

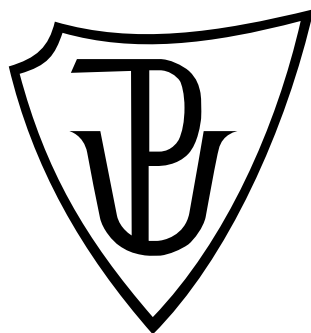
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2013

Eva Malečková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Zapojení fotoreceptorů a iontových kanálů v klíčení semen

Bakalářská práce

Eva Malečková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2013

Vedoucí práce: Doc. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.

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

V Olomouci dne 4. dubna 2013

.....

Eva Malečková

Souhrn

Pro další vývoj rostlin je klíčové správné načasování klíčení, a proto jsou semena velmi citlivá k podnětům vnějšího prostředí. Především světlo, za spolupůsobení teplotních podmínek či dostupnosti vody, hraje v regulaci klíčení stěžejní roli. Zapojení iontových kanálů je důležité v regulaci růstu (klíčení spor a semen obilovin, prodlužování stonku *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) a v několika případech bylo popsáno zapojení světla v depolarizaci plazmatické membrány. Bylo proto zajímavé studovat možnost zapojení iontových kanálů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. Semena standardního genotypu rajčete (cv. GT) a fotomorfogenního mutantu s defektem ve fytochromu B1 (*tri*¹) klíčila v *in vitro* podmínkách, tj. v Petriho miskách na agarovém médiu (Murashige-Skoog). Průběh klíčení byl ovlivněn jednak kvalitou světla (tma, modré a červené světlo), a také inhibitory aniontových kanálů: 5-nitro-2,3-fenylpropylaminobenzoová kyselina (NPPB), kyselina niflumová (NIF), kyselina 4-acetamid-4'-isothiokyanstilben-2,2'-disulfonová (SITS) a kyselina 4,4'-diisothiokyanstilben-2,2'-disulfonová (DIDS), které byly do média přidány v různých koncentracích. Za všech experimentálních podmínek bylo sledováno maximální klíčení a jeho kinetika. Jediným účinným inhibitorem klíčení semen se ukázala být kyselina niflumová, která klíčení inhibovala za všech testovaných světelných podmínek. Nejvýznamněji bylo klíčení inhibováno na modrém světle. Na základě výsledků sledování průběhu klíčení semen obou testovaných genotypů rajčete se lze domnívat, že vlastní inhibiční účinek niflumové kyseliny je významně zesílen působením vlnových délek v červené a především pak v modré oblasti světelného spektra a že se tak děje nezávisle na fytochromu B1. Pro působení světla na zesílení inhibičního kyseliny niflumové byly navrženy dvě hypotézy: působením světla může být inhibována exprese NIF-senzitivních kanálů nebo světlo zvyšuje jejich citlivost k exogenně aplikovanému inhibitoru.

Summary

Germination is a very important phase in the development of any plant. Plants are therefore highly sensitive to environmental cues, which are essential for appropriate timing of seed germination. The most important external stimulus is light, alongside factors such as temperature and water accessibility. Ion channels are involved in growth regulation (germination of spores and grain seeds, stem elongation of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.) and also in plasma membrane depolarization. In regard to previous observations, it was interesting to study possible involvement of ion channels in seed germination of tomato *Solanum lycopersicum* L. Seeds of both standard genotype (cv. GT) and photomorphogenic mutant deficient in phytochrome B1 (*tri¹*) were used. Murashige-Skoog basal medium was used for *in vitro* germination, which was affected by light quality and by various concentrations of the following anion channel inhibitors: 5-nitro-2-(3-phenylpropylamino)benzoic acid, niflumic acid, 4-acetamido-4-isothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid and 4,4'-diisothiocyanostilbene-2,2'-disulfonic acid. The object was to score maximal germination rates as well as kinetics of the germination. From all the inhibitors tested, only niflumic acid has been shown to be an efficient inhibitor of seed germination in dark. Furthermore the inhibitory effect of niflumic acid was increased by red light and especially by blue light. Upon application of niflumic acid, germination of both cv. GT and mutant *tri¹* was inhibited. Therefore, the observed inhibition seems to be independent of phytochrome B1. It was further hypothesized that light can inhibit expression of NIF-sensitive channels. The alternative explanation could be that exposure to the light results in increased sensitivity of NIF-sensitive channels to niflumic acid.

Na tomto místě bych ráda poděkovala Doc. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D za odborné vedení, přínosné rady, čas a trpělivost, které mi v průběhu vypracování bakalářské práce poskytl. Ráda bych také poděkovala kolektivu Skupiny molekulární fyziologie za vytvoření příjemného pracovního prostředí, a především pak paní laborantce Renátě Plotzové za autoklávování medií pro vlastní experimenty.

Obsah

1	ÚVOD.....	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2.1	Fotoreceptory a fotomorfogeneze.....	10
2.1.1	Fytochromy	11
2.1.2	Receptory pro modré světlo	14
2.1.2.1	Krytochromy	14
2.1.2.2	Fototropiny.....	17
2.1.3	Interakce fotoreceptorů	18
2.1.4	Úloha COP1 ve fotomorfogenezi	19
2.2	Iontové kanály a ionty v buňkách	21
2.2.1	Transport iontů přes membrány	21
2.2.2	Aniontové kanály	22
2.2.3	Vybrané genové rodiny kódující aniontové kanály	25
2.3	Klíčení	27
2.3.1	Klíčení a světlo	28
2.3.2	Světlo a fytohormony společně regulují růst a vývoj	31
3	CÍL PRÁCE.....	34
4	MATERIÁL A METODIKA.....	35
5	VÝSLEDKY.....	39
5.1	Vliv inhibitorů aniontových kanálů na klíčení semen	39
5.2	Vliv kvality světla na klíčení semen.....	51
6	DISKUZE	53
7	ZÁVĚR.....	58
8	LITERATURA.....	59
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	68

1 Úvod

Pro rostliny, jakožto přisedlé organizmy, je vnímání vnějších podnětů klíčové pro jejich růst a vývoj. Právě světlo je pro rostliny jedním z hlavních podnětů okolního prostředí. Rostlinám slouží jako mechanismus pro řízení biorytmů a je pro rostliny zdrojem energie. Významně se uplatňuje také v regulaci vývoje rostlin od klíčení přes asimilaci a prodlužování stonku až po rozvoj listů a indukci kvetení. V odpovědi na světelné podněty jsou celé rostlinné orgány schopny růstu a ohýbání, jehož směr je určen právě dopadajícím světlem. Světlo je dle své vlnové délky zachycováno fotoreceptory, především fytochromy, kryptochromy a fototropiny (Carvalho a kol., 2011; Casal a kol., 1998; Taiz a Zeiger, 2010).

Odpovědi řízené světlem jsou často vysoce komplexní a dochází k interakcím nejen mezi světelnými signálními drahami, ale také s drahami jinými. Světlo tak například reguluje biosyntézu fytohormonů gibberellinů, ethylenu a kyseliny abscisové. Naopak gibberelliny a auxin výrazně ovlivňují expresi genů kódujících kryptochromy a fytochromy (Alabadí a kol., 2004; Fellner a Sawhney, 2001; Jasoni a kol., 2001; Nováková a kol., 2005; Seo a kol., 2009). Světlo, a to především světlo modré, je také zapojeno v řízení odpovědí rostlin na abiotické stresy, jako jsou stres osmotický, zvýšená koncentrace solí či pokles okolní teploty (Fellner a Sawhney, 2001; Fellner a Sawhney, 2002).

Stejně tak lze očekávat alespoň částečné zapojení fotoreceptorů v řízení propustnosti aniontových kanálů. Na plazmatické membráně hypokotylových buněk *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byly identifikovány kanály řídící přechodnou depolarizaci plazmatické membrány v důsledku působení modrého světla (Cho a Spalding, 1996). Přítomnost světlem aktivovaných aniontových kanálů byla taktéž popsána v buňkách mezofylu *Pisum sativum* L. a bylo navrženo, že právě světlem aktivované kanály by mohly být zodpovědné za depolarizaci, k níž v těchto buňkách dochází (Elzenga and Van Volkenburgh, 1997).

V minulosti byly provedeny experimenty klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. poukazující na důležitost funkčního kryptochromu 1 (CRY1) pro fungování aniontových kanálů (Fellner, dosud nepublikované výsledky). Tato bakalářská práce na předchozí zjištění navazuje studiem klíčení semen fotomorfogenního mutanta *tri¹* stejného rostlinného druhu, vyznačujícího se defektem ve fytochromu B1 (PhyB1). Úloha PhyB1 při klíčení a jeho možné zapojení v regulaci aktivity aniontových kanálů

byly studovány po aplikaci inhibitorů aniontových kanálů (NPPB, NIF, DIDS a SITS) a současně bylo klíčení ovlivněno kvalitou světla (tma, na červené a modré světlo).

Bakalářská práce byla vypracována ve Skupině molekulární fyziologie, Laboratoř růstových regulátorů Univerzity Palackého v Olomouci a Ústav experimentálních botaniky Akademie věd České republiky. Problematika byla řešena v rámci projektu dvoustranné česko-americké spolupráce KONTAKT, podporovaného MŠMT České republiky (č. grantu ME10020; duben 2010-prosinec 2012).

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Fotoreceptory a fotomorfogeneze

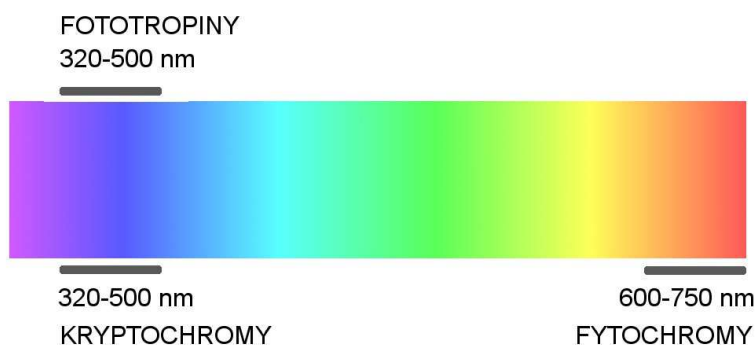
Jelikož jsou rostliny nepohyblivými organizmy, vnímání vnějších podnětů je pro ně nesmírně důležité. Světlo je pro rostliny (společně s dalšími faktory jako jsou okolní teplota, dostupnost vody či koncentrace solí v půdě) jedním z hlavních podnětů vnějšího prostředí a ovlivňuje nejen kvetení, ale také řadu dalších procesů ve vývoji rostlin od klíčení přes asimilaci a prodlužování stonku až po rozvoj listů (Carvalho a kol., 2011). Klíčící rostlinky se tak v závislosti na kvalitě okolního světla vyvíjejí odlišnými procesy. Zatímco na světle dochází k vývoji cestou fotomorfogeneze, ve tmě probíhá skotomorfogeneze či etiolizace (Sullivan a Deng, 2003).

Celé rostlinné orgány stejně jako jednotlivé orgány jsou schopny pohybu v odpovědi na vnější podněty, a to zejména světlo. Kotyledony se ohýbají směrem ke zdroji světla, aby byla zajištěna maximální fotosyntéza v jejich pletivu, zatímco kořeny naopak rostou směrem od zdroje světla. U chloroplastů byl prokázán jejich pohyb směrem ke světlu pro zachycení potřebných fotonů. Avšak při ozáření silným světlem dochází k negativní odpovědi, aby se rostliny vyhnuly poškození chloroplastů silným světlem. U rostlin se proto vyvinuly mechanismy umožňující vnímat nejen intenzitu světla, ale také jeho směr, vlnové délky a samozřejmě dobu ozáření (Carvalho a kol., 2011; Taiz a Zeiger, 2010).

Dopadající světlo je zachycováno několika typy fotoreceptorů (Obrázek 1). Fytochromy se vyznačují maximální absorpcí v červené oblasti spektra, tj. světlo v rozmezí vlnových délek 600-750 nm. K zachycení modrého (400-500 nm) a UV-A záření (320-400 nm) slouží kryptochromy. Modré světlo také vnímají fototropiny, dnes už jsou navíc také známy receptory pro UV-B (290-320 nm) oblast (Carvalho a kol., 2011; Casal a kol., 1998).

Základními komponenty signálních drah řízených světlem jsou fotoreceptory, intermediáty signálních drah přenášející světelný signál na další molekuly a dále pak represory fotomorfogeneze. Zachycení světla fotoreceptorem způsobuje konformační změny molekuly pigmentu vedoucí k ovlivnění interakcí fotoreceptorů s dalšími molekulami (Taiz a Zeiger, 2010). Změny konformace fotoreceptorů také často pozměňují jejich subcelulární lokalizaci, kinázovou aktivitu a v případě PhyA také jeho stabilitu. Konečnou biologickou odpovědí na zachycený světelný signál mohou být

změny v expresi cílových genů a tedy regulace růstu, vývoje a polohy celých rostlinných orgánů. Nezbytnou součástí všech signálních drah je proteolytická degradace jednotlivých signálních komponent či samotných fotoreceptorů (Chen a kol., 2004; Neff a kol., 2000; Quail, 2002; Taiz a Zeiger, 2010).



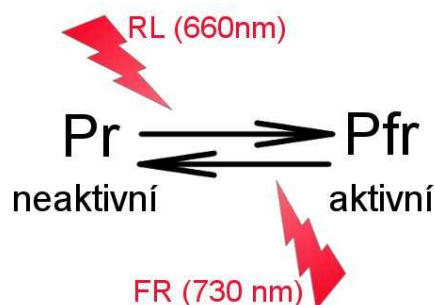
Obrázek 1: Základní typy fotoreceptorů a oblasti vlnových délek, v nichž dochází k absorpci záření. Fototropiny a kryptochromy absorbují záření z modré a UV-A oblasti spektra (320-500 nm) a fytochromy mají absorpční maximum v červené oblasti spektra (600-750 nm). *Upraveno podle Sullivan a Deng, 2003.*

2.1.1 Fytochromy

Nativní fytochromy - holoproteiny - jsou rozpustné proteiny o hmotnosti přibližně 250 kDa, v buňkách běžně přítomné ve formě dimeru. Každá podjednotka se skládá z vlastního pigmentu absorbujícího světlo - chromofor tvořený lineárním tetrapyrrolem - a z polypeptidového řetězce - apoprotein (Kim a kol., 2004; Neff a kol., 2000; Taiz a Zeiger, 2010). Dosud identifikované fytochromy byly rozděleny do dvou skupin: fytochromy typu I (*photo-labile*) podléhající rychlé degradaci po zachycení RL nebo WL a fytochromy typu II (*light-stable*) stabilní i ve své aktivní, Pfr formě (Clough a Vierstra, 1997).

Fytochromy se vyskytují ve dvou vzájemně fotoreverzibilních formách, které mezi sebou přecházejí na základě kvality dopadajícího světla (Obrázek 2). Nově syntetizované proteiny jsou v cytozolu buněk přítomny v inaktivní formě Pr s absorpčním maximem při 660 nm. Pr forma fytochromů je taktéž přítomná v rostlinách pěstovaných ve tmě. V nepřítomnosti světla Pr forma fytochromů inhibuje biologickou odpověď typickou pro ozáření. Děje se tak prostřednictvím fytochromy řízené destabilizace transkripčních faktorů aktivovaných světelnými podněty. Působením červeného světla (RL) pak dochází k přeměně Pr formy na formu Pfr ($\lambda_{\max} = 730 \text{ nm}$) citlivou k dlouhovlnné oblasti červené části spektra (FR) a zároveň je tato forma translokována do jádra buňky. Právě Pfr forma je fyziologicky aktivní

formou fytochromů, a to v jádře stejně jako v cytozolu. V důsledku ozáření krátkovlnným červeným světlem dochází k opětovné fotokonverzi na výchozí Pr formu fytochromu. Za zmínku stojí, že absorpcí fotonů nikdy nedochází k úplné přeměně daného množství na druhou formu fytochromu, ale vždy zůstává určitá část molekul fytochromů, u nichž ke konverzi nedošlo (Appenroth a kol., 2006; Carvalho a kol., 2011; Chen a Chory, 2011; Kendrick and Kronenberg, 1994, cit. Neff a kol., 2000; Paik a kol., 2012; Quail, 1997; Vierstra a Zhang, 2011).



Obrázek 2: Přechod mezi fotoreverzibilními formami fytochromů. Inaktivní forma Pr s absorpčním maximem při 660 nm je schopna přecházet v aktivní formu Pfr. Aktivní forma pak, po ozáření FR, přechází zpět na formu neaktivní.

I přestože jsou fytochromy receptory typickými pro červené světlo, obě formy fytochromů jsou schopné absorbovat vlnové délky také z modré oblasti spektra (400-500 nm), jejichž pohlcení způsobuje přechody fytochromů mezi jejich fotoreverzibilními formami stejně jako při ozáření světlem červeným (Taiz a Zeiger, 2010).

U *Solanum lycopersicum* L. bylo dosud identifikováno pět genů kódujících apoproteiny fytochromů: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* (Pratt a kol., 1997). Oba PhyB *Solanum lycopersicum* L. se odlišují na sobě nezávislou a expresí specifickou pro určitá pletiva. V případě *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je jejich pět fytochromů kódováno geny *PHYA-PHYE*, z nichž je nejhojněji exprimován *PHYB*. PhyB *Solanum lycopersicum* L. jsou ortologní k PhyB či PhyD (jedná se taktéž o typ PhyB) *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. PhyA, PhyE a PhyC/F jsou taktéž ortologní mezi oběma druhy, zatímco PhyB prošly během vývoje obou druhů nezávislou duplikací. Deficience PhyB má za následek řadu fenotypových změn. Semenáčky mutantních rostlin rostoucích při bílém světle (WL) a RL se vyznačují prodlouženými hypokotyly a úbytkem chlorofylu, dospělé rostliny pak dříve kvetou a dochází u nich k výraznějšímu projevu apikální dominance. Obdobné změny fenotypu byly pozorovány i u řady

dalších druhů včetně *Solanum lycopersicum* L. (Pratt a kol., 1995; Whitelam a Devlin, 1997).

Fytochromy vyšších rostlin aktivované světelným signálem vedou ke třem druhům biologických odpovědí. V odpovědi na pulzy RL a ve tmě (D) se spouští *very low fluence response* (VLFR) zprostředkovaná PhyA. V tomto případě je dostačující velmi nízká saturace aktivních Pfr. *Low fluence response* (LFR), taktéž vyvolaná pulzy RL a D, je řízená PhyB a vyznačuje se reverzibilitou vzájemného působení R/FR. Pro odpověď typu LFR je charakteristická její nezávislost na době trvání ozáření, důležité je naopak množství zachycených fotonů. Kromě klíčení řídí LFR celou řadu přechodných procesů, mezi nimi změny toku iontů a cytoplazmatického pohybu (Paik a kol., 2012), pohyby listů, ale také růst stonku či změny genové exprese (Smith a Whitelam, 1997). Jako odpověď na nepřerušované ozáření RL pak byla popsána *high irradiance response* odpovídající na krátkovlnné (*red HIR*) či dlouhovlnné červené světlo (*far-red HIR*), přičemž oba typy HIR jsou závislé na intenzitě působícího světla (Appenroth a kol., 2006; Casal a kol., 1998). Pro rostliny v přírodních podmínkách jsou však fytochromy důležité zejména pro vnímání poměru RL/FR. Poměr krátkovlnného a dlouhovlnného červeného světla tak rostlinám umožňuje rozpoznat jejich zastínění a vnímat změnu světelných podmínek při rozbřesku a za soumraku prostřednictvím tzv. *shade avoidance response* (Neff a kol., 2000; Smith a Whitelam, 1997).

Lokalizace fytochromů

Světlo řídí nejen konformační změny fytochromů, ale také jejich subcelulární lokalizaci. Pokud rostliny rostou ve tmě, PhyA a PhyB jsou lokalizovány v cytoplazmě, avšak po vystavení světelnému signálu dochází k jejich přesunu do jádra (Sakamoto a Nagatani, 1996; Yamaguchi a kol., 1999). Přítomnost fytochromů v jádře je v souladu s jejich předpokládanou funkcí na transkripční úrovni. Vlastní kinetika translokace se však mezi oběma fytochromy liší. Zatímco transport PhyA do jádra je řízen přes VLFR, translokaci PhyB spouští LFR. Je tedy patrné, že se jedná o jeden ze základních mechanismů při přenosu signálu fytochromy (Kircher a kol., 1999).

Fosforylace fytochromů

U *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byla zjištěna schopnost PhyA (jedná se o Ser/Thr kinázu) podléhat autofosforylaci závislé na světle, stejně tak mohou být fytochromy

fosforylovány molekulami dalších fytochromů (Ahmad a kol., 1998). Později byl jako substrát PhyA identifikován PKS1, avšak i jeho fosforylace je vázaná na světlo. Fyziologické experimenty s liniemi overexprimující tento protein dále potvrdily funkci PKS1 jako negativního regulátoru signalizace PhyB. Je tedy pravděpodobné, že přenos signálu od fytochromů je spojen s jejich kinázovou aktivitou regulovanou světlem (Fankhauser a kol., 1999; Kim a kol., 2004; Neff a kol., 2000). Fosforylace navíc moduluje přenášený signál prostřednictvím interakcí fytochromů s dalšími proteiny (např. transkripční faktor PIF3) sloužícími jako možné transduktory signálů. Zatímco fosforylace interakcím zabraňuje, defosforylace má na interakce fytochromů s transduktory signálu účinek opačný (Kim a kol., 2004).

2.1.2 Receptory pro modré světlo

Pro vnímání modrého světla (400-500 nm) jsou u rostlin přítomny, kromě fytochromů, specializované fotoreceptory: kryptochromy a fototropiny. V případě *Solanum lycopersicum* L. jsou hlavními fotoreceptory zachycujícími záření z modré oblasti spektra kryptochrom 1 (CRY1) a právě PhyA. Zatímco CRY1 je aktivován ozářením o vysoké intenzitě (HIR odpověď), PhyA je naopak funkčním v odpovědi na ozářením se slabou intenzitou (LFR reakce). Na zachycení BL se navíc podílejí i oba typy PhyB (Weller a kol., 2001).

2.1.2.1 Kryptochromy

Kryptochromy jsou flavoproteiny vyskytující se jak u rostlin, tak živočichů. Rostlinné kryptochromy jsou 70 až 80kDa proteiny s nápadnou strukturní podobností s DNA fotolýzami, avšak postrádají fotolýzovou aktivitu. Molekuly kryptochromů se skládají ze dvou domén: N-koncové PHR domény sdílející strukturní podobnost s DNA fotolýzami a C-koncové domény. N-koncová doména je vazebným místem pro chromofory kryptochromů, zatímco C-koncová doména je zapojena v translokaci kryptochromů mezi jádrem a cytozolem a v interakcích s jinými proteiny (Lin a Shalitin, 2003; Liu a kol., 2011; Selby a Sancar, 2006).

V případě *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je exprese až 25 % genů ovlivněna právě BL. Regulace signálních drah řízených působením světla je koordinována prostřednictvím metabolických a regulačních drah. Signály vyvolané aktivací kryptochromů však také vedou ke změnám subcelulární lokalizace řady proteinů a

aktivované fytochromy také zprostředkovávají velmi rychlou depolarizaci plazmatické membrány v odpovědi na BL (Ma a kol., 2001; Spalding a Cosgrove, 1988).

V genomu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byly identifikovány čtyři geny kódující kryptochromy: *CRY1*, *CRY2*, *CRY3* a *CRY-DASH*. *CRY-DASH* se od ostatních kryptochromů odlišuje nepřítomností C-terminální domény. N-koncová doména *CRY-DASH* pak umožňuje jeho transport do mitochondrií a chloroplastů (Kleine a kol., 2003). Zatímco *CRY1* a *CRY2* jsou aktivní zejména v jádře, místem fungování *CRY3* jsou pravděpodobně také chloroplasty a mitochondrie (Liu a kol., 2011).

U rajčete *Solanum lycopersicum* L. byly nejprve popsány *CRY1* a *CRY2*, vykazující vyšší míru podobnosti s kryptochromy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. než mezi sebou (Perrotta a kol., 2000). Později však u *Solanum lycopersicum* L. byla identifikována další kopie již objeveného *CRY1* a byla proto pojmenována *CRY1b*. Nezávislá duplikace *CRY1* byla prokázána také v případě ječmene (Perrotta a kol., 2001). Ačkoliv se zdálo, že již byly identifikovány všechny kryptochromy přítomné u *Solanum lycopersicum* L., před několika lety byl i u tohoto druhu nově identifikován fotoreceptor *CRY-DASH*, homologní ke stejnojmennému kryptochromu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *CRY-DASH* je exprimován jak v semenech, tak v dospělých rostlinách. Zároveň je však, alespoň při stimulaci kyselinou abscisovou (ABA), částečně závislý na interakci s *CRY1a* či *CRY2* (Facella a kol., 2006; Facella a kol., 2012).

Kryptochromy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. se uplatňují nejen v regulaci růstu a vývoje rostlin, ale řídí také cirkadiánní rytmy. *CRY1* je zapojen v řízení detiolizace vyvolané BL a stejně tak je v aktivní formě přítomen v dospělých rostlinách pěstovaných při bílém světle (Weller a kol., 2001). *CRY2* pak kontroluje kvetení. Oba zmíněné fotoreceptory jsou dále zapojeny také ve vývoji podpůrných buněk a otvírání stomat, v růstu kořenů, apikální dominanci či v odpovědi na osmotický stres (Lin a Shalitin a kol., 2002; Liu a kol., 2011; Selby a Sancar, 2006; Taiz a Zeiger, 2010). I přestože jsou v odpovědi na ozáření BL zapojeny všechny výše zmíněné typy kryptochromů, jejich jednotlivé formy se uplatňují v různé míře, a to v závislosti na typu biologické odpovědi, na intenzitě ozáření a v neposlední řadě má vliv také přítomnost dalších fotoreceptorů (Weller a kol., 2001).

Lokalizace kryptochromů

Dosud popsané kryptochromy *Solanum lycopersicum* L. jsou exprimovány ve všech pletivech, avšak nejvyšší exprese dosahují v květech rostlin (Perrota a kol, 2001). Na subcelulární úrovni se CRY1 a CRY2 liší svou lokalizací. CRY2 je trvale lokalizován v jádře, avšak subcelulární lokalizace CRY1 je striktně řízena světlem. Po ozáření je CRY1 z jádra transportován do cytoplazmy. Za tmy, v jádře, byla zjištěna schopnost jeho asociace s chromatinem. Lokalizace obou kryptochromů v jádře umožňuje jejich přímou interakci s proteinem COP1 (negativní regulátor fotomorfogeneze) a ovlivňují tak ubiquitinaci substrátových proteinů (Yang a kol., 2001).

Reakce kryptochromů

Aktivace příslušného typu kryptochromu je závislá na kvalitě působícího světla. CRY1 je aktivní na světle s vysokou intenzitou, zatímco při méně intenzivním světle se uplatňuje CRY2 (Ma a kol., 2001).

S ohledem na strukturní podobnost kryptochromů s fotolyázami se předpokládá, že v důsledku zachycení světelného signálu umožňují kryptochromy přenos elektronů z flavinu vlastního kryptochromu na signální molekuly v jeho blízkosti či na jiné proteinové části vlastní molekuly kryptochromu. Tyto elektronové transfery by pak vedly ke konformačním změnám molekul kryptochromů a následným biochemickým modifikacím jakými jsou např. fosforylace či změny interakcí mezi kryptochromy a signálními proteiny (Lin, 2000).

Fosforylace kryptochromů závislá na BL byla potvrzena u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Lin, 2000). U rostlin rostoucích ve tmě nejsou kryptochromy fosforylovány a jsou tedy neaktivní. Avšak po zachycení specifického světelného signálu dochází k jejich fosforylaci. Fosforylace kryptochromů závislá na světle však byla dosud prokázána pouze v *in vitro* podmínkách. V případě CRY1 byla pozorována také jeho schopnost vázat ATP a je tedy možné, že CRY1 je mimo jiné schopen autofosforylace (Bouly a kol., 2003). Právě fosforylace je důležitá pro aktivaci kryptochromů a jejich schopnost přenášet signály na další reakční partnery. Po přenosu signálu jsou kryptochromy nakonec degradovány (Lin, 2000; Shalitin a kol., 2002).

2.1.2.2 Fototropiny

Fototropiny, Ser/Thr kinázy o velikosti přibližně 120 kDa, jsou také citlivé k modrému světlu (Sakamoto a Briggs, 2002). V genomu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byly dosud popsány dva geny kódující fototropiny: *PHOT1* a *PHOT2*. Ve struktuře molekul fototropinů byly identifikovány dvě LOV domény (LOV1 a LOV2) v N-koncové oblasti proteinu, na C-konci je pak přítomná doména kinázová. LOV domény díky asociaci s molekulami flavinmononukleotidu umožňují absorpci záření a právě LOV2 se zejména uplatňuje při autofosforylaci obou fototropinů. Úloha kinázové domény je pak zřejmě spojena s přenosem signálu (Christie a kol., 2002; Kawaga, 2003).

Fototropiny jsou zapojeny ve fototropizmu a inhibici prodlužování hypokotylu či v otvírání stomat a rozvoji listů vyvolanými BL. Odpovědí typickou pro Phot2 je pak jeho úloha v řízení pohybu chloroplastů směrem od zdroje intenzivního záření (Banerjee a Batschauer, 2005; Spalding a Folta, 2005).

Lokalizace fototropinů

Oba fototropiny jsou silně exprimovány v elongačních zónách listů a kořenů - tedy oblastech, kde se předpokládá vysoká citlivost pro dopadající světlo. Většinová frakce obou fototropinů ve tmě asociuje s plazmatickou membránou, zatímco po rozpoznání pulzu BL dochází k translokaci většiny proteinů do cytoplazmy buněk. Bylo zjištěno, že množství Phot1 je down-regulováno BL, avšak podobný mechanismus zatím nebyl popsán v regulaci exprese Phot2 (Kong, 2006; Sakamoto a Briggs, 2002).

Reakce fototropinů

Zapojení konkrétních fotoreceptorů je závislé na době, která uplynula od ozáření a také na intenzitě působícího světla. V počátečních fázích odpovědi na BL se uplatňuje Phot1 a teprve později dochází k aktivaci kryptochromů. Bylo prokázáno, že pro druhou fázi zprostředkovanou kryptochromy jsou nezbytné fototropiny aktivované světlem. U mutantů s chybějícími fototropiny totiž k inhibici docházelo později (Folta a Spalding, 2001b).

Oba fototropiny se také liší intenzitou ozáření potřebného k jejich aktivaci a rychlostí obnovy svých molekul po odeznění působení světla. Phot2 nejenže vyžaduje ke své aktivaci intenzivnější světelný signál, ale také se rychleji obnovuje (Banerjee a

Batschauer, 2005; Kawaga, 2003; Kong a kol., 2006; Sakamoto a Briggs, 2002; Spalding a Folta, 2005). Obdobně jako fytochromy, i fototropiny jsou citlivé k různým intenzitám ozáření, které ovlivňují výslednou odpověď na světelný podnět. Od fytochromů se však odlišují antagonistickým působením odpovědi v ozáření o vysoké intenzitě na odpověď na ozáření s intenzitou nízkou (Spalding a Folta, 2005).

2.1.3 Interakce fotoreceptorů

Ačkoliv každý druh fotoreceptorů je specializován k zachycování odlišných vlnových délek, všechny fotoreceptory nakonec působí na společné oblasti genomu. Do současné doby byla popsána řada komplexních interakcí mezi jednotlivými fotoreceptory. Například kryptochromy a fytochromy společně kontrolují řadu překrývajících se fyziologických odpovědí ve všech fázích rostlinného vývoje. Komplexitu světlem regulovaných signálních drah dokládá i fakt, že v některých případech nemůže konkrétní fotoreceptor přímo kontrolovat danou biologickou odpověď, avšak v přítomnosti dalšího fotoreceptoru funguje jako modulátor odpovědi na světelný podnět. (Ahmad a Cashmore, 1997; Casal a Mazzella, 1998; Janoudi a kol., 1997; Más a kol., 2000).

V *in vitro* podmínkách byla popsána závislost aktivity CRY1 na přítomnosti aktivní Pfr formy PhyA a PhyB (Ahmad a Cashmore, 1997; Ahmad a kol., 1998). Jak již bylo dříve zmíněno, fytochromy absorbují kromě RL také modré světlo (Furuya and Song, 1994; Neff a kol., 2000; Neff a Chory, 1998) a naopak v případě CRY1 byla v *in vitro* podmínkách prokázána jeho fosforylace v závislosti na RL. Fosforylace CRY1 byla zároveň inhibována FR (Ahmad a kol., 1998). Mechanismus synergizmu je založen na aktivaci pozitivních regulátorů signalizace PhyB, a to právě přes kryptochromy. Současně bylo potvrzeno, že aktivace CRY1 vede k zapojení dalších genů kontrolujících aktivitu PhyB. Tytéž geny však nebyly BL v nepřítomnosti CRY1 nijak ovlivněny. Popsaný funkční synergizmus umožňuje přetrvání odpovědi vyvolané kryptochromy i po odeznění aktivačního signálu (Sellaró a kol., 2009). Existence interakcí mezi signálními drahami CRY1 a obou studovaných fytochromů se zdá být možná prostřednictvím společného intermediátu mezi jednotlivými signálními drahami (Neff a Chory, 1998). Díky *in vitro kinase assays* byla také popsána fosforylace CRY1 a CRY2 prostřednictvím fytochromů. Následně byla v *in vivo* podmínkách ověřena závislost fosforylace na RL (Ahmad a kol., 1998).

S PhyB *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. přímo interaguje také CRY2. V tomto případě byl mezi oběma fotoreceptory dokonce pozorován přenos energie, což je důkazem závislosti interakce obou proteinů na světle. Interakce CRY2 s PhyB se zdá být esenciální pro správnou funkci CRY2, což bylo potvrzeno i kolokalizací obou fotoreceptorů v jádře (Más a kol., 2000).

Propojení signální drah modrého a červeného světla bylo opětovně potvrzeno prostřednictvím Ca^{2+} vazebného proteinu SUB1. Tento protein byl identifikován jako komponent signální dráhy kryptochromů, který však zároveň moduluje signální dráhy PhyA. SUB1 se v signálních drahách zřejmě uplatňuje na pozici mezi fotoreceptory a transkripčním faktorem HY5. Jelikož se jedná Ca^{2+} vazebný protein, bylo navrženo, že SUB1 ve fotomorfogenezi reaguje na světlem indukované změny v homeostáze iontů (Guo a kol., 2001).

2.1.4 Úloha COP1 ve fotomorfogenezi

Důležitou součástí světlem řízených signálních drah je protein COP1 (CONstitutively Photomorphogenic 1), který působí jako negativní regulátor fotomorfogeneze. COP1 je na světle převážně cytoplazmatický protein, avšak ve tmě dochází k jeho akumulaci v jádrech, která je nezbytná pro potlačení fotomorfogeneze. Jaderný COP1 přímo interaguje s proteiny stimujícími fotomorfogenezi a fungujícími jako transkripční faktory (např. HY5, HYH, LAF1, HFR1). Tyto proteiny se běžně váží na promotory genů, jejichž exprese podléhá regulaci světlem. Právě interakce COP1 s příslušnými transkripčními faktory je nezbytná pro následnou proteolytickou degradaci HY5 a dalších negativních regulátorů fotomorfogeneze. Působení COP1 na degradaci transkripčních faktorů a změny subcelulární lokalizace COP1 v odpovědi na ozáření, jej činí molekulárním přepínačem mezi fotomorfogenetickým vývojem a etiolizací. Zapojení COP1 bylo zjištěno také v řízení degradace fytochromů. Na molekulární úrovni funguje COP1 jako součást ubiquitin-protein ligázy E3, která umožňuje degradaci substrátu v 26S proteazomu (Deng a ko., 1991; Li a kol., 2011; Ma a kol., 2001; Osterlund a kol., 2000a; Osterlund a kol., 2000b; Subramanian a kol., 2004; Wang a kol., 2001; Yang a kol., 2001). Teprve nedávno bylo zjištěno, že COP1 plní svou funkci v součinnosti s proteinem SPA1, který je negativním regulátorem signální dráhy PhyA a s nímž COP1 tvoří funkční proteinové komplexy (Ma a kol., 2002).

Studiem exprese genů na úrovni genomu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bylo prokázáno, že světlo a COP1 působí na expresi stejných genů (Ma a kol., 2002). Úloha

COP1 byla dosud prokázána v signálních drahách PhyA, PhyB a kryptochromů. Zachycený světelný signál je signální kaskádou přenášen na COP1 a dochází k jeho inaktivaci, která je nezbytná pro vývoj cestou fotomorfogeneze. Společně s redukcí množství COP1 v jádře dochází také k rychlé degradaci *Phytochrome-Interacting Factors* (PIFs) (Li a kol., 2011; Yamamoto a kol., 2001). V případě kryptochromů už víme, že světlem aktivované kryptochromy přímo interagují s COP1 a blokují tak jeho ubiquitin-ligázovou aktivitu. Tak je umožněna akumulace HY5 v jádře a fotomorfogenetický vývoj. Inaktivace COP1 by mohla být možná také prostřednictvím interakcí aktivovaných fytochromů a kryptochromů s komplexy COP1/SPA. Tím by byla umožněna počáteční, velmi rychlá inaktivaci COP1. Dlouhodobé potlačení aktivity COP1 by pak mohlo být umožněno právě úbytkem molekul COP1 v jádře. Oba popsané mechanismy tak umožňují účinnou regulaci vývojových programů a morfologických změn (Li a kol., 2011; Wang a Deng, 2003; Wang a kol., 2001; Yang a kol., 2001).

Několik let po identifikaci COP1 byla u tohoto proteinu poprvé popsána bifunkční odpověď (ve smyslu promotor/represor) na světelné signály (Boccalandro a kol., 2004). U rostlin rostoucích ve tmě, na dlouhovlnném červeném světle a na modrém světle působí COP1 jako represor přenosu světelných signálů, a tedy i fotomorfogeneze. Bylo také zjištěno uplatnění COP1 jako negativního regulátoru signalizace PhyA (Dieterle a kol., 2003; Osterlund a kol., 2000a; Subramanian a kol., 2004). Naopak na krátkovlnném červeném světle by mohl COP1 plnit úlohu v pozitivní regulaci fotomorfogeneze. Tato pozorování vedla k domněnce, že COP1 působí antagonisticky na signální dráhy PhyA a PhyB. To by nasvědčovalo, že COP1 je schopen regulovat výslednou biologickou odpověď v důsledku aktivace každého z obou zmíněných fytochromů a rozlišit tak různě účinné světelné zdroje (Boccalandro a kol., 2004).

2.2 Iontové kanály a ionty v buňkách

Ionty v buňkách

Kationoty jsou na buněčné úrovni nezbytné pro průběh řady základních fyziologických procesů a jejich koncentrace v cytozolu je kompenzována anionty, které mají tedy také funkci regulační a udržují potřebný osmotický tlak. Proti celkovému kladnému náboji působí svou přítomností zejména dusičnany (NO_3^-) a dále fosfáty (PO_4^{3-}), anionty chloridové (Cl^-), síranové (SO_4^{2-}), z organických aniontů jsou pak hojně zastoupeny malát a citrát. V cytozolu musí být neustále udržováno stabilní prostředí, a to navzdory neustálé výměně iontů a metabolitů s vnějším prostředím i mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty - především vakuolou, kde jsou přijaté ionty ukládány. Pro udržení stálosti vnitřního prostředí musejí být proto toky iontů přes membrány striktně regulovány a koordinovány. K tomu, aby nedocházelo k nežádoucímu hromadění nebo naopak úbytku iontů, je důležitá zejména koordinace jejich transportu mezi cytozolem a tonoplastem (Barbier-Brygoo a kol., 2000; Barbier-Brygoo a kol., 2011; Tavares a kol., 2011).

2.2.1 Transport iontů přes membrány

Ionty, které díky svému eklektickému náboji nemohou přes membrány volně difundovat, musejí pro transport využívat membránové transportní proteiny. S ohledem na mechanismus přenosu a jeho energetickou náročnost rozlišujeme tři typy membránových transportních proteinů: pumpy, přenašeče a kanály.

Pumpy slouží k transportu roztoků proti jejich elektrochemickému gradientu za spotřeby ATP a udržují koncentrace vybraných iontů rozdílné uvnitř a vně buňky, stejně jako mezi jednotlivými buněčnými kompartmenty. V případě rostlin se jedná především o H^+ -ATPázovou pumpu a Ca^{2+} -ATPázu (PMCA) prostupující plazmatickou membránou a transportující protony (H^+), respektive Ca^{2+} z buňky (Czempinski a kol., 1999; Pandey a kol., 2007; (Spalding, 2000; Taiz a Zeiger, 2010). Pokud transport iontů přes membránu není kompenzován transportem iontů s opačným nábojem, vzniká na membráně buňky napětí. Neustálou činností H^+ -ATPázové pumpy lokalizované na plazmatické membráně je vytvářen elektrochemický gradient dosahující velikosti -120 až -160 mV. Nerovnoměrná distribuce elektricky nabitých iontů vytváří kromě elektrického potenciálu určené rozdílným nábojem iontů také potenciál závislý na

rozdílných koncentracích iontů na obou stranách membrány. Obě tyto složky vytvářejí membránový elektrochemický potenciál, který je nezbytný pro pasivní transport jinými mechanismy (Sze a kol., 1999; Taiz a Zeiger, 2010).

Transport pomocí přenašečů je spojen s konformačními změnami transportního proteinu. Transportované částice se váží na přenašeč, který prochází změnou konformace a následně uvolňuje přenášené molekuly na druhé straně membrány, přičemž samotný transport může být pasivní či sekundárně aktivní, tj. zpražený s primárním aktivním transportem (Taiz a Zeiger, 2010).

Kanály jsou selektivní k iontům a jejich propustnost je také závislá na lokalizaci kanálů v buňce a funkci, kterou vykonávají. Transport kanály probíhá výhradně po koncentračním spádu přenášených roztoků a nevyžaduje tedy spotřebu energie. Změny elektrochemického potenciálu využívají ke své aktivaci napěťově řízené kanály, zatímco k aktivaci jiných kanálů dochází až po navázání specifického ligandu či zachycením jiného signálu (Pandey a kol., 2007; Spalding, 2000; Taiz a Zeiger, 2010; Tavares a kol., 2011). Iontové kanály mohou být charakterizovány na základě iontové selektivity, vodivosti, kinetiky otevírání a zavírání a také z hlediska závislosti kinetiky na membránovém potenciálu. Další charakteristikou je jejich citlivost k více či méně specifickým inhibitorům (Tavares a kol., 2011). Některé rostlinné iontové kanály, na rozdíl od živočišných, postrádají schopnost velmi rychlé aktivace, na druhou stranu ale mohou zůstat aktivovány po relativně dlouhou dobu. V případě K^+ kanálů svěracích buněk může jejich aktivace trvat i více než 30 minut, čímž je umožněn dlouhodobý transport iontů nezbytný pro osmoticky regulovaný pohyb (Pandey a kol., 2007; Ward a kol., 2009).

2.2.2 Aniontové kanály

Aniontové kanály jsou běžně přítomny na plazmatické membráně a membránách vakuol. Existence napěťově řízených aniontových kanálů byla však popsána také na membránách mitochondrií a chloroplastů, stejně jako na membránách Golgiho aparátu (Tavares a kol., 2011). Aniontové kanály plní klíčovou roli v řadě fyziologických funkcí, například v osmoregulaci, buněčné signalizaci, minerální výživě, kontrole metabolismu a uložení metabolitů do specifických buněčných kompartmentů či v toleranci ke kovům. Transport aniontů přes plazmatickou membránu je také důležitý pro otevírání a zavírání stomat a funkčnost signálních drah, v nichž jsou některé anionty klíčovými komponenty. Dále se transport aniontů podílí na excitaci membrán, regulaci

růstu, tvorbě a udržování elektrochemického gradientu, tropizmech, prodlužování buněk a interakcích s patogeny i symbionty. Úloha aniontových kanálů byla dobře popsána také při klíčení pylové láčky, kdy je důležitý polární růst. Mění se osmolarita je v neposlední řadě důležitá pro pasivní příjem či výdej vody procesem difúze. Změna obsahu vody v buňce se pak promítá do změn v její velikosti, které jsou důležité pro růst, již zmíněné otevírání stomat (Barbier-Brygoo a kol., 2011; Tavares a kol., 2011).

Aktivita rostlinných aniontových kanálů může být přímo či nepřímo regulována řadou efektorů, z nichž nejvýznamnější jsou vápenaté kationty, dále se uplatňují změny pH intracelulárního i extracelulárního prostředí, signalizace zpřažená s G proteiny a přenos signálů prostřednictvím membránových receptorů spojených s těmito kanály (Pei a kol., 1996; Tavares a kol., 2011). Byla popsána depolarizace rostlinných buněk důsledkem působení ABA, auxinů, napadení patogeny, dále také působením fytotoxynů, fytochromu a modrého světla (Ward a kol., 1995).

Membránové kanály mohou být neustále aktivní či k jejich aktivaci může dojít až důsledkem depolarizace či hyperpolarizace membrány, působením světla či mechanického podnětu. Na základě kinetiky a mechanismu, jímž jsou aniontové kanály aktivovány, rozlišujeme (Barbier-Brygoo a kol., 2000; Roberts, 2006; Tavares a kol., 2011):

1. Depolarizací aktivované aniontové kanály

Rostlinné buňky využívají ke generování depolarizace výdej Cl^- z buňky a dále se v tomto procesu uplatňují také Ca^{2+} kanály (Ward a kol., 2009).

- **Depolarizací aktivované aniontové kanály R-typu (*Rapid-type*) a S-typu (*Slow-type*)** transportující ionty z buňky. Oba typy kanálů byly poprvé popsány ve svěřacích buňkách *Vicia faba* L. Kanály S-typu jsou klíčové v počátečních fázích zavírání stomat v odpovědi na ABA, fyziologická úloha R-typu kanálů v tomto procesu zůstává stále nejasná (Barbier-Brygoo a kol., 2011; Siegel a kol., 2009). K aktivaci obou typů kanálů je vyžadována fyziologická hladina cytozolických Ca^{2+} (Pandey a kol., 2007).
- ***Outward-rectifying depolarization-activated anion channels (OR-DAACs)***. I přestože se za fyziologických podmínek uvnitř buněk vytváří záporný náboj, a tedy i nezbytný elektrochemický gradient pro výdej aniontů z buňky, byly

popsány depolarizací aktivované aniontové kanály pro příjem aniontů do buněk. OR-DAACs byly dosud popsány pouze v suspenzích kulturách *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a *Zea mays* L. V kořenových buňkách *Triticum aestivum* L. se předpokládá jejich úloha v transportu Cl^- či NO_3^- , jsou-li koncentrace těchto aniontů v prostředí zvýšené. Obdobně by mohly OR-DAACs fungovat také v buňkách *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Při vysokých extracelulárních koncentracích transportují Cl^- , zatímco při nízkých koncentracích chloridových aniontů přes membránu přecházejí převážně K^+ . V tomto případě by změna selektivity kanálů umožňovala udržení napětí na membráně i při změněných podmínkách prostředí (Roberts, 2006; Tavares a kol., 2011).

2. Hyperpolarizací aktivované aniontové kanály

- **Aniontové kanály aktivované hyperpolarizací (*hyperpolarization-activated anion channels*, HAACs)** zjištěné v membránách řady buněčných typů u několika rostlinných druhů. Kromě kultur suspenzních buněk *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. byla jejich přítomnost potvrzena také v buňkách osemení *Phaseolus vulgaris* L. S diverzitou výskytu HAACs souvisí také rozdíly v selektivitě a podmínkách jejich aktivity. Většina z těchto kanálů je však v různé míře propustná pro Cl^- , setkáváme se však také s kanály v menší míře transportujícími anionty NO_3^- či SO_4^{2-} (Roberts, 2006).

3. Mechanosensitivní aniontové kanály (MS) se pravděpodobně uplatňují v osmoregulaci, jsou-li buňky vystavena osmotickému stresu, a také při růstu buněk. U MS kanálů zůstávajících v otevřeném stavu po dlouho dobu, lze předpokládat zprostředkování mohutných aniontových toků. Pro vnímání změn osmolarity pak pravděpodobně slouží MS kanály rychle přecházející mezi otevřeným a zavřeným stavem (Qi a kol., 2004).

4. Světlem aktivované aniontové kanály citlivé k modrému světlu byly popsány v plazmatické membráně buněk hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Modrým světlem aktivované aniontové kanály těchto buněk způsobují přechodnou depolarizaci plazmatické membrány a hrají klíčovou úlohu v inhibici růstu hypokotylu (Cho a Splading, 1996). Následně

bylo zjištěno, že pravděpodobnost otevření těchto kanálů se zvyšuje při koncentracích cytozolických Ca^{2+} v rozmezí 1-10 $\mu\text{mol/l}$, avšak vápenaté ionty se neuplatňují jako druhý posel (Lewis a kol., 1997). Kanály aktivované bílým světlem byly identifikovány v buňkách mezofylu *Pisum sativum* L. Dopadající světlo zvyšuje pravděpodobnost otevření alespoň některého typu ze všech přítomných aniontových kanálů, pravděpodobně transportujících Cl^- , a následného výdeje aniontů buňkou. Délka světlem indukované přechodné depolarizace plazmatické membrány, která se však vyznačuje vysokou závislostí na cytoplazmatických Ca^{2+} , byla stanovena na 2 až 3 minuty, přičemž výdej aniontů byl také závislý na intenzitě působícího světla (Elzenga a kol., 1995; Elzenga a Van Volkenburgh, 1997).

2.2.3 Vybrané genové rodiny kódující aniontové kanály

SLAC1 (*slow anion channel*) aniontové kanály

Pomalé aniontové kanály, známé také jako kanály S-typu, jsou kódovány genovou rodinou SLAC1 a vyznačují se vysokou afinitou k dusičnanům, zatímco chloridové a další anionty transportují mnohem méně. Pomalá kinetika aktivace a deaktivace těchto kanálů v řádu desítek sekund, jen slabá závislost aktivace na napětí a inaktivace nezávislá na čase jsou dalšími charakteristickými vlastnostmi (Schmidt a Schroeder, 1994; Schroeder a Keller, 1992). S ohledem na jejich trvalou aktivaci byly tyto kanály navrženy jako hlavní mechanismus uplatňující se v depolarizaci, výdeji aniontů a v konečném důsledku poklesu turgoru svěřacích buněk a uzavření stomat (Pandey a kol., 2007; Roelfsema a kol., 2004; Vahisalu a kol., 2008).

ALMT (*aluminum-activated malate transporter*) aniontové kanály

Rodina ALMT kanálů *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. zahrnuje 14 členů, dosud však známe jen funkce tří z nich. ALMT1 je především malátový transportér umožňující pasivní transport aniontů po spádu elektrochemického potenciálu. Ačkoliv je aktivita ALMT zvýšená přítomností extracelulárních Al^{3+} , mohou tyto kanály zprostředkovávat transport aniontů také v nepřítomnosti hliníku. Pro ALMT1 je typická komplexní selektivita pro malát, Cl^- a v menším rozsahu jsou pravděpodobně propustné též pro NO_3^- a SO_4^{2-} (Piñeros a kol., 2008). Přítomnost Al^{3+} stimuluje expresi AtALMT1 (kanál

Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.), kterému je připisován podíl na toleranci k toxicitě hliníku (Hoekenga a kol., 2006).

ALMT9 je součástí tonoplastu, kde se podílí na příjmu malátu do vakuoly a tak na udržování jeho homeostázy v buňkách. Přítomnost ALMT12 byla popsána v plazmatické membráně svěřacích buněk stomat, kde funguje jakou součást iontových toků R-typu charakteristických napětově řízeným tokem iontů a aktivací v řádu milisekund. Kanály R-typu jsou propustné pro většinu běžně se vyskytujících aniontů, především NO_3^- a Cl^- , předpokládá se také významná propustnost pro SO_4^{2-} (Meyer a kol., 2010; Pandey a kol., 2007).

CLC (*chloride channel*) aniontové kanály

V genomu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. bylo dosud popsáno 7 CLC homologů: *AtCLCa* až *AtCLCg*, jimiž kódované kanály se podílejí na transportu Cl^- . Avšak *AtCLCa* se od ostatních CLC kanálů svou funkcí odlišuje. Tento kanál je součástí tonoplastu, kde překvapivě funguje jako NO_3^-/H^+ antiporter a umožňuje akumulaci dusičnanů ve vakuole (De Angeli a kol., 2006; Marmagne a kol., 2007). Součástí membráně vakuoly jsou také *AtCLCb*, *AtCLCc* a *AtCLCg*; součástí vezikul Golgiho aparátu jsou *AtCLCd* a *AtCLCf*; přítomnost *AtCLCe* pak byla potvrzena v thylakoidní membráně chloroplastů (Tavares a kol., 2011; Marmagne a kol., 2007).

2.3 Klíčení

Pro vývoj rostliny je nezbytné rychlé vyklíčení semene za vhodných podmínek, aby se tak klíčící rostlinky co nejučinněji vyvarovaly stresu, jako je například nedostatek vody či kyslíku, sucho, vysoká salinita nebo napadení patogeny. Klíčení semen vyšších rostlin je komplexní proces regulovaný jak endogenními podněty, tak v závislosti na vnějším prostředí. Klíčení je indukováno příjmem vody zralými suchými semeny (imbibice) a v případě dormantních semen jsou také vyžadovány vnější stimulační faktory. Příjem vody semeny probíhá ve třech fázích. Po rychlém počátečním příjmu následuje stabilní fáze a po dokončení klíčení opět dochází k významné hydrataci. Rychlý příjem vody v první fázi je spojen s přestavbou struktury membrán a organel. Hydratace je dále spojena s nárůstem metabolické aktivity a rychlým rozvojem respirace, ačkoliv mitochondrie ještě nejsou plně diferenciovány. Prvním pozorovatelným projevem klíčení je průnik radikuly (kořínku) strukturami obklopujícími embryo, endospermem a testou. Testa nejen omezuje růst embrya mechanicky, ale ovlivňuje také schopnost semene přijímat vodu, vyměňovat plyny s okolím a šířit endogenní inhibitory. Poté, co radikula prorazí osemení, následuje mobilizace zásobních látek spojená s růstem klíčící rostlinky. Až na několik výjimek, je proražení radikuly okamžikem ukončení klíčení a vývoj pokračuje růstem klíčící rostlinky (Appenroth a kol., 2006; Atanassova a kol., 1997; Bewley, 1997; Peng a Harberd, 2002). Pokud však i přes vhodné podmínky okolí semena neklíčí, hovoříme o dormanci. Klíčení může být omezeno účinkem osemení či dormancí samotného embrya. Semena jsou udržována v dormantním stavu účinkem kyseliny abscisové (ABA). K akumulaci ABA dochází už během zrání semen a zabraňuje vyklíčení nezralých semen, zřejmě na úrovni růstu radikuly. Inhibiční účinek ABA může být zvrácen působením gibberelinů (GA) (Bewley, 1997).

Schopnost semen zahájit klíčení je tedy určena rovnováhou mezi hladinami dvou vzájemně antagonistických fytohormonů, gibberelinů a kyseliny abscisové (Kucera a kol., 2005; Seo a kol., 2006). Klíčící semena proto potřebují spolehlivý mechanismus řídící hladiny obou hormonů, a tak rozhodující o počátku klíčení. U semen *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. již bylo prokázáno, že klíčovým faktorem řízení počátku klíčení je světlo. Světelný signál zachycený fytochromy je dále předáván PILP5, proteinu interagujícímu s fytochromy, který funguje jako transkripční faktor genů řídících biosyntézu obou hormonů (Feng a kol., 2008; Oh a kol., 2006). GA jsou esenciální pro

indukci klíčení řady rostlinných druhů. Jejich působení bylo mimo jiné prokázáno při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. a *Nicotiana tabacum* L., kde působí při zeslabování mechanické bariéry ve formě buněk endospermu. U mutanta *ga-1* s deficiencí gibberelinů nedocházelo ke klíčení ani působením RL, které má na klíčení semen obvykle stimulační účinek (Groot a Karssen, 1987; Leubner-Metzger, 2001).

Růst radikuly je proces řízený turgorem a vyžaduje oslabení buněčné stěny buněk nacházejících se mezi kořenovou špičkou a spodní části hypokotylu. Turgorem řízené roztahování buněčné stěny radikuly vyžaduje kontrolované rozrušení sítě xyloglykanu a celulózy, které je umožněné expansiny a xyloglukan endotransglukosylázami/hydrolázami (XTH). Expansiny neenzymaticky rozrušují vodíkové můstky mezi xyloglykany a celulóзовými mikrofibrilami, XTH štípou a opětovně spojují xyloglykanová vlákna a zároveň umožňují začlenění nově syntetizovaných molekul xyloglykanu (Bewley a kol., 1997; Bradford, 1990; Sampedro a Cosgrove, 2005; Vissenberg a kol., 2005). S narušením povrchu semene je spojena částečná enzymatická degradace buněčných stěn obalových vrstev, např. endospermu *Solanum lycopersicum* L. Enzymem řídícím načasování prorůstání radikuly je endo- β -mannáza produkovaná přímo endospermem. Nejedná se však zřejmě o jediný komponent zapojený v tomto procesu, jelikož v klíčících semenech *Solanum lycopersicum* L. byly také identifikovány polygalakturonázy, arabidozidázy a expansiny, taktéž zapojené v modifikacích buněčných stěn (Bewley, 1997). Právě endo- β -mannóza, expansiny LeEXP4, LeEXP8 a LeEXP10 a xyloglukan endotransglukosylázy jsou upregulovány gibberelliny (Peng a Harberd, 2002).

2.3.1 Klíčení a světlo

Světlo je klíčové v regulaci klíčení druhů s malými semeny (např. *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh., *Lactuca sativa* L., *Nicotiana tabacum* L., *Solanum lycopersicum* L.). V této fázi rostlinného vývoje je světlo zachycováno především fytochromy, které tak umožňují semenům vnímat jejich polohu v půdě ve smyslu vzdálenosti od povrchu. Pokud by totiž semena začala klíčit v příliš velké hloubce, jejich omezené zdroje zásobních látek by nebyly dostatečné k dosažení povrchu půdy (Seo a kol., 2009). Semena, jejichž klíčení je indukována světlem, označujeme jako fotoblastická a na molekulární úrovni je aktivace fytochromů důležitá pro indukci syntézy GA při klíčení semen *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Na druhou stranu ale semena *Solanum lycopersicum* L. klíčí po opětovné hydrataci dobře i ve tmě. To je umožněno Pfr formou

fytochromů přítomnou v semenech. Citlivost semen *Solanum lycopersicum* L. ke světlu je zároveň omezena pouze na prvních 3 až 16 hodin od počátku rehydratace semen (Appenroth a kol., 2006; Georghiou a Kendrick, 1991; Sawada a kol., 2008). Pro regulaci vývoje není důležitá pouze kvalita světla, ale také jeho intenzita. U *Lactuca sativa* byla prokázána fotoinhibice působením silného světla (Zhou a kol., 2009).

Vliv červeného světla na klíčení

Červené světlo (600-700 nm) má na klíčení většiny semen stimulační účinek, který však může být lehce zvrácen působením dlouhovlnného červeného světla (FR; 710-740 nm) s účinkem inhibičním. Bylo prokázáno, že tato inhibice je u *Solanum lycopersicum* L. zprostředkována PhyB2. Taktéž působení opakovaných pulsů FR vede k inhibici klíčení, avšak tato reakce je již zprostředkována PhyA (Appenroth a kol., 2006). Působení obou zmíněných oblastí spektra na výslednou biologickou odpověď je tedy navzájem antagonistické a bylo popsáno také při klíčení semen *Lactuca sativa* L. (Sawada a kol., 2008). Z výše uvedeného vyplývá, že RL má stimulační účinek jen, pokud působí krátkodobě, zatímco dlouhodobé vystavení semen RL nebo jeho opakovaným pulsům vede k inhibici klíčení (Appenroth a kol., 2006; Taiz a Zeiger, 2010).

Typickým fenotypovým projevem chromofor-deficientního mutanta *aurea* je jeho rezistence k inhibičnímu účinku FR. Zatímco klíčení nemutovaných semen *Solanum lycopersicum* L. je silně inhibováno působením FR, v případě mutanta *aurea* k inhibici nedochází. Jelikož *aurea* zároveň špatně klíčí ve tmě, lze se domnívat, že fytochromy hrají úlohu také při klíčení ve tmě (Georghiou a Kendrick, 1991).

Zapojení fytochromů v regulaci klíčení bylo studováno zejména u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Jednotlivé fytochromy *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. se vyznačují vysokou mírou redundance, avšak jejich zapojení v regulaci klíčení není zcela totožné: obecně přispívají PhyA a PhyB k regulaci nejvíce, nejmenší podíl na klíčení má pak PhyE. Podíl účinku jednotlivých fytochromů navíc významně závisí na podmínkách prostředí. Tyto výsledky mohou vysvětlovat, proč v případě fytochromů došlo k jejich opakované duplikaci - tedy výhodnost diverzifikace s ohledem na variabilní podmínky prostředí (Heschel a kol., 2008; Shinomura a kol., 1996). Zapojení všech pěti fytochromů ve fotomorfogenezi *Solanum lycopersicum* L., byť v různé míře, dokládají i experimenty s trojnásobným mutantem *PhyA PhyB1 PhyB2*. Ačkoliv tento

mutant postrádá tři z pěti fytochromů, stále prokazuje poměrně silnou odpověď ke zbytkovému FR (Weller a kol., 2000).

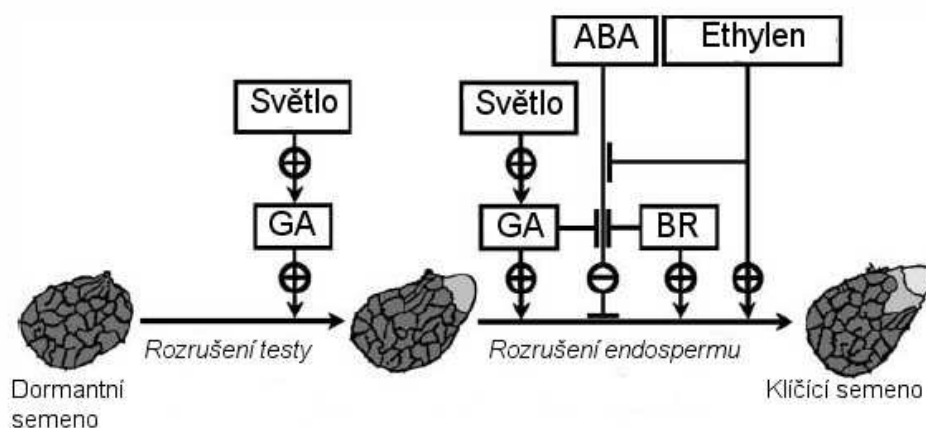
U *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je klíčení z velké části řízeno PhyB, přes LFR odpověď. K indukci klíčení však dochází také přes VLFR a *far-red* HIR zprostředkovanými PhyA. V klíčení je také aktivně zapojen PhyE, a to jak při pulsech FR, tak při klíčení na nepřerušovaném FR. Na nepřerušovaném světle je PhyE důležitý pro indukci klíčení, kdy doplňuje PhyA a může se tak uplatňovat jako doplňkový fotoreceptor při zachycování FR. Překvapivě však PhyE neovlivňuje další z odpovědí řízených PhyA (Henning a kol., 2000)

Modré světlo a klíčení

Ačkoliv v regulaci klíčení jsou zapojeny především fytochromy, tato vývojová fáze může být taktéž ovlivněna působením modrého světla. Inhibice klíčení vlivem BL bylo popsáno u láčkovky *Nepenthes mirabilis* stejně jako u *Solanum lycopersicum* L. (Jala, 2011; Piterková a kol., 2012) a je také alespoň částečně zapojeno v řízení dormance ječmene (Gubler a kol., 2008). Modré světlo u *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a také u *Solanum lycopersicum* L. může navíc zvyšovat inhibici klíčení vyvolanou osmotickým stresem (Fellner a Sawhney, 2002; Reed a kol., 1994).

2.3.2 Světlo a fytohormony společně regulují růst a vývoj

Interakce fytohormonů jsou velice komplexní, jelikož jejich účinek se může sčítat, a stejně tak může být synergický či vzájemně antagonistický. Významnou fyziologickou odpovědí je reciproké působení fytohormonů a světla (Obrázek 3). Bylo prokázáno, že BL zvyšuje citlivost semen *Solanum lycopersicum* L. k ABA (Fellner a Sawhney, 2002) a dnes již také víme, že světlo přímo reguluje biosyntézu aktivních gibberellinů, ethyleny - prokázáno na *Gossypium hirsutum* L. - a kyseliny abscisové. Stejně tak gibberelliny a auxin výrazně ovlivňují expresi genů kódujících kryptochromy a fytochromy *Solanum lycopersicum* L. (Alabadí a kol., 2004; Jasoni a kol., 2001; Nováková a kol., 2005). Na základě provedených experimentů bylo navrženo, že v signální dráze „fytohormony - světlo - fotoreceptory“ hraje důležitou kontrolní úlohu CRY1a. V nepřítomnosti funkčního CRY1a se pak celý systém stává mnohem citlivějším ke změnám v koncentracích fytohormonů (Alabadí a kol., 2004). Zároveň však byla prokázána nižší citlivost k exogenní ABA u mutanta *7B-1* s nadprodukcí endogenní ABA a s defektem v signální dráze BL (Fellner a kol., 2001; Fellner a Sawhney, 2002).



Obrázek 3: Působení světla a fytohormonů na indukci klíčení. Na ukončení dormance a porušení obalových vrstev semen se podílí signální dráha světla a gibberellinů (GA). Světlo a GA se také podílejí na rozrušení endospermu semen a růstu radikuly. Klíčení semen je naopak inhibováno působením ABA. *Upraveno podle Kucera a kol., 2005.*

Vliv světla na biosyntézu gibberellinů a klíčení

Biosyntéza esenciálních GA je spouštěna aktivovanými fytochromy, které regulují expresi enzymů zapojených v biosyntéze GA. Zároveň také fytochromy řídí citlivost

klíčícího semene k těmto fytohormonům. Experimenty s *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. prokázaly zvýšení hladiny bioaktivních forem GA v důsledku působení červeného světla, zatímco FR má opačný účinek (Oh a kol., 2006; Toyomasu a kol., 1998; Seo a kol., 2006). Na molekulární úrovni pak současně dochází ke změnám exprese genů zapojených v metabolismu gibberellinů. Exprese genů esenciálních pro biosyntézu GA (např. enzym GA 3 β -hydroxyláza) je působením RL zvýšena (Toyomasu, 1998; Yamaguchi a kol., 1998), u antagonistických genů však dochází za stejných podmínek k poklesu exprese (Yamauchi, 2007). Dále bylo prokázáno, že v případě *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. je množství přítomné *AtGA3ox2* mRNA specificky regulováno právě PhyB (Yamaguchi a kol., 1998). PhyB jsou mimo jiné s největší pravděpodobností zapojeny také v pozdějších fázích ontogenetického vývoje, kdy regulací citlivosti klíčící rostliny k endogenním GA řídí např. prodloužení hypokotylu (Reed a kol., 1996). Pro regulaci biologických odpovědí vyvolaných světlem vyžadují GA také přítomnost brassinosteroidů. GA stejně jako brassinosteroidy společně potlačují fotomorfogenetický vývoj rostlin ve tmě. Tyto závěry byly získány na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. a také na hrachu (Alabadí a kol., 2004).

V minulosti byly identifikovány faktory signální dráhy gibberellinů s úlohou v regulaci exprese enzymů nezbytných pro mobilizaci zásobních látek semen, avšak teprve nedávno byly popsány faktory RGL1 a RGL2 s funkcí negativních regulátorů signalizace GA. Bylo také navrženo zapojení obou faktorů jako negativních regulátorů klíčení. Faktor RGL2 je potlačován GA a zároveň by klíčení mohl regulovat v závislosti na vnějším prostředí (Lee a kol., 2002; Wen a Chang, 2002).

Působení světla na hladinu endogenní kyseliny abscisové

Vliv světla na hladinu endogenní ABA byl například zjištěn u semen *Lactuca sativa* L. a *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Působením červeného světla dochází rozvoji LFR a jejím prostřednictvím k poklesu množství ABA syntetizované v semenech (Seo a kol., 2006). Obdobě jako v případě regulace metabolismu gibberellinů v klíčícím semeni, červené světlo ovlivňuje expresi řady genů. Zatímco exprese genů zapojených v biosyntéze ABA je působením červeného světla snížena (Seo a kol., 2006), u genů kódujících deaktivaci ABA byl prokázán opačný efekt (Sawada a kol., 2008). Úloha

světla je také důležitá v signalizaci ABA za stresových podmínek, konkrétně osmotického stresu (Piterková a kol., 2012).

3 Cíl práce

Cílem bakalářské práce, navazující na předchozí experimenty provedené ve Skupině molekulární fyziologie, bylo studium zapojení iontových kanálů a fotoreceptorů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L.

V teoretické části práce měly být shromážděny literární zdroje vztahující se k tématu bakalářské práce a seznámení se s řešeným výzkumným projektem, z něhož téma bakalářské práce vychází. Na základě těchto poznatků měla být vypracována literární rešerše k danému tématu.

V experimentální části práce měly být provedeny experimenty klíčení semen v *in vitro* podmínkách, a to po ovlivnění klíčení kvalitou světla a přísadkou inhibitorů.

4 Materiál a metodika

Rostlinný

materiál: rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. cv. GT, LA 4011
rajče jedlé *Solanum lycopersicum* L. *tri*¹ IL In cv. GT, LA 3808

Chemikálie: Murashige and Skoog Basal Salt Mixture (MS), Cat. no. M5524, Sigma-Aldrich
Phyto agar, Cat. no. P1003, Duchefa Biochemie
Sacharosa p. a., Cat. no. 40135-AP0, Lachner
Morpholinoethane sulfonic acid (MES) analytical grade, Cat. no. 29834.04, Serva
SAVO - komerční roztok, BOCHEMIE a. s., Czech Republic
5-nitro-2,3-fenylpropylaminobenzoová kyselina (NPPB), Cat. no. N4779, Sigma-Aldrich
kyselina niflumová (NIF) , Cat. no. N0630, Sigma-Aldrich
kyselina 4-acetamid-4'-isothiokyanstilben-2,2'-disulfonová (SITS), Cat. no. A0554, Sigma-Aldrich
kyselina 4,4'-diisothiokyanstilben-2,2'-disulfonová (DIDS), Cat. no. D3514, Sigma-Aldrich

Pomůcky: Petriho misky plastové, průměr 90 mm
náplast z netkaného textilu, REF: 1320103112, BATIST

Přístroje: laminární box Holten Horizontal Laminar Airflow Clean Bench, Thermo Scientific
růstové komory Snijders Scientific, The Netherlands

Klíčení semen bylo studováno v podmínkách *in vitro* na kultivačním agarovém médiu Murashige-Skoog (MS médium) (Murashige a Skoog, 1962). Klíčení testovaných semen bylo ovlivněno farmakologicky, přidavkem inhibitorů iontových kanálů (NPPB, NIF, SITS, DIDS) exogenního původu a také kvalitou světla (tma, modré a červené světlo).

Rostlinný materiál

Ve všech provedených experimentech byla použita semena fotomorfogenního mutanta *tri*¹ rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L., jehož semena byla laskavě poskytnuta C. M. Rickem, TGC (Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu>). Tento mutant se vyznačuje přítomností mutace ve fytochromu B1 (*PHYB1*), které bylo dosaženo vystavením semen mutagenní látky ethylmethan sulfonátu (van Tuinen a kol., 1995).

Rostliny s touto mutací jsou ve stádiu mladých semenáčků po přesunu z tmavého prostředí na červené světlo přechodně necitlivé k červenému světlu (*temporarily red-light insensitive, tri*). Pokud jsou semenáčky pěstovány v podmínkách dlouhého dne (16 hodin světlo a 8 hodin tma) mutant *tri*¹ se od WT rostlin odlišuje prodlouženým hypokotylem. Tento fenotyp se stává zřetelnějším se stářím rostlin (Lazarova a kol., 1998, van Tuinen a kol., 1995). Ve všech provedených experimentech byla současně s mutantem testována semena standardního genotypu, kterým byl kultivar GT (cv. GT).

Příprava MS média

Pro přípravu 1 l pevného MS média (Murashige a Skoog, 1962) bylo naváženo: 10 g sacharózy, 4,3 g MS média a 0,1952 g MES pufru, dále pak 2,8 g fytoagaru na 400 ml hotového média. Sacharóza, MS médium a MES pufr byly za důkladného míchání na magnetické míchačce rozpuštěny v 1 l destilované vody. Následně bylo pH vzniklého roztoku upraveno na hodnotu 6,1 postupným přidáváním 1M KOH. Připravené médium bylo po 400 ml rozlito do 0,5l sklenic s odpovídajícím množstvím fytoagaru. Takto připravené médium bylo sterilizováno autoklávováním.

Po vychladnutí sterilního média byly sklenice až do doby použití média uchovány v lednici. Před vlastním použitím bylo médium rozehřáto v mikrovlnné troubě. Po zchladnutí na přibližně pokojovou teplotu mohlo být za sterilních podmínek do média pipetováno požadované množství inhibitoru.

Používané koncentrace inhibitorů iontových kanálů

V experimentech byly použity čtyři inhibitory aniontových kanálů (NPPB, NIF, SITS a SIDS) a tolbutamid, inhibitor kationtových kanálů. Každý z těchto inhibitorů byl použit v rozdílných koncentracích. Pro každou z používaných koncentrací bylo připraveno

120 ml MS média, což odpovídalo množství potřebnému pro jeden experiment testující oba genotypy za všech testovaných světelných podmínek (D, BL a RL). Testované koncentrace a pipetovaná množství zásobních roztoků inhibitorů jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1: Koncentrace a odpovídající objemy inhibitorů pro přípravu 120 ml MS média.

Inhibitor	Koncentrace zásobního roztoku [mmol/l]	Testované koncentrace [μ mol/l]	Objem inhibitoru na 120 ml média [μ l]
NPPB	10	20	240
		40	480
		80	960
NIF	10	30	360
		90	1080
		120	1440
SITS	20 (ve 4% DMSO)	10	60
		50	300
		100	600
DIDS	10	10	120
		50	600
		100	1200
		150	1800

Sterilizace a výsev semen

Pro každý pokus bylo potřeba přibližně 400 semen, respektive 500 semen pro experimenty s inhibitorem DIDS, od každého z testovaných genotypů. Potřebné množství semen bylo sterilizováno v plastových 50ml zkumavkách se šroubovaným uzávěrem v 3% roztoku Sava (0,6 l Savo + 0,4 l destilovaná voda) po dobu maximálně 30 minut. V průběhu sterilizace byl obsah zkumavek několikrát protřepán, aby byla zajištěna co nejúčinnější sterilizace. Následně byla semena v laminárním boxu pětkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou, a to pomocí 10ml pipety.

Sterilní semena byla vysazována do Petriho misek s 20 ml MS média obsahujícího požadovanou koncentraci inhibitoru. V každém pokusu pak byly také zařazeny kontrolní Petriho misky obsahující pouze MS médium bez přídavku inhibitoru. V případě experimentů se SITS byly jako kontrola zařazeny misky obsahující 600 μ l 4%DMSO, což odpovídalo obsahu DMSO na miskách s maximální koncentrací inhibitoru SITS.

Vlastní výsev probíhal za sterilních podmínek v laminárním boxu za denního světla či pod bílým světlem. Na každou misku s MS médiem bylo pomocí pinzety (sterilizace v 96% ethanolu a opálením nad plamenem lihového kahanu) vyseto 30-35 semen. Po té byly misky po svém obvodu dvakrát oblepeny textilní páskou BATIST a umístěny vertikálně do růstových komor s příslušnou kvalitou světla. Pro experimenty s modrým světlem byly použity zářivky Philips TLD-36W/18-Blue (Philips, USA; ozáření 10 mol·m⁻²·s⁻¹). Jako zdroj červeného světla byly použity zářivky Philips TLD36W/15-Red (Philips USA; ozáření 10 mol·m⁻²·s⁻¹). Ozáření byla měřena pomocí přenosného spektrometru (model LI-1800; Li-Cor, Lincoln, NE). Petriho misky pro experimenty ve tmě byly před umístěním do komory zabaleny do alobalu. V růstových komorách byla udržována stálá teplota 23 °C.

Hodnocení klíčení

Průběžné klíčení semen bylo sledováno po dobu 10 dnů, a to 3. až 12. den od vysetí, vlastní vyhodnocení probíhalo na bílém světle. Ze tří až pěti opakování daného experimentu pak byly vypočteny průměrné hodnoty počtu vyklíčených semen pro oba testované genotypy. Získané hodnoty byly použity pro vytvoření grafů kinetiky a maximálního klíčení, s uvedením chybových úseček (SE). Pro sestavení grafů i statistické výpočty byl použit program Microsoft Excel 2003.

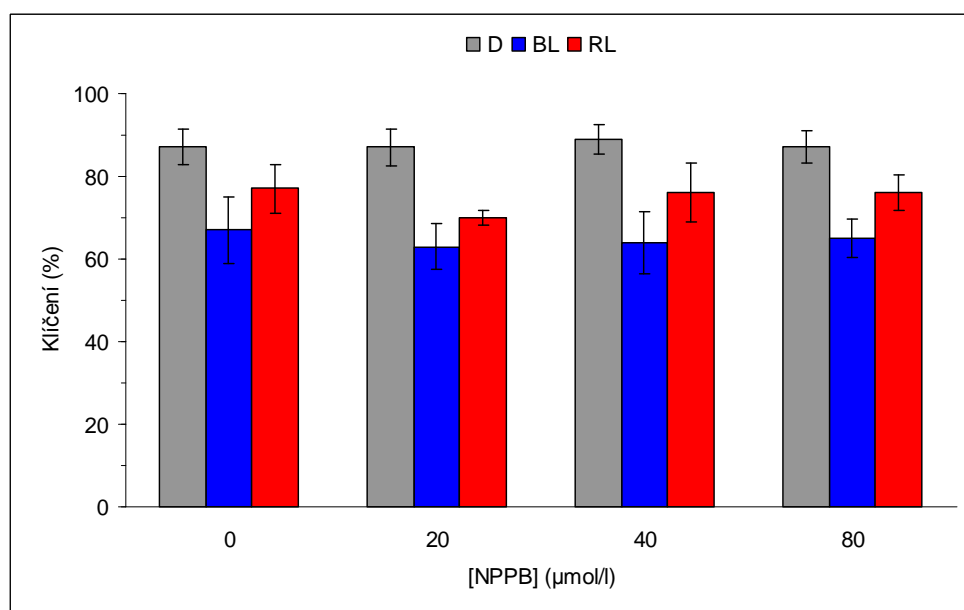
5 Výsledky

Ke zhodnocení úlohy aniontových kanálů a fotoreceptorů při klíčení semen rajčete *Solanum lycopersicum* L. byla sledována kinetika klíčení a maximální klíčení semen v podmínkách *in vitro*. Všechny experimenty byly provedeny dle postupu uvedeného v metodice. Klíčení bylo studováno ve tmě, na modrém a červeném světle a za přítomnosti inhibitorů aniontových kanálů NPPB, NIF, SITS a DIDS.

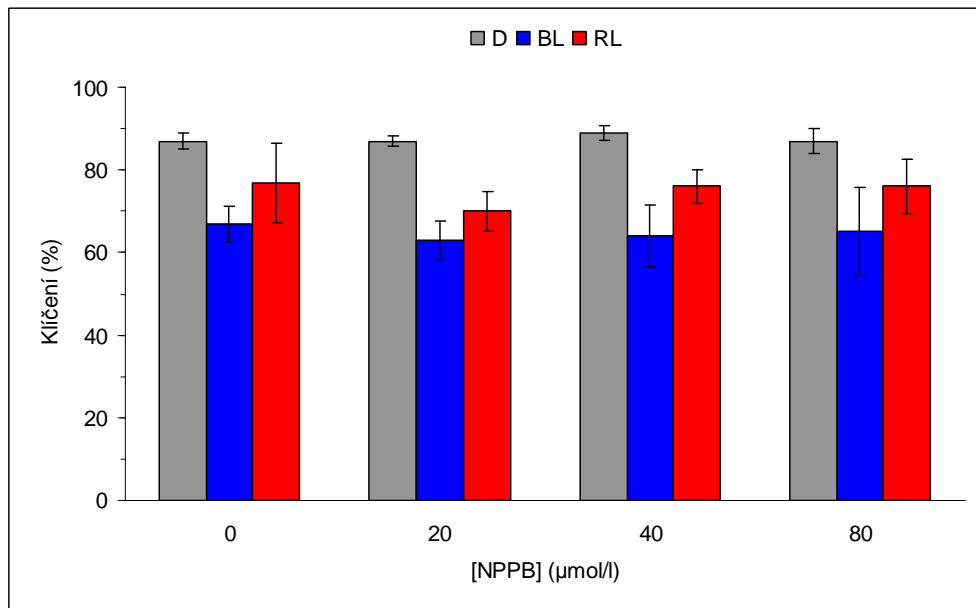
5.1 Vliv inhibitorů aniontových kanálů na klíčení semen

Klíčení ovlivněné inhibitorem NPPB

Dynamika a maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (WT) a fotomorfoenního mutanta *tri*¹ byly ovlivněny přidavkem inhibitoru NPPB v koncentracích 20 $\mu\text{mol/l}$, 40 $\mu\text{mol/l}$ a 80 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s kvalitou světla (D, BL, RL).

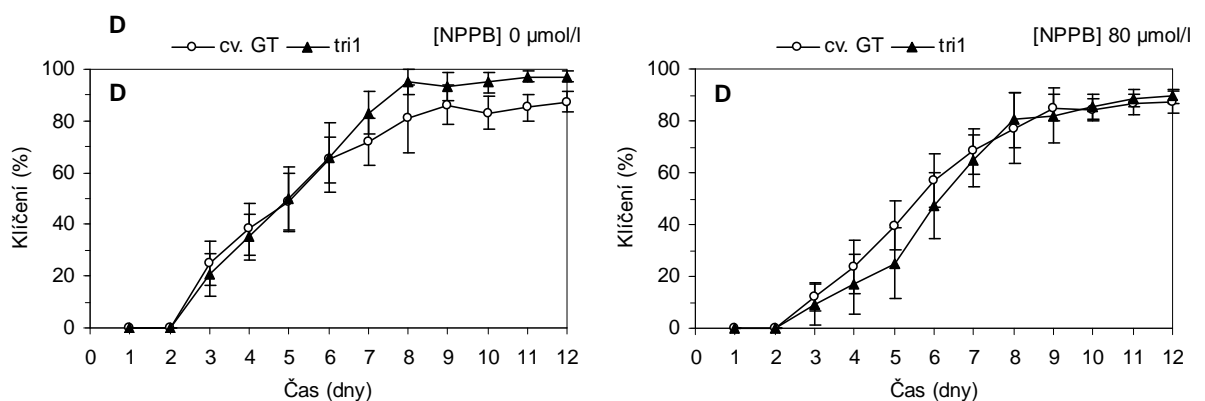


Graf 1: Maximální klíčení *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ovlivněné rostoucí koncentrací NPPB a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po výsevu semen, průměr ze čtyř experimentů a v případě BL z experimentů pěti; 30 až 35 semen v experimentu.



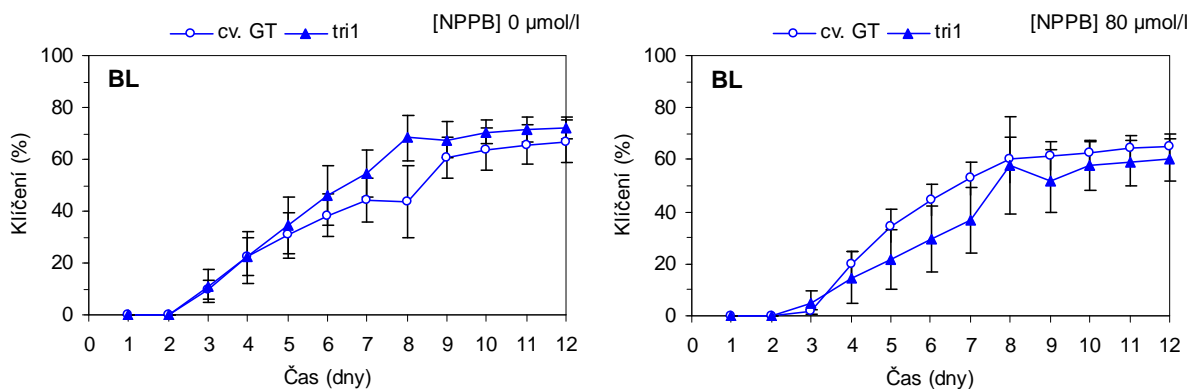
Graf 2: Maximální klíčení fotomorfogenního mutanta *tri*¹ *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné rostoucí koncentrací NPPB a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení ± SE 12. den po výsevu semen, průměr ze čtyř experimentů a v případě BL z experimentů pěti; 30 až 35 semen v experimentu.

Maximální klíčivost semen obou genotypů byla zjištěna ve tmě a nebyl zaznamenán pokles maximálního klíčení ani s rostoucí koncentrací NPPB (Graf 1 a Graf 2). Ve tmě a při nulové koncentraci inhibitoru bylo ve srovnání s WT zaznamenáno mírně zvýšené klíčení semen *tri*¹ v posledních dnech experimentu (Graf 3 vlevo). Při maximální použité koncentraci inhibitoru (80 μmol/l) nebyly zjištěny výrazné změny v kinetice klíčení semen u žádného z použitých genotypů (Graf 3 vpravo).



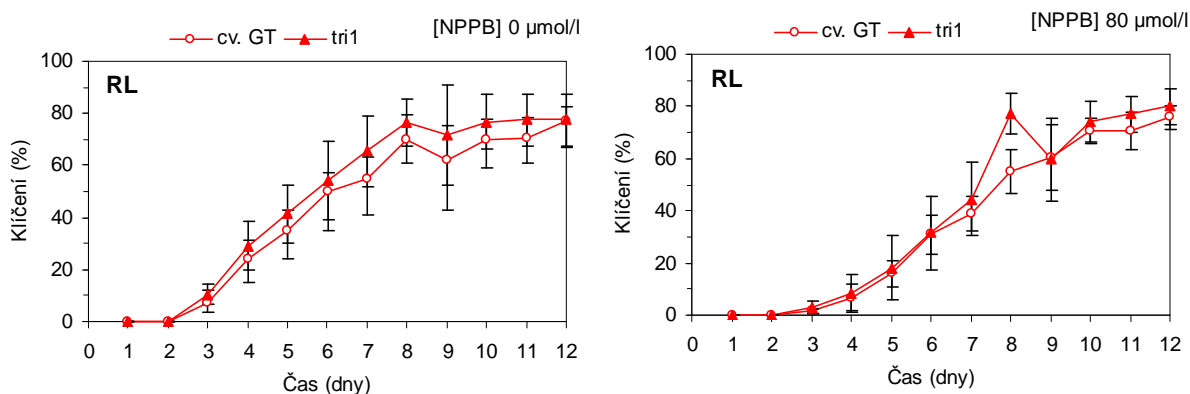
Graf 3: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ ve tmě při koncentraci NPPB 0 μmol/l (vlevo) a 80 μmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Působením modrého světla došlo k významnému poklesu klíčení semen obou genotypů. V rozmezí použitých koncentrací NPPB nebyl pozorován vliv rostoucí koncentrace inhibitoru na pokles maximálního klíčení semen indukovaný modrým světlem (Graf 1 a Graf 2). Podobně, inhibitor NPPB v koncentraci do 80 $\mu\text{mol/l}$ neovlivňoval kinetiku klíčení semen obou genotypů (Graf 4).



Graf 4: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* na BL při koncentraci NPPB 0 $\mu\text{mol/l}$ (vlevo) a 80 $\mu\text{mol/l}$ (vpravo). Průměrné hodnoty \pm SE, průměr z pěti experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

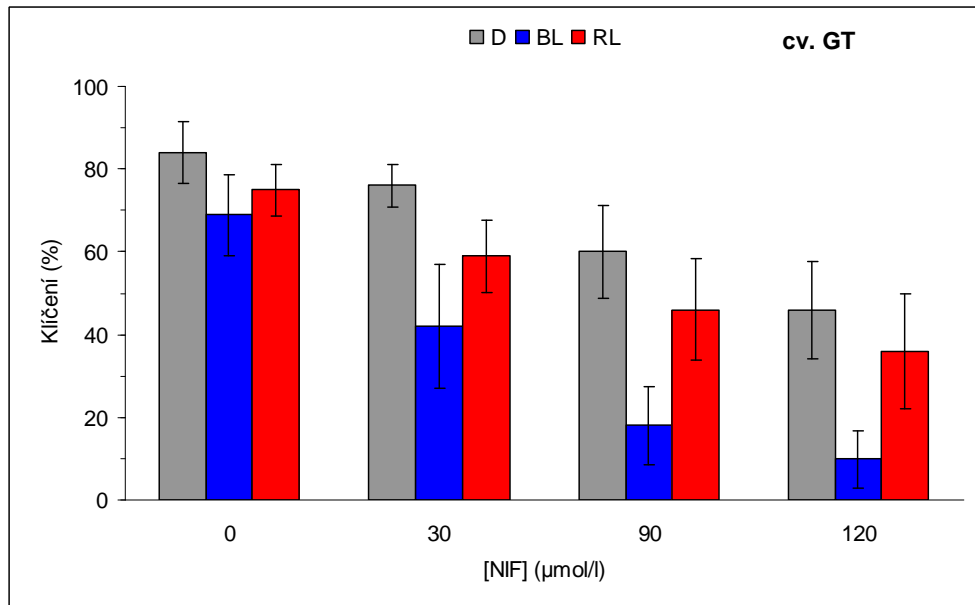
Klíčení semen WT i mutanta *tri1* nebylo červeným světlem ve srovnání s klíčením ve tmě ovlivněno (Graf 1 a Graf 2). Maximální klíčení (Graf 1 a Graf 2) ani jeho kinetika (Graf 5) nebyly aplikací NPPB v koncentraci do 80 $\mu\text{mol/l}$ ovlivněny. Taktéž nebyly zjištěny rozdíly v klíčení mezi semeny WT a mutanta.



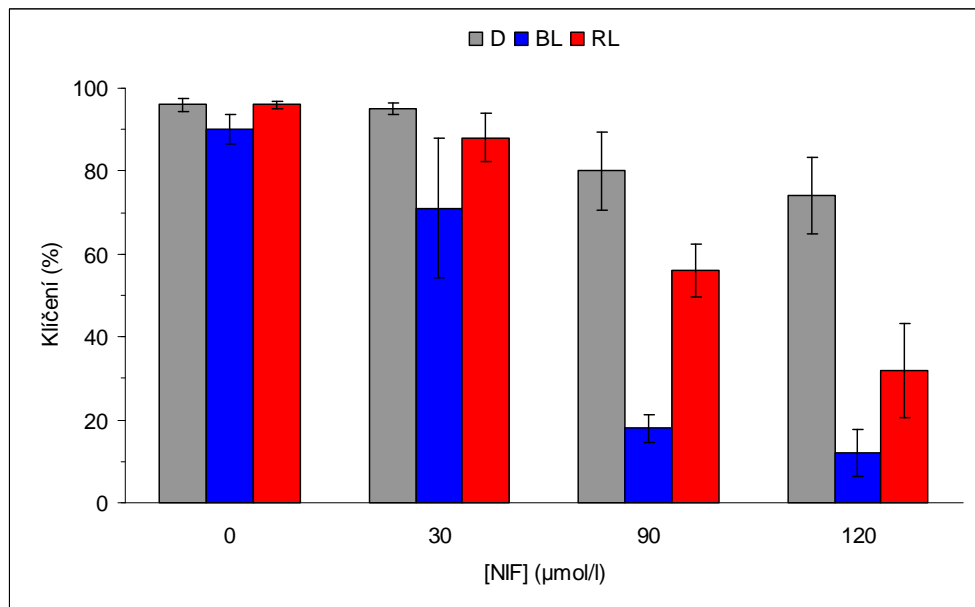
Graf 5: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* na RL při koncentraci NPPB 0 $\mu\text{mol/l}$ (vlevo) a 80 $\mu\text{mol/l}$ (vpravo). Průměrné hodnoty \pm SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semenv experimentu.

Klíčení ovlivněné inhibitorem NIF

Dynamika a maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (WT) a mutanta *tri*¹ byly sníženy přidavkem inhibitoru NIF v koncentracích 30 $\mu\text{mol/l}$, 90 $\mu\text{mol/l}$ a 120 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s kvalitou světla (D, BL, RL).

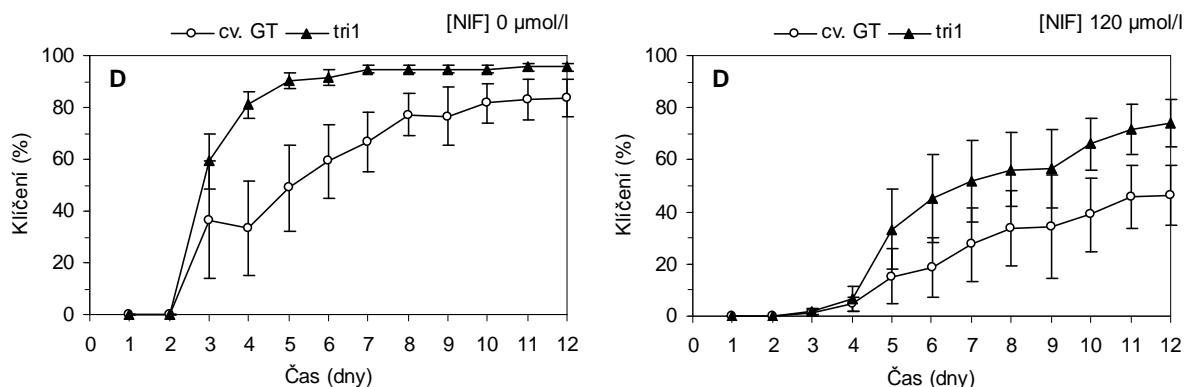


Graf 6: Maximální klíčení *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ovlivněné rostoucí koncentrací NIF a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po vysetí, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.



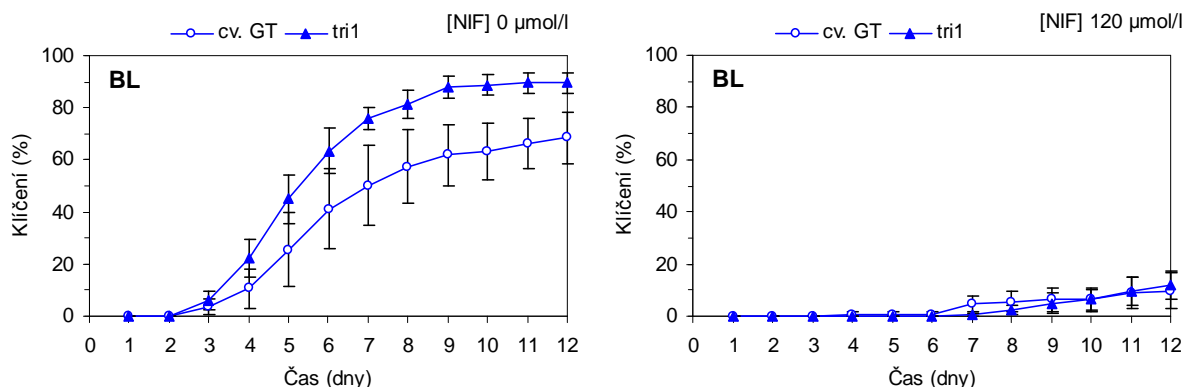
Graf 7: Maximální klíčení fotomorfogenního mutanta *tri*¹ *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné rostoucí koncentrací NIF a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po vysetí, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Klíčení ve tmě a bez aplikace inhibitoru se u mutanta vyznačovalo vyššími hodnotami a rychlejší kinetikou než klíčení semen WT (Graf 8 vlevo). Přídavek inhibitoru NIF výrazně ovlivnil maximální klíčení semen obou genotypů (Graf 6 a Graf 7). Pokles maximálního klíčení byl také doprovázen zpomalením kinetiky klíčení. Popsané změny klíčení se výrazněji projeví u WT než u mutanta *tri1* (Graf 8 vpravo).



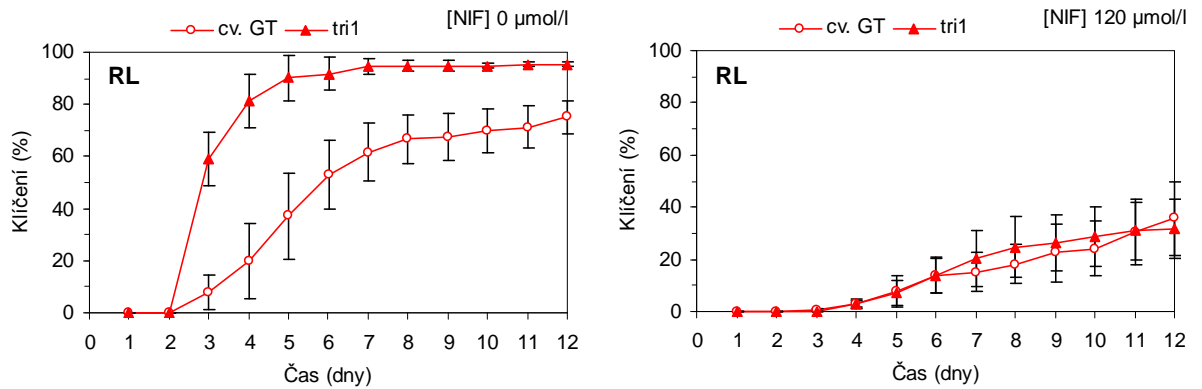
Graf 8: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* ve tmě při koncentraci NIF 0 μmol/l (vlevo) a 120 μmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Na modrém světle a bez přídavku inhibitoru NIF klíčila semena mutanta *tri1* (stejně jako ve tmě) lépe než semena WT (Graf 9 vlevo). Na modrém světle byl inhibiční účinek NIF na klíčení semen významně zesílen a opět vykazoval závislost na koncentraci inhibitoru (Graf 6 a Graf 7). V porovnání s klíčením ve tmě došlo k silné redukci klíčení po aplikaci NIF, a to bez rozdílu mezi oběma genotypy (Graf 9 vpravo).



Graf 9: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* na BL při koncentraci NIF 0 μmol/l (vlevo) a 120 μmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

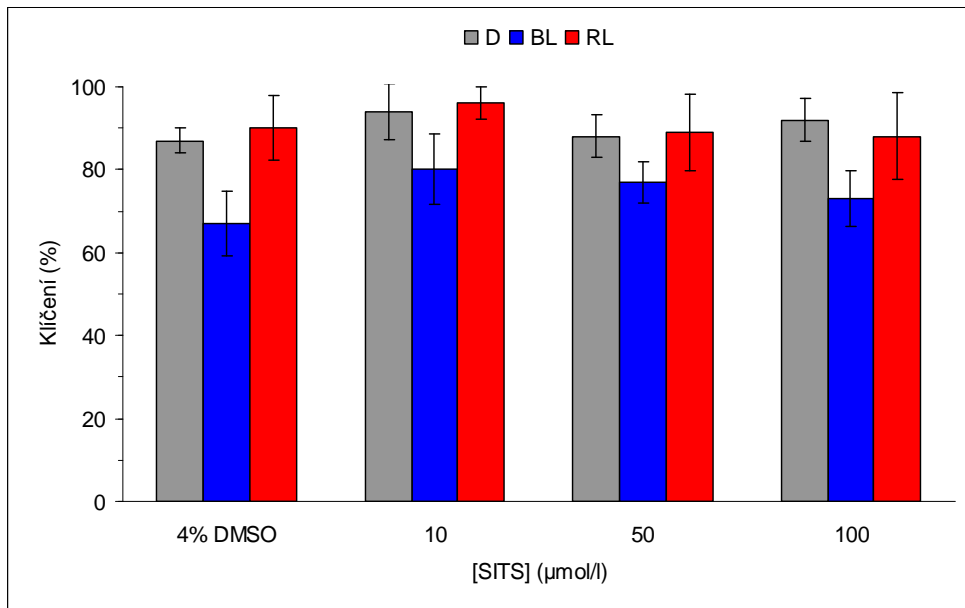
Vliv NIF na klíčení semen byl pozorován také na červeném světle, kdy s rostoucí koncentrací inhibitoru bylo zaznamenáno snížení maximálního klíčení semen obou genotypů (Graf 6 a Graf 7). Pokles maximálního klíčení byl také doprovázen zpomalením kinetiky klíčení (Graf 10).



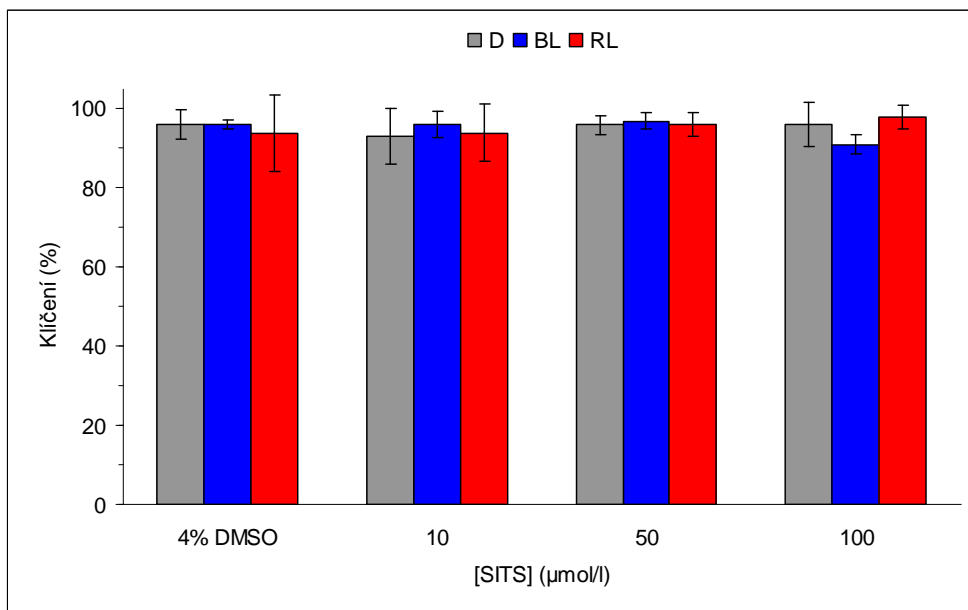
Graf 10: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutantu *tri*¹ na RL při koncentraci NIF 0 µmol/l (vlevo) a 120 µmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Klíčení ovlivněné inhibitorem SITS

Dynamika a maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (WT) a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ nebyly ovlivněny přidavkem inhibitoru SITS v koncentracích 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$ a 100 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s kvalitou světla (D, BL, RL). Jelikož byl inhibitor rozpuštěn ve 4% DMSO, bylo rozpouštědlo zahrnuto také do kontrolních experimentů, a to v množství odpovídající koncentraci při maximální koncentraci SITS, tj. 100 $\mu\text{mol/l}$.

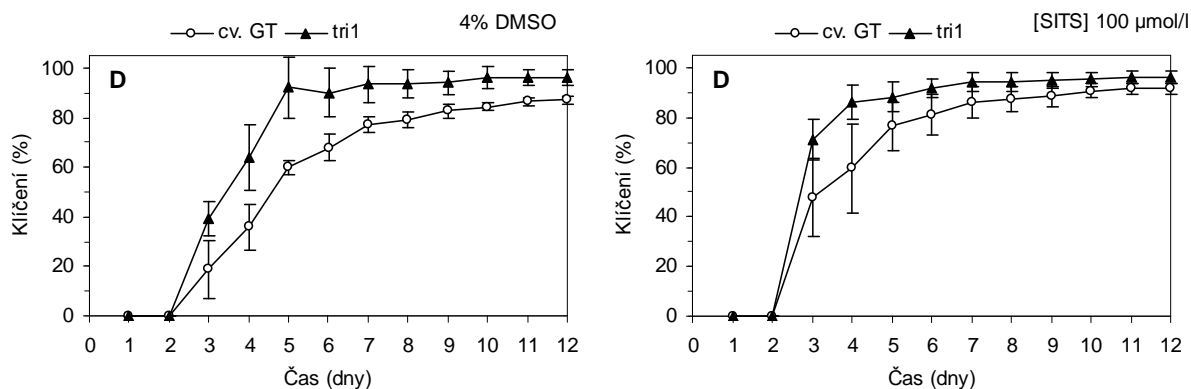


Graf 11: Maximální klíčení *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ovlivněné rostoucí koncentrací SITS a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po vysetí, průměr z pěti experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.



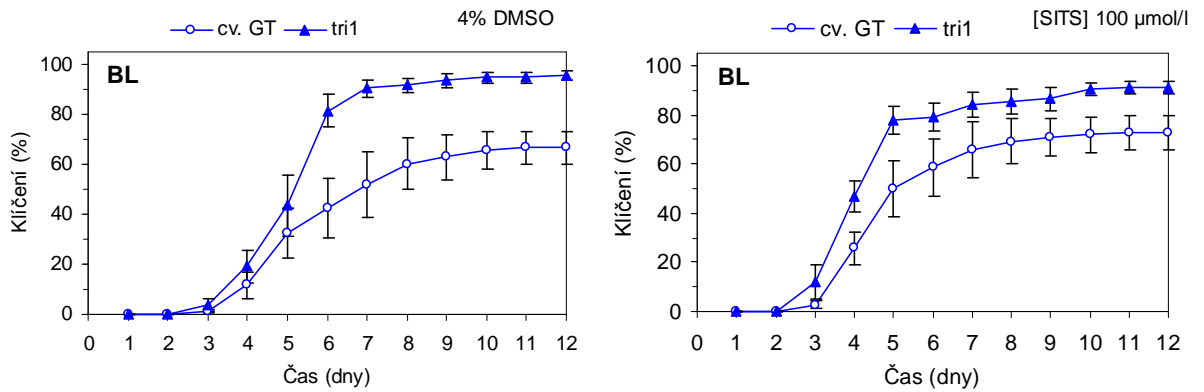
Graf 12: Maximální klíčení fotomorfogenního mutanta *tri*¹ *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné rostoucí koncentrací SITS a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení ± SE 12. den po vysetí, průměr z pěti experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Při klíčení ve tmě neměly použité koncentrace SITS inhibiční účinek na maximální klíčení semen ani u jednoho z použitých genotypů (Graf 11 a Graf 12), stejně tak nebyla ani při nejvyšší koncentraci inhibitoru (100 μmol/l) ovlivněna dynamika klíčení WT ani mutanta (Graf 13).



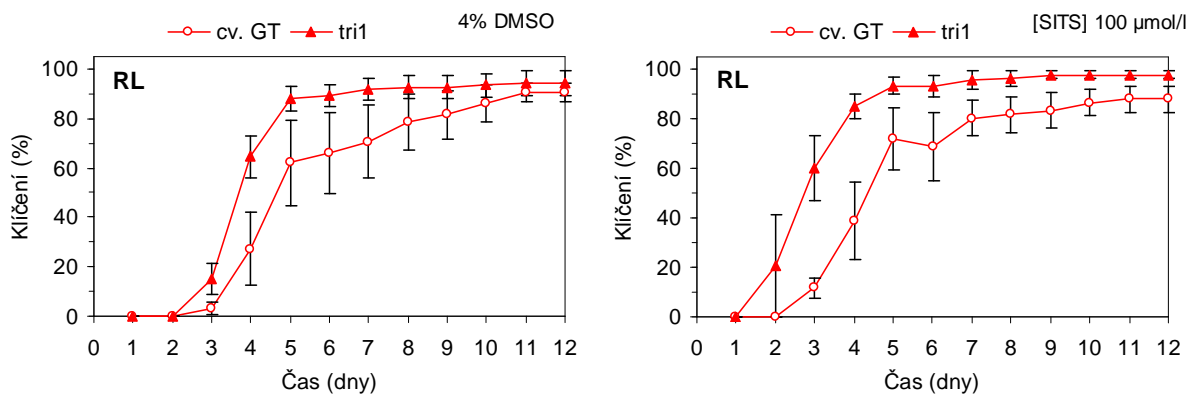
Graf 13: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ ve tmě na médiu obsahujícím 4% DMSO (vlevo) a při koncentraci SITS 100 μmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Na modrém světle byl zaznamenán pokles klíčení semen WT i bez použití inhibitoru, což opětovně potvrdilo inhibiční vliv BL na schopnost semen klíčit (Graf 11 a Graf 14 vlevo). Použití SITS však nevedlo k dalšímu významnému poklesu maximálního klíčení ani jeho kinetiky (Graf 14 vpravo).



Graf 14: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* na BL na médiu obsahujícím 4% DMSO (vlevo) a při koncentraci SITS 100 µmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

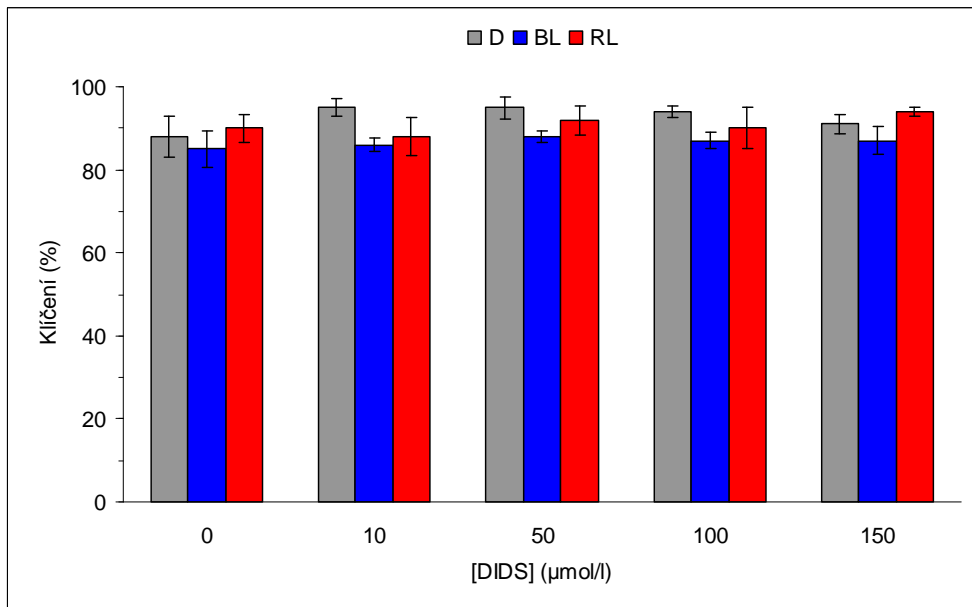
Při klíčení semen na RL neměly použité koncentrace SITS inhibiční účinek na maximální klíčení semen žádného z použitých genotypů (Graf 11 a Graf 12), stejně tak inhibitor v koncentraci 100 µmol/l nepůsobil změny v dynamice klíčení semen WT ani mutanta (Graf 13).



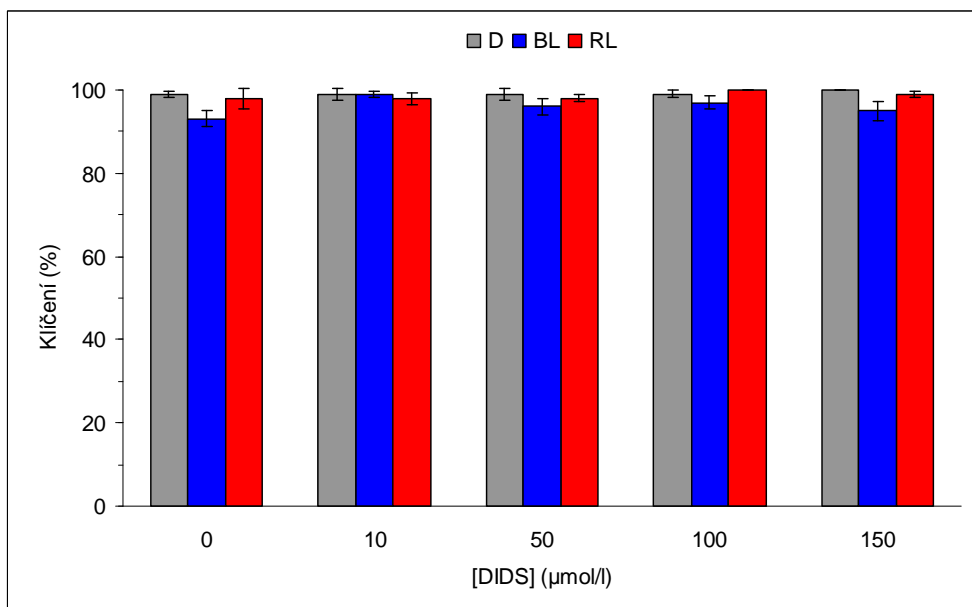
Graf 15: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri1* na RL na médiu obsahujícím 4% DMSO (vlevo) a při koncentraci SITS 100 µmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Klíčení ovlivněné inhibitorem DIDS

Dynamika a maximální klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT (WT) a fotomorfogenního mutantu *tri*¹ nebyly ovlivněny přidavkem inhibitoru DIDS v koncentracích 10 $\mu\text{mol/l}$, 50 $\mu\text{mol/l}$, 100 $\mu\text{mol/l}$ a 150 $\mu\text{mol/l}$ v kombinaci s kvalitou světla (D, BL, RL).

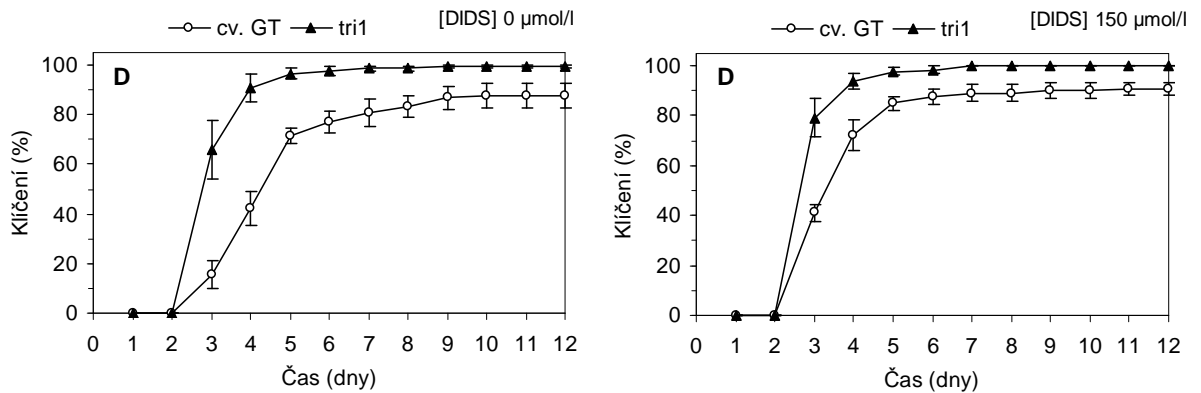


Graf 16: Maximální klíčení *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ovlivněné rostoucí koncentrací DIDS a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po vysetí, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.



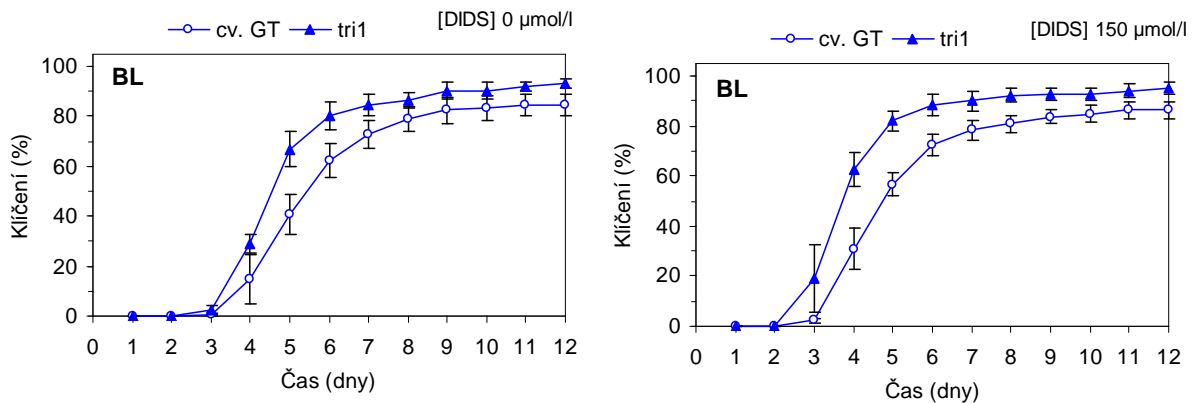
Graf 17: Maximální klíčení fotomorfogenního mutantu *tri*¹ *Solanum lycopersicum* L. ovlivněné rostoucí koncentrací DIDS a kvalitou světla. Průměrné hodnoty klíčení \pm SE 12. den po vysetí, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Ve tmě nebylo klíčení WT ani mutanta v rozsahu použitých koncentrací DIDS výrazně ovlivněno (Graf 16 a Graf 17) a zároveň nebyl patrný ani negativní vliv inhibitoru na kinetiku klíčení (Graf 18).



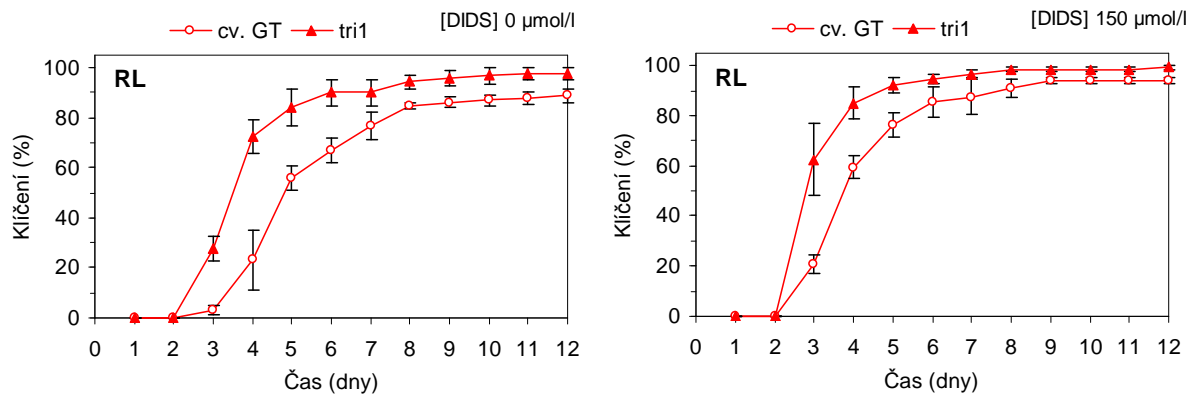
Graf 18: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ ve tmě při koncentraci DIDS 0 µmol/l (vlevo) a 150 µmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Na BL nebyly maximální klíčení (Graf 16 a Graf 17) ani jeho kinetika (Graf 19) přidavkem DIDS v koncentraci do 150 µmol/l ovlivněny.



Graf 19: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ na BL při koncentraci DIDS 0 µmol/l (vlevo) a 150 µmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

Při použitých koncentracích DIDS nebylo na červeném světle ovlivněno maximální klíčení (Graf 16 a Graf 17) ani kinetika klíčení semen WT a mutanta *tri*¹ (Graf 20).

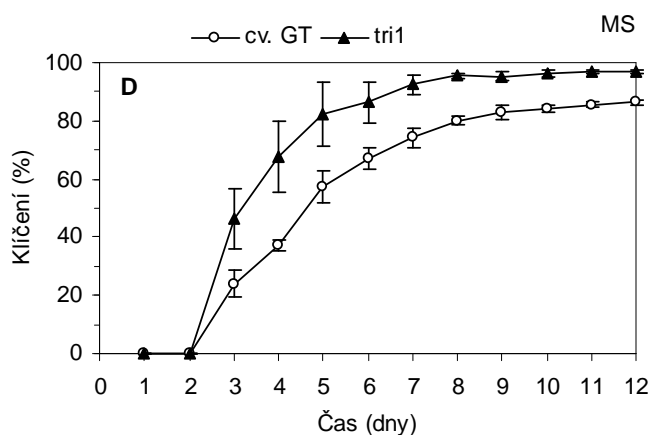


Graf 20: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ na RL při koncentraci DIDS 0 μmol/l (vlevo) a 150 μmol/l (vpravo). Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř experimentů; 30 až 35 semen v experimentu.

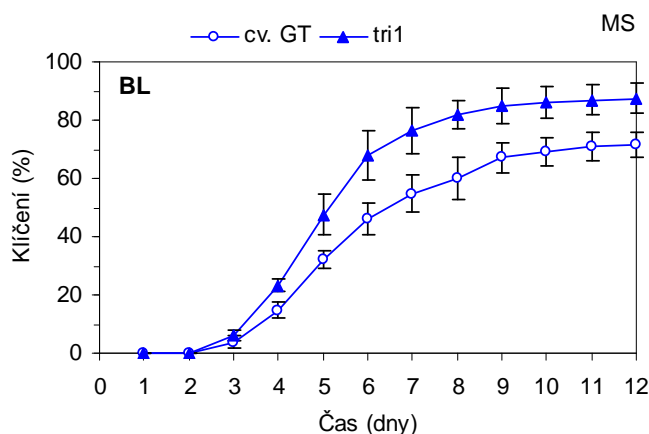
5.2 Vliv kvality světla na klíčení semen

Pro zjištění účinku světla na klíčení semen WT a mutanta *Solanum lycopersicum* L. byla využita data ze čtyř dílčích experimentů klíčení na MS médiu, respektive na médiu se 4% DMSO.

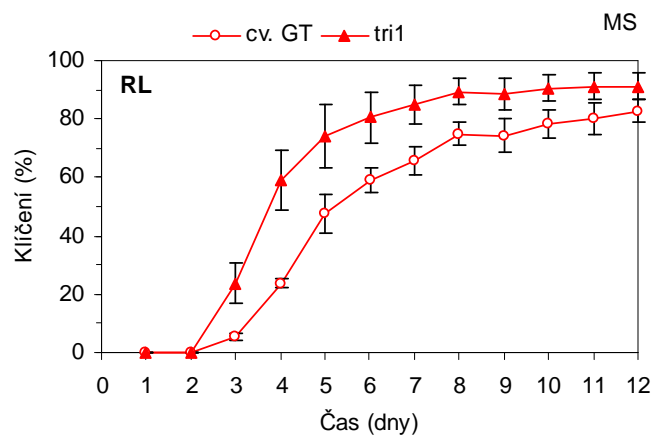
Semena obou genotypů klíčila nejlépe ve tmě (Graf 21) a zároveň bylo zjištěno vyšší klíčení u semen mutanta *tri*¹ než u WT. Na BL došlo k významnému poklesu klíčení semen obou genotypů a zároveň za těchto podmínek klíčila semena mutanta lépe než semena WT (Graf 22). Hodnoty maximálního klíčení i jeho kinetika byly na RL (Graf 23) světle shodné s klíčením zaznamenaným ve tmě. Na RL však nebyl patrný významný rozdíl v maximálním klíčení mezi semeny WT a mutanta.



Graf 21: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ na MS médiu ve tmě. Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř opakování.



Graf 22: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ na MS médiu na BL. Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř opakování.



Graf 23: Dynamika klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a fotomorfogenního mutanta *tri*¹ na MS médiu na RL. Průměrné hodnoty ± SE, průměr ze čtyř opakování.

6 Diskuze

Během všech fází svého vývoje jsou rostliny vystaveny měnícím se podmínkám prostředí. Klíčení je velmi důležitou vývojovou fází a semena jsou proto citlivá k podnětům, které za vhodných podmínek klíčení stimulují. Právě světlo je při vývoji budoucí rostliny mimořádně významným faktorem. Vliv světla byl popsán nejen v regulaci syntézy fytohormonů, ale také v řízení propustnosti aniontových kanálů (Carvalho a kol., 2011; Cho a Spalding, 1996; Neff a kol., 2000). Kryptochromy - avšak pravděpodobně za spolupůsobení fytochromů (Folta a Spalding, 2001a) - jsou zodpovědné za rychlou depolarizaci plazmatické membrány zprostředkovanou aktivací aniontových kanálů (Cho a Spalding, 1996; Folta a Spalding, 2001b).

Předmětem experimentální části bakalářské práce bylo proto studovat zapojení fotoreceptorů a aniontových kanálů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. Za tímto účelem byla využita semena fotomorfogenního mutanta *tri*¹, s mutací ve PhyB1, a zároveň odpovídající nemutovaná semena, tj. cv. GT. Klíčení bylo ovlivněno kvalitou světla (D, BL a RL) a aplikací inhibitorů aniontových kanálů (NPPB, NIF, SITS a DIDS).

Vliv světla na klíčení semen *Solanum lycopersicum* L.

V provedených experimentech semena *Solanum lycopersicum* L. klíčila nejlépe ve tmě a současně bylo mírně zvýšeno maximální klíčení u mutanta *tri*¹ s nefunkčním PhyB1. Na základě těchto výsledků se tedy můžeme domnívat, že by PhyB1 mohl ve tmě působit jako negativní regulátor klíčení. Na RL nebylo klíčení semen mutanta *tri*¹ ve srovnání s klíčením semen cv. GT významně ovlivněno, a to pravděpodobně díky přítomnosti dalších plně funkčních fytochromů. K významnému poklesu klíčení semen obou genotypů však došlo na BL a zároveň bylo klíčení zvýšeno u mutantních semen. V minulosti bylo na příkladu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. poukázáno na - alespoň částečnou - redundanci signálních drah BL a RL (Chory a kol., 1996; Neff a Chory, 1998) a je proto možné, že by se na percepci BL či dalším přenosu signálu kromě fotoreceptorů pro modré světlo mohl podílet právě PhyB1.

Přestože semena rajčete velmi dobře klíčí ve tmě, pro indukci klíčení je nutná přítomnost aktivní Pfr formy fytochromů (Appenroth a kol., 2006; Mancinelli a kol., 1967). Zapojení fytochromů v regulaci klíčení ve tmě bylo popsáno nejen u semen

rajčete *Solanum lycopersicum* L., ale například také u *Cucumis sativus* L. (Mancinelli a Tolkowsky, 1968). Pravděpodobné zapojení fytochromů při klíčení semen ve tmě potvrzuje také zhoršené klíčení semen mutanta *aurea*, vyznačujícího se rozsáhlou ztrátou fytochromů (Georghiou a Kendrick, 1991).

Inhibiční účinek BL na klíčení byl popsán například u spor *Cheilanthes farinosa* (Forssk.) Kaulf., a to pravděpodobně v interferenci se signální drahou fytochromů (Raghavan, 1973). BL také inhibuje klíčení semen *Hordeum vulgare* L. 'Betzes', a to prostřednictvím regulace metabolismu ABA a gibberellinů (Gubler a kol., 2008). Kromě toho bylo poukázáno na udržování semen *Lolium rigidum* Gaud. v dormantním stavu působením BL (Goggin a kol., 2008). Výsledky experimentů provedených v rámci této bakalářské práce pak navrhují zapojení BL také při inhibici klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. Porovnáním klíčení semen mutanta *tri*¹ s klíčením semen WT je navíc patrné, že defekt ve PhyB1 vede k mírně zvýšenému klíčení mutantních semen. Tyto výsledky jsou v souladu s předpokládanou internací receptorů pro BL a RL, tak jak byla popsána mezi aktivními formami PhyA a PhyB s CRY1 (Ahmad a Cashmore, 1997; Ahmad a kol., 1998). Zvýšená schopnost mutantních semen *tri*¹ klíčit na BL by také mohla poukazovat na zapojení PhyB1 v percepci BL, byť ze všech fytochromů je v percepci BL nejvíce zapojen PhyA (Taiz a Zeiger, 2010; Weller a kol., 2001). I přes defekt ve PhyB1 však zůstávají další fotoreceptory plně funkční a především pak receptory pro modré světlo by mohly zprostředkovávat pozorovaný inhibiční účinek BL na klíčení.

Účinek RL na klíčení semen rajčete je závislý na intenzitě světla. Silné záření ($38 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) klíčení inhibuje a naopak světlo o nižší intenzitě ($28 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) má na účinek stimulační. Klíčení je navíc účinněji stimulováno pulzem RL než dlouhodobě působícím RL či opakováním pulzů RL. Klíčení indukované pulzem RL je zřejmě zprostředkováno PhyB2 (Appenroth a kol., 2006). Klíčení semen WT i mutanta *tri*¹ bylo experimentálně ovlivněno RL o intenzitě $10 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a s ohledem na kvalitu světla by tedy bylo možné očekávat stimulaci klíčení semen. Na druhou stranu byla ale semena při klíčení vystavena RL dlouhodobě a tyto podmínky tedy mohly mít na klíčení spíše efekt inhibiční. Při klíčení na RL však nebyl zjištěn rozdíl v maximálním klíčení semen WT a mutanta. Kromě vlastních experimentálních podmínek by vysvětlením mohla být funkční redundance jednotlivých typů fytochromů, popsána u modelové rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Chory a kol., 1996) a účinek PhyB a PhyD na genovou expresi regulovanou RL (Deng a Quail, 1999). U rajčete *Solanum*

lycopersicum L. jsou PhyB1 a PhyB2 redundantní například při tzv. *end-of-day far-red light* odpovědi, kdy při soumraku intenzivněji působí FR (Kendrick a kol., 1997; Neff a kol., 2000) a také při de-etiolizaci klíčnicích rostlin (Weller a kol., 2000).

Zapojení aniontových kanálů při klíčení *Solanum lycopersicum* L.

Dosud nejlépe charakterizovanými kanály jsou R- a S-kanály svěracích buněk *Vicia faba* L. Ačkoliv byla podrobně popsána jejich selektivita k transportovaným iontům a jsou také dobře charakterizovány farmakologicky, nejsou tyto znalosti snadno aplikovatelné na kanály buněk jiných rostlinných orgánů. Tato variabilita v účincích inhibitorů může být způsobena existencí množství aniontových kanálů kontrolujících rozdílné fyziologické funkce a lišících se navzájem svými farmakologickými profily (De Angeli a kol., 2007; Roberts, 2006; Thomine a kol., 1997b).

NPPB-citlivé kanály jsou přítomny v buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh (Cho a Spalding, 1996; Lewis a kol., 1997) a jsou zapojeny v depolarizaci membrány vyvolané BL. Byl navržen mechanismus, při kterém by BL mohlo vést k excitaci kryptochromu CRY1, jejímž výsledkem by byla aktivace příslušných aniontových kanálů plazmatické membrány a následná inhibice prodloužení hypokotylu (Cho a Spalding, 1996, Lewis a kol., 1997; Parks a kol., 1998). Jelikož však aplikace inhibitoru (40 $\mu\text{mol/l}$) nedokázala plně obnovit růst, lze předpokládat zapojení fytochromů - taktéž schopných přenosu BL - při inhibici růstu (Cho a Spalding, 1996). Klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ani mutanta *tri*¹ nebylo aplikací 80 $\mu\text{mol/l}$ NPPB významně ovlivněno ve tmě ani na světle (BL a RL). Neúčinnost NPPB při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. lze vysvětlit tím, že (i) NPPB-citlivé kanály nemusejí být pro indukci a další průběh klíčení důležité. (ii) Stejně tak mohou být tyto kanály v semenech přítomny ve velkém množství, a pak je 80 $\mu\text{mol/l}$ NPPB pro inhibici klíčení nedostačující. NPPB v koncentraci 100 $\mu\text{mol/l}$ například inhiboval pouze 50 % napětově řízených kanálů v buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Thomine a kol., 1997a). (iii) Důležité je však zvážit také možnost, že i pokud by byly NPPB-citlivé kanály v semenech přítomny a dokonce i za daných podmínek významně blokovány, ztráta aktivity NPPB-citlivých kanálů může být účinně nahrazena dalšími plně funkčními aniontovými kanály, necitlivými k tomuto inhibitoru.

I přes určitou nespecifitu (Thomine a kol., 1997b) je NIF velmi účinným inhibitorem aniontových kanálů. Ačkoliv NIF pravděpodobně ovlivňuje uvolňování

Ca^{2+} (Cessna a kol., 1998), při aplikaci na buňky filament *Physcomitrella patens* (Hedw.) Bruch & Schimp. se ukázal být účinným inhibitorem výdeje Cl^- vyvolaného jednak působením RL, a jednak výdeje Cl^- ve tmě. K inhibici depolarizace vyvolané RL docházelo již přidavkem NIF o koncentraci 1 $\mu\text{mol/l}$ (Ermolayeva a kol., 1996; Ermolayeva a kol., 1997). Kromě toho bylo prokázáno inhibiční působení NIF na prodlužování hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Thomine a kol., 1997b). Napětově řízený NIF-senzitivní kanál ($\text{IC}_{50} = 80 \mu\text{mol/l}$) byl lokalizován v membráně epidermálních buněk hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Inhibiční efekt NIF na tento kanál je plně reversibilní a vykazuje závislost na koncentraci inhibitoru. Zároveň byl tento kanál také charakterizován omezenou citlivostí k NPPB (Thomine a kol., 1997a). Ačkoliv bylo klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT významně inhibováno přidavkem NIF, NPPB o koncentraci 80 $\mu\text{mol/l}$ klíčení vůbec neinhiboval (viz výše). V semenech *Solanum lycopersicum* L. jsou tedy přítomny buď odlišné kanály než aniontové kanály popsané v buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. nebo se tyto kanály od aniontových kanálů *Arabidopsis* liší svou citlivostí k NPPB. Výsledky provedených experimentů poukazují na přítomnost NIF-senzitivních aniontových kanálů v semenech *Solanum lycopersicum* L., byť se nemusí jednat o kanály citlivé výhradně k tomuto inhibitoru. Inhibiční účinek NIF na klíčení se projevil u obou genotypů a v různé míře za všech testovaných světelných podmínek. Vliv NIF na inhibici klíčení byl výrazně zesílen BL. Vysvětlením může být (i) působení BL na změnu exprese příslušných aniontových kanálů či (ii) zvýšení citlivosti NIF-citlivých kanálů k inhibitoru vlivem BL. Semena mutanta *tri*¹ navíc nevykazovala zvýšenou rezistenci k účinku NIF a můžeme proto předpokládat, že mechanismus inhibičního působení NIF na BL se děje nezávisle na PhyB1. Nejpravděpodobnějšími kandidáty zapojenými v popsané inhibici jsou receptory pro modré světlo, případně lze uvažovat zapojení jiných typů fytochromů. Zajímavým zjištěním je pokles klíčení semen obou genotypů, ke kterému došlo použitím nejvyšších koncentrací NIF (90 a 120 $\mu\text{mol/l}$) ve tmě. Je tedy patrné, že došlo k ovlivnění také neaktivního poolu fotoreceptorů, a sice bez významných rozdílů mezi oběma genotypy. Z podobnosti klíčení semen WT a mutanta ve tmě lze usuzovat na funkční redundanci PhyB1 a dalších typů fytochromů, jak již bylo navrženo dříve (Deng a Quail, 1999; Chory a kol., 1996).

SITS je inhibitorem R-typu aniontových kanálů řídících především transport Cl^- . Přítomnost SITS-citlivých kanálů byla kupříkladu potvrzena v mezofylových buňkách

listů *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Při koncentraci 500 $\mu\text{mol/l}$ způsobuje SITS redukci počtu funkčních SITS-senzitivních kanálů, aniž by však současně byla ovlivněna také propustnost kanálů, které zůstaly i po aplikaci inhibitoru aktivní (Elzenga a Van Volkenburgh, 1997). Experimenty, jejichž cílem bylo zjistit účinek SITS v koncentraci do 100 $\mu\text{mol/l}$, nepotvrdily vliv inhibitoru při této koncentraci na klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT. Pokud jsou v semenech SITS-kanály přítomny a hrají-li při klíčení důležitou roli, pak je pravděpodobné, že 100 $\mu\text{mol/l}$ SITS není účinný v inhibici takového rozsahu, která by jakkoliv klíčení ovlivnila.

DIDS má inhibiční vliv například na kanál TSAC1 (*tobacco suspension anion channel*), R-typ aniontový kanál svěřacích buněk. Pro 50% inhibici TSAC1 je dostačující DIDS v koncentraci 50 $\mu\text{mol/l}$ (Zimmermann a kol., 1998). Dále byla přítomnost DIDS-inhibovatelných kanálů potvrzena v plazmatické membráně svěřacích buněk *Vicia faba* L. (Schroeder a kol., 1993), kořenových buňkách *Triticum aestivum* L. (Skerrett a Tyerman, 1994) a buňkách hypokotylu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. V případě buněk hypokotylu se jedná o kanál S-typu, kdy 80% ireverzibilní inhibice bylo dosaženo aplikací 100 $\mu\text{mol/l}$ DIDS. Zároveň bylo poukázáno na to, že v buňkách hypokotylu DIDS úspěšně inhibuje pouze kanály S-typu, zatímco na R-kanály je neúčinný (Frachisse a kol., 2000). DIDS v koncentracích do 150 $\mu\text{mol/l}$ neovlivňoval klíčení semen *Solanum lycopersicum* L. cv. GT ani mutanta *tri*¹ a nepodařilo se prokázat ani jeho účinnost v kombinaci s BL či RL. Klíčení nebylo inhibitorem DIDS ovlivněno v důsledku (i) nedostatečné koncentrace inhibitoru, (ii) nepřítomnosti DIDS-senzitivních kanálů v semenech rajčete *Solanum lycopersicum* L. či proto, že (iii) DIDS-senzitivní kanály nejsou pro správný průběh klíčení esenciální.

Vzhledem k předpokládané komplexnosti světelných signálních drah a drah světlem přímo či nepřímo regulovaných, by pro hlubší porozumění úlohy aniontových kanálů a fotoreceptorů při klíčení semen bylo vhodné provést experimenty využívající mutanty v odlišných fotoreceptorech. S ohledem na redundanci jednotlivých fytochromů by nepochybně bylo přínosné i studium klíčení vícenásobných mutantů. Ke stanovení přítomnosti jiných než NIF-senzitivních aniontových kanálů a jejich úlohy při klíčení by mohlo posloužit také zhodnocení vlivu v této práci neúčinných inhibitorů (NPPB, DIDS a SITS) ve vyšších koncentracích.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo studium úlohy iontových kanálů a fotoreceptorů při klíčení semen *Solanum lycopersicum* L., a sice fotomorfogenního mutanta *tri*¹ a standardního genotypu cv. GT. K posouzení vlivu aniontových kanálů a fotoreceptorů při klíčení byla hodnocena kinetika klíčení a maximální klíčení semen v podmínkách *in vitro*. Průběh klíčení byl ovlivněn jednak kvalitou světla (tma, modré a červené světlo), a jednak přidavkem inhibitorů aniontových kanálů (NPPB v koncentracích do 80 $\mu\text{mol/l}$, NIF v koncentracích do 120 $\mu\text{mol/l}$, SITS v koncentracích do 100 $\mu\text{mol/l}$ a DIDS v koncentracích do 150 $\mu\text{mol/l}$).

Bylo zjištěno, že semena obou genotypů klíčí nejlépe ve tmě a na červeném světle, zatímco světlo modré má na klíčení semen obou genotypů inhibiční účinek. Dále byly při klíčení semen ve tmě a na modrém světle zaznamenány vyšší hodnoty maximálního klíčení semen mutanta *tri*¹ než v případě semen cv. GT. Na červeném světle pak nebyly zjištěny významné rozdíly v maximálním klíčení semen cv. GT a *tri*¹, klíčení semen mutanta se pouze vyznačovalo mírně zrychlenou kinetikou.

Z testovaných inhibitorů aniontových kanálů (NPPB, NIF, SITS a DIDS) byl, při použitých koncentracích, zjištěn inhibiční účinek pouze v případě inhibitoru NIF. Zajímavá zjištění pak poskytlo studium klíčení ovlivněné inhibitorem NIF na modrém světle. Inhibiční působení NIF bylo totiž významně zesíleno právě vlivem modrého světla. Byly proto navrženy dvě hypotézy, které by mohly tyto reakce semen vysvětlit: (i) modré světlo může vést ke snížení exprese NIF-senzitivních kanálů v semenech či (ii) působením modrého světla může být zvýšena citlivost NIF-senzitivních kanálů semen k inhibitoru. Jelikož se inhibiční účinek NIF projevil u obou testovaných genotypů, lze se domnívat, že zvýšená citlivost kanálů k NIF a/nebo jejich exprese není závislá na funkčním fytochromu B1.

8 Literatura

- Ahmad M; Cashmore AR.** 1997. The blue-light receptor cryptochrome 1 shows functional dependence on phytochrome A or phytochrome B in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **11**, 421–427.
- Ahmad M; Jarillo JA; Smirnova O; Cashmore AR.** 1998. The CRY1 Blue Light Photoreceptor of *Arabidopsis* Interacts with Phytochrome A In Vitro. *Molecular Cell* **1**, 939–948.
- Alabadí D; Gil J; Blázquez MA; García-Martínez JL.** 2004. Gibberellins Repress Photomorphogenesis in Darkness. *Plant Physiology* **134**, 1050–1057.
- De Angeli A; Monachello D; Ephritikhine G; Frachisse J-M; Thomine S; Gambale F; Barbier-Brygoo H.** 2006. The nitrate/proton antiporter AtCLCa mediates nitrate accumulation in plant vacuoles. *Nature* **442**, 939–942.
- De Angeli A; Thomine S; Frachisse J-M; Ephritikhine G; Gambale F; Barbier-Brygoo H.** 2007. Anion channels and transporters in plant cell membranes. *FEBS Letter* **581**, 2367–2374.
- Appenroth KJ; Lenk G; Goldau L; Sharma R.** 2006. Tomato seed germination: regulation of different response modes by phytochrome B2 and phytochrome A. *Plant, Cell & Environment* **29**, 701–709.
- Atanassova B; Shtereva L; Molle E.** 1997. Effect of three anthocyaninless genes on germination in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) I. Seed germination under optimal conditions. *Euphytica* **95**, 89–98.
- Banerjee R; Batschauer A.** 2005. Plant blue-light receptors. *Planta* **220**, 498–502.
- Barbier-Brygoo H; De Angeli A; Filleur S; Frachisse J-M; Gambale F; Thomine S; Wege S.** 2011. Anion Channels/Transporters in Plants: From Molecular Bases to Regulatory Networks. *Annual Review of Plant Biology* **62**, 25–51.
- Barbier-Brygoo H; Vinauger M; Colcombet J; Ephritikhine G; Frachisse J-M; Maurel C.** 2000. Anion channels in higher plants: functional characterization, molecular structure and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta* **1465**, 199–218.
- Bewley JD.** 1997. Seed Germination and Dormancy. *The Plant Cell* **9**, 1055–1066.
- Boccalandro HE; Rossi MC; Saijo Y; Deng X-W; Casal JJ.** 2004. Promotion of photomorphogenesis by COP1. *Plant Molecular Biology* **56**, 905–915.
- Bouly JP; Giovani B; Djamei A; Mueller M; Zeugner A; Dudkin EA; Batschauer A; Ahmad M.** 2003. Novel ATP-binding and autophosphorylation activity associated with *Arabidopsis* and human cryptochrome-1. *European Journal of Biochemistry* **270**, 2921–2928.
- Bradford KJ.** 1990. A Water Relations Analysis of Seed Germination Rates. *Plant Physiology* **94**, 840–849.
- Carvalho RF; Takaki M; Azevedo RA.** 2011. Plant pigments: the many faces of light perception. *Acta Physiologiae Plantarum* **33**, 241–248.
- Casal JJ; Mazzella MA.** 1998. Conditional Synergism between Cryptochrome 1 and Phytochrome B is Shown by the Analysis of *phyA*, *phyB*, and *hy4* Simple, Double, and Triple Mutants in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **118**, 19–25.

- Casal JJ; Sánchez RA; Botto JF.** 1998. Modes of action of phytochromes. *Journal of Experimental Botany* **49**, 127–138.
- Cessna SG; Chandra S; Low PS.** 1998. Hypo-osmotic Shock of Tobacco Cells Stimulates Ca²⁺ Fluxes Deriving First from External and then Internal Ca²⁺ Stores. *The Journal of Biological Chemistry* **273**, 27286–27291.
- Clough RC; Vierstra RD.** 1997. Phytochrome degradation. *Plant, Cell & Environment* **20**, 713–721.
- Czempinski K; Gaedeke N; Zimmermann S; Müller-Röber B.** 1999. Molecular mechanisms and regulation of plant ion channels. *Journal of Experimental Botany* **50**, 955–966.
- Deng X-W; Caspar T; Quail PH.** 1991. *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **5**, 1172–1182.
- Dieterle M; Büche C; Schäfer E; Kretsch T.** 2003. Characterization of a Novel Non-Constitutive Photomorphogenic *cop1* Allele. *Plant Physiology* **133**, 1557–1564.
- Elzenga JTM; Prins HBA; Van Volkenburgh E.** 1995. Light-induced membrane potential changes of epidermal and mesophyll cells in growing leaves of *Pisum sativum*. *Planta* **197**, 127–134.
- Elzenga JTM; Van Volkenburgh E.** 1997. Characterization of a Light-Controlled Anion Channel in the Plasma Membrane of Mesophyll Cells of Pea. *Plant Physiology* **113**, 1419–1426.
- Ermolayeva E; Hohmeyer H; Johannes Eva; Sanders D.** 1996. Calcium-dependent membrane depolarisation activated by phytochrome in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **199**, 352–358.
- Ermolayeva E; Sanders D; Johannes E.** 1997. Ionic mechanism and role of phytochrome-mediated membrane depolarisation in caulonemal side branch initial formation in the moss *Physcomitrella patens*. *Planta* **201**, 109–118.
- Facella P; Daddiego L; Giuliano G; Perrotta G.** 2012. Gibberellin and Auxin Influence the Diurnal Transcription Pattern of Photoreceptor Genes via CRY1a in Tomato. *PloS ONE* **7**, e30121. DOI: 10.1371/journal.pone.0030121.
- Facella P; Lopez L; Chiappetta A; Bitonti MB; Giuliano G; Perrotta G.** 2006. *CRY-DASH* gene expression is under the control of the circadian clock machinery in tomato. *FEBS Letters* **580**, 4618–4624.
- Fankhauser C; Yeh KC; Lagarias JC; Zhang H; Elich TD; Chory J.** 1999. PKS1, a Substrate Phosphorylated by Phytochrome That Modulates Light Signaling in *Arabidopsis*. *Science* **284**, 1539–1541.
- Fellner M; Sawhney VK.** 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; Zhang R; Pharis RP; Sawhney VK.** 2001. Reduced de-etiolation of hypocotyl growth in a tomato mutant is associated with hypersensitivity to, and high endogenous levels of, abscisic acid. *Journal of Experimental Botany* **52**, 725–738.
- Feng S; Martinez C; Gusmaroli G; Wang Y; Zhou J; Wang F; Chen L; Yu L; Iglesias-Pedraz JM; Kircher S; Schäfer E; Fu X; Fan L-M; Deng XW.** 2008. Coordinated regulation of *Arabidopsis thaliana* development by light and gibberellins. *Nature* **451**, 475–479.
- Folta KM; Spalding EP.** 2001a. Unexpected roles for cryptochrome 2 and phototropin revealed by high-resolution analysis of blue light-mediated hypocotyl growth inhibition. *The Plant Journal* **26**, 471–478.

- Folta KM; Spalding EP.** 2001b. Opposing roles of phytochrome A and phytochrome B in early cryptochrome-mediated growth inhibition. *The Plant Journal* **28**, 333–340.
- Frachisse JM; Colcombet J; Guern J; Barbier-Brygoo H.** 2000. Characterization of a nitrate-permeable channel able to mediate sustained anion efflux in hypocotyl cells from *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **21**, 361–371.
- Furuya M.** 2004. An Unforeseen Voyage to the World of Phytochromes. *Annual Review of Plant Biology* **55**, 1–21.
- Georghiou K; Kendrick RE.** 1991. The germination characteristics of phytochrome-deficient *aurea* mutant tomato seeds. *Physiologia Plantarum* **82**, 127–133.
- Goggin DE; Steadman KJ; Powles SB.** 2008. Green and blue light photoreceptors are involved in maintenance of dormancy in imbibed annual ryegrass (*Lolium rigidum*) seeds. *The New Phytologist* **180**, 81–89.
- Groot SPC; Karssen CM.** 1987. Gibberellins regulate seed germination in tomato by endosperm weakening: a study with gibberellin-deficient mutants. *Planta* **171**, 525–531.
- Gubler F; Hughes T; Waterhouse P; Jacobsen J.** 2008. Regulation of Dormancy in Barley by Blue Light and After-Ripening: Effects on Abscisic Acid and Gibberellin Metabolism. *Plant Physiology* **147**, 886–896.
- Guo H; Mockler T; Duong H; Lin C.** 2001. SUB1, an Arabidopsis Ca²⁺-Binding Protein Involved in Cryptochrome and Phytochrome Coaction. *Science* **291**, 487–490.
- Hennig L; Buche C; Schafer E.** 2000. Degradation of phytochrome A and the high irradiance response in Arabidopsis: a kinetic analysis. *Plant, Cell & Environment* **23**, 727–734.
- Heschel MS; Butler CM; Barua D; Chiang GCK; Wheeler A; Sharrock RA; Whitelam GC; Donohue K.** 2008. New Roles of Phytochromes during Seed Germination. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 531–540.
- Hoekenga OA; Maron LG; Piñeros MA; Cançado GMA; Shaff J; Kobayashi Y; Ryan PR; Dong B; Delhaize E; Sasaki T; Matsumoto H; Yamamoto Y; Koyama H; Kochian LV.** 2006. *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 9738–9743.
- Chen M; Chory J.** 2011. Phytochrome signaling mechanisms and the control of plant development. *Trends in Cell Biology* **21**, 664–671.
- Chen M; Chory J; Fankhauser C.** 2004. Light Signal Transduction in Higher Plants. *Annual Review of Genetics* **38**, 87–117.
- Cho MH; Spalding EP.** 1996. An anion channel in *Arabidopsis* hypocotyls activated by blue light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8134–8138.
- Chory J; Chatterjee M; Cook RK; Elich T; Fankhauser C; Li J; Nagpal P; Neff M; Pepper A; Poole D; Reed J; Vitart V.** 1996. From seed germination to flowering, light controls plant development via the pigment phytochrome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 12066–12071.
- Christie JM; Swartz TE; Bogomolni RA; Briggs WR.** 2002. Phototropin LOV domains exhibit distinct roles in regulating photoreceptor function. *The Plant Journal* **32**, 205–219.

- Jala A.** 2011. Effects of Different Light Treatments on the Germination of *Nepenthes mirabilis*. International Transaction Journal of Engineering, Management, & Applied Sciences & Technologies **2**, 83–91.
- Janoudi A; Cordon R; Wagner D; Quail P; Poff K.** 1997. Multiple Phytochromes Are Involved in Red-Light-Induced Enhancement of First-Positive Phototropism in *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiology **113**, 975–979.
- Jasoni RL; Cothren JT; Morgan PW; Sohan DE.** 2000. Circadian ethylene production in cotton. Plant Growth Regulation **36**, 127–133.
- Kagawa T.** 2003. The phototropin family as photoreceptors for blue light-induced chloroplast relocation. Journal of Plant Research **116**, 77–82.
- Kendrick RE; Peters JL; Kerckhoffs LH; van Tuinen A; Koornneef M.** 1997. Photomorphogenic mutants of tomato. Plant, Cell & Environment **20**, 746–751.
- Kim JI; Shen Y; Han Y-J; Park J-E; Kirchenbauer D; Soh M-S; Nagy F; Schäfer E; Song P-S.** 2012. Phytochrome Phosphorylation Modulates Light Signaling by Influencing the Protein-Protein Interaction. The Plant Cell **16**, 2629–2640.
- Kircher S; Kozma-Bognar L; Kim L; Adam E; Harter K; Schäfer E; Nagy F.** 1999. Light Quality-Dependent Nuclear Import of the Plant Photoreceptors Phytochrome A and B. The Plant Cell **11**, 1445–1456.
- Kleine T; Lockhart P; Batschauer A.** 2003. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles. The Plant Journal **35**, 93–103.
- Kong S-G; Suzuki T; Tamura K; Mochizuki N; Hara-Nishimura I; Nagatani A.** 2006. Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus. The Plant Journal **45**, 994–1005.
- Kucera B; Cohn MA; Leubner-Metzger G.** 2005. Plant hormone interactions during seed dormancy release and germination. Seed Science Research **15**, 281–307.
- Lazarova GI; Kubota T; Frances S; Peters JL; Hughes MJ; Brandstädter J; Széll M; Matsui M; Kendrick RE; Cordonnier-Pratt MM; Pratt LH.** 1998. Characterization of tomato PHYB1 and identification of molecular defects in four mutant alleles. Plant Molecular Biology **38**, 1137–1146.
- Lee S; Cheng H; King KE; Wang W; He Y; Hussain A; Lo J; Harberd NP; Peng J.** 2002. Gibberellin regulates *Arabidopsis* seed germination via *RGL2*, a *GAI/RGA*-like gene whose expression is up-regulated following imbibition. Genes & Development **16**, 646–658.
- Leubner-Metzger G.** 2001. Brassinosteroids and gibberellins promote tobacco seed germination by distinct pathways. Planta **213**, 758–763.
- Lewis BD; Karlin-Neumann G; Davis RW; Spalding EP.** 1997. Ca²⁺-Activated Anion Channels and Membrane Depolarizations Induced by Blue Light and Cold in *Arabidopsis* Seedlings. Plant Physiology **114**, 1327–1334.
- Li J; Li G; Wang H; Deng XW.** 2011. Phytochrome Signaling Mechanisms. The Arabidopsis Book **9**, e0148. DOI: 10.1199/tab.0148.
- Lin C.** 2000. Plant blue-light receptors. Trends in Plant Science **5**, 337–342.
- Lin C; Shalitin D.** 2003. Cryptochrome Structure and Signal Transduction. Annual Review of Plant Biology **54**, 469–496.

- Liu H; Liu B; Zhao C; Pepper M; Lin C.** 2011. The action mechanisms of plant cryptochromes. *Trends in Plant Science* **16**, 684–691.
- Ma L; Gao Y; Qu L; Chen Z; Li J; Zhao H; Deng XW.** 2002. Genomic Evidence for COP1 as a Repressor of Light-Regulated Gene Expression and Development in Arabidopsis. *The Plant Cell* **14**, 2383–2398.
- Ma L; Li J; Qu L; Hager J; Chen Z; Zhao H; Deng XW.** 2001. Light Control of Arabidopsis Development Entails Coordinated Regulation of Genome Expression and Cellular Pathways. *The Plant Cell* **13**, 2589–2607.
- Mancinelli AL; Tolkowsky A.** 1968. Phytochrome and Seed Germination. V. Changes of Phytochrome Content During the Germination of Cucumber Seeds. *Plant Physiology* **43**, 489–494.
- Mancinelli AL; Yaniv Z; Smith P.** 1967. Phytochrome and Seed Germination. I. Temperature Dependence and Relative P_{FR} Levels in the Germination of Dark-germinating Tomato Seeds. *Plant Physiology* **42**, 333–337.
- Marmagne A; Vinauger-Douard M; Monachello D; de Longevialle AF; Charon C; Allot M; Rappaport F; Wollman FA; Barbier-Brygoo H; Ephritikhine G.** 2007. Two members of the *Arabidopsis* CLC (chloride channel) family, AtCLCe and AtCLCf, are associated with thylakoid and Golgi membranes, respectively. *Journal of Experimental Botany* **58**, 3385–3393.
- Mazzella MA; Magliano TMA; Casal JJ.** 1997. Dual effect of phytochrome A on hypocotyl growth under continuous red light. *Plant, Cell & Environment* **20**, 261–267.
- Meyer S; Mumm P; Imes D; Endler A; Weder B; Al-Rasheid KAS; Geiger D; Marten I; Martinoia E; Hedrich R.** 2010. AtALMT12 represents an R-type anion channel required for stomatal movement in Arabidopsis guard cells. *The Plant Journal* **63**, 1054–1062.
- Más P; Devlin PF; Panda S; Kay SA.** 2000. Functional interaction of phytochrome B and cryptochrome 2. *Nature* **408**, 207–211.
- Murasnige T; Skoog F.** 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Neff MM; Chory J.** 1998. Genetic Interactions between Phytochrome A, Phytochrome B, and Cryptochrome 1 during Arabidopsis development. *Plant Physiology* **118**, 27–36.
- Neff MM; Fankhauser C; Chory J.** 2000. Light: an indicator of time and place. *Genes & Development* **14**, 257–271.
- Nováková M; Motyka V; Dobrev PI; Malbeck J; Gaudinová A; Vanková R.** 2005. Diurnal variation of cytokinin, auxin and abscisic acid levels in tobacco leaves. *Journal of Experimental Botany* **56**, 2877–2883.
- Oh E; Yamaguchi S; Kamiya Y; Bae G; Chung WI; Choi G.** 2006. Light activates the degradation of PIL5 protein to promote seed germination through gibberellin in Arabidopsis. *The Plant Journal* **47**, 124–139.
- Osterlund MT; Hardtke CS; Wei N; Deng XW.** 2000. Targeted destabilization of HY5 during light-regulated development of *Arabidopsis*. *Nature* **405**, 462–466.
- Osterlund MT; Wei N; Deng XW.** 2000. The Roles of Photoreceptor Systems and the COP1-Targeted Destabilization of HY5 in Light Control of Arabidopsis Seedling Development. *Plant Physiology* **124**, 1520152–4.

- Paik I; Yang S; Choi G.** 2012. Phytochrome regulates translation of mRNA in the cytosol. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **109**, 1335–1340.
- Pandey S; Zhang W; Assmann SM.** 2007. Roles of ion channels and transporters in guard cell signal transduction. FEBS Letters **581**, 2325–2336.
- Parks BM; Cho MH; Spalding EP.** 1998. Two Genetically Separable Phases of Growth Inhibition Induced by Blue Light in Arabidopsis Seedlings. Plant Physiology **118**, 609–615.
- Pei ZM; Ward JM; Harper JF; Schroeder JI.** 1996. A novel chloride channel in *Vicia faba* guard cell vacuoles activated by the serine/threonine kinase, CDPK. The EMBO Journal **15**, 6564–6574.
- Peng J; Harberd NP.** 2002. The role of GA-mediated signalling in the control of seed germination. Current Opinion in Plant Biology **5**, 376–381.
- Perrotta G, Ninu L, Flamma F, Weller JL, Kendrick RE, Nebuloso E, Giuliano G.** 2000. Tomato contains homologues of *Arabidopsis* cryptochromes 1 and 2. Plant Molecular Biology **42**, 765–773.
- Piterková Jana; Luhová L; Hofman J; Turečková V; Novák O; Petřivalský M; Fellner M.** 2012. Nitric oxide is involved in light-specific responses of tomato during germination under normal and osmotic stress conditions. Annals of Botany **110**, 767–776.
- Piñeros MA; Cançado GMA; Kochian LV.** 2008. Novel Properties of the Wheat Aluminum Tolerance Organic Acid Transporter (TaALMT1) Revealed by Electrophysiological Characterization in *Xenopus* Oocytes: Functional and Structural Implications. Plant Physiology **147**, 2131–2146.
- Pratt LH; Cordonnier-Pratt MM; Hauser B; Caboche M.** 1995. Tomato contains two differentially expressed genes encoding B-type phytochromes, neither of which can be considered an ortholog of *Arabidopsis* phytochrome B. Planta **197**, 203–206.
- Pratt LH; Cordonnier-Pratt MM; Kelmenson PM; Lazarova GI; Kubota T; Alba RM.** 1997. The phytochrome gene family in tomato (*Solanum lycopersicum* L.). Plant, Cell & Environment **20**, 672–677.
- Qi Z; Kishigami A; Nakagawa Y; Iida H; Sokabe M.** 2004. A Mechanosensitive Anion Channel in *Arabidopsis thaliana* Mesophyll Cells. Plant & Cell Physiology **45**, 1704–1708.
- Quail PH.** 1997. An emerging molecular map of the phytochromes. Plant, Cell & Environment **20**, 657–665.
- Quail PH.** 2002. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? Current Opinion in Cell Biology **14**, 180–188.
- Raghavan V.** 1973. Blue Light Interference in the Phytochrome-controlled Germination of the Spores of *Cheilanthes farinosa*. Plant Physiology **51**, 306–311.
- Reed JW; Foster KR; Morgan PW; Chory J.** 1996. Phytochrome B Affects Responsiveness to Gibberellins in Arabidopsis. Plant Physiology **112**, 337–342.
- Reed JW; Nagatani A; Elich TD; Fagan M; Chory J.** 1994. Phytochrome A and Phytochrome B Have Overlapping but Distinct Functions in *Arabidopsis* Development. Plant Physiology **104**, 1139–1149.
- Roberts SK.** 2006. Plasma membrane anion channels in higher plants and their putative functions in roots. New Phytologist **169**, 647–666.
- Roelfsema MRG; Levchenko V; Hedrich R.** 2004. ABA depolarizes guard cells in intact plants, through a transient activation of R- and S-type anion channels. The Plant Journal **37**, 578–588.

- Sakamoto K; Briggs WR.** 2002. Cellular and Subcellular Localization of Phototropin 1. *The Plant Cell* **14**, 1723–1735.
- Sakamoto K; Nagatani A.** 1996. Nuclear localization activity of phytochrome B. *The Plant Journal* **10**, 859–868.
- Sampedro J; Cosgrove DJ.** 2005. The expansin superfamily. *Genome Biology* **6**, 242.1–242.11.
- Sawada Y; Aoki M; Nakaminami K; Mitsuhashi W; Tatematsu K; Kushiro T; Koshiha T; Kamiya Y; Inoue Y; Nambara E; Toyomasu T.** 2008. Phytochrome- and Gibberellin-Mediated Regulation of Abscisic Acid Metabolism during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiology* **146**, 1386–1396.
- Selby CP; Sancar A.** 2006. A cryptochrome/photolyase class of enzymes with single-stranded DNA-specific photolyase activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 17696–17700.
- Sellaro R; Hoecker U; Yanovsky M; Chory J; Casal JJ.** 2010. Synergistic interactions of red and blue light in the control of Arabidopsis gene expression and development. *Current Biology* **19**, 1216–1220.
- Seo M; Hanada A; Kuwahara A; Endo A; Okamoto M; Yamauchi Y; North H; Marion-Poll A; Sun TP; Koshiha T; Kamiya Y; Yamaguchi S; Nambara E.** 2006. Regulation of hormone metabolism in Arabidopsis seeds: phytochrome regulation of abscisic acid metabolism and abscisic acid regulation of gibberellin metabolism. *The Plant Journal* **48**, 354–366.
- Seo M; Nambara E; Choi G; Yamaguchi S.** 2009. Interaction of light and hormone signals in germinating seeds. *Plant Molecular Biology* **69**, 463–472.
- Shalitin D; Yang H; Mockler TC; Maymon M; Guo H; Whitelam GC; Lin C.** 2002. Regulation of *Arabidopsis* cryptochrome 2 by blue-light-dependent phosphorylation. *Nature* **417**, 763–767.
- Shinomura T; Nagatani A; Hanzawa H; Kubota M; Watanabe M; Furuya M.** 1996. Action spectra for phytochrome A- and B-specific photoinduction of seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8129–8133.
- Schmidt C; Schroeder JI.** 1994. Anion Selectivity of Slow Anion Channels in the Plasma Membrane of Guard Cells. *Plant Physiology* **106**, 383–391.
- Schroeder JI; Keller BU.** 1992. Two types of anion channel currents in guard cells with distinct voltage regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **89**, 5025–5029.
- Schroeder JI; Schmidt C; Sheaffer J.** 1993. Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *The Plant Cell* **5**, 1831–1841.
- Siegel RS; Xue S; Murata Y; Yang Y; Nishimura N; Wang A; Schroeder JI.** 2009. Calcium Elevation- and Attenuated Resting Calcium-dependent Abscisic Acid Induction of Stomatal Closure and Abscisic Acid-Induced Enhancement of Calcium Sensitivities of S-type Anion and K⁺ Channels in *Arabidopsis* guard cells. *Plant Journal* **59**, 207–220.
- Skerrett M; Tyerman SD.** 1994. A channel that allows inwardly directed fluxes of anions in protoplasts derived from wheat roots. *Planta* **192**, 295–305.
- Small JGC; Spruit CJP; Blaauw-Jansen G; Blaauw OH.** 1979. Action Spectra for Light-induced Germination in Dormant Lettuce Seeds. *Planta* **144**, 133–136.

- Smith H; Whitelam GC.** 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell & Environment* **20**, 840–844.
- Spalding EP.** 2000. Ion channels and the transduction of light signals. *Plant, Cell & Environment* **23**, 665–674.
- Spalding EP; Cosgrove DJ.** 1988. Large plasma-membrane depolarization precedes rapid blue-light-induced growth inhibition in cucumber. *Planta* **178**, 407–410.
- Spalding EP; Folta KM.** 2005. Illuminating topics in plant photobiology. *Plant, Cell & Environment* **28**, 39–53.
- Subramanian C; Kim BH; Lyssenko NN; Xu X; Johnson CH; von Arnim AG.** 2004. The *Arabidopsis* repressor of light signaling, COP1, is regulated by nuclear exclusion: Mutational analysis by bioluminescence resonance energy transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 6798–6802.
- Sullivan J; Deng XW.** 2003. From seed to seed: the role of photoreceptors in *Arabidopsis* development. *Developmental Biology* **260**, 289–297.
- Sze H; Li X; Palmgren MG.** 1999. Energization of Plant Cell Membranes by H⁺-pumping ATPases: Regulation and Biosynthesis. *The Plant Cell* **11**, 677–689.
- Taiz L; Zeiger E.** 2010. *Plant Physiology*. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates.
- Tavares B; Domingos P; Dias PN; Feijó JA; Bicho A.** 2011. The essential role of anionic transport in plant cells: the pollen tube as a case study. *Journal of Experimental Botany* **62**, 2273–2298.
- Thomine S; Guern J; Barbier-Brygoo H.** 1997a. Voltage-Dependent Anion Channel of *Arabidopsis* Hypocotyls: Nucleotide Regulation and Pharmacological Properties. *The Journal of Membrane Biology* **159**, 71–82.
- Thomine S; Lelièvre F; Boufflet M; Guern J; Barbier-Brygoo H.** 1997b. Anion-Channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-Grown *Arabidopsis* hypocotyls. *Plant Physiology* **115**, 533–542.
- Toyomasu T; Kawaide H; Mitsuhashi W; Inoue Y; Kamiya Y.** 1998. Phytochrome Regulates Gibberellin Biosynthesis during Germination of Photoblastic Lettuce Seeds. *Plant Physiology* **118**, 1517–1523.
- van Tuinen A; Kerckhoffs LHJ; Nagatani A; Kendrick RE; Koornneef M.** 1995. A Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato Lacks a Light-Stable, B-like Phytochrome. *Plant Physiology* **108**, 939–947.
- Vahisalu T; Kollist H; Wang YF; Nishimura N; Chan WY; Valerio G; Lamminmäki A; Brosché M; Moldau H; Desikan R; Schroeder JI; Kangasjärvi J.** 2008. SLAC1 is required for plant guard cell S-type anion channel function in stomatal signalling. *Nature* **452**, 487–491.
- Vierstra RD; Zhang J.** 2011. Phytochrome signaling: solving the Gordian knot with microbial relatives. *Trends in Plant Science* **16**, 417–426.
- Vissenberg K; Fry SC; Pauly M; Höfte H; Verbelen JP.** 2005. XTH acts at the microfibril-matrix interface during cell elongation. *Journal of Experimental Botany* **56**, 673–683.
- Wang H; Deng XW.** 2003. Dissecting the phytochrome A-dependent signaling network in higher plants. *Trends in Plant Science* **8**, 172–178.

- Wang H; Ma LG; Li JM; Zhao HY; Deng XW.** 2001. Direct Interaction of *Arabidopsis* Cryptochromes with COP1 in Light Control Development. *Science* **294**, 154–158.
- Ward JM; Mäser P; Schroeder JI.** 2009. Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Plant Biology* **71**, 59–82.
- Ward JM; Pei ZM; Schroeder JI.** 1995. Roles of Ion Channels in Initiation of Signal Transduction in Higher Plants. *The Plant Cell* **7**, 833–844.
- Weller JL; Perrotta G; Schreuder ME; van Tuinen A; Koornneef M; Giuliano G; Kendrick RE.** 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.
- Weller JL; Schreuder ME; Smith H; Koornneef M; Kendrick RE.** 2000. Physiological interactions of phytochromes A, B1 and B2 in the control of development in tomato. *The Plant Journal* **24**, 345–356.
- Wen CK; Chang C.** 2002. *Arabidopsis RGL1* Encodes a Negative Regulator of Gibberellin Responses. *The Plant Cell* **14**, 87–100.
- Whitelam GC; Devlin PF.** 1997. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant, Cell & Environment* **20**, 752–758.
- Yamaguchi R; Nakamura M; Mochizuki N; Kay SA; Nagatani A.** 1999. Light-dependent Translocation of Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic *Arabidopsis*. *The Journal of Cell Biology* **145**, 437–445.
- Yamaguchi S; Smith MW; Brown RG; Kamiya Y; Sun T.** 1998. Phytochrome Regulation and Differential Expression of Gibberellin 3 β -Hydroxylase Genes in Germinating *Arabidopsis* Seeds. *The Plant Cell* **10**, 2115–2126.
- Yamamoto YY; Deng X; Matsui M.** 2001. CIP4, a New COP1 Target, Is a Nucleus-Localized Positive Regulator of *Arabidopsis* Photomorphogenesis. *The Plant Cell* **13**, 399–411.
- Yang HQ; Tang RH; Cashmore AR.** 2001. The Signaling Mechanism of *Arabidopsis* CRY1 Involves Direct Interaction with COP1. *The Plant Cell* **13**, 2573–2587.
- Zhou YH; Zhang YY; Zhao X; Yu HJ; Shi K; Yu JQ.** 2009. Impact of Light Variation on Development of Photoprotection, Antioxidants, and Nutritional Value in *Lactuca sativa* L. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **57**, 5494–5500.
- Zimmermann S; Frachisse J-M; Thornine S; Barbier-Brygoo H; Guern J.** 1998. Elicitor-induced chloride efflux and anion channels in tobacco cell suspensions. *Plant physiology and Biochemistry* **36**, 665–674.

9 Seznam použitých zkratek

ABA	kyselina abscisová
ALMT	<i>aluminum-activated malate transporter</i>
BL	modré světlo
CLC	<i>chloride channel</i> , napětově řízený chloridový kanál
COP1	<i>Constitutively photomorphogenic 1</i> , negativní regulátor fotomorfogeneze
CRY	krytochrom
D	tma
DIDS	kyselina 4,4'-diisothiokyanstilben-2,2'-disulfonová
FR	<i>far-red light</i> , dlouhovlnné červené světlo
GA	gibberelliny
MS médium	bazální médium podle Murashige a Skoog
NIF	kyselina niiflumová
NPPB	5-nitro-2,3-fenylpropylaminobenzoová kyselina
Pfr	<i>far-red light-absorbing form of phytochrome</i> , aktivní forma fytochromu
PHOT	fototropin
PHY	fytochrom
Pr	<i>red light-absorbing form of phytochrome</i> , neaktivní forma fytochromu
RL	červené světlo
SITS	kyselina 4-acetamid-4'-isothiokyanstilben-2,2'-disulfonová
SLAC1	<i>slow anion channel</i> , aniontový kanál S-typu
WT	<i>wild-type</i> , standardní genotyp