



UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Laboratoř růstových regulátorů

**Fytochromy a jejich úloha v regulaci
aniontových kanálů v průběhu klíčení
semen**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Martin Mokrý
Studijní program:	B1501 Experimentální biologie
Studijní obor:	Experimentální biologie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odevzdání práce:	2021

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora:	Martin Mokrý
Název práce:	Fytochromy a jejich úloha v regulaci aniontových kanálů v průběhu klíčení semen
Typ práce:	Bakalářská
Pracoviště:	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce:	2021

Abstrakt:

Cílem bakalářské práce bylo pomocí farmakologického a genetického přístupu vyšetřovat, zda světlo prostřednictvím fytochromů může ovlivňovat aktivitu aniontových kanálů v průběhu klíčení semen rajčete (*Solanum lycopersicum L.*). V podmínkách *in vitro* byla semena fotomorfogenních mutantů *tri1*, *au^W* a *yg-2* ovlivněna inhibitory aniontových kanálů 9-AC a DIDS, a to v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo). Výsledky experimentů naznačují, že aniontové kanály jsou zapojeny v klíčení semen rajčete ve tmě i na světle. Výsledky rovněž ukázaly, že modré a červené světlo zesiluje inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen rajčete. To vedlo k hypotéze, že světlo zvyšuje citlivost kanálů k 9-AC a/nebo snižuje počet 9-AC-citlivých aniontových kanálů. Semena mutantů *yg-2* a *au^W* byla na světle tolerantnější k 9-AC než kontrolní genotypy, což by mohlo znamenat, že světlo zesiluje reakci semen k 9-AC prostřednictvím fytochromového chromoforu. Experimenty s mutantem *tri1* pak naznačují, že funkční fotoreceptor PhyB1 i v neaktivované formě ovlivňuje aktivitu 9-AC-citlivých aniontových kanálů. Inhibitor DIDS neměl na klíčení semen výrazný účinek, což napovídá, že na DIDS-citlivé kanály nejsou v procesu klíčení semen rajčete významně zapojeny.

Klíčová slova:	aniontový kanál, fotoreceptor, fytochrom, inhibitor aniontových kanálů, klíčení semen, rajče, světlo
Počet stran:	51
Jazyk:	Český

Bibliographical identification

Author's full name: Martin Mokrý
Title of thesis: Role of phytochromes in regulation of anion channels during seed germination
Type of thesis: Bachelor
Department: Laboratory of Growth Regulators
Supervisor: prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation: 2021

Abstract:

The aim of the bachelor thesis was to investigate using a genetic and pharmacological approaches whether light through phytochromes can influence the activity of anion channels during germination of seeds in tomato (*Solanum lycopersicum L.*). In conditions *in vitro*, seeds of photomorphogenic mutants *tri1*, *au^w* and *yg-2* were treated by anion channel inhibitors 9-AC and DIDS as a function of light conditions (dark, blue and red light). The results of the experiments suggest that anion channels are involved in the germination of tomato seeds in the dark as well as in light. The results also showed that blue and red light amplifies the inhibitory effect of 9-AC on tomato seed germination. This led to the hypothesis that light increases the sensitivity of channels to 9-AC and/or reduces the number of 9-AC-sensitive anion channels. Seeds of *yg-2* and *au^w* mutants were more tolerant than control genotypes to 9-AC in light, which could mean that light enhances the seed response to 9-AC via the phytochrome chromophore. Experiments with the *tri1* mutant then suggest that functional PhyB1 even in the inactivated form influences the activity of 9-AC-sensitive anion channels. The inhibitor DIDS did not have a significant effect on seed germination, suggesting that DIDS-sensitive channels are not significantly involved in the tomato seed germination.

Keywords: anion channel, anion channel inhibitor, light, photoreceptor, phytochrome, seed germination, tomato
Number of pages: 51
Language: Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracoval samostatně pod vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a za použití citované literatury.

V Olomouci dne.....

podpis.....

Poděkování

Tímto bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Martinu Fellnerovi, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, konzultace, čas a vstřícný přístup, které mi během přípravy a vypracování bakalářské práce věnoval. Taktéž bych chtěl poděkovat celé Skupině molekulární fyziologie za příjemné a přátelské pracovní prostředí, zejména Bc. Janě Glogarové, Mgr. Tereze Miksteinové a Ing. Veronice Krbečkové, PhD. za veškerou pomoc s experimenty.

Obsah

Seznam zkratek	7
1 Úvod a cíle práce.....	8
2 Současný stav řešené problematiky	9
2.1 Fotomorfogeneze	9
2.2 Fotoreceptory	10
2.3 Fytochromy.....	11
2.3.1 Vliv fytochromů na genovou expresi	13
2.4 Dormance semen	15
2.5 Klíčení semen.....	16
2.5.1 Klíčení semen v závislosti na světelných podmínkách.....	17
2.6 Iontové kanály	20
2.6.1 Vliv světla na aktivitu aniontových kanálů	21
2.6.2 Inhibitory aniontových kanálů.....	23
3 Materiál a metodika	25
3.1 Příprava MS média.....	27
3.2 Povrchová sterilizace semen	27
3.3 Příprava média obsahujícího inhibitory	27
3.4 Výsev semen	28
3.5 Vyhodnocení experimentu	28
4 Výsledky	29
4.1 Klíčení semen <i>tri1</i> a cv. GT v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC	29
4.2 Klíčení semen <i>tri1</i> a cv. GT v závislosti na světle a inhibitoru DIDS.....	31
4.3 Klíčení semen <i>au^w</i> a cv. MM v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC	34
4.4 Klíčení semen <i>au^w</i> a cv. MM v závislosti na světle a inhibitoru DIDS.....	36
4.5 Klíčení semen <i>yg-2</i> a cv. Kokomo v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC	39
4.6 Klíčení semen <i>yg-2</i> a cv. Kokomo v závislosti na světle a inhibitoru DIDS.....	41
5 Diskuse.....	44
6 Závěr	47
Seznam použité literatury	48

Seznam zkratek

ABA, GA	abscisic acid, gibberellic acid (kyselina abscisová, kyselina gibberelová)
ABI3, GAI	ABA-Insensitive 3, GA-Insensitive (transkripční faktory)
COP1	constitutive photomorphogenic 1 (transkripční regulátor)
CRY1-3	cryptochrome1-3 (krytochromy 1-3, receptory pro modré světlo)
<i>DAG1</i>	doe affecting germination1 (gen pro transkripční faktor)
DIDS, 9-AC	4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbendisulfonová kyselina, anthracen-9-karboxylová kyselina
<i>DOG1</i>	delay of germination (gen pro zpoždění klíčení)
GA3ox1,2	gibberellin 3-oxidase 1, 2 (giberelin 3-oxidáza 1, 2 enzymy)
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid (2-ethansulfonová kyselina)
MS médium	Murashige a Skoog médium
PhyA-E	phytochrome A-E (fytochromy A-E, receptory červeného světla)
PIF	phytochrome-interacting factor (fytochrom-interagující faktor)
P _R , P _{FR}	phytochrom red, far-red (neaktivní a aktivní forma fytochromu)
R, FR	red, far-red (červené světlo do 660 nm, dlouhovlnné červené světlo do 730 nm)
RGL2	RGA-like 2 (transkripční faktor)
RVE1	reveille1 factor (transkripční faktor)
UVR8	UV resistance locus 8 (receptor pro UV-B oblast světla)

1 Úvod a cíle práce

Obecným cílem bakalářské práce bylo pomocí farmakologického a genetického přístupu zjistit, zda světlo prostřednictvím fytochromů může ovlivňovat aktivitu anionových kanálů v průběhu klíčení semen.

V teoretické části byly shromážděny literární zdroje zaměřené na danou problematiku v oblasti klíčení semen, světelné signalizace rostlin a anionových kanálů rostlin. K tomuto tématu byla vypracována literární rešerše.

Experimentálním cílem bakalářské práce bylo studium citlivosti klíčení semen mutantů rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) k inhibitorům anionových kanálů (9-AC a DIDS) v závislosti na světelných podmínkách (tma, modré a červené světlo). Experimentální část práce byla prováděna v Laboratoři růstových regulátorů Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého ve skupině Molekulární fyziologie pod odborným vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D.

2 Současný stav řešené problematiky

2.1 Fotomorfogeneze

Sluneční světlo rostlinám neslouží pouze jako zdroj energie pro fotosyntézu, ale i jako signál regulující různé vývojové procesy (Taiz et al. 2015). Tyto procesy zahrnují klíčení semen, růst závislý na světle a stínu, zrání plodů a senescenci. Sluneční světlo taktéž poskytuje informace pro pohyb rostlin, jako například pohyb listů za světlem během pohybu slunce po obloze. Taktéž je znám fototropismus, jakožto růst rostliny směrem k přicházejícímu světlu, pokud je rostlina umístěna ve stínu. V závislosti na intenzitě a kvalitě světla a ve spolupráci s dalšími vnějšími faktory jsou rostliny schopné reagovat na měnící se okolní podmínky (Jones et al. 2013).

Rostliny jsou citlivé k sezónním, denním a momentálním změnám světelných podmínek (Jones et al. 2013). Pokud rostlina roste mimo světelné podmínky, dochází u ní k takzvané etiolizaci. Tento typ růstu je pak nazýván skotomorfogeneze. Rostliny rostoucí na světle pak podstupují opačný proces fotomorfogeneze. Ta je definována jako reakce na světlem zprostředkovaný signál pro růst a vývoj rostliny, který je tvořen v odpovědi na aktivaci fotoreceptorů světlem (Teixeira 2020). Mezi fotomorfogenické fyziologické odpovědi na světlo řadíme klíčení semen, de-etiolizaci, vyhýbání se stínu, cirkadiánní rytmy a kvetení.

Rostliny jsou schopné zachytávat informaci udávanou fotony viditelného světla, které v nich interagují s molekulami nazývanými pigmenty (Jones et al. 2013). Pigmenty jsou pro lidské oko barevné, protože selektivně pohlcují jen určité vlnové délky viditelného spektra. Zachycením fotonu s dostatečnou energií se tyto atomy a molekuly mohou excitovat. To vede k fyzikálním změnám v příslušných molekulách, což může vést k dalším dějům zapadajícím do signálních kaskád a následným odpovědím rostlin na světlo. Taktéž to může vést k absorpci energie fotonu a přeměně této energie v energii chemické vazby, která je dále využívána rostlinou pro různé metabolické děje.

Růst a vývoj rostlin, jejich fyziologie a obrany jsou flexibilní děje závislé na jejich vnímání vnějšího i vnitřního prostředí (Buchanan et al. 2015). Na buněčné úrovni jsou detekovány fyzické a chemické změny příslušnými receptory, které následně iniciují transdukcí signálu vnitrobuněčnými cestami. Ty pak kontrolují vnitrobuněčné procesy a chování buněk. Receptory taktéž mohou iniciovat transdukcí signálu mimobuněčnými cestami nebo signálními kaskádami, které vedou k odpovědím na signál z receptorů nad buněčnou úrovní. Takto jsou následně koordinovaně ovlivňována rostlinná pletiva, orgány a rostlina jako celek.

2.2 Fotoreceptory

Všechny odpovědi na světlo, včetně odpovědi na světlo v UV oblasti, jsou zprostředkovány skrze na světlo citlivé receptory (Taiz et al. 2015). Světelné receptory rostlin reagují na odpovídající specifické vlnové délky světla, které je ozařují. To spouští signální transdukcí vedoucí ke změnám ve vývoji a fyziologii rostliny. Tato transdukcí signálu pak většinou zahrnuje druhé posly a fosforylační kaskády.

Fotoreceptory absorbují foton o dané vlnové délce a energii a konvertují ho do biochemického signálu, který způsobí specifickou odpověď na světlo (Taiz et al. 2015). S výjimkou UVR8 (UV resistance locus 8) se všechny fotoreceptory skládají z proteinu a světlo absorbující prostetické skupiny nazývané chromofor.

Fotoreceptor pro červenou oblast světla je fytochrom (Paik and Huq 2019). Fytochromy jsou proteiny kovalentně vázané k fytochromobilinovému tetrapyrrolovému rozvinutému kruhu, který má schopnost izomerace v odpovědi na červené světlo a dlouhovlnné červené světlo a indukuje tak změny v proteinové struktuře fytochromu. Fytochromy se mohou nacházet ve dvou isoformách, P_R a P_{FR} (Bae and Choi 2008; Butler et al. 1963). Konverzí mezi těmito formami se mění jejich biologická aktivita a spouští se tak signální kaskáda vedoucí k příslušným odezvám. Fytochromy lze rozdělit na několik druhů (PhyA-E), které byly objeveny u *Arabidopsis* a svým působením se mohou v některých aspektech percepce signálu lišit, navzájem doplňovat nebo zastupovat (Sanchez et al. 2020; Mathews and Sharrock 1997).

Dalším receptorem je takzvaný kryptochrom, sloužící pro detekci světla v oblasti UV-A záření a modrého světla (Paik and Huq 2019). Kryptochromy obsahují molekulu FAD v roli chromoforu. K jejich aktivaci dochází sérií chemických reakcí, jako je fosforylace a dimerizace. Při ozáření modrým světlem dochází u kryptochromu k rapidní fosforylaci, což je považováno za důležitou modifikaci pro jejich funkci. Podobně jako fytochromy pak kryptochromy interagují s příslušnými transkripčními faktory. Podobně jako fytochromy lze rozdělit kryptochromy na více druhů, konkrétně CRY1, CRY2 a CRY3 (Sanchez et al. 2020).

Fototropiny jsou dalšími receptory pro modré světlo (Paik and Huq 2019). Obsahují dvě molekuly flavinmononukleotidu jakožto chromoforu. Fototropiny mají schopnost přímo fosforylovat příslušné substráty skrze svoji c-koncovou serin-threoninovou kinázovou doménu. Fosforylované substráty následně mohou interagovat s dalšími signálními dráhami. Taktéž hrají roli v otevírání průduchů a pohybu chloroplastů v odpovědi na světlo. Mezi nově objevené receptory světla v rostlinách lze zařadit receptor UVR8 (Paik and Huq 2019). Tento receptor reaguje na UV-B oblast světelného spektra a mechanismus jeho aktivace je odlišný od předešlých receptorů. Neobsahuje totiž chromofor, ale zbytky tryptofanu v podobě aromatických kruhů,

navázané na UVR8 proteinu. Při ozáření receptoru příslušnou vlnovou délkou dochází k rozbití UVR8 dimeru a vzniklý monomer proniká do jádra, kde následně působí na příslušné transkripční faktory.

Podle doposud známých poznatků o strukturách, funkcích a mechanismech působení fotoreceptorů rostlin se zdá, že dosud známé fotoreceptory jsou schopné vzájemné spolupráce při vnímání změn prostředí nejen v oblasti světla, ale například i teploty (Sanchez et al. 2020; Paik and Huq 2019). Vzájemné interakce signálních kaskád se pravděpodobně dějí na úrovni transkripčních regulátorů, kde dochází k interakcím aktivních forem různých fotoreceptorů se stejnými regulátory. To se děje například s regulátory PIF nebo COP1.

2.3 Fytochromy

Fytochromy (Phy) jsou světelné receptory přítomné ve všech zelených rostlinách a některých bakteriích a houbách (Buchanan et al. 2015). Fytochromy patří mezi světelné receptory, kontrolující vývoj rostlin již od klíčení (Heldt 2005). Jsou citlivé k červené a modré části spektra a jsou to rozpustné proteiny fungující jako homodimery. Fytochromy jsou biliproteiny složené ze 120kDa apoproteinu a fotoreaktivní prostetické složky chromoforu. Chromofor fytochromů je tvořen otevřeným řetězcem tetrapyrrolu (Heldt. 2005), který při absorpci světla o potřebné vlnové délce mění konfiguraci jedné z dvojných vazeb, mezi pyrrolovými jádry, z konfigurace *trans* na *cis*. To vede ke změně konformace tohoto proteinu.

Neaktivní formou fytochromu je P_R v konfiguraci *trans*, absorbující červené světlo při maximu 660 nm (R), kdy dochází k následné změně konformace a stává se z něj biologicky aktivní P_{FR} forma (Heldt 2005; Taiz et al. 2015). Tato forma může být následně převedena zpět do neaktivní P_R absorpcí záření o maximální vlnové délce 730 nm (FR). Tento jev se nazývá fotoreversibilita a je jednou z nejvýznamnějších vlastností fytochromů. Fotoreversibilita R/FR při klíčení na světlo citlivých semen listového salátu vedla k objevu a izolaci těchto fotoreceptorů (Jones et al. 2013). Taktéž je možná na teplotě závislá relaxace aktivní formy, nazvaná teplotní reversibilita (Paik and Huq 2019; Cheng et al. 2021). To naznačuje, že fytochromy mají schopnost detekce nejméně dvou různých environmentálních změn, tedy změn v intenzitě světla a změn teploty v okolí rostliny.

Fytochrom A je považován za fotolabilní fytochrom typu I a podílí se na vývoji sazenic v závislosti na světle a reakcích na stín (Cheng et al. 2021). Fytochromy B až E jsou klasifikovány jako fytochromy typu II a vykazují relativní stabilitu při delším vystavení světlu. Při ozáření FR a R světlem dochází u PhyA a PhyB k translokaci do jádra, což vede k fosforylaci a rychlé degradaci PIF faktorů, jakožto negativních regulátorů

fotomorfogeního vývoje rostliny (Sun and Ni 2011).

Fytochromy reagují na světelné signály skrze odpovědi, které byly rozděleny v závislosti na jejich charakteristice na VLFR (very-low-fluence responses), LFR (low-fluence responses) a FR-HIR (far-red high-irradiance responses) odpovědi (Shinomura et al. 2000; Sullivan, et al. 2003). Odpovědi LFR závisí převážně na PhyB a jsou R/FR fotoreversibilní. Odpovědi VLFR a FR-HIR jsou hlavně závislé na PhyA a nepodporují fotoreversibilitu (Possart et al. 2014).

U *Arabidopsis* se vyskytuje pět známých fytochromů (PhyA-E), které jsou kódovány příslušnými geny (*PHYA-E*) (Mathews and Sharrock 1997). Klíčení je pravděpodobně regulováno fytochromy A a B, bez účasti ostatních fytochromů (Shinomura et al. 1996). Analýza mutantů deficientních ve fytochromu A a B taktéž naznačila, že je jejich působení rozdílné. Fytochromy C, D a E jsou ve své funkci odlišné od fytochromů A a B, což může znamenat, že různé druhy fytochromů interpretují světelný signál různými mechanismy (Yamaguchi et al. 1999).

Schopností PhyA je zachytávat světlo o vlnové délce mezi 300 nm a 780 nm a při vystavení červenému světlu spouštět odpověď na VLFR a tak indukovat klíčení (Shinomura et al. 1996). Taktéž způsobuje inhibici dlouhivého růstu při delším vystavení FR (Boylan and Quail 1991). Hraje důležitou roli při percepci kvality světla a fotoperiodicity (Johnson et al. 1994).

Bylo navrženo, že PhyB má větší vliv na low-fluence responses, než na very-low-fluence responses při klíčení semen *Arabidopsis* (Botto et al. 1995), což znamená kontrolu klíčení PhyB pouze v případech, kdy jsou ostatní zodpovědné fytochromy nefunkční nebo nedostupné. Dále je PhyB nutný pro světlem stimulovanou expanzi buněk v děložních listech *Arabidopsis* (Neff et al. 1994). Fytochrom B hraje taktéž důležitou roli při inkorporaci světelné signalizace při regulaci dormance semen a jejich klíčení (Yang et al. 2020a). Taktéž byla zjištěna funkce PhyB jako teplotního senzoru zodpovídajícího za odpovědi rostlin na teplotní změny okolního prostředí formou termomorfogeneze (Paik and Huq 2019; Casal et al. 2019).

Fytochrom C je pravděpodobně zodpovědný za deetiolizaci sazenic a ovlivňování plochy listů a délky a obvodu stonku u dospělých rostlin (Halliday et al. 1997; Qin et al. 1997). Při nadměrné expresi fytochromů A a B a nadměrné expresi fytochromu C byl pozorován antagonistický vliv na rostliny tabáku, což může vést k domněnce, že tyto fytochromy jsou částečně zodpovědné za některé aspekty vegetativního vývoje rostlin. Fytochrom C taktéž negativně působí na světelnou regulaci klíčení semen rostlin (Carrera-Castaño et al. 2020).

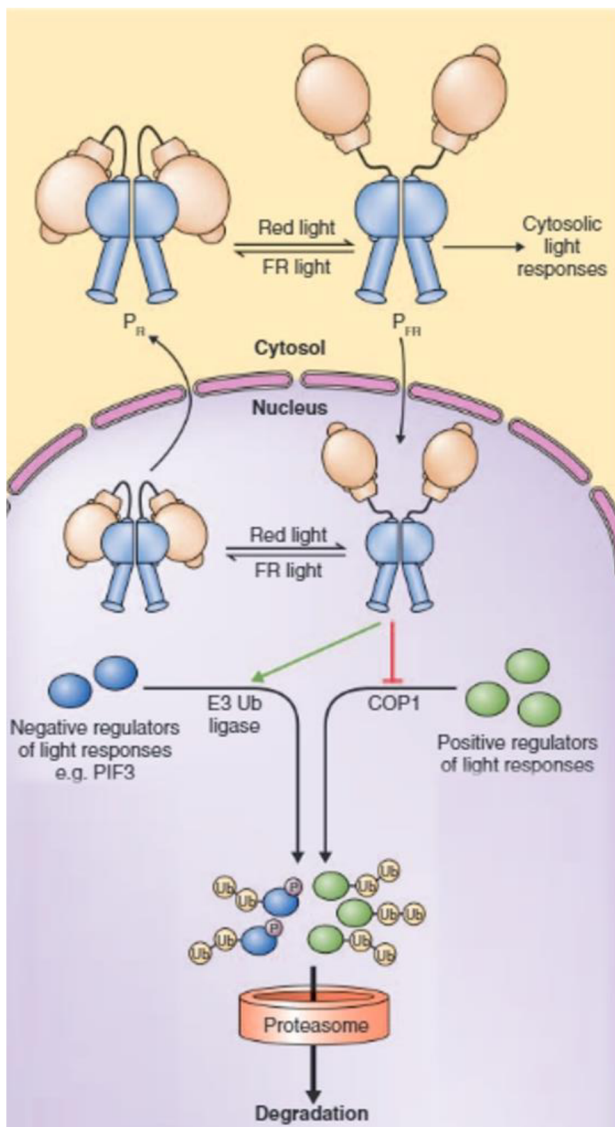
Fytochrom D je ve své funkci velmi podobný PhyB, avšak PhyB hraje v odpovědi na červené světlo blízké vlnové délky (R) mnohem větší roli (Aukerman et al. 1997). Fylogeneze genů zodpovědných za syntézu fytochromů u *Arabidopsis* ukázala, že PhyB

a PhyD pochází z genové duplikace a tím pádem se jejich funkce výrazně překrývají (Mathews et al. 1995).

Fytochrom E pravděpodobně kontroluje hladiny signálních meziproductů, vyžadovaných pro indukci klíčení skrze PhyA, nebo alternativně může PhyE fungovat jako dodatečný receptor pro FR (Hennig et al. 2002). Je pravděpodobné, že PhyB, PhyD a PhyE jsou od sebe odvozené fytochromy a podílí se společně například na inhibici kvetení rostlin (Devlin et al. 1998).

Fytochromy C, D a E jsou zapojeny do regulace R/FR fotomorfogeneze *Arabidopsis* (Ádám et al. 2013). Dále komplementární funkce PhyA a PhyB při ozáření R a FR světlem jsou možná schopné zajišťovat regulaci růstu sazenic po proniknutí půdou (Quail et al. 2002).

2.3.1 Vliv fytochromů na genovou expresi



Obrázek 1: Zobrazení fotokonverze fytochromu, jeho přechodu do jádra a působení na regulátory genové transkripce. Převzato a upraveno z Jones et al. 2013

Fytochromy v součinnosti s dalšími fotoreceptory ovlivňují fyziologii a vývoj rostlin (Buchanan et al. 2015). Fytochromy podávají rostlině informaci o podílu různých vlnových délek červeného a dlouhovlnného červeného světla (R/FR) skrze fotokonverzi molekuly fytochromu (P_R/P_{FR}) (Obr. 1). Fytochromy jsou zodpovědné za různé odpovědi rostlin na světlo, jako jsou klíčení semen, fotomorfogeneze, růst za světlem a čas kvetení (Cheng et al. 2021). Fotokonverze fytochromů například ovlivňuje reakci na stínění ostatními rostlinami, protože listy zelených rostlin absorbují především v oblasti červeného světla a spíše propouští dlouhovlnné červené světlo. Například u *Arabidopsis* to může způsobit inhibici klíčení, nebo po vyklíčení naopak zvýšený růst. Aktivovaná P_{FR} forma je mobilizována a přesouvá se z cytosolu do jádra buňky, kde působí na transkripční faktory (Yamaguchi et al. 1999) (Obr. 1). Fytochromy vyžadují aktivní transport do jádra, například PhyB obsahuje NLS vazebnou doménu, která je odkryta v jeho aktivní formě změnou konformace a umožňuje tak vazbu na jaderné transportní proteiny. Pro různé fytochromy existují různé způsoby transportu do jádra.

Fytochromy mají serinovou a threoninovou kinázovou aktivitu a mohou tak fosforylovat signální proteiny účastnící se transdukce signálu (Buchanan et al. 2015), což vede k aktivaci nebo degradaci příslušných transkripčních faktorů v jádře. Degradovány jsou faktory působící jako negativní regulátory odpovědi rostliny na světelné podmínky, a naopak stabilizovány jsou faktory s pozitivním účinkem regulace odpovědi na světlo. Negativními regulátory jsou například PIFs (phytochrome interacting factors) a bylo identifikováno nejméně šest těchto faktorů interagujících s fytochromy. Jejich fosforylace přímo koreluje s následnou ubiquitinací a degradací 26S proteasomem. Takto je degradován například PIF3 faktor zodpovědný za expresi genů pro etiolizaci (Obr. 1). Naopak pozitivní regulaci vyvolávají fytochromy tím, že blokují ubiquitinaci a následnou degradaci transkripčních faktorů, např. HY5 (elongated hypocotyl 5), LAF1 (long after far-red light 1) či HFR1 (long hypocotyl in far-red 1), podporujících expresi světlem indukovaných genů, které jsou ve tmě jinak degradovány (Yang et al. 2009).

Světlo taktéž aktivuje interakce mezi fytochromy a proteiny s AUXIN/INDOLACETIC ACID (Aux/IAA), ovlivňující auxinem indukovanou degradaci Aux/IAA skrze E3 ligázy (Cheng et al. 2021). To způsobuje represi auxinových signálních drah. Množství Aux/IAA regulátorů auxinem kontrolované exprese je ovlivňováno PhyA a PhyB, které jsou schopné tyto proteiny chránit před auxinem regulovanou proteolytickou degradací.

Fytochromy jsou taktéž schopny autofosforylace a defosforylace (Buchanan et al. 2015), což by mělo poskytovat buňkám rostlin schopnost regulace síly signalizace poskytnuté fytochromy. Světlem indukované změny ve vlastnostech fytochromů jim umožňují interakci s dalšími signálními částicemi, které zahrnují

transkripční faktory a enzymy regulativní dráhy fytochromů, jako například kinázy, fosfatázy, a E3 ligázy (Cheng et al. 2021). To nakonec vede k masivním změnám v transkripci genů. Fytochromy taktéž regulují remodelaci chromatinu, sestřih prekursorové mRNA a translaci, a to zatím málo objasněnými mechanismy.

2.4 Dormance semen

Dormance je proces zrání semen, který zahrnuje jejich dehydrataci a vstoupení do klidové fáze (Taiz et al. 2015). Pro to, aby došlo k vyklíčení těchto semen je nutná jejich rehydratace. Příjem vody je nutný pro vytvoření reakčního prostředí a tím i mobilizaci zásobních látek. Klíčení je taktéž závislé na teplotě a přítomnosti kyslíku, je nutné, aby byla voda v kapalném stavu. Teplota je důležitá pro aktivitu a funkci enzymů štěpících zásobní látky semen.

Dormance je vnitřní zablokování metabolických procesů vedoucích k vyklíčení semene (Taiz et al. 2015). Poskytuje semenům mnoho výhod, mezi které patří maximalizace disperze semen do okolí mateřské rostliny, což redukuje kompetici o živiny a světlo mezi potomky a mateřskou rostlinou (Carrera-Castaño et al. 2020). Také to zabraňuje klíčení v nevhodné roční době nebo za nevhodných vnějších podmínek. Po dozrání semene dochází k procesu velké redukce vody obsažené v semeni v závislosti na původním obsahu vody a vnější teplotě. Primární dormanci lze přisoudit aktivitě kyseliny abscisové (ABA), která spolu s gibereliny vykazuje hormonální řízení biosyntetických cest aktivujících proces klíčení (Taiz et al. 2015). Interakce mezi prostředím mateřské rostliny a jejím genotypem determinuje úroveň primární dormance během zrání semen (Carrera-Castaño et al. 2020). Poté nastupuje sekundární dormance indukovaná nepříznivými podmínkami pro metabolickou aktivitu semen.

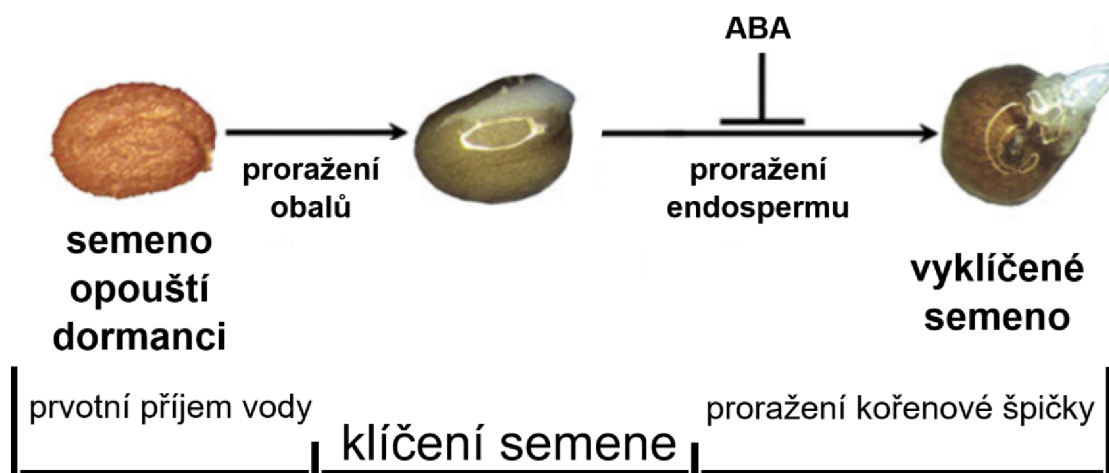
Sekundární dormance může být až několikrát aktivována v závislosti na vnějších podmínkách, dokud nenastane proces klíčení nebo embryo nezahyne (Carrera-Castaño et al. 2020). Může docházet ke střídání hluboké a nízké úrovně dormance v závislosti na sezónních vnějších podmínkách. K tomu dochází prostřednictvím ovlivňování rovnováhy kyseliny abscisové a gibereliny a exprese genu *DOG1*. Dormanci taktéž může být zabráněno pomocí obalů semene, které mohou bránit průniku vody, výměně plynů apod. Analýza QTL (quantitative trait locus) lokusu *Arabidopsis* vedla k identifikaci genů nejspíše specifických pro dormanci semen (Chiang et al. 2013). Jedním z těchto genů je gen *DOG1* (delay of germination) a je exprimován v průběhu vyzrání semen (Bentsink et al. 2006). Ztráta funkčnosti tohoto genu vykazuje ztrátu dormance semen. Tento gen má pozitivní vliv na dormanci semen spolu s dalšími geny (Nonogaki 2014). Jeho exprese v semenech je kontrolována na čtyřech různých úrovních

(Carrera-Castaño et al. 2020). Ty zahrnují elongaci při transkripci, alternativní sestřih, alternativní polyadenylaci, a potlačení transkripce skrze nekódující transkript. Bylo zjištěno, že DOG1 je protein vážící se na hem, což se ukázalo být klíčové v jeho funkci při dormanci. Zároveň to poukazuje na roli tohoto proteinu při integraci enviromentálních signálů, protože skupina proteinů vážících se na hem funguje jako senzory pro kyslík a oxid dusnatý.

Taktéž existují geny s negativním účinkem na dormanci (Nonogaki 2014). Z toho vyplývá, že proces dormance probíhá na genetické úrovni a vyžaduje spolupráci množství genů a je taktéž ovlivněn epigenetickými vlivy, jako např. umlčováním genů pomocí metylace histonů a DNA.

Bylo zjištěno, že míra dormance je geneticky determinována, ale enviromentální prostředí mateřské rostliny hraje taktéž významnou roli ve vlastnostech produkovaných semen (Klupczyńska and Pawłowski 2021). Taktéž bylo dokázáno, že při klíčení se uplatňují různé fytochromy v závislosti na zrání semen. Funkční fytochromy PhyB a PhyD byly nutné k překonání dormance indukované chladem, a PhyA přispíval naopak k udržování dormance semen. Teplota při zrání semen však poskytuje silnější efekt než ovlivnění dormance semen světelnými podmínkami.

2.5 Klíčení semen



Obrázek 2: Zobrazení tří fází klíčení semen. Převzato a upraveno z Weitbrecht et al. 2011.

Za počátek formování semen je považováno dvojité oplození (Yang et al. 2020b). To je následováno morfogenezí a fází zrání semen. Zrání semen je charakterizováno akumulací zásobních látek v embryu. Dormance semen je pak indukována právě během fáze zrání a přerušení dormance vede ke klíčení.

Samotné klíčení semen je proces počínající rehydratací semen a končící proražením semenných obalů embryonálním kořenem (Taiz et al. 2015). Tento proces

zahrnuje tři fáze (Obr. 2), v první fázi dochází k rapidnímu příjmu vody suchým semenem. Následuje druhá fáze krátkým přerušením příjmu vody a aktivací metabolismu, obnovením růstu embrya a jeho proražením skrze semenné obaly. Třetí fáze pak zahrnuje obnovení příjmu vody a plnou mobilizaci zásobních látek.

Příjem vody způsobí zformování vakuoly, kde následně probíhá hydrolyza zásobních proteinů, které jsou degradovány na aminokyseliny, ze kterých jsou poté syntetizovány enzymy, potřebné pro mobilizaci zásobních lipidů (Heldt 2005). Dochází k aktivaci biochemických metabolických a fyziologických procesů, vedoucích k obnovení respirace, produkce energie, aktivace opravných procesů a biosyntézy proteinů ze zásobních zdrojů a nově syntetizované mRNA (Carrera-Castaño et al. 2020). Tyto události následně vedou k obnově růstu embrya a oslabení vnějších pletiv, obalujících embrya, a nakonec k proražení obalů semene dělohami rostlinky. Klíčení typicky nastává pod povrchem půdy a rostlina tak může být zpočátku zcela závislá na zásobních látkách semene, nezávisle na fotosyntéze (Jones et al. 2013). Zásobní látky mohou být uloženy v embryu nebo endospermu, jedná se především o polysacharidy, lipidy, proteiny a minerály. Semena často začínají klíčit vlivem více faktorů naráz, zejména změnou teploty, světelných podmínek a vlhkosti.

Klíčení je také regulováno skrze fytohormony, kyselinu abscisovou (ABA) a antagonisticky působícími gibereliny (Penfield 2017), kdy kyselina abscisová působí kladně na dormanci semen, kdežto gibereliny (GA) podporují klíčení. Například u *Arabidopsis* je známo, že přechod mezi dormancí a klíčením semen je závislý na kompetici mezi kyselinou abscisovou a giberelinem (FitzGerald and Keener. 2021). Bylo zjištěno, že rovnováha v produkci těchto fytohormonů je ovlivňována skrze PIF1-RVE1 komplex působící jako transkripční faktor.

Klíčení semen je považováno za velice složitý proces ovlivněný různými endogenními a exogenními faktory (Longo et al. 2020; Shu et al. 2015). Tento proces je tak řízen prostřednictvím světelné signalizace, hormonální kontroly, vlivu abiotického stresu, transkripce a translace genů a epigenetické regulace. Porozumění procesu dormance a klíčení semen by mohlo poskytnout řešení zemědělských ztrát způsobených předčasným vyklíčením nebo naopak nedostatečnou klíčivostí semen v důsledku již zmíněných vlivů.

2.5.1 Klíčení semen v závislosti na světelných podmínkách

Světlo většinou není podmínkou klíčení, některá semena však klíčí na světle rychleji než ve tmě (Jones et al. 2013). Podle toho pak rozdělujeme druhy na kladně (světlo klíčení stimuluje) a záporně (světlo klíčení inhibuje) fotoblastické. Fotoblastické chování semen

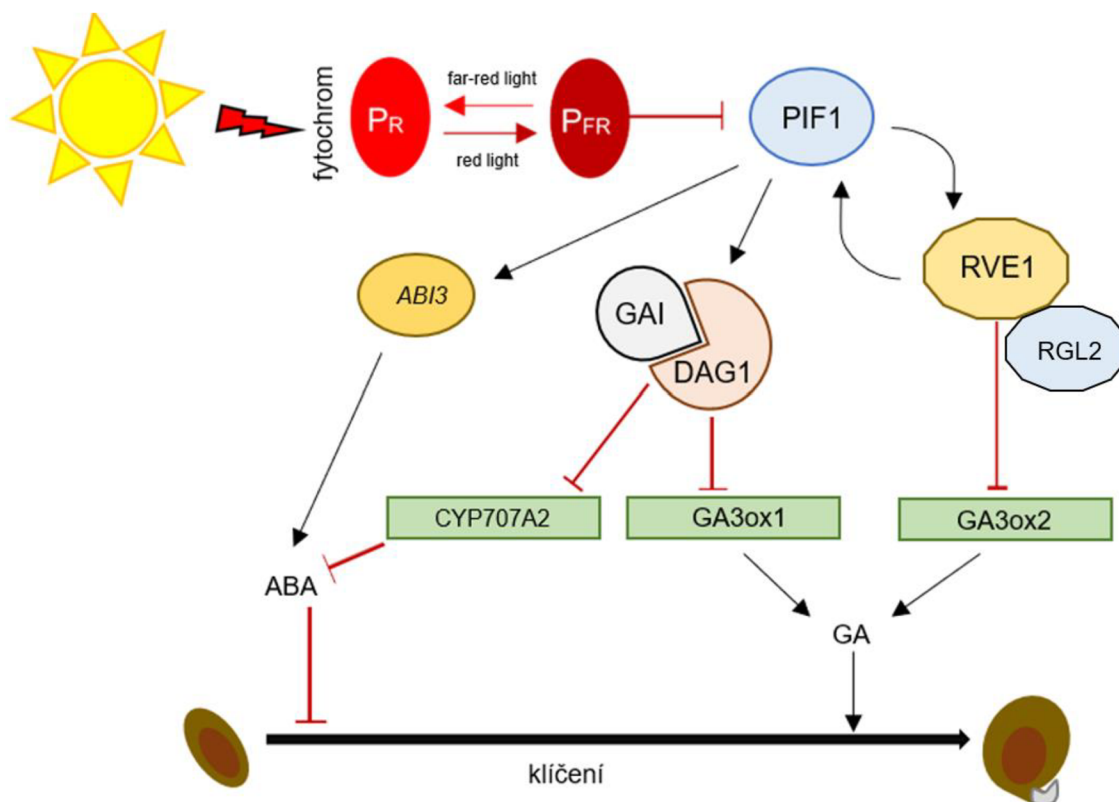
má adaptační význam. Kladně fotoblastická semena nemívají dostatek zásobních látek, a proto při klíčení se snaží dosáhnout podmínek vhodných pro jejich autotrofní výživu. Negativní reakce na světlo se může uplatňovat v případě, kdy nejsou vhodné podmínky pro klíčení, jako například nedostatek vláhy v půdě. Klíčení v zásadě ovlivňuje červená a modrá oblast viditelného záření. Větší význam se při tomto ději však připisuje červenému spektru. Receptorem pro toto spektrum je fytochrom, platí, že klíčení je závislé na jeho aktivní formě – P_{FR} (Buchanan et al. 2015). Klíčení je pak podmíněno jeho množstvím, zde se však projevují výrazné druhové rozdíly. U kladně fotoblastických semen se nachází fytochrom v neaktivní formě nebo je jeho hladina velmi nízká a světlo je pak nutné pro vznik odpovídajícího množství P_{FR} . Záporně fotoblastická semena klíčí ve tmě, mají dostatečnou hladinu P_{FR} a ozáření dlouhovlnným červeným světlem může tuto hladinu snížit.

Schopnost vnímat vnější podmínky je pro klíčení semen nejdůležitější vlastností, která zajišťuje jejich přežití (Yang et al. 2020b; Paik and Huq 2019). Semena připravená ke klíčení potřebují červené světlo k aktivaci fytochromu, především PhyB, k iniciaci samotného procesu klíčení. Červené světlo tak aktivuje fytochromy, které spouští signalizační kaskádu vedoucí k syntéze giberelinů a redukci hladiny kyseliny abscisové v semenech. V tomto případě pak PhyA a PhyB hrají různé role. V suchých semenech je exprese PhyA limitována oproti PhyB. Fytochrom B je tedy prvním fotoreceptorem reagujícím na červené světlo. Po vystavení semen vodě se hladina PhyA zvětší, což vede k iniciaci klíčení.

Světlo přímo ovlivňuje transkripci některých genů dýchacího řetězce, včetně genů kódujících pyruvát dehydrogenázu, komponenty TCA cyklu, cytochrom c, ADP/ATP přenašečové proteiny apod. (Jones et al. 2013). Ve spoustě případů existují důkazy o přímém zapojení fotoreceptorů, jako jsou fytochromy a kryptochromy (Yang et al. 2020b). Protože jsou fytochromy syntetizovány v neaktivní formě (P_R) je to jediná forma přítomná v semenech za tmy (Buchanan et al. 2015) a bylo prokázáno, že jsou lokalizovány pouze v cytosolu. Při konverzi do aktivní formy (P_{FR}) dochází k jejich přesunu do jádra buněk, kde následně působí při genové expresi.

Bylo zjištěno, že červené světlo působí skrze komplexní síť genových regulátorů zahrnující PhyB, PIF1 a RVE1 (Yang et al. 2020a). Fytochrom B hraje důležitou roli při inkorporaci světelné signalizace při regulaci dormance semen a jejich klíčení. Fytochrom-interagující faktor (PIF1) je klíčovým transkripčním faktorem potlačujícím klíčení semen zprostředkované fytochromem B (Obr. 3). Faktor Reveille1 (RVE1) funguje jako regulátor při dormanci a klíčení semen a formuje s PIF1 faktorem komplex, fungující jako regulátor produkce ABA a GA (FitzGerald and Keener 2021). Bylo zjištěno, že faktor PIF1 funguje jako transkripční faktor pro expresi RVE1 a naopak faktor RVE1 funguje jako transkripční faktor pro expresi PIF1. Faktor PIF1 taktéž funguje jako

transkripční faktor pro *ABI3*, pozitivní regulátor pro expresi ABA. Faktor *RVE1* následně funguje jako represor *GA3ox2* (*Gibberellin 3-Oxidáza 2*), což je pozitivní regulátor pro syntézu GA. Fytohormony GA a ABA jsou pak přímo zapojeny v procesu klíčení a vzájemný poměr jejich koncentrací následně rozhoduje o dormanci nebo klíčení semen. Gibereliny jsou stimulačním faktorem v procesu klíčení semen, zatímco ABA je faktorem represivním. Světelná signalizace skrze faktory závislé na PhyB tedy koordinovaně stimuluje klíčení pozitivně fotoblastických nebo inhibuje klíčení negativně fotoblastických semen prostřednictvím regulace koncentrací GA a ABA (Yang et al. 2020a). V *Arabidopsis* bylo zjištěno, že *PIF1* faktor negativně reguluje světlem indukované klíčení semen (Longo et al. 2020). Inaktivace *PIF1* totiž vedla ke kompenzaci neschopnosti klíčení semen *phyb* mutanta, což vedlo k jejich klíčení po vystavení červenému světlu. Interakce *PIF1* s aktivní formou PhyB vedla k fosforylaci *PIF1*, což mělo za následek spuštění degradace tohoto faktoru skrze 26S proteasom, a vedlo tak k indukci klíčení semen. Transkripce indukovaná *PIF1* faktorem vede k expresi genů *GAI* (*GA-Insensitive*) a *RVE1*. Faktor *GAI* kooperuje s *DAG1* transkripčním faktorem na represí promotoru biosyntézy giberelinů *GA3ox1* (*Gibberellin 3-Oxidáza 1*). Faktor *RVE1* zase kooperuje s proteinem *RGL2* na represí *GA3ox2*. Takto je negativně ovlivňována biosyntéza giberelinů a zároveň pozitivně ovlivňována biosyntéza kyseliny abscisové.



Obrázek 3: Zobrazení ovlivnění metabolismu kyseliny abscisové a giberelinů prostřednictvím aktivity fytochromu a důsledek na klíčení semen. Faktor *PIF1* přímo aktivuje expresi *GAI* a *RVE1* a *RVE1* přímo indukuje expresi *PIF1*. *RVE1* kooperuje s proteinem *RGL2* na represí *GA3ox2* a *GAI* kooperuje s *DAG1* na represí *GA3ox1*. Převzato a upraveno z Longo et al. 2020.

2.6 Iontové kanály

U rostlin byly identifikovány pouze dva typy kanálů, iontové kanály a aquaporiny, které umožňují transport vody skrze membrány (Jones et al. 2013). Iontové kanály formují vysoce selektivní vodou vyplněné póry v membránách. Jedná se o transmembránové proteiny, které umožňují pasivní transport nabitých a v některých případech i neutrálních částic v závislosti na osmotickém potenciálu a difúzních vlastnostech membrány (Taiz et al. 2015). Umožňují rostlinám provádět osmoticky řízené reverzibilní pohyby buněk, iontové kanály umožňují rostlinám přijímat minerální výživu, jsou součástí buněčné signalizace a signální transdukce, zajišťují dlouhivý růst buněk, export toxických iontů a organických kyselin a taktéž interakce s patogeny a symbiotickými organismy (Ward et al. 2009).

Iontové kanály jsou vysoce specifické, což je dáno velikostí kanálu a povahou a hustotou náboje na povrchu daného kanálu a membrány, ve které je kanál obsažený (Taiz et al. 2015). Kanály mají proteinové domény nazývané brány, které jim umožňují regulovat jejich propustnost tím, že daný pór uzavřou. To se děje prostřednictvím změny konformace proteinu tvořícího příslušný pór. Signály regulující tuto aktivitu iontových kanálů jsou změny v membránovém potenciálu, vazba ligandů těchto kanálů, hormony, světlo a posttranslační modifikace, jako například fosforylace. V momentě otevření kanálů probíhá transport velmi rychle oproti jiným transportérům (Buchanan et al. 2015), a je závislý na gradientu elektrochemického potenciálu.

Iontové kanály vykazují selektivitu pro jejich iontové substráty (Buchanan et al. 2015). Kanály lze rozdělit na kationtové a aniontové. Kationtové kanály lze nadále rozdělit na selektivní pro draselné a sodné ionty, na relativně neselektivní kationtové kanály a na kanály selektivní pro dvojmocné kationty, jako je například vápenatý iont. Kanály pro vápenaté ionty se uplatňují především při změnách turgoru ve svěracích buňkách průduchů rostlin nebo při různých typech signalizace v rostlinách (Taiz et al. 2015).

Iontové kanály se mohou vyskytovat ve velkém množství různých druhů rostlin, například u *Arabidopsis* bylo identifikováno 50 genů kódujících iontové kanály (Taiz et al. 2015). Tyto kanály fungují s různou selektivitou, množstvím propouštěných iontů a s různými způsoby jejich aktivace. Taktéž existuje více kanálů pro transport specifických iontů, které jsou závislé na různých gradientech elektrochemického potenciálu nebo různých ligandech, jako jsou například cyklické nukleotidy.

Aniontové kanály v plazmatických membránách rostlin jsou méně selektivní (Buchanan et al. 2015; Taiz et al. 2015). Umožňují transport velké škále anorganických aniontů, jako jsou chloridové, nitrátové, sulfátové a fosfátové anionty. Taktéž transportují organické anionty zastoupené především organickými kyselinami. Byly popsány

specifické typy aniontových kanálů v tonoplastu, které jsou selektivní pro chloridové anionty nebo organické kyseliny, jako je například malát. Aniontové kanály se vyskytují i v buňkách různých orgánů rostlin například v kořeni, hypokotylu nebo v listech (Roberts 2006).

Například bylo zjištěno, že aniontový kanál ALMT9 (aluminum-activated malate transporter) přítomný ve vakuolách *Arabidopsis* je zodpovědný za reakce na stres indukovaný solí pomocí kontroly koncentrace chloridových aniontů ve vakuolách buněk cévních svazků a tím i kontroly pohybu iontů v celé rostlině (Baetz et al. 2016).

Poškození funkce chloridových kanálů vede k vážnému narušení normálního růstu a vývoje rostliny (Subba et al. 2021). Taktéž bylo navrženo, že aniontové kanály rostlin mohou spíše funkčně záviset na výměně nabitých molekul za protony. Například AtCLC-a a AtCLC-b (aniontové chloridové kanály) byly prokázány jako výměnné transportéry nitrátových aniontů a protonů v *Arabidopsis*.

Aktivita aniontových kanálů je ovlivněna různými efekty, například vápenatými kationty, vnitřními a vnějšími změnami pH, signalizací spřaženou s G-proteiny, nebo vlivem fytochromu a modrého světla (Taiz et al. 2015; Buchanan et al. 2015). Aniontové kanály mohou být nepřetržitě aktivní, nebo k jejich aktivaci/deaktivaci může dojít depolarizací, či hyperpolarizací membrány, působením světla anebo na základě mechanického podnětu.

Aniontové kanály aktivované světlem byly například popsány v plazmatické membráně buněk hypokotylu *Arabidopsis* (Cho and Spalding 1996). Vystavení těchto buněk modrému světlu pak způsobí depolarizaci membrány, následně zastavení expanze buněk a tím je inhibování růstu hypokotylu. Aniontové kanály aktivované bílým světlem byly nalezeny a popsány v buňkách mezofylu listů hrachu (Elzenga and Van Volkenburgh 1997). Pravděpodobně se v tomto případě jedná o aktivaci kanálů pro transport chloridových aniontů. Světlo způsobuje depolarizaci plazmatických membrán pomocí aniontových kanálů, a to v závislosti na délce a intenzitě ozáření, na vlnové délce ozařujícího světla, na přítomnosti a množství vápenatých iontů.

2.6.1 Vliv světla na aktivitu aniontových kanálů

Světlem indukované změny v potenciálu plazmatické membrány jsou běžné ve fotosynteticky aktivních buňkách, ale taktéž nastávají i v jiných buňkách (Marten et al. 2010). Zatímco odpovědi na světlo ve fotosyntetických buňkách jsou běžně dominovány ději vázícími se k chloroplastům, odpovědi plazmatické membrány mohou být aktivovány skrze různé fotoreceptory. Transport iontů skrze plazmatickou membránu mohou přímo ovlivňovat fototropiny a nepřímo kryptochromy a fytochromy.

Většina informací o rostlinných aniontových kanálech byla získána na úrovni

plazmatické membrány (Barbier-Brygoo et al. 2000). Kvůli vysoce negativnímu transmembránovému potenciálu a ven směrovanému gradientu aniontů skrze tuto membránu, otevírání aniontových kanálů vede k uvolnění aniontů z cytoplazmy do extracelulárního prostoru. Aktivace aniontových kanálů tak indukuje membránovou depolarizaci, která zase může vést k aktivaci dalších na napětí závislých kanálů, jako jsou například Ca^{2+} kanály, nebo může sloužit jako spouštěč pro protonovou ATPázu, která uvolní protony do apoplastu. Toto může přispívat ke krátkodobé elektrické nebo Ca^{2+} signalizaci a k regulaci membránového potenciálu a pH gradientu. Je taktéž možné, že depolarizace membrány může aktivovat ven-směřující draselné kanály, což by vedlo ke ztrátě solí a ovlivňovalo tak osmoregulaci a proudění vody v rostlině.

Aniontový transport je taktéž důležitý pro otevírání a zavírání stomat a funkci signálních drah (Assmann and Jegla 2016). Svěrací buňky průduchů u rostlin jsou příkladem pro sledování aniontových kanálů, jsou totiž zapojeny do zavírání průduchů působením kyseliny abscisové. V plazmatické membráně svěracích buněk se vyskytují dva základní typy aniontových kanálů S-typ (slow anion channel) a R-typ (rapid anion channel) (Tavares et al. 2011; Schroeder and Keller 1992).

Průduchy pak regulují výměnu plynů právě pomocí otevírání a uzavírání svěracích buněk (Assmann and Jegla 2016). Otevírají se při nízké koncentraci CO_2 v atmosféře a jsou regulovány červeným a modrým světlem. Je tak maximalizována efektivita fotosyntézy v mesofylu. Hlavními světelnými receptory jsou v tomto procesu fototropiny. Fototropiny při aktivaci iniciují signální kaskádu, která zahrnuje fosforylaci zprostředkovanou aktivními fototropiny, aktivaci protein fosfatázy 1 a další kroky vedoucí k procesům hyperpolarizace membrán svěracích buněk. Hyperpolarizace pak zajistí příjem draselných iontů skrze příslušné kanály. Akumulace draselných iontů, malátu a cukrů uvnitř svěracích buněk způsobí příjem vody, změny turgoru a tím zvětšení svěracích buněk a otevření průduchu.

Proti otevírání průduchů působí kyselina abscisová (Assmann and Jegla 2016). Ta způsobuje depolarizaci membrány svěracích buněk pomocí aktivace kanálů pro vápenaté ionty, jak S-typu tak R-typu. Depolarizace zajistí vyčerpávání draselných iontů ze svěracích buněk draselnými kanály v opačném směru, což zajistí únik vody z buněk, snížení turgoru a tím uzavření průduchu.

Aniontové kanály aktivované bílým a modrým světlem u buněk hypokotylu *Arabidopsis* nebo u buněk mezofylu listů hrášku vykazují malé jednotkové vodivosti (Roberts 2006). Přestože jejich aktivita závisí na cytosolové Ca^{2+} signalizaci, světelná signalizace není na cytosolové Ca^{2+} signalizaci závislá. U *Arabidopsis* bylo demonstrováno, že aniontové kanály závislé na signalizaci modrého světla zprostředkovávají membránovou depolarizaci asociovanou s inhibicí růstu hypokotylu *Arabidopsis* indukovanou modrým světlem (Cho and Spalding 1996). V etiolovaných

hypokotylech okurky zase byl odhalen mechanismus zodpovědný za depolarizaci membrány indukované modrým světlem pomocí inhibice protonové ATPázy a pravděpodobně aktivace aniontových kanálů (Barbier-Brygoo et al. 2000).

Taktéž byly nalezeny kinázy CBC1/CBC2 (convergence of blue light and CO₂), které spojují signální odpověď rostlin na nedostatek CO₂ a odpověď na vystavení se modrému světlu (Hiyama et al. 2017). Tyto kinázy jsou schopné nezávisle na sobě ovlivnit otevírání průduchů tím, že inhibují S-typ aniontových kanálů. Také účinkují v signálních dráhách fototropinů. Tyto kinázy tedy pravděpodobně regulují otevírání stomat interakcí signálů z modrého světla a CO₂ receptorů.

2.6.2 Inhibitory aniontových kanálů

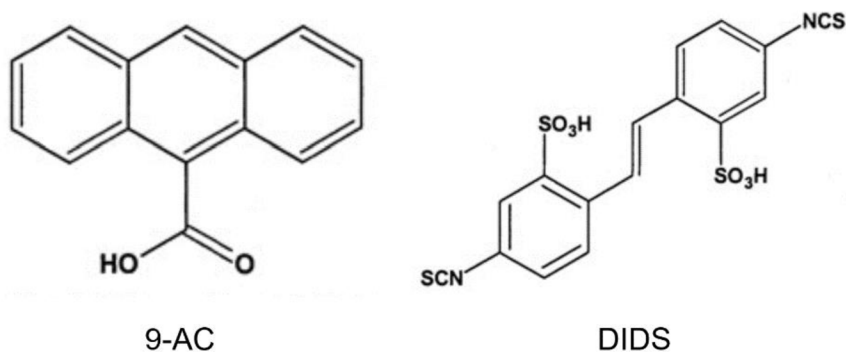
Aniontové kanály jsou většinou analyzované pomocí takzvané „patch-clamp“ techniky a různých jejích modifikací (Tavares et al. 2011). Těmito technikami lze determinovat kanály na bázi jejich iontové selektivity, vodivosti, jejich otevírání v závislosti na membránovém potenciálu a kinetice jejich otevřených nebo uzavřených stavů. Aniontové kanály, které nelze těmito technikami od sebe rozeznat mohou být identifikovány pomocí farmakologického přístupu. K jejich identifikaci tak lze využít kanálových inhibitorů, které mohou být velmi specifické, a fungují aktivací skrze extracelulární agonisty a skrze další působení na intracelulární regulativní molekuly.

Kanálové inhibitory, jsou látky bránící přenosu aniontů skrze jejich příslušné kanály. To ovlivňuje buněčnou signalizaci a procesy na aniontech závislé. Jako inhibitory mohou působit například kyselina anthracen-9-karboxylová (9-AC) nebo 4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbendisulfonová kyselina (DIDS) (Tavares et al. 2011). Tyto látky slouží primárně jako inhibitory chloridových kanálů a brání depolarizaci membrány. Jsou schopné negativně ovlivnit procesy vedoucí ke změnám náboje v buňce a na membráně (Roberts 2006). Přestože není známá přesná mechanika působení těchto inhibitorů, u aniontových kanálů hypokotylu *Arabidopsis* se pravděpodobně jedná o vazbu v extracelulární části přímo v póru kanálu. Důsledky působení těchto látek mohou být: stimulace hypokotylového růstu, blokáce proudění iontů skrze kanály buněk, zabránění reakcím na vnější podněty přijímané receptory závislými na aniontové signalizaci a zabránění této signalizace může taktéž vést k zmírnění nebo inhibici účinků fytohormonu auxinu při regulaci hypokotylového růstu, kdy je vliv auxinu v různé míře negován.

Ve spoustě případech bylo ukázáno, že inhibitory aniontových kanálů byly schopny inhibovat membránovou depolarizaci nebo aniontový tok (Barbier-Brygoo et al. 2000). Taktéž se ukázalo, že inhibitory aniontových kanálů mohou ovlivňovat růst nebo obranné odpovědi rostliny. To ukazuje na důležitou roli aniontových kanálů v buněčné

signalizaci vedoucí k růstovým, vývojovým a adaptačním schopnostem rostlin.

Zjištění, zdali jsou aniontové kanály zapojené v pohybech svěřacích buněk průduchů, bylo primárně dosaženo pomocí farmakologického přístupu využívajícího inhibitory aniontových kanálů (Barbier-Brygoo et al. 2000). Jejich zapojení bylo prokázáno skrze změny v otevírání stomat indukované právě těmito inhibitory. Konkrétně inhibice otevírání průduchů skrze ABA signalizaci byla zmírněna například přítomností 9-AC inhibitoru (Schwartz et al. 1995). Inhibitor 9-AC cílí na inhibici aniontových kanálů S-typu. Bylo zjištěno, že tento inhibitor je schopen zvrátit inhibici otevření stomat skrze ABA signalizaci. Koncept aniontových kanálů S-typu podílejících se na uzavírání průduchů je zase podpořen studií (Schroeder et al. 1993), která ukázala, že inhibitor DIDS nemá významný vliv na procesy spojené s ABA signalizací. Inhibitor DIDS je účinným inhibitorem kanálů R-typu. Jeho aplikace ve vysokých koncentracích taktéž neměla žádný vliv na světlem indukované otevírání stomat, což napovídá, že kanály R-typu nehrají významnou roli při regulaci otevírání průduchů v odpovědi na bílé světlo. Tyto kanály pravděpodobně jsou zapojeny v procesu zavírání stomat, aplikace inhibitoru DIDS v tomto případě však nemá rovněž žádný efekt (Schwartz et al. 1995). U inhibitorů aniontových kanálů jako 9-AC a DIDS byla pozorována schopnost působit proti inhibici a rozpadu indukovaného auxiny (Thomine et al. 1997). Tato schopnost se nezdá být spjatá s jinými regulátory hypokotylového růstu jako jsou ethylen nebo cytokininy. Tyto inhibitory taktéž vykazují schopnost lehké stimulace růstu hypokotylu sami o sobě, ale při inhibici růstu hypokotylu indukované auxinem jsou schopné působit proti účinkům auxinu. Ovšem tyto inhibitory se lehce liší účinkem na změny hypokotylu indukované auxinem. Inhibitor 9-AC byl schopen působit proti všem účinkům auxinu na hypokotyl jako jsou inhibice růstu, dekortikace, růst adventivních kořenů, zatímco inhibitor DIDS působil pouze proti inhibici růstu a dekortikaci (Thomine et al. 1997). Bylo tedy ukázáno, že 9-AC a DIDS jsou schopné obnovit normální růst hypokotylu, zabránit dekortikaci a snižují citlivost hypokotylu k auxinu, ale neinhibují zcela jeho působení. Je pravděpodobné, že tyto inhibitory působí na aniontové kanály zapojené v transdukci signálu auxinu.



Obrázek 4: Strukturální vzorce pro inhibitory aniontových kanálů. Zleva: kyselina anthracen-9-karboxylová (9-AC), kyselina 4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbendisulfonová (DIDS). Upraveno podle Liantonio et al. 2004.

3 Materiál a metodika

Rostlinný materiál: *Solanum lycopersicum* L. cv. GT a od něj odvozený recesivní mutant *tri1* (*temporarily red light-insensitive 1*, odvozen od kultivaru cv. GT; LA3808; deficientní ve PhyB1; Van Tuinen et al. 1995)

Solanum lycopersicum L. cv. Money Maker a od něj odvozený recesivní mutant *au^W* (*aurea*, cv. Money Maker; LA2837; deficientní ve fytochromovém chromoforu; Koornneef et al. 1985; Terry 1997)

Solanum lycopersicum L. cv. Kokomo a od něj odvozený recesivní mutant *yg-2* (*yellow-green 2*, odvozen od cv. Kokomo; deficientní ve fytochromovém chromoforu; Terry and Kendrick 1996)

Semena mutantů byla laskavě poskytnuta C. M. Rick, TGC: Tomato Genetics Cooperative, <http://tgc.ifas.ufl.edu/>)

Chemikálie: kultivační médium MS (Murashige and Skoog 1962): MS basal medium (Duchefa Biochemie; kat. č. M0221)

sacharóza

agar: phyto agar (Duchefa Biochemie, Nizozemsko; kat. č. P1003.1000)

sterilní destilovaná voda

1M KOH

pufr MES 2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid

70% a 96% ethanol

SAVO – zředěný komerční roztok chlornanu sodného (obsah aktivního chloru 2,8 %)

kyselina anthracen-9-karboxylová (9-AC; zásobní roztok 10⁻² mol.l⁻¹)

kyselina 4,4'-diisothiokyno-2,2'-stilbendisulfonová (DIDS; zásobní roztok 10⁻² mol.l⁻¹)

Pomůcky:	Kopistka, lžičky, váženky, alobal, 3litrová Erlenmayerova baňka, litrový odměrný válec, 5 x 500ml termolahev, magnetické míchátko, magnetická tyčka na vytahování míchátko, barevná páska, autoklávovací páska, lihová fixa, dlouhá pinzeta, lihový kahan, zápalky, sterilní Erlenmayerova baňka (300 ml), nesterilní kádinku na odpad (cca. 300 ml), plastové sterilní Petriho misky (průměr 90 mm), lepicí páska z netkané textilie (Urgopore nebo Softpore: Batist Medical, a.s., Česká republika), cca. 100 ml sklenička na ethanol, hliníková folie, 3 falkony 50 ml (2 nesterilní, 1 sterilní), plastový stojan na mikrozskumavky, 10ml automatická pipeta a sterilní špička, 1ml automatická pipeta a sterilní špičky, plastový stojan na Petriho misky
Přístroje:	pH metr, magnetická míchačka, laboratorní váhy, analytické váhy, automatické růstové komory Microclima 1000 (Snijders Scientific B.V., The Netherlands) s modrým a červeným světlem, laminární flowbox, mikrovlnná trouba, lednice, mrazák na -20 °C, parní autokláv
Zdroje světla:	Zdrojem modrého světla byla trubice Philips TLD-36W/18-Blue (Philips USA) s maximální ozářeností $10 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při 440 nm 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

3.1 Příprava MS média

Pro experimenty bylo použito základní kultivační médium (Murashige and Skoog 1962). Příprava 2 litrů média byla provedena do 3litrové Erlenmayerovy baňky s vloženým magnetickým míchátkem a doplněné na 1 l destilovanou vodou. Baňka byla umístěna na magnetickou míchačku. Do Erlenmayerovy baňky bylo postupně přidáno za stálého míchání 20 g sacharózy, 8,6 g MS média a 390,4 mg pufru MES. Po rozpuštění látek byl objem roztoku doplněn destilovanou vodou na 2 litry. Do roztoku byla vložena pH sonda a pH bylo upraveno pomocí 1M KOH na požadovanou hodnotu 6,1. Následně bylo do každé z pěti 400 ml termolahví naváženo 2,8 g agaru a pomocí odměrného válce byla každá z lahví doplněna 400 ml připraveného roztoku média. Víčko lahve bylo zabaleno do alobalu, lahve byly popsány a sterilizovány v parním autoklávu. Láhve se sterilním médiem byly skladovány v lednici pro pozdější použití.

3.2 Povrchová sterilizace semen

Povrchová sterilizace semen probíhala v laminárním flowboxu. Semena byla napočítána na potřebný počet pro plánovaný experiment. To znamená pro každý genotyp nejméně 360 semen v každém experimentu s inhibitorem 9-AC a nejméně 450 semen pro každý experiment s inhibitorem DIDS. Semena byla umístěna zvlášť do dvou nesterilních 50ml plastových zkumavek Falcon. Následně byla semena za občasného protřepání sterilizována pomocí zředěného komerčního roztoku chlornanu sodného (SAVO) s obsahem aktivního chloru 2,8 %, a to po dobu 25-30 minut. Poté byla semena nejméně pětikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou pomocí 10ml automatické pipety. Po důkladném propláchnutí bylo k semenům přidáno 5 ml sterilní destilované vody.

3.3 Příprava média obsahujícího inhibitory

Pro kultivaci semen byly použity plastové sterilní Petriho misky (průměr 90 mm). Do každé misky bylo nalito 20 ml média obsahující buď inhibitor 9-AC, a to v koncentracích 0, 100, 150 a 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ nebo inhibitor DIDS v koncentracích 0, 100, 150, 200 a 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Médium pro nalévání misek bylo rozehráno v mikrovlnné troubě, v množství 120 ml nalito do sterilní 300 ml Erlenmayerovy baňky a k němu byl přidán pomocí 1 ml automatické pipety daný inhibitor o koncentraci $10^{-2} \text{ mol.l}^{-1}$ v takovém množství, abychom dostali požadovanou koncentraci. Médium pak bylo rozlito pomocí sterilní 50 ml plastové zkumavky do celkem 6 misek (dva genotypy, tři světelné podmínky).

Tabulka č. 1: Použité koncentrace a objemy zásobního roztoku inhibitorů (zásobní roztok 10^{-2} mol.l⁻¹)

inhibitor	použité koncentrace ($\mu\text{mol l}^{-1}$)				
	0	100	150	200	250
DIDS	0	100	150	200	250
9-AC	0	100	150	200	-

množství inhibitoru na 120 ml média (ml)					
0	1,2	1,8	2,4	3	

3.4 Výsev semen

Výsev semen probíhal v laminárním flowboxu. Semena byla vysévána pomocí dlouhé pinzety, namočené v 96% ethanolu a ožehnuté nad plamenem lihového kahanu. Do každé misky bylo vyseto cca. 30 semen, s tím, že semena jednotlivých genotypů byla vyseta odděleně. Misky byly následně zalepeny pomocí dvou vrstev lepící pásky z netkané textilie a vertikálně umístěny do plastových stojanů jednotlivě za sebou. Misky se semeny určenými pro kultivaci na červeném a modrém světle byly umístěny do kultivační růstové komory s červeným světlem, respektive do kultivační růstové komory s modrým světlem. Misky se semeny určenými pro kultivaci ve tmě byly obaleny hliníkovou fólií. Semena byla kultivována při teplotě 23°C po dobu 7 až 8 dnů.

3.5 Vyhodnocení experimentu

Klíčivost semen byla sledována na bílém světle na laboratorním stole a byla zaznamenávána od třetího až čtvrtého den od výsevu semen. Klíčivost byla vyjádřena v procentech. Data byla zapisována do zhotovených formulářů, rozdělená podle jednotlivých koncentrací inhibitorů, světelných podmínek a genotypů, a to každý den zvlášť. Procentuální klíčivost z jednotlivých experimentů byla následně vynesena do tabulek v programu Excel, kde byla vypočítána průměrná klíčivost, směrodatná odchylka, standartní chyba a procentuální inhibice klíčivosti vlivem daného inhibitoru. Výsledky pak byly vyneseny do grafu pomocí programu Excel.

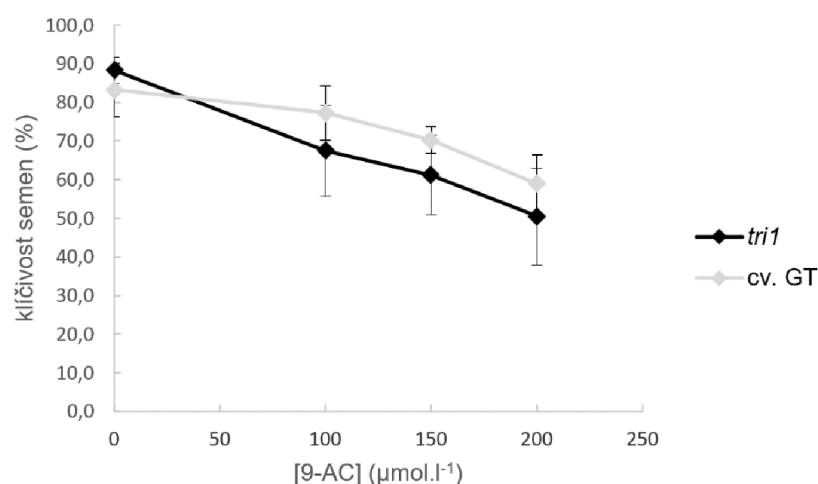
4 Výsledky

Experimentálním cílem bakalářské práce bylo studium citlivosti klíčení semen mutantů rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) k inhibitorům iontových kanálů (9-AC a DIDS) v závislosti na světelných podmínkách. Ke studiu bylo využito genetického přístupu, který spočíval ve fyziologické analýze mutantů s mutacemi v biosyntéze chromoforů fytochromů (mutanti *au^W* a *yg-2*), nebo v samotném fytochromu (mutant *tri1*).

Experimenty s klíčením semen fotomorfogenních mutantů rajčete byly prováděny ve třech různých světelných podmínkách, konkrétně ve tmě, na modrém a červeném světle. Při pokusech byly semena vystavena působení inhibitorů aniontových kanálů DIDS a 9-AC s tím, že testované koncentrace inhibitorů se pohybovaly od 0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ po 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ pro 9-AC a pro DIDS od 0 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ do 250 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, a to vždy pro všechny testované světelné podmínky. Byla tak zkoumána spojitost mezi světelnými podmínkami a signálními dráhami aniontových kanálů, které byly vystaveny účinkům inhibitorů těchto kanálů. K dosažení uvedených výsledků byly provedeny experimenty popsané v kapitole materiál a metodika.

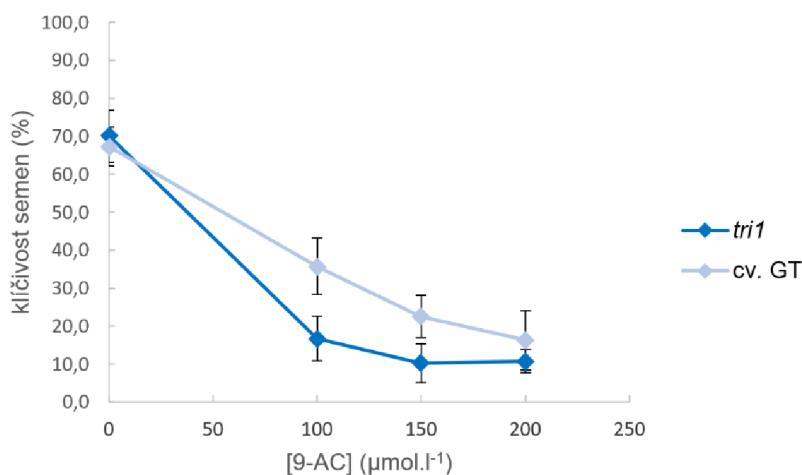
4.1 Klíčení semen *tri1* a cv. GT v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC

Obrázek 5 ukazuje závislost klíčivosti semen mutantu *tri1* a odpovídajícího kontrolního genotypu cv. GT ve tmě na koncentraci inhibitoru aniontových kanálů 9-AC. Na obrázku je patrné, že maximální klíčivost semen *tri1* a cv. GT po 7 až 8 dnech kultivace na základním médiu dosahovala podobných hodnot, a to kolem 90 %. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru 9-AC se klíčivost semen obou genotypů postupně snižovala a při koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ dosahovala klíčivost hodnot 50 až 60 %.



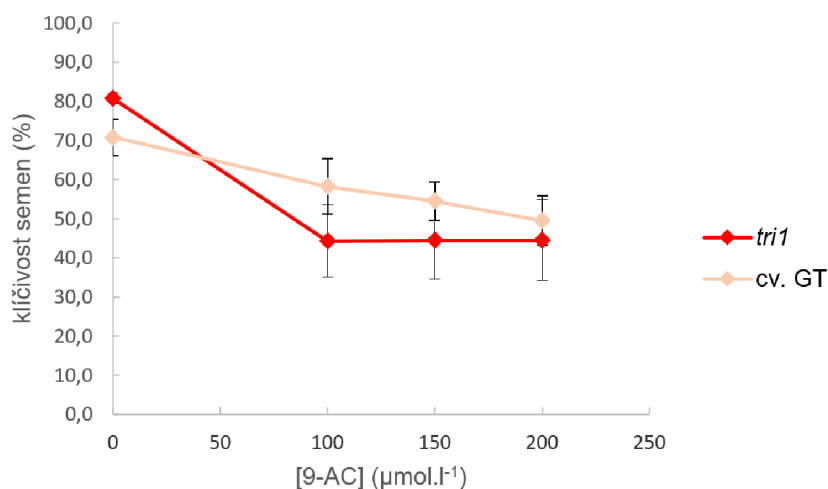
Obrázek 5: Závislost maximální klíčivosti semen mutantu *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru 9-AC ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

Na obrázku 6 lze dále vidět závislost klíčivosti semen na koncentraci 9-AC kultivovaných na modrém světle. Z grafu je patrné, že klíčivost semen obou genotypů se pohybovala na základním médiu kolem 70 % s tím, že už při koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ byla klíčivost semen velmi výrazně inhibována. Je rovněž patrné, že při koncentracích 100 a 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ 9-AC byla klíčivost semen mutanta inhibována silněji než klíčivost semen cv. GT.



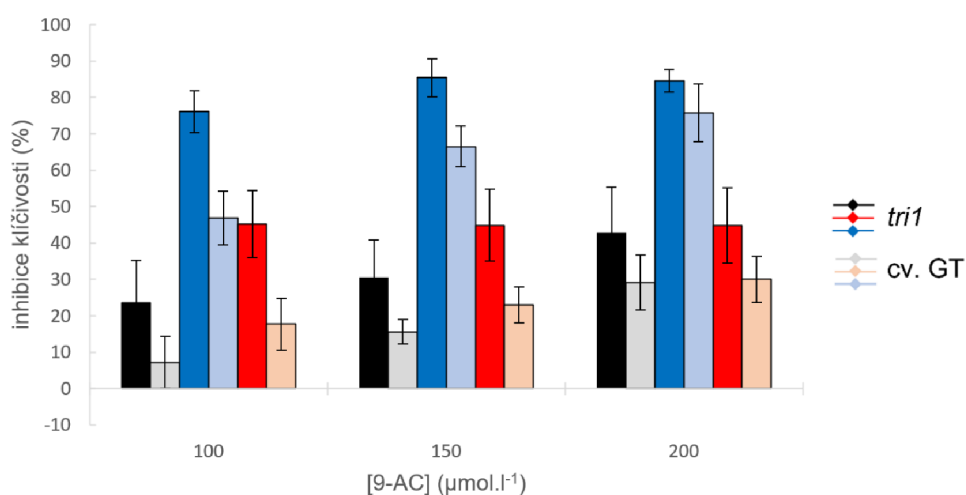
Obrázek 6: Závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru 9-AC na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

Účinek inhibitoru 9-AC na klíčivost semen obou genotypů na červeném světle pak ukazuje Obr. 7. Z grafu lze vyčíst, že klíčivost semen obou genotypů se po 7 až 8 dnech kultivace na médiu bez inhibitoru pohybovala mezi 70 až 80 %. Rostoucí koncentrace inhibitoru způsobila inhibici klíčení semen obou genotypů, nicméně mutant *tri1* vykazoval nižší klíčivost semen v závislosti na rostoucí koncentraci inhibitoru a zároveň cv. GT projevil téměř lineární závislost klíčivosti semen na rostoucí koncentraci inhibitoru.



Obrázek 7: Závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru 9-AC na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

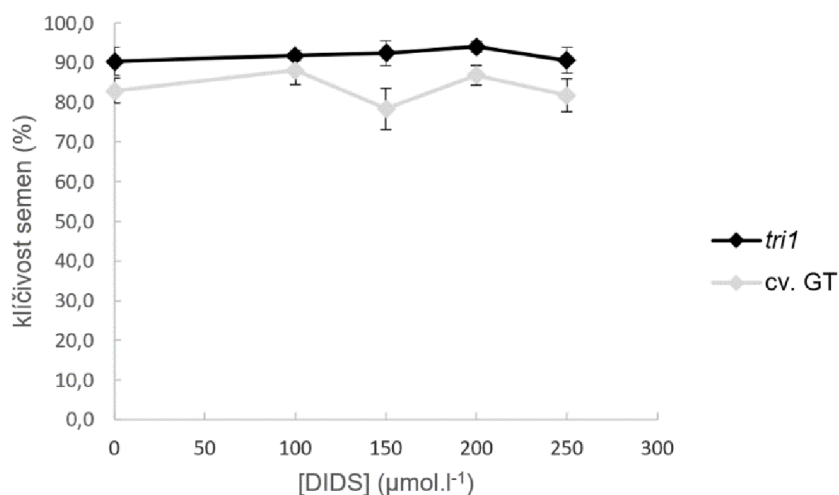
Obrázek 8 pak vyjadřuje porovnání inhibice klíčivosti semen cv. GT a *tri1* při testovaných koncentracích 9-AC za tři různých světelných podmínek. Klíčení bylo inhibováno 9-AC u obou genotypů s rostoucí koncentrací inhibitoru. U obou genotypů se inhibiční efekt projevil nejvíce na modrém světle, kdy inhibice klíčivosti dosahovala 75 až 85 %. Klíčivost semen genotypu *tri1* byla inhibována výrazněji než klíčivost semen cv. GT. Taktéž se u tohoto genotypu inhibice klíčivosti projevila jako lineárnější závislost na rostoucí koncentraci inhibitoru než u mutantního *tri1*. U *tri1* se inhibice klíčivosti výrazně projevila už při koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Při koncentracích 150 a 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ se inhibice klíčivosti již výrazněji nezvyšovala.



Obrázek 8: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutantu *tri1* a cv. GT ve tmě, na modrém a červeném světle vlivem 9-AC. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčivosti semen (\pm SE) vypočítané ze 4 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

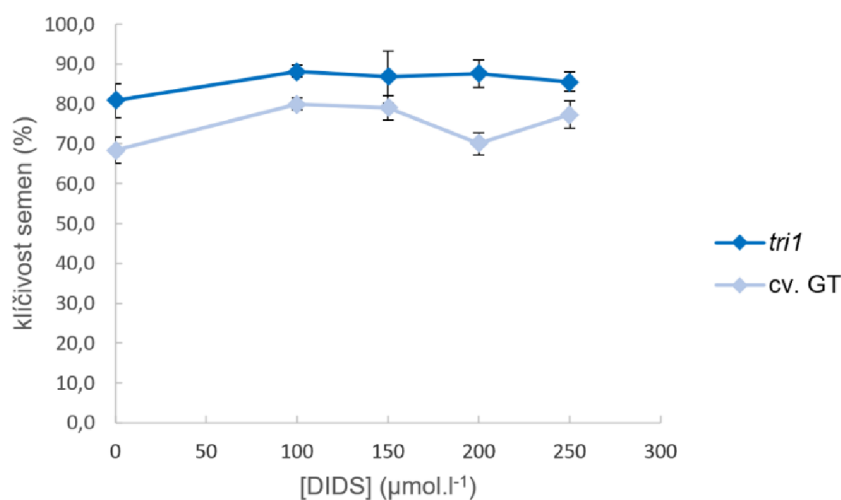
4.2 Klíčení semen *tri1* a cv. GT v závislosti na světle a inhibitoru DIDS

U semen mutantu *tri1* a cv. GT nebyl prokázán výrazný účinek inhibitoru DIDS na klíčivost. Ve tmě nebyl pozorován žádný větší rozdíl v klíčivosti semen se stoupající koncentrací inhibitoru DIDS. Obrázek 9 ukazuje závislost maximální klíčivosti cv. GT a mutantu *tri1* na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě. Projevil se pouze lehký rozdíl mezi klíčivostí semen cv. GT a *tri1* po sedmi až osmi dnech kultivace na základním médiu, a to rozdíl přibližně 10 %.



Obrázek 9: Závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

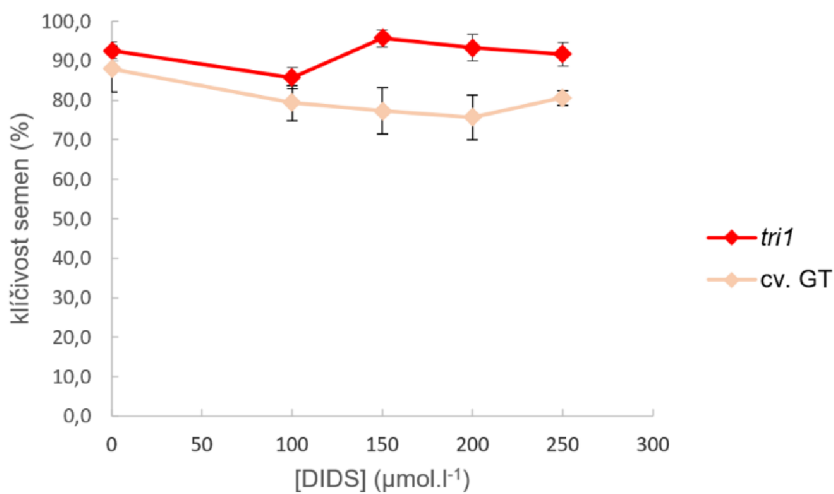
Podle obrázku 10, ukazujícího závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle, bylo klíčení u semen obou genotypů vlivem DIDS lehce stimulováno, konkrétně u koncentrace 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ klíčivost stoupla zhruba o 10 %. Tento rozdíl se už se stoupající koncentrací dále výrazně neměnil.



Obrázek 10: Závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

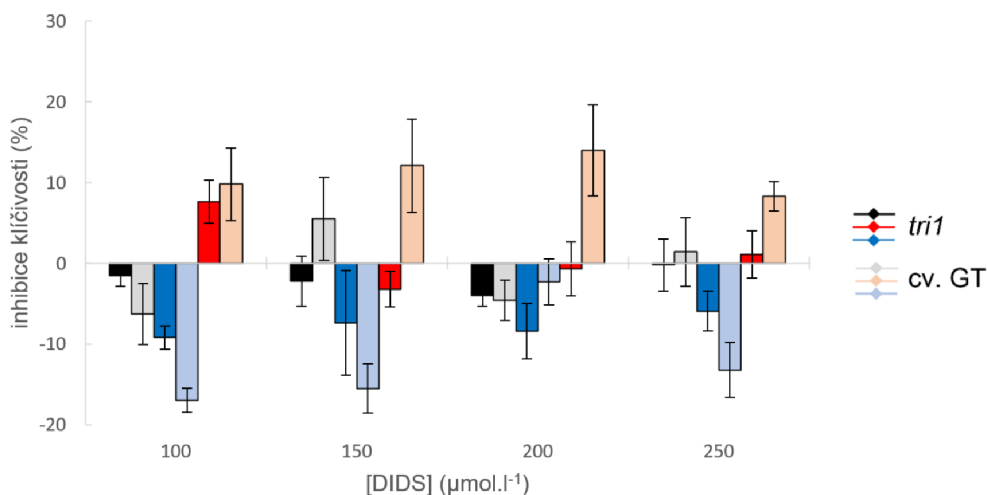
Obrázek 11 ukazuje závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle. Klíčivost semen obou genotypů se pohybovala na základním médiu kolem 90 %. Klíčivost semen cv. GT se stoupající koncentrací inhibitoru lehce klesala, a to o zhruba 10 % již při koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$, nicméně nadále už více neklesala. Klíčivost semen mutanta *tri1* za přítomnosti DIDS byla více variabilní než u cv. GT, přičemž tento inhibitor při koncentraci 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$

klíčivost mírně redukoval, zatímco při koncentraci 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ docházelo naopak k mírné stimulaci klíčení.



Obrázek 11: Závislost maximální klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

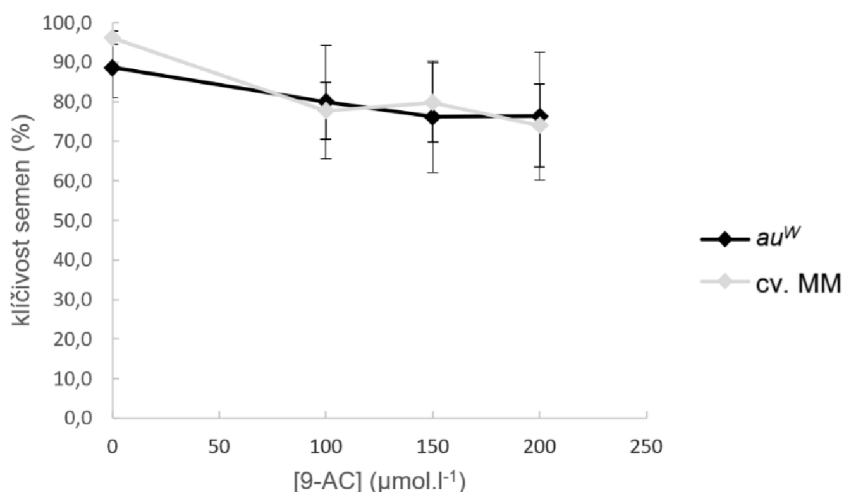
Obrázek 12 ukazuje porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT za různých světelných podmínek. Na světle byla inhibitory DIDS ovlivněna klíčivost semen kontrolního genotypu cv. GT více, než mutanta *tri1*. Na modrém světle se projevila lehká stimulace klíčivosti cv. GT kolem 15 %, na červeném světle se naopak projevila lehká inhibice kolem 10 %. U mutanta *tri1* se na modrém světle se projevila lehká stimulace klíčivosti v rámci 10 %, přičemž účinky inhibitoru nebyly výrazně závislé na jeho koncentraci.



Obrázek 12: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *tri1* a cv. GT ve tmě, na modrém a červeném světle při aplikaci DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčivosti semen (\pm SE) vypočítané z 5 nezávislých experimentů ve tmě a na BL, v případě RL ze 3 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

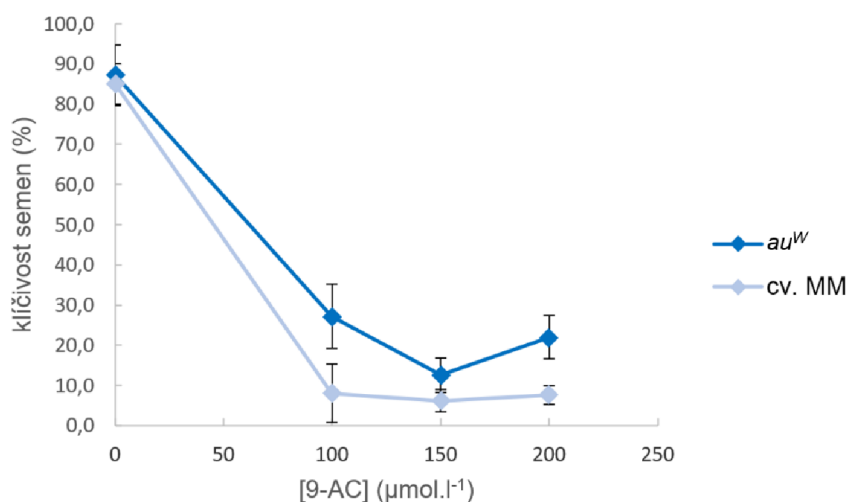
4.3 Klíčení semen au^W a cv. MM v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC

Obrázek 13 zachycuje závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC ve tmě po sedmi až osmi dnech kultivace semen. Maximální klíčivost semen obou genotypů bez inhibitoru se pohybovala mezi 90 % a 100 %. S rostoucí koncentrací 9-AC klíčivost semen lehce poklesla. Pokles se pohyboval kolem 10 % pro mutanta au^W . Pro semena cv. MM byl pokles klíčivosti okolo 20 %. Rozdíly v klíčivosti semen pro různé koncentrace inhibitoru 9-AC byly ve tmě pro oba genotypy minimální.



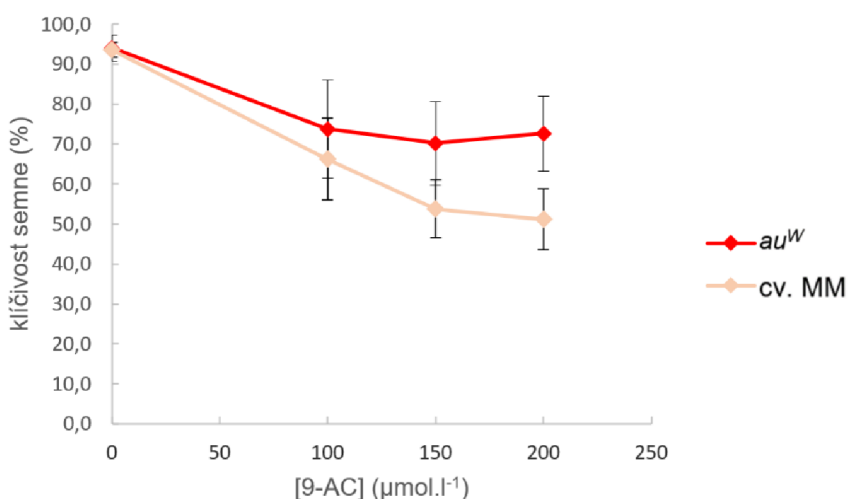
Obrázek 13: Závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

Na obrázku 14 je pak ukázána závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC na modrém světle. Klíčivost po sedmi až osmi dnech kultivace na základním médiu dosahovala u obou genotypů 85 %. Se zvyšující se koncentrací 9-AC se projevil výrazný pokles klíčivosti již od 100 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Při této koncentraci se pokles klíčivosti projevil méně u mutanta au^W (pokles klíčivosti na 30 %) než u cv. MM (redukce klíčivosti na 10 %).



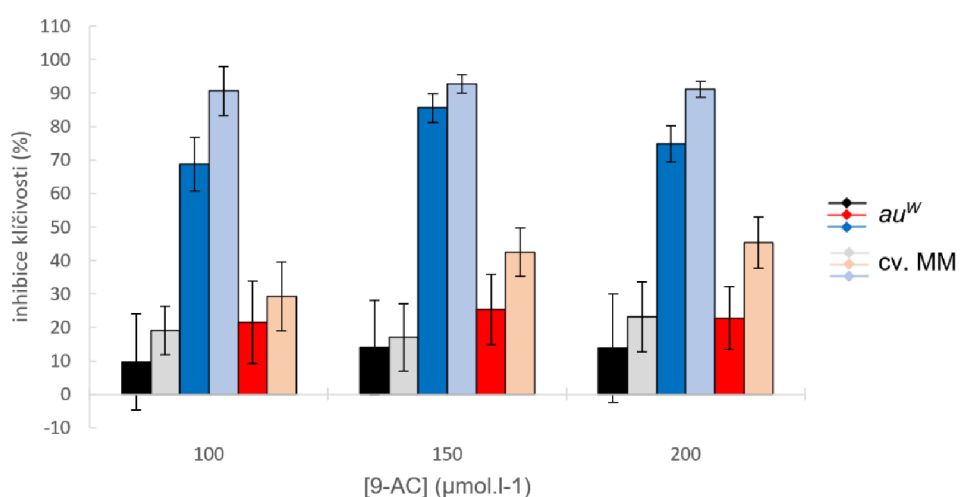
Obrázek 14: Závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

Obrázek 15 dále udává závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC na červeném světle. Lze z něj vyčíst, že klíčivost semen obou genotypů po sedmi až osmi dnech kultivace za nepřítomnosti inhibitoru lehce přesahovala 90 %. Se stoupající koncentrací inhibitoru 9-AC se u obou genotypů klíčivost snižovala. Zatímco u mutantního genotypu au^W byl pokles klíčivosti podobný u všech tří testovaných koncentrací 9-AC (snížení klíčivosti zhruba o 20 %), u kontrolního genotypu cv. MM se pokles zvyšoval se zvyšující se koncentrací 9-AC. Při koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ dosáhl tento pokles až 40 %.



Obrázek 15: Závislost klíčivosti semen mutanta au^W a cv. MM na koncentraci inhibitoru 9-AC na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

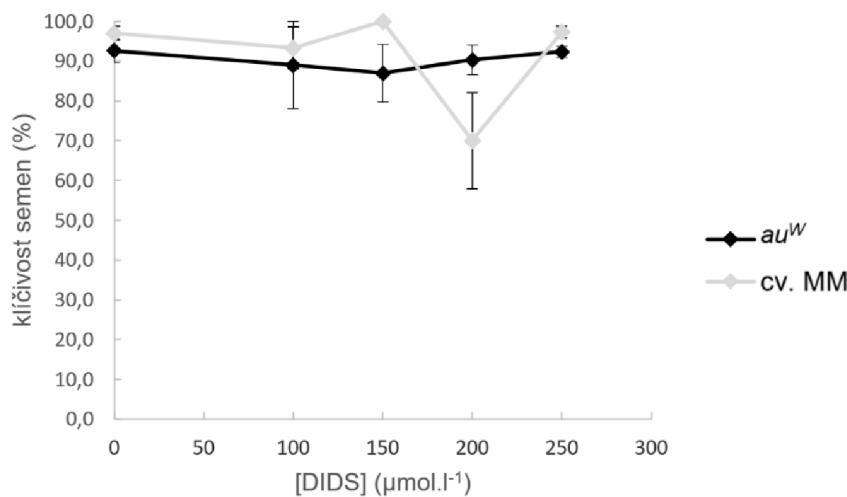
Hodnoty inhibice klíčivosti semen obou genotypů po sedmi až osmi dnech kultivace na všech testovaných koncentracích 9-AC a všech světelných podmínkách jsou ukázány na obrázku 16. Inhibitor 9-AC redukoval klíčivost semen obou genotypů v závislosti na jeho zvyšující se koncentraci. Inhibice klíčivosti na modrém světle byla nejvýraznější a dosahovala hodnot přes 90 % pro genotyp cv. MM, pro mutanta *au^W* hodnot o něco nižších. Podobná situace nastala i na červeném světle a ve tmě. Obecně na světle byl inhibiční účinek 9-AC na oba genotypy mnohem silnější než ve tmě.



Obrázek 16: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *au^W* a cv. MM ve tmě, na modrém a červeném světle vlivem 9-AC. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčení semen (\pm SE) získané z 5 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

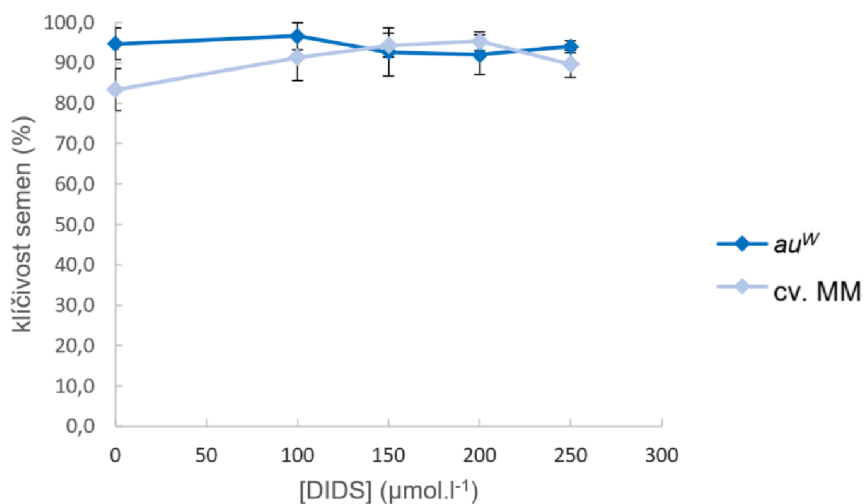
4.4 Klíčení semen *au^W* a cv. MM v závislosti na světle a inhibitoru DIDS

Obrázek 17 zobrazuje závislost klíčivosti semen mutanta *au^W* a cv. MM na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě. Klíčivost semen bez přítomnosti DIDS se pohybovala po sedmi dnech kultivace okolo 90 % u genotypu *au^W*. Pro genotyp cv. MM pak okolo 100 %. V případě obou genotypů se účinek DIDS při všech testovaných koncentracích výrazněji neprojevil. Pro koncentraci 200 μmol.l⁻¹ se projevila snížená klíčivost semen cv. MM, ale s větší standardní chybou než pro ostatní výsledky.



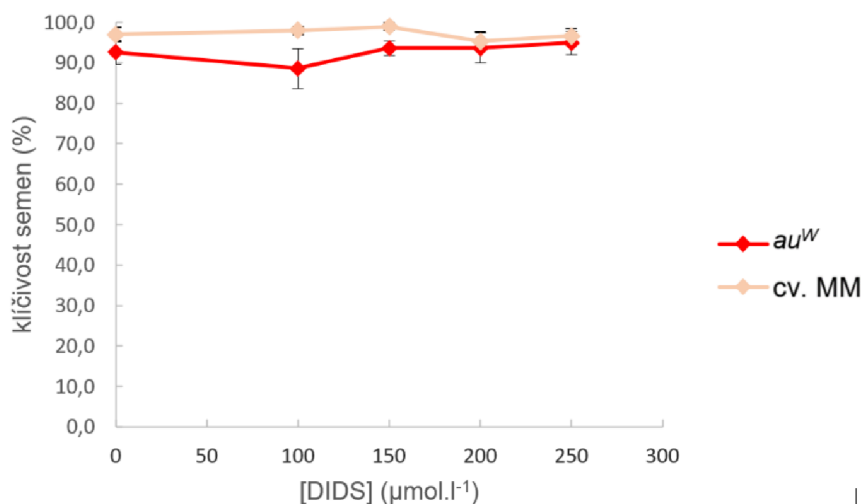
Obrázek 17: Závislost klíčivosti semen mutanta *au^W* a cv. MM na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Obrázek 18 ukazuje obdobnou závislost klíčivosti semen cv. MM a mutanta *au^W* na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle po sedmi dnech kultivace semen. Na modrém světle došlo k lehké stimulaci klíčivosti semen u cv. MM oproti *au^W*. Kontrolní genotyp cv. MM začínal na klíčivosti semen kolem 80 %, zatímco klíčivost mutantního genotypu byla lehce vyšší, dosahovala až 95 %. Se zvyšující se koncentrací inhibitoru DIDS se klíčivost semen cv. MM vyrovnala klíčivosti mutantního genotypu *au^W*.



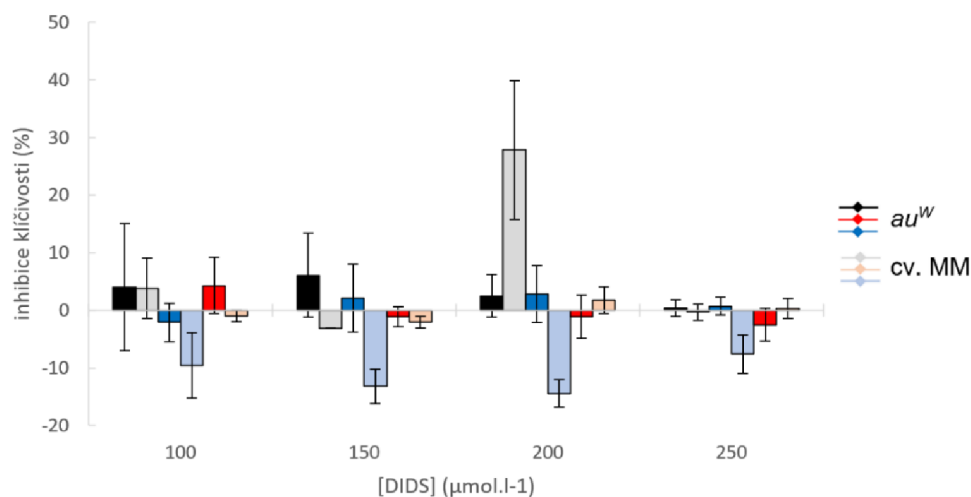
Obrázek 18: Závislost klíčivosti cv. MM a mutanta *au^W* na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčení ze 3 nezávislých experimentů (\pm SE) 7. den po výsevu.

Obrázek 19 popisuje závislost klíčivosti semen cv. MM a mutanta *au^W* na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle po sedmi dnech kultivace semen. Červené světlo v kombinaci s inhibitorem DIDS nemělo na klíčivost semen výrazný účinek. Genotyp cv. MM vykazoval klíčivost semen kolem 100 %. Genotyp *au^W* klíčivostí semen jen lehce přesáhl 90 %.



Obrázek 19: Závislost klíčivosti semen mutanta *au^W* a cv. MM na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

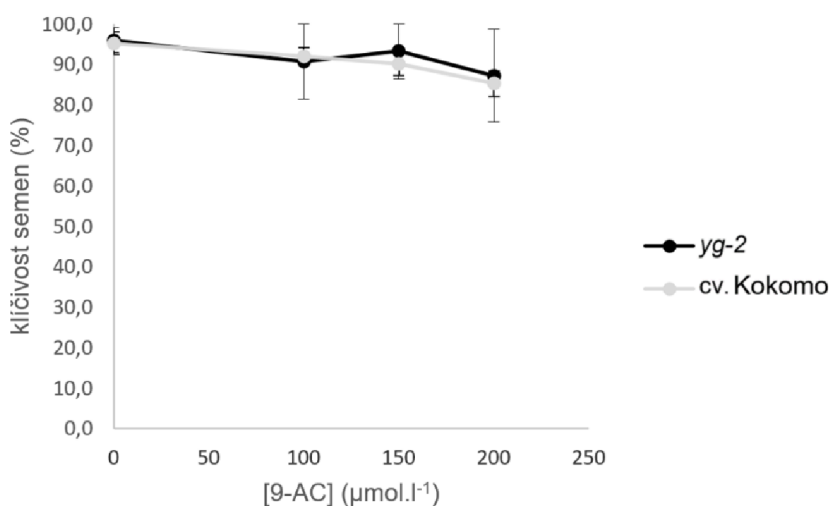
Obrázek 20 následně zachycuje porovnání inhibice klíčivosti semen cv. MM a *au^W* vlivem DIDS za testovaných světelných podmínek po sedmi dnech kultivace semen. Kontrolní genotyp cv. MM vykazoval na modrém světle lehkou stimulaci klíčivosti semen oproti mutantnímu *au^W*. Pro koncentraci DIDS 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ se projevila inhibice klíčivosti semen genotypu cv. MM necelých 30 %, nicméně tento výsledek je zatížen větší standardní chybou a pro vyšší koncentraci inhibitoru se tato inhibice neopakovala.



Obrázek 20: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *au^W* a cv. MM ve tmě, na modrém a červeném světle za přítomnosti DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčivosti semen (\pm SE) vypočítané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

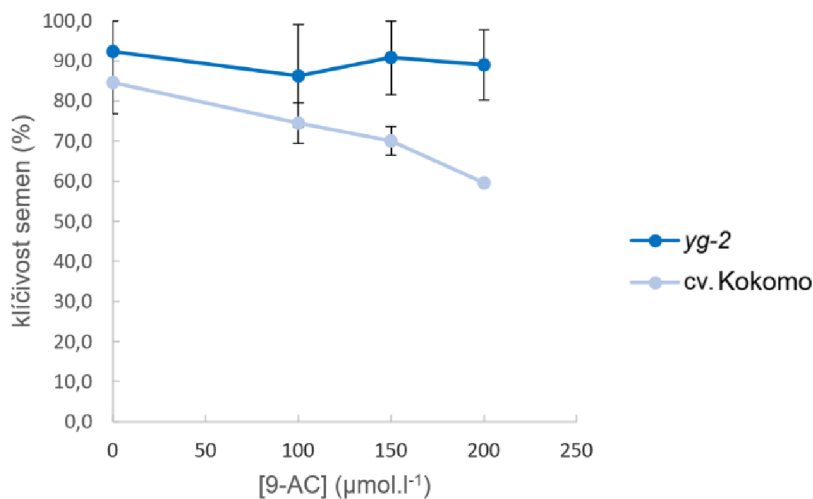
4.5 Klíčení semen *yg-2* a cv. Kokomo v závislosti na světle a inhibitoru 9-AC

Na obrázku 21 je zachycena závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo v závislosti na koncentraci inhibitoru 9-AC ve tmě po sedmi až osmi dnech kultivace. Z něj je patrné, že klíčivost semen obou genotypů dosahovala bez přítomnosti inhibitoru 95 % a v závislosti na zvyšující se koncentraci inhibitoru 9-AC se jejich klíčivost výrazně nezměnila. Při nejvyšší testované koncentraci 9-AC byla pozorována inhibice klíčivosti semen obou genotypů okolo 10 %.



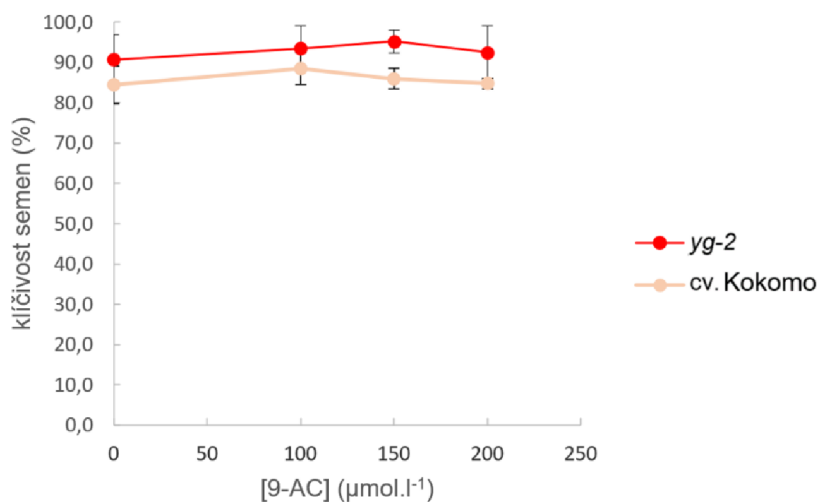
Obrázek 21: Závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru 9-AC ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Na obrázku 22 je zobrazena závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru 9-AC na modrém světle. Klíčivost semen kontrolního genotypu cv. Kokomo dosahovala na základním médiu zhruba 85 %, zatímco klíčivost mutantního genotypu *yg-2* byla přibližně o 5 % vyšší. S rostoucí koncentrací inhibitoru byla klíčivost semen silně redukována u kontrolního genotypu cv. Kokomo, kdežto u semen mutanta *yg-2* nebyla klíčivost semen výrazně ovlivněna. Inhibice klíčivosti semen cv. Kokomo pomocí 9-AC stoupala se zvyšující se koncentrací a projevila se nejvíce při koncentraci 200 $\mu\text{mol.l}^{-1}$. Výsledky pro klíčení cv. Kokomo a *yg-2* na modrém světle se podobají výsledkům u cv. MM a *au^W* při klíčení ve stejných podmínkách.



Obrázek 22: Závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru 9-AC na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

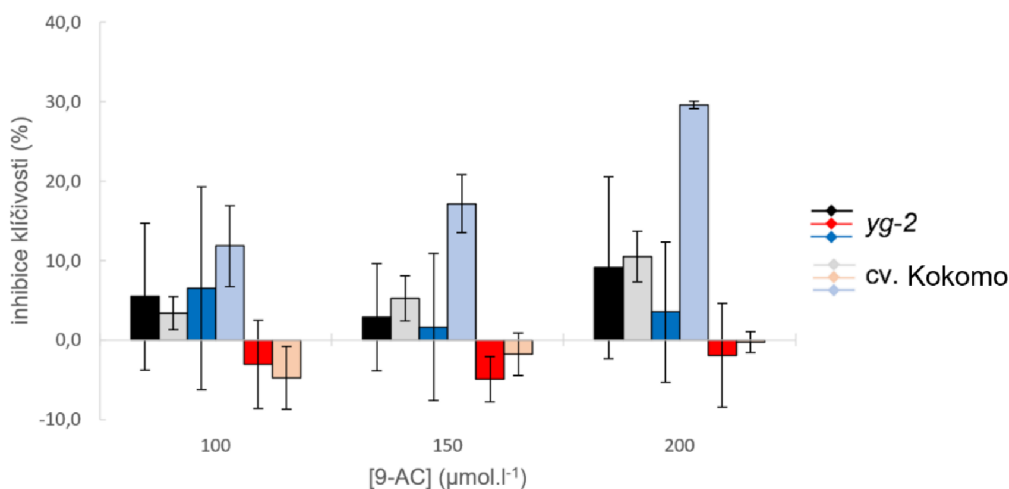
Vliv inhibitoru 9-AC na klíčivost semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na červeném světle po sedmi dnech kultivace semen je znázorněn na Obr. 23. Kontrolní genotyp cv. Kokomo vykazoval na základním médiu klíčivost semen kolem 85 %, zatímco mutantní genotyp *yg-2* vykazoval klíčivost semen zhruba o 5 až 10 % vyšší. Klíčivost obou genotypů nebyla inhibitorem 9-AC na červeném světle nijak výrazně ovlivněna a podobá se klíčivosti těchto genotypů ovlivněných inhibitorem 9-AC ve tmě.



Obrázek 23: Závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru 9-AC na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 4 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Výsledky klíčení semen cv. Kokomo a odvozeného mutanta *yg-2* ukázaly, že inhibitor 9-AC měl výraznější vliv pouze na klíčivost semen u cv. Kokomo, a to na modrém světle, jak je patrné z obrázku 24. Ten ukazuje, že klíčivost semen cv. Kokomo byla inhibována

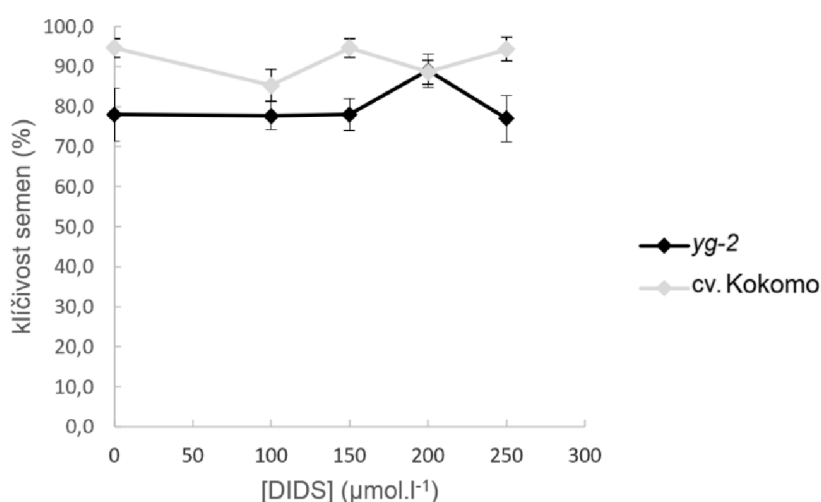
při všech testovaných koncentracích 9-AC, a to od 10 do 30 %, zatímco semena mutanta *yg-2* byla vůči 9-AC tolerantní.



Obrázek 24: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo ve tmě, na modrém a červeném vlivu 9-AC. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčivosti semen (\pm SE) vypočítané ze 4 nezávislých experimentů 7. až 8. den po výsevu.

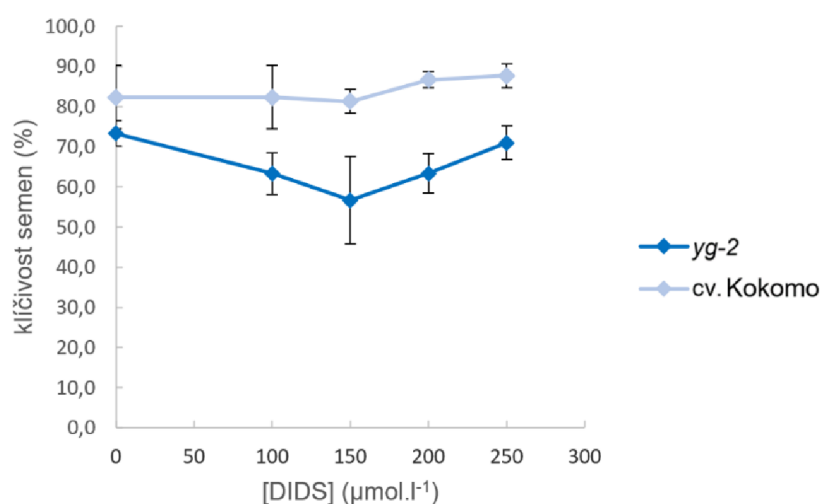
4.6 Klíčení semen *yg-2* a cv. Kokomo v závislosti na světle a inhibitoru DIDS

Obrázek 25 ukazuje závislost klíčivosti cv. Kokomo a mutanta *yg-2* na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě po sedmi dnech kultivace semen. Zatímco kontrolní genotyp cv. Kokomo vykazoval na médiu bez inhibitoru klíčivost semen kolem 95 %, mutantní genotyp *yg-2* vykazoval klíčivost semen zhruba o 15 % nižší. Se stoupající koncentrací inhibitoru DIDS se tato klíčivost nějak výrazněji neměnila.



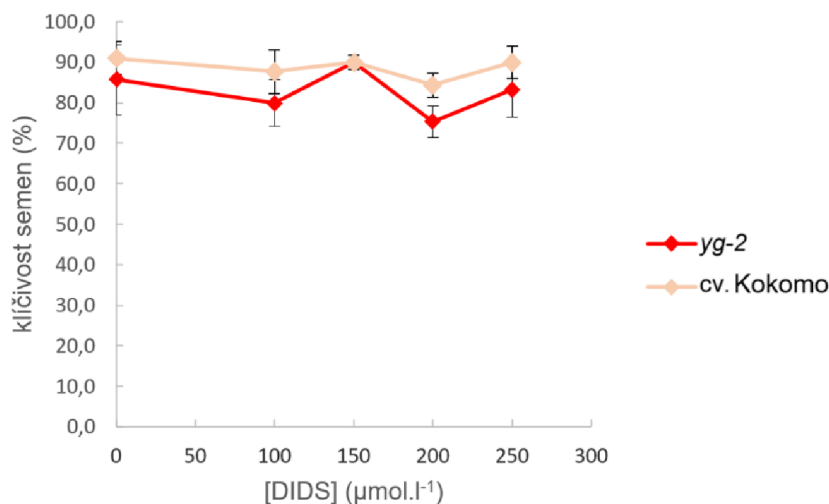
Obrázek 25: Závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru DIDS ve tmě. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Z obrázku 26 lze vyčíst závislost klíčivosti cv. Kokomo a mutantu *yg-2* na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle. Kontrolní genotyp vykazoval bez přítomnosti DIDS klíčivost semen kolem 85 % a tato klíčivost se v závislosti na stoupající koncentraci inhibitoru výrazněji nezměnila. Pro mutantní genotyp *yg-2* dosahovala klíčivost semen na základním médiu kolem 70 % a DIDS klíčivost semen výrazně neovlivnil. Pouze na koncentraci 150 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ DIDS snížil klíčivost semen na asi 55 %, přičemž tento výsledek je zatížený větší statistickou chybou.



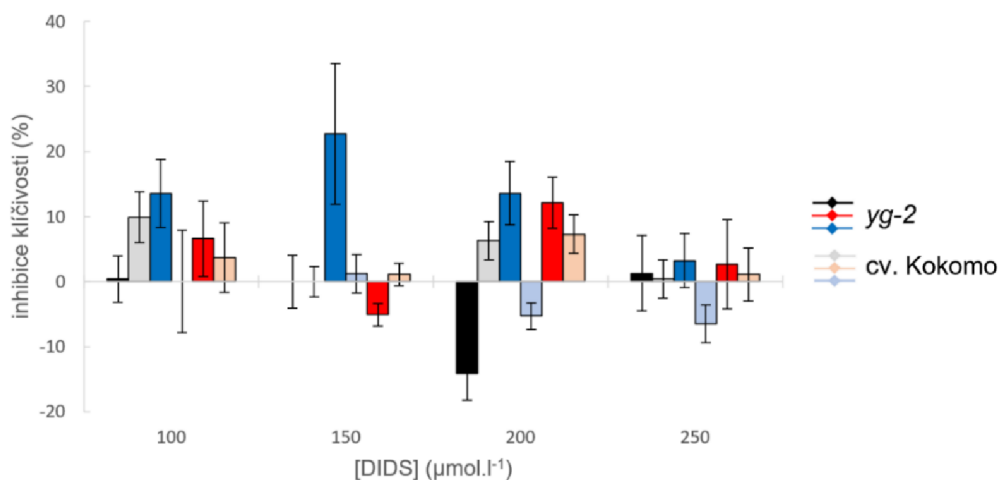
Obrázek 26: Závislost klíčivosti semen mutantu *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru DIDS na modrém světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Na obrázku 27 je zobrazena závislost klíčivosti semen mutantu *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle po sedmi dnech kultivace semen. Klíčivost semen obou genotypů dosahovala na základním médiu hodnot mezi 85 a 90 %. DIDS v testovaných koncentracích neměl na klíčivost semen obou genotypů výrazný vliv.



Obrázek 27: Závislost klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo na koncentraci inhibitoru DIDS na červeném světle. Graf ukazuje průměrné hodnoty klíčivosti semen (\pm SE) získané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

Z obrázku 28, který ukazuje porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo ve tmě, na modrém a červeném světle po sedmi dnech kultivace semen je zřejmé, že inhibitor DIDS neměl na inhibici klíčivosti obou genotypů konzistentní vliv a je patrné, že výsledky jsou zatíženy většími statistickými chybami v poměru k vyznačeným hodnotám.



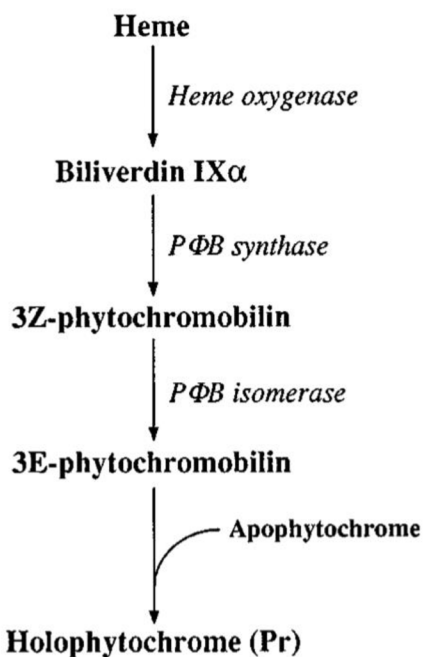
Obrázek 28: Porovnání inhibice klíčivosti semen mutanta *yg-2* a cv. Kokomo a ve tmě, na modrém a červeném světle za přítomnosti inhibitoru DIDS. Graf ukazuje průměrné hodnoty inhibice klíčivosti semen (\pm SE) vypočítané ze 3 nezávislých experimentů 7. den po výsevu.

5 Diskuse

Fotoreceptory rostlin jsou součástí složité sítě signalizačních a regulačních drah, které se navzájem proplétají, ovlivňují a doplňují ve svých funkcích a konečných projevech na fenotypy rostlin. Těmito receptory jsou receptory modrého světla, jako jsou například fototropiny nebo kryptochromy, a receptory červeného světla fytochromy. K odhalení účinků, funkce a signalizačních drah jednotlivých fotoreceptorů je využíváno fotomorfogenních mutantů, jako jsou například *Arabidopsis thaliana* nebo *Solanum lycopersicum* L. Je využíváno deficiencí v genech kódujících příslušné fotoreceptory k pozorování projevů na úrovni fenotypů rostlin a následně jsou zkoumány fyziologické procesy těchto vybraných mutantů na molekulární úrovni.

V této práci bylo studium zacíleno na rostlinné fotoreceptory fytochromy, které mají absorpční maximum v červené oblasti světla (ale absorbují i světlo modré) a hrají významnou úlohu v klíčení semen. Cílem bakalářské práce bylo zjistit, zda jsou v klíčení semen rajčete zapojeny aniontové kanály a zda fytochromy mohou regulací těchto aniontových kanálů ovlivňovat proces klíčení.

V bakalářské práci bylo testováno klíčení semen mutantů *tri1* s defektem ve fytochromu B1, a mutantů *au^W* a *yg-2*, kteří jsou deficientní ve fytochromovém chromoforu. Mutanti *au^W* a *yg-2* se ovšem liší se geny, ve kterých byla nalezena mutace. Zatímco mutant *yg-2* má defekt v hem oxygenáze, enzymu konvertujícím hem na Biliverdin IX α , mutant *au^W* je defektní v genu kódujícím enzym P Φ B syntázu, který konvertuje biliverdin IX α na 3Z-fytochromobilin (Obr. 29; Terry and Kendrick 1996).



Obrázek 29: Biosyntéza chromoforu fytochromu podle Terry and Kendrick 1996.

Experimenty s klíčením semen fotomorfogenního mutanta *au^W* a kontrolního genotypu cv. MM ukázaly, že inhibitor 9-AC inhiboval klíčivost semen obou genotypů v závislosti na zvyšující se koncentraci 9-AC. Na červeném, ale především na modrém světle byl inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen kontrolního genotypu cv. MM mnohem silnější než ve tmě. Současně bylo pozorováno, že klíčení semen mutanta *au^W* bylo na modrém i červeném světle méně inhibováno inhibitorem 9-AC než klíčení semen cv. MM. Tyto výsledky tedy ukazují, že červené světlo, a především modré světlo zesiluje inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen rajčete. Takto zvýšená citlivost semen k inhibitoru aniontových kanálů napovídá, že světelná signalizace v rostlinách může vést ke zvýšené citlivosti kanálů k 9-AC (např. změna konformace kanálu, zvýšená afinita kanálu k inhibitoru). Je rovněž možné, že světlo snižuje počet aniontových kanálů, například tím, že potlačuje expresi genů kódujících 9-AC sensitivní kanály. Podobný závěr lze učinit i na základě výsledků experimentů s cv. Kokomo a odvozeným mutantem *yg-2*. V tomto případě byl však zesilující účinek na citlivost semen cv. Kokomo k 9-AC pozorován pouze na modrém světle, nikoliv na světle červeném. To plyne z toho, že cv. MM ukazoval mnohem vyšší citlivost semen k 9-AC na modrém i červeném světle než cv. Kokomo (Obr. 16 a 24). V souladu s tím, mutant *yg-2* odvozený od cv. Kokomo ukazoval sníženou citlivost k inhibičnímu účinku 9-AC pouze na modrém světle (Obr. 24) a nikoliv na červeném, jak tomu bylo v případě mutanta *au^W*.

Experimenty s klíčením fotomorfogenního mutanta *tri1* a kontrolního genotypu cv. GT odhalily, že 9-AC inhiboval klíčení semen obou genotypů úměrně s rostoucí koncentrací. Podobně jako u cv. MM modré světlo výrazně zvyšovalo citlivost semen cv. GT k inhibičnímu účinku 9-AC. Současně bylo zjištěno, že klíčivost semen mutanta *tri1* byla inhibována vlivem 9-AC výrazně více než u kontrolního cv. GT, a to za všech testovaných světelných podmínek. Mutace *tri1* tedy obecně způsobila zvýšenou citlivost semen k inhibitoru 9-AC. To tedy vede k závěru, že funkční PhyB1, ve kterém je mutant *tri1* deficientní, může snižovat reakci semen k inhibičnímu účinku 9-AC. Lze tedy spekulovat, že PhyB1 by mohl snižovat citlivost aniontových kanálů k inhibitoru 9-AC nebo by mohl stimulovat genovou expresi vedoucí k syntéze příslušných aniontových kanálů, a tak snižovat citlivost semen k inhibitoru 9-AC.

Inhibitory aniontových kanálů, jsou látky blokující aktivitu aniontových kanálů a tím snižují přenos aniontů skrze tyto kanály. To ovlivňuje buněčnou signalizaci a procesy na aniontech závislé. Působením inhibitorů aniontových kanálů tak může docházet k blokování reakcí na vnější podněty, ve kterých jsou aniontové kanály zapojeny. Dochází tak k ovlivňování různých procesů ve vývoji rostlin. Zejména u 9-AC bylo ukázáno, že může působit jako inhibitor klíčení semen v závislosti na světelných podmínkách (Bubeníková 2017). Výsledky experimentů klíčení semen s inhibitorem DIDS ukazují, že tento inhibitor má na klíčení semen rajčete jen velmi slabý účinek,

u genotypů cv. GT a cv. MM dokonce klíčení na modrém světle mírně stimuluje. Podobné výsledky s inhibitorem DIDS byly dosaženy například v práci (Malečková 2013). To by mohlo naznačovat, že na DIDS citlivé aniontové kanály nejsou v semenech rajčete přítomny nebo nejsou v procesu klíčení semen přímo zapojeny.

Výsledky bakalářské práce tedy ukázaly, že aniontové kanály citlivé k 9-AC jsou nezbytné v procesu klíčení semen rajčete. Výsledky bakalářské práce rovněž demonstrovaly, že odpovědi semen k 9-AC mohou být regulovány světlem a že tedy světlo určitým způsobem reguluje fungování aniontových kanálů. Může tak docházet i k ovlivňování aniontové signalizace zapojené například v signalizaci fytohormonů ABA a GA, které se na klíčení semen podílejí.

6 Závěr

Cílem bakalářské práce bylo pomocí farmakologického a genetického přístupu zjistit, zda světlo prostřednictvím fytochromů může ovlivňovat aktivitu anionových kanálů v průběhu klíčení semen. Ke zkoumání procesů klíčení semen *in vitro* bylo využito studia klíčivosti semen fotomorfogenních mutantů rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) v závislosti na různých koncentracích inhibitorů anionových kanálů 9-AC a DIDS a při různých světelných podmínkách, konkrétně ve tmě, na modrém a červeném světle.

Z dosažených výsledků vyplývá, že aniontové kanály jsou zapojeny v procesu klíčení semen, a to na světle i ve tmě. Výsledky dále ukázaly, že modré a červené světlo obecně zesiluje inhibiční účinek 9-AC na klíčení semen rajčete. Výsledky tedy mohou vést k hypotéze, že světlo snižuje počet 9-AC-citlivých aniontových kanálů, nebo že může zvyšovat citlivost těchto kanálů k inhibitoru 9-AC. Fakt, že mutanti *au^W* a *yg-2* jsou tolerantnější k 9-AC naznačuje, že světlo prostřednictvím fytochromového chromoforu zesiluje reakci semen k 9-AC.

U genotypu *tri1* výsledky naznačují zvýšenou citlivost semen k inhibitoru 9-AC, a to ve tmě i na modrém a červeném světle, a tudíž napovídají, že funkční PhyB1 i v neaktivované formě, může snižovat citlivost semen k 9-AC nebo že by mohl stimulovat genovou expresi vedoucí k tvorbě aniontových kanálů citlivých k inhibitoru 9-AC.

Seznam použité literatury

- Assmann SM, Jegla T.** Guard Cell Sensory Systems: Recent Insights on Stomatal Responses to Light, Abscisic Acid, and CO₂. *Current Opinion in Plant Biology*. 2016 Oct;33:157-167
- Aukerman MJ, Hirschfeld M, Wester L, Weaver M, Clack T, Amasino RM, Sharrock RA.** A Deletion in the PHYD Gene of the Arabidopsis Wassilewskija Ecotype Defines a Role for Phytochrome D in Eed/Far-red Light Sensing. *The Plant Cell*. 1997 Aug;9(8):1317-1326
- Ádám É, Kircher S, Liu P, Mérai Z, González-Schain N, Hörner M, Viczián A, Monte E, Sharrock RA, Schäfer E, Nagy F.** Comparative Functional Analysis of Full-length and N-terminal Fragments of Phytochrome C, D and E in Red Light-induced Signaling. *New Phytologist*. 2013 Oct;200(1):86-96
- Bae G, Choi G.** Decoding of Light Signals by Plant Phytochromes and Their Interacting Proteins. *Annual Review of Plant Biology*. 2008;59:281-311
- Baetz U, Eisenach C, Tohge T, Martinoia E, De Angeli A.** Vacuolar Chloride Fluxes Impact Ion Content and Distribution during Early Salinity Stress. 2016. *Plant Physiology*. Oct;172(2):1167-1181
- Barbier-Brygoo H, Vinauger M, Colcombet J, Ephritikhine G, Frachisse J, Maurel C.** Anion Channels in Higher Plants: Functional Characterization, Molecular Structure and Physiological Role. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2000 May 1;1465(1-2):199-218
- Bentsink L, Jowett J, Hanhart CJ, Koornneef M.** Cloning of DOG1, a Quantitative Trait Locus Controlling Seed Dormancy in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* 2006 Nov 7;103(45):17042-17047
- Botto JF, Sánchez RA, Casal JJ.** Role of Phytochrome B in the Induction of Seed Germination by Light in Arabidopsis thaliana. *Journal of Plant Physiology*. 1995;146(3):307-312
- Boylan MT, Quail PH.** Phytochrome a Overexpression Inhibits Hypocotyl Elongation in Transgenic Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of U S A*. 1991 Dec 1;88(23):10806-10810
- Bubeníková V.** Úloha Fytochromů v Regulaci Iontových Kanálů během Klíčení Semen. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. 2017. Bakalářská práce (Bc.)
- Buchanan B, Gruissem W, Jones R.** *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*. 2nd edition. Wiley, 2015. ISBN 9780470714218
- Butler WL, Lane HC, Siegelman HW.** Nonphotochemical Transformations of Phytochrome in Vivo. *Plant Physiology*. 1963 Sep;38(5):514-9
- Carrera-Castaño G, Calleja-Cabrera J, Pernas M, Gómez L, Oñate-Sánchez L.** An Updated Overview on the Regulation of Seed Germination. *Plants (Basel)*. 2020 Jun 1;9(6):703
- Casal JJ, Balasubramanian S.** Thermomorphogenesis. *Annual Review of Plant Biology*. 2019 Apr 29;70:321-346
- Cheng MC, Kathare PK, Paik I, Huq E.** Phytochrome Signaling Networks. *Annual Review of Plant Biology*. 2021 Jun 17;72:217-244
- Chiang GC, Barua D, Dittmar E, Kramer EM, de Casas RR, Donohue K.** Pleiotropy in the Wild: the Dormancy Gene DOG1 Exerts Cascading Control on Life Cycles. *Evolution*. 2013 Mar;67(3):883–893

- Cho MH, Spalding EP.** An Anion Channel in Arabidopsis Hypocotyls Activated by Blue Light. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A.* 1996 Jul 23;93(15):8134-8138
- Devlin PF, Patel SR, Whitelam GC.** Phytochrome E Influences Internode Elongation and Flowering Time in Arabidopsis. *The Plant Cell.* 1998 Sep;10(9):1479-1487
- Elzenga JT, Van Volkenburgh E.** Kinetics of Ca²⁺- and ATP-dependent, Voltage-controlled Anion Conductance in the Plasma Membrane of Mesophyll Cells of *Pisum sativum*. *Planta.* 1997;201(4):415-423
- FitzGerald C, Keener J.** Red Light and the Dormancy-Germination Decision in Arabidopsis Seeds. *Bulletin of Mathematical Biology.* 2021 Jan 16;83(3):17
- Halliday KJ, Thomas B, Whitelam GC.** Expression of Heterologous Phytochromes A, B or C in Transgenic Tobacco Plants Alters Vegetative Development and Flowering Time. *The Plant Journal.* 1997 Nov;12(5):1079-1090
- Heldt HW.** *Plant Biochemistry.* 3rd edition. USA: Elsevier, 2005. ISBN 0-12-088391-0
- Hennig L, Stoddart WM, Dieterle M, Whitelam GC, Schäfer E.** Phytochrome E Controls Light-induced Germination of Arabidopsis. *Plant Physiology.* 2002 Jan;128(1):194-200
- Hiyama A, Takemiya A, Munemasa S, Okuma E, Sugiyama N, Tada Y, Murata Y, Shimazaki KI.** Blue Light and CO₂ Signals Converge to Regulate Light-induced Stomatal opening. *Nature Communications.* 2017 Nov 3;8(1):1284
- Johnson E, Bradley M, Harberd NP, Whitelam GC.** Photoresponses of Light-Grown phyA Mutants of Arabidopsis (Phytochrome A Is Required for the Perception of Daylength Extensions). *Plant Physiology.* 1994 May;105(1):141-149
- Jones R, Ougham H, Thomas H, Waaland S.** *The Molecular Life of Plants.* Wiley, 2013. ISBN 978-0-470-87012-9
- Klupczyńska EA, Pawłowski TA.** Regulation of Seed Dormancy and Germination Mechanisms in a Changing Environment. *International Journal of Molecular Sciences.* 2021 Jan 29;22(3):1357
- Koornneef M, Kendrick RE, Kerckhoffs LHM, Van Tuinen A.** Photomorphogenic Mutants of Tomato. *Plant, Cell and Environment.* 1985 Jun;20(6):746-751
- Liantonio A, Pusch M, Picollo A, Guida P, De Luca A, Pierno S, Fracchiolla G, Liodice F, Tortorella P, Conte Camerino D.** Investigations of Pharmacologic Properties of the Renal CLC-K1 Chloride Channel Co-expressed with Barttin by the use of 2-(p-Chlorophenoxy)propionic Acid Derivatives and Other Structurally Unrelated Chloride Channels Blockers. *Journal of the American Society of Nephrology.* 2004 Jan;15(1):13-20
- Longo C, Holness S, De Angelis V, Lepri A, Occhigrossi S, Ruta V, Vittorioso P.** From the Outside to the Inside: New Insights on the Main Factors That Guide Seed Dormancy and Germination. *Genes (Basel).* 2020 Dec 31;12(1):52
- Malečková E.** Zapojení Fotoreceptorů a Iontových Kanálů v Klíčení Semen. Univerzita Palackého v Olomouci, Přírodovědecká fakulta. 2013. Bakalářská práce (Bc.)
- Marten I, Deeken R, Hedrich R, Roelfsema MR.** Light-induced Modification of Plant Plasma Membrane Ion Transport. *Plant Biology (Stuttg).* 2010 Sep;12 Suppl 1:64-79
- Mathews S, Lavin M, Sharrock RA.** Evolution of the Phytochrome Gene Family and Its Utility for Phylogenetic Analyses of Angiosperms. *Annals of the Missouri Botanical Garden.* 1995;82(2): 296-321
- Mathews S, Sharrock RA.** Phytochrome Gene Diversity. *Plant Cell and Environment,* 1997 Jun 20: 666-671

- Murashige T, Skoog A.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 1962;15: 473–497
- Neff MM, Van Volkenburgh E.** Light-Stimulated Cotyledon Expansion in Arabidopsis Seedlings (The Role of Phytochrome B). *Plant Physiology*. 1994 Mar;104(3):1027-1032
- Nonogaki H.** Seed Dormancy and Germination-emerging Mechanisms and New Hypotheses. *Frontiers in Plant Science*. 2014 May 28;5:233
- Paik I, Huq E.** Plant Photoreceptors: Multi-functional Sensory Proteins and Their Signaling Networks. *Seminars in Cell and Developmental Biology*. 2019 Aug;92:114-121
- Penfield S.** Seed Dormancy and Germination. *Current Biology*. 2017 Sep 11;27(17):R874-R878
- Possart A, Fleck Ch, Hiltbrunner A.** Shedding (far-red) Light on Phytochrome Mechanisms and Responses in Land Plants. *Plant Science*. Mar;217-218:36-46
- Qin M, Kuhn R, Moran S, Quail PH.** Overexpressed Phytochrome C Has Similar Photosensory Specificity to Phytochrome B but a Distinctive Capacity to Enhance Primary Leaf Expansion. *The Plant Journal*. 1997 Nov;12(5):1163-1172
- Quail PH.** Phytochrome Photosensory Signalling Networks. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 2002 Feb;3(2):85-93
- Roberts SK.** Plasma Membrane Anion Channels in Higher Plants and Their Putative Functions in Roots. *The New Phytologist*. 2006;169(4):647-666
- Sanchez SE, Rugnone ML, Kay SA.** Light Perception: A Matter of Time. *Molecular Plant*. 2020 Mar 2;13(3):363-385
- Schroeder JI, Keller BU.** Two Types of Anion Channel Currents in Guard Cells with Distinct Voltage Regulation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U S A*. 1992 Jun 1;89(11):5025-5029
- Schroeder JI, Schmidt C, Sheaffer J.** Identification of High-Affinity Slow Anion Channel Blockers and Evidence for Stomatal Regulation by Slow Anion Channels in Guard Cells. *Plant Cell*. 1993;5(12):1831-1841
- Schwartz A, Ilan N, Schwarz M, Scheaffer J, Assmann SM, Schroeder JI.** Anion-Channel Blockers Inhibit S-Type Anion Channels and Abscisic Acid Responses in Guard Cells. *Plant Physiology*. 1995;109(2):651-658
- Shinomura T, Nagatani A, Hanzawa H, Kubota M, Watanabe M, Furuya M.** Action Spectra for Phytochrome A- and B-specific Photoinduction of Seed Germination in Arabidopsis thaliana. *Proceedings of the National Academy of Sciences U S A*. 1996 Jul 23;93(15):8129-8133
- Shinomura T, Uchida K, Furuya M.** Elementary Processes of Photoperception by Phytochrome A for High-Irradiance Response of Hypocotyl Elongation in Arabidopsis. *Plant Physiology*. 2000 Jan;122(1):147-56
- Shu K, Meng YJ, Shuai HW, Liu WG, Du JB, Liu J, Yang WY.** Dormancy and Germination: How Does the Crop Seed Decide? *Plant Biology (Stuttgart)*. 2015 Nov;17(6):1104-1112
- Subba A, Tomar S, Pareek A, Singla-Pareek SL.** The Chloride Channels: Silently Serving the Plants. 2021. *Physiologia Plantarum*. Apr;171(4):688-702
- Sullivan JA, Deng XW.** From Seed to Seed: the Role of Photoreceptors in Arabidopsis Development. *Developmental Biology*. 2003 Aug 15;260(2):289-297
- Sun XD, Ni M.** Hyposensitive to Light, an Alpha/Beta Fold Protein, Acts Downstream of Elongated Hypocotyl 5 to Regulate Seedling De-Etiolation. *Molecular Plant: Cell Press*. 2011 Jan;4(1):116-126

- Taiz L, Zeiger E, Moller I, Murphy A.** Plant Physiology and Development. 6th edition. USA: Sinauer Associates, 2015. ISBN 978-1-60535-255-8
- Tavares B, Domingos P, Dias PN, Feijó JA, Bicho A.** The Essential Role of Anionic Transport in Plant Cells: the Pollen Tube as a Case Study. *Journal of Experimental Botany*. 2011 Apr;62(7):2273-2298
- Teixeira RT.** Distinct Responses to Light in Plants. *Plants (Basel)*. 2020 Jul 15;9(7):894
- Terry MJ, Kendrick RE.** The Aurea and Yellow-green-2 Mutants of Tomato are Deficient in Phytochrome Chromophore Synthesis. *The Journal of Biological Chemistry*. 1996;271: 21681-21686
- Terry MJ.** Phytochrome Chromophore-deficient Mutants. *Plant, Cell & Environment*. 1997;20:740-745
- Thomine S, Lelièvre F, Boufflet M, Guern J, Barbier-Brygoo H.** Anion-channel Blockers Interfere with Auxin Responses in Dark-grown Arabidopsis Hypocotyls. *Plant Physiology*. 1997 Oct;115(2):533-452
- Van Tuinen A, Kerckhoffs LHJ, Nagatani A, Kendrick RE, Koornneef M.** A Temporarily Red Light-Insensitive Mutant of Tomato Lacks a Light-Stable, B-Like Phytochrome. *Plant Physiology*. 1995 Jul;108(3):939-947
- Ward JM, Mäser P, Schroeder JI.** Plant Ion Channels: Gene Families, Physiology, and Functional Genomics Analyses. *Annual Review of Physiology*. 2009;71:59-82
- Weitbrecht K, Müller K, Leubner-Metzger G.** First off the Mark: Early Seed Germination. *Journal of Experimental Botany*. 2011 Jun;62(10):3289-3309
- Yamaguchi R, Nakamura M, Mochizuki N, Kay SA, Nagatani A.** Light-dependent Translocation of a Phytochrome B-GFP Fusion Protein to the Nucleus in Transgenic Arabidopsis. *Journal of Cell Biology*. 1999 May 3;145(3):437-445
- Yang L, Jiang Z, Jing Y, Lin R.** PIF1 and RVE1 Form a Transcriptional Feedback Loop to Control Light-mediated Seed Germination in Arabidopsis. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2020a Sep;62(9):1372-1384
- Yang L, Liu S, Lin R.** The Role of Light in Regulating Seed Dormancy and Germination. *Journal of Integrative Plant Biology*. 2020b Sep;62(9):1310-1326
- Yang SW, Jang IC, Henriques R, Chua NH.** FAR-RED ELONGATED HYPOCOTYL1 and FHY1-LIKE associate with the Arabidopsis Transcription Factors LAF1 and HFR1 to transmit Phytochrome A Signals for Inhibition of Hypocotyl elongation. *Plant Cell*. 2009 May;21(5):1341-1359