

Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů



**Úloha fytochromového chromoforu v regulaci akvaporinů
během klíčení semen rajčete**

Bakalářská práce

Autor: Tereza Slavíková

Obor: Experimentální biologie

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

Olomouc 2022

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora:	Tereza Slavíková
Název práce:	Úloha fytochromového chromoforu v regulaci akvaporinů během klíčení semen rajčete
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2022
Abstrakt:	<p>Předložená bakalářská práce se zabývá studiem vlivu světla a fotoreceptorů fytochromů na aktivitu akvaporinů v průběhu klíčení semen rajčete <i>Solanum lycopersicum</i> L. Ke studiu byl použit genetický přístup, který spočíval v analýze mutantů <i>au^W</i> a <i>yg-2</i> s defekty v biosyntéze fytochromového chromoforu. Experimentálním cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda je v podmínkách <i>in vitro</i> citlivost semen k inhibitoru akvaporinů HgCl₂ ovlivněna světlem a pokud ano, zda může být vliv světla zprostředkován fytochromy. Na základě výsledků této bakalářské práce bylo zjištěno, že akvaporiny hrají roli v procesu klíčení semen rajčete a že jejich aktivita je pravděpodobně regulována světlem prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů.</p>
Klíčová slova:	akvaporiny, fotoreceptory, fytochromy, HgCl ₂ , klíčení semen, rajče, světlo
Počet stran:	35
Jazyk:	čeština

Bibliographical identification

Author's first name and surname:	Tereza Slavíková
Title:	Role of phytochrome chromophore in regulation of aquaporins during tomato seed germination
Type of thesis:	Bachelor
Department:	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation:	2022
Abstract:	<p>This bachelor thesis studies the influence of light and photoreceptors on the activity of aquaporins during the process of seed germination in tomato <i>Solanum lycopersicum</i> L. The genetic approach was used to carry out this study and it consisted in the analysis of mutants <i>au^W</i> and <i>yg-2</i> with defects in the biosynthesis of phytochrome chromophore. The experimental goal of this thesis was to find out if under the conditions <i>in vitro</i>, the sensitivity of the seeds to HgCl₂, the inhibitor of aquaporins, was influenced by light and if so, whether the influence of light could be mediated by phytochromes. Based on our results, we can conclude that aquaporins play a role in the process of tomato seed germination and that their activity is most likely regulated by light via phytochrome photoreceptors.</p>
Key words:	aquaporins, photoreceptors, phytochromes, HgCl ₂ , seed germination, tomato, light
Number of pages:	35
Language:	Czech

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci na téma „Úloha fytochromového chromoforu v regulaci akvaporinů během klíčení semen rajčete“ vypracovala samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. s použitím citované literatury.

V Olomouci dne:

Podpis:

Poděkování

Chtěla bych velmi poděkovat panu prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za jeho ochotu, vstřícnost a pomoc při zpracování mé Bakalářské práce a jeho týmu Skupině molekulární fyziologie, za jejich pomoc při vykonávání experimentální části práce v laboratoři.

Obsah

Bibliografické údaje.....	2
Bibliographical identification.....	3
Prohlášení.....	4
Poděkování.....	5
Obsah	6
Seznam použitých zkratek.....	7
Úvod.....	8
1 Současný stav řešené problematiky.....	9
1.1 Fotomorfogenze	9
1.2 Fytochromy a jejich struktura	9
1.3 Specializace fytochromů	11
1.4 Receptory modrého světla.....	12
1.4.1 Fototropiny.....	12
1.4.2 Kryptochromy	13
1.5 UV-B světlo a jeho receptory.....	15
2 Klíčení semen.....	15
2.1 Regulace klíčení semen světlem	16
2.2 Ovlivnění klíčení pomocí fytochromů	17
3 Akvaporiny.....	17
3.1 Struktura akvaporinů.....	19
3.1.1 Inhibice akvaporinu pomocí chloridu rtuťnatého.....	19
3.2 Transport vody a jiných látek pomocí akvaporinů.....	20
3.2.1 Peroxid vodíku	20
3.2.2 Oxid uhličitý.....	21
3.2.3 Transport rozpuštěných látek prostřednictvím NIP.....	21
4 Materiál a metody	22
4.1 Metody	22
4.1.1 Míchání MS média.....	22
4.1.2 Výsev semen	22
5 Výsledky	25
5.1 Vliv světla na citlivost mutanta <i>aurea</i> k HgCl ₂	25
5.2 Vliv světla na citlivost mutanta <i>yellow green 2</i> k HgCl ₂	27
6 Diskuze.....	30
7 Závěr	33
8 Zdroje.....	34

Seznam použitých zkratek

ABA – abscisic acid, kyselina abscisová

ABI3-5 - Abscisic acid insensitive 3-5

au^W – *aurea*

BICS – blue-light inhibitors of CRYs

BL – blue light, modré světlo

CRY – kryptochrom

D – dark, tma

FMN – flavinmononukleotid

FR – far-red light, dlouhovlnné červené světlo

GA – gibberellic acid, kyselina gibberelová

GIPs – GIpF-like intrinsic protein, GIpF podobné vnitřní proteiny LFR – low fluence response, reakce k nízké ozáření

HIR – high irradiance response, reakce k vysoké ozáření

MIPS – major intrinsic proteins, hlavní vnitřní proteiny

MS médium – Murashige and Skoog médium

NIPs – nodulin26-like intrinsic proteins, nodulinu26 podobné vnitřní proteiny

Phy – fytochrom

PIPs – plasma membrane intrinsic proteins, vnitřní proteiny plazmatické membrány

VLFR – very low fluence response, reakce k velmi nízké ozáření

SIPs – small basic intrinsic proteins, malé základní vnitřní proteiny

TIPs – tonoplast intrinsic protein, vnitřní tonoplastové proteiny

WT – wild type, divoký genotyp

yg-2 – *yellow green-2*

Úvod

Ke klíčení semen vyšších rostlin je potřeba především voda, teplo a u mnoha rostlin i světlo. Voda se do semen aktivně dostává jednak vlivem imbibice, ale později v průběhu klíčení semen i pomocí kanálů zvaných akvaporiny. Není však známo, jak je aktivita akvaporinů v průběhu klíčení semen regulována světlem.

Předložená bakalářská práce se tedy zabývá studiem zapojení akvaporinů v procesu klíčení semen rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. a jejich regulací vlivem světla. Cílem bakalářské práce bylo vypracovat literární rešerši týkající se problematiky klíčení semen a zapojením akvaporinů v procesu klíčení semen. V experimentální části bylo cílem bakalářské práce zjistit, jestli je v podmínkách *in vitro* citlivost semen k inhibitoru akvaporinů chloridu rtuťnatému (HgCl_2) ovlivněna světlem a zda mohou být v tomto procesu zapojeny fotoreceptory fytochromy. Pro práci byl využit genetický přístup, který spočívá v analýze mutantů s poruchou ve vnímání světla. Konkrétně se jednalo o mutované rostliny *au^w* a *yg-2*, které mají mutaci v genech kódujících biosyntézu chromoforu, barviva, které je součástí fotoreceptorů červeného světla, fytochromů. V bakalářské práci bylo vyšetřováno, jak je klíčivost semen těchto mutantů a odpovídajících kontrolních genotypů ovlivněna inhibitorem akvaporinů HgCl_2 , a to v závislosti na kvalitě světla. Výsledky bakalářské práce naznačují, že akvaporiny jsou zapojeny v procesu klíčení semen rajčete a že jejich aktivita je pravděpodobně regulována světlem prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů.

Experimenty byly prováděny v rámci pracovní skupiny molekulární fyziologie, která je součástí Laboratoře růstových regulátorů UP v Olomouci a Ústavu experimentální botaniky AVČR.

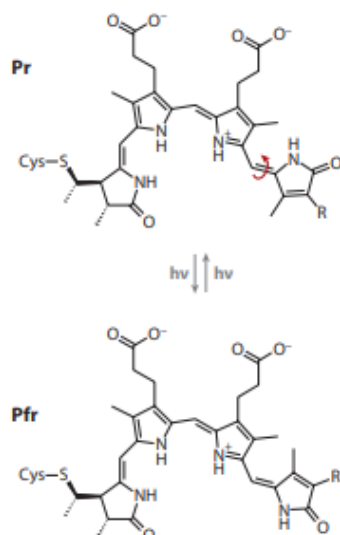
1 Současný stav řešené problematiky

1.1 Fotomorfogeneze

Světlo je pro rostliny nezbytným zdrojem energie, kterou si rostlina vyrábí fotosyntézou. Také je důležitým faktorem pro proces fotomorfogeneze. Jelikož tento proces neprobíhá bez přítomnosti světelného záření, můžeme ji označit jako proces, při kterém se nejefektivněji využívá světelné energie. Fotomorfogeneze se vyznačuje tím, že v rostlině probíhá inhibice prodloužení stonků, dochází k diferenciaci chloroplastů, chlorofyl se akumuluje a listy se zvětšují. Rostliny, které rostou ve tmě mají tzv. „temný fenotyp“, tento proces, který je opačný fotomorfogenezi označujeme jako skotomorfogeneze. Etiolizovaná rostlina má prodloužený stonek, malé a uzavřené listy a nediferenciované chloroplasty. Mechanismus fotomorfogeneze ještě není zcela probádán (Han et al., 2007). Světlo je vnímáno pomocí fotoreceptorů, které ho zachycují. Máme více druhů fotoreceptorů – fytochromy, které zachycují světlo v červeném a dalece červeném spektru (R/FR), receptory na modré a UV světlo a receptory na UV-B světlo (Kendrick et al., 1997).

1.2 Fytochromy a jejich struktura

Fytochrom má dvě složky – bílkovinnou (apoprotein) a nebílkovinnou (chromofor). Bílkovinná část, která se skládá z polypeptidového základu a aminokyselinových postranních řetězců neabsorbuje světlo ve viditelném spektru, proto obsahuje fytochrom nebílkovinnou složku, která zachycuje fotony a může být k bílkovinné části kovalentně nebo nekovalentně přichycena (Moglich et al., 2010). Fytochromy se skládají z monomerů. Každý monomer má hmotnost přibližně 120 kD a obsahuje lineární tetrapyrrolový (nebo bilinový) chromofor (3E)-fytochromobilin (PΦB), který je prostřednictvím thioetherové vazby kovalentně připojený. Po jeho sestavení na sebe může fytochrom vzít jednu ze dvou stabilních konformací. První je Pr (fytochrom-red), která absorbuje červené světlo (R) a formu Pfr (fytochrom-far red) absorbující dlouhovlnné červené světlo (FR), které jsou opakovaně schopné přecházet z aktivní a inaktivní konformace a naopak střídavým ozařováním R a FR (Obr.1) (Emborg et al., 2006).



Obrázek 1 – Inaktivní a aktivní forma fytochromu (převzato z Moglich et al., 2010).

Zpočátku jsou fytochromy syntetizovány jako Pr, což je biologicky neaktivní forma, a aktivují se až po fotokonverzi na Pfr. Při dopadu světla na rostlinu se mění konformace chromoforu a spolu s ní se mění i konformace apoproteinu. Apoprotein poté přenáší světelný signál dál do rostliny, což mu umožňuje to, že není zcela nasycený, a tudíž dokáže přenášet elektrony přes konjugovaný systém π vazeb v jeho molekule. Čím větší je chromofor, tím větší je jeho konjugovaný systém, ve kterém dochází k delokalizaci elektronů a tím větší je vlnová délka ve které bude chromofor absorbovat světlo, což je například lineární tetrapyrrolový fytochromobilin (P Φ B), který absorbuje v červené až dlouhovlnné červené oblasti (Moglich et al., 2010).

Geny, které kódují u rajčete syntézu apoproteinů jsou: *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF*. Máme pět druhů apoproteinů *PHYA*, *PHYB1*, *PHYB2*, *PHYE* a *PHYF* a po jejich sestavení na tetrapyrrolový lineární chromofor vedou ke vzniku fotoreverzibilních holofytochromů *phyA*, *phyB1*, *phyB2*, *phyE* a *phyF*. N-konec fytochromů slouží k vnímání světla. Na základě intenzity osvětlení dělíme reakce fytochromů na reakci k nízké ozáření (LFR), velmi nízké ozáření (VLFR) a reakci k vysoké ozáření (HIR). Jednotlivé fotoreceptory jsou schopné se vzájemně ovlivňovat, což je studováno pomocí fotomorfogenních mutantů rajčete (Kendrick et al., 1997).

Reakci fytochromů k nízké ozáření (LFR) můžeme označit klasickou reverzibilní reakcí na R a FR světelného spektra, přičemž hlavním fytochromem, který tuto reakci zprostředkovává je fytochrom B. Klíčení na základě nízké reakce u *Arabidopsis* je podpořeno např. modulací metabolismu giberelinů. Velmi nízká reakce (VLFR) probíhá

u rostlin, které jsou velmi citlivé na světlo a je zprostředkována fytochromem A. Může být pohlcena velmi malou hladinou Pfr a nezprostředkovává klasickou R-FR reverzibilitu. Tato reakce může nastávat například u rostlin, které jsou po nějakou dobu v půdě, které jsou vystavené teplotním změnám nebo se inkubují v přítomnosti kyseliny gibberelové (GA). Prodloužená expozice FR světla však může způsobit inhibici klíčení u několika druhů. Tento třetí způsob je označován jako reakce k vysoké ozáření (HIR) a je také zprostředkován fytochromem A. Reakce HIR antagonizuje klíčení vyvolané pomocí LFR, protože obě tyto reakce zprostředkovávají např. oslabení endospermu semene, což je regulační bod těchto reakcí při klíčení (Arana et al., 2007).

1.3 Specializace fytochromů

Mezi všemi fotoreceptory pouze u fytochromů bylo nalezeno přímé spojení s indukcí klíčení (Hennig et al., 2002). Absorpční maximum neaktivní formy fytochromu (Pr) se nachází v červené části spektra (660 nm), zatímco absorpční maximum aktivní formy (Pfr) se nachází v dlouhovlnné červené oblasti světla (730 nm). Osvětlení pomocí FR pomáhá transformaci aktivního Pfr na inaktivní formu – Pr. Při tepelné relaxaci fytochromobilinu dochází také k přechodu z aktivní do inaktivní formy fytochromu, což je proces, který se objevuje ve tmě. Absorbance obou těchto forem je velmi malá i v UV-A oblasti a u vlnových délek 450-550 nm, což je fyziologicky významné u buněk, ve kterých se nachází vysoké množství fytochromu. Takovou situaci můžeme nalézt například u semenáčků huseničku rolního (*Arabidopsis thaliana*), kde existuje 5 typů fytochromů PhyA-PhyE a kde se hromadí velké množství PhyA v poměru s ostatními. Dokonce i velmi malá intenzita FR umožní přechod alespoň několika PhyA do aktivní formy, což bude stačit k vyvolání fotomorfogeneze, na jejíž vypnutí už nebude stačit ozáření pomocí FR (Voitsekhovskaja, 2019).

Fytochrom A je fytochrom, který je fotolabilní. To znamená, že při vysokém ozáření degraduje. Může být aktivován množstvím světla jakékoliv vlnové délky 300-780 nm, které je menší než $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$. Po jeho aktivaci zprostředkovává komplex reakcí označených jako VLFR. Může však být aktivovaný i velkou světelnou intenzitou v množství $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ a více v reakci na zvýšení FR nebo na snížení množství světla. Tento typ reakce je označován jako HIR a díky ní můžou semenáčky dokončit vývoj s působením světla i když jsou zakryté. Fytochrom A je ve tmě lokalizován v cytosolu, kde může regulovat gravitropismus (Voitsekhovskaja, 2019).

Fytochrom B a všechny ostatní fytochromy jsou na světle stabilní. Při konstantním osvětlení je PhyB dominantní formou fytochromu v poměru s ostatními, nicméně pořád

o mnoho menší, než je tomu s PhyA u semenáčků a proto ani nízké ozáření pomocí R nebo vysoké ozáření pomocí FR a ani žádná další vlnová délka nemůže aktivovat fyziologicky významnou hladinu molekul PhyB (Voitsekhovskaja, 2019). Fytochromy B, D a E jsou příbuzné evolučně a liší se od zbylých fytochromů A a C. Nejlépe jsou popsány fytochromy A a B v *Arabidopsis*. Můžeme pozorovat LFR fytochromu D v PhyB sazenicích. Po určení genové sekvence PhyB a PhyD se ukázalo, že 80 % genů je identických, a to pravděpodobně zajišťuje jejich podobné role s několika fyziologickými rozdíly. Hlavní funkcí PhyE je syndrom vyhýbání se stínu, kterým se tato práce zabývá v následujícím odstavci. (Hennig et al., 2002).

Syndrom vyhýbání se stínu je důležitá a výhodná strategie, která se vyvinula u rostlin, které se nacházejí například v lese nebo v rostlinných komunitách, kde existuje soupeření o přístup ke světlu. Rostliny začnou stín potřebovat nebo se mu začnou vyhýbat. Reakce na vyhýbání se stínu jsou všechny iniciovány jedním signálem z prostředí – snížení poměru R k FR, k čemuž dochází právě v rostlinných komunitách. Termín „syndrom“ je použit právě proto, že stejně jako v lékařském slovníku je zde popisováno více reakcí či příznaků, které vedou všechny od jediného základního problému (Smith and Whitelam, 1997).

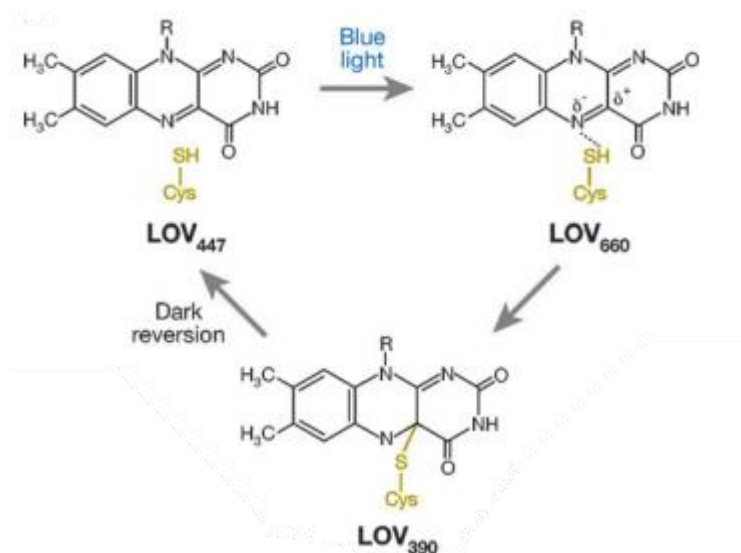
1.4 Receptory modrého světla

1.4.1 Fototropiny

Rozlišujeme dva druhy fototropinů – phot1 a phot2, které můžeme aktivovat pomocí modrého světla. Autofosforylace fototropinů a jejich aktivace pomocí světla podporuje jejich translokaci buď do cytosolu (phot1) nebo do membrány Golgiho aparátu (phot2) (Voitsekhovskaja, 2019). Fototropiny jsou složeny z primární aminokyselinové struktury, kterou můžeme rozdělit na N-terminální část s fotosenzorickou funkcí a C-terminální část, která má motiv serin/threonin kinázy. To znamená, že to jsou proteinkinázy (enzymy, které na aminokyselinový zbytek vážou molekulu fosfátu; tento děj se nazývá fosforylace a řadí se mezi katabolické procesy), které zprostředkovávají různé adaptivní procesy, sloužící k optimalizaci účinnosti fotosyntetických procesů v rostlině. Tím se podporuje její růst. Fototropiny mají dva fotosenzory označované jako LOV1 a LOV2. Pomocí biofyzikální a strukturní analýzy bylo dokázáno, že převládá role LOV2 v regulaci aktivity díky specifické změně proteinů, ke které dochází po jeho fotoexcitaci (Jones and Christie, 2008).

C-terminální část obsahuje serin/threonin kinázovou doménu, která je nutná pro autofosforylacii po ozáření modrým světlem a po autofosforylacii dochází k tvorbě dimerů a aktivaci fototropinů (Voitsekhovskaja, 2019). N-terminální část obsahuje dvě LOV domény, kterými dochází ke zprostředkování vnímání světla rostlinou. Každá z těchto

domén na sebe váže modré světlo absorbující kofaktor flavinmononukleotid (FMN), který slouží jako chromofor. Ve tmě dochází k nekovalentnímu navázání FMN za vzniku specifického fotosenzoru LOV₄₄₇, který absorbuje světlo o vlnové délce 447 nm. Po ozáření domény dochází ke tvorbě kovalentní vazby mezi uhlíkem FMN a sírou, která je obsažena v cysteinovém zbytku. Tato formace se vytvoří v řádu mikrosekund po ozáření a tvoří specifický fotosenzor LOV₃₉₀, který absorbuje světlo o vlnové délce 390 nm (Jones and Christie, 2008). Cyklus mezi LOV₃₉₀ aktivní a LOV₄₄₇ inaktivní strukturou závisí na světelných podmínkách (Obr. 2). LOV₃₉₀ se může vrátit do počátečního stavu ve tmě po ozáření UV světlem. Počáteční absorpce modrého světla chromoforem vede k vytvoření excitovaného singletového stavu, který se následně rozpadá do stavu flavinového tripletu (LOV₆₆₀), který absorbuje maximálně v červené oblasti spektra (Christie, 2007).



Obrázek 2 – Schématické zobrazení LOV-domény (převzato z Christie, 2007).

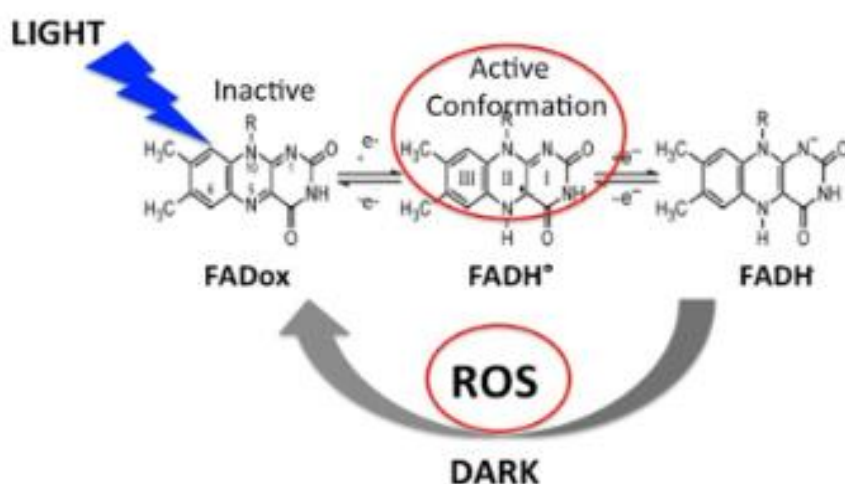
Mezi fototropiny regulované reakce v rostlině patří např. fototropismus kořenů, listů, migrace chloroplastů v reakci na světelné a teplotní signály a otevírání a zavírání průduchů v reakci na modré světlo (Voitsekhovskaja, 2019).

1.4.2 Kryptochromy

Kryptochromy jsou receptory pro UV-A/modré světlo (320-500 nm), které zprostředkovávají regulaci světlem, růst a vývoj rostliny. V rostlině existuje více typů kryptochromů (CRY1 až CRY3) (Han et al., 2007). Kryptochromy existují jako inaktivní monomery ve tmě, ale při fotoexcitaci dochází k homodimerizaci, po které jsou kryptochromy více afinitní ke kryptochromovým signalizačním proteinům jako jsou COP1-SPA komplexy (konstitutivní fotomorfogenní 1-supresor fytochromu A) (Wang et al., 2018). COP1-SPA je E3 ubiquitin ligázový komplex, který zabraňuje fotomorfogenezi ve tmě tím, že degraduje transkripční faktory reagující na světlo. Při vnímání světla fotoreceptory reagují

s tímto komplexem a potlačují jeho aktivitu. Na modrém světle (450-500 nm) je aktivita tohoto komplexu inhibována právě kryptochromy (CRY1 a CRY2) a dále například i fytochromem A. Společnou aktivitou těchto receptorů dochází k regulaci růstu a vývoji rostliny od semenáčků po indukci kvetení (Ponnu, 2020). Při jejich fotoexcitaci dochází i ke změně afinity ke kryptochromovým regulačním proteinům, jako jsou BICS (blue-light inhibitors of CRYs) nebo PKK (fotoregulační proteinkinázy), které modulují množství, činnost nebo modifikace kryptochromů a fotosenzitivitu rostlin na světelné prostředí. BICS dělíme na BICS1 a BICS 2 a tyto regulátory kryptochromů 2 (CRY2) inhibují homodimerizaci a oligomerizaci. Mutantní rostliny, které tyto regulátory nemají funkční jsou hypersenzitivní na modré světlo, zatímco nadměrná exprese těchto regulátorů způsobuje potlačení aktivity CRY1 a CRY2.

Kryptochromy zprostředkovávají různé reakce na modré světlo. Jsou to např. inhibice hypokotylové elongace, otevírání stomat, podpora rezistence proti patogenům, potlačení senescence listů, syndrom vyhýbání se stínu a mnohé další. Jako u ostatních fotoreceptorů existuje hypotéza, že kryptochromy procházejí vratnými změnami energie, orbitalů nebo elektronových stavů chemických vazeb, které zprostředkovává chromofor, kterým je u kryptochromů flavin adenin dinukleotid (Obr. 3). Vnímání signálu je zprostředkováno změnou konformace kryptochromů a jejich afinitou k CRY-vázajícím proteinům, které zahajují signální transdukcii (přenos signálu přes membránu do nitra buňky) (Wang et al., 2018).



Obrázek 3 – Flavinové fotoredukční a reoxidační reakce, které jsou spojeny s biologickou signalizací. Flavin adenin dinukleotid je oxidován (tma) a v přítomnosti světla se redukuje za vzniku flavinového redoxního stavu s neutrálním radikálem (FADH[•]), který koreluje s konformační změnou proteinu spojenou s biologickou aktivací. Po redukci flavinů dochází k reoxidaci flavinů v reakci nezávislé na světle, což vede k produkci reaktivních druhů kyslíku (ROS). (Převzato z El-Esawi et al., 2017).

1.5 UV-B světlo a jeho receptory

O UV-B fotoreceptorech máme mnohem méně informací než o fotoreceptorech pro UV-A světlo. UV-B fotoreceptory absorbují světlo o vlnové délce 280-315 nm. UV-B světlo obecně má dopad na všechny organismy, přestože se jedná pouze o malou část spektra, které denní světlo obsahuje a většina je absorbována ozonovou vrstvou zemské sféry (pouze vlnové délky nad 295 nm se přes ozonovou vrstvu dostanou). Vzhledem k vysoké energii má toto záření potenciál k vytváření mutací v DNA, které mohou zapříčinit až smrt, proto si organismy vyvinuly obranné mechanismy, které je před tímto typem záření ochraňují. U rostlin jsou to kutikuly a trichomy, které chrání povrch listů a také UV-absorbující sloučeniny, které se hromadí v epidermis, snižují propustnost pro tento typ světla a ochraňují buňky pod ní. Snížení již vzniklého poškození mají na starost enzymy, které DNA opravují, a antioxidační systémy. Nízké dávky UV-B světla mezi 295–300 nm vyvolávají u rostlin fotomorfogenezi. Poškození DNA bývá způsobeno světlem o vlnové délce pod 260 nm, (které se už řadí mezi UV-C). Reakce rostlin na UV-B světlo jsou například inhibice prodloužení hypokotylu a růstu kořenů v oblasti s nízkým ozářením. Tento typ světla také podporuje otevírání děložních listů. Pravděpodobně nejrozsáhlejší reakce na UV-B záření je ale biosyntéza flavonoidních sloučenin, které jsou součástí clony, která absorbuje UV-B záření. U *Arabidopsis* byl objeven UVR8 (UV RESISTANCE LOCUS8), který slouží jako fotoreceptor pro UV-B světlo (Jenkins, 2014).

UV RESISTANCE LOCUS8 tvoří v nepřítomnosti UV-B záření inaktivní homodimery a v jeho přítomnosti absorbuje UV-B pomocí tryptofanů, kterými jsou tvořeny jeho chromofory. Po absorpci tohoto druhu světla dochází k jeho strukturní změně a k jeho monomerizaci na aktivní monomery. Tento fotoreceptor, bez ozáření pomocí UV-B, se nachází v cytosolu a jádře. Po jeho ozáření se akumuluje do jádra. Hromadění UVR8 v jádře i monomerizace jsou nezbytné pro jeho funkci při řízení fotomorfogeneze. Procesy monomerizace i dimerizace jsou dynamické a reverzibilní procesy (Liang et al., 2019).

2 Klíčení semen

Klíčení je proces, při kterém vyrůstá rostlina ze semene. Hlavními aspekty, které jsou rostlinou vnímány v době klíčení jsou světlo a teplota. Tyto aspekty poskytují budoucí rostlině informace o ročním období a poloze semene v půdě. Teplota je zásadní environmentální faktor, který reguluje hloubku dormance semen u *Arabidopsis*. Při dormanci dochází k inhibici klíčení i v případě vhodných podmínek. Tento proces probíhá vnitřní i vnější cestou, kdy vnitřní je řízena geneticky a vnější je dána neprodyšným semenným obalem. Klíčivost semen závisí na mnoha faktorech. Dalším důležitým faktorem

je voda. Semena sama o sobě obsahují co nejméně vody, aby nezmrzla přes zimu, proto po kontaktu s vodou bobtnají a indukují proces klíčení. (Yang et al., 2020).

2.1 Regulace klíčení semen světlem

Světlo je důležitým faktorem v rostlině, díky kterému dochází ke klíčení semen a je důležité i pro fotomorfogenezi, syndrom vyhýbání se stínu (viz. kapitola 1.3 Specializace fytochromů) nebo fototropismus. Fotoreceptory, díky kterým rostlina vnímá světelné podněty z okolí předávají tento signál, který upraví transkripci v rostlině tím, že interaguje s transkripčními faktory nebo ubiquitin ligázou 3. V procesu klíčení semen hrají největší roli fytochromy, konkrétně PhyB, protože během počáteční fáze, kdy semena nasávají vodu a bobtnají, zprostředkovává R/FR fotoreverzibilní odezvu (LFR) a tím je zahájen proces klíčení. Fytochrom A naproti tomu prodlužuje proces bobtnání semen ve tmě pomocí velmi malé reakce (VLFR) na různá světelná spektra (UV-A/FR) a velmi vysoké (HIR) na R/FR k urychlení klíčení semen v nepřítomnosti aktivního PhyB (Yang et al., 2020).

Klíčení předchází dvojí oplození, které je následováno dozráváním a morfogenezí semene, která se projevuje proliferací a diferenciací embrya a endospermu. Zrání se projevuje akumulací zásobních látek v embryu a poté je navozena dormance, což je klidový stav rostliny. Vyzrálá semena se poté dostávají do fáze, kdy se úroveň vegetačního stavu snižuje, semena vysychají a stávají se vhodná pro stádium klíčení. Dormance zahrnuje několik fází. První fázi můžeme označit jako indukce, druhá zahrnuje udržení a uvolnění dormance a po této fázi následuje klíčení. V regulaci dormance hrají roli rostlinné hormony jako gibereliny, mezi které patří kyselina giberelová (GA) a kyselina abscisová (ABA) (Yang et al., 2020).

Rostlinné hormony GA a ABA mají velký vliv na růst a vývoj rostliny. GA je fytohormon, který podporuje růst a pozitivně reguluje procesy jako je elongace stonku, klíčení semen, expanze listů, růst pylových láček, květů a plodů. ABA reguluje procesy, jako je zrání embrya, vývoj semen, klíčení a dělení buněk. ABA a GA mají antagonistické účinky (GA obvykle pozitivně reguluje a ABA negativně reguluje) například u klíčení semen nebo u vývoje plodů (Razem et al., 2006). GA je spojována s dormancí semen a stav klíčení je naopak obvykle doprovázen sníženou hladinou ABA. Ošetření rostliny pomocí GA obvykle nestimuluje klíčení u plně dormantních semen. Pro skončení dormance a začátek klíčení je tedy nutné, aby se hladina ABA snížila a zvýšila se hladina GA. Regulaci hladiny ABA mají při biosyntéze na starost enzymy NCED6 (9-cisepoxykardenoid dioxygenáza6), NCED9 (9-cisepoxykardenoid dioxygenáza9) a CYP707A2 (cytochrom P450, rodina 707, podrodina A, polypeptid 2), díky kterým jsou klíčení nebo dormance regulovány. Signalizace ABA je

pozitivně regulována transkripčními faktory jako jsou ABI3, ABI4 a ABI5 (Abscisic acid insensitive 3-5). Mutace genů, které kódují tyto transkripční faktory, vede ke zvýšení klíčivosti semen (Yang et al., 2020).

Dalším důležitým fytohormonem při klíčení je auxin, který se účastní vývoje rostliny, ke kterému patří například růst kořenů, apikální dominance, reakce na signály z prostředí nebo růst plodů. U kapusty čínské auxin také interaguje s ABA při regulaci reakcí na nedostatek vody nebo osmotický tlak. U rajčete auxin spolu s ABA ovlivňují vývoj semen nebo tvorbu kořenů ale auxin je také regulátorem hormonálních signálních drah (GA a ABA), čímž reguluje tvar plodů u rajčat (Shuai et al., 2017).

2.2 Ovlivnění klíčení pomocí fytochromů

Fytochrom A a fytochrom B hrají důležitou úlohu při klíčení semen, které je závislé na světle. Na rozdíl od ostatních fytochromů dokáže PhyA reagovat pouze na malé ozáření pomocí širokého spektra světla (VLFR) nebo na vysoké ozáření (HIR) pomocí FR. Po nabobtnání semen je důležitý PhyB, který je aktivován slunečním zářením spolu se světlem v R spektru. Phy-B dependentní klíčení je zprostředkováno aktivní formou Pfr fytochromu B. Po jeho ozáření pomocí FR dochází k inhibici pomocí FR-dependentní konverze na jeho inaktivní formu Pr. Druhý impulz pomocí FR poté stimuluje PhyA-dependentní klíčení, kdy se PhyA konvertuje na jeho aktivní Pfr formu (Lee et al., 2012). Předpokládá se, že fytochromy kontrolují hladinu fytohormonů GA a ABA, které stimuluji či potlačují klíčení. Bylo prokázáno, že ABA zabraňuje růstu embryí, proto je možné, že konečným krokem signalizace fytochromů je kontrolování hladiny pouze fytohormonu ABA (Lee et al., 2012).

3 Akvaporiny

Akvaporiny patří mezi starobylou rodinu hlavních vnitřních proteinů (MIPs z anglického major intrinsic proteins), které se nacházejí jak u rostlin, tak u živočichů nebo mikroorganismů. Akvaporiny začaly být zkoumány právě na základě jejich fungování jako vodních kanálů v rostlinách, protože toto zjištění bylo neočekávané, a i když nezpůsobilo převrat v chápání rostlinného vodního transportu, tak vedlo k propojení mnoha aspektů vodních vztahů v rostlině a k novým fyziologickým souvislostem. Jsou to membránové proteiny, které tvoří kanály nejen pro vodu, ale bylo zjištěno, že i pro plyny a neutrální rozpuštěné látky. Rostlinné akvaporiny mohou tvořit mnoho homologních struktur (izoforem) a právě díky sekvenční homologii je můžeme rozdělit do čtyř skupin. Vnitřní proteiny plasmatické membrány (PIP), ke kterým patří podskupiny PIP1, PIP2 a dalších 13 homologních akvaporinů u *Arabidopsis*, vnitřní tonoplastové proteiny (TIP), které mají 10 homologních akvaporinů u *Arabidopsis*, nodulinu26 podobné membránové proteiny (NIP),

kteře byly pojmenovány po nodulin-26 (GmNOD26) u sójových bobů (*Glycine max*) a malé základní vnitřní proteiny (SIP), které mají 3 homologní akvaporiny u *Arabidopsis*. Nodulinu26 podobné membránové proteiny jsou exprimovány v kořenech luštěnin i v rostlinách, které se nacházejí u jiných druhů například 9 homologních akvaporinů u *Arabidopsis*. Genom některých vyšších rostlin kóduje pátou třídu akvaporinů, která úzce souvisí s PIPs. Navíc některé rostlinné druhy mají i jiné typy akvaporinů, kdy u mechu *Physcomitrella patens* byl pomocí horizontálního genového transferu objeven homolog bakteriálního glycerolového facilitátoru (Maurel et al., 2008). Glycerolovému facilitátoru podobný membránový protein (GIP) je homologním akvaporinem ke glycerolovému facilitátoru, který je exprimován u bakterie *Escherichia coli*. Existují také hybridní nebo nekategorizované X vnitřní proteiny. Nekategorizované X vnitřní proteiny byly také exprimovány v některých vyšších rostlinných druzích (Wudick et al., 2009). Glycerolový facilitátor byl objeven v bakteriích umístěných do hyperosmotického prostředí, ve kterém bakterie nepodlehly lýze a ani se nezmenšily, jak bylo očekáváno, což vedlo k hypotéze, že jsou velmi propustné pro glycerol. Glycerolový facilitátor je kanál, který je propustný pro glycerol a další malé nenabitě organické látky a byl jako jeden z prvních zařazen mezi akvaporiny (Stroud et al., 2003). Geny kódující akvaporiny jsou exprimovány v několika rostlinných pletivech a jsou regulovány pomocí stresových podnětů z okolí jako je sucho nebo zima. Voda je nejdůležitějším faktorem jak pro fotosyntézu, tak pro vývoj nebo růst rostliny, proto se různé akvaporiny podílejí na udržování vhodné hladiny pro různá pletiva v různých vývojových stádiích. Semena před klíčením vykazují dormanci a v pozdější fázi vysychají. Obecně platí, že suchá semena obsahují pod 10 % vody. Není toho ovšem moc známo o dehydrataci semen za pomoci akvaporinů (Shiota et al., 2006).

Původně bylo navrženo, že PIP se podílejí na rehydrataci semen při fázi klíčení, protože se zvyšuje jejich exprese v klíčících semenech, ovšem také bylo navrženo, že akvaporiny jsou právě během nasávání uzavřeny, aby se předešlo jejich poškození. Je možné tedy, že voda se dostává v průběhu imbibice do semene pomocí difúze. Také se myslelo, že vnitřní proteiny plazmatické membrány se podílejí na rehydrataci z důvodu, že nejsou přítomny v suchých semenech, avšak bylo zjištěno, že některé z PIP jsou přítomny i v suchých semenech, ovšem nejsou aktivní. Analýzy ukazují tedy, že až na jednu výjimku (*PIP2;4*) u které nedochází k expresi při rehydrataci a ani není obsažena v suchých semenech, se všechny ostatní PIP podílejí na klíčení a raném prodlužování kořene (Balarynova and Fellner, 2019). Vnitřní proteiny plazmatické membrány se podílejí na odpovědi na abiotický stres a jejich exprese se může abiotickým stresem regulovat jako součást adaptačního systému, díky kterému rostliny snižují ztrátu vody. Bylo zjištěno, že na

abiotický stres každá izoforma akvaporinu reaguje odlišně, např. PIP1 slouží jako senzor pro modré světlo díky jeho umístění v plazmatické membráně a schopnosti vázat flaviny (chromofory fotoreceptorů pro modré světlo), což potvrzuje zvýšení exprese *PIP1;2* na modrém světle v *Arabidopsis*. Exprese PIP v klíčících semenech se zvyšuje při imbibici, kdy level hydratace dosahuje 50-55 % (Balarynová et al., 2018).

Při klíčení semen *Arabidopsis* probíhá dobře kineticky definovaná a rozsáhlá výměna vody, proto lze očekávat, že tuto výměnu budou zprostředkovávat právě akvaporiny. Analýzy pomocí mikroassay a Western blotu odhalily, že v suchých semenech se nacházely vysoké hladiny exprese několika TIPs izoform (TIP3;1, TIP3;2 a TIP5;1) a poté v průběhu klíčení došlo ke změně a převládala exprese podskupin TIP1 TIP2 akvaporinů, které mají vysoké hladiny exprese i v listech, kořenech a jsou také spojeny s buněčnou expanzí. Jako specifické akvaporiny pro zrání a klíčení semen již byly určeny v několika druzích rostlin TIP3. Vysoký výskyt TIP byl udržován až do úplného vyklíčení. Na rozdíl od tonoplastových akvaporinů byl zjištěn velmi nízký obsah PIP v suchých semenech a až později se jejich exprese zvýšila v pozdní fázi růstu embrya (Hennig et al., 2002).

3.1 Struktura akvaporinů

Díky struktuře různých akvaporinů byl objasněn molekulární mechanismus vodního transportu. Struktura akvaporinů je konzervovaná u živočichů, rostlin, bakterií a kvasinek. Všechny MIP proteiny sdílejí šest transmembránových proteinů s N- a C- terminálními konci směřujícími do cytosolu. Těchto šest domén je složeno z α -helixů, které jsou spojené dohromady pomocí pár formujících domén, které směřují ven i do středu tetramerního akvaporinu. Existuje 5 smyček (A-E), které doprovázejí α -helixy. První a třetí smyčka jsou hydrofobní a obsahují konzervativní Asp-Pro-Ala aminokyselinovou sekvenci. Dvě poloviny proteinu obsahují stejnou sekvenci a překrývají se uprostřed lipidové dvojvrstvy za vzniku dvou hemipórů. Tyto hemipóry vytvářejí úzký kanál, který má podobný tvar jako přesýpací hodiny. Polypeptidové akvaporiny jsou obecně tvořeny v membráně homotetramery a každý monomer tvoří jeden vodní pór. Pomocí elektrostatických sil dochází k průtoku vody v akvaporinu přes pór směrem dolů po směru potenciálového gradientu. Aby mohla být zohledněna molekulární selektivita MIP předpokládá se, že pór propouští látky na základě velikosti (Shao et al., 2008).

3.1.1 Inhibice akvaporinu pomocí chloridu rtuťnatého

Inhibice funkce akvaporinů probíhá pomocí vazby sulfhydrylového činidla na cysteinový zbytek, který je umístěný v těsné blízkosti póru, což vede k fyzickému zablokování molekulárního toku pórem (Shao et al., 2008). Rtuť je obecný inhibitor akvaporinů

v různých organismech, redukuje rychlost klíčení semen a indukuje zpoždění prasknutí pláště mateřského semene. Rtuť ale nezměnila homogenitu ani vývojovou sekvenci klíčení a její efekt lze zvrátit pomocí přidání 2 mM dithiotreitolu, což naznačuje, že tyto účinky byly způsobeny primárně oxidací některých složek, které jsou v buňce obsaženy, případně akvaporinů bez ireverzibilních změn buněčné integrity. Měření příjmu vody v semenech ošetřených rtuť a kontrolních semenech naznačuje, že akvaporiny nejsou zapojeny do časného nasávání vody semenem (imbibice), ale jsou spíše spojeny s opožděným zahájením fáze absorpce vody, expanzí i růstem embrya a mohou ovlivňovat rychlost klíčení semen (Vander Willigen et al., 2006). V genomu rajčete existuje 47 genů, které kódují akvaporiny, avšak jen 14 kóduje ty, které jsou obsaženy v plazmatické membráně a které se podílejí na rehydrataci a vývoji semene. Chlorid rtuťnatý se používá pro zkoumání jejich funkce při klíčení a pro brzký růst rostliny po klíčení, a přestože bylo objeveno několik akvaporinů, které byly vůči rtuti rezistentní jsou její sloučeniny hojně užívány jako jejich inhibitory. Expres akvaporinů může být modulována různými faktory, například zářením (Balarynova and Fellner, 2019) nebo abiotickým stresem (Balarynová et al., 2018). Díky experimentům s mutantem rajčete bylo zjištěno, že $HgCl_2$ potlačuje nebo opoždí klíčení semen a opožděn je také růst kořenů, a to nejvíce pod modrým světlem. Aby nebyly účinky rtuti toxické, používají se relativně malé koncentrace, u kterých je prokázáno, že nemají jedovaté účinky na semeno (Balarynova and Fellner, 2019).

3.2 Transport vody a jiných látek pomocí akvaporinů

Akvaporiny se vyskytují téměř ve všech kompartmentech buněčných membrán rostlin, což naznačuje, že jejich role v dějích, které probíhají uvnitř buňky a v rozdělování různých substrátů je kritická. Například modelování pohybu vody mezi cytoplazmou a vakuolami je přisuzováno roli tonoplastovým akvaporinům v osmotické rovnováze buňky. Pro ostatní substráty ještě zůstávají nezodpovězené otázky, co se týče příspěvku akvaporinů a směru transportu (Maurel et al., 2009).

3.2.1 Peroxid vodíku

Peroxid vodíku je velmi podobný vodě, tudíž bylo dokázáno v kvasinkách, že tato molekula může být efektivně transportována jak pomocí vnitřních proteinů plazmatické membrány, tak pomocí vnitřních tonoplastových proteinů. Fenotyp mutantní rostliny *Arabidopsis*, která je deficientní v *tip1;1* i *tip1;2* může být dán transportní aktivitou těchto akvaporinů. Pod normálními světelnými podmínkami ($100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$) měla tato mutantní rostlina ve srovnání s kontrolním genotypem (WT) o 50 % zvýšený obsah antokyanů a o 20 % sníženou aktivitu katalázy. Tyto změny mohou být indukovány i u rostlin divokého typu,

ovšem až při vysoké míře osvětlení ($500 \mu\text{mol fotonů m}^{-2} \text{s}^{-1}$), proto fenotyp tohoto mutanta ukazuje na roli TIP1 v buněčné detoxikaci kyslíkových radikálů (ROS), které jsou indukovány světlem. Je proto pravděpodobné, že přenos signálu mezi buňkami nebo uvnitř buněk je zprostředkován pomocí vnitřních proteinů plazmatické membrány, tak pomocí vnitřních tonoplastových proteinů (Maurel et al., 2009).

3.2.2 Oxid uhličitý

Oxid uhličitý je dalším substrátem, který má primární fyziologický význam. Lokalizace NtAQP1 v chloroplastovém obalu i plazmatické membráně listů tabáku podnítily přehodnocení propustnosti těchto membrán pro vodu a oxid uhličitý. Po změření zastaveného toku ve vezikulách těchto membrán, které byly purifikovány z rostlin divokého typu a NtAQP1 RNAi ukázaly, že NtAQP1 přispívá kolem 45 % k propustnosti plazmatické membrány pro vodu, ale má zanedbatelný účinek pro oxid uhličitý. V chloroplastovém obalu by však mohl představovat kolem 90 % propustnosti pro oxid uhličitý, ale méně než 10% propustnost pro vodu. Tato data je ale nutné ještě porovnat s modely, které zkoumají příspěvek membrán k celkové vodivosti mezofylu vůči oxidu uhličitému a rozšířit na další systémy. (Maurel et al., 2009).

3.2.3 Transport rozpuštěných látek prostřednictvím NIP

Nedávno se ukázalo, že dva toxické metaloidy arsen a antimon jsou transportovány ve formě hydroxidů ($\text{As}(\text{OH})_3$ a $\text{Sb}(\text{OH})_3$) pomocí NIP. Protože tyto sloučeniny se vyskytují pouze v kontaminovaném prostředí a nejsou nezbytně nutné pro rostlinu může to odrážet nedostatečnou selektivitu systému, který je určen pro transport metaloidů, které jsou pro rostlinu esenciální (bór a křemík) a které jsou potřeba pro jejich výživu a rezistenci vůči stresu. Akumulace arsenu v rýžových semenech je například dána dvěma křemíkovými transportéry a genetické studie ukázaly, že u *Arabidopsis* je hlavním faktorem citlivosti na toxicitu arsenitu AtNIP1;1. Přesto však existuje možnost, že některé z ostatních NIP přispívají k detoxikaci rostliny. Další NIP v *Arabidopsis* transportuje kyselinu mléčnou v oocytech a byla potvrzena jeho funkce, kterou je uvolňovat kyselinu mléčnou v kořenech, které jsou zaplaveny vodou a zabránění jejich fermentaci, která je vyvolána acidifikací buněk (Maurel et al., 2009).

4 Materiál a metody

Rostlinný materiál – semena *Solanum lycopersicum* L. ve formě recesivního mutantu *au*^W (*aurea*, cv. Money Maker; LA2837; deficientní ve fytochromovém chromoforu; Koornneef et al., 1985; Terry, 1997) a recesivního mutantu *yg-2* (*yellow green 2*, odvozen od cv. Kokomo; deficientní ve fytochromovém chromoforu; Terry and Kendrick, 1996). Semena mutantů byla poskytnuta C. M. Rick, TGC: Tomato Genetics Cooperative, University of Florida, Gainesville).

4.1 Metody

4.1.1 Míchání MS média

Pomůcky – plastové váženky, odměrný válec 0.5 l, třílitrová Erlenmayerova baňka, analytické váhy a předvážky, magnetické míchátko, magnetická míchačka, hliníková fólie, špachtle, lžička, pH-metr, barevná páska, autoklávovací páska, lihová fixa, plastová Pasteurova pipeta

Chemikálie – Murashige Skoog médium (Murashige and Skoog 1962; Duchefa Biochemie, Nizozemsko, Prod. No: M0221.0100), sacharóza, pufr MES (2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina), destilovaná voda, fytoagar, 1M roztok hydroxidu sodného (KOH), roztok chloridu draselného (KCl)

Postup přípravy média

Do třílitrové Erlenmayerovy baňky byl nalit 1 litr destilované vody, do kterého bylo přidáno 20 g sacharózy, která byla rozpuštěna na magnetické míchačce. Poté bylo odváženo 8,6 g média, které po rozpuštění sacharózy bylo přesypáno do baňky. Na analytických vahách bylo odváženo do misky 0,39 g MES pufru a nasypáno do média. Do odměrného válce byl napuštěn litr destilované vody. Po rozmíchání pufru v baňce se zastavilo míchání a objem v baňce byl doplněn na 2 litry pomocí odměrného válce. Poté bylo upraveno pH média pomocí pH metru. Nejdříve bylo pH změřeno pomocí elektrody (4,5), a poté bylo pH upraveno pomocí 1 M roztoku KOH na hodnotu 6,1. Bylo připraveno 5 půllitrových termolahví obsahujících 2,8 g fytoagaru, do kterých bylo odměřeno pomocí odměrného válce 400 ml média. Láhve byly lehce zašroubovány, označeny štítkem s popiskem a médium bylo připraveno ke sterilizaci v parním autoklávu. Sterilní médium bylo přechováváno v lednici.

4.1.2 Výsev semen

Pomůcky – sterilní plastové Petriho misky (průměr 90 mm), dlouhá pinzeta, lihový kahan, sterilní Erlenmayerova odměrná baňka (objem 300 ml), automatická pipeta (objem 10 ml),

sterilní špička, plastové centrifugační zkumavky s víčky (objem 50 ml), nesterilní kádinka (objem cca. 300 ml), alobal, barevná páska

Chemikálie – zásobní roztok chloridu rtuťnatého (konc. 10^{-2} mol/l; sterilizovaný filtrací), sterilní destilovaná voda, roztok Sava, ve kterém bylo 2,8 % aktivního chlóru, 96 % a 70 % ethanol a připravené kultivační médium MS.

Postup

Nejdříve bylo rozežráto kultivační médium. Než se médium rozežrálo, proběhla povrchová sterilizace semen rajčete pomocí roztoku Sava, které bylo nalito k semenům do plastových zkumavek s víčky a ponecháno působit 20 minut. Byla vydesinfikována pracovní deska flowboxu pomocí 70 % roztoku ethanolu. Po 20minutové lhůtě byl ve flowboxu roztok odpipetován a semena byla propláchnuta destilovanou vodou: místo Sava byla nalita k semenům sterilní destilovaná voda, která po chvilce působení byla opět odpipetována a znovu dolita do zkumavky. Tento postup byl pětkrát zopakován pro semínka obou genotypů. Po posledním promytí bylo k semenům přilito 5 ml sterilní destilované vody. Semena byla připravena k výsevu.

Po rozežrání bylo nalito do odměrné baňky 120 ml kultivačního média, které bylo rozlito do šesti Petriho misek (po 20 ml) označených jako misky s nulovou koncentrací HgCl_2 . Dále bylo nalito do odměrné baňky 120 ml kultivačního média a 120 μl HgCl_2 , které bylo rozlito do šesti Petriho misek (po 20 ml) označených jako misky s 10 μM koncentrací HgCl_2 . Podobným způsobem byly připraveny misky s koncentracemi 15, 20 a 30 $\mu\text{mol/l}$. Příslušné objemy zásobního roztoku jsou uvedeny v tabulce 1.

Tabulka 1 - Koncentrace HgCl_2 pro přípravu MS média o objemu 120 ml

Koncentrace [$\mu\text{mol/l}$]	10	12	15	20	30	40	50	70	90
HgCl_2 [μl]	120	144	180	240	360	480	600	840	1080

Po ztuhnutí média v miskách byl zapálen kahan a do sklenice nalit 96 % ethanol, který se používal k dezinfekci pinzety. Do každé Petriho misky bylo pomocí nad plamenem ožehnuté pinzety vyseto na médium 30 upravených vysterilizovaných semen. Poté byly misky přelepeny dvěma vrstvami pásky z netkané textilie (Softpore, Batist Medical, ČR), popsány, seřazeny podle koncentrací za sebou, misky patřící do tmy, byly obaleny vrstvou alobalu a umístěny ve vertikální poloze do automatické kultivační komory; Microclima 1000E, Snijders Scientific, Nizozemsko). Misky se semeny určené ke kultivaci na BL a RL

byly umístěny ve vertikální poloze do speciálních stojánek a umístěny do stejné kultivační komory. Zdrojem modrého světla byly trubice Philips TLD-36 W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 440 nm modrého světla. Zdrojem červeného světla byla trubice Philips TLD- 36 W/15-Red (Philips, USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ při 660 nm.

Hodnocení klíčivosti semen

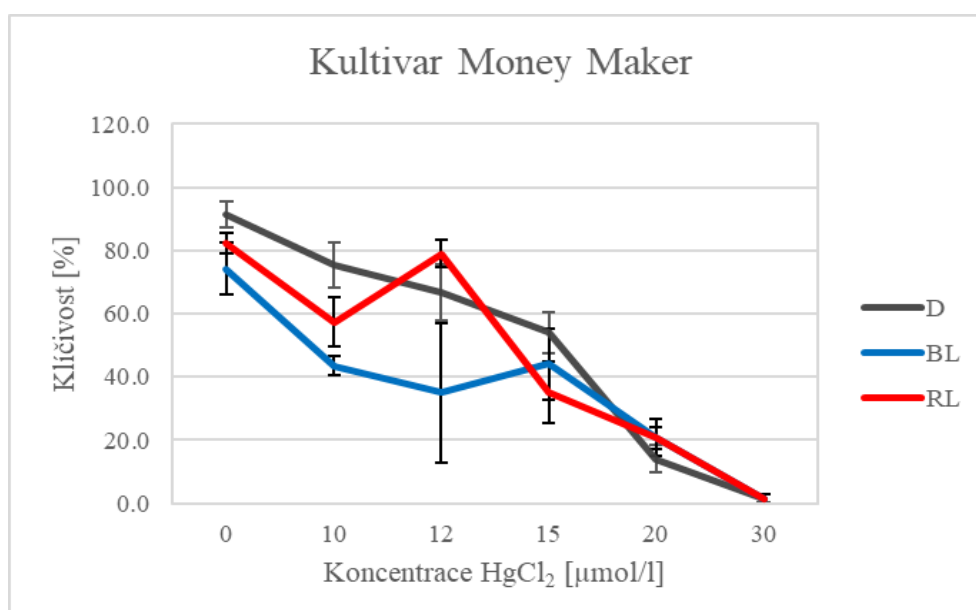
Semena byla kultivována ve tmě, na modrém nebo červeném světle při teplotě 23 °C celkem 7 dnů a během této doby byla sledována klíčivost semen. Ze získaných hodnot klíčivosti byla vypočítána procentuální inhibice klíčivosti vlivem HgCl_2 . Ze získaných či vypočítaných hodnot byly následně vytvořeny tabulky a grafy které ukazují závislost klíčivosti či inhibice na použité koncentraci HgCl_2 .

5 Výsledky

Obecným cílem experimentů v této bakalářské práci bylo zjistit, zda červené světlo prostřednictvím fytochromů může nějakým způsobem ovlivňovat aktivitu akvaporinů během klíčivosti semen rajčete *Solanum lycopersicum* L. V provedených experimentech byl použit genetický přístup, při kterém byla porovnávána klíčivost mutantních rostlin s defekty ve fytochromovém chromoforu a jejich odpovídajících kultivarů po aplikaci inhibitoru akvaporinů chloridu rtuťnatého (HgCl_2). Konkrétně byly použity mutanti rajčete *aurea* (au^W) a *yellow green 2* (*yg-2*) oba s defekty v biosyntéze chromoforu.

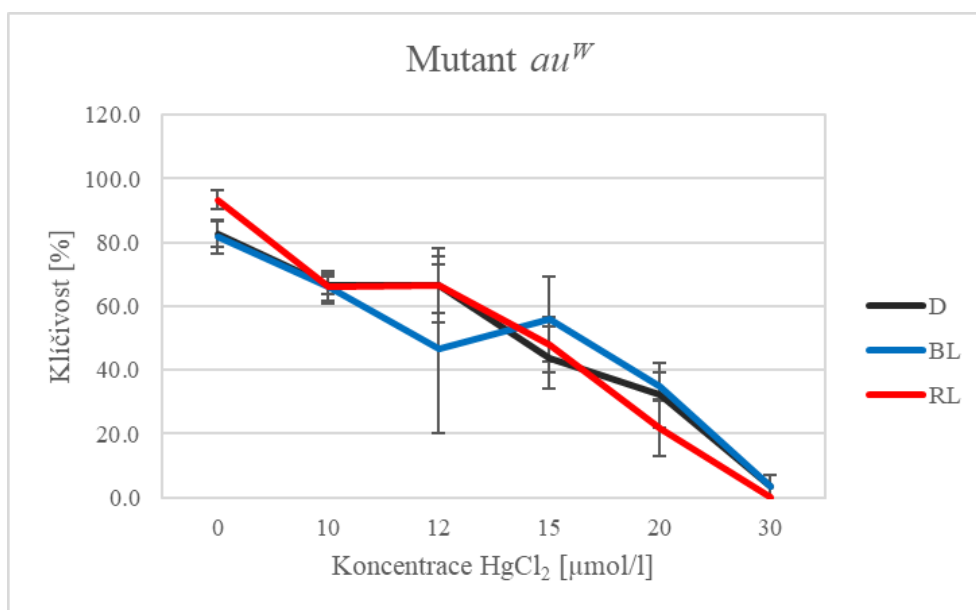
5.1 Vliv světla na citlivost mutanta *aurea* k HgCl_2

V těchto experimentech byla použita mutantní rostlina au^W deficitní v druhém kroku syntézy fytochromového chromoforu (Obr. 10, Diskuze). Byl sledován vliv HgCl_2 a světelných podmínek na klíčivost semen této mutantní rostliny v porovnání s jejím kultivarem Money Maker (cv. MM). Na obrázku 4 můžeme vidět, že u kultivaru MM byla míra procenta klíčivosti podobná (až na koncentraci $-12 \mu\text{mol/l}$) na modrém i červeném světle. U semen kultivovaných ve tmě byla klíčivost semen největší, až do koncentrace $15 \mu\text{mol/l}$, poté byla podobná jako klíčivost na červeném a modrém světle.



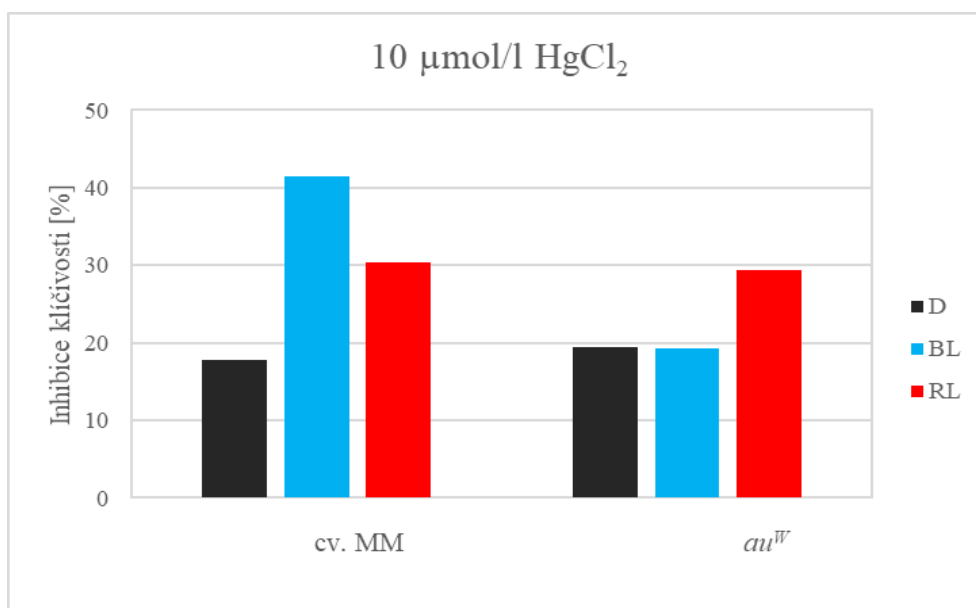
Obrázek 4 – Klíčivost genotypu cv. MM ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna vybranými koncentracemi (0, 10, 12, 15, 20 a $30 \mu\text{mol/l}$) chloridu rtuťnatého (HgCl_2) 7 dní po výsevu. Na grafu je vyobrazen průměr klíčivosti \pm SE vypočítaný ze čtyř (BL) a pěti nezávislých experimentů (RL a D).

Na obrázku 5 je vidět, že klíčivost semen mutanta au^W ve tmě a při kultivaci na modrém a červeném světle byla na základním médiu při absenci $HgCl_2$ podobná. Se zvyšující se koncentrací $HgCl_2$ se klíčivost semen postupně snižovala, a to rovněž podobně na všech testovaných světelných podmínkách.



Obrázek 5 – Klíčivost semen mutanta au^W ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna vybranými koncentracemi (0, 10, 12, 15, 20 a 30 $\mu mol/l$) chloridu rtuťnatého ($HgCl_2$) 7 dní po výsevu. Na grafu je vyobrazen průměr klíčivosti \pm SE vypočítaný ze čtyř (BL) a pěti nezávislých experimentů (RL a D).

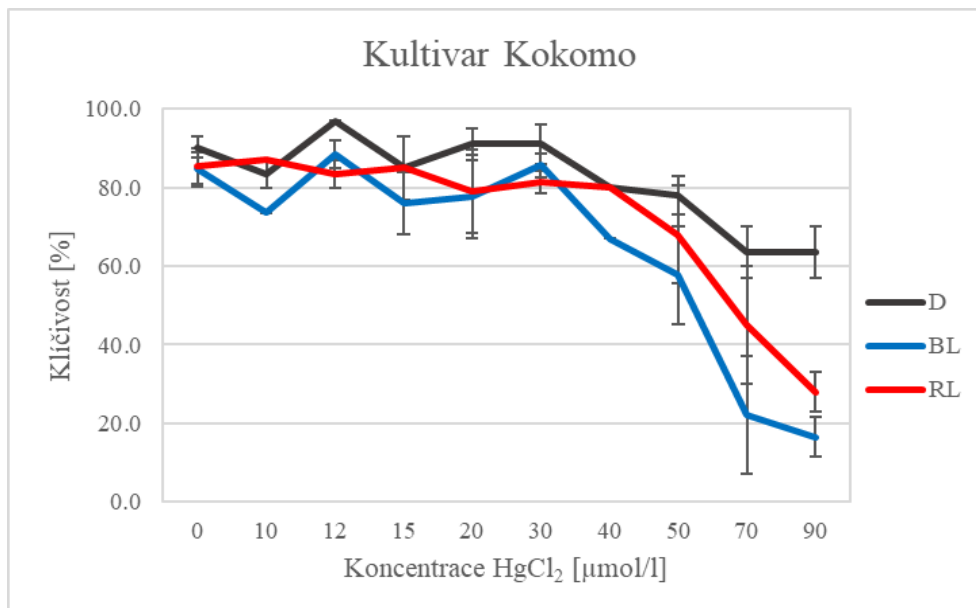
Na obrázku 6 je následně znázorněno porovnání inhibice klíčivosti semen cv. MM a mutanta au^W při koncentraci 10 $\mu mol/l$ $HgCl_2$. Můžeme vidět, že u kultivaru cv. MM byla nejmenší inhibice klíčivosti semen pozorována ve tmě, zatímco byla výrazně (dvojnásobně) zvýšena na modrém světle. Červené světlo zesilovalo citlivost semen k inhibičnímu účinku asi o třetinu. U mutanta au^W byla relativní inhibice klíčivosti vlivem $HgCl_2$ ve tmě a na RL srovnatelná s inhibicí pozorovanou u cv. MM. Na modrém světle však byla inhibice klíčivosti semen mutanta au^W zřetelně nižší než u cv. MM (cca. 20 %). Podobný trend byl pozorován u dalších testovaných koncentrací $HgCl_2$.



Obrázek 6 – Porovnání inhibice klíčivosti genotypu cv. MM a mutantu au^W ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna koncentrací 10 $\mu\text{mol/l}$ HgCl_2 , 7 dní po výsevu. Na obrázku je vyobrazena relativní inhibice vypočítaná z průměrných hodnot klíčivosti získaných ze čtyř (BL) a pěti (RL a D) nezávislých experimentů.

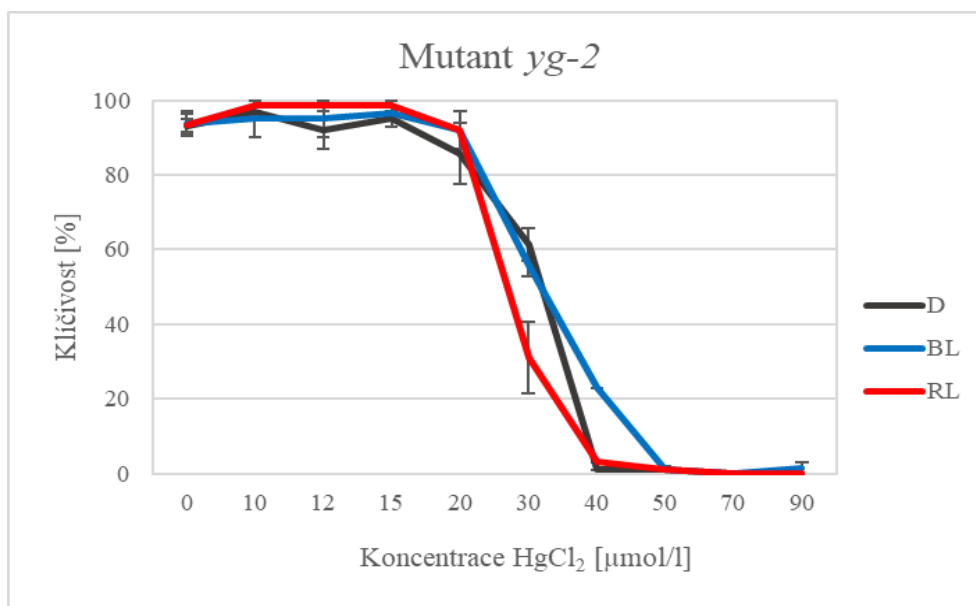
5.2 Vliv světla na citlivost mutantu *yellow green 2* k HgCl_2

Pro tento experiment byla použita mutantní rostlina *yg-2* deficitní v prvním kroku syntézy fytochromového chromoforu (Obr. 10, Diskuze). Byl sledován vliv HgCl_2 a světelných podmínek na klíčivost semen této mutantní rostliny v porovnání s jejím kultivarem cv. Kokomo. Na obrázku 7 je vidět, že ve tmě byla klíčivost semen cv. Kokomo relativně vysoká i při nejvyšší testované koncentraci HgCl_2 (90 $\mu\text{mol/l}$). Naproti tomu, klíčivost semen kultivovaných na modrém a červeném světle se prudce snižovala od koncentrace 30 až 40 $\mu\text{mol/l}$.



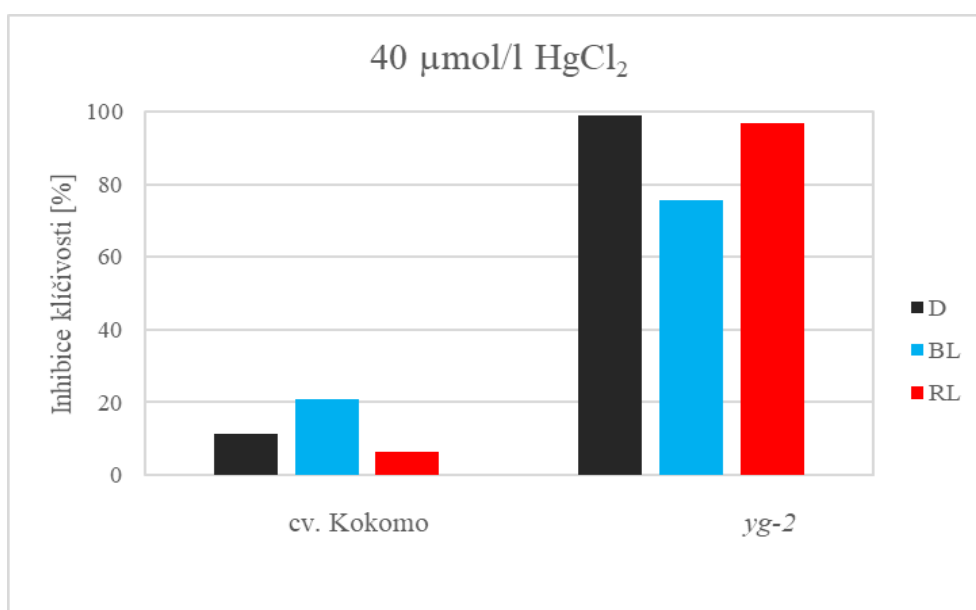
Obrázek 7 – Klíčivost genotypu cv. Kokomo ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna vybranými koncentracemi (0, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 70 a 90 μmol/l) chloridu rtuťnatého (HgCl₂) 7 dní po výsevu. Na grafu je vyobrazen průměr ± SE vypočítaný z pěti nezávislých experimentů.

Na obrázku 8 můžeme vidět, že semena mutantu *yg-2* byla tolerantní k HgCl₂ asi do koncentrace 15 μmol/l, ale od koncentrace 20 μmol/l se klíčivost semen prudce snižovala, podobně za všech testovaných světelných podmínek. Semena pak nebyla schopna klíčit již zhruba od koncentrace 40 až 50 μmol/l.



Obrázek 8 – Klíčivost mutantu *yg-2* ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna vybranými koncentracemi (0, 10, 12, 15, 20, 30, 40, 50, 70 a 90 μmol/l) chloridu rtuťnatého (HgCl₂) 7 dní po výsevu. Na grafu je vyobrazen průměr ± SE vypočítaný z pěti nezávislých experimentů.

Na obrázku 9 je následně znázorněno porovnání inhibice klíčivosti semen kultivaru Kokomo a mutantní rostliny *yg-2* při koncentraci 40 $\mu\text{mol/l}$ HgCl_2 . Můžeme vidět, že u kultivaru Kokomo byla nejmenší inhibice klíčivosti semen pozorována na červeném světle, o něco vyšší byla ve tmě a největší byla pozorována při kultivaci na modrém světle (cca. 20 %). U mutantu *yg-2* byly inhibice klíčivosti vlivem stejné koncentrace HgCl_2 mnohonásobně vyšší bez ohledu na testované světelné podmínky. Ve tmě a na červeném světle dosahovala relativní inhibice cca 95 %, zatímco na modrém světle byla relativní inhibice klíčivosti semen mutantu *yg-2* znatelně nižší (cca. 75 %) než ve tmě a na červeném světle, ale přesto o mnoho vyšší než u kultivaru Kokomo na modrém světle.

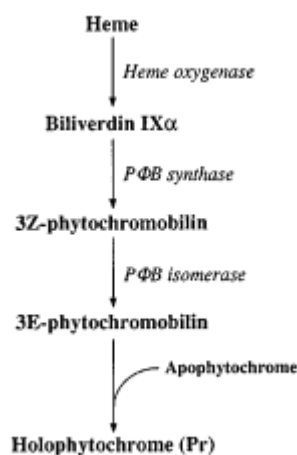


Obrázek 9 – Porovnání inhibice klíčivosti genotypu cv. Kokomo a mutantu *yg-2* ve tmě, na červeném a modrém světle ovlivněna koncentrací 40 $\mu\text{mol/l}$ HgCl_2 , 7 dní po výsevu. Na obrázku je vyobrazena relativní inhibice vypočítaná z průměrných hodnot klíčivosti získaných z pěti nezávislých experimentů.

6 Diskuze

V experimentální části bakalářské práce jsem se zabývala vlivem chloridu rtuťnatého (HgCl_2), inhibitoru akvaporinů, na klíčení semen rajčete jedlého *Solanum lycopersicum* L. s cílem zjistit, zda jsou akvaporiny v tomto procesu zapojeny. Experimenty byly prováděny ve tmě, na modrém a červeném světle, abychom zjistili, zda může být citlivost semen k HgCl_2 regulována světlem. Z výsledků by se pak dalo usuzovat, zda světlo je schopno regulovat aktivitu akvaporinů. Pro experimentální část byl použit genetický přístup, který spočíval v analýze klíčivosti mutantů *aurea* (au^W) a *yellow green 2* (*yg-2*) s defekty v biosyntéze fytochromového chromoforu. Tyto experimenty by mohly odhalit, zda regulace akvaporinů vlivem světla může být zprostředkována fotoreceptory fytochromy.

Mutantní rostliny au^W a *yg-2* studovali Terry a Kendrick (1996) a Kendrick *et al.* (1997). Mutant *aurea* rajčete deficitní v syntéze fytochromového chromoforu je používán pro studium funkce různých druhů fotoreceptorů v řízení vývoje vyšších rostlin, převážně se ale používá ke studiu fytochromů. Analýzou bylo zjištěno, že tyto mutanti jsou deficitní v syntéze fytochromového chromoforu. Přesněji, mutant au^W má deficit v PΦB syntéze, tudíž nedochází k přeměně biliverdinu IX α na 3Z-phytochromobilin a nevzniká chromofor, a *yg-2* má deficit v prvním kroku enzymatické přeměně hemu pomocí hemové oxygenázy na biliverdin IX α (Obr. 10; Terry a Kendrick, 1996).



Obrázek 10 – Postup a jednotlivé kroky biosyntézy fytochromového chromoforu (převzato z Terry and Kendrick, 1996).

Tyto mutantní rostliny mají podobný fenotyp jako mutanti *hy1* a *hy2* u *Arabidopsis* a mutant *pcd1* u hrachu. Semenačky mutantu rajčete *fri*, které jsou deficitní ve fytochromu A, obsahují zjizitelnou hladinu stabilního fotoreverzibilního fytochromu, který není přítomen v au^W , což dokazuje, že tato mutantní rostlina je deficitní v jiných fytochomech než PhyA. (Terry and Kendrick, 1996). Pouze nízká reakce mutantní rostliny *aurea* na R

a FR spektrum světla naznačuje, že *au^W* je mutantem ve chromoforové části fytochromu. Na základě studií s *Arabidopsis* bylo zjištěno, že tyto vlnové délky jsou zachycovány pomocí PhyB a PhyA částmi chromoforu. U mutantu *au^W* rostliny s pozměněným genotypem je velká pravděpodobnost, že bude mít deficit ve všech fytochomech, což zabraňuje určení funkcí jednotlivých fytochromových genů v rajčatech (Kendrick et al., 1997).

Výsledky našich experimentů ukázaly, že inhibitor akvaporinů, HgCl₂, významně redukuje klíčení semen bez ohledu na světelné podmínky. Výsledky tedy naznačují, že akvaporiny jsou důležité pro klíčení semen rajčete. V našich experimentech bylo dále zjištěno, že citlivost semen cv. MM k nižším koncentracím inhibitoru akvaporinů HgCl₂ (10 až 12 μmol/l) byla na modrém světle ve srovnání s citlivostí semen kultivovaných ve tmě výrazně zvýšena. Tento jev však nebyl pozorován u mutantu *au^W* a mutant tedy vykazoval na modrém světle značnou toleranci k HgCl₂. Je tedy evidentní, že mutace v PΦB syntéze vede k určité a na modrém světle specifické toleranci k HgCl₂. Zvýšená citlivost cv. MM k HgCl₂ na modrém světle může být vysvětlena např. tím, že by modré světlo mohlo snižovat syntézu akvaporinů (snižovat expresi genů kódujících akvaporiny). Tím by HgCl₂ aplikovaný v nižší koncentraci snadněji (rychleji) akvaporiny zablokoval. Je také možné, že by modré světlo prostřednictvím chromoforu mohlo měnit vlastnosti akvaporinů a tím zvyšovat jejich citlivost (náchylnost) k vazbě HgCl₂. Defekt v syntéze chromoforu u mutantu *au^W* vede ke sníženému příjmu signálu modrého světla. Mutant *au^W* by tedy mohl mít vyšší hladinu akvaporinů, nebo nižší citlivost akvaporinů k HgCl₂ což by vysvětlovalo jeho toleranci k tomuto inhibitoru.

V případě semen kultivaru Kokomo, od kterého byl odvozen mutant *yg-2*, bylo zjištěno, že jsou ve srovnání se semeny cv. MM mnohem tolerantnější k HgCl₂. U kultivaru cv. MM stačila ve tmě koncentrace 30 μmol/l ke 100% inhibici klíčivosti semen, kdežto u kultivaru Kokomo bylo zapotřebí za stejných světelných podmínek koncentrace 90 μmol/l HgCl₂ k inhibici klíčivosti pouze 30 %. Výsledky dále ukázaly, že u cv. Kokomo modré světlo zvyšovalo citlivost semen k vyšším koncentracím HgCl₂. Tento jev nebyl pozorován u mutantu *yg-2*, protože tato mutace vedla k velmi silné citlivosti semen k inhibitoru už ve tmě (Obr. 8). Je tedy evidentní, že mutace v prvním kroku biosyntézy fytochromového chromoforu, tedy mutace v genu pro hem oxygenázu měla za následek výrazné zvýšení citlivosti semen k HgCl₂. Lze tedy spekulovat, že tento gen (a jeho produkt) je nějak zapojen v biosyntéze (aktivitě) akvaporinů, nebo obecně ve fungování akvaporinů, a to bez ohledu na světelné podmínky.

V minulých letech se podobným tématem zabývala například Eliška Hlaváčová (2019), která zkoumala vliv světelných podmínek a HgCl_2 na klíčení tří fotomorfogenních mutantů *tri1*, *fri1* a *hp1*, sledovala jejich maximální klíčivost a míru inhibice. Ve své bakalářské práci potvrdila, že fytochromy jsou zapojeny do procesu klíčení a zjistila, že funkční PhyB1 ve tmě snižuje citlivost klíčení semen k HgCl_2 a naopak, že funkční PhyA zvyšuje citlivost semen k HgCl_2 . Dalším, kdo zkoumal reakce fotomorfogenních mutantů rajčete ke chloridu rtuťnatému v závislosti na světelných podmínkách byla Jana Zaoralová (2007), která ve své diplomové práci zkoumala zapojení akvaporinů v růstu rostlin. Ve své práci testovala rostliny rajčete, které mají mutaci v receptoru pro modré světlo kryptochromu *CRY1*, nebo rostliny s mutací v genu *7B-1*, které mají defekt v signalizaci modrého světla prostřednictvím fototropinů a které ukazují toleranci k abiotickým stresům na modrém světle. Ve své práci zjistila, že akvaporiny jsou pozitivně zapojeny v růstu rostlin. Na úrovni růstu hypokotylu pak zjistila, že gen *7B-1* není pravděpodobně zapojen v reakcích rostlin k HgCl_2 a neovlivňuje aktivitu či množství akvaporinů. Její výsledky však potvrdily, že na červeném i modrém světle má HgCl_2 větší inhibiční účinek na růst rostlin rajčete. Na základě svých výsledků došla k závěru, že citlivost hypokotylů rostlin rajčete k HgCl_2 je ovlivňována světlem prostřednictvím fotoreceptoru *CRY1*.

7 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda je v podmínkách *in vitro* citlivost semen k inhibitoru akvaporinů HgCl_2 ovlivněna světlem a pokud ano, zda může být vliv světla zprostředkován fytochromy. Pro experimentální část byl použit genetický přístup, při kterém byly zkoumány fotomorfogenní mutantní rostliny *aurea* a *yellow green 2* deficitní ve fytochromovém chromoforu. Na základě výsledků této bakalářské práce bylo zjištěno, že akvaporiny hrají roli v procesu klíčení semen rajčete a že jejich aktivita je pravděpodobně regulována světlem prostřednictvím fotoreceptorů fytochromů.

V našich experimentech bylo zjištěno, že citlivost semen cv. MM (od kterého byl odvozen mutant *au*^W) k nižším koncentracím inhibitoru akvaporinů HgCl_2 byla zvýšena na modrém světle, z čehož bylo odvozeno že mutace v PΦB syntáze vede na modrém světle ke specifické toleranci k HgCl_2 . Výsledky experimentů s mutantem *yg-2* pak vedou k hypotéze (nebo spekulaci), že gen (a jeho produkt) pro hem oxygenázu, enzym prvního kroku biosyntézy chromoforu, je pravděpodobně zapojen v biosyntéze (aktivitě) akvaporinů nebo ve fungování akvaporinů, a to bez ohledu na světelné podmínky. Pro potvrzení této domněnky by bylo potřeba dalšího výzkumu

Výsledky našich experimentů ukázaly, že inhibitor akvaporinů, HgCl_2 , významně redukuje klíčení semen bez ohledu na světelné podmínky. Výsledky tedy naznačují, že akvaporiny jsou důležité pro klíčení semen rajčete a také vedou k hypotéze, že fotoreceptory fytochromy jsou zapojené v biosyntéze či fungování akvaporinů.

8 Zdroje

- ARANA, M. V., BURGIN, M. J., DE MIGUEL, L. C. & SANCHEZ, R. A. 2007. The very low-fluence and high-irradiance responses of the phytochromes have antagonistic effects on germination, mannan-degrading activities, and DfGA3ox transcript levels in *Datura ferox* seeds. *Journal of Experimental Botany*, 58, 3997-4004.
- BALARYNOVA, J. & FELLNER, M. 2019. Expression of genes encoding PIP aquaporins in tomato seeds exposed to blue radiation and mercury. *Biologia plantarum*, 63, 1-10.
- BALARYNOVÁ, J., DANIHLÍK, J. & FELLNER, M. 2018. Changes in plasma membrane aquaporin gene expression under osmotic stress and blue light in tomato. *Acta Physiologiae Plantarum*, 40, 1-8.
- CHRISTIE, J. M. 2007. Phototropin blue-light receptors. *Annual Review Plant Biology*, 58, 21-45.
- EL-ESAWI, M., ARTHAUT, L.-D., JOURDAN, N., D'HARLINGUE, A., LINK, J., MARTINO, C. F. & AHMAD, M. 2017. Blue-light induced biosynthesis of ROS contributes to the signaling mechanism of Arabidopsis cryptochrome. *Scientific Reports*, 7, 1-9.
- EMBORG, T. J., WALKER, J. M., NOH, B. & VIERSTRA, R. D. 2006. Multiple Heme Oxygenase Family Members Contribute to the Biosynthesis of the Phytochrome Chromophore in Arabidopsis. *Plant Physiology*, 140, 856-868.
- HAN, Y. J., SONG, P. S. & KIM, J. I. 2007. Phytochrome-mediated photomorphogenesis in plants. *Journal of Plant Biology*, 50, 230-240.
- HENNIG, L., STODDART, W. M., DIETERLE, M., WHITELAM, G. C. & SCHÄFER, E. 2002. Phytochrome E Controls Light-Induced Germination of Arabidopsis. *Plant Physiology*, 128, 194-200.
- JENKINS, G. I. 2014. The UV-B Photoreceptor UVR8: From Structure to Physiology. *Plant Cell*, 26, 21-37.
- JONES, M. A. & CHRISTIE, J. M. 2008. Phototropin receptor kinase activation by blue light. *Plant Signaling & Behavior*, 3, 44-46.
- KENDRICK, R. E., KERCKHOFFS, L. H. J., VANTUINEN, A. & KOORNNEEF, M. 1997. Photomorphogenic mutants of tomato. *Plant Cell and Environment*, 20, 746-751.
- KOORNNEEF, M., CONE, J. W., DEKENS, R. G., O'HERNE-ROBERTS, E. G., SPRUIT, C. J. P. & KENDRICK, R. E. 1985. Photomorphogenic responses of long hypocotyl mutants of tomato. *Journal of Plant Physiology*, 120, 153-165.
- LEE, K. P., PISKUREWICZ, U., TUREČKOVÁ, V., CARAT, S., CHAPPUIS, R., STRNAD, M., FANKHAUSER, C. & LOPEZ-MOLINA, L. 2012. Spatially and genetically distinct control of seed germination by phytochromes A and B. *Genes & Development*, 26, 1984-1996.
- LIANG, T., YANG, Y. & LIU, H. 2019. Signal transduction mediated by the plant UV-B photoreceptor UVR8. *New Phytologist*, 221, 1247-1252.
- MAUREL, C., SANTONI, V., LUU, D. T., WUDICK, M. M. & VERDOUCQ, L. 2009. The cellular dynamics of plant aquaporin expression and functions. *Current Opinion in Plant Biology*, 12, 690-698.
- MAUREL, C., VERDOUCQ, L., LUU, D. T. & SANTONI, V. 2008. Plant aquaporins: Membrane channels with multiple integrated functions. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 595-624.

- MOGLICH, A., YANG, X. J., AYERS, R. A. & MOFFAT, K. 2010. Structure and Function of Plant Photoreceptors. *Annual Review of Plant Biology*, 61, 21-47.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIO ASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.
- PONNU, J. 2020. Molecular mechanisms suppressing ubiquitin ligase activity in blue light. *Physiologia Plantarum*, 169, 418-429.
- RAZEM, F. A., BARON, K. & HILL, R. D. 2006. Turning on gibberellin and abscisic acid signaling. *Current Opinion in Plant Biology*, 9, 454-459.
- SHAO, H. B., CHU, L. Y., SHAO, M. A. & ZHAO, C. X. 2008. Advances in functional regulation mechanisms of plant aquaporins: Their diversity, gene expression, localization, structure and roles in plant soil-water relations (review). *Molecular Membrane Biology*, 25, 179-191.
- SHIOTA, H., SUDOH, T. & TANAKA, I. 2006. Expression analysis of genes encoding plasma membrane aquaporins during seed and fruit development in tomato. *Plant Science*, 171, 277-285.
- SHUAI, H. W., MENG, Y. J., LUO, X. F., CHEN, F., ZHOU, W. G., DAI, Y. J., QI, Y., DU, J. B., YANG, F., LIU, J., YANG, W. Y. & SHU, K. 2017. Exogenous auxin represses soybean seed germination through decreasing the gibberellin/abscisic acid (GA/ABA) ratio. *Scientific Reports*, 7, 1-11.
- SMITH, H. & WHITELAM, G. C. 1997. The shade avoidance syndrome: multiple responses mediated by multiple phytochromes. *Plant, Cell and Environment*, 20, 840-844.
- STROUD, R. M., MIERCKE, L. J., O'CONNELL, J., KHADEMI, S., LEE, J. K., REMIS, J., HARRIES, W., ROBLES, Y. & AKHAVAN, D. 2003. Glycerol facilitator GlpF and the associated aquaporin family of channels. *Current Opinion in Plant Biology*, 13, 424-31.
- TERRY, M. J. 1997. Phytochrome chromophore-deficient mutants. *Plant Cell and Environment*, 20, 740-745.
- TERRY, M. J. & KENDRICK, R. E. 1996. The aurea and yellow-green-2 mutants of tomato are deficient in phytochrome chromophore synthesis. *Journal of Biological Chemistry*, 271, 21681-21686.
- VANDER WILLIGEN, C., POSTAIRE, O., TOURNAIRE-ROUX, C., BOURSIAIC, Y. & MAUREL, C. 2006. Expression and inhibition of aquaporins in germinating Arabidopsis seeds. *Plant and Cell Physiology*, 47, 1241-1250.
- VOITSEKHOVSKAJA, O. V. 2019. Phytochromes and Other (Photo)Receptors of Information in Plants. *Russian Journal of Plant Physiology*, 66, 351-364.
- WANG, Q., ZUO, Z. C., WANG, X., LIU, Q., GU, L. F., OKA, Y. & LIN, C. T. 2018. Beyond the photocycle - how cryptochromes regulate photoresponses in plants? *Current Opinion in Plant Biology*, 45, 120-126.
- WUDICK, M. M., LUU, D. T. & MAUREL, C. 2009. A look inside: localization patterns and functions of intracellular plant aquaporins. *New Phytologist*, 184, 289-302.
- YANG, L. W., LIU, S. R. & LIN, R. C. 2020. The role of light in regulating seed dormancy and germination. *Journal of Integrative Plant Biology*, 62, 1310-1326.