



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**

**Úloha fytochromů v regulaci iontových kanálů  
během klíčení semen**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor:	<b>Věra Bubeníková</b>
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.</b>
Termín odevzdání práce:	2017

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Věra Bubeníková
Název práce	Úloha fytochromů v regulaci iontových kanálů během klíčení semen
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

**Abstrakt**

Předmětem bakalářské práce bylo studium problematiky zapojení aniontových kanálů v klíčení semen a regulace tohoto procesu světlem v podmínkách *in vitro*. Cílem experimentální části bakalářské práce bylo zjistit, zda světlo ovlivňuje aktivitu aniontových kanálů v průběhu klíčení semen rajčete. Experimentální strategií byl genetický přístup, spočívající ve studiu citlivosti klíčení semen fotomorfogenních mutantů *fri1* a *hpl* rajčete jedlého (*Solanum lycopersicum* L.) k inhibitorům iontových kanálů (NIF a 9-AC) v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré světlo a červené světlo). Výsledky vedly k závěrům, že aniontové kanály citlivé k NIF jsou důležité pro klíčení semen rajčete za všech testovaných světelných podmínek, kdežto 9-AC se zdá být zapojen v klíčení semen pouze na světle. Z výsledků rovněž vyplývá, že modré i červené světlo ovlivňuje aniontové kanály citlivé k NIF a 9-AC, přičemž je v tomto procesu zapojen fotoreceptor phyA a protein DDB1, který je součástí proteinového komplexu CDD spojeného s E3 ubiquitin ligázou COP1.

Klíčová slova	fytochrom, inhibitor, iontový kanál, klíčení, semeno
Počet stran	51
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Věra Bubeníková
Title of thesis	Role of phytochromes in regulation of anion channels during seed germination
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2017

**Abstract**

The subject of this bachelor thesis was to study the problems of involvement of anion channels in the seed germination and regulation of this process by light in conditions *in vitro*. The aim of the experimental part of the thesis was to determine whether light affects the activity of anion channels during tomato seed germination. The genetic approach consisting in the study of sensitivity of seed germination of tomato (*Solanum lycopersicum* L.) photomorphogenic mutants *fri1* and *hp1* to inhibitors of anion channels (NIF and 9-AC) as a function of light conditions (dark, blue light and red light) was used as an experimental strategy. Results led to the conclusions that NIF-sensitive anionic channels are important for the germination of tomato seeds under all tested light conditions, whereas inhibitor 9-AC seems to be involved in seed germination only in light. The results also show that blue and red light affect NIF and 9-AC sensitive anion channels, while photoreceptor phyA and protein DDB1, which is part of the CDD complex associated with E3 ubiquitin ligase COP1, are involved in this process.

Keywords	anion channel, germination, inhibitor, phytochrome, seed
Number of pages	51
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením Prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s využitím citované literatury.

V Olomouci dne 18.5.2017

## Obsah:

Seznam zkratek .....	7
1 Úvod .....	8
2 Současný stav řešené problematiky .....	9
2.1 Klíčení semen .....	9
2.2 Klíčení a světlo .....	9
2.3 Fotoreceptory .....	10
2.3.1 Fytochromy .....	11
2.3.2 Kryptochromy .....	12
2.3.3 Fototropiny .....	13
2.3.4 Mutanti <i>fri1</i> a <i>hp1</i> ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	14
2.4 Iontové kanály .....	15
2.4.1 Struktura a funkce kanálů .....	17
2.4.2 Inhibitory kanálů .....	19
2.5 Regulace kanálů světlem .....	21
3 Materiál a metodika .....	23
3.1 Rostlinný materiál .....	24
3.2 Příprava MS média .....	24
3.3 Koncentrace inhibitorů iontových kanálů .....	24
3.4 Sterilizace a výsev semen .....	25
3.5 Hodnocení klíčení .....	26
4 Výsledky .....	27
4.1 Klíčení semen ovlivněné kvalitou světla a inhibitorem NIF .....	27
4.2 Klíčení semen ovlivněné kvalitou světla a inhibitorem 9-AC .....	33
5 Diskuze .....	34
6 Závěr .....	38
Citovaná literatura .....	39

Mé poděkování patří prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, ochotu, čas a pomoc, kterou mi v průběhu vypracování bakalářské práce poskytl. Chtěla bych také poděkovat kolektivu Skupiny molekulární fyziologie za příjemné pracovní prostředí, vstřícnost a spolupráci.

## Seznam zkratek

ABA	<i>abscisic acid</i> , kyselina abscisová
BL	<i>blue light</i> , modré světlo
CAB	<i>chlorophyll a/b-binding protein</i>
CLC	<i>chloride channels</i> , chloridové kanály
CRY	krytochrom
D	<i>dark</i> , tma
FR	<i>far-red light</i> , dlouhovlnné červené světlo
Fri	<i>far-red light insensitive</i>
Hp	<i>high pigment</i>
LOV	<i>light, oxygen or voltage</i> doména
mRNA	<i>messenger RNA</i> , mediátorová RNA
MS médium	Murashige a Skoog médium
NIF	<i>niflumic acid</i> , kyselina niflumová
NPPB	<i>5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid</i>
Pfr	<i>far-red light-absorbing form of phytochrome</i> , biologický aktivní forma fytochromu
Phot	fototropin
Phy	fytochrom
Pr	<i>red light-absorbing form of phytochrome</i> , neaktivní forma fytochromu
RL	<i>red light</i> , červené světlo
WT	<i>wild type</i> , standardní genotyp
9-AC	<i>9-anthracenecarboxylic acid</i> , kyselina anthracen-9-karboxylová

# 1 Úvod

Cílem práce bylo studium zapojení aniontových kanálů v procesu klíčení semen rajčete a úlohy fotoreceptorů červeného světla v tomto procesu. K tomu byl použit genetický přístup, spočívající v analýze fotomorfogenních mutantů a farmakologický přístup spočívající ve studiu účinků inhibitorů aniontových kanálů na klíčení semen.

V teoretické části byly shromážděny literární zdroje vztahující se k tématu bakalářské práce, a to především literatura týkající se problematiky aniontových kanálů a klíčení semen a jejich regulace světlem. Na základě těchto poznatků byla vypracována literární rešerše na dané téma.

V experimentální části byly provedeny experimenty, jejichž cílem bylo studium citlivosti klíčení semen mutantů *fri1* a *hpl* rajčete *Solanum lycopersicum L.* k inhibitorům iontových kanálů v závislosti na světelných podmínkách.

Bakalářské práce byla prováděna v Laboratoři růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci, konkrétně ve Skupině molekulární fyziologie pod vedením Prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.



## 2 Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Klíčení semen

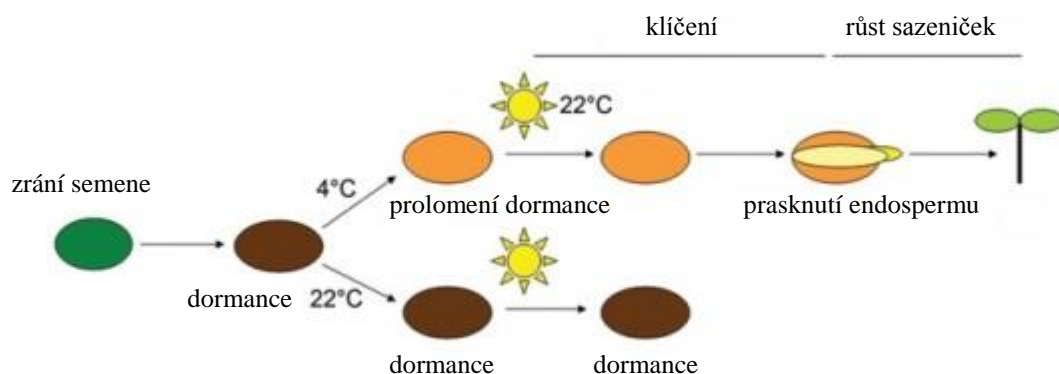
Klíčení semen je počáteční vývojový proces životního cyklu rostlin. Semena jsou výsledné produkty rostlinné reprodukce a jejich hlavní funkcí je tvorba nové generace rostlin a usnadnění jejich rozšíření (Bewley 1997; Lee et al., 2015). Na samotném počátku stojí embryonální vývoj (též embryogeneze) semen, který je u kvetoucích druhů rostlin zahájen dvojím oplozením (Gehring et al., 2004; Berger et al., 2008). Na konci tohoto embryonálního vývoje dochází k nahromadění makromolekul, jako jsou lipidy nebo proteiny v děložních lístcích a k pozastavení buněčného cyklu v embryu (Goldberg et al., 1989; Raz et al., 2001). Tato fáze bývá označována jako fáze zrání semen a dehydratovaná semena se následně stávají dormantními. Nachází se v klidovém stavu, který je odolný k jejich vysychání (McCarty and Carson, 1991). Ve stavu dormance je klíčení životaschopných semen v příznivých podmínkách pozastaveno a stav dormance může být prolomen například stratifikací (Bentsink and Koornneef, 2008). Samotný proces klíčení zahrnuje procesy začínající příjmem vody semenem a končící prodlužováním zárodečné osy (Bewley and Black, 1994). Prvotní fází je příjem vody semeny, následuje absorpce a nasávání vody a viditelným znakem ukončení klíčení je penetrace neboli průnik kořínku strukturami obklopujícími embryo. Výsledek je označován jako tzv. viditelné klíčení (Bewley, 1997).

### 2.2 Klíčení a světlo

Klíčení semen u vyšších rostlin je komplexní proces, který je ovlivněn řadou vnějších faktorů, jako je vlhkost, teplota, dostatečný přísun kyslíku, výživné látky a světlo. Světlo hraje v regulaci klíčení semen důležitou roli především u druhů rostlin s malými semenáčky jako je *Arabidopsis thaliana* (Seo et al., 2009).

Zatímco některá semena pro své klíčení požadují pouze rehydrataci, dormantní semena potřebují ke svému klíčení vnější podnět jako je např. světlo. Příkladem takových rostlin je *Arabidopsis thaliana*, *Lactuca sativa*, *Oryzopsis miliacea*, kdy u těchto druhů rostlin je klíčení vyvoláno nebo podporováno světlem. Zatímco například u rajčete je

klíčení indukováno i rehydratací ve tmě. Citlivost semen rajčete ke světlu je omezena na 3 až 16 hodin od počátku rehydratace. Hlavní roli při vnímání světla k vyvolání klíčení hraje skupina fotoreceptorů - fytochromy. Existence fytochromů ve fyziologicky aktivní formě (Pfr) umožňuje odpověď semen na světelné podmínky a je rozhodujícím faktorem pro klíčení rostlin. Z hlediska načasování klíčení semen hraje důležitou roli antagonistické působení dvou fytohormonů, gibberellinů a kyseliny abscisové (ABA), kdy gibberelliny stimulují klíčení semen, zatímco kyselina abscisová celý klíčící proces inhibuje (Bewley and Black, 1994; Casal and Sanchez, 1998; Appenroth et al., 2006).



**Obrázek č. 1:** Klíčení semen *Arabidopsis Cvi*. Počáteční stav primární dormance semen se objevuje při procesu zrání semen. Suchá a zralá semena jsou dormantní a v tomto stavu při teplotě 22 °C setrvávají po dobu až 14 dní. Dormance může být prolomena stratifikací, pokud se semena nachází v dostatečně vlhkém prostředí se sníženou teplotou vzduchu (4 °C). Pokud je dormance prolomena, za přítomnosti světla mohou semena klíčit, což vede k penetraci kořínku. Právě penetrace signalizuje ukončení klíčení a následuje proces růstu sazenic (upraveno a převzato z Müller et al., 2012).

## 2.3 Fotoreceptory

Velikost a množství viditelného světla ovlivňuje celou řadu biologických procesů. Fotosyntéza je hlavním procesem vyjadřujícím vztah mezi světlem a vývojem rostlin. Světlo však není rostlinami využíváno pouze jako zdroj energie pro biologické procesy jako je fotosyntéza, ale rostliny využívají světlo také jako vnější signál pro vývoj rostlin v procesu zvaném fotomorfogeneze. U rostlin se vyvinul vysoce propracovaný systém drah, které přenáší světelný signál iniciovaný fotoreceptory, které charakterizujeme podle vlnových délek světla, jež vnímají. Vyšší rostliny si vyvinuly dvě hlavní skupiny fotoreceptorů. Fytochromy absorbující červené a dlouhovlnné červené světlo, tj. světlo v rozmezí vlnových délek 600-750 nm. Druhá skupina zahrnuje fotoreceptory modrého

světla, kam řadíme kryptochromy absorbující modré a UV-A světlo, tj. světlo dosahující vlnových délek 320-500 nm a fototropiny, které stejně jako kryptochromy absorbují modré světlo (Sullivan and Deng, 2003; Carvalho et al., 2011).

### 2.3.1 Fytochromy

Fytochromy řadíme mezi fotoreceptory, jejichž maximální absorpce se nachází v oblasti červeného a dlouhovlnného červeného světla (z angl. red/far-red) (Carvalho et al., 2011). Z hlediska struktury jsou fytochromy složeny z apoproteinů a kovalentně vázaného lineárního tetrapyrrolového chromoforu. Tyto pigmentované proteiny existují ve dvou spektrálně odlišných formách a podstupují fotoreversibilní přeměnu mezi těmito formami. První forma absorbující červené světlo je označována jako Pr a druhá forma absorbující dlouhovlnné červené světlo je označována jako Pfr. Přechod z Pr do Pfr formy indukuje velké množství morfologických procesů, opačný přechod nikoliv. Tedy pouze Pfr formu fytochromu lze považovat za biologicky aktivní (Chory et al., 1996; Yamaguchi et al., 1999).

U modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* byly popsány fytochromy phyA-E, kódované specifickými geny. Bylo zjištěno, že mutanti deficientní ve phyA a phyB mají rozdílné chování a jsou funkčně odlišné od skupiny fytochromů phyC, phyD a phyE (Yamaguchi et al., 1999).

Úlohou fytochromů je také kontrola fyziologických procesů, kdy můžeme rozlišit biologické odpovědi rostlin indukované vlivem červeného světla a odpovědi indukované ozářením pomocí dlouhovlnného červeného světla (Yamaguchi et al., 1999).



**Obrázek č. 2:** Princip změny konformace fytochromu: Biologicky neaktivní forma fytochromu (Pr), je při osvětlení červeným světlem převedena na formu biologicky aktivní (Pfr) a v tomto případě dochází k buněčné odpovědi. Dlouhovlnným červeným světlem a tmou dochází ke zpětnému převedení fytochromu na biologicky neaktivní formu a v tomto případě k žádné buněčné odpovědi nedochází (upraveno a převzato z Koning, 1994).

### 2.3.2 Kryptochromy

Kryptochromy řadíme mezi fotoreceptory, jejichž maximální absorpce se nachází v oblasti modrého a UV-A světla (Lin and Todo, 2005). Strukturně se kryptochromy řadí mezi flavoproteinové fotoreceptory, které vykazují vysokou podobnost s flavoproteiny, katalyzujícími opravu DNA, fotolyasami. Přestože s těmito opravnými enzymy sdílí kryptochromy velké množství identických sekvencí, schopnost opravy DNA kryptochromy nemají a mechanismus jejich signálních drah dosud není zcela přesně znám (Perrota et al., 2000; Partch et al., 2005; Chaves et al., 2011).

Velké množství fotoreceptorů je rostlinami využíváno k vnímání změny množství a kvality světla, k regulaci jejich vývoje a růstu. Kryptochromy se jako fotoreceptory modrého světla vyskytují u řady organismů, jako jsou například rostliny, bakterie a živočichové, kde regulují velké množství biologických odpovědí. Mezi takové odpovědi patří pohyby rostlin, otevírání průduchů nebo fotomorfogeneze (Giliberto et al., 2005; Partch et al., 2005).

V roce 1993 došlo k objevu kryptochromů (CRYs) u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, kde mají tyto flavoproteiny klíčovou roli v růstu a vývoji rostliny. Bylo například zjištěno, že CRYs mají schopnost regulovat transkripci v podmínkách modrého záření přímou a nepřímou aktivací (Li et al., 2007; Yang et al., 2017). *Arabidopsis thaliana* jako modelová rostlina obsahuje ve svých buňkách kryptochromy CRY1 a CRY2, které se v rostlinných buňkách vyskytují jako dimery, jejichž správné uskupení je nezbytné pro funkci CRYs. Tyto kryptochromy jsou lokalizované v jádře a cytoplazmě na rozdíl od CRY3, jejichž lokalizace je v organelách (Kleine et al., 2003; Lin and Shalitin, 2003; Li et al., 2007). Společnou funkcí CRY1 a CRY2 je inhibice prodlužování hypokotylu u rostlin a kontrola fotomorfogeneze. CRY2 má navíc funkci kontroly kvetení za světla, při níž byl objeven (Guo et al., 1998; Lin et al., 1998; Lin and Shalitin, 2003; Giliberto et al., 2005).

V průběhu sledování chování mutantu *Arabidopsis thaliana* při různých světelných podmínkách bylo zjištěno, že pokud mutant roste na modrém nebo UV-A světle, jeho hypokotyl je dlouhý. Oproti tomu chování mutantu v podmínkách červeného a dlouhovlnného červeného světla je zcela jiné. Pokud mutant roste v těchto světelných podmínkách, chová se jako kontrolní rostlina a dochází u něj k inhibici růstu hypokotylů, kdy tato inhibice je vyvolána fytochromy (Li et al., 2007). U rajčete byla charakterizována genová rodina kryptochromů sestávající ze 4 skupin (CRY1, CRY1b, CRY2, CRY3).

Právě gen *CRY1* u rajčete kóduje protein, který prokazuje velmi vysokou podobnost a identitu s genem *CRY1* u *Arabidopsis thaliana*. Kryptochromové geny řadíme mezi poměrně novou skupinu rostlinných genů, které jsou zodpovědné za různorodé odpovědi organismů na modré světlo (Ninu et al., 1999; Giliberto et al., 2005).

### 2.3.3 Fototropiny

Fototropiny řadíme mezi fotoreceptory, jejichž maximální absorpce se nachází v oblasti modrého světla. Tyto fotoreceptory reprezentují poměrně novou skupinu protein kináz, které mají pro rostliny velký význam. Spolu s fytochromy patří mezi hlavní fotosenzitivní fotoreceptory a důležitou roli hrají především v kontrole mechanických procesů rostlin jako je pohyb a akumulace chloroplastů, otevírání průduchů a fototropismus (Briggs and Christie, 2002; Carvalho et al., 2011; Liscum et al., 2014).

Všechny tyto biologické odpovědi na modré světlo slouží k optimalizaci průběhu fotosyntézy rostlin. Optimalizace je dosaženo ziskem světelné energie a ziskem oxidu uhličitého (Takemiya et al., 2005). Schopnost fototropinů vnímat světlo je zprostředkováno pomocí tzv. LOV (*light, oxygen, or voltage*) domény na N-terminálním konci proteinu. Právě fotoexcitace LOV doménou zahajuje fototropismus a rozhoduje o autofosforylaci receptoru (Christie, 2007). Vnímání světla pomocí fototropinů u *Arabidopsis thaliana* je zprostředkováno především LOV2 doménou (Sullivan et al., 2016).

V roce 1997 byl izolován gen PHOT1 u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*. Tato rostlina obsahuje dva fototropiny - PHOT1 a PHOT2, jejichž funkce se vzájemně částečně překrývají v závislosti na různých fyziologických procesech (Briggs and Christie, 2002; Christie, 2007). Velká většina biologických odpovědí je řízena současně PHOT1 a PHOT2 (Kinoshita et al., 2001; Sakamoto and Briggs, 2002), ovšem mohou nastat situace, kdy některé odpovědi jsou řízeny pouze jedním z fototropinů (Sakai et al., 2001; Suetsugu et al. 2005). Odpovědi řízené PHOT1 mohou být negativně regulovány pomocí PHOT2 (de Carbonnel et al., 2010) a naopak (Harada et al., 2003, 2013).

PHOT1 i PHOT2 regulují fototropismus hypokotylů u rostlin. Fototropismus umožňuje rostlinám ohyb za světlem vnímáním intenzity světla, vlnové délky světla a jeho směru. Bylo zjištěno, že PHOT1 i PHOT2 regulují fototropismus v závislosti na rozdílných intenzitách modrého světla (Inada et al., 2004; Zhao et al., 2013). Tyto fotoreceptory zprostředkovávají odpovědi zvyšující fotosyntetickou aktivitu rostlin v závislosti na nízké intenzitě modrého světla a odpovědi snižující poškození rostlin v závislosti na vysoké

intenzitě modrého světla (Ishishita et al., 2016). S využitím mutantů *Arabidopsis thaliana* s poruchou ve fototropismu (Huala et al., 1997) bylo zjištěno, že PHOT2 je zodpovědný za fototropní ohyby v závislosti na vysoké intenzitě modrého světla a naopak PHOT1 je k tomuto světlu více citlivý (Sakai et al., 2001; Takemiya et al., 2005). Bylo zjištěno, že ve tmě jsou fototropiny lokalizovány na plazmatické membráně a po ozáření je určitá část fototropinů přemísťována z plazmatické membrány do cytoplazmy, přičemž jejich funkce v cytoplazmě nebyla dosud objasněna (Sakamoto and Briggs, 2002; Knieb et al. 2004; Preuten et al., 2015). Oba fototropiny jsou také zapojeny v otevírání průduchů rostlin a zvětšování listů, u kterých zprostředkovávají jejich orientaci a postavení (Aggarwal et al., 2014; Liscum et al., 2014).

#### **2.3.4 Mutanti *fri1* a *hp1* (*Solanum lycopersicum* L.)**

U rajčete (*Lycopersicon esculentum*) bylo popsáno několik fotomorfogenetických mutantů. Mutanti nesoucí monogenetickou, recesivní *hp* (*hp1*, *hp1w*, *hp2*,...) mutaci (z angl. high-pigmented), jsou charakterizováni jejich zvýšenou odpovědí ke světlu (Bino et al., 2005) a vykazují defekt v genu DDB1 (*Damaged DNA Binding protein 1*) (Caspi et al., 2008). Tito mutanti mají kratší hypokotyly a vyšší množství antokyaninů v semenáčcích rostlin rostoucích na světle (Peters et al., 1992; Kerckhoffs et al., 1997a). Mají také silnější pigmentaci listů ve srovnání s kontrolní rostlinou WT. Původně byly *hp1* mutace zřejmě jako poškození ve strukturních genech biosyntetických drah karotenoidů (Stevens and Rick, 1986). *Hpl* mutant byl prvně identifikován v roce 1917 (Reynard, 1956). I přesto, že povaha mutace je stále nejasná, detailní fyziologická charakterizace *hp1* mutanta poskytuje cenný přehled procesů uvnitř signálních cest fytochromu. Mutant *hp1* vykazuje vyšší CAB genovou expresi oproti WT ve tmě, po ozáření RL a v perikarpu nezralého ovoce. Nicméně v rostlinných pletivech semenáčků rostoucích na světle se CAB mRNA akumulace mezi WT a mutantem nerozlišuje. Mutant *hp1*, postrádající určitého člena specifické fytochromové rodiny, byl izolován z několika rostlinných druhů, například *Arabidopsis thaliana*, rajče (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Van Tuinen et al., 1995a) a hrách (Weller et al., 1995). Tito mutanti jsou skvělým nástrojem pro studium funkčnosti různých členů fytochromové rodiny (Peters, 1998). Bylo zjištěno, že *hp1* představuje mutaci rajčete, homologní s lidským genem a genem *A. thaliana*, který kóduje DDB1 multifunkční protein (Lieberman et al., 2004; Iovine et al., 2011). Semena tohoto mutanta klíčí velmi dobře ve tmě, při dostatku vody, zatímco pod vlivem FR zůstávají v nevyklíčeném stavu po několik

dní (Shichijo et al., 2001). Vysoká produkce karotenoidů, lykopenů a zvýšené množství kyseliny askorbové je charakteristické pro *hp* mutanty. Navíc fotoindukce některých enzymů je silnější u *hp1* mutantů než u kontrolní rostliny. Bylo tedy zjištěno, že *hp1* mutant zdůrazňuje odpovědi fytochromů (Kerckhoffs and Kendrick, 1997; Peters, 1998).

*Fri1* (z angl. far-red light insensitive) mutanti vykazují deficienci ve PhyA. Dospělé rostliny *fri* mutantů vykazují opožděný růst a mají sklony k vadnutí, ale vykazují normální odpověď na FR a to prodlužování. Při selekci dvou recesivních mutantů rajčete s delšími hypokotyly než u WT v rozdílných podmínkách (nižší a vyšší frekvence BL) se tyto dva mutanti ukázali jako aleličtí a další analýzy prokázaly, že růst hypokotylů byl nesenzitivní na FR. U mutantů *fri* chybí PhyA, ale PhyB je přítomen v normálním množství. Inhibice hypokotylového růstu pomocí R pulzů každé 4 hodiny je kvantitativně podobné u mutantů *fri* a u WT a efekt je do značné míry vratný, pokud jsou pulzy R ihned následovány FR pulzy. Během experimentu, kdy byli mutanti *fri* i kontrolní rostliny WT nejprve kultivovány ve tmě a poté v podmínkách FR po dobu 7 dní bylo zjištěno, že mutanti *fri* jsou rezistentní k FR. Semena těchto mutantů v podmínkách FR de-etiolizovaly na rozdíl od WT, jejichž semena v těchto podmínkách etiolizovaly (Van Tuinen et al., 1995b).

## 2.4 Iontové kanály

Iontové kanály řadíme mezi integrované membránové proteiny, které mají schopnost transportovat anionty skrz póry cytoplazmatické membrány. Proudění iontů skrz kanály je pasivní na rozdíl od jiných transportérů, jako jsou protonové pumpy a směr proudění iontů je řízen elektrochemickým potenciálem (Buchanan et al., 2015). Tyto kanály jsou přítomny v rostlinných membránách, jako je cytoplazmatická membrána, tonoplast, mitochondrie, endoplazmatické retikulum a chloroplasty. Dále je možné iontové kanály identifikovat v rostlinných pletivech, kde také hrají důležitou roli. V životních procesech rostlin je zásadní proudění vody a v ní rozpuštěných solí v okolí vnitřních membrán buňky, jako je tonoplast a cytoplazmatická membrána. Mezi tyto základní životní procesy patří růst a vývoj rostlin, jejich metabolismus a minerální výživa. Velké množství transportních systémů, které bylo doposud u buněk vytvořeno, vzniklo důsledkem vysoké kompartmentalizace buněk. Mezi tyto transportní systémy řadíme iontové kanály, které mají různorodé vlastnosti (Barbier-Brygoo et al., 2000; Roberts, 2006).

Proudění iontů ve směru elektrochemického gradientu, kontrola turgorového tlaku, změny membránového potenciálu, otevírání a zavírání průduchů a další fyziologické procesy jsou umožněny a kontrolovány iontovými kanály (Barbier-Brygoo et al., 2000; Roberts, 2006; Tavares et al., 2011). Velkou výhodou kanálů je jejich schopnost vytvářet velké množství struktur (Trick et al., 2016). Bylo také zjištěno, že buněčné membrány, jejichž vlastnosti a funkce byly již prozkoumány, disponují různými druhy kanálů, které vykazují specifické regulační mechanismy a rozmanitou iontovou selektivitu (Barbier-Brygoo et al., 2000).

Na základě kinetiky a proudové závislosti je možné klasifikovat kanály do tří skupin: 1.) kanály aktivované depolarizací, které jsou zodpovědné za proudění aniontů ven z buňky i dovnitř buňky; 2.) kanály aktivované hyperpolarizací, které jsou zodpovědné za proudění aniontů ven z buňky a 3.) kanály aktivované světlem nebo membránovou pružností. Tyto skupiny kanálů byly identifikovány v kořenových buňkách, kde mohou mít podíl na udržení vnitřní homeostázy, stabilizaci a osmoregulaci prostředí (Roberts, 2006; Tavares et al., 2011). Výše uvedené kanály aktivované depolarizací mohou být ještě dále rozděleny na R-typ a S-typ v závislosti na kinetice a vlastnostech otevírání a zavírání těchto kanálů. Oba kanály jsou situovány v plazmatické membráně různých typů buněk. Fyziologická role S-typu kanálů byla objasněna u svěracích buněk průduchů. Tyto kanály, aktivované hormonem ABA, jsou zapojeny v procesu otevírání průduchů. Fyziologická funkce R-typu kanálů je stále nejasná (White and Broadly, 2001; Barbier-Brygoo et al., 2011; Buchanan et al., 2015).

Známou skupinou kanálů jsou velké chloridové kanály, neboli CLC kanály. Právě chloridové anionty jsou nejvíce rozšířené v živočišných buňkách na rozdíl od buněk rostlinných, které jsou složeny z velkého množství aniontů, jako jsou chloridy, sulfáty, fosfáty, nitráty, organické kyseliny (malát, oxalát, citrát). Zásobárnou aniontů u dospělých rostlinných buněk je vakuola, která u starších buněk může zaujímat až 80% obsahu. Zde narážíme na jisté rozdíly u rostlinných a živočišných buněk. Například elektrické vlastnosti založené na transportu aniontů,  $H^+$  a  $K^+$  iontů, které si rostlinné buňky vyvinuly. Tyto vlastnosti jsou pro rostliny zcela unikátní v porovnání s buňkami živočišnými. Záporný membránový potenciál rostlin je způsoben  $H^+$ -ATPasou, jejíž funkcí jsou protony transportovány do apoplastu buňky. Iontové kanály vlivem nízké koncentrace extracelulárních kationtů umožní proudění aniontů skrz plazmatickou membránu. Právě



tento děj může mít klíčovou roli v regulaci potenciálu buněk. Zde narážíme na jisté rozdíly u rostlinných a živočišných buněk (Barbier-Brygoo et al., 2000; Roberts, 2006).

Aktivita kanálů v pletivech a membránách vyšších rostlin již byla zkoumána (Hedrich et al., 1994), ovšem mnoho informací o specifické funkci těchto buněčných transportérů, jako je jejich molekulární struktura a lokalizace, je prozatím v počátcích objevování. První struktura iontových kanálů byla objevena v roce 2002 u bakterií, ovšem elektrofyziologické vlastnosti membrán rostlinných buněk byly zkoumány ještě před identifikací genů, kódujících iontové kanály (Barbier-Brygoo et al., 2000; Dutzler et al., 2002; Roberts, 2006; Kollist et al., 2011; Tavares et al., 2011; Baluška and Mancuso, 2013).

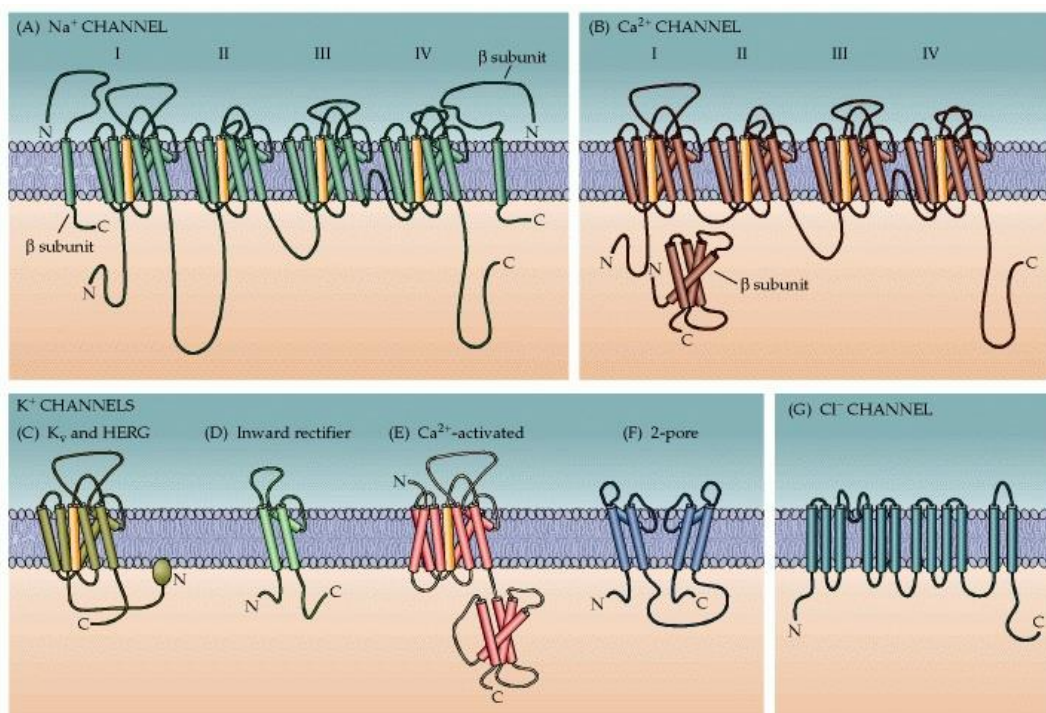
#### **2.4.1 Struktura a funkce kanálů**

Jak již bylo zmíněno, iontové kanály jsou integrované membránové proteiny, jejichž charakteristické prvky jim umožňují shlukovat se do vysokomolekulárních celků. Tyto proteinové struktury umožňují průchod iontů, inaktivaci a vazbu na neurotoxiny a schopnost rozpoznat změnu transmembránového potenciálu (Purves et al., 2001).

Klíčové k rozpoznání funkce kanálů je pochopení jejich struktury. Molekulární struktura, na rozdíl od fyziologické role a funkce kanálů, není příliš známá. Pochopení struktury lze demonstrovat pomocí bakteriálního  $K^+$  kanálu. Tento kanál je složen z podjednotek procházejících skrz plazmatickou membránu. Mezi jednotlivými podjednotkami je umístěna smyčka, která je uvnitř cytoplazmatické membrány, a dohromady tvoří iontový kanál čtyři podjednotky. Uprostřed kanálu se nachází zúžené místo, tzv. pór, který je stejně jako podjednotky tvořen smyčkou a umožňuje průchod  $K^+$  iontů skrz membránu. Právě struktura póru musí být formována tak, aby byl průchod  $K^+$  iontů umožněn. Nejuzší část póru se nachází v blízkosti vyústění kanálu a mohou jí procházet pouze nehydratované  $K^+$  ionty. Tato část kanálového komplexu je označována jako selektivní filtr (Guo et al., 2016). Další částí kanálu je vodou naplněná dutina napojená na vnitřní prostor buňky prostřednictvím póru. Uvnitř této dutiny se hromadí  $K^+$  ionty, které se stávají dehydratovanými vlivem negativního náboje proteinu. Detailní obrázek průchodu iontů skrz plazmatickou membránu a selektivní propustnosti kanálů pro  $K^+$  ionty ukazuje struktura  $K^+$  kanálu. Je velice pravděpodobné, že další typy kanálů pracují na stejném mechanismu jako výše zmíněný, pro dosažení iontové selektivity (Barbier-Brygoo et al., 2000; Purves et al., 2001).

Iontové kanály plní u rostlinných i živočišných buněk tři hlavní fyziologické funkce: 1.) osmoregulace buněk, kdy kanály mají schopnost v krátkém čase pojmout velké množství iontů; 2.) buněčná signalizace pomocí šíření elektrických signálů nebo transport sekundárních poslů. Za vznik elektrických signálů v buněčných membránách rostlin jsou zodpovědné napětím otevírané kanály; 3.) kontrola membránového potenciálu (Barbier-Brygoo et al., 2000). Aktivace kanálů stejně jako jiné fyziologické jevy v buňce, jako například změna osmotického tlaku a proudění vody v buňkách má vliv na změny stavu průduchů. Průduchy se nacházejí v epidermis rostlinných stonků a listů v podobě drobných pórů a jejich hlavní funkcí je kontrola výměny plynů. Na změny vnějšího prostředí reagují buňky obklopující průduchové póry zvětšováním nebo zmenšováním svého objemu. Před 20 lety byla rozpoznána aktivace proudů iontů jako jeden z prvních kroků otevírání průduchů. Pro samotnou indukci otevírání průduchů je hlavním krokem aktivace buněk kanálů a uvolnění aniontů, což má za následek depolarizaci membrány. Osmotický tlak je uvnitř buňky snižován, voda proudí ven, objem buňky se zmenšuje a průduchy se zavírají. V závislosti na faktorech, které se podílí na otevírání průduchů, přecházejí kanály mezi dvěma stavy, otevřeným a zavřeným. Světlo, především modré světlo, je hlavním faktorem v procesu otevírání průduchů (Taiz et al., 2015). Pokud je kanál otevřený, ionty proudí v závislosti na elektrochemickém gradientu (Kollist et al., 2011).

Všechny doposud studované vnitrobuněčné membrány obsahují různé typy kanálů, které mají různou iontovou selektivitu i regulační mechanismy. Příkladem jsou napětím otevírané kanály, které se otevírají v závislosti na změně membránového potenciálu (Taiz et al., 2015). Kdy se kanály vyvinuly, a jaká byla jejich hlavní funkce v počátcích života na zemi, dodnes není známo, ovšem nyní jsou kanály nejvíce známé jako elementy vzruchových buněk (Hille, 2001; Baluška and Mancuso, 2013).



**Obrázek č. 3:** Hlavní podjednotky Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup> a Cl<sup>-</sup> kanálů. Číslice I, II, III, IV značí opakující se jednotky Na<sup>+</sup> a Ca<sup>2+</sup> kanálů. Nejvíce rozmanitým typem kanálů jsou K<sup>+</sup> kanály a strukturálně odlišné od všech ostatních jsou Cl<sup>-</sup> kanály. (upraveno a převzato z Purves et al., 2001).

### 2.4.2 Inhibitory kanálů

Kanálové inhibitory, jako je například anthracen-9-karboxylová kyselina (9-AC) a kyselina niflumová (NIF), mohou zásadně ovlivňovat vývoj rostlinných buněk (Schwartz et al., 1995; Thomine et al., 1997; Tavares et al., 2011; Koselski et al., 2017). Důsledkem působení inhibitorů je stimulace hypokotylového růstu, schopnost zabránění iontovým kanálům v reakci na vnější signály a blokáce proudění iontů skrz kanály buněk. Právě regulace prodlužování hypokotylových buněk je situace, ve které mohou iontové kanály hrát velmi důležitou roli, a s využitím farmakologického přístupu bylo zkoumáno, jakou funkci kanály mají v regulaci vývoje hypokotylů rostlinnými hormony-auxiny. Auxiny aplikované na intaktní rostliny inhibují prodlužování hypokotylů a formují adventní kořeny modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* rostoucí ve tmě. Užití auxinů redukuje délku hypokotylů o 20-30% proti kontrolní rostlině. Bylo zjištěno, že inhibitory jsou schopny s různou účinností potlačit inhibici vyvolanou auxiny. Pokud je ovšem inhibice prodlužování hypokotylů způsobena jinými růstovými regulátory, jako jsou cytokininy nebo ethylen, tato interference není přítomna a ukazuje se být specifickou právě pro auxiny (Schwartz et al., 1995; Thomine et al., 1997).

Se zvyšující koncentrací inhibitoru 9-AC dochází k inhibici elongace hypokotylů a k inhibici růstu hlavních kořenů. Hypokotyly ošetřeny koncentrací 100 pM 9-AC vykazovaly užší strukturu než kontrolní rostliny. Všechny regulátory růstu, jako je ethylen (Ecker, 1995), cytokininy (Chory et al., 1994; Cary et al., 1995), brassinosteroidy (Clouse, 1996), auxiny (Cleland, 1995) a světlo (Elich and Chory, 1994), přispívají k regulaci hypokotylové elongace (Thomine et al., 1997).

Farmakologickým přístupem bylo zjištěno zapojení kyseliny abscisové (ABA) v indukci iontových kanálů (Schroeder et al., 1993; Schwartz et al., 1995). Oba inhibitory NIF i 9-AC blokují iontové kanály plazmatické membrány a mění inhibici ABA v procesu otevírání průduchů. Bylo prokázáno, že vysoké koncentrace inhibitorů způsobují otevírání průduchů a efekt inhibitorů na regulaci otevírání průduchů pomocí ABA byl studován v dalších experimentech. Inhibice pomocí ABA byla přidáním 9-AC snížena a inhibitor zabraňoval indukci ABA v procesu otevírání průduchů (Schwartz et al., 1995). Nízké koncentrace ABA způsobují viditelnou stimulaci růstu mutantů v porovnání s kontrolními rostlinami. Vysoké koncentrace ABA inhibují růst všech genotypů (Humplik et al., 2015). Mechanismus otevírání a zavírání průduchů je založen především na depolarizaci plazmatické membrány důsledkem otevírání aniontových kanálů. Fakt, že inhibitory iontových kanálů regulují otevírání průduchů, toto tvrzení prohlubuje. Studie prokázala, že inhibitory iontových kanálů hrají velmi důležitou roli ve studiu signalizujících drah průduchů. Inhibitory 9-AC a NIF blokují proudy iontů skrz R-typ a S-typ kanálů plazmatické membrány buněk *Vicia faba*. U *Arabidopsis thaliana*, 9-AC indukoval otevírání průduchů ve tmě, zatímco aplikace NIF inhibitoru strukturu průduchů nezměnila (Hlavinka et al., 2013).

Bylo prokázáno, že inhibitory podporují otevírání průduchů i v podmínkách, ve kterých je otevírání obvykle inhibováno. Tyto výsledky ukázaly, že inhibitory iontových kanálů objeveny pro živočišný systém jsou efektivní také v inhibici kanálů rostlinných (Schwartz et al., 1995).

## 2.5 Regulace kanálů světlem

Naprostá většina biologických procesů je závislá na množství viditelného světla. Nicméně velké množství rostlin je schopno odpovědi na vlnové délky mimo viditelné spektrum, jako například kratší vlnové délky UV; <400 nm (z angl. ultraviolet light) a delší vlnové délky FR; 700-800 nm (z angl. far-red light). Světlo je pravděpodobně nejdůležitější podmínkou života na zemi a jeho vzájemná interakce s organismy je zajímavou oblastí výzkumu (Carvalho et al., 2011).

Rostlinné buňky mohou na světlo reagovat dvěma signalizujícími cestami, na sobě nezávislými. Iniciaci první cesty způsobuje fotosynteticky aktivní radiace spojená se změnami koncentrace intracelulárního oxidu uhličitého. Buněčný transport není ovlivňován přímo, ale změnami koncentrace oxidu uhličitého uvnitř a vně buněk (Roelfsema et al., 2002). To má za následek inhibici iontových kanálů v plazmatické membráně. Iniciaci druhé cesty způsobuje modré světlo aktivací H<sup>+</sup>-ATPasy. Tato cesta je specificky závislá na modrém světle a jako spouštěče zde působí fototropiny. Interakce obou zmíněných signalizačních cest směřuje k hyperpolarizaci plazmatické membrány a následkem toho dochází ke zvýšení koncentrace K<sup>+</sup> iontů v kanálech (Roelfsema et al., 2001, 2002). Interakce byla studována u modelových rostlin *Arabidopsis thaliana* a *Vicia faba*. V podmínkách bez oxidu uhličitého byla u buněk *V. faba* zaznamenána odpověď na modré světlo proudem iontů pryč z plazmatické membrány a síla proudění iontů z membrány vzrostla přidáním oxidu uhličitého. Vyšší koncentrace proudění je pravděpodobně spojována s inhibicí kanálu S-typu. Během fotosyntetického děje koncentrace oxidu uhličitého za světla uvnitř buňky klesá, což vede k deaktivaci kanálů (Brearley et al., 1997; Roelsema et al., 2002). U modelové rostliny *A. thaliana* modré světlo také inhibovalo iontové kanály, ovšem u mutantů *phot1* a *phot2* tomu tak nebylo. K inhibici tedy došlo skrz signalizační cestu zahrnující fotoreceptory skupiny fototropinů. Schopnost vnímat modré světlo je u buněk *Arabidopsis* dána dvěma fototropními kinasami asociovanými s membránou (Kinoshita et al., 2001; Briggs and Christie, 2002; Sakamoto and Briggs, 2002; Harada et al., 2003). Působením modrého světla nastává fosforylace fotoreceptorů, které jsou schopny vázat proteiny udržující receptory kinas v aktivním stavu (Kinoshita et al., 2003; Marten et al., 2007).

Modré světlo má na růst rostlin a jejich vývoj velký vliv. Příkladem může být depolarizace membrány iontových kanálů selektivních pro určitý druh iontů. Inhibitor 5-

nitro-2-(3-fenylpropylamino)-benzoová kyselina (NPPB) velice silně blokuje tyto kanály a také blokuje depolarizaci vyvolanou modrým světlem a snižuje jeho inhibiční efekt. Ve tmě nebyl efekt NPPB téměř žádný. Výsledky ukazují, že aktivace kanálů pomocí modrého světla způsobuje depolarizaci membrány a následně inhibici prodlužovacího růstu. Nelze ovšem vyloučit možnost, že jiné typy kanálů jsou senzitivitou NPPB ovlivněny (Cho et al., 1996).

### 3 Materiál a metodika

- Rostlinný materiál: Rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. cv. Money Maker  
Rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. mutant *fri1*  
Rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers; LA3004  
Rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. mutant *hp1*
- Chemikálie: MS - kultivační médium Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, Cat. no. M5524, Caisson (USA)  
Sacharosa  
Agar  
MES - 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid, analytical grade  
hydroxid draselný (KOH, 1M)  
Savo - komerční roztok chlornanu sodného (NaClO), (0,6 l Savo + 0,4 l destilovaná voda)  
NIF (kyselina niiflumová), (zás. roztok  $10^{-2}$  M)  
9-AC (kyselina anthracen-9-karboxylová), (zás. roztok  $10^{-2}$  M)  
90% a 70% ethanol  
Sterilní destilovaná voda
- Pomůcky: sterilní kulaté plastové Petriho misky (průměr 90 mm), lepicí páska Softpore - z netkané textilie, 0,5 l termoláhve, 50 ml sterilní a nesterilní plastové centrifugační zkumavky, automatická pipeta (1 ml, 10 ml a 200  $\mu$ l), sterilní plastové špičky k pipetám, 250 ml sterilní Erlenmeyerova baňka, plastové sterilní mikrozukavky eppendorf, 100 ml a 500 ml kádinka, lihový kahan, dlouhá pinzeta, zápalky, magnetické míchátko, alobal, lihová fixa, stojánek na centrifugační zkumavky, plastové stojánky na Petriho misky
- Přístroje: analytické váhy, předvážky, magnetická míchačka, pH metr, laminární box, automatické růstové komory (Microclima 1000,

Snijders Scientific, Nizozemsko), mikrovlnná trouba, chladnička, mražák (-20 °C)

### 3.1 Rostlinný materiál

V provedených experimentech bylo využito semen mutantů *fri1* a *hpl* rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. Semena obou mutantů byla poskytnuta C. M. Rickem, TGC (Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>). Mutant *fri1* byl odvozen od kultivaru cv. Money-Maker (cv. MM) a vyznačuje se defektem ve fytochromu A. Rostliny s touto mutací jsou po přesunu z tmavého prostředí na červené světlo necitlivé k dlouhovlnnému červenému světlu (*far-red insensitive, fri*). Mutant *hpl*, odvozený od kultivaru cv. Rutgers, LA3004, se vyznačuje zvýšenou reakcí fytochromů ke světlu a zvýšenou fototropickou reakcí (Srinivas et al., 2004) a vykazuje defekt v genu DDB1 (*Damaged DNA Binding protein 1*). Mutované rostliny, které vykazují defekt v tomto genu, se vyznačují zvýšenou citlivostí ke světlu, zvýšeným obsahem karotenoidů v plodech a kratším hypokotylem v porovnání s kontrolní rostlinou (Caspi et al., 2008).

### 3.2 Příprava MS média

Pro přípravu 2l MS média (Murashige and Skoog, 1962) bylo naváženo: 20 g sacharosy, 8,66 g MS média a 390,4 mg MES pufru. Dále bylo naváženo 2,8 g agaru na 400 ml média. Za stálého míchání na magnetické míchačce byly sacharosa, MS médium a MES pufr rozpuštěny v 1l vody. Objem byl doplněn na 2l a bylo upraveno pH roztoku postupným přidáváním 1M hydroxidu draselného na hodnotu 6,1. Do 0,5l termolahví s odpovídajícím množstvím agaru bylo hotové médium rozlito po 400 ml. Připravené médium bylo sterilizováno autoklávováním. Termolahve se sterilním médiem byly po vychladnutí skladovány v lednici do dalšího použití.

### 3.3 Koncentrace inhibitorů iontových kanálů

V experimentech bylo využito dvou typů inhibitorů iontových kanálů (NIF a 9-AC). Každý inhibitor byl používán v jiných koncentracích. Potřebné množství MS média na jeden experiment testující dva genotypy za všech světelných podmínek bylo 480 ml. Pro každou



koncentraci bylo tedy použito 120 ml MS média. Koncentrace a pipetované množství inhibitorů ze zásobních roztoků jsou uvedeny v Tabulce 1.

**Tabulka 1:** Objemy a koncentrace inhibitorů pro přípravu 120 ml média

Inhibitor	Koncentrace zásobního roztoku [mol/l]	Testované koncentrace [μmol/l]	Objem inhibitoru na 120 ml MS média [μl]
NIF	10 <sup>-2</sup>	30	360
		90	1080
		120	1440
9-AC	10 <sup>-2</sup>	100	1200
		150	1800
		200	2400

### 3.4 Sterilizace a výsev semen

Množství potřebných semen pro jeden experiment bylo 360 od každého genotypu. Semena byla sterilizována v plastových 50 ml zkumavkách v roztoku SAVA obsahujícím 3% aktivního chloru po dobu 25-30 minut. Během sterilizace byl obsah zkumavek několikrát promíchán. Následovalo propláchnutí semen sterilní destilovanou vodou v laminárním boxu. Propláchnutí bylo provedeno celkem pětkrát pomocí 10 ml pipety.

Po sterilizaci byla semena vysazena do Petriho misek obsahujících 20 ml MS média a příslušnou koncentrací inhibitoru. Pro každý genotyp byly zařazeny kontrolní Petriho misky s nulovou koncentrací inhibitoru.

Výsev semen byl proveden za sterilních podmínek v laminárním boxu. Na každou Petriho misku bylo vyseto asi 30-35 semen. Výsev byl proveden pomocí sterilní pinzety (sterilizace v 96% ethanolu a následné vyžihání v plameni kahanu). Misky byly následně oblepeny dvakrát po svém obvodu pomocí textilní pásky a vertikálně umístěny do růstových komor do příslušných světelných podmínek. Semena byla kultivována po dobu 7 dnů na modrém, nebo červeném světle při teplotě 23°C. Zdrojem modrého světla s maximální ozářeností 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při 440 nm byla zářivka Philips TLD-36W/18-Blue, zdrojem červeného světla s maximální ozářeností 10 μmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> při 660 nm byla zářivka

Philips TLD36W/15-Red. Pro kultivaci ve tmě byly misky se semeny zabaleny do alobalu a umístěny do stejné růstové komory.

### **3.5 Hodnocení klíčení**

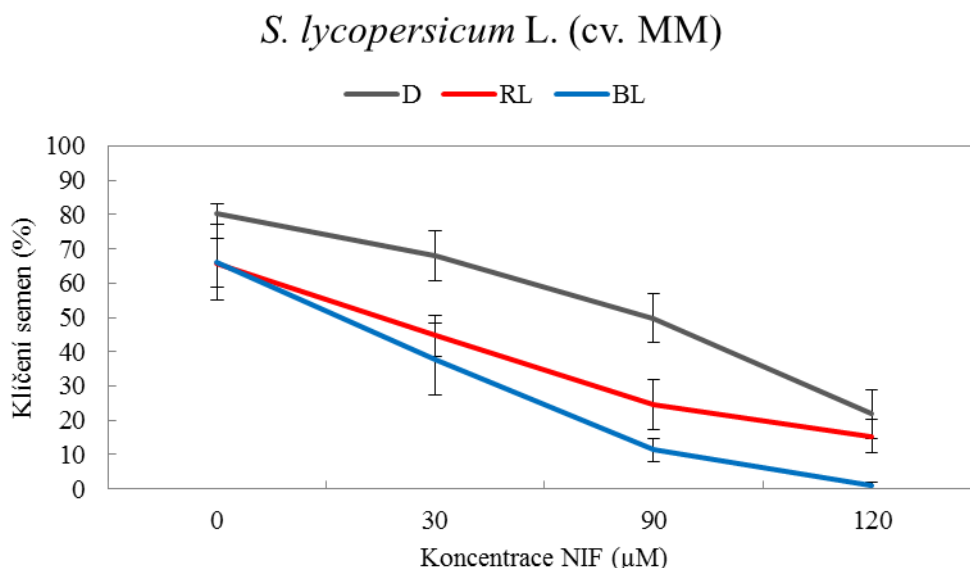
Klíčení semen bylo pozorováno po dobu 4 dní, 4.-7. den od vysetí. Hodnocení probíhalo na denním světle. Každý experiment byl opakován tři až pětkrát. Z těchto opakování byla vypočtena průměrná hodnota pro každý genotyp a tyto hodnoty byly využity při zpracování grafů. Z výsledných průměrných hodnot byly zpracovány grafy závislosti klíčivosti semen v procentech na koncentraci inhibitoru. Pro sestavení grafů bylo využito programu Microsoft Excel 2010.

## 4 Výsledky

Prvním cílem provedených experimentů bylo zjistit, zda jsou iontové kanály zapojeny v klíčení semen. K tomu bylo využito inhibitorů iontových kanálů NIF a 9-AC a byl sledován vliv těchto inhibitorů na proces klíčení semen. Druhým cílem bylo zjistit, zda případné zapojení iontových kanálů v klíčení semen může být ovlivněno světlem. Vliv inhibitorů NIF a 9-AC na klíčení semen byl tedy studován ve tmě, na modrém a červeném světle. Třetím cílem bylo zjistit, zda případný vliv světla na funkci iontových kanálů je zprostředkován fotoreceptory, které mají maximální absorpci v červené oblasti spektra, tzv. fytochromů. Proto bylo klíčení studováno u dvou fotomorfogenních mutantů, *fri1* s redukovanou reakcí ke světlu a *hpl* se zvýšenou reakcí ke světlu. Experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodice.

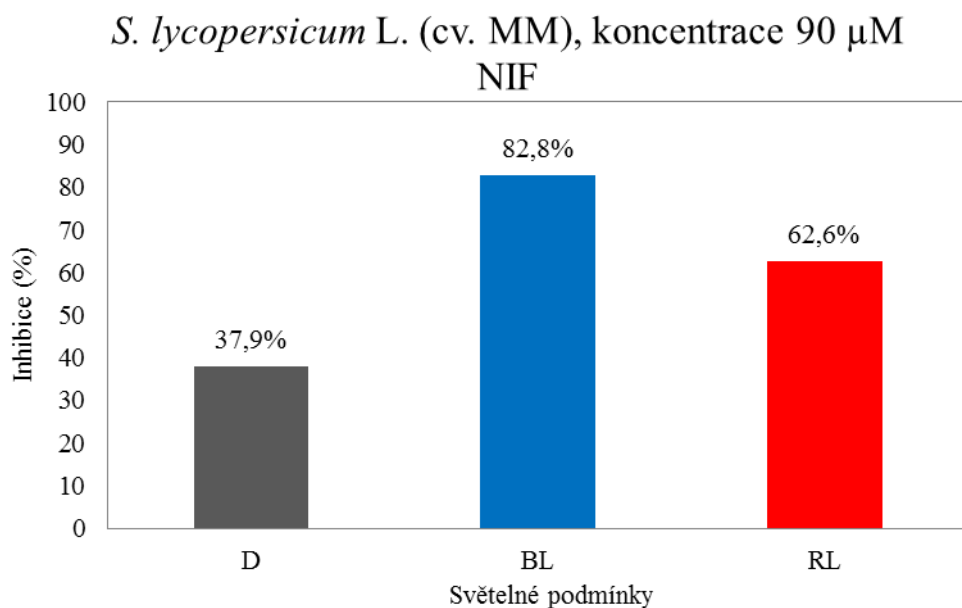
### 4.1 Klíčení semen ovlivněné kvalitou světla a inhibitorem NIF

Maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. MM, cv. Rutgers (WT) a mutantů *fri1* a *hpl* bylo ovlivňováno přidavkem inhibitoru NIF v koncentracích 30  $\mu\text{M}$ , 90  $\mu\text{M}$  a 120  $\mu\text{M}$  v kombinaci se světelnými podmínkami (tma-D, modré světlo-BL, červené světlo-RL).

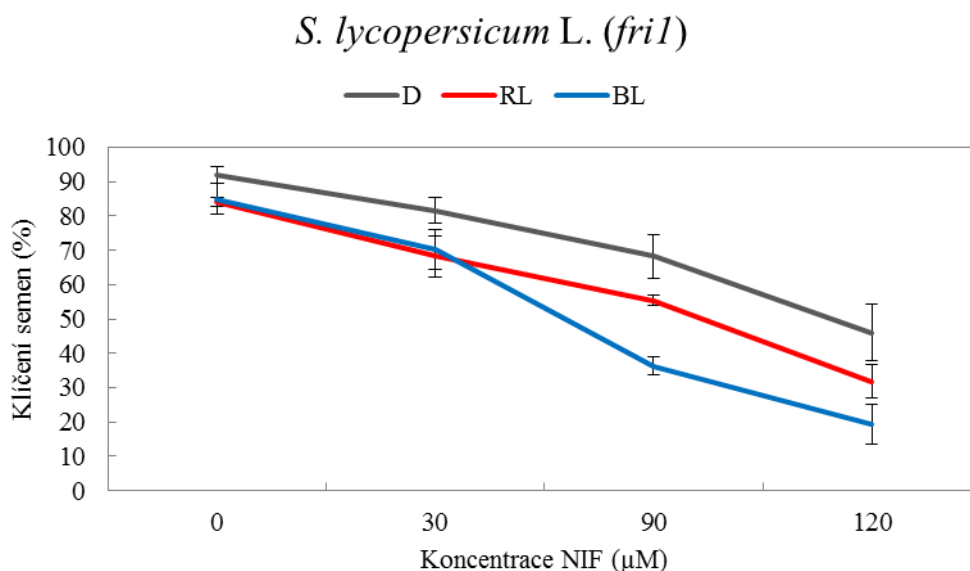


**Obrázek č. 4:** Maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. MM ovlivněné inhibitorem aniontových kanálů NIF a kvalitou světla. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčení  $\pm$  SE 7. den po výsevu a získané z 5 nezávislých experimentů, v případě BL ze 3 nezávislých experimentů.

Z obrázku č. 4 lze vyčíst, že maximálního klíčení u genotypu cv. MM bylo dosaženo ve tmě. S rostoucí koncentrací inhibitoru NIF bylo zaznamenáno snížené klíčení semen. Inhibiční účinek inhibitoru NIF na klíčení semen byl zesílen působením světla, konkrétně modrého světla (BL). Srovnání maximální inhibice klíčení semen (v %) ovlivněné kvalitou světla a nejvyšší koncentrací inhibitoru NIF (90  $\mu$ M) ukazuje obrázek č. 5.

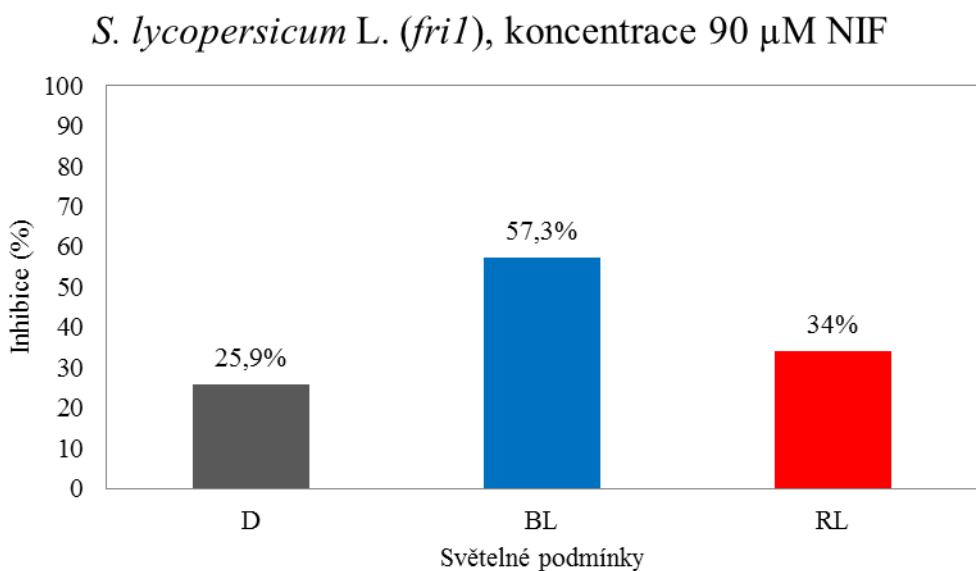


**Obrázek č. 5:** Srovnání maximální inhibice klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. MM vlivem NIF (vybraná konc. 90  $\mu$ M) ve tmě, BL a RL, 7. den po výsevu.



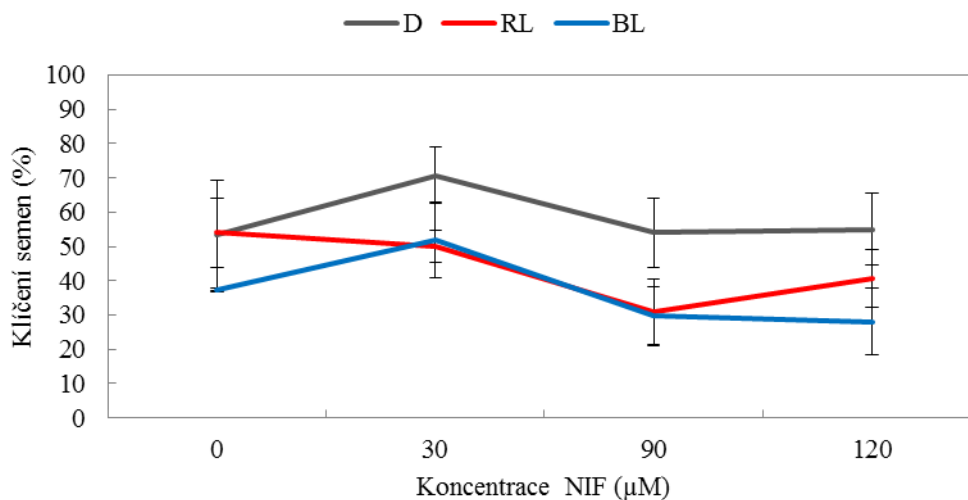
**Obrázek č. 6:** Maximální klíčení semen (v %) mutantu *fri1* *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné kvalitou světla a rostoucí koncentrací inhibitoru NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčení  $\pm$  SE získané 7. den po výsevu z 5 nezávislých experimentů, v případě BL ze 3 nezávislých experimentů.

Klíčení semen mutanta *fri1* ve tmě bylo mírně vyšší než u genotypu cv. MM a maximální klíčení ve tmě i na světle při nulové koncentraci inhibitoru bylo téměř stejné. Z obrázku č. 6 můžeme vyčíst, že se zvyšující se koncentrací inhibitoru docházelo ke snížení maximálního klíčení semen mutanta za všech světelných podmínek (D, BL, RL). Podobně jako u cv. MM docházelo působením světla spolu s rostoucí koncentrací inhibitoru NIF ke snížení klíčení semen, ovšem vliv světla byl výrazně nižší než u genotypu cv. MM. Srovnání procent maximální inhibice semen ovlivněné kvalitou světla a nejvyšší koncentrací inhibitoru NIF (90  $\mu$ M) ukazuje obrázek č. 7. Podobný trend byl pozorován i u ostatních testovaných koncentrací NIF. Ze srovnání obrázků č. 5 a 7 je rovněž zřejmé, že inhibice klíčení semen u mutanta *fri1* vlivem NIF byla nižší než u cv. MM, a to za všech světelných podmínek.



**Obrázek č. 7:** Srovnání maximální inhibice klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. *fri1* vlivem NIF (vybraná konc. 90  $\mu$ M) ve tmě, BL a RL, 7. den po výsevu.

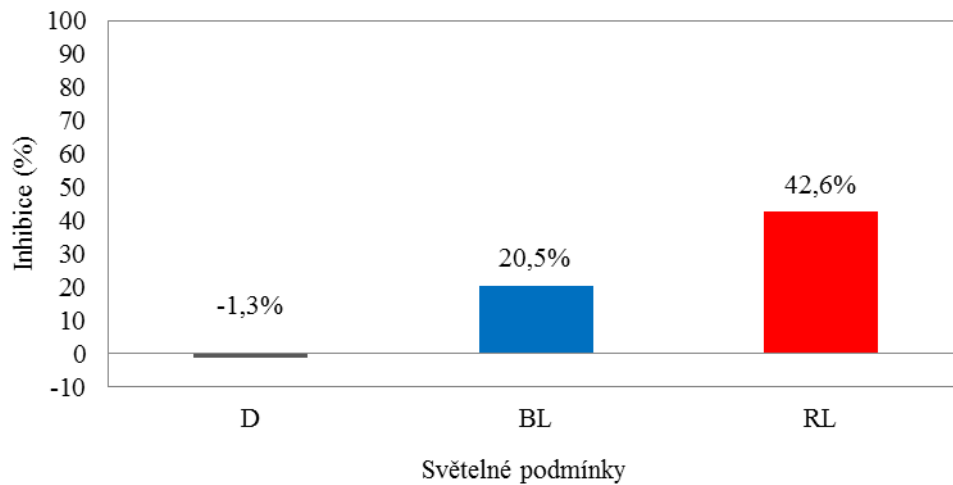
### *S. lycopersicum* L. (cv. Rutgers)



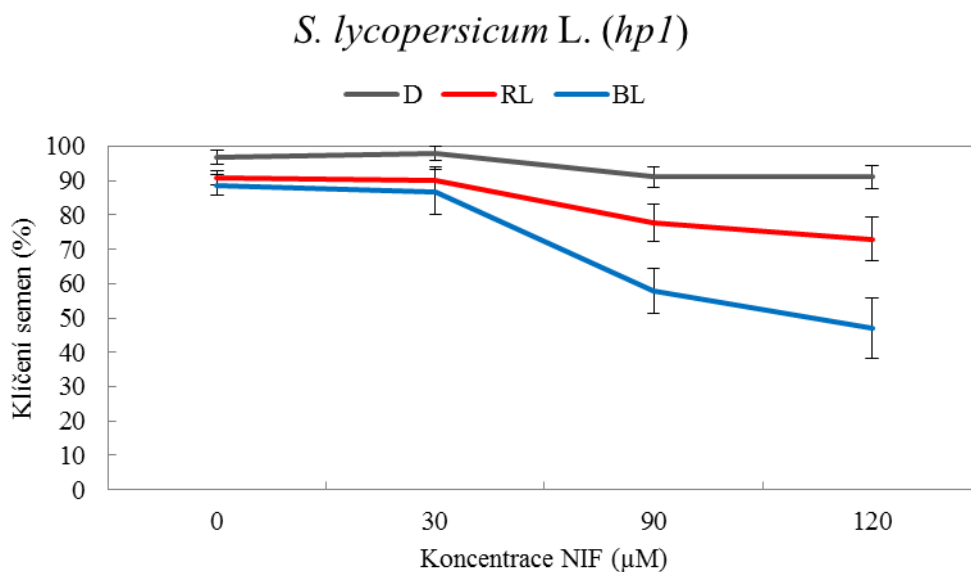
**Obrázek č. 8:** Maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers ovlivněné inhibitorem aniontových kanálů NIF a kvalitou světla. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčení  $\pm$  SE 7. den po výsevu získané ze 3 nezávislých experimentů.

Z obrázku č. 8 lze vyčíst, že maximálního klíčení u genotypu cv. Rutgers bylo dosaženo ve tmě a s rostoucí koncentrací inhibitoru NIF nebyl zaznamenán výrazný inhibiční efekt na klíčení semen. Na modrém světle při absenci NIF bylo klíčení semen ve srovnání s tmou mírně inhibováno, kdežto na červeném světle bylo max. klíčení podobné jako ve tmě. Na modrém světle inhibitor NIF klíčení semen inhiboval, a to znatelně více, než tomu bylo ve tmě. Srovnání procent maximální inhibice semen ovlivněné kvalitou světla a nejvyšší koncentrací inhibitoru NIF (90  $\mu\text{M}$ ) ukazuje obrázek č. 9.

*S. lycopersicum* L. (cv. Rutgers), koncentrace 90  $\mu$ M NIF



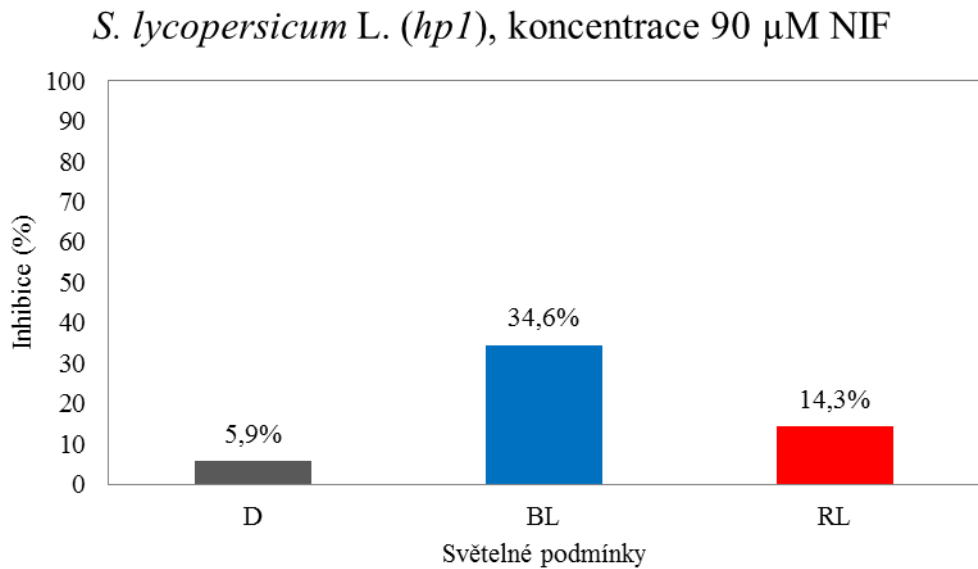
**Obrázek č. 9:** Srovnání maximální inhibice klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. Rutgers vlivem NIF (vybraná konc. 90  $\mu$ M) ve tmě, BL a RL, 7. den po výsevu.



**Obrázek č. 10:** Maximální klíčení semen (v %) mutanta *hp1* *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné kvalitou světla a rostoucí koncentrací inhibitoru NIF. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčení  $\pm$  SE získané 7. den po výsevu ze 3 nezávislých experimentů.

Stejně jako u genotypu cv. Rutgers bylo maximálního klíčení semen u mutanta *hp1* dosaženo ve tmě a efekt zvyšující se koncentrace inhibitoru NIF byl velmi nízký. Působením světla spolu se zvyšující se koncentrací inhibitoru docházelo ke snižování klíčení semen mutanta *hp1*, přičemž na modrém světle byla inhibice nejvyšší. Srovnání procent maximální inhibice semen ovlivněné kvalitou světla a nejvyšší koncentrací

inhibitoru NIF (90  $\mu$ M) ukazuje obrázek č. 11. Srovnáním obrázků č. 9 a 11 je vidět, že u mutanta *hpl* byla na modrém světle inhibice klíčení vlivem NIF výraznější než u kontrolního genotypu cv. Rutgers, kdežto na červeném světle tomu bylo právě opačně. Stejný trend byl pozorován i u ostatních použitých koncentrací.



**Obrázek č. 11:** Srovnání maximální inhibice klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. *hpl* vlivem NIF (vybraná konc.) ve tmě, BL a RL, 7. den po výsevu.



## 4.2 Klíčení semen ovlivněné kvalitou světla a inhibitorem 9-AC

Inhibitor 9-AC neovlivňoval významně klíčení semen cv. MM a mutanta *fri1*, pokud byla jejich semena kultivována ve tmě. Pokud byla semena kultivována na BL, u obou genotypů byl pozorován nástup mírného inhibičního účinku 9-AC na klíčení semen, přičemž při nejvyšší testované koncentraci 120  $\mu\text{M}$  dosahovala inhibice 30% u cv. MM a 23% u mutanta *fri1*. Rovněž na RL byl pozorován slabý inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen, přičemž byl slabší než na modrém světle. Podobně jako na BL, inhibice klíčení semen vlivem 9-AC byla na RL slabší u mutanta *fri1* než u kontrolního genotypu cv. MM (výsledky nejsou ukázány).

Podobné výsledky byly pozorovány v případě dvojice genotypů cv. Rutgers a mutanta *hp1*. Na rozdíl od kultivace semen ve tmě, na BL byl pozorován relativně silný inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen, přičemž však z výsledků nelze jednoznačně usoudit, u kterého genotypu byla inhibice výraznější. Na RL byl inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen zesílen podobně, jako tomu bylo u dvojice cv. MM a mutanta *fri1*. Podobně jako na modrém světle nelze však jednoznačně říci, který z genotypů cv. Rutgers a *hp1* byl na RL k inhibitoru 9-AC citlivější (výsledky neukázány).

## 5 Diskuze

Světlo je důležitým signálem regulujícím vývoj rostlin a je absorbováno fotoreceptory-fytochromy pro RL, FR a kryptochromy/fototropiny pro BL. Všechny fotoreceptory jsou zapojeny v inhibici hypokotylového růstu, ale nejvíce efektivní se zdá být BL. Cho and Spalding ukázali, že inhibice růstu hypokotylu modrým světlem spočívá v indukci depolarizace plazmatické membrány vyvolané aktivací plazmamembránových aniontových kanálů modrým světlem. Dále se ukázalo, že indukce změn membránového potenciálu a inhibice růstu mohou být inhibovány blokátorem iontových kanálů NPPB. Bylo tedy zhodnoceno, že aktivace iontových kanálů vede opravdu k depolarizaci plazmatické membrány (Wang et al., 1998). Světlo má vliv nejen na depolarizaci, ale také na signální dráhy fytohormonů jako jsou ABA a auxiny (Cho and Spalding, 1996), které regulují prodlužovací růst.

Velice málo je ovšem známo o zapojení aniontových kanálů v procesu klíčení semen, který předchází vlastnímu růstu nadzemní části rostliny a ještě méně o tom, jak světlo může aniontové kanály v buňkách semen při klíčení ovlivňovat. Světlo je přitom pro řadu rostlin klíčovým faktorem, který klíčení semen indukuje.

Cílem experimentální části bakalářské práce bylo proto studium zapojení aniontových kanálů v procesu klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. a regulace tohoto procesu světlem. Ke studiu byl aplikován tzv. farmakologický přístup spočívající v použití více či méně specifických inhibitorů aniontových kanálů. Abychom zjistili, zda a jak světlo a fotoreceptory červeného světla nebo jiné elementy signální dráhy červeného světla ovlivňují aktivitu těchto kanálů, využili jsme i tzv. genetického přístupu. Genetický přístup spočíval ve studiu klíčení fotomorfogenních mutantů *fri1*, s mutací ve *phyA*, a mutantu *hp1*, s defektem v genu *DDB1*. Srovnáním jejich reakcí ke světlu a k inhibitorům aniontových kanálů je možno odhadnout, jakou úlohu mohou tyto mutované geny hrát v účincích světla na aktivitu aniontových kanálů během procesu klíčení semen.

Naše výsledky ukázaly, že za všech světelných podmínek se zvyšující se koncentrací inhibitoru NIF docházelo k inhibici klíčení semen u kontrolní rostliny cv. MM. Je tedy zřejmé, že funkční aniontové kanály citlivé k inhibitoru NIF jsou nutné pro klíčení semen rajčete. Bylo také zjištěno, že účinek inhibitoru NIF na klíčení semen je zesílen působením světla, konkrétně BL, tedy, že inhibice klíčení semen vlivem NIF je při osvětlení vyšší než ve tmě. Z těchto výsledků lze usuzovat, že světlo nějakým způsobem zvyšuje citlivost

těchto kanálů k inhibitoru NIF. Je také možné, že modré světlo může redukovat počet NIF-sensitivních kanálů v buňkách semen a to tím, že může potlačovat expresi genů, které tyto kanály kódují.

Výsledky experimentů s mutantem *fri1*, který vykazuje defekt ve *phyA*, odhalily několik zajímavých skutečností. Při absenci inhibitoru NIF modré i červené světlo částečně snižovalo procento klíčení semen kontrolního genotypu cv. MM. Toto snížení nebylo však patrné u mutantu *fri1*. Z výsledků tedy vyplývá, že modré i červené světlo snižuje klíčení semen rajčete prostřednictvím *phyA*. Dále jsme zjistili, že citlivost semen *fri1* k inhibičnímu účinku NIF byla na světle nižší než citlivost WT. To značí, že zvýšení citlivosti semen k NIF vlivem světla je zprostředkováno *phyA*. Pokud tedy uvažujeme, že světlo zvyšuje citlivost semen k NIF tím, že redukuje množství NIF-sensitivních kanálů, pak k větší redukci dochází u cv. MM než u *fri1*, protože se tak děje prostřednictvím *phyA*. Mechanismus může být následující. Modré či červené světlo aktivuje *phyA*, který se přemísťuje z cytoplazmy do jádra (Sakamoto et Nagatani, 1996; Yamaguchi et al., 1999). Zde může aktivní *phyA* zablokovat transkripční faktory, které spouští expresi genů kódujících NIF-sensitivní aniontové kanály. Může dojít také k tomu, že aktivní *phyA* odblokuje expresi genů, které kódují jiné proteiny, které však mohou fungovat jako represory exprese genů pro NIF-sensitivní aniontové kanály. Fakt, že snížení citlivosti semen *fri1* k NIF bylo pozorováno i na modrém světle potvrzuje, že *phyA* je zapojen i v procesu vnímání modrého světla (Neff and Chory, 1998).

Mutant *hpl* je charakterizován zvýšenou citlivostí ke světlu, zvýšeným množstvím karotenoidů v plodech, vysokým množstvím antokyaninů, tmavými listy a kratším hypokotylem než kontrolní nemutované rostliny (Mustilli et al. 1999; Lieberman et al. 2004; Liu et al. 2004). Bylo zjištěno, že mutace *hpl* spočívá ve změně A<sup>931</sup> (aspargin) na T<sup>931</sup> (tyrosin) v kódující sekvenci genu *DDB1* (Lieberman et al. 2004). Gen *DDB1* (*DAMAGED DNA BINDING PROTEIN 1*) je homologem lidského genu *HsDDB1*. U člověka protein HsDDB1 v rámci komplexu DDB1-CUL4A-ROC1 (Mustilli et al. 1999; Kapetanaki et al. 2006; Wang et al. 2006) chrání buňky před nadměrným a škodlivým UV zářením, protože je důležitým faktorem zapojeným v opravě a regulaci buněčného cyklu (Fu et al. 2003). U rostlin bylo odhaleno, že je DDB1 součástí proteinového komplexu CDD (COP10, DDB1 a DET1) (Schroeder et al., 2002; Yanagawa et al., 2004), který je spojen s E3 ubiquitin ligázou COP1 a signalozomem COP9 (CSN). U rostlin tento systém zajišťuje degradaci fotomorfogenních faktorů prostřednictvím procesu zvaného

ubiquitinace (Osterlund et al., 2000; Yanagawa et al., 2004). Tím dochází k ochraně rostliny před nadměrným světelným zářením. Defekt v genu DDB1 vede tedy k nadměrné citlivosti ke světlu, jak je zřejmé u mutanta *hpl*. Nedávno bylo publikováno, že mutant *hpl* se vyznačuje i zvýšenou fototropickou reakcí k modrému světlu (Srinivas et al., 2004). Protože u rajčete zatím fototropinový mutant identifikován nebyl, *hpl* byl vhodným objektem ke studiu toho, zda a jak je fototropinová signalizace zapojena v regulaci citlivosti semen k inhibitoru aniontových kanálů NIF.

Výsledky experimentů, ve kterých bylo využito mutanta *hpl* a odpovídající kontrolní rostliny cv. Rutgers LA3004 ukázaly, že ve tmě s rostoucí koncentrací inhibitoru NIF nebyl zaznamenán výrazný inhibiční efekt na klíčení semen, a to u obou genotypů. Je tedy zřejmé, že cv. Rutgers i *hpl* potřebují k inhibici klíčení semen ve tmě vyšší koncentraci NIF než dvojice cv. MM a *fri1*. To může znamenat, že genotypy cv. Rutgers a *hpl* mohou ve tmě syntetizovat vyšší množství NIF-senzitivních kanálů než genotypy cv. MM a *fri1*. Podobně jako u cv. MM a *fri1* modré i červené světlo výrazně zesilovalo inhibiční účinek NIF, přičemž na modrém světle byla inhibice nejvyšší. Ve srovnání s kontrolním genotypem cv. Rutgers ukazoval mutant *hpl* na modrém světle zvýšenou citlivost k NIF. Tyto výsledky tedy korespondují s výsledky u mutanta *fri1*, který, jakožto méně citlivý ke světlu, ukazoval i menší citlivost k NIF. Z výsledků tedy plyne závěr, že protein DDB1 je nějakým způsobem zapojen ve světlem-regulované regulaci citlivosti semen k NIF, tedy např. v redukci počtu NIF-senzitivních kanálů.

Na červeném světle semena mutanta *hpl* ukazovala sníženou citlivost k NIF v koncentraci 90  $\mu\text{M}$  (Obr. č. 11). Je však třeba poznamenat, že při dvou krajních koncentracích 30 a 120  $\mu\text{M}$  byla citlivost semen *hpl* k NIF srovnatelná jako u cv. Rutgers. Tyto výsledky proto nejsou zcela jednoznačné a bude potřeba pokusy s účinkem NIF na klíčení semen na RL několikrát zopakovat.

Z výsledků experimentů s inhibitorem 9-AC plynou následující závěry. Protože ve tmě neměl 9-AC v použitých koncentracích (10 až 200  $\mu\text{M}$ ) významný vliv na klíčení semen všech genotypů (ani inhibice ani stimulace), je zřejmé, že množství kanálů citlivých k 9-AC v semenech kultivovaných ve tmě bylo buď velmi vysoké, nebo naopak tyto kanály exprimovány nebyly. Na modrém i červeném světle ovšem byla inhibice klíčení u všech genotypů vlivem 9-AC výrazná. Je tedy možné, že pokud bylo množství 9-AC citlivých kanálů v semenech vysoké, tak světlo jejich množství dramaticky snižuje. Pokud

se však ve tmě 9-AC sensitivní kanály v semenech nevyskytovaly, je zřejmé, že světlo jejich expresi indukuje.

Vzhledem k tomu, že semena mutantů *fri1* i *hpl* ukazovala podobnou citlivost k 9-AC jako odpovídající kontrolní genotypy cv. MM a cv. Rutgers, je zřejmé, že phyA ani protein DDB1 nehrají ve světlem-regulované citlivosti semen k 9-AC významnou úlohu.

Naše výsledky naznačují, že systém regulace funkce aniontových kanálů světlem během klíčení semen představuje komplexní systém. Znalosti o mechanismech těchto regulací jsou velice omezené. I když úloha světla v procesu klíčení semen je intenzivně studována, neexistují práce, které by informovaly o tom, zda a jak světlo v semenech reguluje aktivitu aniontových kanálů a jakou hrají při klíčení semen úlohu. Výsledky této bakalářské práce mimo jiné nabídly nové výhledy, jak tyto mechanismy studovat. Zajímavé by určitě bylo zjistit, které aniontové kanály se v semeni rajčete nacházejí a jak světlo ovlivňuje jejich expresi ať už na úrovni RNA či proteinů.

## 6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo studium zapojení iontových kanálů a světelné signalizace v procesu klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. K tomu byl použit genetický přístup, spočívající v analýze fotomorfogenních mutantů a farmakologický přístup, spočívající ve studiu účinků inhibitorů aniontových kanálů na klíčení semen. V podmínkách *in vitro* bylo studováno působení inhibitorů aniontových kanálů, NIF a 9-AC na klíčení semen fotomorfogenních mutantů *fri1* a *hpl* rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L., a to ve tmě a na modrém a červeném světle.

Z výsledků předkládané bakalářské práce vyplývají některé důležité závěry. V první řadě je ze získaných výsledků zřejmé, že za všech světelných podmínek jsou funkční aniontové kanály citlivé k inhibitoru NIF nutné pro klíčení semen rajčete. Odlišně, zdá se, že aniontové kanály citlivé k inhibitoru 9-AC jsou důležité především pro klíčení semen na světle. Z našich výsledků je dále evidentní, že světlo nějakým způsobem ovlivňuje aniontové kanály zapojené v klíčení semen rajčete.

Analýza klíčení semen mutantu *fri1* vedla k závěrům, že modré i červené světlo redukuje klíčení semen rajčete prostřednictvím phyA a současně, že světlo zvyšuje citlivost semen k inhibitoru NIF, a toto zvýšení se děje prostřednictvím phyA. Analýza mutantu *hpl* pak potvrdila závěry získané z výsledků experimentů na mutantu *fri1*. Výsledky navíc vedly k závěru, že protein DDB1 je zapojen ve světlem-regulované regulaci citlivosti semen k NIF.

## Citovaná literatura

Aggarwal, C., Banaś, A.K., Kasprovicz-Maluški, A., Borghetti, C., Łabuz, J., Dobrucki, J., & Gabryś, H. (2014) Blue-light-activated phototropin2 trafficking from the cytoplasm to Golgi/post-Golgi vesicles. *Journal of Experimental Botany*, **65**(12): 3263–3276.

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

Baluška, F., Mancuso, S. (2013) Ion channels in plants. *Plant Signaling & Behavior*, **8**: 1, e23009.

Barbier-Brygoo, H., Vinauger, M., Colcombet, J., Ephritikhine, G., Frachisse, J., Biochim, C.M. (2000) Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biophys Acta*, **1465**(1-2): 199–218.

Barbier-Brygoo, H., De Angeli, A., Filleur, S., Frachisse, J.M., Gambale, F., Thomine, S., Wege, S. (2011) Anion channels/transporters in plants: from molecular bases to regulatory networks. *Annu Review of Plant Biology*, **62**: 25–51.

Bentsink, L., & Koornneef, M. (2008) Seed Dormancy and Germination. *The Arabidopsis Book / American Society of Plant Biologists*, **6**, e0119.

Berger, F., Hamamura, Y., Ingouff, M., Higashiyama, T. (2008) Double fertilization: caught in the act. *Trends Plant Sci.*, **13**: 437–443.

Bewley, J.D. and Black, M. (1994) Seeds: Physiology of Development and Germination. *New York: Plenum Press*.

Bewley, J. (1997) Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell*, **9**(7): 1055–1066.

- Bino, R.J., De Vos, C.H.R., Lieberman, M., Hall, R.D., Bovy, A., Jonker, H.H., Tikunov, Y., Lommen, A., Moco, S. and Levin, I. (2005) The light-hyperresponsive *high pigment-2dg* mutation of tomato: alterations in the fruit metabolome. *New Phytologist*, **166**: 427–438.
- Brearley, J., Venis, M.A. and Blatt, M.R. (1997) The effect of elevated CO<sub>2</sub> concentrations on K<sup>+</sup> and anion channels of *Vicia faba* L. guard cells. *Planta*, **203**: 145–154.
- Briggs, W.R., Christie, J.M. (2002) Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends Plant Sci.*, **7**(5): 204–210.
- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, R.L. (2015) *Biochemistry & molecular biology of plants* (2nd edition), p.: 128-138.
- Carvalho, R.F., Takaki, M., Azevedo, R.A. (2011) Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum*, **33**: 241–248.
- Cary, A.J., Liu, W., & Howell, S.H. (1995) Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Physiology*, **107**(4): 1075–1082.
- Casal, J.J. & Sanchez, R.A. (1998) Phytochrome and seed germination. *Seed Science Research*, **8**: 317–329.
- Caspi, N., Levin, I., Chamovitz, D.A., & Reuveni, M. (2008). A mutation in the tomato *DDB1* gene affects cell and chloroplast compartment size and CDT1 transcript. *Plant Signaling & Behavior*, **3**(9): 641–649.
- Cleland, R.E. (1995) Auxin and cell elongation. In *I'J Davies, ed, Plant Hormones. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands*, pp 214227.
- Clouse, S.D. (1996) Molecular genetic studies confirm the role of brassinosteroids in plant growth and development. *The Plant Journal*, **10**: 1–8.



- De Carbonnel, M., Davis, P., Roelfsema, M.R.G., Inoue, S., Schepens, I., Lariguet, P., Geisler, M., Shimazaki, K.I., Hangarter, R., Fankhauser, C. (2010) The *Arabidopsis* PHYTOCHROME KINASE SUBSTRATE2 protein is a phototropin signaling element that regulates leaf flattening and leaf positioning. *Plant Physiology*, **152**(3): 1391–140.
- Dutzler, R., Campbell, E.B., Cadene, M., Chait, B.T., MacKinnon, R. (2002) X-ray structure of a ClC chloride channel at 3.0 Å reveals the molecular basis of anion selectivity. *Nature*, **415**(6869): 287–294.
- Ecker, J.R. (1995) The ethylene signal transduction pathway in plants. *Science*, **268**(5211): 667–675.
- Elich, T.D., & Chory, J. (1994) Initial events in phytochrome signalling: still in the dark. *Plant Molecular Biology*, **26**(5): 1315–1327.
- Fu, D., Wakasugi, M., Ishigaki, Y., Nikaido, O., Matsunaga, T. (2003) cDNA cloning of the chicken DDB1 gene encoding the p127 subunit of damaged DNA-binding protein. *Genes Genet. Syst.*, **78**:169–177.
- Gehring, M., Choi, Y., Fischer, R.L. (2004) Imprinting and seed development. *Plant Cell (Suppl.)*, **16**: S203–S213.
- Giliberto, L., Perrotta, G., Pallara, P., Weller, J.L., Fraser, P.D., Bramley, P.M., Fiore, A., Tavazza, M., Giuliano, G. (2005) Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content. *Plant Physiology*, **137**(1): 199–208.
- Goldberg, R.B., Barker, S.J., Perez-Grau, L. (1989) Regulation of gene expression during plant embryogenesis. *Cell*, **56**: 149–160.
- Guo, H., Yang, H., Mockler, T.C., Lin, C. (1998) Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors. *Science*, **279**: 1360–1363.

- Guo, J., Zeng, W., Chen, Q., Lee, C., Chen, L., Yang, Y., Cang, C., Ren, D., Jiang, Y. (2016) Structure of voltage-gated two-pore channel TPC1 from *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, **531**(7593): 196–201.
- Harada, A., Sakai, T., & Okada, K. (2003) phot1 and phot2 mediate blue light-induced transient increases in cytosolic Ca<sup>2+</sup> differently in *Arabidopsis* leaves. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**(14): 8583–8588.
- Harada, A., Takemiya, A., Inoue, S., Sakai, T., Shimazaki, K. (2013) Role of RPT2 in leaf positioning and flattening and a possible inhibition of phot2 signaling by phot1. *Plant Cell Physiology*, **54**: 36–47.
- Hedrich, R., & Becker, D. (1994) Green circuits--the potential of plant specific ion channels. *Plant Molecular Biology*, **26**(5): 1637–1650.
- Hille, B. (2001) Ion channels of excitable membranes (3rd edition), Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA p. 1.
- Hlavinka, J., Nauš, J., Fellner, M. (2013) Spontaneous mutation 7B-1 in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science*, **209**: 75–80.
- Huala, E., Oeller, P.W., Liscum, E., Han, I.S., Larsen, E., and Briggs, W.R. (1997) *Arabidopsis* NPH1: A protein kinase with a putative redox-sensing domain. *Science*, **278**: 2120–2123.
- Humplík, J.F., Turečková, V., Fellner, M., & Bergougnoux, V. (2015) Spatio-temporal changes in endogenous abscisic acid contents during etiolated growth and photomorphogenesis in tomato seedlings. *Plant Signaling & Behavior*, **10**: 8, e1039213.
- Chaves, I., Pokorny, R., Byrdin, M., Hoang, N., Ritz, T., Brettel, K., Essen, L.O., van der Horst, G. T. J., Batschaer, A., Ahmad, M. (2011) The cryptochromes: blue light photoreceptors in plants and animals. *Annu Review of Plant Biology*, **62**: 335–364.

Cho, M.H., & Spalding, E.P. (1996) An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(15): 8134–8138.

Chory, J., Reinecke, D., Sim, S., Washburn, T., & Brenner, M. (1994) A role for cytokinins in de-etiolation in *Arabidopsis* (det mutants have an altered response to cytokinins). *Plant Physiology*, **104**(2): 339–347.

Chory, J., Chatterjee, M., Cook, R.K., Elich, T., Fankhauser, C., Li, J., Nagpal, P., Neff, M., Pepper, A., Poole, D., Reed, J., Vitart, V. (1996) From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **93**(22): 12066–12071.

Christie, J.M. (2007) Phototropin blue-light receptors. *Annu Review of Plant Biology*, **58**: 21–45.

Inada, S., Ohgishi, M., Mayama, T., Okada, K., & Sakai, T. (2004) RPT2 is a signal transducer involved in phototropic response and stomatal opening by association with phototropin 1 in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, **16**(4): 887–896.

Iovine, B., Iannella, M.L., Bevilacqua, M.A. (2011) Damage-specific DNA binding protein 1 (DDB1): a protein with a wide range of functions. *International Journal of Biochemistry & Cell Biol.*, **43**(12): 1664–1667.

Ishishita, K., Suetsugu, N., Hirose, Y., Higa, T., Doi, M., Wada, M., Matsushita, T., Gotoh, E. (2016) Functional characterization of blue-light-induced responses and PHOTOTROPIN 1 gene in *Welwitschia mirabilis*. *Journal of Plant Research*, **129**(2): 175–187.

Kapetanaki, M.G., Guerrero-Santoro, J., Bisi, D.C., Hsieh, C.H., Rasic-Otrin, V., Levine, A.S. (2006) The DDB1-CUL4A DDB2 ubiquitin ligase is deficient in xeroderma pigmentosum group E and targets histone H2A at UV-damaged DNA sites. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**: 2588-2593.

- Kerckhoffs, L.H.J., Kendrick, R.E. (1997) Photocontrol of anthocyanin biosynthesis in tomato. *Journal of Plant Research*, **110**: 141–149.
- Kerckhoffs, L.H.J., de Groot, N.A.M.A., van Tuinen, A., Schreuder, M.E.L., Nagatani, A., Koornneef, M., Kendrick, R.E. (1997a) Physiological characterization of exaggerated-photoresponse mutants of tomato. *Journal of Plant Physiology*, **150**: 578-587.
- Kinoshita, T., Doi, M., Suetsugu, N., Kagawa, T., Wada, M., Shimazaki, K. (2001) Phot1 and phot2 mediate blue light regulation of stomatal opening. *Nature*, **414**(6864): 656–660.
- Kinoshita, T., Emi, T., Tominaga, M., Sakamoto, K., Shigenaga, A., Doi, M., & Shimazaki, K. (2003) Blue-light- and phosphorylation-dependent binding of a 14-3-3 protein to phototropins in stomatal guard cells of broad bean. *Plant Physiology*, **133**(4): 1453–1463.
- Kleine, T., Lockhart, P. and Batschauer, A. (2003) An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystiscryptochrome* is targeted to organelles. *The Plant Journal*, **35**: 93–103.
- Knieb, E., Salomon, M., Rüdiger, W. (2004) Tissue-specific and subcellular localization of phototropin determined by immuno-blotting. *Planta*, **218**: 843–851.
- Kollist, H., Jossier, M., Laanemets, K. and Thomine, S. (2011), Anion channels in plant cells. *FEBS Journal*, **278**: 4277–4292.
- Koselski, M., Trebacz, K., Dziubinska, H. (2017) Vacuolar ion channels in the liverwort *Marchantia polymorpha*: influence of ion channel inhibitors. *Planta* **245**: 1049–1060.
- Lee, K., Lee, H.G., Yoon, S., Kim, H.U., & Seo, P.J. (2015) The *Arabidopsis* MYB96 transcription factor is a positive regulator of *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE4* in the control of seed germination. *Plant Physiology*, **168**(2): 677–689.

- Li, Q.H. and Yang, H.Q. (2007) Cryptochrome Signaling in Plants. *Photochemistry and Photobiology*, **83**: 94–101.
- Lieberman, M., Segev, O., Gilboa, N., Lalazar, A., Levin, I. (2004) The tomato homolog of the gene encoding UV-damaged DNA binding protein 1 (DDB1) underlined as the gene that causes the high pigment-1 mutant phenotype. *Theoretical and Applied Genetics*, **108**(8): 1574–1581.
- Lin, C., Yang, H., Guo, H., Mockler, T., Chen, J., & Cashmore, A.R. (1998) Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**(5): 2686–2690.
- Lin, C., Shalitin, D. (2003) Cryptochrome structure and signal transduction. *Annu Review of Plant Biology*, **54**: 469–496.
- Lin, C., & Todo, T. (2005) The cryptochromes. *Genome Biology*, **6**(5): 220.
- Liscum, E., Askinosie, S.K., Leuchtman, D.L., Morrow, J., Willenburg, K.T., & Coats, D.R. (2014) Phototropism: growing towards an understanding of plant movement. *The Plant Cell*, **26**(1): 38–55.
- Liu, Y., Roof, S., Ye, Z., Barry, C., Van Tuinen, A., Vrebalov, J., Bowler, C., Giovannoni, J. (2004) Manipulation of light signal transduction as a means of modifying fruit nutritional quality in tomato. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **101**: 9897-9902.
- Marten, H., Hedrich, R. and Roelfsema, M.R.G. (2007) Blue light inhibits guard cell plasma membrane anion channels in a phototropin-dependent manner. *The Plant Journal*, **50**: 29–39.
- McCarty, D.R., Carson, C.B. (1991) The molecular genetics of seed maturation in maize. *Physiologia Plant*, **81**: 267–272.

Müller, K., Bouyer, D., Schnittger, A., & Kermode, A.R. (2012) Evolutionarily Conserved Histone Methylation Dynamics during Seed Life-Cycle Transitions. *PLoS ONE*, **7**(12): e51532.

Mustilli, A.C., Fenzi, F., Ciliento, R., Alfano, F., Bowler, C. (1999) Phenotype of the tomato *high pigment-2* mutant is caused by a mutation in the tomato homolog of *DEETIOLATED1*. *The Plant Cell*, **11**: 145-157.

Neff, M.M., & Chory, J. (1998) Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during *Arabidopsis* Development. *Plant Physiology*, **118**(1): 27–35.

Ninu, L., Ahmad, M., Miarelli, C., Cashmore, A.R. and Giuliano, G. (1999) Cryptochrome 1 controls tomato development in response to blue light. *The Plant Journal*, **18**: 551–556.

Osterlund, M.T., Hardtke, C.S., Wei, N., Deng, X.W. (2000) Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature*, **405**: 462–466.

Partch, C.L., Clarkson, M.W., Özgür, S., Lee, A. L., & Sancar, A. (2005) Role of structural plasticity in signal transduction by the cryptochrome blue-light photoreceptor. *Biochemistry*, **44**(10): 3795-3805.

Perrota, G., Ninu, L., Flamma, F., Weller J.L., Kendrick R.E., Nebuloso E., Giuliano G. (2000) Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2. *Plant Molecular Biology*, **42**(5): 765-773.

Peters, J.L., Schreuder, M.E.L., Heeringa, G.H., Wesselius, J.C., Kendrick, R.E., Koornneef, M. (1992) Analysis of the response of photomorphogenetic tomato mutants to end-of-day far-red light. *Acta Horticulturae, Vol.*, **305**: 67-77.

Peters, J.L., Széll, M., & Kendrick, R.E. (1998) The expression of light-regulated genes in the high-pigment-1 mutant of tomato. *Plant Physiology*, **117**(3): 797–807.

Preuten, T., Blackwood, L., Christie, J. M. and Fankhauser, C. (2015) Lipid anchoring of *Arabidopsis* phototropin 1 to assess the functional significance of receptor internalization: should I stay or should I go? *New Phytologist*, **206**: 1038–1050.

Purves, D., Augustine, G.J., Fitzpatrick, D., et al., (2001) Neuroscience. 2nd edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates; The Molecular Structure of Ion Channels.

Raz, V., Bergervoet, J.H., Koornneef, M. (2001) Sequential steps for developmental arrest in *Arabidopsis* seeds. *Development*, **128**: 243–252.

Reynard, G.B. (1956) Origin of Web Special (Black Queen) in tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, **40**: 44–64.

Roberts, S.K. (2006) Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. *New Phytologist*, **169**: 647–666.

Roelfsema, M.R.G., Steinmeyer, R., Staal, M. and Hedrich, R. (2001) Single guard cell recordings in intact plants: light-induced hyperpolarization of the plasma membrane. *The Plant Journal*, **26**: 1–13.

Roelfsema, M.R.G., Hanstein, S., Felle, H.H. and Hedrich, R. (2002) CO<sub>2</sub> provides an intermediate link in the red light response of guard cells. *The Plant Journal*, **32**: 65–75.

Sakai, T., Kagawa, T., Kasahara, M., Swartz, T.E., Christie, J.M., Briggs, W.R., Wada, M., and Okada, K. (2001) *Arabidopsis* nph1 and npl1: Blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 6969–6974.

Sakamoto, K., Nagatani, A. (1996) Nuclear localization activity of phytochrome B. *The Plant Journal*, **10**: 859–868.

Sakamoto, K., & Briggs, W.R. (2002) Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell*, **14**(8): 1723–1735.

- Seo, M., Nambara, E., Choi, G., Yamaguchi, S. (2009) Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology*, **69**: 463-472.
- Shichijo, C., Katada, K., Tanaka, O., Hashimoto, T. (2001) Phytochrome A-mediated inhibition of seed germination in tomato. *Planta.*, **213**(5): 764–769.
- Schroeder, J., Schmidt, C., & Sheaffer, J. (1993) Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *The Plant Cell*, **5**(12): 1831–1841.
- Schroeder, D.F., Gahrtz, M., Maxwell, B.B., Cook, R.K., Kan, J.M., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Chory, J. (2002) Deetiolated1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Current Biology*, **12**: 1462–1472.
- Schwartz, A., Ilan, N., Schwarz, M., Scheaffer, J., Assmann, S. M., & Schroeder, J. I. (1995) Anion-channel blockers inhibit S-type anion channels and abscisic acid responses in guard cells. *Plant Physiology*, **109**(2): 651–658.
- Srinivas, A., Behera, R. K., Kagawa, T., Wada, M., & Sharma, R. (2004) *High pigment1* mutation negatively regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. *Plant Physiology*, **134**(2): 790–800.
- Stevens, M.A., Rick, C.M. (1986) Genetics and breeding. In: Atherton, J.G., Rudish, J., eds. The tomato crop. A scientific basis for improvement. London: Chapman and Hall.
- Suetsugu, N., Kagawa, T., & Wada, M. (2005) An auxilin-like J-domain protein, JAC1, regulates phototropin-mediated chloroplast movement in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, **139**(1): 151–162.
- Sullivan, J.A., Deng, X.W. (2003) From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology*, **260**: 289–297.



Sullivan, S., Takemiya, A., Kharshiing, E., Cloix, C., Shimazaki, K., & Christie, J.M. (2016) Functional characterization of *Arabidopsis* phototropin 1 in the hypocotyl apex. *The Plant Journal*, **88**(6): 907–920.

Taiz, L., Zeiger, E., Møller, I.M., Murphy, A. (2015) Plant physiology and development (6th edition), Sinauer Associates, Inc., p.: 150, 270.

Takemiya, A., Inoue, S., Doi, M., Kinoshita, T., & Shimazaki, K. (2005) Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments. *The Plant Cell*, **17**(4): 1120–1127.

Tavares, B., Domingos, P., Dias, P.N., Feijó, J.A., Bicho, A. (2011) The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany*, **62** (7): 2273-2298.

Thomine, S., Lelièvre, F., Boufflet, M., Guern, J., & Barbier-Brygoo, H. (1997) Anion-channel blockers interfere with auxin responses in dark-grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiology*, **115**(2): 533–542.

Trick, J.L., Chelvanithilan, S., Klesse, G., Aryal, P., Wallace, E.J., Tucker, S.J., & Sansom, M.S.P. (2016) Functional annotation of ion channel structures by molecular simulation. *Structure (London,England:1993)*, **24**(12): 2207–2216.

Van Tuinen, A., Kerckhoffs, L., Nagatani, A., Kendrick, R. E., & Koornneef, M. (1995a) A temporarily red light-insensitive mutant of tomato lacks a light-stable, B-like phytochrome. *Plant Physiology*, **108**(3): 939–947.

Van Tuinen, Kerckhoffs, L.H., Nagatani, A., Kendrick, R.E., Koornneef, M (1995b) Far-red light-insensitive, phytochrome A-deficient mutants of tomato. *Molecular and General Genetics*, **246**(2): 133–141.

- Wang T.B., Gassmann, W., Rubio, F., Schroeder, J.I., Glass, A.D.M. (1998) Rapid up-regulation of HKT1, a high-affinity potassium transporter gene, in roots of barley and wheat following withdrawal of potassium. *Plant Physiology*, **118**: 651–659.
- Wang, H., Zhai, L., Xu, J., Joo, H.Y., Jackson, S., Erdjument-Bromage, H., Tempst, P., Xiong, Y., Zhang, Y. (2006) Histone H3 and H4 ubiquitylation by the CUL4-DDB-ROC1 ubiquitin ligase facilitates cellular response to DNA damage. *Molecular Cell*, **22**: 383-394.
- Weller, J.L., Nagatani, A., Kendrick, R.E., Murfet, I.C., & Reid, J.B. (1995) New lv mutants of pea are deficient in phytochrome B. *Plant Physiology*, **108**(2): 525–532.
- White, P., & Broadley, M. (2001) Chloride in soils and its uptake and movement within the plant: a review. *Annals of Botany*, **88**(6): 967-988.
- Yamaguchi, R., Nakamura, M., Mochizuki, N., Kay, S.A., & Nagatani, A. (1999) Light-dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis*. *The Journal of Cell Biology*, **145**(3): 437–445.
- Yanagawa, Y., Sullivan, J.A., Komatsu, S., Gusmaroli, G., Suzuki, G., Yin, J., Ishibashi, T., Saijo, Y., Rubio, V., Kimura, S., Wang, J., Deng, X.W. (2004) COP10 forms a complex with DDB1 and DET1 in vivo *Arabidopsis* and enhances the activity of ubiquitin conjugating enzymes. *Genes & Development*, **18**: 2172-2181.
- Yang, Z., Liu, B., Su, J., Liao, J., Lin, C. and Oka, Y. (2017) Cryptochromes orchestrate transcription regulation of diverse blue light responses in plants. *Photochemistry and Photobiology*, **93**: 112–127.
- Zhao, X., Wang, Y.L., Qiao, X.R., Wang, J., Wang, L.D., Xu, C.S., & Zhang, X. (2013) Phototropins function in high-intensity blue light-induced hypocotyl phototropism in *Arabidopsis* by altering cytosolic calcium. *Plant Physiology*, **162**(3): 1539–1551.

Internetové odkazy:

Koning, R.E. (1994) Phytochrome. Plant Physiology Information Website:  
[http://plantphys.info/plant\\_physiology/phytochrome.shtml](http://plantphys.info/plant_physiology/phytochrome.shtml); Staženo 14.4.2017.