám RL, pouze je propuštěno dlouhovlnné červené záření. To je zaregistrováno právě phyA a díky tomu je pozměněn morfologický vývoj rostliny – prodloužení stonku a řapíku. Rostlina tak prorůstá jinými rostlinami směrem ke světlu. Hlavní funkce phyA nastává při procesu změny skotomorfogeneze na fotomorfogenezi. V etiolovaných rostlinách je phyA obsažen ve větším množství v cytosolu ve formě  $P_r$  a předává informace o délce záření. V okamžiku osvětlení rostliny se mění forma na  $P_{fr}$  a phyA se přesouvá do jádra (Nagy & Schäfer, 2002). Při přesunu zároveň nastává i pokles hladiny fytochromu. Ten je uskutečněn třemi rozdílnými mechanismy, které probíhají simultánně. První z mechanismů je potlačení transkripce genu *PHYA*, druhý zahrnuje degradaci mRNA phyA a třetí je ubikvitinace formy  $P_{fr}$  a jeho následná degradace za pomoci proteasomu (Debrieux & Fankhauser, 2010).

## **Fytochrom B**

Fytochrom B patří do skupiny fotostabilních fotoreceptorů. Exprese genu *PHYB* není závislá na světle a jeho obsah v rostlině je ve tmě i na světle víceméně stálý. Tento fotoreceptor detekuje RL a není plně zastupitelný ostatními fotoreceptory. Avšak velmi často bývá při reakcích doprovázen některými fotoreceptory ze skupiny fotostabilních (Mathews, 2010). Hlavní funkce phyB nastává při mechanismu vyhnutí se stínu, jelikož fytochrom dokáže rozpoznat poměr RL/FR. Při pokusech byli zkoumaní mutanti s vyřazeným *PHYB* méně schopní vyhnout se stínu (Franklin, 2003). Dále je také phyB velmi důležitý při klíčení semen a v procesu de-etiolace. Fytochrom B se stejně jako fytochrom A vyskytuje v cytoplazmě v biologicky inaktivní formě, kdy po aktivaci světlem konvertuje na formu aktivní a přemísťuje se do jádra buňky.

## **Receptory modrého světla**

V rostlinných buňkách se vyskytuje více druhů receptorů reagujících na modré světlo (BL). Jedná se o kryptochromy, fototropiny a ZTL/FKF1/LPK2 proteiny. Reakce rostlin na BL se projevuje především jako inhibice prodlužovacího růstu, fototropismus, posun chloroplastů, otevírání průduchů. Modré světlo dále reguluje růst listů a kvetení a také genovou expresi.

## **Kryptochromy**

Kryptochromy jsou fotoreceptory zachycující BL a UV-A záření. Dříve se vědci domnívali, že chromofor kryptochromu má podobu karotenoidu, avšak po zjištění, že reaguje i na UV-A záření se došlo k závěru, že se jedná o látku na bázi flavinu (Hertel, 1980). Kryptochromy jsou tvořené apoproteinem a dvěma chromofory. Chromoformní kofaktory obsahují flavinandenindinukleotid (FAD) a methenyltetrahydrofolát (MTHF, také pterin). Kryptochromy vykazují podobnost s enzymy DNA fotolyasy (PHR), které se účastní oprav DNA a fungují jako fotoreceptory u bakterií. Kryptochromy však funkci při opravě DNA nemají. Jedna molekula kryptochromu se skládá ze dvou domén. První je N-koncová doména PHR (PHotolyase-Related) a druhá C-koncová DAS (DQXVP-*acidic*-STAES) doména. PHR napomáhá při dimerizaci fotoreceptoru, která je pro správnou funkci nepostradatelná. Kryptochromy se vyskytují ve všech pletivech rostliny a nejvyšší exprese genu byla zaznamenána v kořenech a květech (Perrotta *et al.*, 2001). V současnosti je předmětem bádání přenos elektronů u kryptochromů z flavinu na blízké

signální molekuly nebo na jiné části molekuly. Předpokládá se, že přenos může mít za následek konformační změny (Liu *et al.*, 2011).

### **Fototropiny**

Fototropin je fotoreceptor objevený při studiu fototropismu. Jedná se o protein velký asi 120 kDa, který reaguje na BL a udává informace o umístění zdroje světla. Stejně jako kryptochromy, patří i fototropiny do rodiny flavoproteinů, avšak s kryptochromy nejsou příbuzné. Hlavními funkcemi fototropinů je otevírání květů při fototropismu, inhibice růstu stonku a pohyb chloroplastů. Molekula fototropinu je složena ze dvou domén. První z nich je N-koncová doména, která obsahuje dvě totožné LOV sekvence (light/oxygen/voltage). Tato doména ve tmě interaguje s flavinmononukleotidem (FMN) za vzniku nekovalentní vazby, která se při působení BL mění na kovalentní. Druhou doménou na C-konci je STK doména (serin/threonin kinasa). Fototropiny se na rozdíl od fytochromů a kryptochromů nacházejí v cytoplasmatické membráně a odtud po ozáření BL putují do cytoplasmy (Christie *et al.*, 2015).



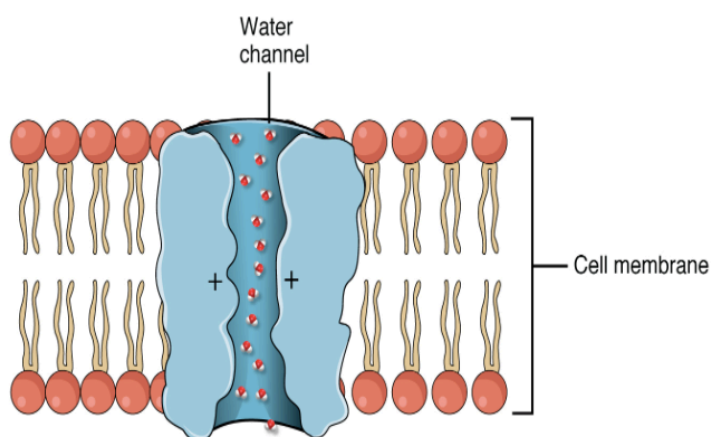
## Akvaporiny

V roce 1988 se britský vědec Petr Agre snažil neúspěšně nalézt specifické rostlinné bílkoviny. Místo nich si připsal jiný objev, a to kanály propouštějící vodu přes membrány, které byly později označeny jako akvaporiny (AQPs). Objev, který Agreovi přinesl Nobelovu cenu, potvrdil myšlenku, že musí existovat i jiný mechanismus na rozvod vody než jen prostá difúze, tedy samovolné pronikání molekul vody po spádu elektrochemického gradientu.

Akvaporiny jsou transmembránové kanály bílkovinné povahy. První odhady byly, že dokážou transportovat pouze molekuly vody, proto dostali jejich název z anglického *Aquaporins*. Později se zjistilo, že zajišťují transport nejen vody, ale i plynů a jiných malých neutrálních molekul, mezi které například řadíme oxid uhličitý, peroxid vodíku nebo glycerol (Tyerman *et al.*, 2002).

Různé druhy akvaporinů se od sebe navzájem rozlišují podle funkce, výskytu a struktury a jednotlivé druhy můžeme nalézt v libovolných počtech v membránách všech organismů až na termofilní archeu a intracelulární bakterie, které se řadí mezi výjimky (Abascal *et al.*, 2014).

Počet akvaporinů je závislý na druhu, stáří, tkáních a typu organismu. Exprese je z velké části ovlivněna i vnějšími stresovými podmínkami (Tyerman *et al.*, 2002). Akvaporiny patří do rodiny proteinů nesoucí název MIP (*Major Intrinsic Protein*). Jejich velikost se udává mezi 25–35 kDa. Rostlinné akvaporiny jsou umístěny v cytoplazmatické membráně a v membráně vakuoly, tj. v tonoplastu. Procházejí skrze celou membránu, kde vytvářejí póry umožňující průchod molekul (Obr. 2).

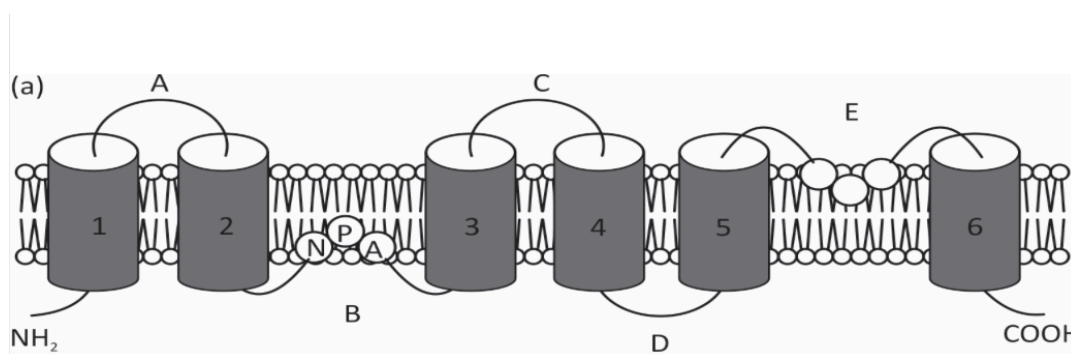


**Obr. 2** Umístění akvaporinu ve dvojvrstvě fosfolipidů cytoplazmatické membrány, zdroj: <http://ihc2015.info/skin/aquaporin-definition-biology.akp>

V současné době je známo 13 druhů akvaporinů vyskytujících se u živočichů, vč. člověka a 35 druhů rostlinných akvaporinů. K nalezení rostlinných AQPů dopomohlo osekvenování kompletního genomu *Arabidopsis thaliana*.

## Struktura

Struktura AQPů je mezi ostatními proteiny naprosto unikátní. Akvaporin je složen z proteinových podjednotek, z čehož každá tvoří samostatný kanál. Podjednotka je tvořena šesti spirálami,  $\alpha$ -helixy, které procházejí skrze membránu (Obr. 3).



**Obr. 3** Schematická struktura podjednotky akvaporinu s 6  $\alpha$ -helixy,

zdroj:<https://www.letstalkacademy.com/publication/read/aquaporins-across-cell-membrane>

Helixy jsou spojeny smyčkami, z nichž dvě jsou intracelulární (B a D) a tři extracelulární (A, C a E). Konce spirál směřují v každém případě dovnitř buňky, do cytosolu. N-terminální konec obsahuje NH<sub>2</sub> funkční skupinu, C-terminální konec je zastoupen COOH skupinou (Murata *et al.*, 2000). Smyčky B a E se nacházejí uvnitř fosfolipidové dvojvrstvy, kde vytvářejí krátké  $\alpha$ -helixy hydrofobního charakteru. Na tomto místě se nachází kanál jako takový. Spirály procházející skrze celou membránu se označují číslicemi 1-6 a smyčky, které spirály spojují, se označují písmeny A-E (Obr. 2). Nedílnou součástí každého akvaporinu jsou specifické skupiny aminokyselin. Smyčky B a E obsahují NPA boxy (sekvence aminokyselin asparagin-prolin-alanin), které se nacházejí uvnitř membrány. Další důležitou skupinou je histidinový zbytek nacházející se v D smyčce u PIP proteinů (viz další kapitola), který je zcela zásadní pro vnímání pH uvnitř buňky. Naprosto zásadní skupinou jsou serinové zbytky, obvykle jeden až dva, které regulují průchod molekul akvaporinem, respektive regulují jeho otevřenost a

zavřenost. Na tomto místě probíhá také reverzibilní fosforylace, která reguluje zmíněné otevření a zavření (Luu & Maurel, 2005).

## **Rozdělení**

Akvaporiny lze rozdělit na základě jejich umístění v buňce do čtyř základních rodin: PIP, TIP, NIP a SIP. První dvě zmíněné jsou si nejvíce podobné a vyskytují se v membránách buňky. PIP (*Plasma membrane Intrinsic Proteins*) jsou proteiny nacházející se v plazmatické membráně. Naopak TIP (*Tonoplast Intrinsic Proteins*) jsou proteiny s výskytem v membráně vakuol. NIP (*Nodulin-26-like intrinsic proteins*) jsou akvaporiny vyskytující se pouze u bobovitých rostlin, konkrétněji v peribakteroidních membránách hlízek, kde zprostředkovávají poutání vzdušného dusíku. Nejmladší rodinou akvaporinů jsou SIP (*Small Intrinsic Proteins*), z jejichž názvu je patrné, že se jedná o akvaporiny malé velikosti (Chaumont *et al.*, 2001).

Konkrétní skupiny jsou podrobněji charakterizovány níže.

### *PIP – Plasma membrane intrinsic proteins*

Akvaporiny patřící do skupiny PIP proteinů vytvářejí nejpočetnější skupinu. Vyskytují se v plazmatické membráně rostlinných buněk. Nejvíce PIP proteinů bylo nalezeno v huseníčku a kukuřici.

Jejich výskyt není omezený pouze jen na určitou část rostliny, ale je možné nalézt je jak v podzemních, tak i nadzemních částech rostliny. V každé části rostliny mají rozdílnou funkci. Pro akvaporiny, vyskytující se v buňkách kořene, je stěžejní funkcí transport vody, zatímco akvaporiny, které nalezneme v buňkách listů, uskutečňují transport jiných malých molekul a plynů (Kaldenhoff & Fisher, 2006).

PIP proteiny se dále dělí na dvě fylogenetické skupiny lišící se zejména v délce N- a C- konců. S tím souvisí i rozdílná schopnost skupin transportu vody. Akvaporiny skupiny PIP1 propouštějí vodu daleko méně v porovnání s akvaporiny skupiny PIP2.

### *TIP – Tonoplast intrinsic proteins*

Akvaporiny s označením TIP náleží membráně vakuoly, tedy tonoplastu. Vakuola je obecně známá jako buněčná organela s velmi variabilními funkcemi, mezi které patří například ukládání a degradace látek nebo regulace turgoru. Vakuola řídí osmoregulaci buňky a je proto nesmírně důležité, aby byl transport vody přísně řízen. TIP akvaporiny usměrňují nejen transport vody, ale také glycerolu a močoviny. Jako první byla tato

vlastnost akvaporinů pozorována u rostliny *Nicotiana tabacum* (Gerbeau *et al.*, 1999), později i u huseníčku (Liu *et al.*, 2003).

#### *NIP – Nodulin-26-like intrinsic proteins*

NIP proteiny jsou malá skupina akvaporinů, která má u *Arabidopsis* devět členů. První nalezený člen se označuje jako nodulin26, a byl nalezen u sóji. Stejně jako u TIP akvaporiny, není jejich jedinou funkcí transport vody, ale i rozvod jiných molekul. Těmito molekulami jsou například  $\text{NH}_3$ , glycerol a jiné ve vodě rozpustné látky. Hlavní funkcí těchto akvaporinů je poutání vzdušného dusíku. Vyskytují se totiž v místě kořenových hlízek rostliny, kde probíhá symbióza s bakteriemi, které fixují vzdušný dusík.

Existují dvě podskupiny NIP akvaporinů. První z nich jsou NIP1, které se svojí strukturou téměř shodují prvnímu NIP akvaporinu nodulinu26 a lze je také nazývat jako akvaglycerolporiny. Společným znakem pro členy skupiny je lokalizace místa, kde probíhá fosforylace. V tomto případě je to na karboxylovém konci proteinu (Weaver & Roberts, 1992). NIP2 se strukturně liší od NIP1. Největší rozdíl spočívá v lokalizaci místa fosforylace, které je u této skupiny stálé.

#### *SIP – Small intrinsic proteins*

Společným znakem SIP proteinů je jejich velikost. Oproti ostatním akvaporinům jsou velmi malé zejména kvůli kratší N-terminální oblasti. Největší výskyt SIP proteinů je na povrchu endoplazmatického retikula a nejméně v tonoplastu a plazmatické membráně. Obecně je v buňce rostliny množství akvaporinů mnohem menší než jiných druhů. O SIP proteinech je v této době stále málo informací a jsou předmětem bádání.

## **Regulace**

Zatímco struktura akvaporinů je již prozkoumanou oblastí, jejich regulace se v posledních letech dostává do popředí zájmu vrcholných vědců. Regulace exprese a aktivity akvaporinů je velmi různorodá vzhledem k jejich rozmanitosti. Rozvod vody pomocí AQPů je regulovanou záležitostí, rostlina díky nim dokáže reagovat na jemné změny v okolí, které mohou být během určité fáze rostlinného životního cyklu zcela klíčové.

Změna v expresi genů kódujících akvaporiny vede ke změně jejich počtu v buňce. Mění se počet transportních míst, a tudíž i transportní potenciál buněk. Změny v expresi

nastávají především při diferenciaci a stárnutí buněk, ale také při reakcích buněk na vnější prostředí. Dalším způsobem regulace je změna aktivity akvaporinů. K té dochází především při odpovědích na změny vnějšího prostředí, například při reakcích na stres.

Hlavními mechanismy, které regulují akvaporiny jsou post-translační modifikace, mezi které řadíme fosforylaci zprostředkovanou kinázami, defosforylaci zprostředkovanou fosfatázami a heterodimerizaci. Mezi další mechanismy patří například vliv pH, působení sucha, tlaku, či jiných stresových faktorů a koncentrace dvojmocných kationtů vně buňky. Při těchto procesech se mění struktura buněčných proteinů přímou cestou nebo nepřímo přes specifické reakce.

Nejčastějším a nejběžnějším způsobem regulace aktivity je zmíněná fosforylace. Kinázy, které fosforylaci zprostředkovávají, reagují na změny přicházející z vnějšího okolí. K nim lze zařadit působení patogenů, rostlinných hormonů, světla a stresu ze sucha (Chaumont *et al.*, 2005). Mechanismus fosforylace zodpovědné za regulaci aktivity byl zkoumán pomocí funkční analýzy, konkrétně byla studována N- a C- terminální oblast serinových zbytků akvaporinů u sóji, špenátu a fazolu. Díky zjištění molekulární struktury akvaporinu SoPIP2-1 špenátu bylo objeveno, že D-smyčka interaguje s N-koncem bílkoviny, a v tomto místě vzniká uzávěr kanálu (Maurel *et al.*, 2007).

Dále byl zkoumán i vliv pH a dvojmocných kationtů. Bylo zjištěno, že aktivita akvaporinů závisí na pH uvnitř buňky (respektive vezikuly). Z konkrétního zjištění vyplývalo, že nízké pH snižuje jejich aktivitu. V téže studii byl také uveden vliv barnatých a vápenatých iontů. Výsledky ukazovaly možný vliv dvojmocných iontů na fosforylaci a také jejich přímou vazbu na akvaporiny. Zvýšená koncentrace barnatých a vápenatých iontů zvyšovala inhibici aktivity akvaporinů. U vápenatých iontů více než u barnatých (Alleva *et al.*, 2006).

### **Mechanismus inhibice aktivity akvaporinu vlivem HgCl<sub>2</sub>**

Při studiu vlastností akvaporinů se zkoumala a nadále zkoumá také selektivní inhibice jejich aktivity. V dnešní době je již známo, že sloučeniny rtuti reverzibilně inhibují transport vody uskutečněný akvaporiny. Rtuťnaté ionty reagují se sulfhydrylovými skupinami (SH) akvaporinů, což způsobí jejich uzavření. Tento děj je nejvíce pozorovatelný u membrán buněk vyskytujících se v kořenové části rostliny (Carvajal *et al.*, 1996) a je všeobecně u všech buněk vyšších rostlin (Niemetz & Tyerman, 1997). Společným znakem všech MIP proteinů jsou NPA boxy, které jsou pevně zakotveny ve smyčkách akvaporinů. Před těmito boxy se nachází zbytek aminokyseliny cysteinu.

Pomocí řízené mutagenese bylo zjištěno, že je tento úsek zodpovědný za citlivost akvaporinů na rtuť. Pokud byl cysteinový zbytek nahrazen zbytkem jiné aminokyseliny, například serinovým, akvaporin přestal vykazovat citlivost vůči rtuti (Daniels *et al.*, 1994). Použití  $\text{HgCl}_2$  zapříčiňuje depolarizaci cytoplazmatické membrány buněk a ovlivňuje fyziologii buněk (Martre *et al.*, 2002), což je jeden z důvodů, proč jsou studia mechanismu inhibice aktivity akvaporinů, způsobené  $\text{HgCl}_2$ , stále aktuální. Při dalších experimentech bylo zjištěno, že semena *Arabidopsis*, která byla ošetřena  $\text{HgCl}_2$ , klíčila pomaleji než semena kontrolní. Také se došlo k závěru, že tyto účinky byly způsobeny právě specifickým navázáním  $\text{HgCl}_2$  na akvaporin a nedošlo zde k nesespecifickým toxickým účinkům  $\text{HgCl}_2$ . Posledním výsledkem výzkumu bylo prokázání působení  $\text{HgCl}_2$  až ve fázi II a III klíčení semene (Vander Williegen *et al.*, 2006).

## **Materiál a metody**

### **Rostlinný materiál**

Při pokusech se pracovalo se semeny *Solanum lycopersicum L.* tří různých kultivarů a s jejich recesivními mutanty. Prvním z nich byl mutant *tri1*, jež je odvozený od kultivaru cv. GT. Tento mutant je deficientní ve fytochromu phyB1 (van Tuinen et al., 1995). Dalším mutantem odvozeným od kultivaru cv. Money Maker byl *fri1*, který je deficientní ve fytochromu phyA (Kerckhoff et al., 1997). Posledním použitým mutantem byl mutant *hp*. Tento mutant odvozený od kultivaru cv. Rutgers; LA3004 (Kendrick et al., 1997) je mutován v genu *SIDDB1*, který kóduje protein DDB1 (UV-Damaged DNA-binding protein1) a vykazuje zesílené fytochromové reakce a zesílený fototropismus (Srinivas et al., 2004, Yuxiang et al., 2016)

### **Pracovní postupy**

#### **Příprava kultivačního média**

Ve všech pokusech bylo použito kultivační MS médium (Murashige and Skoog, 1962), které bylo připraveno uvedeným způsobem: Do Erlenmayerovy baňky o objemu 3 l se odměřil 1 l destilované vody, do které se přidalo navážených 20 g sacharózy (Cat. no 40135-AP0, Lachner) a na elektromagnetické míchačce se nechal obsah baňky rozmíchat. Za stálého míchání bylo do roztoku přidáno 8,6 g MS média (Cat. no. M5524, Caisson, USA; Murashige and Skoog, 1962) a 0,3904 g pufru MES (Morpholinoethane sulfonic acid; kat. č. 29834.04, Serva). Následně byl doplněn objem na 2 l destilovanou vodou. Pro dosažení pH 6,1 byl do roztoku postupně přidáván 1M KOH.

Takto připravený roztok byl rozdělen po 400 ml do pěti 500 ml termoláhví. Každá termoláhev již obsahovala 2,8 g agaru (Cat. no. P1003, Duchefa Biochemie). Médium bylo poté sterilizováno autoklávováním. Proces autoklávování způsobí změnu pH kultivačního média na přibližných 5,7. Kultivační médium se před samotným použitím postupně nechalo rozehřát v mikrovlnné troubě a bylo do něj přidáno požadované množství  $\text{HgCl}_2$  (zás. roztok  $10^{-2}$  mol/l). Tato práce již probíhala za sterilních podmínek v laminárním boxu.

## Koncentrace HgCl<sub>2</sub> v MS médiu

Kultivační média pro výsev semen se lišila pouze v koncentraci použitého inhibitoru HgCl<sub>2</sub>. Konečné koncentrace HgCl<sub>2</sub> v médiu byly 0; 20; 30; 40 a 45 μmol/l a pro přípravu MS médií s přídavkem HgCl<sub>2</sub> byl využíván jeho zásobní roztok o koncentraci 10<sup>-2</sup> M. Množství napipetovaného HgCl<sub>2</sub> do 120 ml média je uvedeno v následující tabulce (Tab.1).

Tab 1: Koncentrace HgCl<sub>2</sub> ve 120 ml média a odpovídající objem zásobního roztoku

<b>Koncentrace v médiu (μmol/l)</b>	0	20	30	40	45
<b>Objem zásobního roztoku (μl)</b>	0	240	360	480	540

## Sterilní výsev semen

Pro jeden pokus bylo potřeba cca 360 semen od každého genotypu (mutant a jemu příslušný WT). Po napočítání byla semena zvlášť přesypána do popsaných 50 ml plastových zkumavek. Poté k nim bylo přidáno 40 ml 3% roztoku Sava (60 ml Sava + 40 ml destilované vody) pro povrchovou sterilizaci. Sterilizace probíhala po dobu 30 minut a pro zvýšení účinnosti byla zkumavka několikrát protřepána. Po 30 min bylo Savo odsáto a semínka byla promyta pětkrát až šestkrát sterilní destilovanou vodou.

Veškerá následující práce probíhala již ve flowboxu. Bylo připraveno potřebných 24 kulatých sterilních plastových Petriho misek (průměr 90 mm), které byly řádně popsány. Na každé Petriho misce byl zaznamenán údaj o koncentraci HgCl<sub>2</sub> v kultivačním médiu, o typu semene (WT nebo mutant) a o prostředí klíčení (BL, RL, D).

Dále bylo 120 ml rozehřátého a vychladlého média s předem vypočítaným množstvím HgCl<sub>2</sub> rozděleno vždy do šesti Petriho misek, tzn. v každé Petriho misce bylo 20 ml média. Postup byl opakován 4-5x, v závislosti na tom, kolik bylo testovaných koncentrací, vždy s jiným objemem HgCl<sub>2</sub> (viz. Tab. 1). Kontrolní médium označené číslicí 0 neobsahovalo roztok HgCl<sub>2</sub>.

Samotné vysazování probíhalo na ztuhlém médiu vždy po třiceti semínkách do pravidelného čtverce na jedné Petriho misce. Semena byla vysazována pomocí pinzety sterilizované v 96% ethanolu a ožehlé nad plamenem. Petriho misky s vysetými semínky byly řádně oblepeny páskou z netkané textilie (Urgopore nebo Softpore) a vertikálně uloženy do stojánek a umístěny do růstových komor (Microclima 1000; Snijders



Scientific B.V., The Netherlands) s modrým (BL) nebo červeným světlem (RL). Zdroj modrého světla byly trubice Philips TLP-36 W/18-Blue (Philips, USA) - maximální ozáření 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při 440 nm a zdrojem červeného světla byly trubice Philips TLD-36 W/15-Red (Philips, USA) – maximální ozáření 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  při 660 nm. Sada Petriho misek určená pro klíčení ve tmě (D) byla zabalena do alobalu a uložena taktéž do růstové komory. Kultivace semen probíhala po dobu 7 dnů.

### **Vyhodnocování klíčivosti semen**

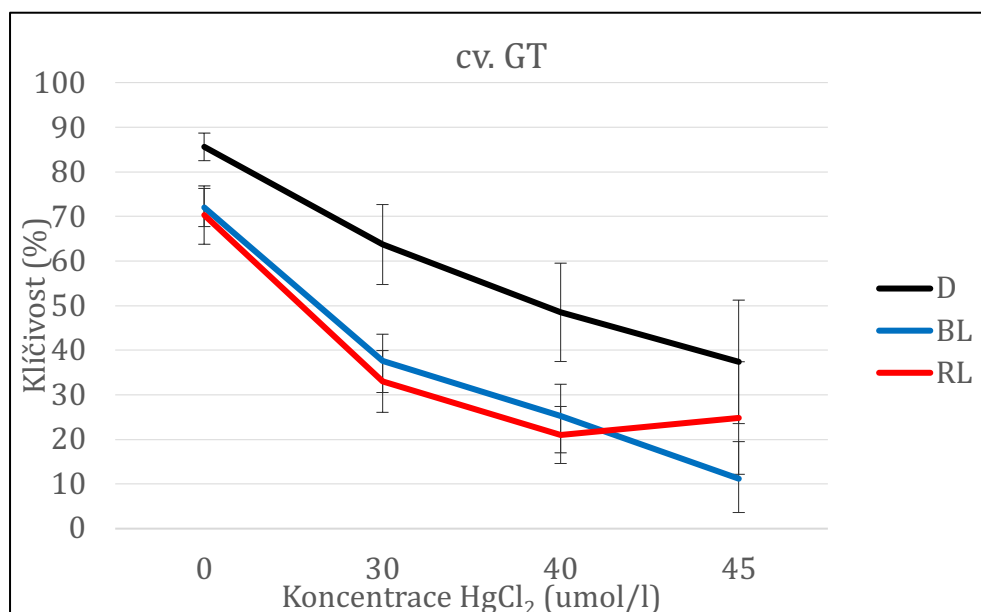
Zaznamenávání klíčivosti semen probíhalo od 3. dne po výsevu denně. Se zaznamenáváním se začalo třetí den až proto, že v použitých experimentálních podmínkách začala semena ve zmiňovaný den klíčit. Experiment s daným mutantem a jeho kultivarem byl opakován 3-5x a z každého experimentu byla klíčivost po sedmi dnech od výsevu vyjádřena v procentech. Následně byly z těchto hodnot vypočítány průměrné hodnoty. Výsledkem vyhodnocování potom byly grafy závislosti klíčivosti (%) na koncentraci inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách. Zpracování výsledků bylo provedeno v programu Microsoft Excel:mac<sup>2011</sup>.

## Výsledky

Jedním z cílů této bakalářské práce bylo zjistit, zda akvaporiny hrají úlohu při procesu klíčení semen. Pro dosažení tohoto cíle byl zvolen farmakologický přístup, který spočíval v použití inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$ . Bylo sledováno, jak zablokování akvaporinů ovlivňuje klíčení semen. Vliv inhibitoru byl studován ve tmě, při působení modrého a červeného světla proto, aby se zjistilo, jestli světlo může ovlivňovat aktivitu kanálů citlivých k blokadě vlivem  $\text{HgCl}_2$ , což byl další cíl této práce. Genetickým přístupem, tedy použitím mutantů rajčete s defekty ve fytochromech, bylo vyšetřováno, prostřednictvím kterých fotoreceptorů světlo citlivost k  $\text{HgCl}_2$  ovlivňuje. Veškeré experimenty byly prováděny *in vitro* s přidavkem  $\text{HgCl}_2$  o zvolené koncentraci (0, 20, 30, 40, 45  $\mu\text{M}$ ) za působení daných světelných podmínek – D, BL, RL.

### Působení světelných podmínek a $\text{HgCl}_2$ na klíčení semen mutantu *tri1*

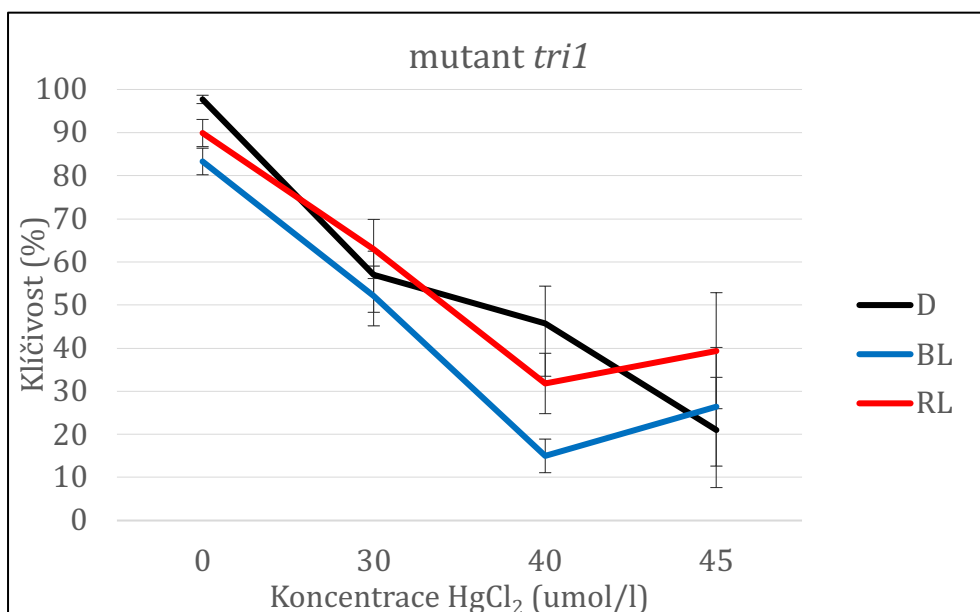
Při experimentu byl sledován vliv světelných podmínek a  $\text{HgCl}_2$  na klíčení recesivního mutantu *tri1*, který je deficientní ve fytochromu phyB1, a na klíčení odpovídajícího kultivaru cv. GT.



**Obr. 4:** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. cv. GT v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách 7. den po výsevu  $\pm$  SE vypočítané ze 7 nezávislých experimentů.

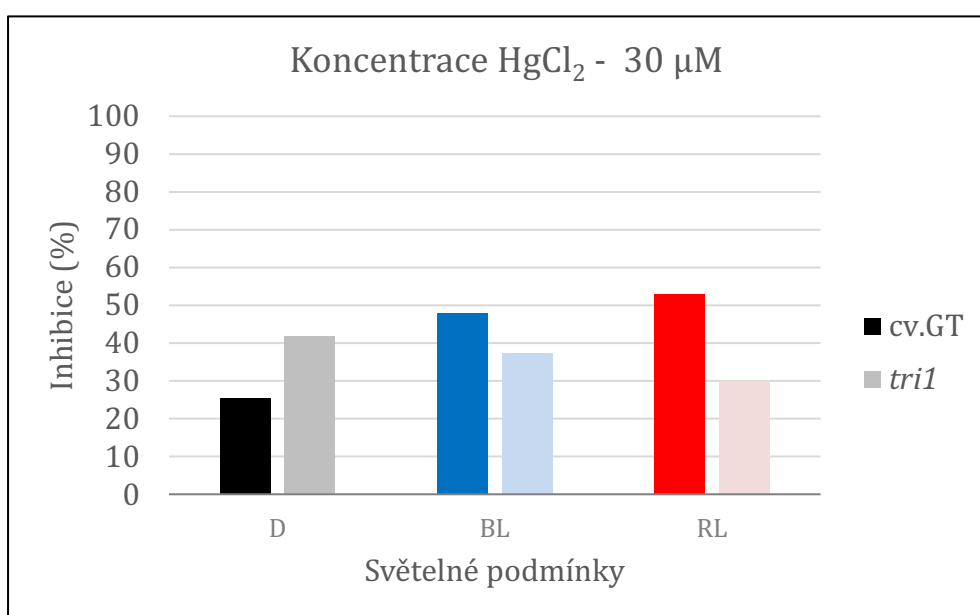
Z Obr. 4 je možné vyčíst výsledky maximální klíčivosti semen rajčete cv. GT ve tmě, při působení BL a RL a zároveň při působení inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$ . Nejvyšší klíčivost semen byla zaznamenána ve tmě, nižší při působení BL i RL. Dále je z grafu patrné, že se zvyšující se koncentrací  $\text{HgCl}_2$  se snižuje klíčivost semen. Ve tmě došlo zhruba k 50%

inhibici klíčení semen při koncentraci 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$ . Pokud byla semena vystavena působení BL a RL, byla inhibice o dalších asi 25 % vyšší.



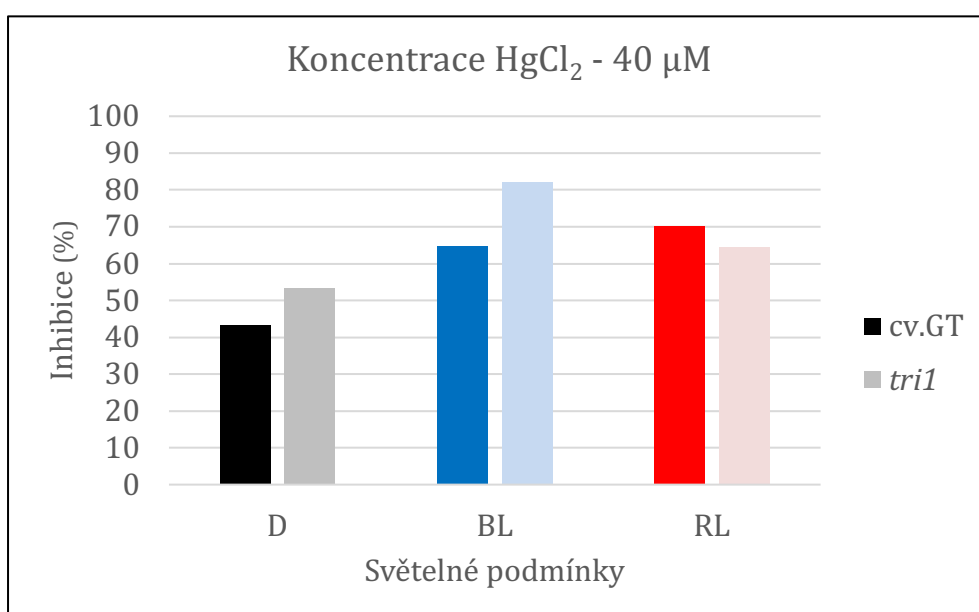
**Obr. 5:** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. mutanta *tri1* v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách 7. den po výsevu  $\pm$  SE vypočítané ze 7 nezávislých experimentů.

Výsledky Obrázku 5 ukazují maximální klíčivost semen mutanta *tri1* při působení rozdílných světelných podmínek a daných koncentrací  $\text{HgCl}_2$ . Lze pozorovat výraznou variabilitu v klíčení semen. Nejvyšší klíčivost semen na základním MS médiu byla zaznamenána ve tmě, na BL a RL byla klíčivost něco nižší. Podobně jako u cv. GT, klíčivost semen se prudce snižovala se zvyšující se koncentrací  $\text{HgCl}_2$ .



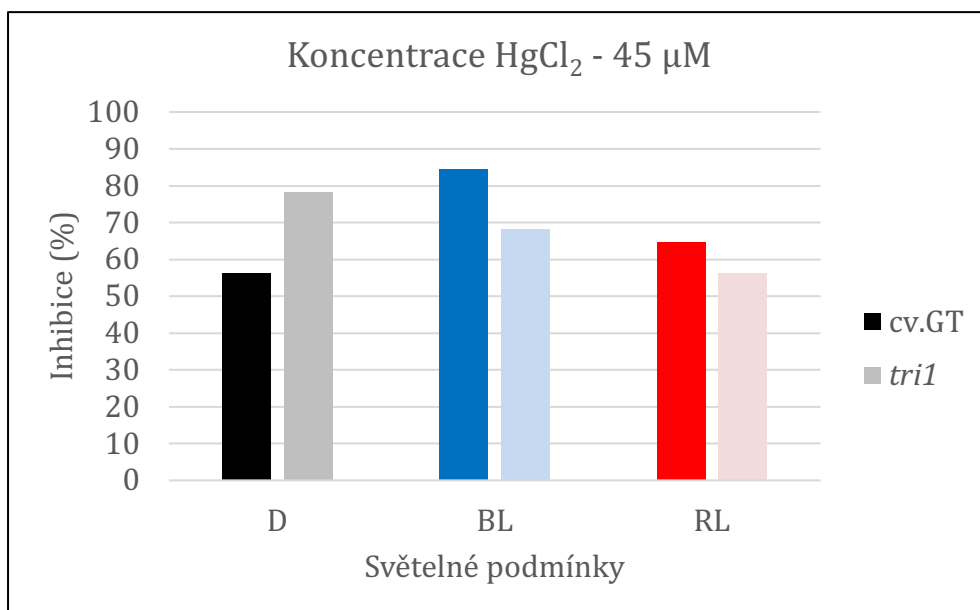
**Obr. 6:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. GT a mutanta *tri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 30  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  7. den po výsevu.

Obr. 6 porovnává hodnoty maximální inhibice klíčení semen WT (cv. GT) a od něj odvozeného mutantu *tri1* při použité koncentraci 30  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  a všech světelných podmínkách. Semena WT byla nejvíce citlivá k  $\text{HgCl}_2$  při působení červeného světla, méně pak při modrém světle a nejméně ve tmě. Naopak klíčení semen mutantu *tri1* bylo nejvíce inhibováno ve tmě (a výrazně více než u cv. GT), podobně na modrém světle a výrazně nejméně na červeném, kde byla inhibice klíčivosti semen *tri1* opět mnohem nižší než u cv. GT. Jiná situace nastává na Obrázku 7, kde při koncentraci 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  je klíčení mutantu *tri1* nejvíce inhibováno při působení BL. Semena WT vykazují stejný trend jako na Obrázku 6, tedy takový, že modré i červené světlo zvyšují citlivost klíčení semen k  $\text{HgCl}_2$  více než klíčení semen ve tmě.



**Obr. 7:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. GT a mutantu *tri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 40  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  7. den po výsevu.

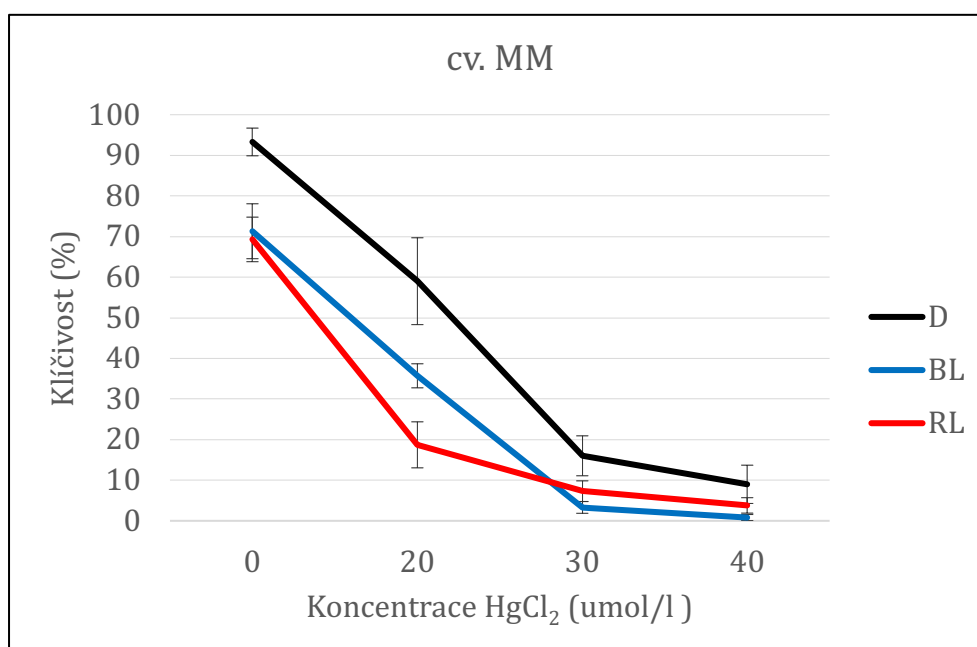
Na Obr. 8 je patrná zvýšená inhibice klíčení při působení BL a koncentraci 45  $\mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  u WT. Stejně jako na Obrázku 7, tak i na Obrázku 8, je vidět, že nejvyšší inhibice klíčení semen mutantu *tri1* ve tmě, menší pak na modrém světle a nejmenší na červeném světle.



**Obr. 8:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. GT a mutanta *tri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 45 µM HgCl<sub>2</sub> 7. den po výsevu.

### Působení světelných podmínek a HgCl<sub>2</sub> na klíčení semen mutanta *fri1*

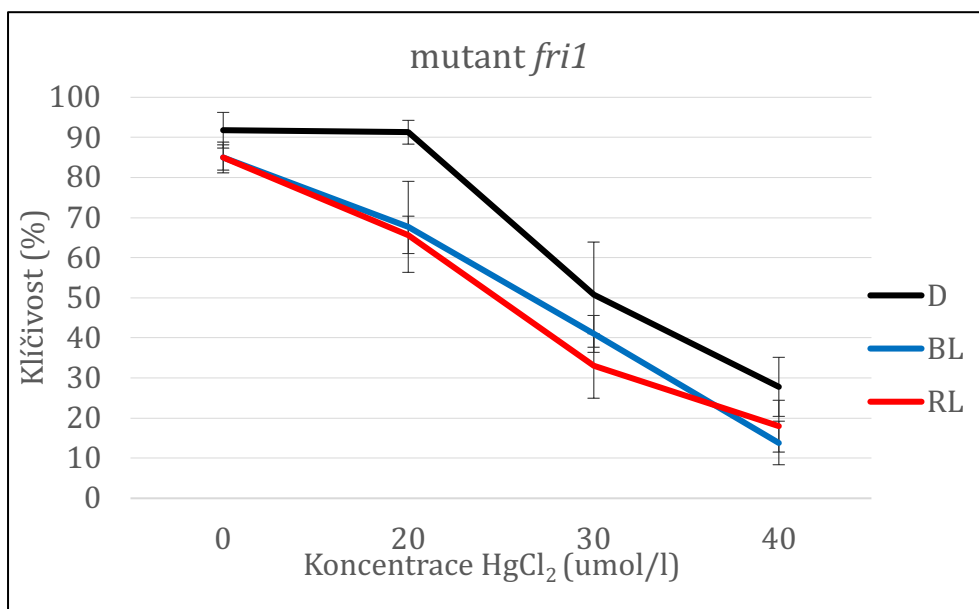
Při experimentu byl sledován vliv světelných podmínek a inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> na klíčení semen *S. lycopersicum* L. WT (cv. MM) a od něj odvozeného mutanta *fri1*, který je deficientní ve fytochromu phyA.



**Obr. 9:** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. cv. MM v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách 7. den po výsevu ± SE vypočítané ze 4 nezávislých experimentů.

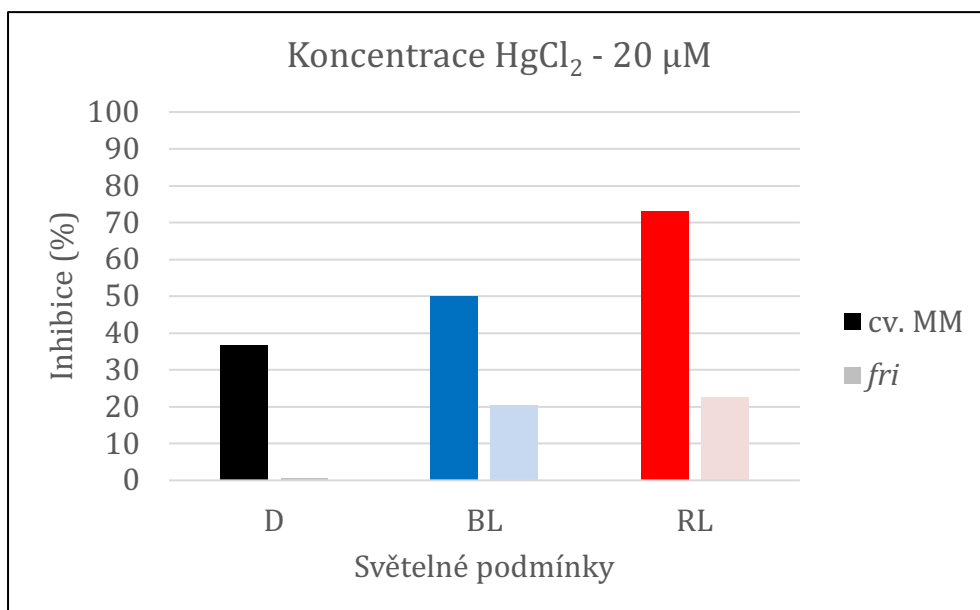
Obr. 9 zobrazuje vliv světelných podmínek a množství HgCl<sub>2</sub> na klíčení semen rajčete cv. MM. Nejvyšší klíčivost semen byla pozorována při klíčení ve tmě. Modré i červené světlo

klíčení mírně inhibovalo. Inhibitor akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  klíčení výrazně inhiboval. Největší rozdíl v klíčivosti byl zaznamenán při koncentraci  $20 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  u semen klíčících ve tmě (60 %) a u semen klíčených pod červeným světlem (18 %). Se zvyšující se koncentrací  $\text{HgCl}_2$  docházelo k úměrnému snižování klíčivosti semen ve všech světelných podmínkách a rozdíl v klíčivosti za rozdílných světelných podmínek byl s nárůstem koncentrace stále menší.



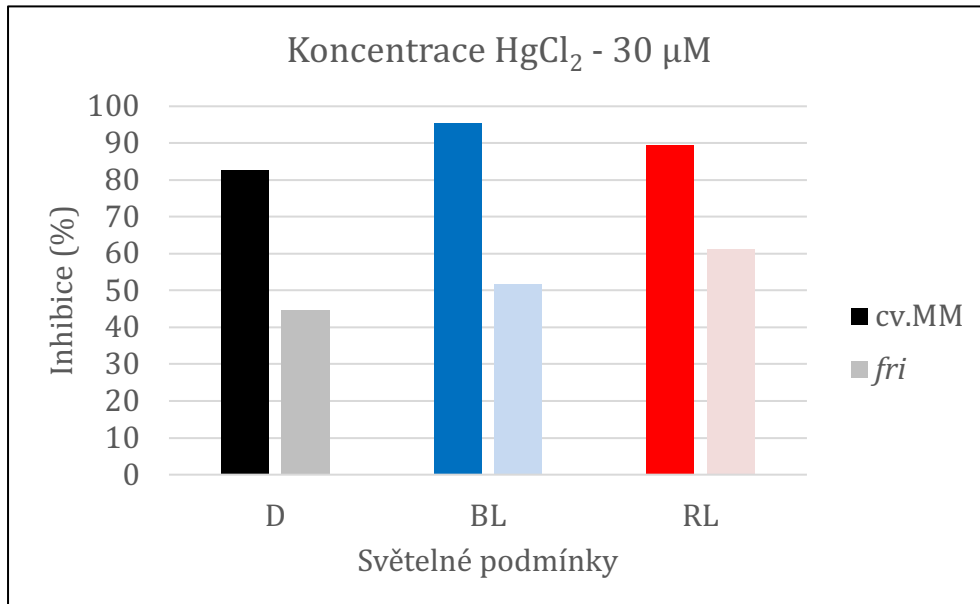
**Obr. 10:** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. mutanta *fri1* v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů  $\text{HgCl}_2$  a světelných podmínkách 7. den po výsevu  $\pm$  SE vypočítané z nezávislých experimentů.

Klíčovost mutanta *fri1* znázorněná na Obr. 10 byla všech případech vyšší než klíčivost WT uvedená na Obr. 9. Při koncentraci  $40 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  byla klíčivost semen *fri1* ve tmě 3x vyšší než u WT, při působení BL a RL 5x vyšší. Opět lze pozorovat trend zvyšující se koncentrace  $\text{HgCl}_2$  a zároveň snižující se klíčivost semen a také, že citlivost semen k  $\text{HgCl}_2$  je nejnižší ve tmě.

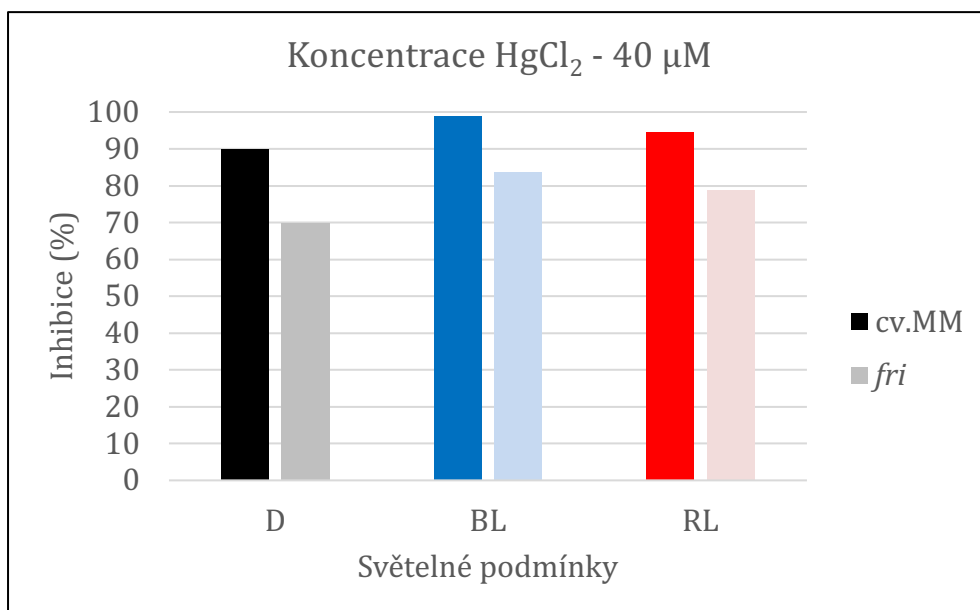


**Obr. 11:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 20 µM HgCl<sub>2</sub> 7. den po výsevu.

Na základě výsledků ukázaných na Obr. 11 lze konstatovat, že semena WT byla mnohem více citlivější k HgCl<sub>2</sub> než semena mutanta, a to za všech testovaných světelných podmínek. Největší rozdíl je viditelný při klíčení semen ve tmě. Dále je patrné, že koncentrace 20 µM HgCl<sub>2</sub> neměla žádný vliv na klíčivost semen mutanta *fri1*.



**Obr. 12:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 30 µM HgCl<sub>2</sub> 7. den po výsevu.



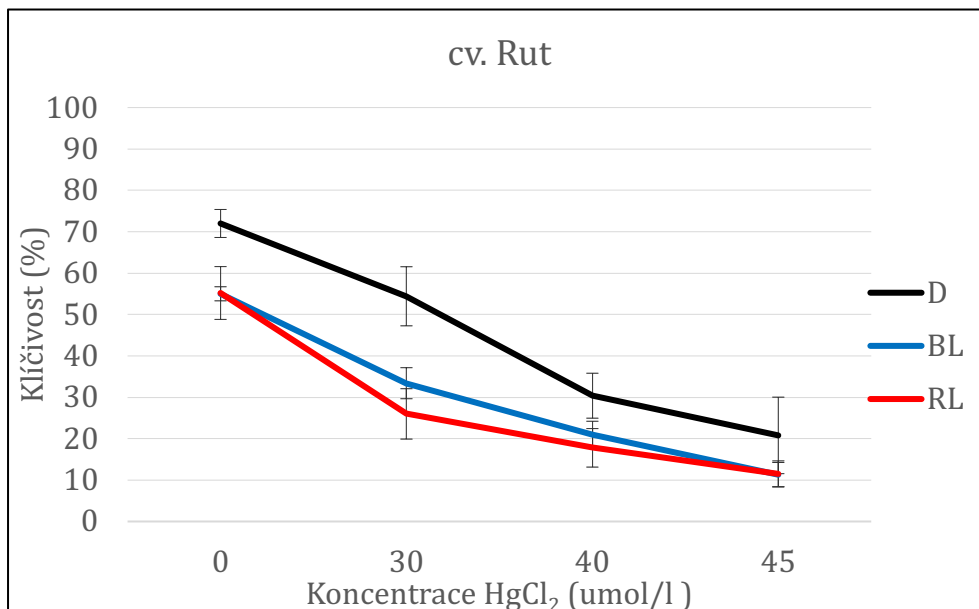
**Obr. 13:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. MM a mutanta *fri1* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 40 μM HgCl<sub>2</sub> 7. den po výsevu.

I při použití vyšších koncentrací HgCl<sub>2</sub> (30 μM a 40 μM) byla semena WT citlivější k HgCl<sub>2</sub>. Nejvyšší inhibice je zaznamenána při působení BL, poté při RL a nejméně ve tmě. Stejný trend následují i semena mutanta, avšak s nižšími hodnotami inhibice klíčení (Obr. 12 a 13)

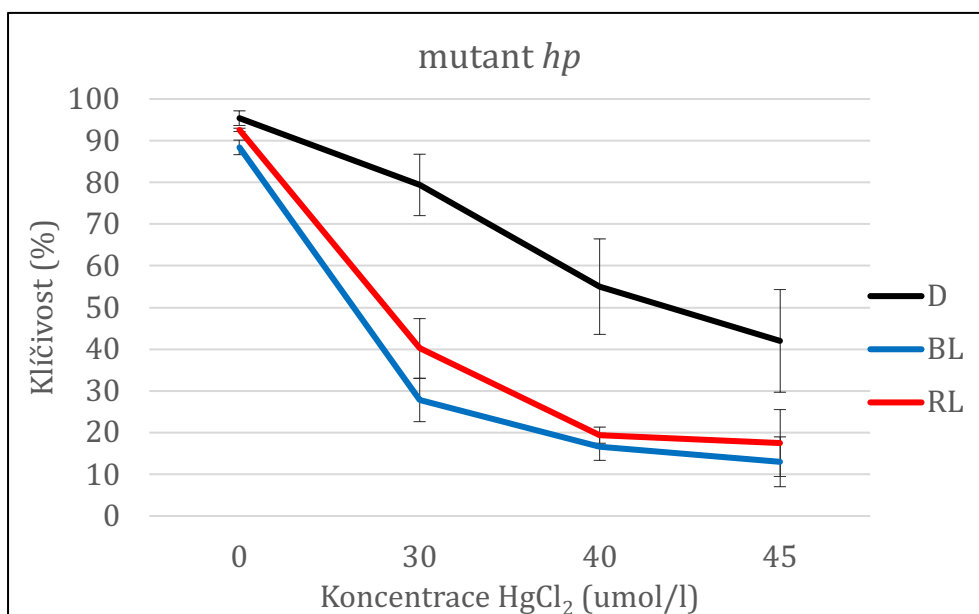


## Působení světelných podmínek a HgCl<sub>2</sub> na klíčení semen mutanta *hp*

V experimentu byl sledován vliv světelných podmínek a inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> na klíčení semen rajčete cv. Rutgers (Rut) a jeho recesivního mutanta *hp*, který vykazuje zesílené fytochromové reakce.



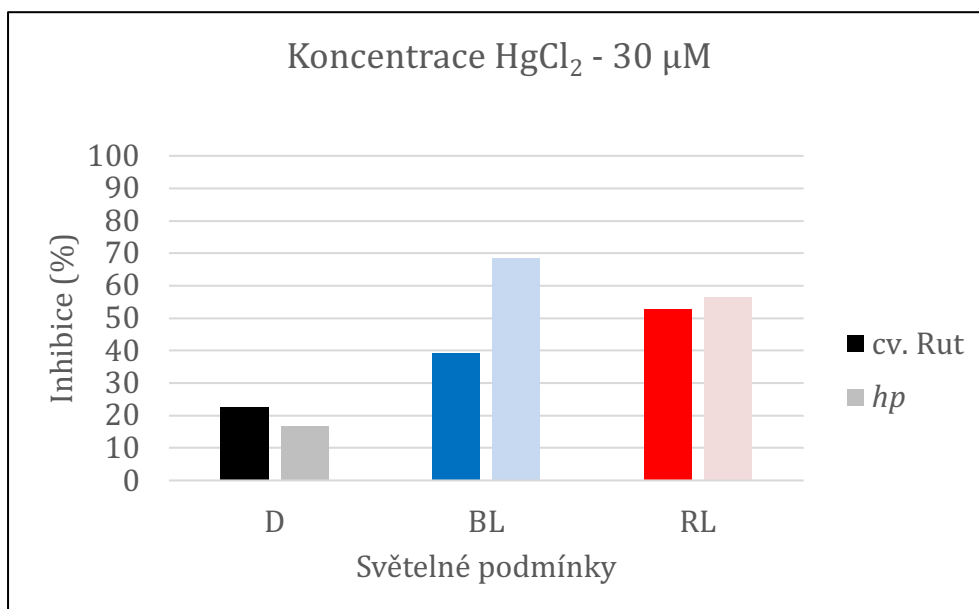
**Obr. 14** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. cv. Rut v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách 7. den po výsevu ± SE vypočítané z 5 nezávislých experimentů.



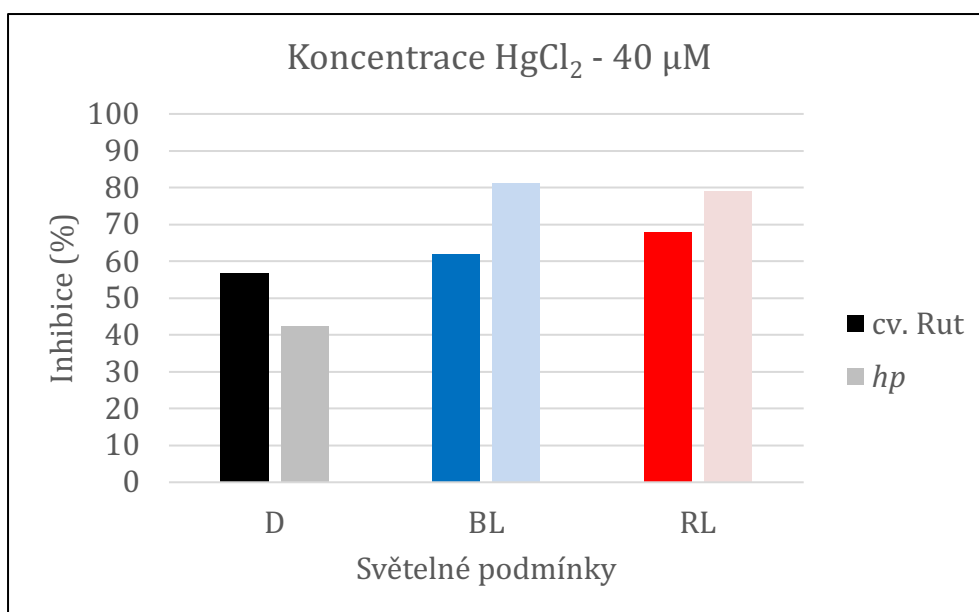
**Obr. 15:** Maximální klíčivost semen *S. lycopersicum* L. mutanta *hp* v závislosti na koncentraci inhibitoru akvaporinů HgCl<sub>2</sub> a světelných podmínkách 7. den po výsevu ± SE vypočítané z 5 nezávislých experimentů.

Obr. 14 a 15 ukazují maximální klíčivost semen WT a mutanta *hp* v závislosti na světelných podmínkách a množství HgCl<sub>2</sub>. Nejvyšší klíčivosti semen WT na základním médiu bylo dosaženo ve tmě, nejnižší při působení BL a RL (Obr. 14). U mutanta *hp* byla maximální klíčivost semen při absenci HgCl<sub>2</sub> ve tmě, na BL a RL podobná (Obr. 15). Z

obou grafů lze vidět, že čím vyšší je koncentrace  $\text{HgCl}_2$ , tím nižší je klíčivost semen, a to za všech světelných podmínek. Rozdíl v klíčivosti ve tmě u cv. Rut a mutantu *hp* při koncentraci  $45 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  je dvojnásobný – mutant dosáhl hodnoty nad 40 %, WT pouze 20 %. Klíčivosti semen WT ve tmě a při působení BL či RL byly zřetelně menší než u mutantu *hp*, kde rozdíl při nejvyšší použité koncentraci  $\text{HgCl}_2$  ve tmě a na světle je mezi 20 - 30 %.

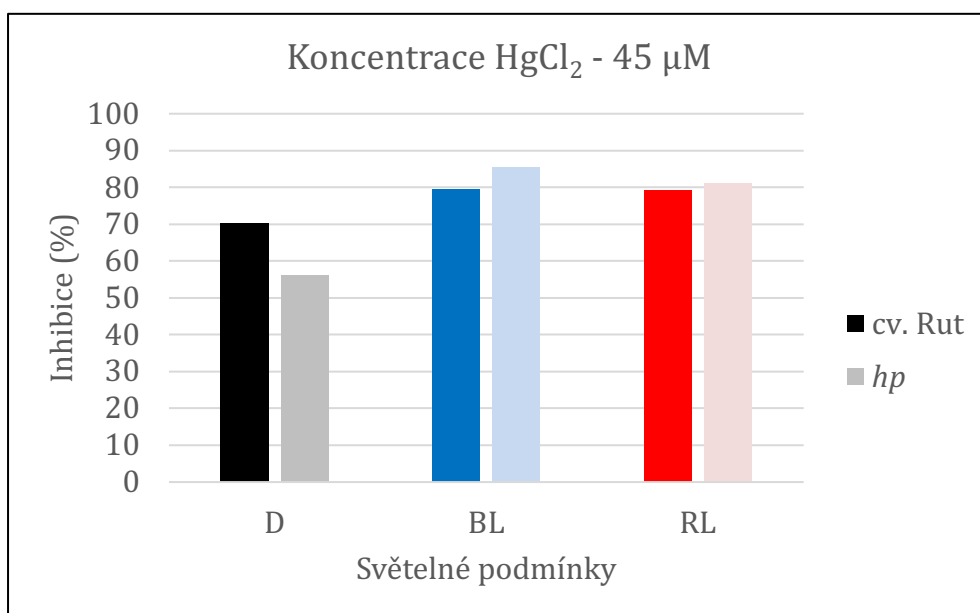


**Obr. 16:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. Rut a mutantu *hp* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci  $30 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  7. den po výsevu.



**Obr. 17:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. Rut a mutantu *hp* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci  $40 \mu\text{M}$   $\text{HgCl}_2$  7. den po výsevu.

Na Obr. 16 lze vidět skokový rozdíl inhibice klíčení semen mutanta *hp* ve tmě a na modrém světle při stejné koncentraci HgCl<sub>2</sub>. U výsledků v Obr. 16, 17 a 18 platí, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru je potlačení klíčení vyšší u WT i mutanta. Lze vidět, že semena mutanta *hp* jsou ve tmě méně citlivá k HgCl<sub>2</sub> než semena cv. Rutgers. Na BL se naopak zdá, že semena *hp* jsou k inhibičnímu účinku HgCl<sub>2</sub> citlivější než semena cv. Rutgers. Na červeném světle není v citlivosti semen *hp* a cv. Rutgers k HgCl<sub>2</sub> výraznější rozdíl.



**Obr 18:** Porovnání inhibice klíčivosti semen *S. lycopersicum* L. cv. Rut a mutanta *hp* v závislosti na světelných podmínkách a při koncentraci 30 μM HgCl<sub>2</sub> 7. den po výsevu.

## Diskuze

V praktické části předložené bakalářské práce byl studován vliv světelných podmínek a  $\text{HgCl}_2$  na klíčení semen tří různých kultivarů rajčete a jejich recesivních mutantů s mutacemi ve fytochromech. Byla použita semena mutantů *tri1*, *fri1* a *hp* a také jejich nemutované verze, které sloužily k porovnání výsledků. Klíčení semen probíhalo při rozdílných světelných podmínkách, konkrétně ve tmě, na modrém, anebo na červeném světle s předem daným množstvím  $\text{HgCl}_2$ , jakožto známým a používaným inhibitorem akvaporinů (Kjellbom *et al.*, 1999), v kultivačním médiu. Při vyhodnocování výsledků byla sledována maximální klíčivost semen a míra inhibice v závislosti na použité koncentraci  $\text{HgCl}_2$  a zmíněných světelných podmínkách.

Výsledky bakalářské práce ukazují, že semena všech použitých kultivarů rajčete klíčí nejlépe ve tmě. Tento jev je vysvětlován tím, že semena rajčete obsahují v fytochromy ve formě  $P_{fr}$  (Appenroth *et al.*, 2006).

U všech kultivarů bylo pozorováno, že světlo, především modré, snižovalo klíčení semen rajčete. Důvodem by mohla být právě světlem o dané vlnové délce potlačena exprese genů kódujících proteiny zodpovědné za klíčení semen, či jejich inaktivace. Je také možné, že světlo ovlivňuje hladiny hormonů důležitých v procesu klíčení, ABA a gibberelinů. Nedávno bylo například zjištěno, že na modrém světle je během inkubace semen ve vhodných podmínkách katabolismus ABA pomalejší než ve tmě (Pokorná *et al.* 2018).

Provedené experimenty dále ukázaly, že u všech testovaných genotypů je klíčení semen rajčete inhibováno vlivem  $\text{HgCl}_2$  v kultivačním médiu. Z toho plyne závěr, že ve všech světelných podmínkách jsou akvaporiny citlivé k  $\text{HgCl}_2$  nezbytné pro klíčení semen rajčete. Při srovnání účinků  $\text{HgCl}_2$  na klíčení semen jednotlivých mutantů byly zjištěny následující skutečnosti. Ve tmě byla citlivost klíčení semen mutantu *tri1* k inhibitoru  $\text{HgCl}_2$  vyšší než u cv. GT. To znamená, že ve tmě funkční PhyB1 snižoval citlivost semen k  $\text{HgCl}_2$ . Modré i červené světlo výrazně zvyšovalo citlivost klíčení semen k  $\text{HgCl}_2$  u WT. U mutantu *tri1* nebyl tento trend na modrém světle zcela zřetelný a jednoznačný, zatímco na červeném světle ke zvyšování citlivosti semen k  $\text{HgCl}_2$  nedocházelo. Na základě těchto výsledků lze konstatovat, že zvýšení citlivosti semen rajčete k  $\text{HgCl}_2$  vlivem červeného světla (a pravděpodobně i modrého) může být zprostředkováno fotoreceptorem PhyB1. Fakt, že ve tmě je citlivost semen rajčete k  $\text{HgCl}_2$  menší než na modrém a červeném světle, může být vysvětlen např. tím, že světlo

může snižovat množství HgCl<sub>2</sub>-citlivých akvaporinů. Je také možné, že světlo může nějakým způsobem zvyšovat citlivost akvaporinů k HgCl<sub>2</sub>.

Výsledky experimentů s mutantem *fri1* byly jednoznačné. Ve všech světelných podmínkách bylo zjištěno, že semena mutantu *fri1* byla méně citlivá k inhibičnímu účinku HgCl<sub>2</sub>. WT. Na základě těchto výsledků lze vyvodit závěr, že za všech testovaných světelných podmínek funkční PhyA zvyšuje citlivost klíčení semen rajčete k HgCl<sub>2</sub>.

Poslední experimenty byly prováděny s mutantem rajčete *hp*, který vykazuje zesílené fytochromové reakce a zesílený fototropismus. Jako kontrolní rostlina zde sloužila nemutovaná verze cv. Rutgers. Ve tmě byla citlivost semen mutantu *hp* k HgCl<sub>2</sub> mnohem nižší než citlivost semen cv. Rutgers. Ovšem při působení modrého světla se role otáčí a citlivějšími k HgCl<sub>2</sub> se stávají semena mutantu *hp*. Na červeném světla vykazovala semena *hp* a cv. Rutgers podobnou citlivost k inhibitorů akvaporinů HgCl<sub>2</sub>. Výsledky tedy vedou k závěru, že ve tmě funkční protein DDB1 zvyšuje citlivost klíčení semen k HgCl<sub>2</sub>. Naopak na modrém světle, protein DDB1 citlivost semen k HgCl<sub>2</sub> snižuje. Naproti tomu, na červeném světle se změna funkce proteinu DDB1 neprojevuje. Zvýšená citlivost při působení RL oproti působení BL je spojena s vyšším obsahem karotenoidů (především β-karoten a lykopen) v buňkách listů mutantu *hp*.

V návaznosti na získané výsledky je možno navrhnout mechanismus, podle kterého by regulace akvaporinů ve tmě či na světle, prostřednictvím daných fotoreceptorů, mohla fungovat. PhyA i PhyB1 se nacházejí v cytosolu a odtud se po aktivaci světlem přesouvají do jádra. Zároveň při tomto přesunu dochází k úbytku množství PhyA v rostlině celkově (Nagy & Schäfer, 2002). DDB1 je od samého počátku lokalizován v jádře. Mechanismus regulace akvaporinů by mohl vypadat následovně: Světelné záření dopadající na fytochromy způsobí jejich přesun do jádra a změnu konformace. Tato změna má za následek expresi genů, které kódují akvaporiny. Mutace v genu *PHYA* pak může zapříčinit vytvoření menšího počtu akvaporinů nebo zhoršení jejich funkce, což může vést k vyšší reakci k relativně nižší koncentraci HgCl<sub>2</sub>. Ve tmě se fytochrom PhyA nachází v cytosolu buňky ve své biologicky neaktivní formě P<sub>r</sub>. Pokud víme, že mutace v genu *PHYA* snižuje citlivost semen k HgCl<sub>2</sub> za podmínek modrého i červeného záření, pak ve tmě biologicky neaktivní mutovaná forma fytochromu PhyA také způsobuje sníženou citlivost semen mutantu *fri1* k HgCl<sub>2</sub>. Světlem indukovaný přesun a konformační změna PhyB1 může vést k expresi genů, které kódují proteiny zodpovědné za fosforylaci serinových zbytků akvaporinů. Důsledkem může být uzavření akvaporinů. Mutace genu *PHYB1* může vyvolat tutéž reakci, a proto lze pozorovat zvýšenou citlivost semen mutantu *tri1* k HgCl<sub>2</sub>. V této práci se však

projevovala vysoká míra variability při klíčení semen mutanta na BL a RL a změny v klíčivosti semen byly pozorovány jen ve tmě. Protein DDB1 působí jako negativní regulátor přenosu světelného signálu. Mutace DDB1 způsobuje silnou indukci enzymů vyvolanou světlem a může tak zapříčinit vznik většího počtu akvaporinů. Pro potvrzení, či vyvrácení této hypotézy jsou ovšem zapotřebí biochemické či molekulární testy. Pro potvrzení by se také měl vyloučit nesespecifický účinek iontů rtuti, které jsou obsažené v inhibitoru HgCl<sub>2</sub>.

## Závěr

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou fotoreceptory fytochromy zapojeny v regulaci akvaporinů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L.

Pro dosažení cíle byl využitý farmakologický přístup, kdy se pracovalo se známým inhibitorem akvaporinů HgCl<sub>2</sub>. Genetický přístup spočíval v práci s mutanty rajčete ve fotoreceptorech a jimi odpovídajícími kultivary. Konkrétně byli použiti mutanti *tril* (cv. GT), *fril* (cv. MM) a *hp* (cv. Rut). Byla provedena analýza klíčení těchto mutantů ve tmě, na modrém a červeném světle v *in vitro* podmínkách.

Výsledky všech experimentů ukazují, že akvaporiny citlivé na HgCl<sub>2</sub> jsou zapojeny v procesu klíčení semen. Bylo zjištěno, že jejich zapojení nesouvisí jen s působením modrého či červeného světla, ale jsou zapojeny i do procesu klíčení semen ve tmě. Výsledky bakalářské práce naznačují, že funkční PhyB1 ve tmě snižuje citlivost klíčení semen k HgCl<sub>2</sub>, také že funkční PhyA zvyšuje citlivost semen k HgCl<sub>2</sub>, a to za všech testovaných světelných podmínkách. Výsledky rovněž vedou k závěru, že ve tmě funkční protein DDB1 zvyšuje citlivost klíčení semen k HgCl<sub>2</sub>, a naopak na modrém světle, protein DDB1 citlivost semen k HgCl<sub>2</sub> snižuje. Na základě výsledků byl navržen mechanismus, na jehož základě by mohla být tato citlivost založena.

## Seznam zkratek

AQP1	akvaporin 1
ATP	adenosintrifosfát
BL	<i>blue light</i> , modré světlo
cv. MM	kultivar Money Maker
cv. Rut	kultivar Rutgers
D	<i>dark</i> , tma
DDB1	<i>UV-damaged DNA-binding protein 1</i>
FAD	flavinadenindinukleotid
FR	<i>far-red light</i> , dlouhovlnné červené světlo
<i>fri1</i>	<i>far-red-insensitive 1</i>
<i>hp</i>	<i>high pigment</i>
LOV	<i>light/oxygen/voltage</i> doména
MES	<i>morpholinoethane sulfonic acid</i>
MIP	<i>major intrinsic proteins</i>
MS médium	Murashige & Skoog médium
MTHF	methenyltetrahydrofolát
NIP	<i>nodulin-like intrinsic proteins</i>
P <sub>fr</sub>	<i>far-red light-absorbing form of phytochrome</i> , biologicky aktivní forma fytochromu
PHR	<i>photolyase-related</i> doména
Phy	fytochrom
PIP	<i>plasma membrane intrinsic proteins</i>
P <sub>r</sub>	<i>red light-absorbing form of phytochrome</i> , biologicky neaktivní forma fytochromu
RL	<i>red light</i> , červené světlo
SE	<i>standard error</i> , standardní chyba
SIP	<i>small basic intrinsic proteins</i>
STK	<i>serin/threonin kinasa</i>
TIP	<i>tonoplast intrinsic proteins</i>
<i>tri1</i>	<i>temporarily red light-insensitive 1</i>
UVA	dlouhovlnné ultrafialové záření
UVB	středněvlnné ultrafialové záření
WT	<i>wild type</i> , standardní (kontrolní) genotyp



## Literatura

Abascal F., Irisarri I., Zardoya R. (2014): Diversity and evolution of membrane intrinsic proteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 5, 1468–1481.

Albrechtová J., Sedlecký L., Čížková V. (2007): Fotomorfogeneze – teoretické základy pro výuku biologie rostlin na školách. *Biologie. Chemie. Zeměpis* [online]. 26(4), 26-37 [cit. 2019-01-14]. DOI: 10.14712/25337556.2017.4.3. ISSN 2533-7556. Dostupné z: <http://bichez.pedf.cuni.cz/archiv/article/45>.

Alleva, K., Niemetz, C. M., Sutka, M., Maurel, C., Parisi, M., Tyerman, S. D., Amodeo, G. (2006): Plasma membrane of *Beta vulgaris* storage root shows high water channel activity regulated by cytoplasmic pH and a dual range of calcium concentrations. *Journal of Experimental Botany* 57, 609-621.

Appenroth K. J., Lenk G., Goldau L., Sharma R. (2006): Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant, Cell & Environment* 29, 701–709.

Bewley J. D. (1997): Seed germination and dormancy. *Plant Cell* 9, 1055-1066.

Carvajal M., Cooke D.T., and Clarkson D.T. (1996): Responses of wheat plants to nutrient deprivation may involve the regulation of water-channel function, *Planta* 199, 372-381.

Carvalho R. F, Takaki M., Azevedo R. A. (2011): Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum* 33, 241-248.

Daniels M.J., Mirkov T.E., Chrispeels M.J. (1994): The plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* contains a mercury-insensitive aquaporin that is a homolog of the tonoplast water channel protein TIP. *Plant Physiology* 106, 1325-1333.

Debrieux D., Fankhauser C. (2010): Light-induced degradation of phyA is promoted by transfer of the photoreceptor into the nucleus. *Plant Molecular Biology* 73(6), 687-695.

Fenner, M., Thomson K. (1998): *The ecology of seeds*. New York, NY, USA: Cambridge University Press. ISBN 0521-65311-8.

Franklin, K. (2003): Phytochromes B, D, and E Act Redundantly to Control Multiple Physiological Responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, 131, 1340–1346.

Franklin, K., Quail, P. (2009): Phytochrome functions in *Arabidopsis* development. *Journal of Experimental Botany*, 61, 11–24.

Freeman W.H. (2005): *Biology of plants*, 7th ed., New York, USA, ISBN 0-7167-1007-2.

Georghiou K., Kendrick R. (1991): The germination characteristics of phytochrome-deficient aurea mutant tomato seeds. *Physiologia Plantarum* 82, 127-133.

Gerbau P., Gulcu J., Ripoche P., Maurel C. (1999): Aquaporin Nt-TIPa can account for the high permeability of tobacco cell vacuolar membrane to small neutral solutes. *Plant Journal* 18, 577-587.

Hauser B.A., Cordonnier – Pratt, M.-M., Daniel-Vedele F., Pratt L.H. (1995): The phytochrome gene family in tomato includes a novel subfamily. *Plant Molecular Biology* 29, 1143-1155.

- Hertel R., (1980): Photoreception and Sensory Transduction in Aneural Organism. *Plenum*, New York.
- Chaumont F., Barrieu F., Wojcik E., Chrispeels M.J., Jung R. (2001): Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol.* 125, 1206-1215.
- Chaumont F., Moshelion M., Daniels M. J. (2005): Regulation of plant aquaporin activity, *Biology Cell* 97, 749–764.
- Chen M, Chory J. (2011): Phytochrome signalling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology* 21, 664–671.
- Christie J. M., Blackwood L., Petersen J., Sullivan S. (2015): Plant flavoprotein photoreceptors. *Plant and Cell Physiology* 56, 401-413.
- Jablonský I., (2005): *Pěstujeme klíčící osivo a výhonky*, Grada, Praha, ISBN 80-247–1114-1.
- Kaldenhoff R., Grote K., Zhu J. J., Zimmermann U. (1998): Significance of plasmalema aquaporins for water-transport in *Arabidopsis thaliana*, *Plant Journal.* 14, 121-128.
- Kaldenhoff R., Fischer M. (2006): Aquaporins in plants, *Acta Physiology* 187, 169–176.
- Kjellbom P., Larsson C., Johansson I., Karlsson M., Jophanson U. (1999): Aquaporins and water homeostasis in plants. *Trends Plant Science* 4, 3089–314
- Lack A., Evans D. E. (2005): *Plant biology. 2nd ed.*, Taylor & Francis, New York, ISBN 0-415-35643-1.
- Liu H., Liu B., Zhao C., Pepper M., Lin C. (2011): The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* 16, 684-691.
- Liu L.H., Ludewig U., Gassert B., Frommer W.B. and von Wiren N. (2003): Urea transport by nitrogen- regulated tonoplast intrinsic proteins in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 133, 1220-1228.
- Luu D.T., Maurel C. (2005): Aquaporins in a challenging environment: molecular gears for adjusting plant water status. *Plant Cell And Environment* 28, 85-96.
- Martre P., Morillon R., Barrieu F., North G. B., Nobel P. S., Chrispeels M. J. (2002): Plasma membrane aquaporins play a significant role during recovery from water deficit. *Plant Physiology* 130, 2101-2110.
- Mathews S. (2010): Evolutionary Studies Illuminate the Structural – Functional Model of Plant Phytochromes. *The Plant Cell* 22, 4–16.
- Maurel C. (2007): Plant aquaporins: Novel functions and regulation properties *FEBS Letters* 581, 2227-2236.
- Montgomery B.L., Lagarias J.C. (2002): Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. *Trends in Plant Science* 7, 357–366.
- Murata K., Mitsuoka K., Hirai T., Walz T., Agre P., Heymann J.B., Engel A., Fijiyoshi Y. (2000): Structural determinants of water permeation through aquaporin-1. *Nature* 407, 599–605.
- Nagy F, Schäfer E. (2002): Phytochromes control photomorphogenesis by differentially regulated, interacting signaling pathways in higher plants. *Annual Review Plant Biology* 53, 329–355.

- Niemetz C.M., Tyerman S.D. (1997): Characterization of water channels in wheat root membrane vesicles. *Plant Physiology* 155, 561-567.
- Parks B. (2003): The red side of photomorphogenesis. *Plant Physiology*, 133, 1437–1444.
- Pavlová L., Daněk L. (2002): Fotomorfogeneze I. Kryptochromy a fototropin. *Biologické listy* 67, 195-205.
- Perrotta G., Yahoubyan G., Nebuloso E., Renzi L., Giuliano G. (2001): Tomato and barley contains duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant Cell And Environment* 24, 991–997.
- Pokorná P., Turečková V., Strnad M., Fellner M. (2018): Interaction between blue light and ABA during tomato seed germination. VISCEA, *Plant Physiology & Biochemistry*, July 9-10, 2018
- Pratt L.H., Cordonnier-Pratt M.-M., Kelmenson P.M., Lazarova G.I. & Alba R.M. (1997): The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.) *Plant, Cell and Environment*.
- Procházka, S. (1998): Fyziologie rostlin. Praha: Academia, ISBN 8020005862.
- Quail PH. (2002): Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion. Cell Biology* 14, 180-188.
- Russell J., Ougham H., Thomas H., Waaland S. (2013): *The Molecular Life of Plants*. American Society of Plant Biologists, ISBN 0470870125
- Shinomura T., Nagatani A., Chory J., Furuya M. (1994): The induction of seed germination in *Arabidopsis thaliana* is regulated principally by phytochrome B and secondarily by phytochrome A. *Plant Physiology* 104, 363-371.
- Taiz L., Zeiger E. (2010): *Plant physiology*, 5th Ed., Sinauer Associates, Inc., USA, ISBN 0878938664
- Taiz L, Zeiger E, Moller I. M, Murphy A. (2015): *Plant Physiology and Development*, 6th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates, ISBN 1605353531
- Takemiya A., Inoue S., Doi M., Kinoshita T., Shimazaki K. (2005): Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *Plant Cell* 17, 1120-1127.
- Tyerman S.D., Niemetz C.M., Bramley H. (2002): Plant aquaporins: Multifunctional water and solute channels with expanding roles. *Plant Cell And Environment* 25, 173–194.
- Vander Willigen C., Postaire O., Tournaire-Roux C., Boursiac Y., Maurel C. (2006): Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant & Cell Physiology* 47, 1241–1250.
- Weaver C.D., Roberts D.M. (1992): Determination of the site of phosphorylation of nodulin-26 by the calcium-dependent protein-kinase from soybean nodules. *Biochemistry* 31, 8954-8959.
- Weller J. L., Batge S. L., Smith, J. J., Kerckhoffs L. H. J., Sineshchekov V. A., Murfet, I. C., Reid J. B. (2004): A Dominant Mutation in the Pea PHYA Gene Confers Enhanced Responses to Light and Impairs the Light-Dependent Degradation of Phytochrome A. *Plant Physiology*, 135, 2186–2195.

Yuxiang L., Deng H., Miao M., Li H., Huang S., Wang S., Liu Y (2016): Tomato MBD5, a methyl CpG binding domain protein, physically interacting with UV-damaged DNA binding protein-1, functions in multiple processes. *New Phytologist* 210, 208-226.

Zoltowski B. D., Imaizumi T. (2014): Structure and Function of the ZTL/FKF1/LKP2 Group Proteins in Arabidopsis. *Enzymes* 35, 213-39.