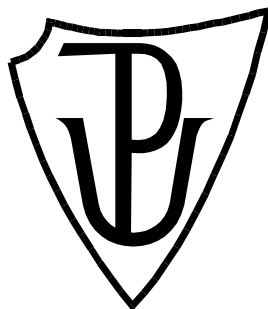


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Světlem indukovaný pohyb chloroplastů
u fotomorfogenních mutantů rajčete**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Otakar Savara
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok:	2018

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval 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. Byl jsem seznámen 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 *podpis bakaláře*

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Martině Špundové, Ph.D., za příkladné vedení, za rady a podněty, které mi poskytla, za odbornou pomoc při sepisování bakalářské práce a za vypěstování rostlin ve fyto komoře. Dále bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D., a prof. RNDr. Janu Naušovi, CSc., za odbornou pomoc a cenné připomínky k bakalářské práci. Děkuji také Mgr. Vladimíře Nožkové, Ph.D., za provedená gazometrická měření.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Otakar Savara
Název práce	Světlem indukovaný pohyb chloroplastů u fotomorfogenních mutantů rajčete
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Pohyb chloroplastů je součástí souboru procesů, které rostlinám umožňují efektivně a rychle reagovat na dynamicky se měnící světelné podmínky okolního prostředí. Rostliny dovedou díky pohybům chloroplastů regulovat množství absorbovaného slunečního záření na subcelulární úrovni a tím v případě nedostačující intenzity světla zvýšit rychlost fotosyntézy (akumulační pohyb), případně se vyhnout poškození fotosyntetického aparátu vlivem příliš silného záření (únikový pohyb). Pohyb chloroplastů je u vyšších rostlin vyvolán modrou částí světelného spektra, přičemž intenzita modrého světla určuje, jaký typ pohybu chloroplastů nastane. Pohyb chloroplastů je řízen specifickými rostlinnými fotoreceptory – fototropiny. Tato práce je zaměřena na studium změn v pohybech chloroplastů v následujících fotomorfogenních mutantech lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.): *7B-1* (obecně snížená reakce na modré světlo), *cry1-1* a *cry1-2* (defekt v kryptochromu 1, fotoreceptoru citlivému na modré světlo), *hp1* (hypersenzitivita vůči modrému světlu) a *nps1* (defekt ve fototropinu 1, který řídí akumulační pohyby chloroplastů). Pohyb chloroplastů byl určován ze změn kolimované transmitance listů. Ze studovaných mutantů byl pohyb chloroplastů průkazně ovlivněn (inhibován) pouze u listů rostlin mutantu *7B-1* pěstovaných při dlouhém dni, což je v souladu s očekáváním, protože je známo, že tento mutant má defekt ve fototropinové signální dráze.

Klíčová slova	Pohyb chloroplastů, transmitance, fototropin, lilek rajče
Počet stran	58
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Otakar Savara
Title	Light-induced chloroplast movement in photomorphogenic tomato mutants
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of Biochemistry
Supervisor	RNDr. Martina Špundová, Ph.D.
The year of presentation	2018

Abstract

Chloroplast photorelocation movements belong to processes that allow plants to adapt to fluctuating changes of environmental light conditions. Via the chloroplast movements, plants are able to regulate amount of absorbed light on subcellular level thus they can optimize photosynthetic activity and avoid photodamage. Chloroplast movements are induced by blue light, whereas the intensity of the light determines, which movement will occur (avoidance or accumulation). The movements are managed by specialized plant photoreceptors – phototropins. This bachelor thesis is aimed to find out, whether there are changes in chloroplast movements in chosen photomorphogenic mutants of tomato (*Solanum lycopersicum* L.). The mutants are: *7B-1* (lower sensitivity to blue-light), *cry1-1* and *cry1-2* (defect in cryptochrome 1, a blue-light photoreceptor), *hp1* (hypersensitiveness to blue-light) and *nps1* (defect in phototropin 1, a blue light photoreceptor that regulates chloroplast accumulation). Chloroplast movements were estimated from changes in collimated leaf transmittance. It was shown, that *7B-1*, which is defective in phototropin signaling, exhibits also defect in blue-light induced chloroplast movements when grown on long days. In other mutants no significant alterations in chloroplast movements were found.

Keywords	Chloroplast movement, transmittance, phototropin, tomato
Number of pages	58
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	Úvod.....	9
2	Současný stav řešené problematiky	11
2.1	Úvod do problematiky	11
2.2	Obecná charakteristika pohybu chloroplastů.....	11
2.3	Mechanismus pohybu chloroplastů.....	13
2.3.1	Fototropiny	13
2.3.1.1	Struktura fototropinů a přenos signálu	14
2.3.2	Cp-aktin.....	15
2.3.3	Další fotoreceptory zapojené v pohybu chloroplastů.....	17
2.3.3.1	Fytochromy	17
2.3.3.2	Neochrom 1.....	17
2.4	Zkoumané fotomorfogenní mutanty lilku rajčete (<i>Solanum lycopersicum</i> L.) 18	
2.4.1	<i>7B-1</i>	18
2.4.2	<i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i>	19
2.4.3	<i>hp1</i>	20
2.4.4	<i>nps1</i>	21
3	Experimentální část.....	22
3.1	Rostlinný materiál	22
3.2	Metody.....	24
3.2.1	Měření pohybu chloroplastů	24
3.2.2	Stanovení relativního obsahu chlorofylu	28
3.2.3	Stanovení parametru F_v/F_M	28
3.2.4	Statistické zpracování získaných dat.....	29
3.2.5	Fotodokumentace	29
4	Výsledky a diskuse.....	30
4.1	<i>7B-1</i>	30
4.1.1	Únikový pohyb chloroplastů (<i>7B-1</i>).....	30
4.1.2	Akumulační pohyb chloroplastů (<i>7B-1</i>).....	37
4.2	<i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i>	39
4.2.1	Únikový pohyb chloroplastů (<i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i>).....	39
4.2.2	Akumulační pohyb chloroplastů (<i>cry1-1</i> a <i>cry1-2</i>).....	42
4.3	<i>hp1</i>	43

4.3.1	Únikový pohyb chloroplastů (<i>hpl</i>)	43
4.3.2	Akumulační pohyb chloroplastů (<i>hpl</i>)	45
4.4	<i>nps1</i>	46
4.4.1	Únikový pohyb chloroplastů (<i>nps1</i>).....	46
4.4.2	Akumulační pohyb chloroplastů (<i>nps1</i>).....	48
5	Závěr	52
6	Literatura	54
7	Seznam použitých symbolů a zkratek	58

Cíle práce

1. Sepsání literární rešerše na téma pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem se zaměřením na jeho molekulární mechanismus a signální dráhu.
2. Stanovení únikového a akumulčního pohybu chloroplastů ve vybraných fotomorfogenních mutantech lilku rajčete pomocí měření změn optické propustnosti listu (přístroj Spectrapen).
3. Změření relativního obsahu chlorofylu a parametru F_v/F_M ve vybraných fotomorfogenních mutantech lilku rajčete.
4. Zpracování výsledků a sepsání experimentální části bakalářské práce.

1 ÚVOD

Světlo má zásadní roli v životě zelených fotosyntetických rostlin, konsekventně pak v životě téměř všech živých organismů na Zemi, neboť ty využívají chemickou energii získanou rostlinami přeměnou energie světelné v procesu fotosyntézy. Fototrofní rostliny vyvinuly v průběhu evoluce mechanismy, díky kterým se dovedou přizpůsobit měnícím se světelným podmínkám okolí za účelem zvýšení rychlosti fotosyntézy nebo vyhnoutí se poškození příliš vysokou intenzitou dopadajícího záření. Důležité místo mezi těmito mechanismy zaujímají fotorelokační pohyby chloroplastů. První fází reakce rostliny na změnu světelných podmínek je zachycení podnětu fotoreceptory. Jedná se hlavně o tři skupiny fotoreceptorů – fytochromy, kryptochromy a fototropiny. Z hlediska naší práce jsou stěžejní fototropiny, neboť právě jimi jsou řízeny fotorelokační pohyby chloroplastů (Kong a Wada, 2014).

Moderní věda nám nabízí nové možnosti, jak pochopit procesy odehrávající se v rostlině při změně vnějších podmínek než pouhé pozorování. Metoda genového knock-outu, za kterou získali vědci Mario Capecchi, Martin Evans a Oliver Smithies v roce 2007 Nobelovu cenu za fyziologii a medicínu, nám umožňuje nahlédnout do procesů odehrávajících se v rostlině na genové, a v kombinaci s dalšími moderními postupy i molekulární úrovni. Využití organismů s vyřazenými geny a následné zkoumání rozdílů v mutantech v porovnání s původními organismy je cesta, kterou se vydává současná věda a kterou se vydáváme i my. Bakalářská práce má za cíl ověřit změny pohybu chloroplastů vyvolané modrým světlem o nízké a vysoké intenzitě ve vybraných fotomorfogenních mutantech lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.). Jedná se o tyto mutantní rostliny: *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2*, *hpl* a *nps1*.

Uspořádání chloroplastů v buňkách není stálé, ale mění se v závislosti na vnějších světelných podmínkách následujícím způsobem: při osvitě světlem o nízké intenzitě nastává akumulární pohyb – chloroplasty se pohybují směrem ke slabému světlu, aby se zvýšila rychlost fotosyntézy. V případě ozáření světlem o vysoké intenzitě nastává tzv. únikový pohyb. Při tomto pohybu chloroplasty naopak migrují směrem od silného světla, aby se ochránily před poškozením fotosyntetického aparátu (Haupt a Scheurlein, 1990; Kagawa a Wada, 2002; Kong a Wada, 2014).

Zkoumáním procesů, které stojí za pohyby chloroplastů, nahlížíme do jednoho z klíčových mechanismů zajišťujícího fungování života na Zemi – pohyby

chloroplastů patří mezi způsoby, jakými rostliny dovedou zefektivnit hospodaření se světelnou energií, která je pro jejich růst stěžejní. S přihlédnutím k faktu, že většina organismů je závislá na energii, kterou rostliny dovedou ze světla získat, jde o mimořádně významné procesy. Výzkum fotorelokačních pohybů chloroplastů nám může v neposlední řadě pomoci vyvinout rostliny s vylepšenými vlastnostmi, které by byly využitelné v zemědělství.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Úvod do problematiky

Většinu rostlin na Zemi řadíme mezi autotrofní organismy – jsou schopny získávat uhlík pro tvorbu organických látek pro vlastní výživu a stavbu z anorganických látek. Jako zdroj uhlíku využívají většinou oxid uhličitý z ovzduší, další důležitou komponentou je pak voda a dále potřebují pro svůj růst různé minerální látky z půdy. Z vody a oxidu uhličitého jsou rostliny schopny v procesu fotosyntézy vyrobit organické látky – cukry, jmenovitě glukózu. Pro celý proces fotosyntézy je esenciální přísun energie, kterou rostliny získávají většinou ve formě slunečního záření. Rostliny využívající sluneční záření jako zdroj energie pro fotosyntézu nazýváme fototrofní. V takovýchto rostlinách je světlo pohlceno zeleným fotosyntetickým barvivem – chlorofylem, který se nachází v tylakoidech chloroplastů.

V přírodním prostředí se během dne i roku světelné podmínky dynamicky mění - jedná se zejména o složení dopadajícího světla, jeho intenzitu, dobu působení, směr a fotoperiodu. Aby se rostliny dokázaly přizpůsobit těmto změnám, vyvinuly v průběhu evoluce sérii mechanismů, díky kterým dovedou optimalizovat svůj růst. Mezi obecně známé mechanismy patří fototropismus, otevírání stomat, fotonastické pohyby listů a také fotorelokační pohyby chloroplastů.

2.2 Obecná charakteristika pohybu chloroplastů

Pohyby chloroplastů zajišťují odpověď rostliny na změnu světelných podmínek na subcelulární úrovni. Pohyby chloroplastů jsou společné všem vyšším a některým nižším rostlinám (např. *Adiantum capillus* nebo *Physcomitrella patens*; Kong a Wada, 2014). Rozlišujeme 2 základní druhy pohybu chloroplastů:

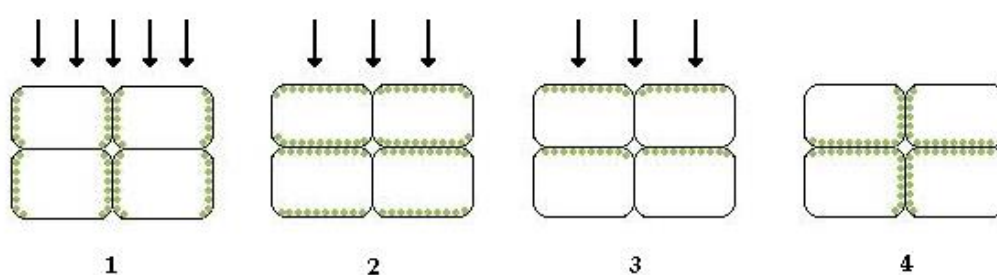
a) Únikový pohyb – „avoidance response“ (z angl. to avoid - vyhnout se)

Tento typ pohybu chloroplastů nastává v případě příliš vysoké intenzity světla dopadajícího na rostlinu, resp. list. Při tomto typu pohybu se chloroplasty přesunují do parastrofické pozice (Obr. 1), tj. ke stěnám buněk rovnoběžným s dopadajícím zářením. Rostlina tímto zabraňuje poškození fotosyntetického aparátu (Haupt a Scheurlein, 1990; Kagawa a Wada, 2002; Kong a Wada, 2014).

b) Akumulační pohyb – „accumulation response“ (z angl. to accumulate - nahromadit se)

Tento typ pohybu nastává při slabé intenzitě dopadajícího světla. Chloroplasty se přesouvají do diastrofické nebo epistrofické pozice (Obr. 1), tj. ke stěnám kolmým k dopadajícímu záření. Dochází ke zvýšení absorpce světla a tím ke zvýšení rychlosti fotosyntézy (Haupt a Scheurlein, 1990; Kagawa a Wada, 2002; Wada 2016).

Ve tmě chloroplasty pak zaujímají pozici apostrofe (Obr. 1) (Wada 2016).



Obr. 1 Uspořádání chloroplastů v buňkách v reakci na různou ozáření buněk. Parastrofe (1), diastrofe (2), epistrofe (3), apostrofe (4). Počet šipek znázorňuje relativní ozáření (převzato z Řebíček, 2009).

2.3 Mechanismus pohybu chloroplastů

Pro účinnou odpověď na světelné stimuly vyvinuly vyšší rostliny sérii fotoreceptorů – proteinů citlivých na světelný podnět. Řadíme mezi ně fytochromy reagující na červené světlo (Mathews, 2006) a fototropiny a kryptochromy reagující na UV-A a modrou oblast světelného spektra (Banerjee a Batschauer, 2005). Pro nás jsou stěžejní fototropiny, neboť ty jsou zodpovědné za fotorelokační pohyby chloroplastů (Kong *et al.*, 2012). Mechanickým elementem odpovědným za pohyb chloroplastů po příjmu signálu příslušnými receptory a jeho přenosu signálními dráhami je aktinový cytoskelet, zejména tzv. cp-aktinová vlákna (Suetsugu *et al.*, 2016).

Pohyb chloroplastů je indukován především modrým světlem (450-510 nm), u některých nižších rostlin (např. *Adiantum capillus* nebo *Physcomitrella patens*) také světlem červeným (620-760 nm) (Kong a Wada, 2014). Bylo zjištěno, že současné působení červeného světla zvyšuje odezvu na modré světlo (Kagawa a Wada, 2000). V případě vyšších rostlin (včetně *Arabidopsis thaliana*) je pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem zprostředkován specifickými fotoreceptory – fototropiny, které mají absorpční spektrum v rozmezí 320-500 nm (Kong *et al.*, 2012; Kong a Wada, 2014).

2.3.1 Fototropiny

Fototropiny jsou specifické rostlinné fotoreceptorové proteiny nacházející se ve většině organismů rostlinné říše, napříč vyššími rostlinami, po jednobuněčné řase (např. *Chlamydomonas reinhardtii*), u kterých mohou regulovat sexuální cyklus v závislosti na modrém světle (Huang a Beck, 2003). Jedná se o vysoce konzervativní proteiny (Briggs *et al.*, 2001; Lariguet a Dunand, 2005). Ve vyšších rostlinách byly objeveny dva druhy fototropinů: fototropin 1 (phot1) a fototropin 2 (phot2), které ze 60 % sdílejí stejnou sekvenční identitu (Jarillo *et al.*, 2001; Briggs a Christie, 2002). Oba fototropiny se funkčně překrývají v regulaci akumulčního pohybu chloroplastů. Phot2 je pak samostatně zodpovědný za únikový pohyb chloroplastů a přesun chloroplastů do pozice apostrofe, který nastává za tmy (Obr. 1) (Aihara *et al.*, 2008). Regulace akumulčního pohybu chloroplastů pomocí phot2 není v porovnání s phot1 příliš významná (Kong a Wada, 2014). Mezi další funkce fototropinů patří regulace fototropismu, otevírání a zavírání stomat, zploštění listů a

inhibice růstu hypokotylu při osvitě modrým světlem (Christie, 2007; Aihara *et al.*, 2008).

Phot1 je oproti phot2 specifický vyšší citlivostí, která se projevuje větším rozmezím intenzity modrého světla, na kterou reaguje. Zatímco phot1 reguluje fototropismus vyvolaný modrým světlem o intenzitě 0,01 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, phot2 reaguje při řízení fototropismu na modré světlo o intenzitě 1 – 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Phot1 je dále zodpovědný za akumulární pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem o intenzitě 0,4 až 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, nejcitlivěji však reaguje v rozmezí intenzity 0,4-40 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Sakai *et al.*, 2001). Phot1 tedy řídí převážně procesy vyvolané modrým světlem o nízké intenzitě.

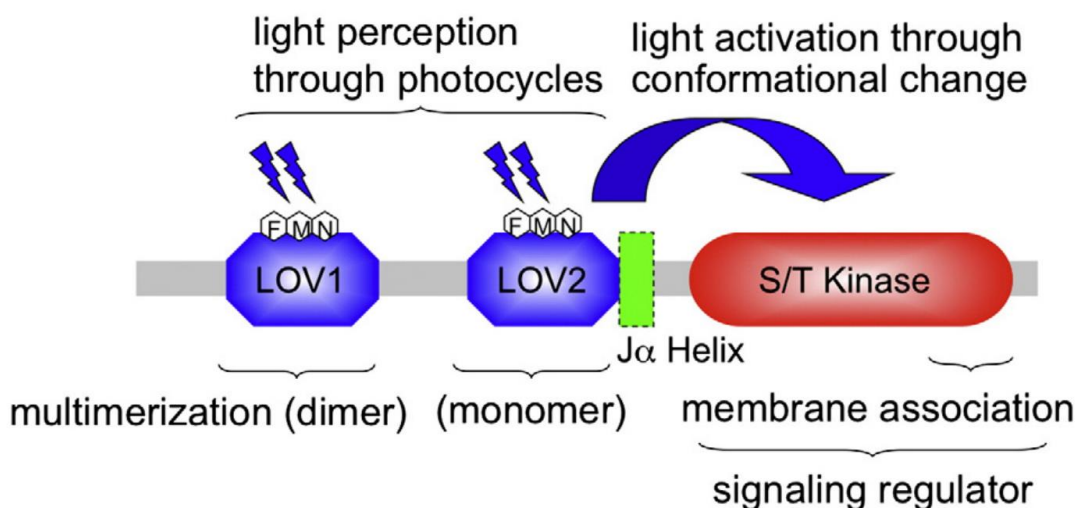
Phot2 je samostatně odpovědný za únikový pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem o intenzitě kolem 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ a vyšší. Dále je zapojen do regulace akumulárního pohybu chloroplastů v rozmezí intenzity modrého světla 2-30 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (Sakai *et al.*, 2001). Phot2 je tedy zapojený převážně v procesech vyvolaných modrým světlem o vyšší intenzitě.

Z hlediska subcelulární lokalizace se většina fototropinů odpovědných za pohyby chloroplastů nachází podél plazmatické membrány, za určitých okolností se však mohou přesouvat i do jiných částí buňky (Kong *et al.*, 2013). Bylo zjištěno, že v reakci na osvit modrým světlem se phot1 z části přesunuje do cytoplazmy, phot2 se pak v reakci na modré světlo částečně připojuje ke Golgiho aparátu. Tyto přesuny jsou důležité pro kinázovou aktivitu fototropinů (Kong a Wada, 2014).

2.3.1.1 Struktura fototropinů a přenos signálu

Z chemického hlediska jsou fototropiny Ser/Thr proteinové kinázy složené z 900-1000 aminokyselinových zbytků a dvou prostetických FMN molekul (Briggs a Christie, 2002; Nakasako *et al.*, 2008). Fototropiny se skládají ze dvou částí: N-koncové fotosenzorické části a C-koncové Ser/Thr kinázové domény (Christie 2007; Matsuoka *et al.*, 2007). Uvnitř N-koncové části se nacházejí 2 LOV (Light oxygen and voltage) domény (LOV1 a LOV2), přičemž primární roli v biologické funkci fototropinů hraje LOV2 (Christie *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2007). Ukázalo se rovněž, že N-konec je odpovědný za vyšší citlivost phot1 oproti phot2 v regulaci procesů řízených fototropiny (Aihara *et al.*, 2008). LOV domény sdílejí společnou sekundární a terciární strukturu a vytvářejí vazebné místo pro nekovalentně připojené FMN

chromofory, které zajišťují fotochemickou aktivitu fototropinů (Obr. 2) (Crosson a Moffat, 2001; Nakasako *et al.*, 2008). Signál vyvolaný excitací FMN chromoforů modrým světlem je pomocí tzv. „linker region“ (spojovací region) intramolekulárně přenesen z LOV2 domény na C-kinázovou doménu, která je spojená s cytoplazmatickou membránou (Aihara *et al.*, 2008; Nakasako *et al.*, 2008; Kong a Wada, 2014). Přenosem signálu dochází k autofosforylaci Ser-851 na C-kinázové doméně a signál je dále fosforylací veden do „down-stream“ komponent fototropinové signální dráhy. „Down-stream“ komponenty světelné signální dráhy se nacházejí v jiných částech buňky než fototropiny (převážně v cytosolu) a jejich biochemická funkce zůstává prozatím neobjasněná. Dosavadní výsledky výzkumu procesů skrývajících se za pohyby chloroplastů naznačují, že signál, který způsobuje relokační pohyby chloroplastů, je iniciován právě fosforylací „down-stream“ komponent fototropiny (Kong a Wada, 2014).



Obr. 2 Schéma aktivace signální dráhy fototropinů (převzato z Kong a Wada, 2014).

2.3.2 Cp-aktin

Podobně jako v případě jádra, mitochondrií, endoplazmatického retikula, Golgiho aparátu a dalších organel, i chloroplasty používají pro svůj pohyb v buňce aktinový cytoskelet. Primární roli v zajištění pohybu chloroplastů hrají tzv. cp-aktinová vlákna (z angl. chloroplast-actin filaments). Tato vlákna byla identifikována poměrně nedávno (2009) a oproti aktinovým vláknům nacházejícím se v cytoplazmě mají odlišnou funkci, což se projevuje v rozdílné délce, tvaru i regulačních mechanismech (Kadota *et al.*, 2009; Kong a Wada, 2014).

Jedním z předpokladů efektivní reakce chloroplastů na změnu světelných podmínek je schopnost jejich fixace v určité pozici, resp. zrušení této fixace za účelem pohybu chloroplastu do pozice jiné. Mechanizmy propůjčující chloroplastům tyto schopnosti nejsou doposud detailně popsány, předpokládá se však, že jde o kombinaci „down-stream“ signalizace zprostředkované především phot2, aktivity cp-aktinových vláken a v neposlední řadě signalizace prostřednictvím Ca^{2+} , která stimuluje zrušení fixace chloroplastů v jejich stávající pozici (Takamatsu a Tagaki, 2011; Kong a Wada, 2014).

Chloroplasty analyzují směr a intenzitu dopadajícího světla a v závislosti na těchto informacích indukují přeskupení, resp. nahromadění cp-aktinových vláken v určitém místě své vnější membrány. Toto přeskupení má za následek cílený pohyb chloroplastů (Kadota *et al.*, 2009; Kong a Wada, 2014). Obecně platí, že rychlost pohybu chloroplastů se zvyšuje se zvyšujícím se množstvím nahromaděných cp-aktinových vláken, přičemž pozice těchto vláken na vnější membráně chloroplastu určuje směr pohybu (Kong *et al.*, 2013).

Způsob, jakým se cp-aktinová vlákna na povrchu chloroplastu přeskupují, závisí na intenzitě modrého světla dopadajícího na buňku. Vlivem modrého světla o vysoké intenzitě se cp-aktinová vlákna rychle depolymerizují a mizí z ozářené části chloroplastu, zatímco na neozářené části chloroplastu můžeme naopak pozorovat akumulaci polymerizovaných cp-aktinových vláken. Toto uspořádání vyvolá únikový pohyb chloroplastů, který je veden ve směru nahromadění cp-aktinových vláken (tj. směrem od silného modrého světla) (Kong *et al.*, 2013; Kong a Wada, 2014).

Při ozáření modrým světlem o nízké intenzitě se cp-aktinová vlákna přesouvají menší rychlostí než v případě působení silného modrého světla. Slabé modré světlo vyvolá mírnou akumulaci cp-aktinových vláken na straně chloroplastu přilehlé k tomuto světlu. Výsledkem rozdílů v rychlosti přeskupení cp-aktinových vláken vlivem modrého světla o různé intenzitě je různá rychlost pohybu chloroplastů v závislosti na intenzitě dopadajícího záření (Kong *et al.*, 2013).

2.3.3 Další fotoreceptory zapojené v pohybu chloroplastů

2.3.3.1 Fytochromy

Červené světlo je obvykle neúčinné ve spouštění pohybu chloroplastů ve vyšších rostlinách, nicméně DeBlasio *et al.* (2003) objevili v *A. thaliana* modulaci pohybu chloroplastů fytochromy A a B (phyA a phyB), které patří mezi rostlinné fotoreceptory citlivé na červenou a dalece-červenou oblast světelného spektra. Fytochromy obecně jsou zapojeny spíše v regulaci vývojových procesů řízených světlem, jako např. v klíčení semene, de-etiolizaci rostlin při kontaktu se světlem, růstu kotyledonů, otevírání listů nebo prodlužování stonků (Neff *et al.*, 2000). DeBlasio *et al.* (2003) nicméně zjistili, že mutanti s defektem ve phyA nebo phyB se oproti WT vyznačují zvýšenou mírou únikového pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem o intenzitě $20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Rostliny *A. thaliana* se zvýšenou expresí phyA a phyB se pak oproti WT vyznačovaly zvýšenou mírou akumulárního pohybu chloroplastů vyvolaného modrým světlem o intenzitě $0,3 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. DeBlasio *et al.* (2003) z uvedených výsledků vyvodili, že fytochromy hrají v *A. thaliana* roli v modulaci přechodu mezi pohybem chloroplastů vyvolaném slabým a silným modrým světlem, tj. v rozmezí intenzit $0,3 - 20 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

2.3.3.2 Neochrom 1

Neochrom 1 je chimérický fotoreceptor, který obsahuje N-koncovou část (nesoucí chromofor) strukturně podobnou fytochromům a C-koncovou část mající stejnou strukturu jako u fototropinů (Suetsugu a Wada, 2007). Tento fotoreceptor přítomný v nižších zelených rostlinách řídí relokační pohyby chloroplastů v závislosti nejen na modrém, ale i na červeném světle. Např. netík (*Adiantum capillus-veneris*) reguluje relokační pohyby chloroplastů vyvolané červeným světlem právě pomocí neochromu 1 (Kawai *et al.*, 2003; Suetsugu *et al.*, 2005).

2.4 Zkoumané fotomorfogenní mutanty lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.)

Modré světlo ovlivňuje řadu procesů v rostlině, jmenovitě tvorbu chlorofylu, otevírání a zavírání stomat, fotomorfogenezi, fototropismus, fotorelokační pohyby chloroplastů, zploštění listů a rapidní inhibici prodlužování hypokotylu (Christie, 2007; Aihara *et al.*, 2008). V bakalářské práci jsme se zaměřili na pohyb chloroplastů, který jsme vyvolávali vysokou nebo nízkou intenzitou modrého světla. Srovnávali jsme pohyb chloroplastů v normálních („wild-type“) kultivarech lilku rajčete a ve fotomorfogenních mutantech popsáných v následujících kapitolách.

2.4.1 7B-1

Mutant rajčete 7B-1 (*Solanum lycopersicum* L.) se vyznačuje samčí sterilitou a zvýšenou odolností vůči abiotickým stresům, což z něj dělá potenciálního kandidáta pro produkci hybridních semen s využitím ve stresovém inženýrství rostlin. Mutace 7B-1 je pravděpodobně způsobena defektem v genu *SIGLO2* (*Solanum lycopersicum* glycolate oxidase), který patří do skupiny genů B MADS-box (název odvozen od nejstarších známých genů této rodiny: MCM1, AGAMOUS, DEFICIENS a SRF1), které jsou zapojeny ve vývoji okvětních lístků a tyčinek (Pucci *et al.*, 2017).

Zvýšená odolnost mutantních rostlin vůči abiotickým stresům byla vyvozena ze zvýšené rezistence klíčení semen a růstu hypokotylu vůči osmotickému, solnému a chladovému stresu (Fellner a Sawhney, 2001). Tato odolnost pravděpodobně souvisí se zvýšenou hladinou kyseliny abscisové v 7B-1 (Fellner a Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001; Fellner a Sawhney, 2002). Obecně, v nemutantních rostlinách je odolnost vůči osmotickému stresu ovlivněna modrým nebo bílým světlem – při osvětlení je klíčení semen vlivem mannitolu (osmotický stres) inhibováno, za tmy se inhibiční účinky mannitolu neprojeví. Mutant 7B-1 při působení osmotického stresu vykazuje absenci modrým nebo bílým světlem indukované inhibice klíčení a růstu hypokotylu. Tato absence je pravděpodobně způsobena defektem v signalizaci modrého světla v 7B-1 (Fellner a Sawhney, 2001; Fellner *et al.*, 2001). Existují indicie, že tento defekt by mohl negativně ovlivňovat pohyb chloroplastů, avšak studie zabývající se vlivem mutace 7B-1 na pohyb chloroplastů nebyla zatím publikována. Relokační pohyby chloroplastů vyvolané

modrým světlem jsou řízeny phot1 a phot2 (Kong a Wada, 2014), Omidvar a Fellner (2015) však zjistili, že mutace *7B-1* nemá na transkripční úrovni na fototropiny vliv. Defekt způsobující poruchu v relokačním pohybu chloroplastů se tedy pravděpodobně nachází v „down-stream“ komponentách světelné signální dráhy.

Defekt v signalizaci modrého světla u *7B-1* dále způsobuje poruchu v otevírání stomat vyvolaném modrým světlem (Hlavinka *et al.*, 2013). Ježilová *et al.* (2012) se ve své práci zabývali tím, jestli má porucha v otevírání stomat v *7B-1* negativní vliv na rychlost fotosyntézy na modrém světle. Zjistili, že rostliny *7B-1* vykazují snížení rychlosti fotosyntézy a opoždění v dosažení stabilní hodnoty rychlosti fotosyntézy a vodivosti stomat oproti rostlinám divokého typu pouze v případě měření na starších rostlinách. Z toho usoudili, že změny ve fotosyntetických vlastnostech *7B-1* jsou způsobeny spíše zvýšenou endogenní hladinou ABA v mutantu než vlivem poruchy otevírání stomat.

Samčí sterilita mutantu *7B-1* je, jak se ukázalo, závislá na fotoperiodě - při dlouhém dni se vytvářejí deformované tyčinky a neživotaschopné mikrospory, zatímco při krátkém dni jsou květy plodné a produkují normální tyčinky s vitálním pylem (Sawhney, 1997; Omidvar *et al.*, 2015). Cytologická studie provedená na *7B-1* odhalila několik defektů ve vývoji prašníků: poruchu v synchronizaci zrání prašníků, dysfunkční meiózu, zadržení mikrospor v tetradách vlivem poruchy v degradaci pektinu v tetradových buněčných stěnách, poruchu v degradaci kalózy a abnormální vývoj tapeta. Dále byl zjištěn defekt v programované buněčné smrti v buňkách tapeta prašníků *7B-1* (Omidvar *et al.*, 2017).

2.4.2 *cry1-1* a *cry1-2*

Mutantní rostliny lilku rajčete *cry1-1* a *cry1-2* obsahují defekt v kryptochromu 1 (Cry1). Kryptochromy patří mezi receptory modré a UV-A části světelného spektra u vyšších rostlin. Zajímavostí je pak výskyt kryptochromů v živočišné říši, kde hrají roli v udržování cirkadiánních rytmů a v magnetoreceptci a s ní spojenou magnetickou orientací živočichů (Hsu *et al.*, 1996; Stanewsky *et al.*, 1998; Lin a Todo, 2005).

Kryptochromy řadíme mezi DNA fotolyázy, třídu flavoproteinů, které zprostředkovávají fotoreaktivaci DNA (Cashmore *et al.*, 1999; Lin, 2000). I když kryptochromy patří, stejně jako fototropiny, mezi receptory citlivé na modrou část světelného spektra (Sakai *et al.*, 2001), neměly by být, na rozdíl od fototropinů,

zodpovědné za pohyby chloroplastů (Kagawa a Wada, 2000). Kryptochromy řídí detiolizaci, která nastává vlivem modrého, zeleného a UV-A světla a jsou rovněž zapojeny do signalizace fototropismu (Weller *et al.*, 2001; Facella *et al.*, 2012). Ahmad a Cashmore (1993) poprvé popsali molekulární vlastnosti kryptochromů při zkoumání mutantu *HY4* rostliny *A. thaliana* s nefunkčním kryptochromem 1. Tento mutant vykazoval absenci inhibice růstu hypokotylu při osvětlení modrým světlem.

Dle Weller *et al.* (2001) mají rostliny *cry1-1* a *cry1-2* mutaci na stejném lokusu, mutace je však způsobenou jinou alelou genu. V obou případech se jedná o nulové mutace, tj. způsobují vyřazení genu z funkčnosti. Mutant *cry1-2* se vyznačuje prodlouženým hypokotytem se sníženým obsahem antokyanů a chlorofylu a menšími kotyledony. Prodloužení hypokotylu je způsobeno defektem v inhibici jeho růstu při ozáření modrým světlem. Mutant je tedy pravděpodobně defektní ve vnímání modrého světla nebo v přenosu jeho signálu signálními dráhami. Mutant *cry1-1* se oproti *cry1-2* vyznačuje pouze mírným prodloužením hypokotylu, což naznačuje, že mutace *cry1-2* může mít větší vliv na defekt ve vnímání modrého světla, než *cry1-1* (Weller *et al.*, 2001).

V rajčeti a ječmeni byly oproti ostatním vyšším rostlinám nalezeny 2 kopie kryptochromu 1 - *Cry1a* a *Cry1b*, přičemž *Cry1b* pravděpodobně vznikl duplikací *Cry1* (Perrotta *et al.*, 2001). Mutace v námi zkoumaných rostlinách *cry1-1* a *cry1-2* se nachází v genu *Cry1a* (Facella *et al.*, 2012).

2.4.3 *hp1*

Hpl (*high pigment 1*) mutant se vyznačuje zvýšeným množstvím a větší velikostí chloroplastů (Kilambi *et al.*, 2013). Alely genu mutantu rajčete *hp1* představují mutaci v *UV-DAMAGED-DNA-BINDING PROTEIN 1 (DDB1)* homologu *A. thaliana*, negativním regulátoru přenosu světelného signálu (Srinivas *et al.*, 2004). *Hpl* je charakteristický zvýšenou citlivostí vůči modrému a červenému světlu, která je spojena s vyšším obsahem karotenoidů, zejm. β -karotenu a lykopenu. Toho bývá využíváno v komerční sféře, kde jsou geny ovlivňující přenos světelného signálu, včetně genů *hp*, využívány ve šlechtitelských programech pro produkci odrůd se zvýšeným obsahem rostlinných pigmentů a nutričních látek (Liu *et al.*, 2004, Srinivas *et al.*, 2004).

Studie zabývající se projevem hypersenzitivity *hp1* vůči modrému světlu v pohybu chloroplastů vyvolaném modrým světlem nebyla dosud publikována.

Srinivas *et al.* (2004) sice nezjistili pozměněnou míru pohybu chloroplastů u mutantu *frihp1*, nicméně v tomto případě nemůže být vyloučena kombinace efektu mutace *fri* a *hp1*. Z tohoto důvodu nelze jednoznačně určit, jestli mutace *hp1* ovlivňuje pohyb chloroplastů.

2.4.4 *nps1*

Nps1 (*Nonphototropic seedling1*) je mutant lilku rajčete se sníženou reakcí na slabé modré světlo. Sharma *et al.* (2014) se domnívají, že snížená reakce *nps1* na slabé modré světlo je způsobena defektem ve *phot1*. Autoři uvádějí, že defekt v *nps1* je způsoben dominantně negativní mutací na jediném lokusu. U rostlin *nps1* pozorovali úplnou ztrátu fototropismu hypokotylu směrem ke slabému modrému světlu ($0.1\text{--}1\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Své výsledky porovnali s výzkumem provedeným Sakai *et al.* (2001), kteří zaznamenali zmenšenou míru fototropismu hypokotylu vůči slabému modrému světlu v rostlinách *A. thaliana* s mutací ve *phot1*. Sharma *et al.* (2014) tedy dospěli k závěru, že mutace *nps1* může způsobovat defekt ve *phot1*. Analýza mutantu *nps1* a rostliny divokého typu pomocí western blotu ukázala 10% úbytek intenzity proužku odpovídajícímu molekulové hmotnosti 124 kD u *nps1* oproti WT (Sharma *et al.*, 2014). Molekulová hmotnost 124 kD odpovídá fototropinu 1 v *A. thaliana* (Doi *et al.*, 2004). Ohyb hypokotylu u *nps1* vyvolaný silným modrým světlem ($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), který je zprostředkován *phot2* (Wada 2016), zůstal v porovnání s WT naopak nezměněný (Sharma *et al.*, 2014). To značí, že mutace v genu *nps1* ovlivňuje pouze *phot1*, nikoliv *phot2*.

Sharma *et al.* (2014) u rostlin *nps1* pozorovali defekt v dalších procesech regulovaných *phot1* – v otevírání stomat při osvětlení slabým modrým světlem ($2\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a v akumulacím pohybu chloroplastů. Zatímco WT vykazoval lineární nárůst vodivosti stomat a dosáhl stabilní hodnoty během 20-ti minut, mutant *nps1* na ozáření slabým modrým světlem otevřením stomat nereagoval. V případě akumulacního pohybu chloroplastů pak autoři zaznamenali úplnou inhibici tohoto pohybu – při osvětlení slabým modrým světlem zůstaly chloroplasty na stěnách buněk rovnoběžných s dopadajícím zářením, zatímco chloroplasty ve WT se přesunuly na stěny kolmé k dopadajícímu záření.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Rostlinný materiál

Pro experimenty byly použity fotomorfogenní mutantní rostliny lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.), které byly srovnávány s příslušným kultivarem, v němž byla mutace identifikována. Jedná se o tyto dvojice:

- *7B-1* (obecně snížená reakce na modré světlo: Sawhney 1997; Fellner *et al.*, 2001) s kultivarem Rutgers,
- *cry1-1* a *cry1-2* (defekt v receptoru modrého světla Cry1a: Weller *et al.*, 2001; Facella *et al.*, 2012) s kultivarem Moneymaker,
- *hp1* (hypersensitivní reakce ke světlu: Peters *et al.*, 1992; Peters *et al.*, 1998; Srinivas *et al.*, 2004; defekt v genu *DDB1*: Liu *et al.*, 2004) s kultivarem Rutgers LA1090,
- *nps1* (mutace v genu *phot1*, defektní mimo jiné i v akumulaci chloroplastů: Sharma *et al.*, 2014) s kultivarem Ailsa Craig.

Rostliny příslušných kultivarů budou dále v textu a obrázcích označeny jako WT („wild type“).

Pro pěstování rostlin byly použity květináče o velikosti 7x7 cm naplněné pěstebním substrátem Potgrond H (Klasmann Deilmann, Německo). Rostliny byly pravidelně zalévány vodou z vodovodního řádu. Byly pěstovány ve fytokomoře (Snijders Scientific, Nizozemí) při relativní vlhkosti vzduchu 50 %. S výjimkou experimentu z června 2017, kdy byly rostliny WT a *7B-1* pěstovány při krátké fotoperiodě (8 h světlo / 16 h tma), byla používána fotoperioda 16 h světlo / 8 h tma. Datum zasetí a měření rostlin, měřený list (počítáno od báze), délka fotoperiody, ozářenost a teplota vzduchu jsou pro jednotlivé dvojice mutantů a WT uvedeny v Tab. 1.

Ve většině případů byly experimenty prováděny na rostlinách starých 4 – 5 týdnů (přesný údaj ve dnech je uveden v obrázcích), které byly ve vegetativní fázi a měly 4 až 6 pravých listů. Výjimkou bylo měření ze dne 19. 12. 2016, kdy byly rostliny *7B-1* a příslušného WT staré 49 dní a již byly v generativní fázi (začátek kvetení, 8 – 10 pravých listů), podobně jako rostliny *cry1-1* a *cry1-2* a příslušného WT měřené 16. 2. 2017 (stáří 44 dní, generativní fáze – začátek kvetení, 8 – 10 pravých listů).

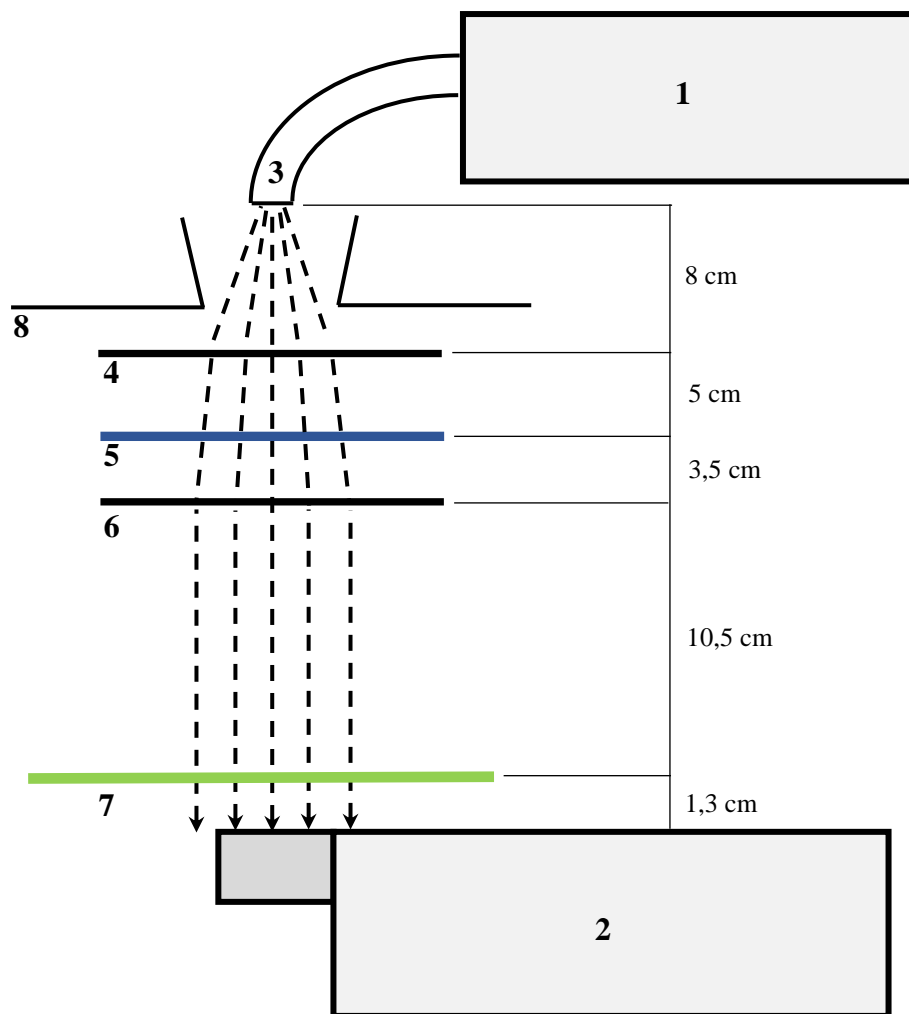
Tab. 1 Pěstební podmínky příslušných dvojic mutantů a WT. Uveden mutant a kultivar WT, datum zasetí a datum měření, pořadí měřeného listu (počítáno od báze), délka fotoperiody (den/noc), ozáření ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a zdroj světla a teplota vzduchu (den/noc). *pořadí měřeného listu v případě poškození původně měřeného.

Mutant	WT	Zasetí	Měření	List	Fotoperioda (světlo/tma)	Ozáření v $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ (zdroj)	Teplota
<i>7B-1</i>	cv. Rutgers	31. 10. 2016	5. 12. 2016	3	16/8 h	190 (LED)	25 °C
		31. 10. 2016	19. 12. 2016	3	16/8 h	190 (LED)	25 °C
		27. 9. 2017	23. 10. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
		16. 5. 2017	19. - 21. 6. 2017	2	8/16 h	125 (LED)	22/20 °C
<i>cry1-1</i> <i>cry1-2</i>	cv. Moneymaker	3. 1. 2017	1. 2. 2017	1, 3*	16/8 h	190 (zářivky)	25 °C
		3. 1. 2017	16. 2. 2017	3, 4*	16/8 h	190 (zářivky)	25 °C
		29. 5. 2017	27. - 30. 6. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
<i>hp1</i>	cv. Rutgers LA1090	21. 2. 2017	24. 3. 2017	4	16/8 h	190 (zářivky)	25 °C
		25. 7. 2017	21. - 23. 8. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
<i>nps1</i>	cv. Ailsa Craig	23. 8. 2017	18. 9. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
		23. 8. 2017	26. 9. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
		25. 10. 2017	20. - 22. 11. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C
		25. 10. 2017	22. - 23. 11. 2017	2	16/8 h	125 (LED)	22/20 °C

3.2 Metody

3.2.1 Měření pohybu chloroplastů

Pohyb chloroplastů byl sledován pomocí měření změn kolimované transmittance listu. Transmittance (optická propustnost) vyjadřuje množství světla, které projde vzorkem (v našem případě listem). Změny v transmittanci byly vyvolány působením modrého světla s maximem kolem 460 nm na listy zatemněných rostlin. Modré světlo bylo generováno pomocí zdroje studeného světla KL-2500 (Schott Glass, Mainz, Německo) a modrého filtru BG12 (Schott Glass, Wiesbaden, Německo) (Obr. 3). Osvitem listu silným modrým světlem (o intenzitě 130 nebo 420 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) byl vyvolán únikový pohyb chloroplastů. Akumulační pohyb chloroplastů byl vyvolán slabým modrým světlem, jehož intenzita byla 0,8 nebo 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Intenzita světla byla měřena v μmol fotonů fotosynteticky aktivního záření (400 – 700 nm) $\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ pomocí integrálního radiometru LI-250A (LI-COR, Lincoln, Nebraska, USA). Datum měření, doba zatemnění před měřením, intenzita měřicího světla a intenzita světla použitého pro vyvolání pohybu chloroplastů (silné a slabé světlo) jsou pro příslušné dvojice mutanta a kultivaru WT uvedeny v Tab. 2.



Obr. 3. Schéma aparatury pro měření kolimované transmittance (optické propustnosti) listu. Popis komponent: zdroj studeného světla KL-2500 (1), Spectrapen SP-100 (2), světlovod (3), kolimátor I (4), modrý filtr (5), kolimátor II (6), měřený vzorek – list (7), stínítko (8). Vyznačeny vzdálenosti mezi jednotlivými komponentami aparatury (cm).

Tab. 2 Měřicí podmínky příslušných dvojic mutantů a WT. Uveden mutant a kultivar WT, datum měření, doba zatemnění před měřením, intenzita měřicího světla a světla použitého pro vyvolání pohybu chloroplastů (silné nebo slabé). *12 – 19 h podle pořadí měřené rostliny.

Mutant	WT	Měření	Doba zatemnění	Měřicí světlo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Silné světlo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)	Slabé světlo ($\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$)
<i>7B-1</i>	cv. Rutgers	5. 12. 2016	30 min	420	420	Neměřeno
		19. 12. 2016	30 min	420	420	Neměřeno
		23. 10. 2017	30 min	550	130	6
		19. - 21. 6. 2017	30 min	550	130	6
<i>cry1-1</i> <i>cry1-2</i>	cv. MoneyMaker	1. 2. 2017	30 min	420	420	Neměřeno
		16. 2. 2017	30 min	420	420	Neměřeno
		27. - 30. 6. 2017	30 min	550	130	6
<i>hp1</i>	cv. Rutgers LA1090	24. 3. 2017	30 min	420	420	Neměřeno
		21. - 23. 8. 2017	30 min	550	130	6
<i>nps1</i>	cv. Ailsa Craig	18. 9. 2017	30 min	550	130	Neměřeno
		26. 9. 2017	30 min	550	Neměřeno	6
		20. – 22. 11. 2017	30 min	550	Neměřeno	0,8
		22. – 23. 11. 2017	Přes noc*	550	130	Neměřeno

Změny kolimované transmitance vyvolané modrým světlem byly měřeny na listech neoddělených od rostliny pomocí spektrálního radiometru Spectrapen SP-100 (PSI, Drásov, Česká republika). Umístění čidla radiometru v příslušné vzdálenosti (1,3 cm) pod listem umožňuje detekovat převážně kolimované paprsky procházející listem, což přispívá k vysoké citlivosti metody. Před měřením byly rostliny ponechány ve tmě, aby byly chloroplasty ve stejné výchozí pozici. Nejprve bylo změřeno spektrum měřicího světla dopadajícího na list (I_0 - měření bez vloženého listu). Poté následovalo změření spektra s vloženým listem (I). Z podílu I/I_0 bylo získáno spektrum kolimované transmitance, ze kterého byla odečtena hodnota při 436 nm. Při této vlnové délce transmitance citlivě reaguje na pohyb chloroplastů. Poté bylo aplikováno slabé nebo silné modré světlo vyvolávající pohyb chloroplastů, každých 10 minut změřeno spektrum s vloženým listem a vyhodnocena kolimovaná transmitance listu při 436 nm. Vypočítané hodnoty byly nanormovány na výchozí hodnotu kolimované transmitance před působením slabého / silného světla. Měření jednoho listu probíhalo 40 - 60 minut.

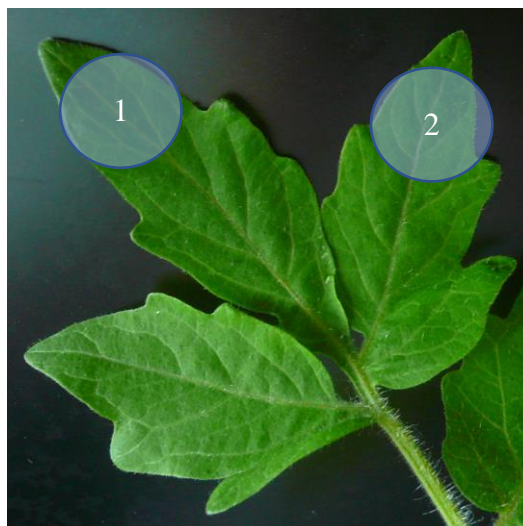
3.2.2 Stanovení relativního obsahu chlorofylu

Měření bylo prováděno nedestruktivně chlorofylmetrem SPAD-502 (Konica Minolta, Japonsko). Rostliny byly před měřením umístěny na 30 minut do tmy, aby se chloroplasty nacházely ve stejné výchozí pozici a eliminoval se tak vliv jejich rozmístění na naměřený obsah chlorofylu (Nauš *et al.*, 2010). Ve vybrané oblasti listu (Obr. 4) byla hodnota relativního obsahu chlorofylu odečtena pětkrát a průměrná hodnota z těchto 5 měření byla brána jako reprezentativní pro daný list. Měřeno bylo 4 – 5 listů.

Stanovení obsahu chlorofylu přístrojem SPAD-502 je sice nedestruktivní, ale v případě více opakování může dojít k mírnému stlačení měřené oblasti listu, které by mohlo mít vliv na následné měření pohybu chloroplastů. Z tohoto důvodu jsme měření obsahu chlorofylu a následný pohyb chloroplastů měřili na jiném místě listu (Obr. 4).

3.2.3 Stanovení parametru F_v/F_M

Jako ukazatel fyziologického stavu měřených listů byl měřen parametr fluorescence chlorofylu *in vivo* – F_v/F_M , kde F_v je variabilní fluorescence ($F_v = F_M - F_0$), F_M maximální fluorescence a F_0 minimální fluorescence listu adaptovaného na tmu. Tento parametr odráží maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II a u nestresovaných listů se pohybuje kolem hodnoty 0,8. Parametr F_v/F_M byl měřen pomocí přístroje PEA (Hansatech, King's Lynn, UK) na rostlinách adaptovaných 30 min na tmu. Jedná se o nedestruktivní metodu. Byla použita intenzita měřicího světla o velikosti 50 % maximální intenzity přístroje ($1200 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a doba měření byla nastavena na 3 s. Pro měření jsme použili listovou svorku firmy Hansatech. Měření parametru F_v/F_M bylo provedeno ve stejné oblasti listu jako měření relativního obsahu chlorofylu (Obr. 4).



Obr. 4 Oblasti listu použité k měření pohybu chloroplastů (1), relativního obsahu chlorofylu (2) a parametru F_v/F_M (2).

3.2.4 Statistické zpracování získaných dat

Data byla zpracována v programu Microsoft Office Excel. Statistická významnost rozdílů mezi hodnotami parametrů naměřenými u WT a mutantů byla vyhodnocena pomocí nepárového t-testu.

3.2.5 Fotodokumentace

Prezentované fotografie byly vyfoceny pomocí digitálního fotoaparátu DMC-FX50 (Panasonic Corporation, Kadoma, Japonsko).

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

V experimentech jsme zkoumali, zda je u fotomorfogenních mutantů lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) ovlivněný pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem (BL) oproti pohybu v listech kultivarů, ve kterých byla tato mutace identifikována. Pohyb chloroplastů jsme měřili pomocí změn kolimované transmitance zaznamenaných přístrojem Spectrapen SP-100 během působení modrého světla. Toto měření bylo doplněno měřením relativního obsahu chlorofylu pomocí chlorofylmetru SPAD-502 a parametru F_v/F_m (jehož hodnota odráží funkci fotosystému II) pomocí fluorimetru PEA. Listy s odlišným obsahem chlorofylu by se totiž mohly lišit svými optickými vlastnostmi (včetně např. počtu chloroplastů) a změny transmitance související s pohybem chloroplastů by tímto mohly být ovlivněny (Rolencová, 2008). Podobně, pokud by se listy mutantních a WT rostlin výrazně lišily v hodnotě F_v/F_m (přičemž hodnota výrazně nižší než 0,8 indikuje, že je rostlina stresovaná), mohl by být pohyb chloroplastů ovlivněn spíše stresem rostliny (Frolec *et al.*, 2010; Nauš *et al.*, 2016) než vlastní mutací.

4.1 7B-1

Fotomorfogenní mutant lilku rajčete *7B-1* se vyznačuje obecně sníženou reakcí na modré světlo, která je pravděpodobně způsobena defektem v přenosu signálu signálními dráhami (Fellner *et al.*, 2001). Dosavadní výsledky naznačují, že *7B-1* je defektní v procesech řízených fototropiny (Ježilová *et al.*, 2012; Hlavinka *et al.*, 2013), mezi které patří i pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem. V našem experimentu jsme ověřovali, zda a jak je pohyb chloroplastů v mutantu *7B-1* ovlivněn. Jako kontrolní varianta byl použit kultivar Rutgers (dále WT). Reakce mutantu na modré světlo byla zkoumána ve dvou experimentech, ve kterých jsme zjišťovali reakci na silné modré světlo (únikový pohyb chloroplastů) a slabé modré světlo (akumulační pohyb chloroplastů).

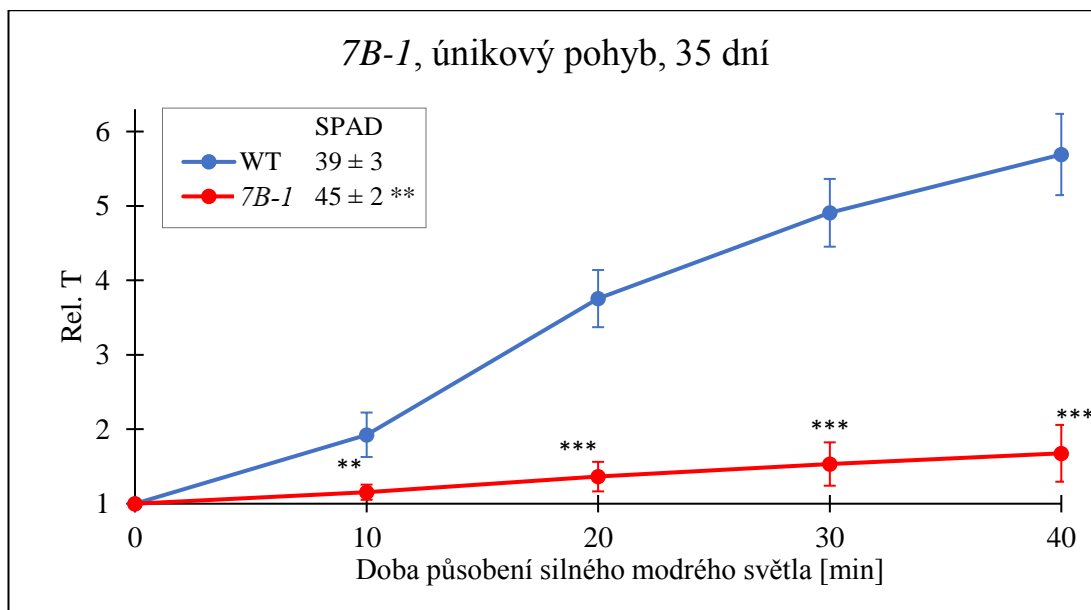
4.1.1 Únikový pohyb chloroplastů (*7B-1*)

Obr. 5 znázorňuje výsledky prvního měření provedeného na listech rostlin starých 35 dní. U mutantu *7B-1* můžeme pozorovat výrazně zmenšenou reakci na silné modré světlo. Relativní transmitance u WT se vlivem silného BL zvětšila 5,7krát. U mutantu se relativní nárůst transmitance zastavil na hodnotě 1,7. Mutant se v tomto

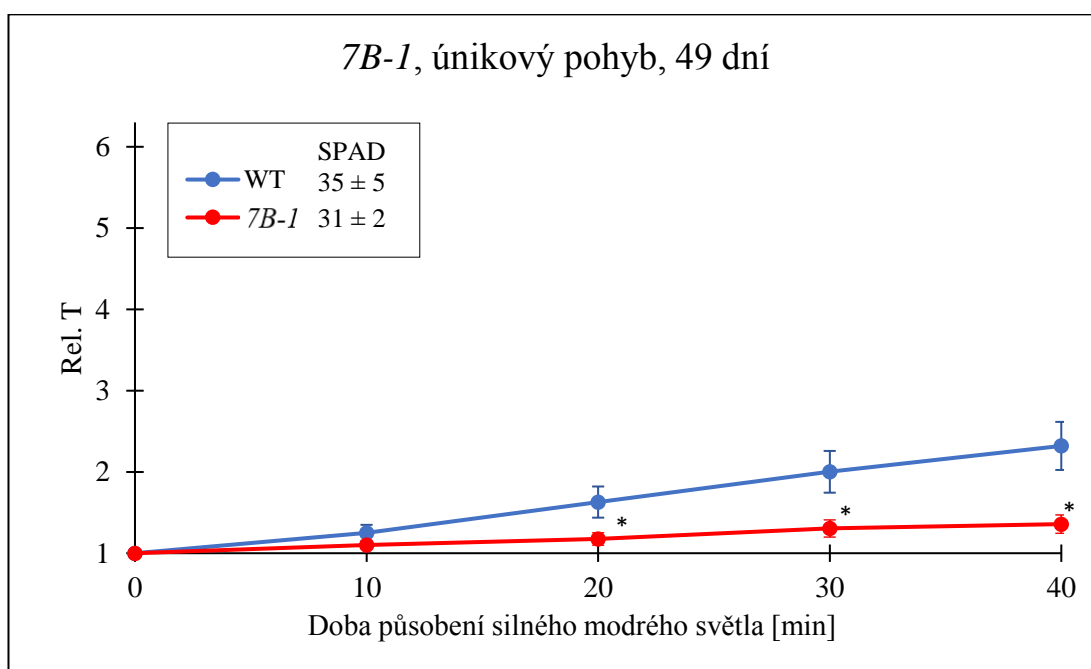
měření vyznačoval mírně zvýšeným (asi o 15 %) relativním obsahem chlorofylu (hodnoty SPAD, Obr. 5).

Měření na stejných rostlinách i listech jsme opakovali o 2 týdny později (Obr. 6). Jejich stáří bylo tedy 49 dní. Oba typy rajčete, WT i mutant, vykazovaly sníženou míru pohybu chloroplastů oproti předchozímu měření, stále však můžeme u *7B-1* oproti WT pozorovat signifikantně zmenšenou reakci na silné BL. Relativní transmitance u WT se v tomto případě zvětšila 2,3krát, u mutantu pak přibližně 1,4krát. Zmenšenou míru pohybu chloroplastů oproti předchozímu měření přisuzujeme pokročilejšímu stáří měřených listů. Nauš *et al.* (2010, 2016) zjistili zmenšenou míru pohybu chloroplastů u starších rostlin ječmene (Nauš *et al.*, 2016) a tabáku (Nauš *et al.*, 2010) v porovnání s mladšími rostlinami. Jedním z důvodů poklesu míry pohybu mohl být přechod rostliny do generativní fáze – na rostlinách starých 49 dní již byly vytvořeny květy. Nauš *et al.* (2010) zjistili, že s přechodem rostliny do generativní fáze obvykle klesá pohyb chloroplastů. Detailnější studie popisující změny pohybu chloroplastů během ontogeneze a senescence listů nebyla doposud publikována a není ani znám mechanismus, jakým je pohyb chloroplastů ve stárnoucích listech inhibován.

Dále si v měřených listech můžeme všimnout poklesu relativního obsahu chlorofylu oproti prvnímu měření (Obr. 5 a 6, hodnoty SPAD). U WT klesl relativní obsah chlorofylu na 89 % hodnoty z prvního měření (z 39 na 35), u *7B-1* na 68 % (ze 45 na 31). Rozdíl v rychlosti poklesu obsahu chlorofylu může být způsoben rychlejší ontogenezí rostlin *7B-1*. Dle práce Ježilová *et al.* (2012) měly rostliny *7B-1* rychlejší ontogenezi, což se projevovalo výraznějším poklesem rychlosti fotosyntézy a vodivosti stomat se zvyšujícím se stářím listů oproti rostlinám WT. Je tedy možné, že rychlejší ontogeneze *7B-1* způsobuje v našem případě rovněž rychlejší úbytek obsahu chlorofylu v měřených listech oproti WT.



Obr. 5 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *7B-1* a WT. Stáří rostlin - 35 dní. Měření 3. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 4$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi WT a *7B-1* v příslušné době působení modrého světla (** $P = (0,001-0,01)$; *** $P \leq 0,001$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD ($n = 4$). Měřeno 5. 12. 2016.

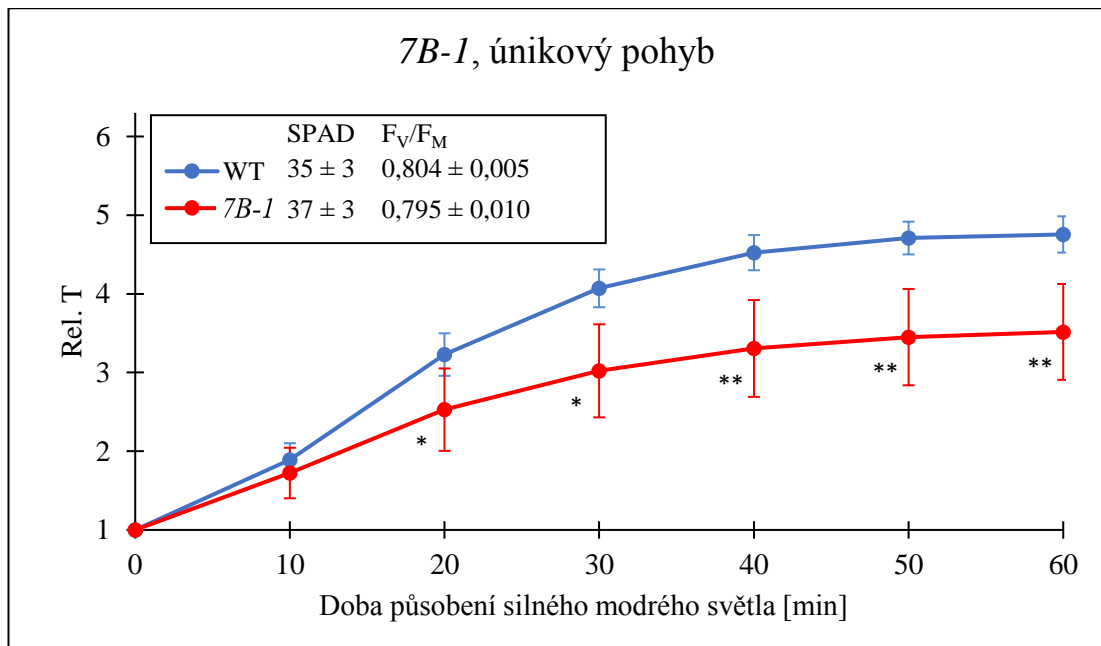


Obr. 6 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *7B-1* a WT. Stáří rostlin - 49 dní. Měření 3. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$ pro WT, $n = 4$ pro *7B-1*). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi WT a *7B-1* v příslušné době působení modrého světla (* $P = (0,01-0,05)$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD ($n = 3$ pro WT, $n = 4$ pro *7B-1*). Měřeno 19. 12. 2016.

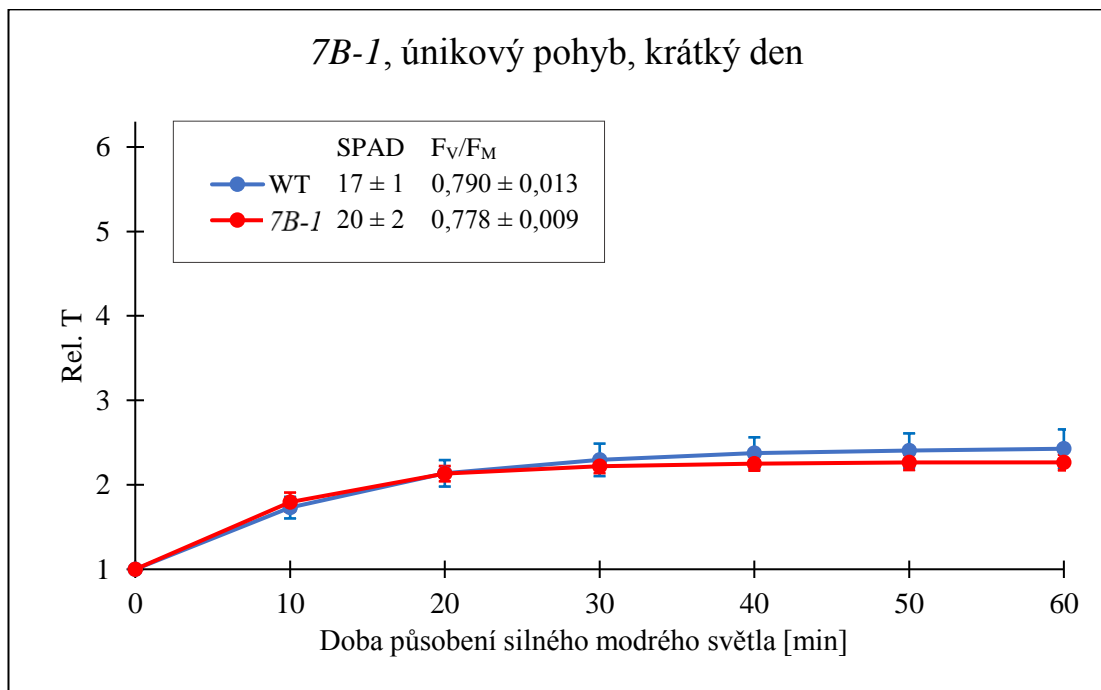
Další měření únikového pohybu chloroplastů u mutantu *7B-1* proběhlo v říjnu roku 2017 na listech rostlin starých 26 dní (Obr. 7). Změna oproti předchozím měřením byla v intenzitě a době působení silného BL. Měřili jsme tentokrát 60 minut, protože při předchozích měřeních nebyly hodnoty relativní transmitance po 40 minutách působení BL stále saturovány a použili jsme modré světlo o nižší intenzitě, abychom snížili riziko poškození listů vlivem fotoinhibice. Intenzitu modrého světla jsme snížili ze 420 na 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$.

Rozdíl mezi relativní transmitancí u *7B-1* a WT nebyl tak výrazný, jako při prvním měření (Obr. 5). Relativní transmitance se pod vlivem silného BL u WT zastavila na 4,7násobku původní hodnoty, u *7B-1* pak na 3,5násobku. U WT není rozdíl oproti měření z 5. 12. 2016 (Obr. 5) tak výrazný, avšak u mutantu *7B-1* můžeme pozorovat větší reakci chloroplastů na silné BL v porovnání s předchozími měřeními. Při experimentech z prosince se relativní transmitance v době působení modrého světla 40 min u *7B-1* zvětšila oproti výchozí hodnotě 1,3 až 1,7krát (Obr. 5 a 6), při měření z října 3,3krát (Obr. 7). Uvedený rozdíl by mohl souviset jednak s různou intenzitou BL použitou k vyvolání pohybu (420 a 130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), jednak s jiným stářím rostlin (35 a 26 dní), resp. s použitím listů různého pořadí na rostlině (3. a 2. listy).

Poslední měření únikového pohybu *7B-1* proběhlo na listech rostlin pěstovaných při krátkém dni (Obr. 8). Rostliny byly měřeny při dosažení stáří 34-36 dní, protože rostly pomaleji než v předchozích experimentech. Pomalejší růst mohl být způsoben právě kratší fotoperiodou (8 h den / 16 h noc oproti 16 h den / 8 h noc v předchozích experimentech; Tab. 1) a nižší pěstební teplotou (22 / 20 °C oproti 25 °C v předchozích experimentech; Tab. 1). V tomto případě nebyl zjištěn rozdíl v únikovém pohybu chloroplastů mezi WT a *7B-1* (Obr. 8). Domníváme se, že to může být způsobeno právě pěstováním rostlin při krátkém dni. Sawhney (1997) a později Omidvar *et al.* (2015) o mutantu *7B-1* uvádějí, že při dlouhém dni vytváří deformované tyčinky a neživotaschopné mikrospory, zatímco při krátkém dni jsou květy plodné a produkují normální tyčinky s vitálním pylem, stejně jako WT. Mutace *7B-1* má tedy za následek nejen na fotoperiodě-závislou fertilitu, ale pravděpodobně i na fotoperiodě-závislý únikový pohyb chloroplastů.



Obr. 7 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *7B-1* a WT. Stáří rostlin – 26 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi WT a *7B-1* v příslušné době působení modrého světla (* $P = (0,01-0,05)$; ** $P = (0,001-0,01)$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$). Měřeno 23. 10. 2017.



Obr. 8 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *7B-1* a WT. Stáří rostlin – 34-36 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$ pro WT, $n = 4$ pro *7B-1*). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$ pro WT, $n = 4$ pro *7B-1*). Měřeno 19. - 21. 6. 2017.

Dále si můžeme všimnout poklesu relativního obsahu chlorofylu v měřených listech rostlin pěstovaných při krátkém dni oproti předešlým experimentům, kdy jsme rostliny pěstovali při dlouhém dni. Při krátkém dni (Obr. 8, hodnoty SPAD) se v případě WT pohybuje relativní obsah chlorofylu okolo 17 a v případě *7B-1* okolo 20. Oproti rostlinám pěstovaných při dlouhém dni, kdy se hodnoty relativního obsahu chlorofylu v měřených listech pro WT i mutanta pohybovaly v rozmezí 31 – 45, jde o výrazný pokles. Tento rozdíl si vysvětlujeme krátkou fotoperiodou, kdy rostliny vlivem zmenšeného přísunu světla syntetizovaly méně chlorofylu. S poklesem relativního obsahu chlorofylu v měřených listech pravděpodobně souvisí i celkový pokles rozsahu změn kolimované transmitance u rostlin pěstovaných při krátkém dni (Obr. 8). Tento pokles se projevil zejména u WT. V případě *7B-1* můžeme pozorovat zmenšený rozsah změny kolimované transmitance jen oproti experimentu z října 2017 (Obr. 7), kdy se kolimovaná transmitance zvětšila 3,3krát oproti 2,3násobnému nárůstu u rostlin s nižším relativním obsahem chlorofylu (Obr. 8, doba působení silného modrého světla 40 min). V případě WT se kolimovaná transmitance v předchozích experimentech (Obr. 5 a 7) vlivem únikového pohybu chloroplastů zvětšila 4,5 až 5,6krát (doba působení silného modrého světla 40 min), u WT rostlin s nižším relativním obsahem chlorofylu pouze 2,4krát (Obr. 8). Vliv obsahu chlorofylu na pohyb chloroplastů v listech tabáku ve své diplomové práci popisuje Rolencová (2008), která zjistila, že se snižujícím se obsahem chlorofylu výrazně klesá rozsah a rychlost relativní změny kolimované transmitance vyvolané pohybem chloroplastů.

Měřené listy rostlin pěstovaných při krátké fotoperiodě se dále vyznačovaly mírně zmenšenou hodnotou parametru F_v/F_M (Obr. 7 a 8, parametr F_v/F_M). U rostlin WT pěstovaných při dlouhém dni se parametr F_v/F_M pohyboval kolem 0,804, při krátkém dni kolem 0,790. U *7B-1* jsme při dlouhém dni naměřili hodnotu F_v/F_M 0,795, při krátkém dni pak 0,778. Pokles parametru F_v/F_M u měřených listů rostlin pěstovaných při krátkém dni oproti rostlinám pěstovaným při dlouhém dni přisuzujeme zhoršené funkci fotosyntetického aparátu kvůli kratší fotoperiodě. I když je snížení F_v/F_M (a tedy zhoršení fotochemické funkce fotosystému II) mírné, mohlo být taky jednou z příčin relativně malého rozsahu únikového pohybu chloroplastů (Obr. 8). Nauš *et al.* (2016) totiž zjistili, že únikový pohyb chloroplastů reaguje na stres citlivěji než parametr F_v/F_M .

U únikového pohybu chloroplastů měřeného na rostlinách pěstovaných za dlouhého dne byla tedy pozorována zmenšená reakce *7B-1* na silné BL oproti WT. Fellner a Sawhney (2002) uvádějí, že mutant *7B-1* obsahuje defekt ve vnímání modrého světla nebo v přenosu jím spouštěného signálu signálními drahami. Doposud nebyl publikován dopad tohoto defektu na pohyb chloroplastů, nicméně naše výsledky ukazují, že defekt ve vnímání BL má negativní vliv na rozsah únikového pohybu chloroplastů v *7B-1*. Únikový pohyb chloroplastů je zajišťován pomocí fototropinu 2 (Jarillo *et al.*, 2001; Kagawa *et al.*, 2001). Omidvar a Fellner (2015) však uvádějí, že mutace *7B-1* nemá na transkripční úrovni vliv na fototropin 1 a 2. Mutace *7B-1* tedy pravděpodobně ovlivňuje „down-stream“ komponenty světelné signální dráhy spouštěné fototropinem 2.

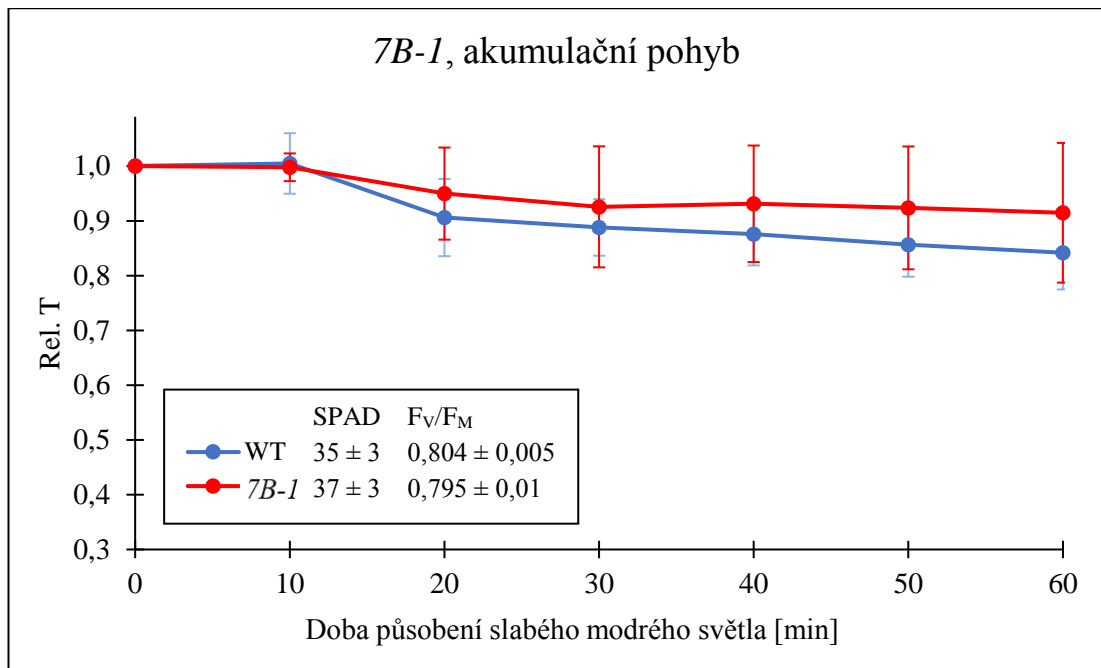
Nutno poznamenat, že v dřívějších experimentech s rostlinami *7B-1* prováděných na Katedře biofyziky nebyly získány tak jednoznačné výsledky jako v této práci. Rozdíly v únikovém pohybu chloroplastů mutantních rostlin oproti WT závisely na tom, jaké listy (jakého pořadí na rostlině) byly k měření použity. Inhibice pohybu byla zjištěna u 9. listů, nicméně u 4. listů pohyb ovlivněn nebyl a v případě 1. listů byl únikový pohyb v *7B-1* dokonce stimulován oproti WT (Nauš *et al.* – nepublikované výsledky). Rostliny byly ale v době měření starší (2,5 měsíce) než v našem případě a byly pěstovány ve skleníku v odlišných podmínkách, včetně světelných. Dá se tedy předpokládat, že projev mutace mohl být z těchto důvodů odlišný.

4.1.2 Akumulační pohyb chloroplastů (7B-1)

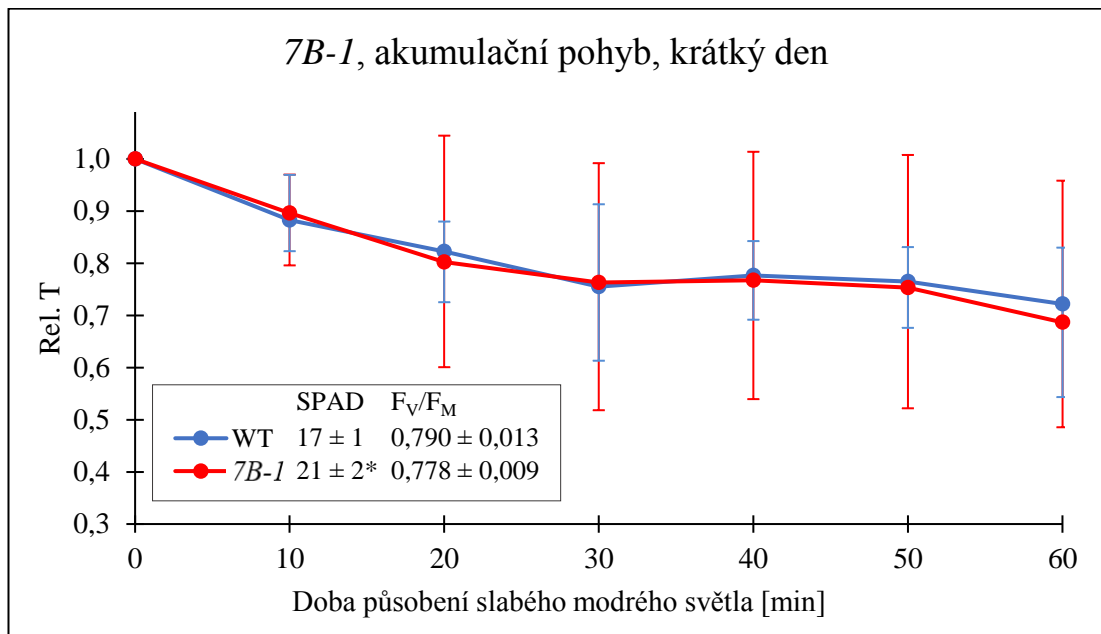
Akumulační odezvu chloroplastů u *7B-1* jsme měřili ve dvou experimentech. Obr. 9 znázorňuje výsledky měření z října roku 2017. Pro mutanta *7B-1* byla při tomto měření typická velká variabilita mezi jednotlivými rostlinami, i přesto ale můžeme pozorovat trend zmenšené citlivosti *7B-1* vůči slabému BL.

Druhé měření akumulace chloroplastů *7B-1* proběhlo na rostlinách pěstovaných při krátkém dni (Obr. 10). Podobně jako při měření únikového pohybu na rostlinách pěstovaných při krátkém dni (Obr. 8) jsme na měřených listech nezaznamenali statisticky významný rozdíl mezi *7B-1* a WT. Opět to přisuzujeme vlivu krátké fotoperiody na projev mutace (Sawhney 1997; Omidvar *et al.*, 2015).

Z uvedených výsledků vyplývá, že mutant *7B-1* může být ovlivněn i v akumulacím pohybu chloroplastů, avšak vliv mutace na tento pohyb chloroplastů se zdá být menší než na únikový pohyb.



Obr. 9 Změna relativní kolimované transmittance při akumulárním pohybu chloroplastů u 7B-1 a WT. Stáří rostlin – 26 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$). Měřeno 23. 10. 2017.



Obr. 10 Změna relativní kolimované transmittance při akumulárním pohybu chloroplastů u 7B-1 a WT. Stáří rostlin – 34-36 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$ pro WT, $n = 6$ pro 7B-1). Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi WT a 7B-1 (* $P = (0,01-0,05)$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$ pro WT, $n = 6$ pro 7B-1). Měřeno 19. - 21. 6. 2017.

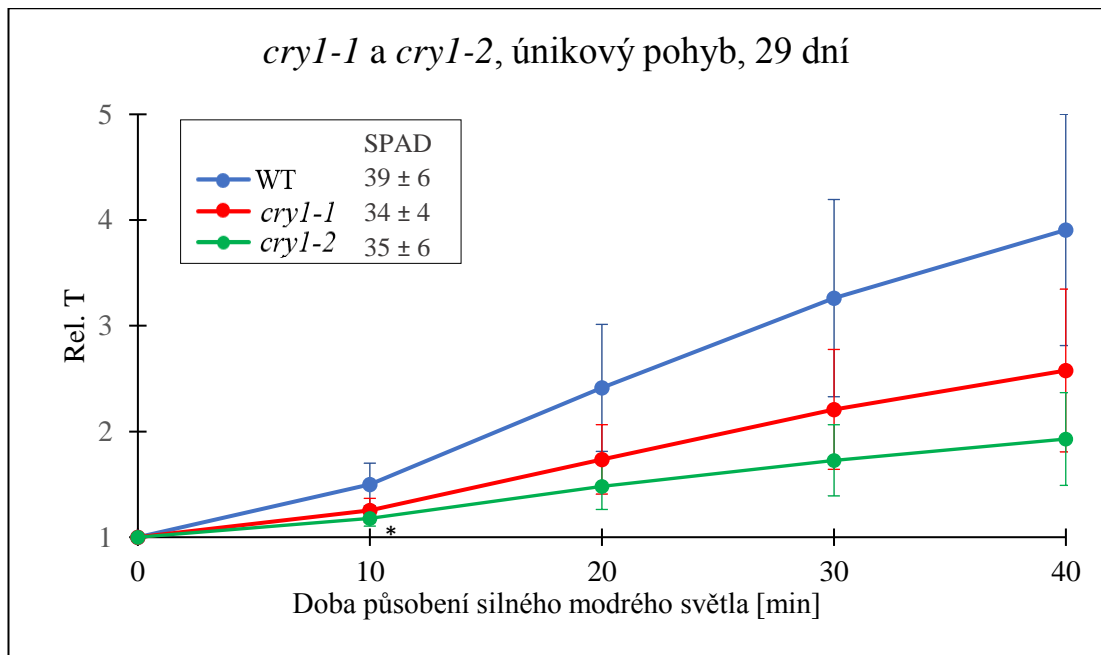
4.2 *cry1-1* a *cry1-2*

Mutanti lilku rajčete *cry1-1* a *cry1-2* obsahují defekt v Cry1a. Kryptochromy řadíme mezi receptory modré a UV-A části světelného spektra, avšak na rozdíl od fototropinů by se neměly podílet na řízení pohybu chloroplastů (Kagawa a Wada, 2000). Cry1 se uplatňuje v de-etiolizaci vyvolané modrým světlem, v pokročilejších ontogenetických fázích rostlin pak ovlivňuje prodlužování stonku, apikální dominanci a obsah chlorofylu v plodech a listech (Weller *et al.*, 2001; Liscum *et al.*, 2003). Zda pohyb chloroplastů není ovlivněn mutací v Cry1a jsme ověřovali ve dvou experimentech zaměřených na únikovou a akumulaci reakci chloroplastů. Mutantní rostliny byly srovnávány s rostlinami kultivaru Moneymaker.

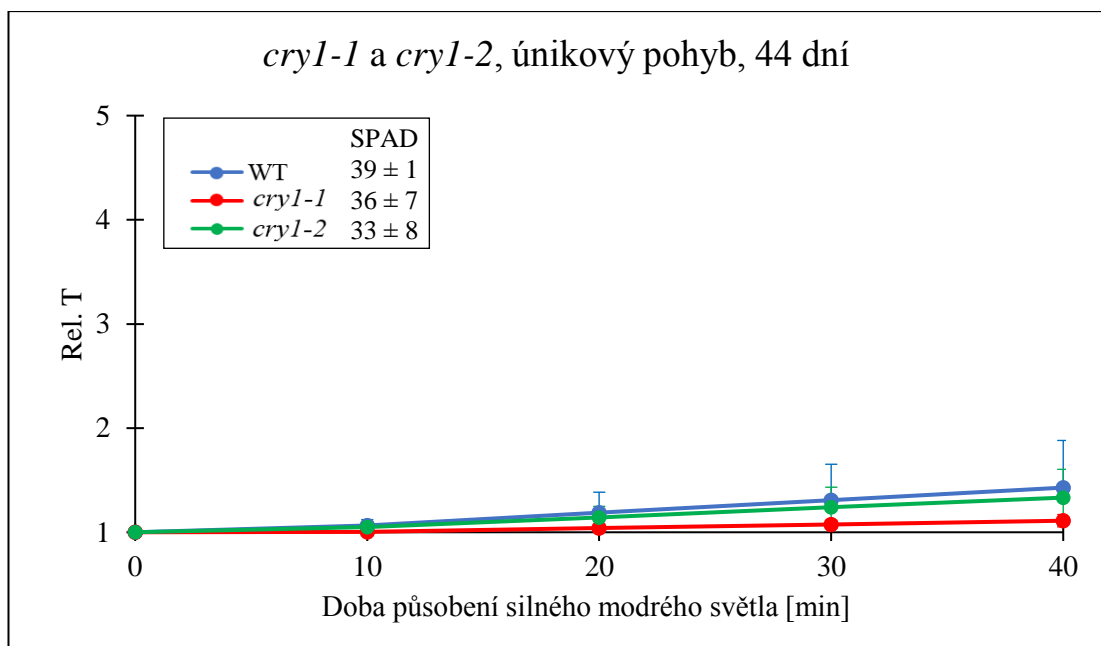
4.2.1 Únikový pohyb chloroplastů (*cry1-1* a *cry1-2*)

První měření únikového pohybu chloroplastů na mutantech s defektem na Cry1a proběhlo v únoru 2017 (Obr. 11). Rostliny byly staré 29 dní. Všechny genotypy se vyznačovaly poměrně velkou variabilitou v hodnotách relativní transmitance. V porovnání s WT je možné pozorovat trend zmenšené reakce obou mutantů na silné BL, nicméně statisticky významný rozdíl byl prokázán pouze u *cry1-2* v čase působení silného modrého světla 10 min. Relativní transmitance se po 40 min působení BL oproti výchozí hodnotě u jednotlivých rostlin zvětšila následovně: u WT 3,9krát, u *cry1-1* 2,6krát, u *cry1-2* pak 1,9krát.

Měření jsme opakovali o 15 dní později, stáří rostlin bylo tedy 44 dní (Obr. 12). Z důvodu zežloutnutí původně měřených listů jsme museli měřit na mladších listech – použili jsme 3. listy oproti předchozím 1. listům (počítáno od báze). U mutantů můžeme opět pozorovat trend zmenšené míry pohybu chloroplastů, nicméně statisticky významný rozdíl nebyl ani tentokrát prokázán. Rostliny se při tomto měření obecně vyznačovaly zmenšenou mírou pohybu chloroplastů, což bylo patrné zejména u rostlin WT. U WT se transmitance po 40 min silného BL zvětšila 1,4krát, u *cry1-1* 1,3krát, u *cry1-2* pak 1,1krát (Obr. 12). Zmenšenou reakci chloroplastů oproti předchozímu měření přisuzujeme pokročilejšímu stáří rostlin (Nauš *et al.*, 2010; Nauš *et al.*, 2016). Další možnou příčinou zmenšené míry pohybu chloroplastů může být přechod rostliny do generativní fáze - na rostlinách starých 44 dní (Obr. 12) už byly vytvořeny květy. Nauš *et al.* (2010) zjistili, že s přechodem rostliny do generativní fáze obvykle klesá pohyb chloroplastů.



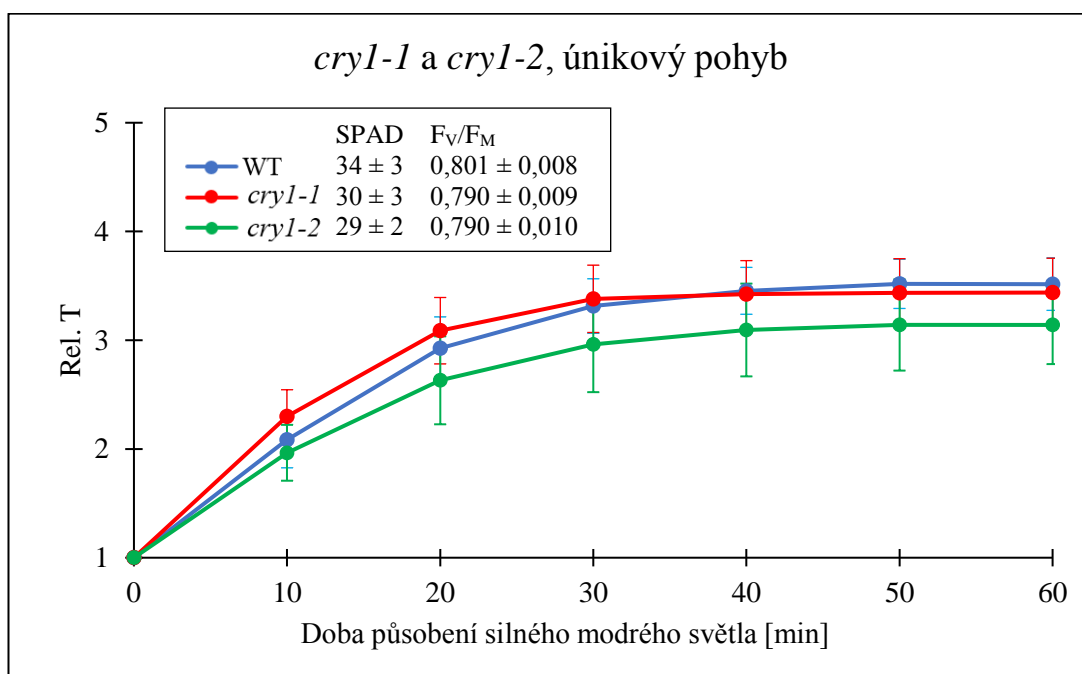
Obr. 11 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *cry1-1*, *cry1-2* a WT. Stáří rostlin – 29 dní. Měřeny 1. listy, v případě poškození 3. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$ pro WT, $n = 4$ pro *cry1-1* a *cry1-2*). Hvězdička označuje statisticky významný rozdíl mezi WT a *cry1-2* v příslušné době působení modrého světla (* $P = (0,01-0,05)$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD ($n = 3$ pro WT, $n = 4$ pro *cry1-1* a *cry1-2*). Měřeno 1. 2. 2017.



Obr. 12 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *cry1-1*, *cry1-2* a WT. Stáří rostlin – 44 dní. Měřeny 3. listy, v případě poškození 4. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 3$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD ($n = 3$). Měřeno 16. 2. 2017.

Obr. 13 znázorňuje výsledky měření reakce mutantů *cry1-1* a *cry1-2* na silné BL z června 2017. Toto měření se vyznačovalo menší variabilitou mezi jednotlivými rostlinami než předešlá měření s těmito mutanty. Dalo by se tedy říct, že výsledky z tohoto měření jsou spolehlivější než z předchozích. Ani tentokrát jsme ale neprokázali statisticky významný rozdíl ve změnách transmitance mezi jednotlivými genotypy. Hodnota relativní transmitance se u WT zvětšila 3,5krát, u *cry1-1* 3,4krát, u *cry1-2* pak 3,1krát. Mutant *cry1-2* oproti *cry1-1* a WT tedy při tomto měření vykazoval mírně zmenšenou reakci na silné modré světlo, podobně jako u prvního měření.

Z uvedených výsledků vyplývá, že mutace v *Cry1a* pravděpodobně neovlivňuje únikový pohyb chloroplastů vyvolaný silným modrým světlem.

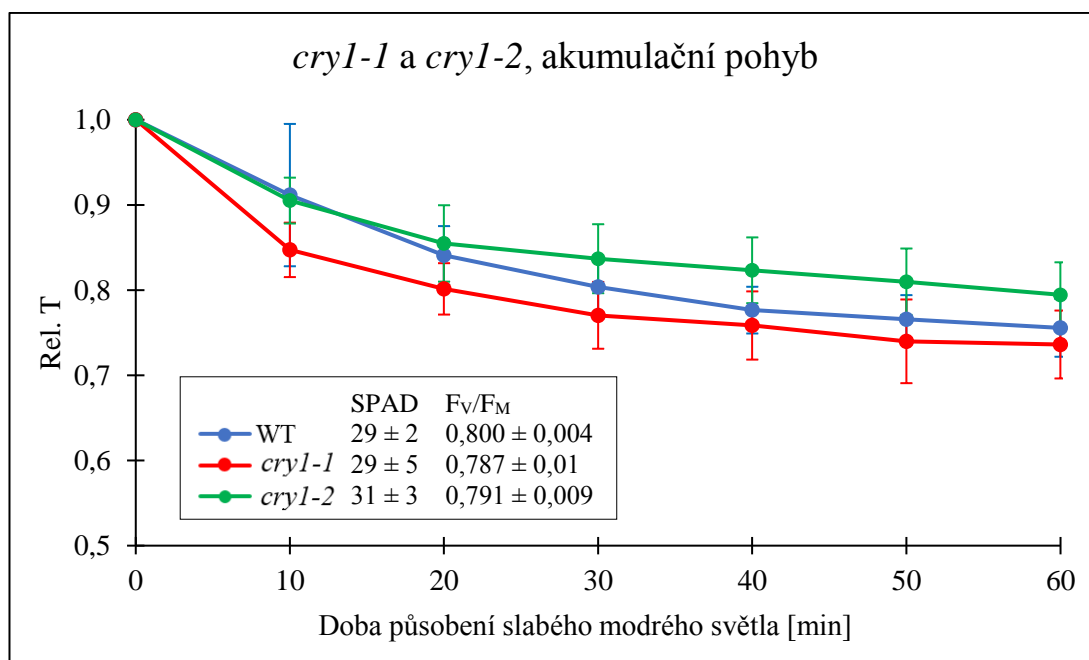


Obr. 13 Změna relativní kolimované transmitance při únikovém pohybu chloroplastů u *cry1-1*, *cry1-2* a WT. Stáří rostlin – 29-32 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 6$ pro WT, $n = 5$ pro *cry1-1* a *cry1-2*). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_V/F_M ($n = 6$ pro WT, $n = 5$ pro *cry1-1* a *cry1-2*). Měřeno 27. - 30. 6. 2017.

4.2.2 Akumulační pohyb chloroplastů (*cry1-1* a *cry1-2*)

Akumulační reakci chloroplastů u rostlin rajčete defektních v *Cry1a* jsme zkoumali v experimentu provedeném v červnu 2017 (Obr. 14). Stejně jako při měření únikového pohybu (Obr. 13) jsme nezjistili statisticky významný rozdíl mezi mutantními rostlinami a WT.

V případě *cry1-2* si můžeme všimnout náznaku zmenšeného rozsahu akumulačního pohybu chloroplastů oproti WT a *cry1-1*, podobně jako v případě únikového pohybu (Obr. 13). Menší reakce obou typů pohybu naznačují, že defekt v kryptochromu 1 způsobený mutací *cry1-2* mohl mírně ovlivnit mechanismy zajišťující jak akumulační pohyb chloroplastů, který je řízen pomocí *phot1* a *phot2*, tak únikový pohyb chloroplastů řízený pomocí *phot2*. Rozdíl v reakci na BL v mutantu *cry1-2* oproti WT a *cry1-1* je však velmi malý na to, aby se daly dělat jednoznačné závěry. Obecně lze spíše konstatovat, že rozdíly v pohybu chloroplastů v rostlinách *cry1-1* a *cry1-2* jsou oproti WT malé a kloníme se tedy k závěru, že mutace v kryptochromu 1 neovlivňuje pohyb chloroplastů. Náš závěr je v souladu s prací Kagawa a Wada (2000), kteří zjistili, že pohyby chloroplastů jsou u vyšších rostlin řízeny především fototropiny, nikoliv kryptochromy.



Obr. 14 Změna relativní kolimované transmittance při akumulačním pohybu chloroplastů u *cry1-1*, *cry1-2* a WT. Stáří rostlin – 29-32 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$). Měřeno 27. - 30. 6. 2017.

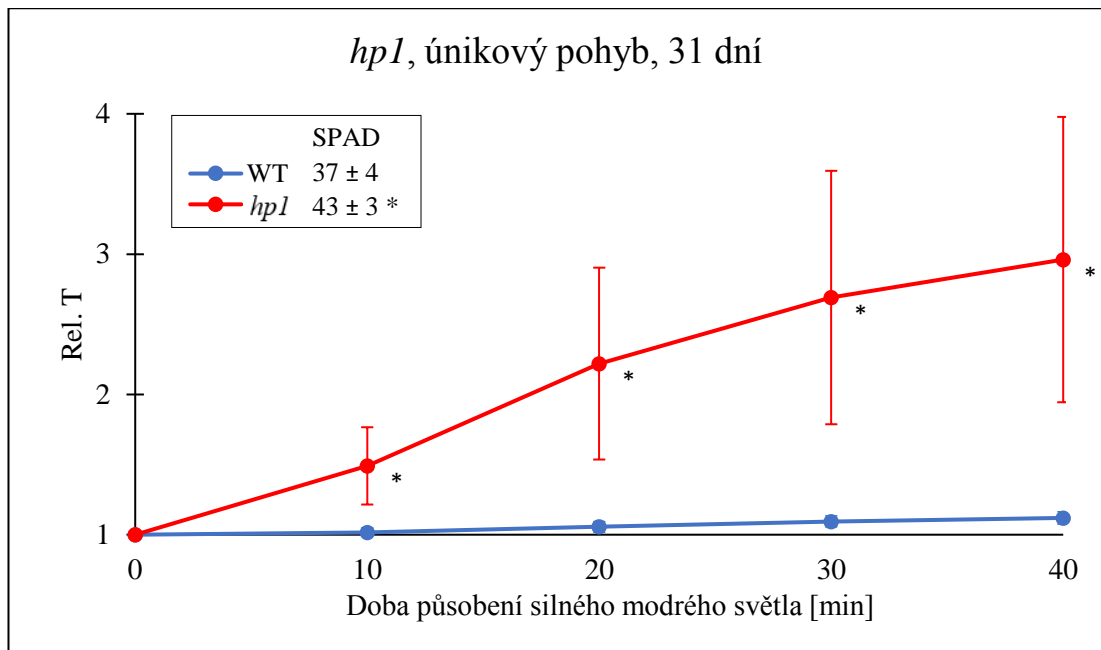
4.3 *hpl*

Mutant rajčete *hpl* (*high pigment1*) se vyznačuje hypersensitivní reakcí ke světlu (Peters *et al.*, 1992, Peters *et al.*, 1998), která je způsobena mutací v *DDB1*, negativním regulátorem přenosu světelného signálu. Mutant *hpl* se v důsledku toho vyznačuje i zvýšenou mírou fototropismu vyvolaného modrým světlem (Srinivas *et al.*, 2004) a zvýšeným množstvím a větší velikostí chloroplastů (Kilambi *et al.*, 2013). Ve dvou experimentech zaměřených na únikový a akumulární pohyb chloroplastů jsme zjišťovali, jestli a jak je mutant *hpl* ovlivněn v reakci chloroplastů na modré světlo. Mutant byl porovnáván s kultivarem Rutgers LA1090.

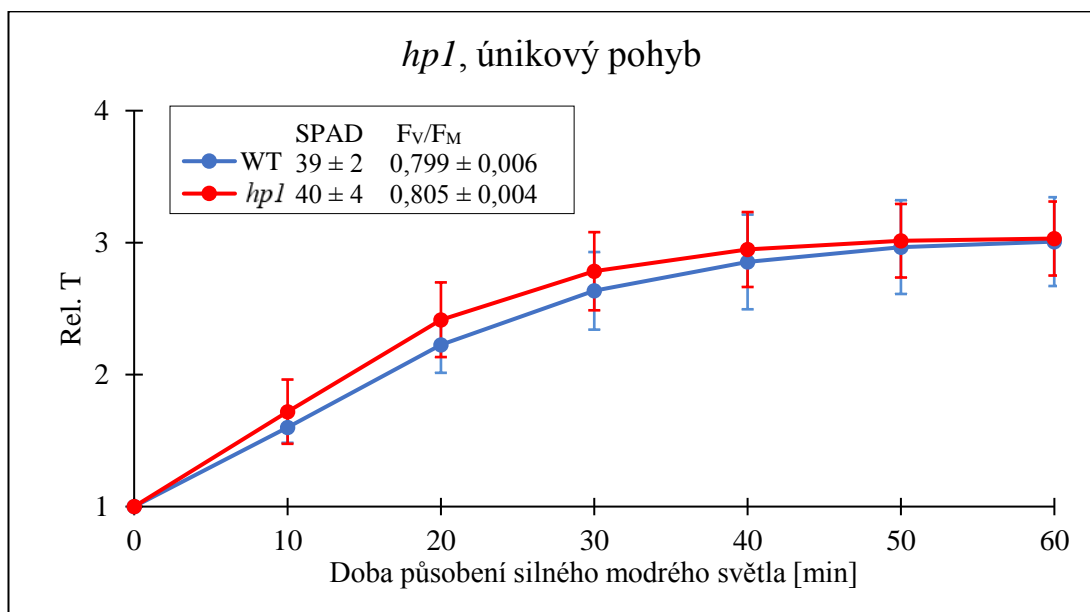
4.3.1 Únikový pohyb chloroplastů (*hpl*)

Při prvním experimentu (Obr. 15) s únikovým pohybem chloroplastů jsme naměřili zvýšenou citlivost mutanta *hpl* oproti WT. Relativní transmitance se u mutanta *hpl* zvětšila téměř 3krát. Nicméně nás překvapila reakce WT, která byla minimální – relativní transmitance se po 40 min působení silného BL zvýšila o pouhých 10 %. V dřívějších experimentech se nárůst relativní transmitance u jiných WT kultivarů pohyboval v rozmezí dvoj- až pětinasobku počáteční hodnoty. Experiment jsme opakovali o 5 měsíců později (Obr. 16). Tentokrát WT reagoval podobně jako *hpl* – transmitance mutanta i WT se zvětšila asi 3krát. Je tedy pravděpodobné, že rozdíl v rozsahu únikového pohybu chloroplastů mezi *hpl* a WT zjištěný v prvním měření byl způsoben spíše inhibicí pohybu u WT (jejíž příčinu neznáme) než zvýšenou reakcí u rostlin *hpl*.

Studie zabývající se vlivem mutace *hpl* na pohyb chloroplastů nebyla zatím publikována. Srinivas *et al.* (2004) zjistili, že dvojitý mutant *frihpl* vykazuje stejnou míru pohybu chloroplastů jako WT. Nabízí se otázka možného ovlivnění pohybu chloroplastů mutací *fri* v mutantu *frihpl*, která způsobuje defekt ve fytochromu A mající za následek menší citlivost k červenému a modrému světlu. Nicméně dle stejných autorů ani mutant *fri* nevykazoval pozměněnou míru pohybu chloroplastů v porovnání s WT. Kloníme se tak k závěru, že mutace *hpl*, způsobující hypersensitivitu rostliny vůči modrému a červenému světlu, nezpůsobuje zvýšenou míru únikového pohybu chloroplastů.



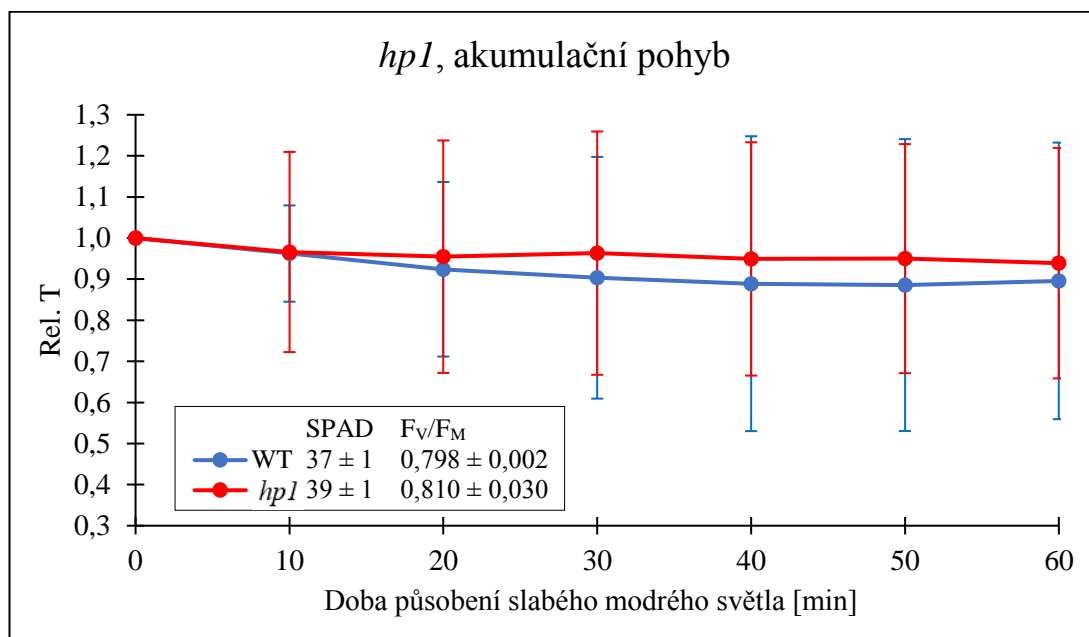
Obr. 15 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *hpl* a WT. Stáří rostlin – 31 dní. Měření 4. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $420 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 4$ pro WT, $n = 5$ pro *hpl*). Hvězdičky označují statisticky významný rozdíl mezi WT a *hpl* v příslušné době působení modrého světla (* $P = (0,01-0,05)$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD ($n = 4$ pro WT, $n = 5$ pro *hpl*). Měřeno 24. 3. 2017.



Obr. 16 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *hpl* a WT. Stáří rostlin – 25-27 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 10$ pro WT, $n = 9$ pro *hpl*). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 10$ pro WT, $n = 9$ pro *hpl*). Měřeno 21. - 23. 8. 2017.

4.3.2 Akumulační pohyb chloroplastů (*hpl*)

Akumulační pohyb chloroplastů u mutantu *hpl* jsme měřili v srpnu 2017 (Obr. 17). Při tomto měření jsme nezjistili rozdíl v akumulacím pohybu chloroplastů mezi mutantem a WT. Transmittance u WT klesla v průběhu 60 minut na 90 % výchozí hodnoty, u *hpl* na 94 %. Byla provedena pouze dvě opakování pro oba typy rostliny, výsledky experimentu jsou tedy spíše orientační, nicméně podle tohoto měření se mutant *hpl* nezdá být ovlivněn v akumulacím pohybu chloroplastů.



Obr. 17 Změna relativní kolimované transmittance při akumulacím pohybu chloroplastů u *hpl* a WT. Stáří rostlin – 25-27 dní. Měření 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 2$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 2$). Měřeno 21. - 23. 8. 2017.

4.4 *nps1*

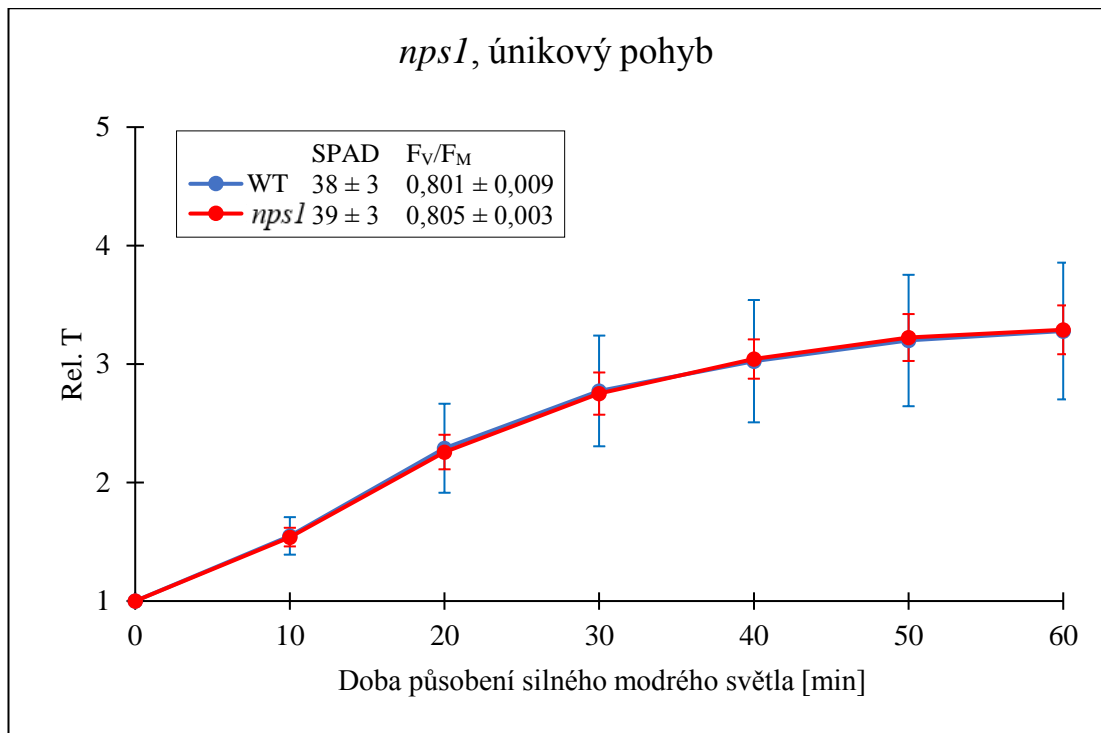
Mutant rajčete *nps1* (*non phototropic seedling 1*) je dle Sharma *et al.* (2014) defektní v procesech řízených *phot1*, mezi které patří mj. fototropismus vyvolaný slabým modrým světlem a otevírání stomat vyvolané rovněž pomocí slabého modrého světla. Mutace *nps1* tak pravděpodobně způsobuje defekt ve *phot1*. Dle Sharma *et al.* (2014) se mutantní rostliny WT dále vyznačují menší velikostí.

Vliv mutace *nps1* na pohyb chloroplastů jsme ověřovali ve dvou experimentech zaměřených na únikovou a akumulaci reakci chloroplastů. Mutantní rostliny jsme srovnávali s kultivarem lilku rajčete cv. Ailsa Craig.

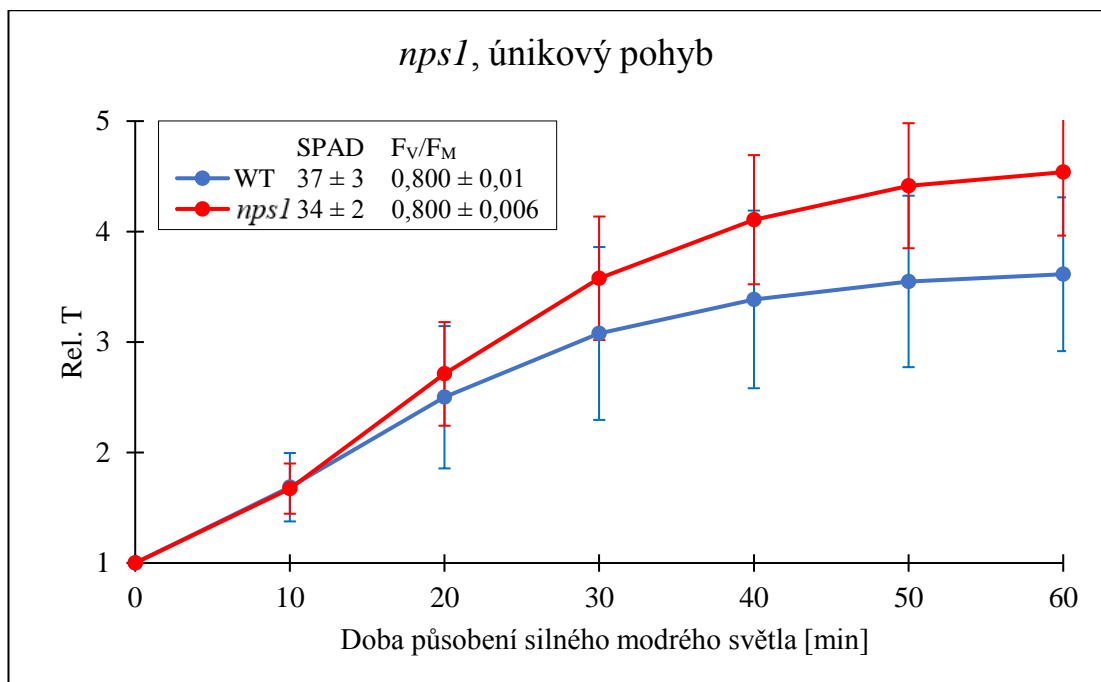
4.4.1 Únikový pohyb chloroplastů (*nps1*)

Únikový pohyb chloroplastů u mutantu *nps1* jsme měřili ve dvou experimentech (Obr. 18 a 19). V žádném z nich jsme nezjistili statisticky významný rozdíl v únikovém pohybu chloroplastů mezi *nps1* a WT. V prvním experimentu se transmitance u WT i *nps1* shodně zvětšila 3,3krát (Obr. 18). Ve druhém experimentu (Obr. 19) vykazoval mutant *nps1* trend zvětšené reakce na silné modré světlo, ale rozdíl oproti WT nebyl statisticky významný. Při tomto měření se relativní transmitance v mutantu *nps1* zvětšila 4,3krát, ve WT 3,6krát.

Jak již bylo uvedeno výše, rostliny *nps1* mají defekt ve *phot1* (Sharma *et al.*, 2014), takže únikový pohyb chloroplastů, který je řízen *phot2*, by měl zůstat neovlivněný. Výsledky našeho měření tedy korespondují s výzkumem citovaných autorů.



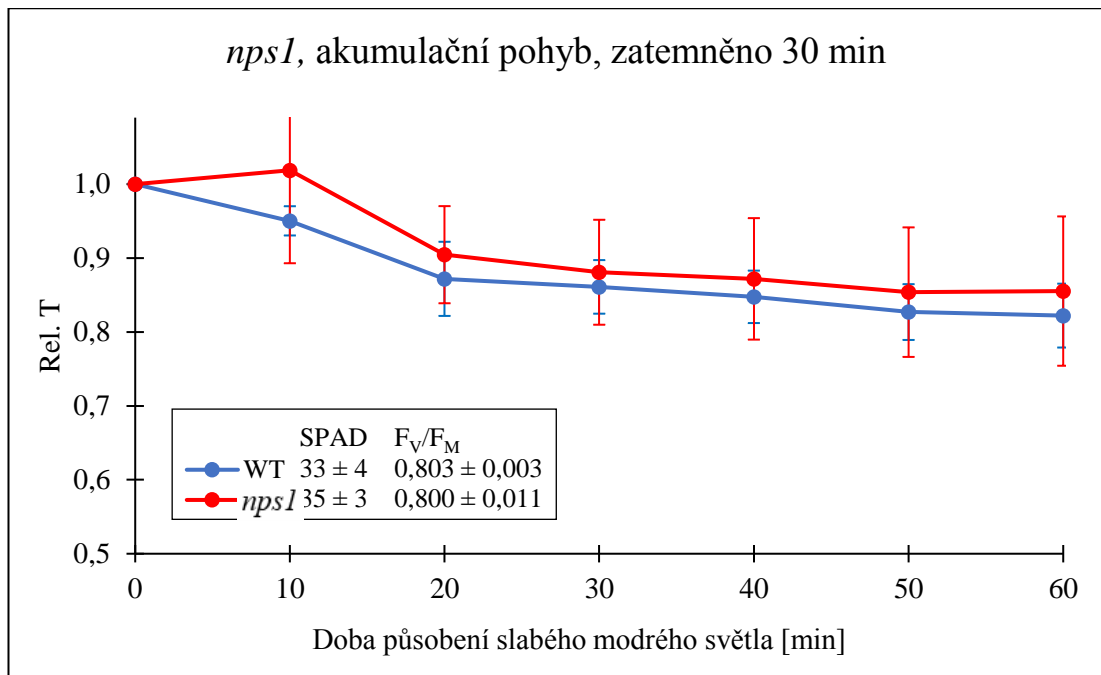
Obr. 18 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *nps1* a WT. Stáří rostlin – 26 dní, měřeny 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchytky ($n = 5$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$). Měřeno 18. 9. 2017.



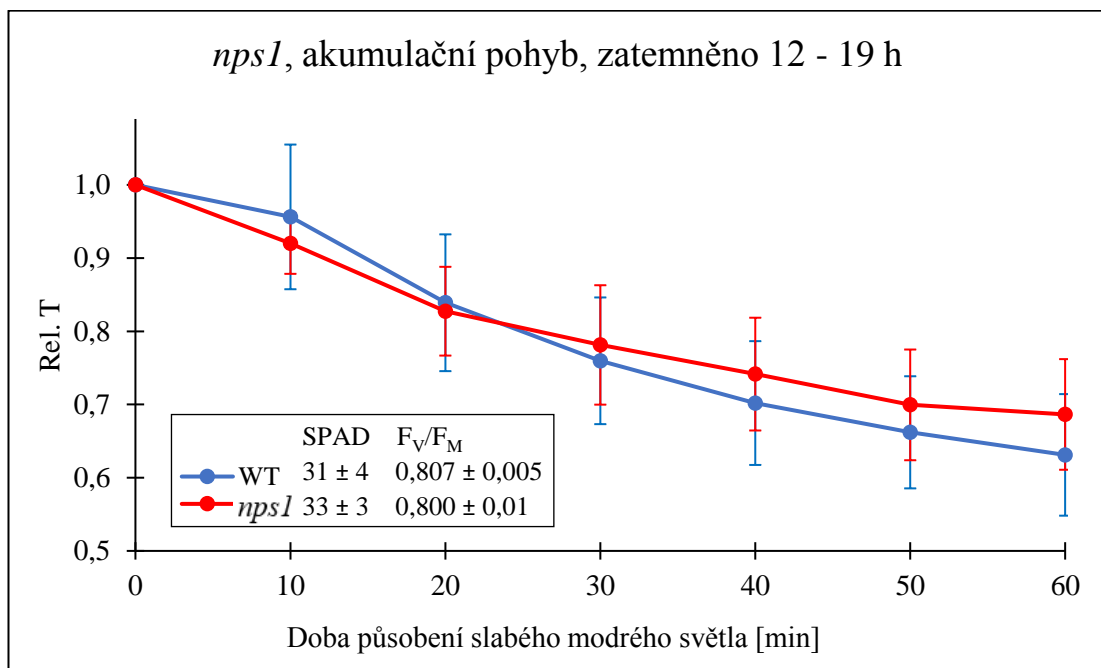
Obr. 19 Změna relativní kolimované transmittance při únikovém pohybu chloroplastů u *nps1* a WT. Stáří rostlin – 25-26 dní, měřeny 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $130 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchytky ($n = 4$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 4$). Měřeno 22. - 23. 11. 2017.

4.4.2 Akumulační pohyb chloroplastů (*nps1*)

Akumulační pohyb chloroplastů mutantu *nps1* jsme měřili ve dvou experimentech (Obr. 20 a 21). V prvním měření (Obr. 20), kdy jsme rostliny před měřením zatemnili po dobu 30 minut a použili slabé BL o intenzitě $6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ jako v předešlých experimentech, nevykazovaly mutantní rostliny oproti WT rozdílnou akumulaci reakci chloroplastů na slabé BL. U *nps1* klesla transmitance vlivem akumulacího pohybu chloroplastů na 86 % původní hodnoty, u WT na 82 %. Podle práce Sharma *et al.* (2014) by však měl být v mutantu *nps1* akumulacího pohyb chloroplastů inhibován. Autoři použili pro vyvolání akumulacího pohybu BL o nižší intenzitě ($0,6 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) a rostliny byly před měřením zatemněny mnohem delší dobu (12 h). V dalším měření jsme tedy ve snaze přiblížit se podmínkám použitým v citované práci (Sharma *et al.*, 2014) rostliny zatemnili po dobu 12 - 19 h (podle pořadí měřené rostliny) a použili jsme pro vyvolání akumulacího pohybu chloroplastů nižší intenzitu modrého světla ($0,8 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) (Obr. 21). Dospěli jsme však k podobnému výsledku jako při prvním experimentu – pokles transmitance se u *nps1* zastavil na 69 %, u WT na 63 %. Rozsah změny relativní transmitance (a tedy akumulacího pohybu chloroplastů) byl tedy větší oproti prvnímu měření (zřejmě díky použití slabšího světla a delší době zatemnění), ale opět nebyl pozorován rozdíl mezi WT a *nps1*.



Obr. 20 Změna relativní kolimované transmittance při akumulárním pohybu chloroplastů u *nps1* a WT. Stáří rostlin – 34 dní, měřeny 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $6 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 4$ pro WT, $n = 5$ pro *nps1*). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 4$ pro WT, $n = 5$ pro *nps1*). Měřeno 26. 9. 2017.



Obr. 21 Změna relativní kolimované transmittance při akumulárním pohybu chloroplastů u *nps1* a WT. Stáří rostlin – 23-25 dní, měřeny 2. listy. Pohyb chloroplastů vyvolán modrým světlem o intenzitě $0,8 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Uvedeny průměry a směrodatné odchylky ($n = 5$). Uvedeny hodnoty relativního obsahu chlorofylu měřené přístrojem SPAD a parametr F_v/F_M ($n = 5$). Měřeno 20. - 22. 11. 2017.

Je známo, že akumulční pohyb chloroplastů je částečně řízen i pomocí *phot2*, avšak v menší míře než *phot1* (Sakai *et al.*, 2001; Kong a Wada, 2014). Z toho by se dalo usoudit, že v případě nefunkčnosti *phot1* v *nps1* převzal jeho roli v akumulaci chloroplastů *phot2*, nicméně dle Sharma *et al.* (2014) *nps1* vykazoval úplnou inhibici akumulčního pohybu chloroplastů, což se v našem případě nepotvrdilo. Tento výsledek vyvolal pochybnost, zda se skutečně jednalo o mutanty *nps1*. Zkusili jsme tedy ověřit, jestli se mutantní rostliny od WT liší i v jiných reakcích řízených *phot1* uváděných v práci Sharma *et al.* (2014). Autoři uvádějí, že mutant vykazuje defekt v otevírání stomat při osvětlení slabým modrým světlem. Když jsme provedli gazometrické měření změn vodivosti průduchů vyvolaných slabým modrým světlem ($2,5 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) na pozadí červeného světla ($200 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) podle postupu uvedeného v práci Sharma *et al.* (2014), na rozdíl od těchto autorů jsme u *nps1* nezjistili signifikantní inhibici otevírání stomat oproti WT.

Sharma *et al.* (2014) dále uvádí, že se mutant *nps1* vyznačuje menší velikostí oproti WT. Námi pěstované rostliny *nps1* byly v porovnání s WT stejně velké (Obr. 22). Rozdíl mezi našimi výsledky a výsledky práce Sharma *et al.* (2014) by mohl mimo jiné souviset s tím, že jsme rostliny pěstovali ve standardním světelném režimu světlo/tma (16 h/8 h), zatímco Sharma *et al.* (2014) používali rostliny pěstované na kontinuálním světle a takové rostliny mohou mít jiné vlastnosti.



Obr. 22 Porovnání velikosti mutanta lilku rajčete WT (vlevo) a *nps1* (vpravo).

Z uvedených skutečností vyplývá, že námi pěstované rostliny pravděpodobně nebyly mutantní v genu *nps1*, nebo by bylo nutné rostliny pěstovat na kontinuálním světle, aby se u nich ve sledovaných znacích a procesech projevila mutace *nps1*. V zájmu celistvosti námi provedených experimentů jsme však zvolili stejný způsob pěstování jako u jiných mutantů v této práci.

5 ZÁVĚR

Cílem této bakalářské práce bylo ověřit, zda a jak je u vybraných fotomorfogenních mutantů lilku rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) ovlivněn pohyb chloroplastů indukovaný modrým světlem. Jednalo se o mutanty *7B-1*, *cry1-1* a *cry1-2*, *hp1* a *nps1*. Tyto mutanty jsme srovnávali s WT - cv. Rutgers, cv. Moneymaker, cv. Rutgers LA1090 a cv. Ailsa Craig (v tomto pořadí). Pohyb chloroplastů jsme měřili pomocí změny kolimované transmitance listu při osvětlení modrým světlem. V závislosti na intenzitě modrého světla vyvolává buď únikový pohyb (při vyšších intenzitách) nebo akumulární pohyb (při nízkých intenzitách), přičemž transmitance roste (při únikovém pohybu) nebo klesá (při akumulárním pohybu).

U mutantu *7B-1*, který se vyznačuje obecně sníženou reakcí na modré světlo, jsme opakovaně zaznamenali zmenšenou míru únikového pohybu chloroplastů, přičemž pohyb akumulární nebyl signifikantně ovlivněn. Z toho vyvozujeme, že mutant *7B-1* obsahuje defekt v signální dráze světla spouštěné fototropinem 2. Protože únikový pohyb chloroplastů nebyl inhibován u rostlin *7B-1* pěstovaných při krátké fotoperiodě, předpokládáme, že projev mutace na únikový pohyb chloroplastů je závislý na délce fotoperiody.

V mutantech *cry1-1* a *cry1-2*, kteří jsou defektní v kryptochromu 1, jsme oproti WT nezaznamenali významný rozdíl v pohybu chloroplastů. V případě *cry1-2* bylo možné pozorovat trend mírně zmenšené reakce chloroplastů na modré světlo o vysoké i nízké intenzitě, spíše se ale kloníme k závěru, že mutace v *Cry1a* nemá vliv na pohyb chloroplastů.

Dále jsme měřili pohyby chloroplastů v mutantu *hp1*. Tento mutant se vyznačuje hypersenzitivitou vůči modrému a červenému světlu, vliv mutace na pohyb chloroplastů vyvolaný modrým světlem jsme však neprokázali.

Poslední měřený mutant byl *nps1*. Tento mutant je dle Sharma *et al.* (2014) defektní ve fototropinu 1. V citované práci autoři zjistili, že tento defekt vede k inhibici akumulárního pohybu chloroplastů v *nps1*, avšak námi provedená měření neprokázala poruchu v tomto typu pohybu. Vystala otázka, zda se v případě námi použitých rostlin skutečně jednalo o mutantu. Ověřovali jsme tedy další vlastnosti, kterými by se měl mutant *nps1* vyznačovat (menší velikost a menší rychlost otevírání průduchů na slabém modrém světle). Ani v těchto znacích jsme ale nezjistili rozdíl oproti WT. V citované práci (Sharma *et al.*, 2014) autoři uvádí, že mutant *nps1* byl

pěstován při kontinuálním světle. Z našich výsledků tedy vyvozujeme, že se buďto nejedná o mutanta *nps1*, nebo by bylo nutné změnit pěstební podmínky, aby se mutace *nps1* projevila.

V poslední řadě je nutné zmínit, že experimenty provedené v rámci bakalářské práce nevyšly vždy podle očekávání a v některých experimentech byla zaznamenána relativně vysoká variabilita rozsahu pohybu chloroplastů v rámci jednotlivých rostlinných variant. To by mohlo být do určité míry způsobeno tím, že pohyb chloroplastů je relativně citlivý na nepříznivé podmínky, mezi které patří např. snížení obsahu vody v listech. Dle práce Nauš *et al.* (2016) má nižší obsah vody v zasychajících listech negativní vliv na únikový pohyb chloroplastů. Drobné výkyvy v obsahu vody v listech v průběhu pěstování a měření mohly tedy způsobit odchylky v měření pohybu chloroplastů. V jiném případě byly rostliny ve fytostronu napadeny třásněnkami. Tyto rostliny vykazovaly zmenšenou míru pohybu chloroplastů (výsledky experimentů s těmito rostlinami nejsou v práci prezentovány). Dosavadní zkušenosti s měřením pohybu chloroplastů také naznačují, že rostliny mohou reagovat různě podle toho, v jakém ročním období jsou pěstovány, i když jsou pěstovány ve standardních podmínkách ve fytostronu.

Studium vlivu stresových podmínek na pohyb chloroplastů stejně jako jeho změn během ontogeneze rostlin je zatím stále v počátcích. Bylo by dobré tento směr výzkumu dále rozvíjet, protože schopnost rostlin vypořádat se s nepříznivými podmínkami prostředí může být významnou měrou ovlivněna právě fungujícím pohybem chloroplastů.

6 LITERATURA

- Ahmad M., Cashmore R.A. (1993): HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* **366**, 162-166.
- Aihara Y., Tabata R., Suzuki T., Shimazaki K., Nagatani A. (2008): Molecular basis of the functional specificities of phototropin 1 and 2. *The Plant Journal* **56**, 364-375.
- Banerjee R., Batschauer A. (2005): Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498-502.
- Briggs W.R., Christie J.M. (2002): Phototropins 1 and 2: versatile plant blue-light receptors. *Trends in Plant Science* **7**, 204-210.
- Briggs W.R., Christie J.M., Salomon M. (2001): Phototropins: a new family of flavin-binding blue light receptors in plants. *Antioxidants and Redox Signalling* **3**, 775-788.
- Cashmore A.R., Jarillo J.A., Wu Y.J., Liu D. (1999): Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals. *Science* **284**, 760-765.
- Crosson S., Moffat K. (2001): Structure of a flavin-binding plant photoreceptor domain: Insights into light-mediated signal transduction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 2995-000.
- DeBlasio S.L., Mullen J.L., Luesse D.R., Hangarter R.P. (2003): Phytochrome modulation of blue light-induced chloroplast movements in Arabidopsis. *Plant Physiology* **133**, 1471-1479.
- Doi M., Shigenaga A., Emi T., Kinoshita T., Shimazaki K. (2004): A transgene encoding a blue-light receptor, phot1, restores blue-light responses in the Arabidopsis phot1 phot2 double mutant. *Journal of Experimental Botany* **55**, 517-523.
- Facella P., Daddiego L., Perrotta G. (2012): *CRY1a* influences the diurnal transcription of photoreceptor genes in tomato plants after gibberellin treatment. *Plant Signaling and Behavior* **7**, 1034-1036.
- Fellner M., Sawhney V.K. (2001): Seed germination in a tomato male sterile mutant is resistant to osmotic, salt and low temperature stresses. *Theoretical and Applied Genetics* **102**, 215-221.
- Fellner M., Sawhney V.K. (2002): The *7B-1* mutant in tomato shows blue-light-specific resistance to osmotic stress and abscisic acid. *Planta* **214**, 675-682.
- Fellner M., Zhang R., Pharis R.P., Sawhney V.K. (2001): Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous level of, abscisic acid (2001): *Journal of Experimental Botany* **52**, 725-738.
- Frolec J., Rebiček J., Lazár D., Nauš J. (2010): Impact of two different types of heat stress on chloroplast movement and fluorescence signal of tobacco leaves. *Plant Cell Reports* **29**, 705-714.
- Haupt W., Scheuerlein R. (1990): Chloroplast movement. *Plant, Cell and Environment* **13**, 595-614.
- Hlavinka J., Nauš J., Fellner M. (2013): Spontaneous mutation *7B-1* in tomato impairs blue light-induced stomatal opening. *Plant Science* **209**, 75-80.
- Hsu D.S., Zhao X., Zhao S., Kazantsev A., Wang R.P. (1996): Putative human blue-light photoreceptors *hCRY1* and *hCRY2* are flavoproteins. *Biochemistry* **35**, 13871-13877.
- Huang K., Beck C.F. (2003): Phototropin is the blue-light receptor that controls multiple steps in the sexual life cycle of the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6269-6274.
- Cho H.Y., Tseng T.S., Kaiserli E., Sullivan S., Christie J.M., Briggs W.R. (2007): Physiological roles of the light, oxygen, or voltage domains of phototropin 1 and phototropin 2 in Arabidopsis. *Plant Physiology* **143**, 517-529.
- Christie J.M. (2007): Phototropin blue-light receptors. *Annual Review of Plant Biology* **58**, 21-45.
- Christie J.M., Swartz T.E., Bogomolni R.A., Briggs W.R. (2002): Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal* **32**, 205-219.

- Jarillo J.A., Gabrys H., Capel J., Alonso J.M., Ecker J.R., Cashmore A.R. (2001): Phototropin-related NPL1 controls blue light-induced chloroplast relocation. *Nature* **410**, 952-954.
- Ježilová E., Fellner M., Bergougnoux V., Špundová M. (2012): Is the rate of photosynthesis under blue light altered in the *7B-1* tomato mutant? *Photosynthetica* **50**, 477-480.
- Kadota A., Yamada N., Suetsugu N., Hirose M., Saito C., Shoda K., Ichikawa S., Kagawa T., Nakano A., Wada M. (2009): Short actin-based mechanism for light-directed chloroplast movement in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 13106-13111.
- Kagawa T., Sakai T., Suetsugu N., Oikawa K., Ishiguro S., Kato T., Tabata S., Okada K., Wada M. (2001): Arabidopsis NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response. *Science* **291**, 2138-2141.
- Kagawa T., Wada M. (2000): Blue light-induced chloroplast relocation in Arabidopsis thaliana as analyzed by microbeam irradiation. *Plant and Cell Physiology* **41**, 84-93.
- Kagawa T., Wada M. (2002): Blue light-induced chloroplast relocation. *Plant and Cell Physiology* **43**, 367-371.
- Kawai H., Kanegae T., Christensen S., Kiyosue T., Sato Y., Imaizumi T., Kadota A., Wada M. (2003): Responses of ferns to red light are mediated by an unconventional photoreceptor. *Nature* **421**, 287-290.
- Kilambi V.H., Kumar R., Sharma R., Sreelakshmi Y. (2013): Chromoplast-specific carotenoid-associated protein appears to be important for enhanced accumulation of carotenoids in *hp1* tomato fruits. *Plant Physiology* **161**, 2085-2101.
- Kong S., Arai Y., Suetsugu N., Yanagida T., Wada M. (2013): Rapid severing and motility of chloroplast-actin filaments are required for the chloroplast avoidance response in Arabidopsis. *Plant Cell* **25**, 572-590.
- Kong S., Suetsugu N., Kikuchi S., Nakai M., Nagatani A., Wada M. (2012): Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity. *Plant and Cell Physiology* **54**, 80-92.
- Kong S., Wada M. (2014): Recent advances in understanding the molecular mechanism of chloroplast photorelocation movement. *Biochimica et Biophysica Acta* **1837**, 522-530.
- Lariguet P., Dunand C. (2005): Plant photoreceptors: phylogenetic overview. *Journal of Molecular Evolution* **61**, 559-569.
- Lin C. (2000): Plant blue-light receptors. *Trends in Plant Sciences* **5**, 337-342.
- Lin C., Todo T. (2005): The cryptochromes. *Genome Biology* **6**, 220.
- Liscum E., Hodgson D.W., Campbell T.J. (2003): Blue light signaling through the cryptochromes and phototropins: so that's what the blues is all about. *Plant Physiology* **133**, 1429-1436.
- Liu, Y., Roof S., Ye Z., Barry C., Tuinen van A., Vrebalov J., Bowler Ch., 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.
- Mathews, S. (2006): Phytochrome-mediated development in land plants: red light sensing evolves to meet the challenges of changing light environments. *Molecular Ecology* **15**, 3483-3503.
- Matsuoka D., Iwata T., Zikihara K., Kandori H., Tokutomi S. (2007): Primary processes during the light-signal transduction of phototropin. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 122-130.
- Nakasako M., Zikihara K., Matsuoka D., Katsura H., Tokutomi S. (2008): Structural basis of the LOV1 dimerization of Arabidopsis phototropins 1 and 2. *Journal of Molecular Biology* **381**, 718-733.
- Nauš J., Prokopová J., Řebíček J., Špundová M. (2010): SPAD chlorophyll meter reading can be pronouncedly affected by chloroplast movement. *Photosynthesis Research* **105**, 265-271.

- Nauš J., Šmecko S., Špundová M. (2016): Chloroplast avoidance movement as a sensitive indicator of relative water content during leaf desiccation in the dark. *Photosynthesis Research* **129**, 217-225.
- Neff M.M., Fankhauser C., Chory J. (2000): Light: an indicator of time and place. *Genes and Development* **14**, 257-271.
- Omidvar V., Fellner M. (2015): DNA Methylation and transcriptomic changes in response to different lights and stresses in *7B-1* male-sterile tomato. *PLOS ONE*, **10**: e0121864. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0121864>.
- Omidvar V., Mohorianu I., Dalmay T., Fellner M. (2015): MicroRNA regulation of abiotic stress response in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *The Plant Genome* **8**. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2015.02.0008>.
- Omidvar V., Mohorianu I., Dalmay T., Zheng Y., Fei Z., Pucci A., Mazzucato., Vecerová V., Sedlářová M., Fellner M. (2017): Transcriptomic analysis of anther development in *7B-1* male-sterile tomato mutant. *PlosONE* **12**: e0170715. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170715>
- Perrotta G., Yahoubyan G., Nebuloso E., Renzi L., Giuliano G. (2001): Tomato and barley contain duplicated copies of cryptochrome 1. *Plant, Cell and Environment* **24**, 991-997.
- Peters J.L., Schreuder M.E.L., Verduin S.J.W., Kendrick R.E. (1992): Physiological characterization of *high pigment* mutant of tomato. *Photochemistry and Photobiology* **56**, 75-82.
- Peters J.L., Szell M., Kendrick R.E. (1998): The expression of light-regulated genes in the *high-pigment-1* mutant of tomato. *Plant Physiology* **117**, 797-807.
- Pucci A., Picarella M.E., Mazzucato A. (2017): Phenotypic, genetic and molecular characterization of *7B-1*, a conditional male-sterile mutant in tomato. *Theoretical and Applied genetics*. <https://doi.org/10.1007/s00122-017-2964-7>.
- Rolencová M. (2008): *Teoretické a experimentální studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem světla různé úrovně a lokálního stresu*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Řebíček J. (2009) *Studium pohybu chloroplastů v listech pod vlivem globálního abiotického a biotického stresu*. Diplomová práce, Univerzita Palackého v Olomouci, Česká republika.
- Sakai T., Kagawa T., Kasahara M., Swartz T.E., Christie J.M., Briggs W.R., Wada M., 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.
- Sawhney V.K. (1997): Genic male sterility. In: *Pollen Biotechnology for Crop Production and Improvement*. (Shivanna K.R., Sawhney V.K., eds.), Cambridge University Press, Cambridge, UK, 183-198.
- Sharma S., Kharshiing E., Srinivas A., Zikihara K., Tokutomi S., Nagatani A., Fukayama H., Bodanapu R., Behera R.K., Sreelakshmi Y., Sharma R. (2014): A dominant mutation in the light–oxygen and voltage2 domain vicinity impairs phototropin1 signaling in tomato. *Plant Physiology* **164**, 2030-2044.
- Srinivas A., Behera R.K., Kagawa T., Wada M., Sharma R. (2004): *High pigment1* mutation regulates phototropic signal transduction in tomato seedlings. *Plant Physiology* **134**, 790-800.
- Stanewsky R., Kaneko M., Emery P., Beretta B., Wager S.K. (1998): The *cry^b* mutation identifies cryptochrome as a circadian photoreceptor in *Drosophila*. *Cell* **95**, 681-692.
- Suetsugu N., Mittmann F., Wagner G., Hughes J., Wada M. (2005): A chimeric photoreceptor gene, neochrome, has arisen twice during plant evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13705-13709.
- Suetsugu N., Higa T., Gotoh E., Wada M. (2016): Light-induced movements of chloroplasts and nuclei are regulated in both cp-actin-filament-dependent and -independent manners in *Arabidopsis thaliana*. *PLOS ONE* **11**: e0168318. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0168318>

- Suetsugu N., Wada M. (2007): Phytochrome-dependent photomovement responses mediated by phototropin family proteins in cryptogam plants. *Photochemistry and Photobiology* **83**, 87-93.
- Takamatsu H., Takagi S. (2011): Actin-dependent chloroplast anchoring is regulated by Ca(2+)-calmodulin in spinach mesophyll cells. *Plant and Cell Physiology* **52**, 1973-1982.
- Wada M. (2016): Chloroplast and nuclear photorelocation movements. *Proceedings of the Japan Academy* **92**, 387-411.
- Weller J.L., Perrotta G., Schreuder E.L.M., van Tuinen A., Koornneef M., Giuliano G., Kendrick E.R. (2001): Genetic dissection of blue-light sensing in tomato using mutants deficient in cryptochrome 1 and phytochromes A, B1 and B2. *The Plant Journal* **25**, 427-440.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

ABA – kyselina abscisová

BL –modré světlo (*blue light*)

DDB1 – DNA damage-binding protein1

LOV – Light oxygen and voltage

Phot1 – fototropin 1

Phot2 – fototropin 2

WT – wild type