

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

BAKALÁRSKA PRÁCA

2019

Anna Repkovská



Univerzita Palackého v Olomouci

Přírodovědecká fakulta

Laboratoř růstových regulátorů

**Úloha H^+ -ATPáz v tolerancii klíčení semen k abiotickým
stresom**

BAKALÁRSKA PRÁCA

Autor:	Anna Repkovská
Štúdijský program:	B1501 Experimentální biologie
Štúdijský odbor:	Experimentální biologie
Forma štúdia:	Prezenční
Vedúcí práce:	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Termín odovzdania práce:	2019

Prehlásenie

Prehlasujem, že som bakalársku prácu vypracovala samostatne, pod odborným vedením prof. RNDr. Martina Fellnera, Ph.D. a s využitím citovanej literatúry.

.....

V Olomouci dňa

.....

Podpis

Pod'akovanie

Veľmi pekne ďakujem vedúcemu bakalárskej práce, prof. RNDr. Martinovi Fellnerovi, Ph.D., za ochotu, čas a cenné rady, ktoré mi dokázal poskytnúť po celú dobu vypracovávania mojej bakalárskej práce.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Anna Repkovská
Názov práce	Úloha H^+ -ATPáz v tolerancii klíčenia semien k abiotickým stresom
Typ práce	Bakalárska
Pracovisko	Laboratoř růstových regulátorů
Vedúci práce	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019

Abstrakt

Klíčenie semena je negatívne ovplyvnené soľným stresom a k zvýšeniu tolerancie naň patrí zvýšená aktivita H^+ -ATPáz v membránach rastlinných buniek. V tejto bakalárskej práci bola prostredníctvom ortovanadátu sodného skúmaná aktivita protónových púmp v semene *Arabidopsis thaliana*, ktoré bolo vystavené soľnému stresu, v závislosti na aktivite fotoreceptoru CRY1 a kvalite svetla. Experimenty prebiehali v tme, na modrom a na červenom svetle. Bol využitý mutant *cry1-1* v géne pre skúmaný fotoreceptor CRY1 a odpovedajúci nemutovaný ekotyp *Ler* (Col).

Ukázalo sa, že samotný vanadát v použitých koncentráciách negatívne neovplyvňuje klíčenie semien. Aplikácia vanadátu nemala na klíčenie semien *Ler* na BL a v D významný vplyv a nijak neovplyvňovali toleranciu na zasolenie. Naopak u *Ler* na RL došlo aplikáciou vanadátu k zníženiu citlivosti na soľný stres. Výsledky tiež ukázali spoluúčasť fotoreceptoru CRY1 na zvýšení tolerancie semien k zasoleniu. Defekt v CRY1 zapríčinil zvýšenie citlivosti semien *cry1-1* na soľný stres, avšak na BL a RL prítomnosť vanadátu zvyšovala toleranciu semena *Arabidopsis* k zasoleniu.

Kľúčové slova	klíčenie, protónová pumpa, svetlo, <i>Arabidopsis thaliana</i> , soľný stres
Počet strán	43
Počet príloh	0
Jazyk	Slovenský (anglický)

Bibliographical identification

Author's first name and surname	Anna Repkovská
Title of thesis	Role of H ⁺ -ATPases in seed germination tolerance to abiotic stress
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	prof. RNDr. Martin Fellner, Ph.D.
The year of presentation	2019

Abstract

The germination of a seed is affected by salt stress. Increased activity of H⁺-ATPases in the plasma membranes of plant cells contributes to the increase of the tolerance to this stress. In this bachelor thesis, the activity of proton pumps in *Arabidopsis thaliana* seed exposed to salt stress was investigated using sodium orthovanadate in relation to the activity of photoreceptors CRY1 and light quality. The experiments were conducted in darkness, in blue and red light. In the experiments, *cry1-1* mutant defective in the gene coding for the CRY1 photoreceptor and corresponding non-mutated ecotype *Ler* (Col) were used.

The results show that vanadate in concentrations used in the experiments does not negatively affect germination of the seeds. The application of vanadate did not affect seed germination in *Ler* ecotype in the dark or in BL nor seed tolerance to salt stress. On the contrary, *Ler* seeds exposed to vanadate in RL showed decreased sensitivity to salt stress. The results also showed a contribution of photoreceptor CRY1 in the increase seed tolerance to salt stress. The defect in CRY1 resulted in the enhancement of sensitivity in *cry1-1* seeds to salt stress but in na BL and RL the presence of vanadate increased tolerance of *Arabidopsis* seeds to salinity.

Keywords	germination, proton pump, light, <i>Arabidopsis thaliana</i> , salt stress
Number of pages	43
Number of appendices	0
Language	Slovak (English)

Obsah

Bibliografická identifikácia	5
Úvod a ciele	8
Súčasný stav riešenej problematiky	9
Klíčenie.....	9
Stres u rastlín	11
Zasolenie ako abiotický stres.....	11
Fotomorfogenézia a fototoreceptory.....	13
Receptory modrého svetla	14
Protónová pumpa	16
Význam vákuolárnej H^+ -ATPázy (V-ATPázy) a Na^+/H^+ antiportov v tolerancií na zasolenie....	16
Regulácia H^+ -ATPázy.....	18
Materiál a metodika práce.....	20
Rastlinný materiál.....	20
Pracovné postupy	20
Príprava kultivačného média Murashige and Skoog (MS)	20
Stratifikácia a povrchová sterilizácia semien.....	20
Výsev semien.....	21
Vyhodnotenie klíčivosti semien.....	22
Výsledky	23
Citlivosť semien <i>Arabidopsis</i> k NaCl.....	24
Citlivosť semien <i>Arabidopsis</i> k Na_3VO_4	26
Vplyv Na_3VO_4 na citlivosť semien k NaCl.....	28
Diskusia	31
Záver	35
Použitá literatúra	37
Zoznam použitých skratiek	44

Úvod a ciele

Klíčenie je počiatočná fáza rastu rastliny. Semeno dokáže vyklíčiť na základe vplyvu faktorov pochádzajúcich z okolia alebo zo semena samotného. Svetlo nie je len zdrojom energie pre fotosyntézu, ale patrí k hlavným impulzom klíčenia a ovplyvňuje rad ďalších procesov v rastline. Je zachytávané špecifickými proteínovými útvarmi zvanými fotoreceptoru. Tie na základe absorpcie svetla rôznych vlnových dĺžok dokážu spustiť kaskádu reakcií, ktoré sú nevyhnutné pre konkrétne bunkové deje. Klíčenie, rast a vývin rastliny často krát neprebíha za ideálnych podmienok a rastlina je vystavovaná stresu. Pôsobením stresu je rastlina schopná upraviť alebo vytvoriť mechanizmus, vďaka ktorému sa dokáže pred nepriaznivými vplyvmi brániť. V prípade soľného stresu sa vo vysokej miere uplatňuje aktivita membránového proteínu zvaného H^+ -ATPáza. Tento enzým je uložený v membráne takmer všetkých organel rastlinných buniek a je regulovaný radou vonkajších a vnútorných faktorov ako sú napríklad svetlo, stres alebo fytohormóny. Svojou katalytickou aktivitou pomáha odolávať toxicite iónov solí v bunke, avšak podieľa sa aj na iných dejoch v rastline.

Predošlé výsledky ukázali, že svetlo redukuje inhibičný účinok soli na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* a že redukčný účinok svetla je sprostredkovaný fotoreceptorom modrého svetla CRY1 (Hladíková 2017). Cieľom predloženej bakalárskej práce bolo zistiť, či zníženie citlivosti semien k zasoleniu zahŕňa aktivitu protónovej pumpy H^+ -ATPázy a svetlom prostredníctvom CRY1. V bakalárskej práci bol študovaný účinok ortovanadátu sodného, ako inhibítora radu H^+ -ATPáz, na klíčenie modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* a či inhibícia H^+ -ATPázy vanadátom ovplyvní klíčenie rastliny vystavenej soľnému stresu. Bol taktiež využitý genetický prístup, na základe ktorého boli analyzované mutanty (*cry1-1* a *cry2*) s defektmi vo fotoreceptoroch svetla CRY1 a CRY2. Pre porovnanie výsledkov boli použité odpovedajúce ekotypy Ler a Col. Počas experimentov bolo pozorované klíčenie mutovaných a nemutovaných semien *Arabidopsis thaliana*. Semená boli kultivované *in vitro* na MS médiu za rôznych svetelných podmienok (tma, modré a červené svetlo) a pod vplyvom NaCl alebo Na_3VO_4 , ktorých rozličné koncentrácie a ich kombinácie boli pridané do kultivačného média.

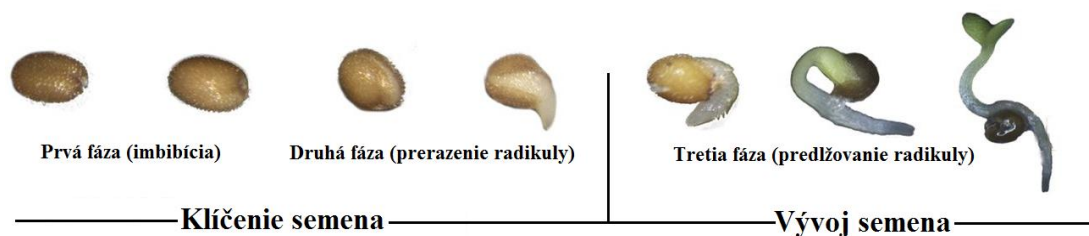
Bakalárska práca bola vypracovaná v Skupine molekulárnej fyziológie, ktorá je súčasťou Laboratória rastových regulátorov pri Prírodovedeckej fakulte Univerzity Palackého v Olomouci a Ústavu experimentálnej botaniky AVČR.

Súčasný stav riešenej problematiky

Klíčenie

Klíčenie je obdobie, ktorým rastlina začína svoj samostatný život. Je to fáza rastu novej rastliny, delenia a diferenciácie jeho buniek. Semeno je pred klíčením v kľudovom stave zvanom dormancia (Simpson 1990). Dormancia je sprevádzaná odvodnením cytoplazmy, čo spôsobuje spomalenie, respektíve zastavenie metabolických procesov v bunkách. Stavom dormancie semeno prekonáva nepriaznivé vonkajšie podmienky a je schopné takto zotrvať veľmi dlhú dobu. Impulz ku klíčeniu suchých semien dáva voda, ktorú prijmu, zbobtnajú a ktorá následne spôsobí spustenie týchto procesov a vývoja rastliny. To, či semeno vo vode vyklíči závisí aj od iných faktorov, ako je teplo, množstvo prítomného kyslíka, intenzita dopadajúceho svetla alebo vzájomný pomer hormónov regulujúcich klíčenie. Ak sa semeno nachádza v optimálnych podmienkach, prekonáva kľudové štádium a začína klíčiť. Aby sa semeno vyšlo počas klíčenia stresovým faktorom, snaží sa vyklíčiť čo najrýchlejšie. Medzi tieto faktory patria napríklad sucho, zasolenie alebo nedostatok kyslíka.

Imbibovať, nasávať vodu, môžu aj semená mŕtve a neschopné klíčiť. Avšak prítomnosť živého embrya v semene spôsobuje aktiváciu dýchania a vzrastanie aktivity enzýmov a hormónov. Prvou fázou klíčenia je rýchle nasávanie vody semenom a zvyšovanie príjmu kyslíka. Počas druhej fázy dochádza k rehydratácii buniek, kedy sú rozpustené zásobné látky a aktivujú sa metabolické procesy. V tejto fáze dochádza tiež k vývoju mitochondriálneho aparátu. Zväčšovaním embrya dochádza k viditeľnej známke klíčenia, kedy radikula prerazí osemenie semena a klíčenie je ukončené. Semeno prechádza do ďalšej fázy. Radikula vo veľkej miere imbibuje, jej bunky sa predlžujú a časom je započatá ich mitotická aktivita. (McDonald et al. 1988, Bewley 1997).



Obr. 1: Viditeľné deje počas klíčenia semena (prevzaté a upravené od Silva 2016)

Klíčenie rastlín ovplyvňujú podnety vonkajšie (exogénne) ale aj vnútorné (endogénne). Medzi endogénne podnety patrí predovšetkým prítomnosť inhibičných látok a hormónov v materskej rastline alebo v semene samotnom. Medzi hlavné fytohormóny ovplyvňujúce klíčenie semien patria giberelíny (GA) a kyselina abscisová (ABA). Tieto dva rastlinné hormóny pôsobia proti sebe a regulujú tak kľudový stav semena. Faktory narušujúce dormanciu, zvyšujú citlivosť giberelínov, ktoré stimulujú klíčenie. Kyselina abscisová klíčenie inhibuje a udržiava stav dormancie. Je obsiahnutá v materskej rastline a v semene (Finkelstein et al. 2008).

Významný exogénny podnet pre klíčenie je svetlo. Svetlo môže klíčenie stimulovať alebo naopak inhibovať. Semená, ktoré sú svetlom navodzované ku klíčeniu, tzv. kladne fotoblastické (Borthwick et al. 1952). Spektrum denného žiarenia je spojené a obsahuje žiarenie o vlnových dĺžkach 400-750 nm. Rastliny však reagujú len na žiarenie určitých vlnových dĺžok, tzv. akčných spektier, tj. odozvy na vlnovej dĺžke pôsobiaceho žiarenia. Jedná sa o oblasť červeného a modrého žiarenia. Vlnové dĺžky týchto oblastí viditeľného svetla pozitívne ovplyvňujú vývoj a rast rastliny, tým že aktivujú fytochrómy. Naopak záporne fotoblastické semená lepšie kľčia v tme. Dovoľuje im to už aktívna forma fytochrómu. Hladina aktívneho fytochrómu je znížená, ak je semeno vystavované svetlu. V tom prípade nie je schopné kľčiť (Whitelam and Delvin 1997).

Stres u rastlín

Rastliny sú často krát vystavované nepriaznivým podmienkam okolitého prostredia. Tie u nich vyvolávajú stres, ktorý sa prejavuje hlavne na zmene rastu a vývoja živého organizmu. Kvôli usadnutému spôsobu života, nie je rastlina schopná pred stresom utiecť. Jedinou možnosťou ako sa s ním vysporiadať je prispôbiť sa mu. Aklimatizácia je spojená s dočasnými zmenami v bunkách rastliny.

Faktory zapríčínujúce stres, tzv. stresory sa podieľajú na aktivácií, respektíve inhibícií konkrétnych bunkových mechanizmov. Rastliny vyvíjajú tak veľké množstvo fyziologických a biochemických stratégií na zvládanie stresu. Po prenose stresových signálov sa aktivuje viacero sekundárnych signálov a hladina intracelulárneho Ca^{2+} sa okamžite zvyšuje, čo môže spustiť fosforylačnú kaskádovú reakciu a pôsobiť tak na proteíny podieľajúce sa na bunkových obranných alebo transkripčných faktoroch. Potom transkripčné faktory regulujú expresiu génov, ktoré reagujú na stres. Podľa typu a dĺžky pôsobenia stresu na rastlinu, organizmus vytvára potrebné metabolity na jeho prekonanie alebo sa môže v dôsledku dlhodobého stresového stavu adaptovať modifikáciou určitých génov. Genetická modifikácia vedie k tvorbe nových proteínov a organel v bunke rastliny (Kosová et al. 2011). Takto sa rastliny postupne prispôbujú stresu. Zatváranie stômat, akumulácia osmolytov alebo zvýšená aktivita antiportu Na^+/H^+ sú obranné mechanizmy vyskytujúce obzvlášť pri soľnom strese (Liang et al. 2018).

Zasolenie ako abiotický stres

Zvýšený obsah solí v pôde je prirodzene v prímorských oblastiach, ale nachádza sa aj vo vnútrozemí. V týchto miestach môže byť salinita pôd spôsobená dlhodobým zavlažovaním. Princíp zvyšovania koncentrácií solí zavlažovaním je taký, že sa pôdna voda odparuje alebo je transpirovaná rastlinami. Strata vody je nepriamo úmerná koncentrácií solí v pôde. Rastlina žijúca v miestach s vysokým obsahom solí je vystavovaná stresu.

Soľný stres má významný vplyv na rast a vývoj rastlín. Osmotický stres je prvým stresom, ktorý sa vyskytne, keď je rastlina vystavená slanej pôde a okamžite ovplyvňuje rast. Toxicita iónov sa prejaví neskôr, keď hladiny soli dosiahnu prahovú hodnotu, nad ktorou rastlina nedokáže udržať homeostázu iónov a rast. Iónová toxicita a osmotický stres patria medzi primárny stres, ktorý môže spôsobiť oxidačný a rad

sekundárnych stresov. Soľný stres tiež vedie k zníženiu fotosyntézy a k výraznému poklesu výnosov rastliny (Liang et al. 2018).

Druhy schopné prežiť bez poškodenia aj značné zasolenie pôdy sú označované ako halofytné. Halofyty si dokážu jednoducho vytvoriť obranné mechanizmy voči stresu vytvoreného prítomnosťou solí v pôde, ktorých vysoká koncentrácia môže byť pre bunku škodlivá. Jedným z týchto mechanizmov je úprava osmózy. Táto úprava má za následok stratu turgoru v bunkách a zníženie vodného potenciálu. Po osmotických úpravách majú rastlinné bunky spomalený rast, ale sú schopné prežiť. Avšak zníženie vodného potenciálu zvyšuje citlivosť k sodným katiónom, obsiahnutých v chloride sodnom. Za bežných podmienok cytosol vyšších rastlín obsahuje približne 100 mM K^+ a menej než 10 mM Na^+ a vytvára optimálne prostredie pre funkciu enzýmov. V slanom prostredí cytosolové Na^+ a Cl^- zvýšia svoju koncentráciu na viac ako 10 mM a tieto ióny sa stávajú toxické. Vysoká koncentrácia solí zapríčiňuje denaturáciu proteínov a s tým spojenú destabilizáciu membrán, nakoľko majú Na^+ väčšiu schopnosť znehodnocovať proteíny než K^+ , ktorý sa bežne v bunke nachádza. Akumulácia iónov počas úprav je smerovaná predovšetkým do vakuoly, kde ióny nie sú v kontakte s cytosolovými enzýmami a organelami (Taiz et al. 2015). S tým je spojená zvýšená tvorba a činnosť iónových kanálov a protónových púmp uložených do cytoplazmatickej a vakuolovej membrány. Odstránenie sodíkových katiónov z bunky, katalizované špecifickým Na^+/H^+ antiportom, závisí o od elektrochemického protónového gradientu na cytoplazmatickej membráne. Pumpa, ktorá generuje tento gradient sa nazýva H^+ -ATPáza (Janicka-Russak and Kabała 2015).

Slaná pôda má vplyv na klíčenie rastliny rovnakými dvoma spôsobmi, ktoré boli spomenuté v odstavci vyššie. Taktiež sa v bunkách semena zvyšuje osmotický potenciál, ktorý bráni príjmu vody alebo sa vytvárajú podmienky pre vstup iónov, ktoré môžu byť toxické pre embryo alebo vývoj semien (Bewley and Black 1982). Chlorid sodný sa považuje za najhorojšiu soľ, ktorá spôsobuje stres zo zasolenia. Semená väčšiny halofytných rastlín dosahujú maximálnu klíčivosť v neprítomnosti NaCl a sú veľmi citlivé na zvýšenú salinitu počas klíčenia. Soľný stres má vážne následky na život semien. Niektorým halofytným druhom môže vysoká pôdna slanosť spôsobiť, že ich semená nevyklíčia, pokiaľ sa podmienky prostredia nezlepšia. Klíčivosť semien v slanom prostredí sa väčšinou zvyšuje počas obdobia zrážok, kedy sa zvyšujúcim množstvom vody v pôde, znižuje koncentrácia solí (Guo et al. 2012).

Fotomorfogenézia a fotoreceptory

Rastliny závisia od svetla, ktoré je ich hlavným zdrojom energie a dôležitým zdrojom informácií. Detekcia a reakcia rastlinného organizmu na svetelné prostredie je umožnená prítomnosťou niekoľkých typov fotoreceptorov. Signálne dráhy iniciované aktiváciou týchto fotoreceptorov umožňujú rastline upraviť vývojové procesy, ako je klíčenie, predlžovanie a ohyb stonky, vývoj a orientácia chloroplastov alebo kvitnutie (Weller and Kendrick 2008). Vývoj rastliny v tme je označovaný ako skotomorfogenéza a takéto rastliny sú etiolované. Majú väčšinou dlhé, štíhle hypokotyly a nerozprestreté listy žltej farby. Prechod vyvíjajúceho sa organizmu do fotomorfogenézie, tj. rast na svetle, sa nazýva ako de-etiolizácia (Deng et al. 1992, Taiz et al. 2015). Svetlo rôznej vlnovej dĺžky ovplyvňuje rast a vývoj rastliny rôznym spôsobom. Najaktívnejšími oblasťami svetelného spektra je oblasť červeného žiarenia, hlavne žiarenie vlnovej dĺžky 660 a 730 nm, a modrého žiarenia, ktorých absorpčné maximá sú pri vlnovej dĺžke 450 a 480 nm. Aby rastliny mohli na žiarenie reagovať, musia byť schopné prijať signál, spracovať ho a preniesť na bunkovú úroveň, odkiaľ môže byť signál ďalej prenesený na úroveň morfofogenetickú (Kendrick and Kronenberg 1994, Neff et al. 2000). Prijem svetelných signálov je sprostredkovaný vďaka špecifickým fotoreceptorom (Deng et al. 1991).

Na rozdiel od fotosyntetických pigmentov, fotoreceptory absorbujú fotón o danej vlnovej dĺžke a z neho získanú energiu využijú ako signál, ktorý iniciuje fotoaktívnu reakciu. Všetky známe fotoreceptory pozostávajú z proteínu a prostetickej skupiny absorbujúcej svetlo, ktorá sa nazýva chromofór. Spoločné aspekty receptorov predstavuje citlivosť na množstvo svetla, na jeho intenzitu alebo na dobu expozície. Napriek tomu sú ich proteínové štruktúry odlišné (Taiz et al. 2015). Špecializované fotoreceptorové systémy vykazujú maximálnu absorpciu svetla v špecifickej oblasti svetelného spektra. Fotoreverzibilné fytochrómy absorbujú prevažne červenú (RL) a ďalekú červenú (FR) oblasť spektra, ale aj časť modrého svetla. Kryptochrómy a fototropíny absorbujú svetlo v modrej oblasti. Fytochrómy sú možno najlepšie charakterizované fotoreceptorovými systémami (Halliday et al. 2001). Nedávne pokroky naznačujú, že fytochrómy pôsobia transkripčne, pretože sú schopné nasmerovať svetelné signály na fotoresponzívne promótoxy, tým že sa naviažu na transkripčný regulátor. Naopak kryptochrómy pôsobia post-translačne. Rovnako ako fytochrómy sa aj kryptochrómy viažu priamo na E3 ubiquitin ligázu, ktorú predstavuje

proteín COP1 (Constitutively Photomorphogenic 1). Ich úlohou je prerušiť degradáciu transkripčného aktivátora. Táto interakcia smeruje k zvýšeniu hladiny aktivátora a k následnej expresii cieľového génu (Quail 2002).

Receptory modrého svetla

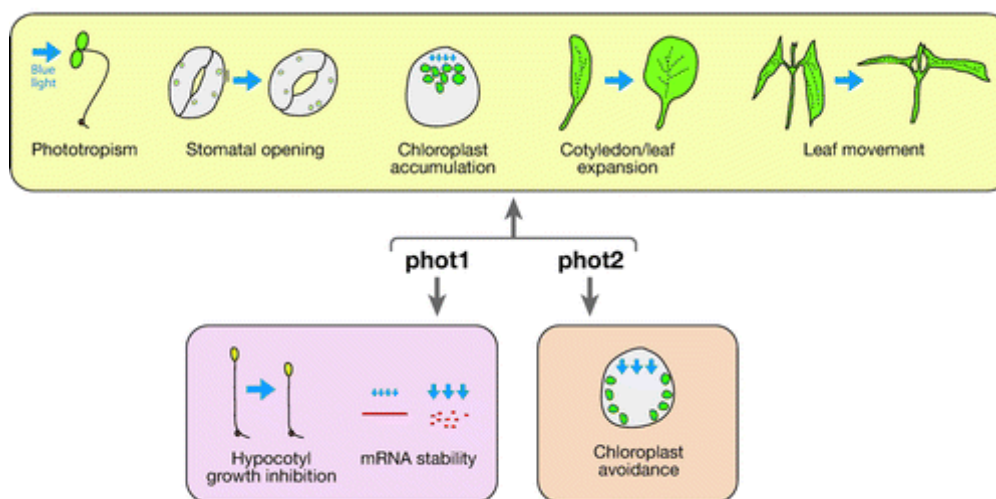
Oblasť BL ovplyvňuje prevažne fototropizmus, rast stonky do dĺžky, pohyby chloroplastov, kvitnutie alebo otváranie prieduchov, s čím je spojená aktivácia protónovej pumpy. Medzi hlavné fotoreceptory absorbujúce BL patria kryptochrómy a fototropíny (Taiz et al. 2015)

Kryptochrómy boli u rastlín evolučne odvodené z fotolyáz, schopných katalyzovať opravy v DNA. Z dôvodu vysokého stupňa sekvenčnej homológie kryptochrómových génov s génmi kódujúcimi fosfolyázu, sú tieto molekuly veľmi podobnej štruktúry. Kryptochrómy majú dve rozoznatelné domény, doménu homológnu s fotolyázou (PHR) a kryptochrómovú C-terminálnu doménu (CCE). Všetky fotolyázy a kryptochrómy môžu mať na C-konci PHR domény nekovalentne naviazaný chromofór flavínadenínindinukleotid (FAD), ktorý je v nezvyčajnej konformácii vo tvare U a umožňuje absorpciu modrého svetla. Na N-koniec PHR domény u kryptochrómu je viazaný druhý chromofór. Slúži ako anténa na zbieranie svetla, ktorej akčné spektrum je vo viditeľnej oblasti svetelného žiarenia. Základným anténovým chromofórom je 5,10-methyltetrahydrofosfát (MTHF, pterin). Spoločným rysom fotolyáz a kryptochrómov je ale schopnosť vystaviť zabudovaný FAD chromofór BL indukovanej fotoredukcií z oxidovaného stavu (FAD) na čiastočne redukovanú formu FAD⁻, FADH a v prípade fotolyáz až na plne redukovaný stav FADH (Sancar 2003, Li et al. 2013, Shalitin et al. 2003, Liu et al. 2016).

Rastlina *Arabidopsis thaliana* sa najčastejšie používa na štúdium kryptochrómov (CRY). V genóme tejto rastliny sú zakódované tri druhy CRY (CRY1, CRY2, CRY3). CRY3 je typ fotoreceptoru, ktorý je detekovaný v mitochondriách alebo chloroplastoch a jeho úlohou je opravovať UV-indukované poškodenia jednoreťazcovej DNA (Sancar 2003). CRY1 a CRY2 sú fotoreceptory, ktorých rozdiel spočíva hlavne v tom, že proteín CRY2 je prednostne degradovaný BL, kdežto CRY1 je oveľa stabilnejší. Oba kryptochrómy regulujú de-etiláciu indukovanú BL. CRY1 fotoreceptor, ktorý absorbuje fotóny v oblasti BL, inhibuje predovšetkým predlžovanie hypokotylu. Naopak nadmerná exprimácia génu CRY2 spôsobuje vo veľkej miere expanziu kotyledónu. Fosforylácia CRY2 závislá na BL, ktorá sa vyskytuje primárne v jadre

bunky, zvyšuje aktivitu CRY2, polyubiquitináciu a proteolýzu zmenou konformácie fotoreceptora. Nedávno bolo zistené, že negatívne regulátory kryptochrómov, inhibítory BL u CRY1 a 2, potlačujú dimerizáciu, fosforyláciu, degradáciu a fyziologickú aktivitu CRY2 v *Arabidopsis*. (Yu et al. 2009, Taiz et al. 2015, Liu et al. 2017).

Ako senzory modrého svetla v rastline vystupujú tiež fototropíny (phot). U vyšších rastlín ako je *Arabidopsis thaliana*, boli identifikované dve izoformy: phot1 a phot2. Obe izoformy obsahujú dve domény LOV1 a LOV2 (LOV z ang.: light/oxygen/voltage), serín-treonín kinázovú doménu na C-konci a doménu ktorá spája kinázu a LOV2. Na LOV1 a LOV2 sa nekovalentne viaže flavínmononukleotid (FMN), ktorý je kofaktorom pre absorpciu modrého svetla. Je známe, že biologické úlohy domén LOV1 a LOV2 sú veľmi odlišné pričom LOV1 kontroluje citlivosť phot na svetlo a LOV2 reguluje hlavne aktivitu kinázy. Spočiatku boli phot identifikované ako fotoreceptory, ktoré sprostredkovali odpoveď na fototropizmus. Neskôr sa ukázalo, že sa podieľajú na regulácii procesov závislých od svetla, ako sú pohyby chlórplastov, otváranie stômat alebo sploštenie listov, ale aj predlžovanie. Tieto procesy slúžia na optimalizáciu fotosyntetickej účinnosti a na podporu rastu. Rozdiel medzi izoformami spočíva v odlišnej závislosti na BL. Zatiaľ čo phot1 pôsobí ako snímač BL pre fototropizmus, phot2 funguje ako senzor v etiolovaných rastlinách, ktorý je exitovaný vyšším vplyvom modrého žiarenia (Christie 2007, Nakasone et al. 2014, Okajima 2016)



Obr. 2: Zhrnutie odpovedí vyšších rastlín na modré svetlo sprostredkované fototropínami (prevzaté a upravené z Christie 2007)

Protónová pumpa

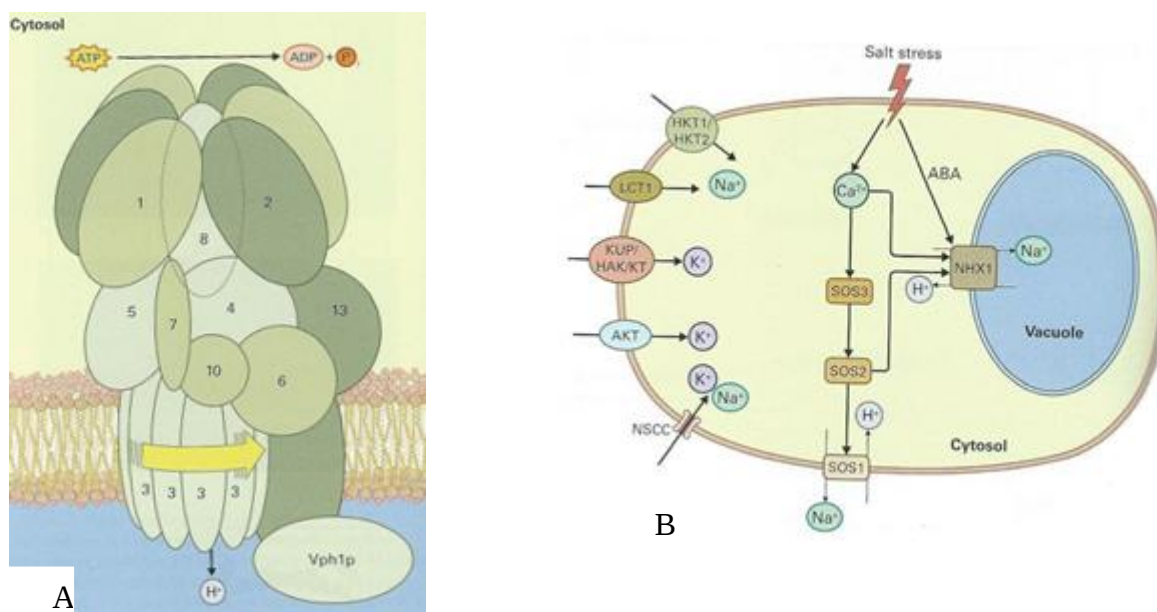
Rast rastlinných buniek je silno ovplyvnený prostredím, ale aj vopred určeným programom vývoja. Protónová pumpa uložená v plazmatickej membráne (PM H^+ -ATPáza), patrí medzi primárne aktívne transportéry, ktoré prenášajú protóny vodíka z cytosolu do extracelulárneho priestoru. Prenos protónov pumpou sprevádzajú rôzne konformačné zmeny H^+ -ATPázy. Fungovanie protónovej pumpy umožňuje hydrolýza adenosíntrifosfátu (ATP), čím je vytvorená potrebná energia. H^+ -ATPáza má v rastlinných bunkách dve hlavné úlohy spojené s transportom protónov. Prvou je okysľovanie bunkových stien a alkalizácia cytosolu, čím H^+ -ATPáza ovplyvňuje rast bunky, otváranie stômat, expanziu bunky ale aj mnohé ďalšie bunkové procesy. Druhou úlohou tvorba elektrochemického gradientu protónov cez plazmatickú membránu, ktorým môže riadiť transport iónov a rozpustených látok proti ich koncentračným gradientom (Buchanan et al. 2015, Buch-Pedersen et al. 2009, Haruta et al. 2015).

Mnohé štúdie preukázali, že protónová hybná sila vytvorená H^+ -ATPázou nielenže poháňa sekundárne transportéry, ale tiež zohráva priamu úlohu pri regulácii expanzie buniek. Za účelom potvrdiť túto skutočnosť, bola vytvorená transgénna rastlina *Arabidopsis thaliana* exprimujúca H^+ -ATPázovú izoformu 2 (AHA2). Svetlom indukovaná lokalizácia AHA2 do plazmatickej membrány mala za následok predlžovanie koreňových buniek (Haruta et al. 2018).

Význam vákuolárnej H^+ -ATPázy (V-ATPázy) a Na^+/H^+ antiportov v tolerancii na zasolenie

Pôdna slanosť narúša vnútrobunkovú homeostázu a znižuje metabolickú aktivitu v rastlinách. Nadbytočné sodné ióny vedú k nedostatku vody, membránovej disfunkcii a iónovej toxicite v rastlinných bunkách. Hlavný mechanizmus, ktorý zabraňuje nadmernej akumulácii Na^+ v cytosole a zvyšuje tak toleranciu na soľný stres, je zvýšenie sekvestrácie Na^+ do vákuol. Zvýšená aktivita V-ATPázy totiž vytvára protónový gradient cez membránu, čím umožňuje Na^+/H^+ antiportom pumpovať Na^+ do vákuoly. (Maathius et al. 2014, Roy et al. 2014, Niu et al. 1995, Chinnusamy et al. 2006). Jedným z iónových transportérov cez tonoplast je sodno-protónový (Na^+/H^+) antiport. Nadmerná expresia Na^+/H^+ antiportu u *Arabidopsis thaliana* podporuje rast a vývoj rastliny v pôde, ktorá obsahuje až 200 mmol/l NaCl. Zvýšenou aktivitou antiportu sa znižuje toxicita Na^+ v cytosole a bunka je schopná prijať vodu (Apse et al. 1999).

V *Arabidopsis thaliana* bol identifikovaný Na^+/H^+ antiport s vysokou citlivosťou na zasolenie s názvom SOS1 (Salt Overly Sensitive 1), ktorý sprostredkúva pasívny transport H^+ do a aktívny transport Na^+ z bunky (Buchanan et al. 2015). *Arabidopsis sos1* mutanti vykazujú NaCl-hypersenzitívny fenotyp, zatiaľ čo nadmerná expresia SOS1 zlepšuje toleranciu na soľný stres. Transgénne rastliny, ktoré sú pod vplyvom vyšších koncentrácií Na^+ vykazujú významnú toleranciu solí v porovnaní s kontrolnými rastlinami divokého typu. Táto tolerancia je dôsledkom zníženia akumulácie Na^+ v cytosole. Ukladanie Na^+ do vakuoly je zabezpečené pomocou antiportu s názvom Na^+/H^+ exchanger (NHX1), ktorý je uložený v tonoplaste. Transgénne rastliny s nadmernou expresiou NHX1 vykazujú zvýšený transport do vakuoly a vďaka tomu môžu rásť a produkovať semená aj v prítomnosti vysokých koncentrácií NaCl.



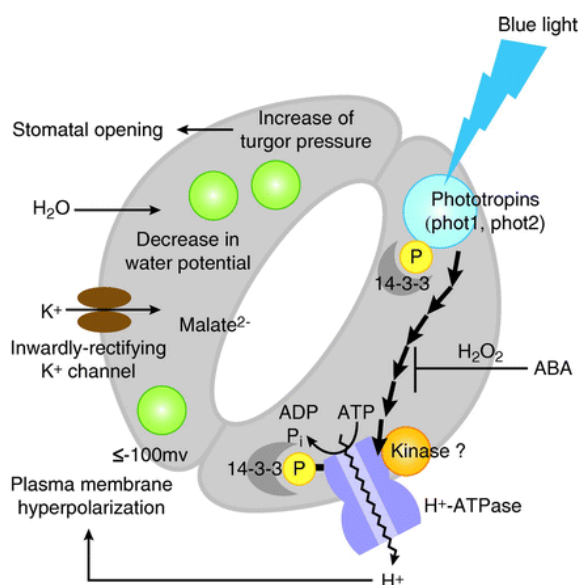
Obr. 3: A, Štruktúrny model V-ATPázy v *Saccharomyces cerevisiae*. B, Iónové kanály a transportéry pomáhajú udržiavať iónovú homeostázu v podmienkach soľného stresu. Pôsobenie soli zvyšuje aktivitu Na^+/H^+ antiportov, ktoré potom pumpujú Na^+ buď von z bunky, alebo do vakuoly. Napríklad soľný stres spôsobuje zmeny v koncentrácií Ca^{2+} , ktoré regulujú SOS3, ktorý následne reguluje SOS2 proteinkinázu aktivujúcu SOS1 Na^+/H^+ antiport nachádzajúci sa v plazmatickej membráne. Zmeny na úrovniach kyseliny abscisovej tiež regulujú NHX1 Na^+/H^+ antiport (oba obrázky prevzaté z Buchanan et al. 2015).

Regulácia H^+ -ATPázy

Katalytická aktivita H^+ -ATPázy je regulovaná hlavne fosforyláciou posledného treonínového zvyšku na C-konci a následnou interakciou proteínu 14-3-3 s fosforylovaným C koncom (Sondergaard et al. 2004, Duby and Boutry 2009). Interakcia proteínu umožňuje uvoľnenie katalytickej domény z autoinhibitorovej domény, čo vedie k aktivácii H^+ -ATPázy (Palmgren 2001). Hlavným exogénnym signálom, ktorý reguluje aktivitu H^+ -ATPázy je svetlo rôznych vlnových dĺžok alebo kyslý stres (Kinoshita and Shimazaki 1999, Bobik et al. 2010). Naopak vplyv na funkciu H^+ -ATPázy môžu mať aj endogénne signály a to predovšetkým fytohormóny auxín a giberelín alebo sacharóza, ktorá je produktom fotosyntézy (Niittylä et al. 2007; Chen et al. 2010).

Bolo zistené, že auxín aktivuje H^+ -ATPázu, čo sa prejavuje predlžovaním etiolovaného hypokotylu *Arabidopsis*. Objav potvrdzujú veľmi podobné koncentrácie auxínu, od ktorých závisia zmeny na úrovni fosforylácie H^+ -ATPázy a hormónom indukovanej elongácie (Takahashi et al. 2012).

Fototropín, ako receptory modrého svetla (BL) v rastlinách, aktivuje PM H^+ -ATPázu v podporných bunkách stomat prostredníctvom fosforylácie, čo má za následok otvorenie stómat. Mechanizmus bol detekovaný na epidermis listoch *Arabidopsis thaliana*. Ďalšie výskumy zistili, že fyziologická koncentrácia fytohormónu ABA je schopná úplne inhibovať modrým svetlom indukovanú fosforyláciu H^+ -ATPázy v podporných bunkách stómat (Hayashi et al. 2011).



Obr. 4 : Proces otvárania prieduchov indukovaný modrým svetlom (prevzaté od Shimazaki et al. 2007)

Nedávno bolo zistené, že okrem BL na H^+ -ATPázu pôsobí stimulačne aj červené svetlo. RL aktivuje PM H^+ -ATPázu v podporných bunkách stómat rastliny *Arabidopsis thaliana*. Fosforylácia protónovej pumpy indukovaná červeným svetlom je však regulovaná fotosyntézou a nie prostredníctvom fytochrómov. Aktiváciou protónovej pumpy dochádza k otvoreniu stómat a k samotnej respirácii. Bolo tak potvrdené, že proteín PM H^+ -ATPáza, kódovaný génom AHA1, zohráva hlavnú úlohu pri svetlom indukovanom otváraní stómat (Ando and Kinoshita 2019).

Výskumy ukázali, že H^+ -ATPáza je dôležitá pre vytvorenie laterálneho gradientu fytohormónu auxínu. Tvorba gradientu je kľúčovým krokom k spusteniu asymetrického rastu výhonku vedúceho k fototropnej reorientácii. Princíp tvorby auxínového gradientu spočíva v regulácii pH apoplastu, čoho je schopná práve PM H^+ -ATPáza. Okrem toho bolo dokázané, že počas fototropizmu je aktivita H^+ -ATPáza regulovaná fototropínovými receptormi. Tým je poskytnutý mechanizmus, ktorým svetlo ovplyvňuje apoplastické pH (Hohm et al. 2014).

Materiál a metodika práce

Rastlinný materiál

K experimentom boli použité semená *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh ekotyp Landsberg *erecta* (Ler) a od neho odvodený recesívny mutant *cry1-1* odvodený od tohto ekotypu (recesívna mutácia v jednom géne, mutácia pomocou urýchlených neurónov; mutant v géne pre fotoreceptor CRY1) a ekotyp Columbia (Col) a od neho odvodený recesívny mutant *cry2* odvodený od tohto ekotypu (recesívna mutácia v jednom géne, mutácia pomocou urýchlených neurónov, mutant v géne pre fotoreceptor CRY2).

Pracovné postupy

Príprava kultivačného média Murashige and Skoog (MS)

Semená boli kultivované na pevnom kultivačnom MS médiu (Murashige and Skoog 1962). Tohto média boli pripravené vždy dva litre rozdelené do piatich termofľaší po 400 ml. Medium bolo pripravené nasledovným postupom. Do Erlenmayerovej banky o objeme 3 l bol pridaný 1 l destilovanej vody. Banka bola postavená na magnetickú miešačku a bolo vložené miešadlo. Na váhach bolo navážených 20 g sacharósy, 8,66 g MS média (Cat. no. M5524, Caisson, USA) a 390,4 mg MES (Morpholinoethane sulfonic acid - analytical grade). Látky boli pridané a za stáleho miešania rozpustené v destilovanej vode v banke. Po úplnom rozpustení bolo miešanie vypnuté a miešadlo vytiahnuté. Médium bolo pomocou odmerného valca doplnené na 2 litre destilovanou vodou. Pomocou pH metra bolo 1 M roztokom KOH (hydroxidu draselného) upravené pH média na hodnotu 6,1. Do 5 sklenených termofľaší bolo navážených vždy 2,8 g phyto agaru a do každej fľaše bolo pridaných 400 ml média. Termofľaše s médiom boli vysterylizované pomocou autoklávu a uložené do chladničky.

Stratifikácia a povrchová sterilizácia semien

Na analytických váhach bolo navážených 8 mg semien *Arabidopsis thaliana*, čo odpovedá počtu približne 400 semien. Semená boli vážené do riadne popísanej mikroskúmavky o objeme 1,5 ml. Bol k nim napipetovaný 1 ml destilovanej vody. Mikroskúmavky boli vložené do stojana a následne do chladničky. Proces stratifikácie prebiehal v tme aspoň 3 dni od namočenia semien.

Po stratifikácii semien a deinfekcii laminárneho boxu bola odpipetovaná voda z mikroskúmaviek a bol pridaný 1 ml zriedeného roztoku chlórnanu sodného (1,4 % SAVO, 0,4 l SAVO + 0,6 dH₂O). Semená v roztoku prešli behom 30 minút povrchovú sterilizáciu. Po uplynutí času bol NaClO odpipetovaný a nahradený 1 ml sterilnej destilovanej vody. Oplach semien sa opakoval 5x. V niektorých experimentoch prebehla sterilizácia a oplach semien už jeden deň pred vysiatím. Semená určené k výsevu na kultivačné médium s ortovanadátom sodným (Na₃VO₄) alebo s kombináciou NaCl a Na₃VO₄ boli deň pred výsevom povrchovo sterilizované a namočené na 24 hodín do roztoku Na₃VO₄ o koncentracii 100 µmol/l.

Výsev semien

Sterilné kultivačné médium bolo rozohriate v mikrovlnnej trúbe a do laminárneho boxu bolo pripravených 24 sterilných guľatých Petriho misiek s priemerom 90 mm. Bol pripravený sklenený pohár, ktorý slúžil ako stojan pre plastovú skúmavku typu Falcon (50ml). Do sterilnej Erlenmayerovej banky (300ml) bolo pridaných 120 ml média a napipetovaný objem zásobného roztoku NaCl (výsledná koncentrácia 0, 100, 150 a 200 mmol/l), Na₃VO₄ (výsledná koncentrácia 0, 50, 100 a 300 µmol/l) alebo ich kombinácie (NaCl 150 mmol/l a Na₃VO₄ 100 µmol/l). Napipetované objemy zásobných roztokov NaCl (5M) a Na₃VO₄ (10⁻²M) sú uvedené v tabuľke 1 a 2. Z banky bolo postupne odlievajúcich 20 ml média a nalievajúcich do riadne popísaných misiek. Médium sa v pootvorenej miske nechalo stuhnúť.

Nad liehovým kahanom bol ožahnutý skalpel, ktorý bol predtým chvíľu namočený v 96% ethanole. Potom bolo sterilným skalpelom odrezané zo sterilnej špičky, ktorá bola nasadená na pipete o objeme 2-20 µl. Orezaný koniec špičky mal otvor s priemerom takým, aby ním mohlo prejsť len jedno semeno. Na stuhnuté médium v miske bolo pomocou pipety vysiatých vždy 30-40 semien. Petriho misky so semenami boli dvakrát oblepené páskou z netkanej textílie (Ugropore alebo Softpore). Misky so semenami, ktoré sa kultivovali na svetle, boli umiestnené do plastových stojanov vo vertikálnej polohe a prenesené do hornej časti automatických rastových komôr Snijders Scientific s modrým alebo červeným svetlom (Microclima 1000E, Holandsko), kde prebiehala kultivácia pri 23°C. Zdrojom modrého svetla s maximálnou ožiarenosťou 10 mmol.m⁻².s⁻¹ pri 440 nm bola žiarivka Philips TLD36W/18-Blue a zdrojom červeného svetla s maximálnou ožiarenosťou 10 mmol.m⁻².s⁻¹ pri 660 nm bola žiarivka Philips TLD36W/15-Red. Misky so semenami určené ku kultivácii v tme boli

zabalené do alobalu a taktiež boli vo vertikálnej polohe umiestnené do spodnej časti rastovej komory.

Tabuľka 1: Objemové množstvá 5M NaCl v 120 ml MS média

Výsledná koncentrácia NaCl v médiu [mmol/l]	Objem zásobného roztoku NaCl [ml]
0	0
100	2,4
150	3,6
200	4,8

Tabuľka 2: Objemové množstvá 10^{-2} M Na_3VO_4 v 120 ml MS média

Výsledná koncentrácia Na_3VO_4 v médiu [$\mu\text{mol/l}$]	Objem zásobného roztoku Na_3VO_4 [ml]
0	0
50	0,6
100	1,2
300	3,6

Vyhodnotenie klíčivosti semien

Klíčivosť semien bola vyhodnocovaná vždy od tretieho alebo štvrtého dňa do siedmeho alebo ôsmeho dňa po vysiati. Spôsob vyhodnocovania spočíval v spočítaní všetkých semien na miske a vyklíčených semien. Z týchto údajov bolo vypočítané percento klíčivosti, respektíve percento inhibície klíčenia. Pre výpočet bol použitý vzorec $(a - b / a) * 100\%$. V tomto vzorci je veličina a priemerné percento klíčenia pri koncentrácií 0 mmol/l NaCl alebo $\mu\text{mol/l}$ Na_3VO_4 . Veličina b predstavuje priemerné percento klíčenia pri zvolenej koncentrácií NaCl alebo Na_3VO_4 , ktorej inhibíciu klíčenia chceme vypočítať. Experimenty s jednotlivými látkami boli opakované vždy trikrát.

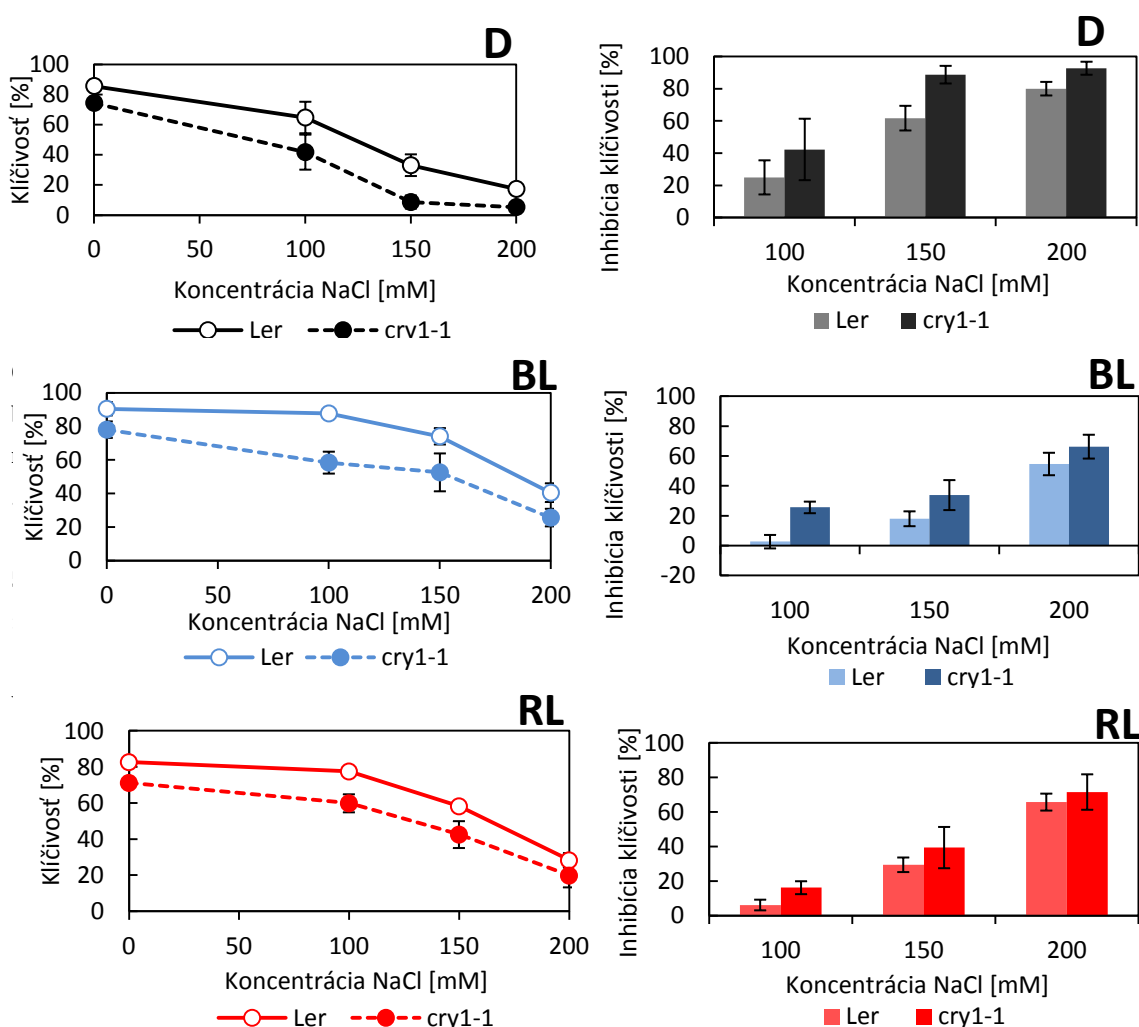
Výsledky

Účelom tejto práce bolo zistiť vplyv ortovanadátu sodného (Na_3VO_4) na klíčenie rastliny a ako inhibícia H^+ -ATPáz ortovanadátom ovplyvní klíčenie rastliny, ktorá je vystavená soľnému stresu (NaCl). Cieľom bolo tiež zistiť, či vplyv ortovanadátu bude na citlivosť semien k NaCl ovplyvnený kvalitou svetla. K experimentom boli použité semená modelovej rastliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. ekotyp *Ler* a od neho odvodený mutant *cry1-1* a ekotyp *Col* a od neho odvodený mutant *cry2*. Avšak výsledky klíčenia mutantu *cry2* boli z dôvodu takmer nulovej klíčivosti semien nepoužiteľné pre túto bakalársku prácu, preto sa v nej neobjavujú. U ekotypov *Ler*, *Col* a mutantu *cry1-1* bola sledovaná klíčivosť semien v tme, na modrom a červenom svetle. Z nej bola následne vypočítaná inhibícia klíčivosti.

.

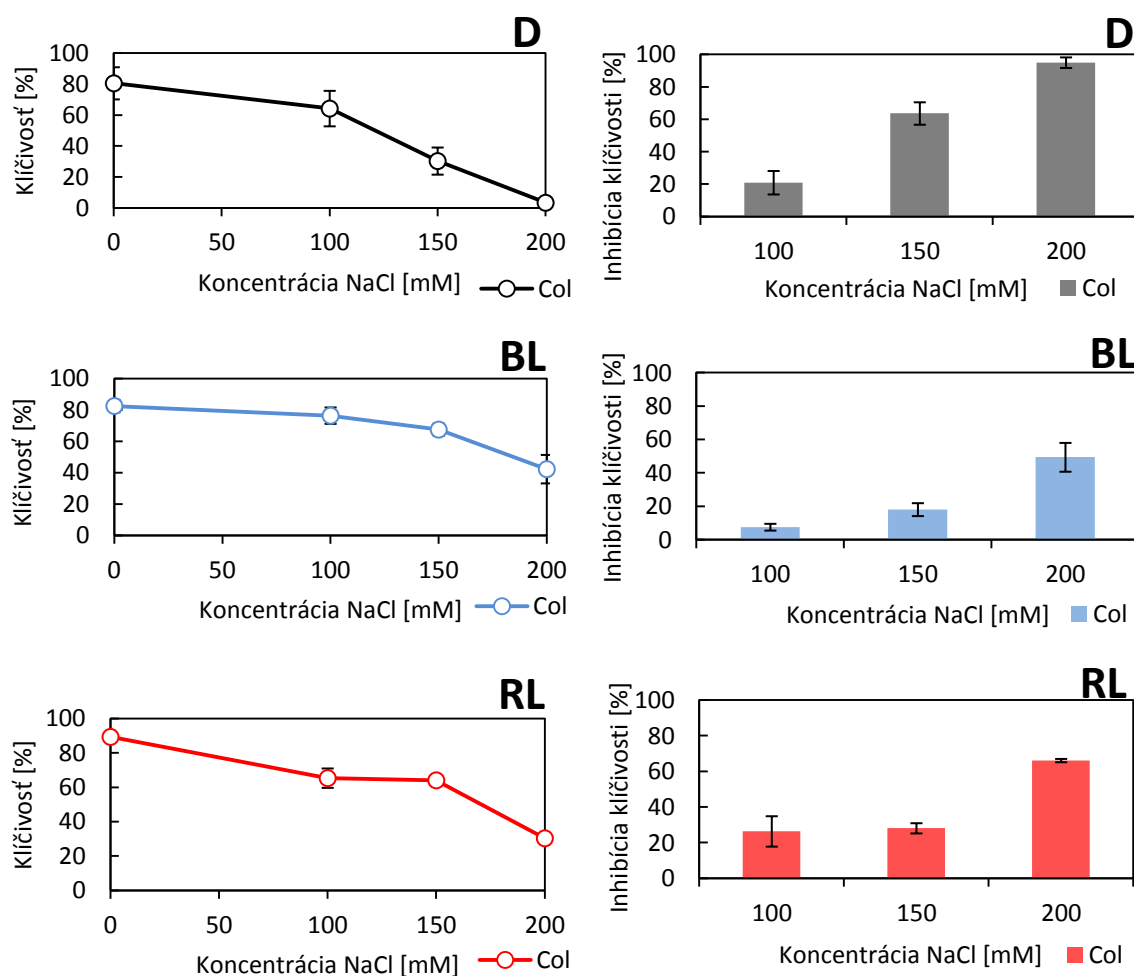
Citlivosť semien *Arabidopsis* k NaCl

Semená *Arabidopsis* boli kultivované na kultivačnom MS médiu s koncentráciou NaCl 0, 100, 150 a 200 mmol/l. Podľa obr. 5 semená *Ler* vykazujú vyššiu klíčivosť oproti *cry1-1* vo všetkých svetelných podmienkach. Najvyššia klíčivosť bola pozorovaná u semien kultivovaných na médiu bez obsahu NaCl. Je vidieť, že postupným zvyšovaním koncentrácie NaCl sa znižuje klíčivosť a zvyšuje sa teda inhibícia klíčenia. Taktiež je vidieť, že klíčivosť semien ovplyvnených 100, 150 a 200 mM NaCl na modrom a červenom svetle je o 20 až 40 % vyššia než klíčivosť v tme. Semená kultivované na červenom svetle vykazujú mierne vyššiu inhibíciu klíčivosti než semená kultivované na modrom svetle.



Obr. 5: Vplyv NaCl na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Ler* a mutanta *cry1-1* kultivovaných v tme (D), na modrom svetle (BL) a na červenom svetle (RL) 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité základné MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z troch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

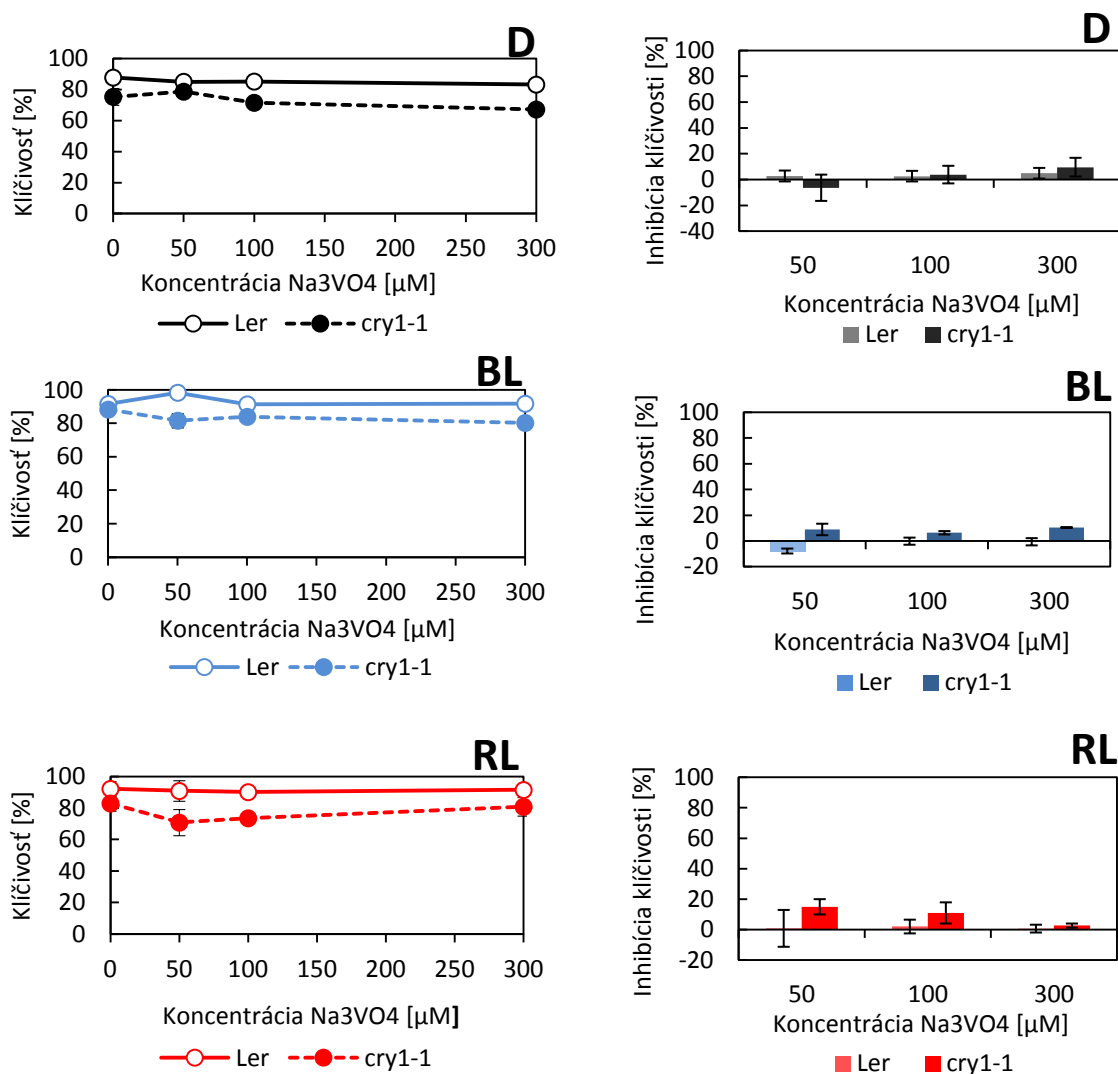
Semená ekotypu Col taktiež najviac klíčili na MS médiu s nulovou koncentráciou NaCl. Zvyšujúcou koncentráciou sa klíčivosť znižovala a zvyšovala sa inhibícia klíčenia. Na obr. 6 je možno vidieť, že najväčšia inhibícia klíčenia bola pozorovaná u semien kultivovaných v tme a pri koncentracii NaCl 200 mmol/l. Na modrom aj červenom svetle je pri koncentraciách 150 a 200 mmol/l klíčivosť semien inhibovaná výrazne menej než klíčivosť semien v tme. U semien kultivovaných na červenom svetle je klíčivosť pri 100, 150 a 200 mM koncentrácii NaCl inhibovaná o cca 20 % viac než na modrom svetle.



Obr. 6: Vplyv NaCl na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col inkubovaných v tme (D), na modrom (BL) a na červenom svetle (RL) 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité základné MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z troch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

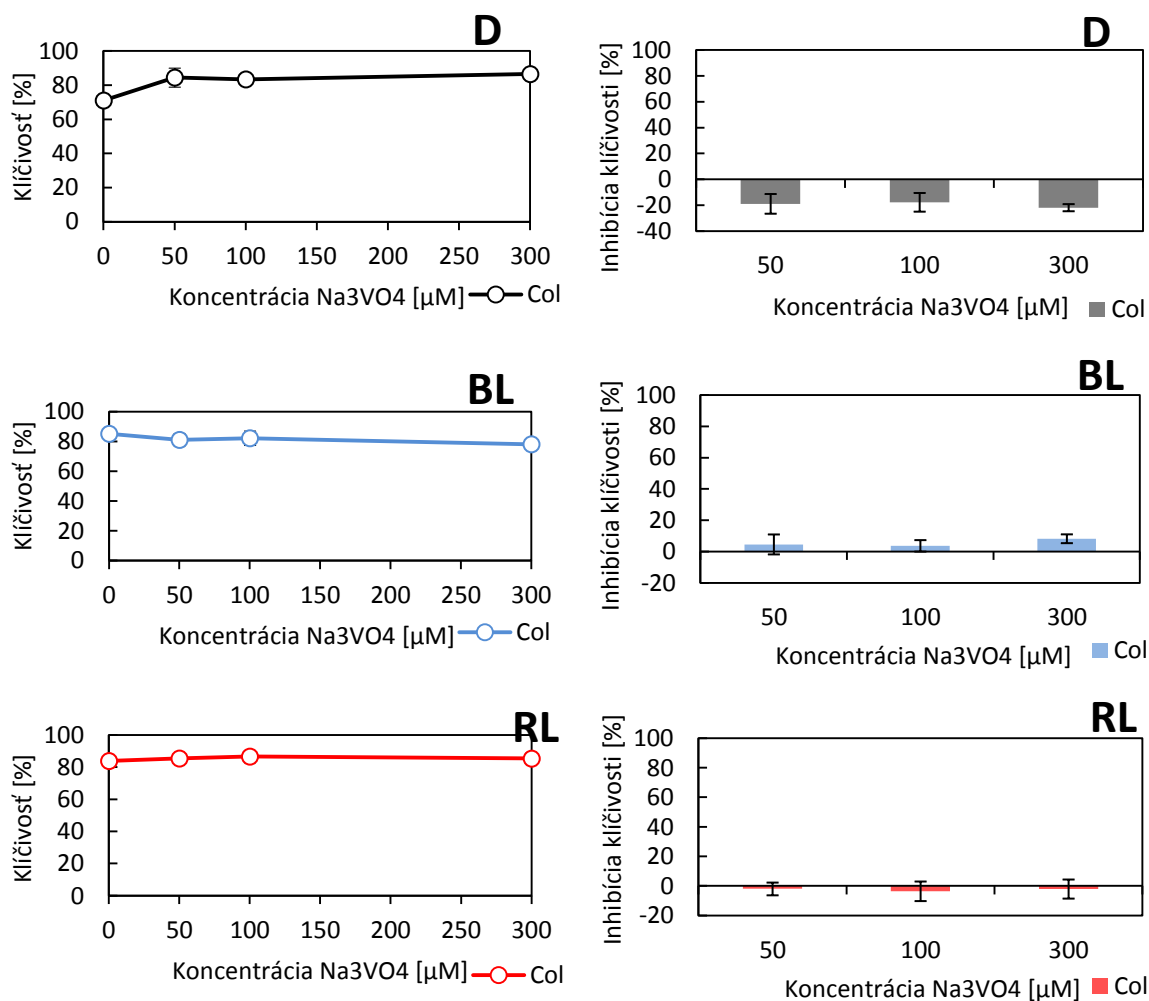
Citlivosť semien *Arabidopsis* k Na_3VO_4

Semená boli vysiate na MS médium, ktoré obsahovalo 0, 50, 100 a 300 $\mu\text{mol/l}$ Na_3VO_4 . Podľa obr. 7 možno povedať že klíčivosť bola u *Ler* len mierne vyššia ako u *cry1-1*. Za všetkých svetelných podmienok bola klíčivosť semien oboch genotypov pomerne vysoká a výrazne sa nemenila vplyvom Na_3VO_4 . Pri modrom a červenom svetle to bolo až 90 % a pri tme 80 %.



Obr. 7: Vplyv Na_3VO_4 na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Ler* a mutanta *cry1-1* kultivovaných v tme (D), na modrom (BL) a na červenom svetle (RL) 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité základné MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z troch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

Klíčivosť semien ekotypu Col na základnom médiu bez pridaného Na_3VO_4 bola približne 80 % vo všetkých svetelných podmienkach okrem kontrolných semien v tme. Semená ovplyvnené 50, 100 a 300 μM Na_3VO_4 a inkubované v tme klíčili približne o 20 % viac než semená kultivované na nulovej koncentrácii Na_3VO_4 . U semien kultivovaných na modrom a červenom svetle nemal vanadát výrazný vplyv na klíčenie semien ekotypu Col.

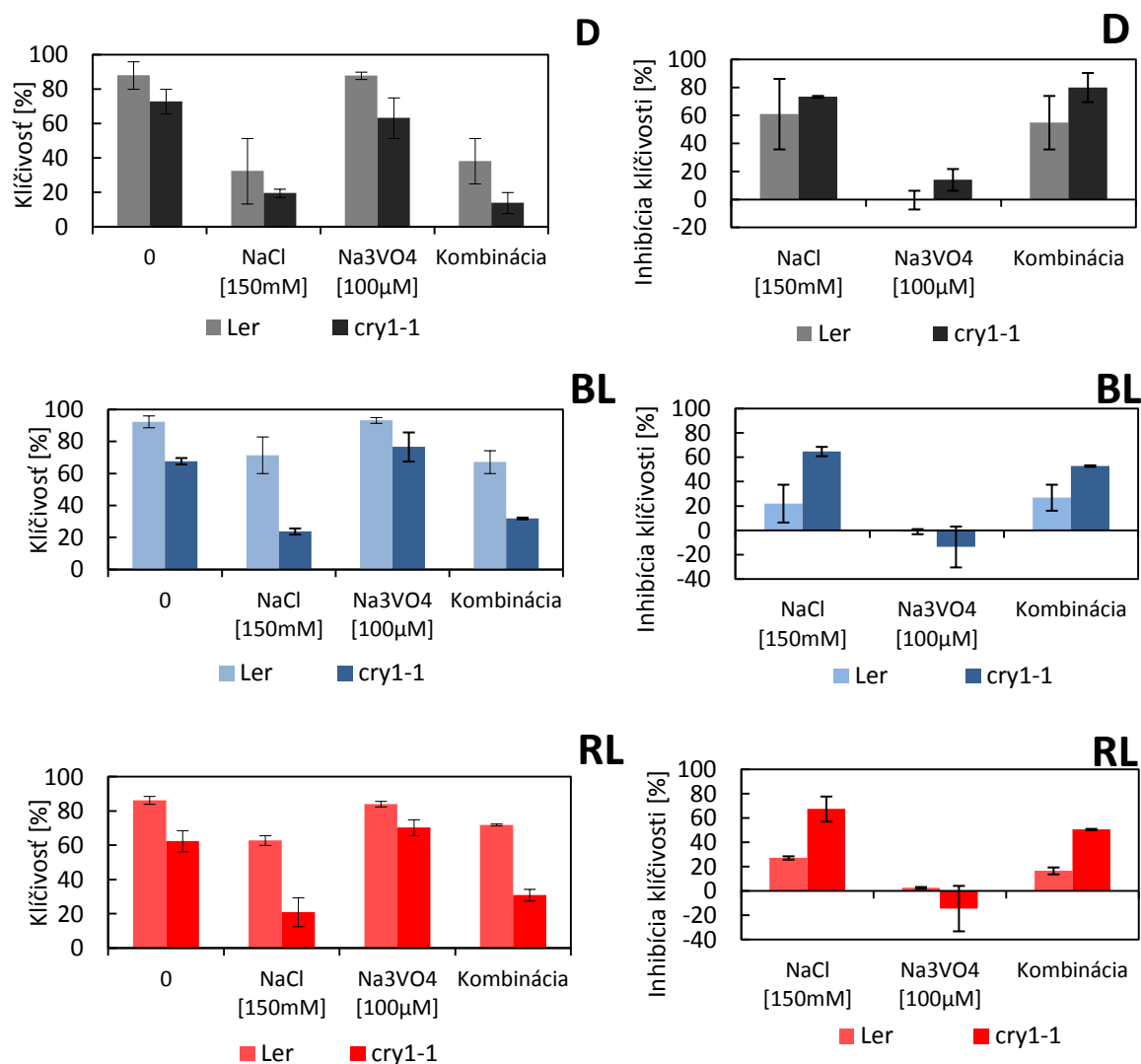


Obr. 8: Vplyv Na_3VO_4 na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col kultivovaných v tme (D), na modrom (BL) a na červenom svetle (RL) v 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité čisté MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z troch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

Vplyv Na_3VO_4 na citlivosť semien k NaCl

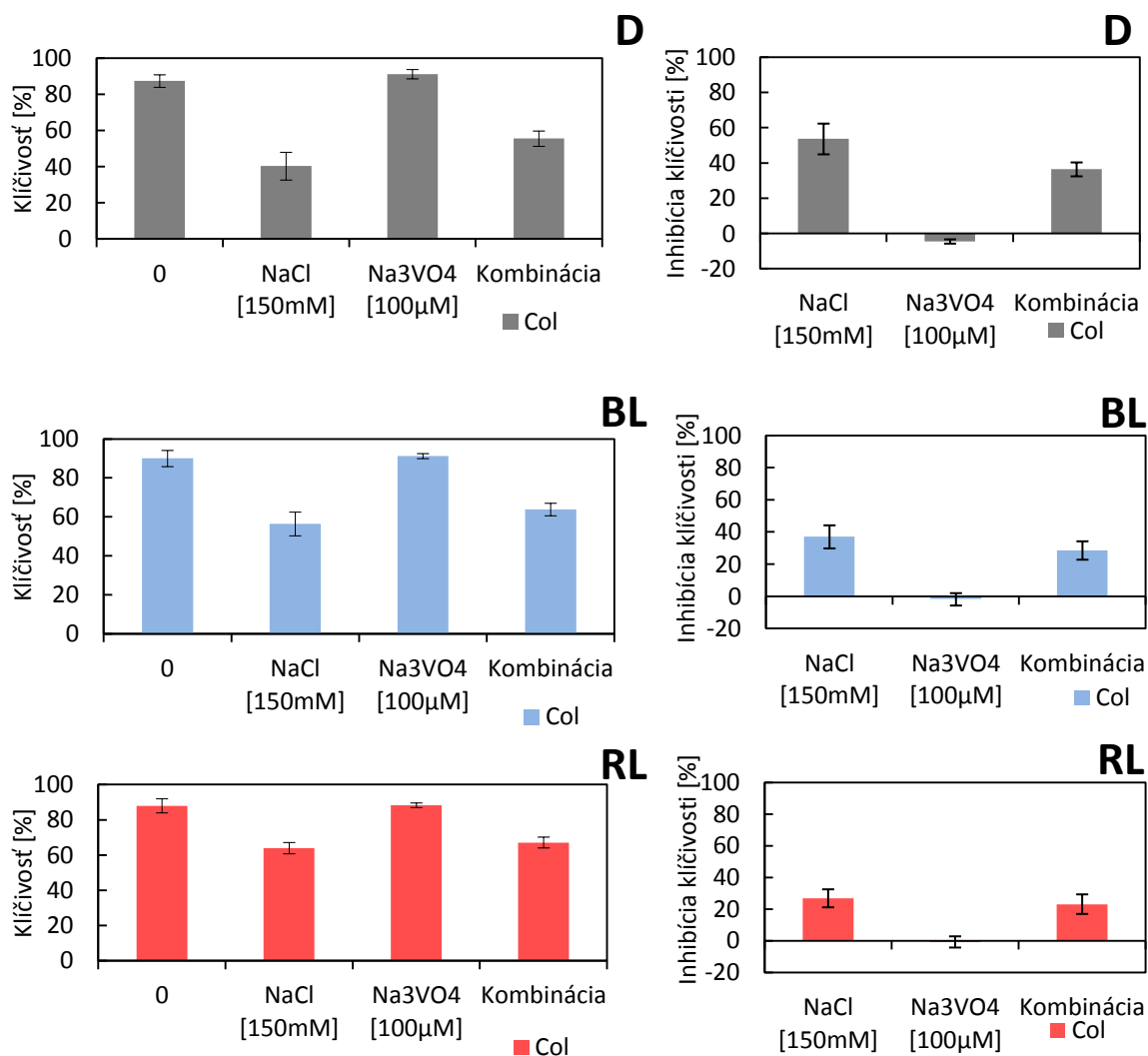
Semená *Arabidopsis* ekotypu *Ler* a mutanta *cry1-1* boli kultivované na základnom MS médiu, na médiu s koncentráciou 150 mmol/l NaCl, 100 $\mu\text{mol/l}$ Na_3VO_4 a na kombinácii týchto dvoch koncentrácií látok.

Ako už bolo ukázané (Obrázok 5 a 7), za všetkých svetelných podmienok bola klíčivosť semien *Ler* výrazne inhibovaná NaCl o koncentracii 150 mmol/l, kdežto vanadát nemal na klíčenie semien *Ler* výrazný vplyv (Obrázok 9). Semená *Ler* kultivované na BL a v D na médiu s NaCl a Na_3VO_4 klíčili podobne ako na médiu s NaCl, avšak na RL na kombinácii NaCl a Na_3VO_4 klíčili semená *Ler* viac než na samotnom NaCl. Semená mutanta *cry1-1* reagovali k NaCl a vanadátu citlivejšie ako *Ler*, a to ako v tme tak aj na modrom a červenom svetle. Z grafu je však vidieť, že semená mutanta *cry1-1* boli na modrom svetle inhibované kombináciou NaCl + Na_3VO_4 o 13 % menej než samotným NaCl a na červenom svetle to bolo dokonca o 17% menej. Ďalej je možno opäť pozorovať, že za všetkých svetelných podmienok bola klíčivosť semien *cry1-1* v prítomnosti NaCl alebo v prítomnosti NaCl + Na_3VO_4 inhibovaná značne viac než u ekotypu *Ler*.



Obr. 9: Vplyv NaCl, Na₃VO₄ a ich kombinácie na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp *Ler* a mutanta *cry1-1*, ktoré boli kultivované v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL) 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité základné MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z dvoch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

V tme kombinácia NaCl + Na₃VO₄ inhibovala klíčenie semien ekotypu Col o 17 % menej než samotný NaCl. Na modrom svetle bola inhibícia klíčenia semien Col najvýraznejšia na médiu, ktoré obsahovalo iba NaCl a na médiu s kombináciou NaCl + Na₃VO₄ bola inhibícia o 9 % nižšia. Semená ekotypu Col kultivované na červenom svetle boli taktiež v najväčšej miere inhibované samotným NaCl a na NaCl + Na₃VO₄ klíčili len o 10 % viac. Samotný Na₃VO₄ neinhiboval klíčenie Col za žiadnych svetelných podmienok.



Obr. 10: Vplyv NaCl, Na₃VO₄ a ich kombinácia na klíčenie semien *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col kultivované v tme (D), na modrom (BL) a červenom svetle (RL) 7. deň od výsevu. Ako kontrola bolo použité základné MS médium. Hodnoty troch grafov vľavo ukazujú priemerné hodnoty $\pm$ SE klíčivosti semien. Hodnoty vyobrazené v troch grafoch vpravo zobrazujú priemernú percentuálnu hodnotu $\pm$ SE inhibície klíčivosti. Hodnoty boli získané z troch rovnakých a na sebe nezávislých experimentov.

Diskusia

Klíčenie rastliny závisí na podmienkach vonkajšieho a vnútorného prostredia. Vďaka pozitívnym vplyvom okolia a rastlinných hormónov je semeno schopné vyklíčiť. Okrem vody a dostatku kyslíka je hlavným exogénnym impulzom pre klíčenie svetlo. Svetlom sú semená navodzované ku klíčeniu. Impulz pozostáva hlavne z modrej a červenej oblasti svetelného spektra. Avšak rovnako ako dospelá rastlina, tak aj semeno môže čeliť stresu. Okolitý stres dokáže zabrániť semenu vyklíčiť, respektíve spomaliť klíčenie. Soľný stres spôsobený NaCl patrí medzi hlavnú skupinu abiotických stresov pôsobiacich na rastlinu. Postihnutá rastlina je nútená prispôbiť sa takejto situácii vytvorením obranných mechanizmov. Dôležitú úlohu pri adaptácii na stres zohráva H^+ -ATPáza nachádzajúca sa v membránach organel rastlinnej bunky ale aj v membráne cytoplazmatickej. Je schopná vytvoriť protónový gradient, vďaka ktorému sú ióny solí nahromadené v cytoplazme akumulované do vákuoly alebo do apoplastu prostredníctvom H^+/Na^+ antiportov (He et al. 2014). Aktivita protónovej pumpy je pri zasolení pre rastlinu nevyhnutná, pretože vysoká koncentrácia iónov soli má na bunky toxický účinok. Katalytická aktivita H^+ -ATPázy je regulovaná rôznymi faktormi. Jedným z nich je modré a červené svetlo. Rast rastliny na takýchto svetelných podmienkach spôsobuje zvýšenú aktivitu protónovej pumpy, čo má za následok napríklad otváranie stômat alebo tvorbu laterálneho gradientu auxínu (Ando and Kinoshita 2019, Hohm et al. 2014). Tieto kroky napomáhajú rastu a vývoju rastliny a mohli by mať vplyv na tolerantnosť rastliny na soľný stres.

Naše výsledky pozitívneho účinku svetla na toleranciu semien *Arabidopsis thaliana* ekotypu Ler a Col k NaCl potvrdzujú výsledky Hladíkovej (2017), ktoré ukázali, že svetlo nejakým mechanizmom znižuje citlivosť buniek k toxickým účinkom NaCl a teda zvyšuje toleranciu ku stresu zasolením. Pôsobením BL a RL sa aktivujú fotoreceptory. Je teda možné, že tie následne prostredníctvom iných proteínov môžu zvyšovať aktivitu vytvorených H^+ -ATPáz. Pumpy potom tvoria protónový gradient a umožňujú Na^+/H^+ antiportom pumpovať Na^+ do vákuoly alebo apoplastu. Týmto procesom sa rastlina stáva tolerantnejšou na soľný stres (Silva and Gerós 2009). Ďalej je možné, že svetlo môže zvyšovať expresiu génov kódujúcich protónové pumpy. Tým by sa zvýšil ich počet a bunka by tak bola schopná silnejšej obrany proti stresu zasolením.

Mutantné semená *cry1-1* s mutáciou vo fotoreceptore CRY1 boli citlivejšie k NaCl v tme, na BL a RL než ekotyp Ler, od ktorého sú odvodené. Značí to,

že nefunkčný fotoreceptor CRY1 negatívne ovplyvňuje schopnosť semien tolerovať stres. Semeno sa tak stáva citlivejšie na NaCl, pretože defektom v CRY1 je narušená jedna alebo viac signálnych dráh a tým i ďalší mechanizmus, ktorý vedie k zvýšeniu tolerancie k zasoleniu. Výsledky teda ukazujú, že modré svetlo prostredníctvom funkčného fotoreceptora CRY1 zvyšuje toleranciu semien *Arabidopsis* k zasoleniu. Fotoreceptory CRY1 červené svetlo nevnímajú, avšak zvýšená citlivosť k NaCl sa prejavila aj u semien *cry1-1* na RL. Tento jav je možné vysvetliť existujúcou spoluprácou CRY1 a fytochrómov (receptorov RL), alebo interakciou signálnych dráh modrého a červeného svetla, ktoré majú radu spoločných signálnych elementov (Podolec & Ulm 2018). Vyššiu inhibíciu klíčenia u mutantu *cry1-1* v tme na NaCl než u *Ler* za rovnakých podmienok možno vysvetliť tak, že aj neaktivovaný fotoreceptor CRY1 sa môže do istej miery neznámym spôsobom podieľať na tolerancii semena k zasoleniu. Z toho vyplýva, že mutant *cry1-1*, ktorý má mutáciu práve v tomto géne, je pravdepodobne preto viac citlivý k soľnému stresu, než ekotyp *Ler*, ktorý tento defekt nemá.

Z našich výsledkov je zjavné, že samotný ortovanadát sodný v MS médiu významne neovplyvňoval klíčenie semien *Ler*, *Col* a ani *cry1-1*. Nestresovaná rastlina teda nie je obzvlášť citlivá na prítomnosť Na_3VO_4 a jeho inhibičný účinok nie je ovplyvnený modrým ani červeným svetlom. Protónové pumpy na PM sú pravdepodobne vanadátom inhibované, ale tým, že semeno nie je v strese a nevyžaduje ich zvýšenú aktivitu, tak sa táto inhibícia neprejavuje na klíčení semena. Taktiež je možné, že časť PM H^+ -ATPáz je vanadátom inhibovaná, ale pôsobenie BL, respektíve RL, ju dokáže aktivovať a obmedziť inhibíciu klíčenia samotným vanadátom.

Kombinácia $\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{VO}_4$ pôsobila na klíčenie semien zaujímavo. Predpokladali sme, že semená vystavené vplyvu NaCl a súčasne vanadátu budú citlivejšie na zasolenie než semená pod vplyvom samotného NaCl, pretože inhibíciou aktívnych protónových púmp by malo dôjsť k zvýšeniu citlivosti semena na zasolenie. Predpoklady boli založené na výskumoch, ktoré ukazujú, že tok H^+ cez H^+ -ATPázu v rastline *Arabidopsis* vystavenej soľnému stresu bol pôsobením roztoku vanadátu znížený až o 75-80%. Tieto výsledky však boli dosiahnuté u rastlín pestovaných na viditeľnom svetle (Bose et al. 2015).

Toto očakávanie sa nenaplnilo. Klíčenie semien *Ler* bolo v D a na BL rovnako inhibované na NaCl ako aj na kombinácii NaCl + vanadát. Je fakt, že protónová pumpa na tonopaste nie je ovplyvnená vanadátom, pretože vanadát sa do bunky nedostane.

Sú ním inhibované iba PM H^+ -ATPázy (Kinoshita & Shimazaki 1999). Je teda možné, že vanadát síce zablokuje protónové pumpy na plazmatickej membráne, ale stratu ich funkcie môže vykompenzovať aktivita protónových púmp v tonoplaste. Aktivita protónových púmp je stimulovaná jednak svetlom a jednak zvýšenou koncentráciou Cl^- . Inhibičný účinok vanadátu sa na svetlom nestimulovanej protónovej pumpe neprejavuje (Schwartz et al. 1991, Memon & Boss 1990). To znamená, že v tme môžu byť PM H^+ -ATPázy rovnako citlivé k Cl^- ako aj k vanadátu. Taktiež je možné, že zatiaľ, čo sú niektoré pumpy inhibované vanadátom, tak iné pumpy sú stimulované pôsobením NaCl a tým sa ich aktivita vyrovná. Dôkazom toho sú aj reakcie semien u mutanta *cry1-1* inkubovaných v tme na zmesi NaCl + Na_3VO_4 .

Podobnosť výsledkov u *Ler* ovplyvnených NaCl a NaCl + Na_3VO_4 kultivovaných na D a BL možno tiež vysvetliť takto. U *Ler* na BL sú aktívne fotoreceptory modrého svetla a spoločne sa so zvýšenou koncentráciou Cl^- podieľajú na zvýšenej aktivite H^+ -ATPáz. V prítomnosti vanadátu pravdepodobne dochádza k súťaživosti o ovplyvnenie aktivity PM H^+ -ATPázy medzi Cl^- a vanadátom. To spôsobuje zníženie inhibičného efektu na protónovú pumpu. Aktívne vákuolárne H^+ -ATPázy nie sú v tomto prípade inhibované a vytvárajú protónový gradient, ktorý zvyšuje tolerantnosť na soľný stres.

V prípade semien *Ler* na RL v prítomnosti NaCl a Na_3VO_4 bola inhibícia klíčivosti nižšia než u semien vystavených len NaCl. Predpokladá sa, že vzájomné pôsobenie Na_3VO_4 a NaCl je rovnaké ako u modrého svetla. Rozdiel môže spočívať v regulácii aktivity protónovej pumpy. U BL je regulovaná prostredníctvom fototropínov, čo sú fotoreceptory modrého svetla a u RL je regulovaná fotosyntézou (Toh et al. 2018, Hayashi et al. 2011, Ando and Kinoshita 2019). Taktiež možno uvažovať o tom, že kryptochrómy a fototropíny, ktoré červené svetlo nevnímajú, nejakým spôsobom spolupracujú s fototropínami a zvyšujú tak tolerantnosť na zasolenie.

U semien *cry1-1* v D bolo pozorované, že zasolenie má rovnaký inhibičný efekt na klíčenie ako kombinácia NaCl a Na_3VO_4 . To odpovedá výsledku klíčenia semien *Ler* v D na NaCl + Na_3VO_4 , preto je možné, že v tme je citlivosť PM H^+ -ATPáz mutovaných semien na vanadát rovnaká ako u nemutovaných semien.

Inhibícia klíčivosti semien *cry1-1* bola na NaCl + Na_3VO_4 na BL o 13 % nižšia než len na NaCl. Príčinou toho je defekt vo fotoreceptore CRY1 a pôsobenie vanadátu na PM H^+ -ATPázy. Nefunkčnosť CRY1 môže zatiaľ nejasným spôsobom zapríčiňovať to, že PM H^+ -ATPáza je menej citlivá k vanadátu a je viac stimulovaná Cl^- a BL

prostredníctvom aktívnych fototropínov. Táto hypotéza by potvrdzovala, že *cry1-1* sú tolerantnejšie na k NaCl v prítomnosti vanadátu než bez neho.

Výsledky klíčenia semien *cry1-1* na RL na NaCl + Na₃VO₄ vykazujú nižšiu inhibíciu klíčenia ako semená na NaCl. Tento výsledok je podobný ako u *Ler* za rovnakých podmienok. Znamená to, že rastlina je v prítomnosti vanadátu menej citlivá na soľný stres. Príčina je pravdepodobne rovnaká ako u *Ler*. Avšak je viditeľný výrazný rozdiel v inhibícii semien *cry1-1* na RL na NaCl + Na₃VO₄ v porovnaní s *Ler*. Na tom sa môže podieľať práve mutácia v géne pre fotoreceptor CRY1, ktorá negatívne ovplyvňuje priebeh tolerancie semena na zasolenie.

Štúdie zaoberajúce sa podobným problémom ukazujú, že vo zvieracích bunkách prieduchov vanadát nemá významný inhibičný účinok na H⁺-ATPázu v tme, pretože nedostatkom svetla neboli protónové pumpy v bunke aktivované. Rovnaký výskum vysvetľuje, že vysoké koncentrácie Cl⁻ spôsobené soľným stresom zabraňujú inhibícií PM H⁺-ATPázy, pretože pri vysokých pomeroch vanadátu a Cl⁻ sa jedná pravdepodobne o kompetitívny vzťah. Znížená schopnosť väzby vanadátu na protónovú pumpu znižuje jeho inhibičný účinok (Schwartz et al. 1991).

Ako ďalší postup v riešení tohto problému možno navrhnúť sledovanie klíčivosti semien s mutáciou vo fotoreceptoroch *phot1* a *phot2*. Bolo by tak možné ozrejmiť do akej miery majú fototropíny vplyv na funkciu PM H⁺-ATPázy vystavenej inhibičnému účinku Na₃VO₄ a ako tento proces dokáže ovplyvniť toleranciu zasolenia semena pri klíčení. Taktiež možno započat' štúdium exprese génov pre protónové pumpy v tme, na BL, RL, u *Ler* a mutantov. Pomohlo by to vysvetliť mechanizmus tolerancie k akému dochádza, keď semeno klíči na zasolenej pôde v tme na BL a RL.

Záver

Podstatou tejto bakalárskej práce bolo zistiť, do akej miery sa podieľa aktivita protónovej pumpy na znížení citlivosti semena *Arabidopsis* k zasoleniu a aký podiel na tom má svetlo a fotoreceptory CRY1 a CRY2. Ďalším cieľom bolo určiť ako vanadát ovplyvňuje klíčenie nestresovaných semien. K tomuto výskumu bol využitý inhibičný účinok ortovanadátu sodného na aktivitu H^+ -ATPázy a taktiež genetický prístup, kedy boli k analýze použité mutované semená *Arabidopsis thaliana cry1-1* s mutáciou v gène pre fotoreceptor CRY1 a mutant *cry2* s defektom vo fotoreceptore CRY2. K porovnaniu výsledkov mutantov boli použité semená ekotypov *Ler* a *Col*. Výsledky boli získané na základe pozorovania klíčenia semien mutantov a k nim odpovedajúcich ekotypov. Kultivovanie semien prebehlo v podmienkach *in vitro* na MS médiu za tmy, na modrom a na červenom svetle. Do MS média bol pridaný NaCl o rôznych koncentráciách (0, 100, 150 a 200 mmol/l) a Na_3VO_4 (0, 50, 100 a 300 μ mol/l) a ich kombinácie (150mmol/l NaCl a 100 μ mol/l Na_3VO_4). Experimenty s mutantom *cry2* žiaľ neposkytli spoľahlivé výsledky, keďže semená *cry2* vykazovali z neznámych príčin takmer nulovú klíčivosť. Výsledky klíčenia tohto mutantu preto neboli v tejto práci použité.

Výsledky klíčenia semien na NaCl potvrdzujú výsledky Hladíkovej (2017). Pôsobenie modrého a červeného svetla na semená *Ler* a *Col* v zasolenom prostredí malo priaznivý účinok na ich klíčenie a teda bola zvýšená tolerancia semena na soľný stres. Oproti tomu semená *cry1-1* boli pri BL a RL ale aj v tme citlivejšie na soľný stres. Z toho vyplýva, že fotoreceptory modrého svetla CRY1 sa nejakým spôsobom pomáhajú semenu tolerovať zasolenie.

Semená *Arabidopsis thaliana* ekotypu *Ler* a *Col*, ale aj mutované semená *cry1-1*, klíčili na samotnom vanadáte pri všetkých použitých svetelných podmienkach rovnako, ako kontrolné semená a nebola pozorovaná takmer žiadna inhibícia klíčenia. Možno teda tvrdiť, že vanadát neovplyvňuje klíčenie semien, aj keď inhibuje aktivitu niektorých PM H^+ -ATPáz. Dôvodom toho pravdepodobne je, že semeno nie je zaťažované soľným stresom a nevyžaduje zvýšenú aktivitu protónových púmp.

Prítomnosť NaCl + Na_3VO_4 v MS médiu mala na semená *Ler* v D a na BL a semená *cry1-1* v D rovnaký účinok ako prítomnosť samotného NaCl. Možno predpokladať, že zníženú aktivitu PM H^+ -ATPáz, ktoré boli inhibované vanadátom, kompenzuje aktivita protónových púmp na tonoplaste. Semeno je tak v prítomnosti Na_3VO_4 rovnako tolerantné na zasolenie. Taktiež je možný kompetitívny vzťah medzi

vanadátom a Cl^- pri ovplyvňovaní PM H^+ -ATPázy. Možná je aj stimulácia aktivity protónových púmp modrým svetlom u *Ler* prostredníctvom aktívnych fotoreceptorov.

Napriek tomu, výsledky u *Ler* na RL v prítomnosti kombinácie $\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{VO}_4$ vykazovali nižšiu inhibíciu klíčenia než na médiu s NaCl . Možnou príčinou toho je spolupráca fototropínov a kryptochrómov a zároveň stimulácia aktivity protónovej pumpy červeným svetlom. Semená *cry1-1* kultivované na RL na $\text{NaCl} + \text{Na}_3\text{VO}_4$ klíčili viac, než semená na samotnom NaCl . Dôvod je pravdepodobne rovnaký, ako u *Ler* na RL na kombinácii a tiež z toho možno usúdiť, že aj na RL sú v tolerancii na zasolenie zapojené CRY1 a teda mutácia v ich génoch zvyšuje citlivosť na soľný stres.

Bližšie a jasnejšie objasnenie výsledkov možno docieľiť pokračovaním v experimentoch na molekulárnej úrovni, kedy by bola venovaná pozornosť štúdiu expresie génov pre protónové pumpy v semenách *Arabidopsis thaliana* v tme, na BL a RL. Rovnako by mohlo byť pozorované klíčenie semien s mutáciou v génoch pre fotoreceptory *phot1* a *phot2* za rovnakých podmienok, aké boli použité v experimentoch tejto práce.

Použitá literatura

Ando E, Kinoshita T. Fluence rate dependence of red light-induced phosphorylation of plasma membrane H^+ -ATPase in stomatal guard cells. *Plant Signaling & Behavior* (2019); 14: Article 1561107

Apse MP, Aharon GS, Snedden WA, Blumwald E. Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na^+/H^+ antiporter in *Arabidopsis*. *Science* (1999); 285: 1256–1258

Bewley JD, Black M. Viability and Longevity. *Physiology and Biochemistry of Seeds in Relation to Germination*. (1982)

Bewley JD. Seed germination and dormancy. *The Plant Cell*. (1997); 9: 1055-1066

Bobik K, Boutry M, Duby G. Activation of the plasma membrane H^+ -ATPase by acid stress. *Plant Signaling & Behavior*. (2010); 5: 681–683

Borthwick HA, Hendricks SB, Parker MW, Toole EH, Toole VK. A Reversible Photoreaction Controlling Seed Germination. *Proceedings of the National Academy of Science of the USA*. (1952); 38: 662-666

Bose J, Rodrigo-Moreno A, Lai D, Xie Y, Shen W, Shabala S. Rapid regulation of the plasma membrane H^+ -ATPase activity is essential to salinity tolerance in two halophyte species, *Atriplex lentiformis* and *Chenopodium quinoa*. *Annals of Botany*. (2015) 115: 481 - 494

Buchanan BB, Gruissem W, Jones RL. *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2nd Edition. (2015)

Buch-Pedersen MJ, Pedersen BP, Veierskov B, Nissen P, Palmgren MG. Protons and how they are transported by proton pumps. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. (2009); 457: 573-579

Deng XW, Caspar T, Quail PH. *cop1*: a regulatory locus involved in light-controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Development* (1991); 5: 1172-1182

Deng XW, Matsui M, Wei N, Wagner D, Chu AM, Feldmann KA, Quail PH. COP1, an *Arabidopsis* regulatory gene, encodes a protein with both a zinc-binding motif and a G beta homologous domain. *Cell* (1992); 71: 791-801

Duby G, Boutry M. The plant plasma membrane proton pump ATPase: a highly regulated P-type ATPase with multiple physiological roles. *Pflügers Archiv: European Journal of Physiology*. (2009); 457: 645–655

Finkelstein R, Reeves W, Ariizumi T, Steber C. Molecular aspects of seed dormancy. *Annual Reviews Plant Biology*. (2008); 59: 387–415

Guo Y, Jia W, Song J, Wang D, Chen M, Wang B. *Thellungiella halophila* is more adaptive to salinity than *Arabidopsis thaliana* at stages of seed germination and seedling establishment. *Acta Physiologiae Plantarum*. (2012); 34: 1287–1294

Halliday K, Praekelt UM, Salter MG, Whitelam GC. Functions and Actions of *Arabidopsis* Phytochromes. *Signal Transduction in Plants*. (2001) 9-17

Haruta M, Gray WM, Sussman MR, Regulation of the plasma membrane proton pump (H^{+} -TPase) by phosphorylation. *Current Opinion in Plant Biology*. (2015); 28: 68-75

Haruta M, Tan LX, Bushey DB, Swanson SJ, Sussman MR. Environmental and Genetic Factors Regulating Localization of the Plant Plasma Membrane H^{+} -ATPase. *Plant Physiology*. (2018); 176: 364-377

Hayashi M, Inoue S, Takahashi K, Kinoshita T. Immunohistochemical detection of blue light-induced phosphorylation of the plasma membrane H^{+} -ATPase in stomatal guard cells. *Plant Cell Physiology* (2011); 52: 1238 – 1248

He X, Huang X, Shen Y, Huang Z. Wheat V- H⁺-ATPase Subunit Genes Significantly Affect Salt Tolerance in *Arabidopsis thaliana*. PLoS One. (2014); Article 9

Hladíková M. Receptory modrého světla a jejich úloha v citlivosti rostlin k zasolení. Bakalárska práca, PrF UP Olomouc. (2017)

Hohm T, Demarsy E, Quan C, Allenbach Petrolati L, Preuten T, Vernoux T, Bergmann S, Fankhauser C. Plasma membrane H⁺-ATPase regulation is required for auxin gradient formation preceding phototropic growth. Molecular Systems Biology. (2014); 10: Article 751

Chen Y. Hoehenwarter W, Weckwerth W. Comparative analysis of phytohormone-responsive phosphoproteins in *Arabidopsis thaliana* using TiO₂-phosphopeptide enrichment and mass accuracy precursor alignment. Plant Journal. (2010); 63: 1–17

Chinnusamy V, Zhu JH, Zhu JK. Salt stress signaling and mechanisms of plant salt tolerance. Genet Eng. (2006); 27: 141–177

Christie J. Phototropin Blue-Light Receptors. Annual Review of Plant Biology. (2007); 58: 21-45

Janicka-Russak M, Kabala K. The Role of Plasma Membrane H⁺-ATPase in Salinity Stress of Plants. Progress in Botany. (2015) 77-92

Kendrick RE, Kronenberg GHM. Photomorphogenesis in Plants. (1994) 2nd ed.

Kinoshita T. Shimazaki K. Blue light activates the plasma membrane H⁺-ATPase by phosphorylation of the C-terminus in stomatal guard cells. EMBO Journal. (1999); 20: 5548–5558

Kosová K, Vítámvás P, Prášil IT, Renaut J. Plant proteome changes under abiotic stress-contribution of proteomics studies to understanding plant stress response. Journal Proteomics. (2011); 74: 1301-22

- Li YY, Mao K, Zhao C, Zhao XY, Zhang RF, Zhang HL, Shu HR, Hao YJ.** Molecular cloning and functional analysis of a blue light receptor gene MdCRY2 from apple (*Malus domestica*). *Plant Cell Reports*. (2013); 32: 555-566.
- Liang W, Ma X, Wan P, Liu L.** Plant salt-tolerance mechanism: A review. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. (2018); 495: 286-291
- Liu B, Yang Z, Gomez A, Lin Ch, Oka Y.** Signaling mechanisms of plant cryptochromes in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*. (2016); 129: 137-148
- Liu Q, Wang Q, Deng W, Wang X, Piao M, Cai D, Li Y, Barshop WD, Yu X, Zhou T, et al.** Molecular basis for blue light-dependent phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 2. *Nature Communications*. (2017); 8: 15234
- Maathuis FJ, Ahmad I, Patishtan J.** Regulation of Na⁺ fluxes in plants. *Frontiers in Plant Science*. (2014); 5: Article 467
- McDonald, MB Jr., Vertucci CW, Roos EE.** Soybean seed imbibition: water absorption by seed parts. *Crop Science*. (1988); 28: 993-997
- Memon AR, Boss WF.** Rapid light-induced changes in phosphoinositide kinases and H(+)-ATPase in plasma membrane of sunflower hypocotyls. *The Journal of Biological Chemistry*. (1990); 265: 14817-14821
- Murashige T, Skoog F.** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* (1962); 15: 473-497
- Nakasone Y, Kawaguchi Y, Kong S, Wada M, Terazima M.** Photoinduced Oligomerization of *Arabidopsis thaliana* Phototropin 2 LOV1. *The Journal of Physical Chemistry B*. (2014); 118: 14314–14325
- Neff MM, Fankhauser C, Chory J.** Light: an indicator of time and place. *Genes & Development*. (2000); 14, 257–271

Niittylä T, Fuglsang AT, Palmgren MG, Frommer WB, Schulze WX. Temporal analysis of sucrose-induced phosphorylation changes in plasma membrane proteins of *Arabidopsis*. *Molecular & Cellular Proteomics*. (2007); 6: 1711–1726

Niu X, Bressan RA, Hasegawa PM, Pardo JM. Ion homeostasis in NaCl stress environments. *Plant Physiology*. (1995); 109: 735-742

Okajima K. Molecular mechanism of phototropin light signaling. *Journal of Plant Research*. (2016); 129: 149-157

Palmgren MG. Plant plasma membrane H⁺-ATPases: powerhouses for nutrient uptake. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*. (2001) 52: 817–845

Podolec R, Ulm R. Photoreceptor-mediated regulation of the COP1/SPA E3 ubiquitin ligase. *Current Opinion in Plant Biology*. (2018); 45: 18-25

Quail PH. Photosensory perception and signalling in plant cells: new paradigms? *Current Opinion in Cell Biology*. (2002) 14: 180-188

Roy SJ, Negrão S, Tester M. Salt resistant crop plants. *Current Opinion in Biotechnology*. (2014); 26: 115–124

Sancar A. Structure and function of DNA photolyase and cryptochrome blue-light photoreceptors. *Chemical Reviews*. (2003); 103: 2203–2237

Shalitin D, Yu X, Maymon M, Mockler T, Lin C. Blue light-dependent *in vivo* and *in vitro* phosphorylation of *Arabidopsis* cryptochrome 1. *Plant Cell*. (2003); 15: 2421–2429

Shimazaki KI, Doi M, Assmann SM, Kinoshita T. Light regulation of stomatal movement. *Annual Reviews Plant Biology*. (2007); 58: 219-247

Schwartz A, Illan N, Assmann SM. Vanadate inhibition of stomatal opening in epidermal peels of *Commelina communis* : Cl^- interferes with vanadate uptake. *Planta*. (1991); 183: 590-596

Silva AT, Ribone PA, Chan RL, Ligterink W, Hillhorst HWM. A Predictive Coexpression Network Identifies Novel Genes Controlling the Seed-to-Seedling Phase Transition in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*. (2016); 170: 2218-2231

Silva P, Gerós H. Regulation by salt of vacuolar H^+ -ATPase and H^+ -pyrophosphatase activities and H^+/Na^+ exchange. *Plant Signaling & Behavior*. (2009); 4: 718 – 726

Simpson GM. Seed Dormancy in Grasses. Cambridge University Press. (1990)

Sondergaard TE, Schulz A, Palmgren MG. Energization of transport processes in plants. Roles of the plasma membrane H^+ -ATPase. *Plant Physiology*. (2004); 136: 2475–2482

Taiz L, Zeiger E, Moller IM, Murphy A. *Plant Physiology and Development*, 6th ed. Sunderland, Mass.: Sinauer Associates. (2015)

Takahashi K, Hayashi K, Kinoshita T. Auxin activates the plasma membrane H^+ -ATPase by phosphorylation during hypocotyl elongation in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*. (2012); 159: 632-641

Toh S, Inoue S, Toda Y, Yuki T, Suzuki K, Hamamoto S, Fukatsu K, Aoki S, Uchida M, Asai E et al. Identification and Characterization of Compounds that Affect Stomatal Movements. *Plant & Cell Physiology*. (2018); 59: 1568-1580

Weller JL, Kendrick RE. Photomorphogenesis and Photoperiodism in Plants. *Photobiology*. (2008) 417-463

Whitelam GC, Devlin PF. Roles of different phytochromes in *Arabidopsis* photomorphogenesis. *Plant, Cell & Environment*. (1997); 20: 752–758

Yu X, Sayegh R, Maymon M, Warpeha K, Klejnot J, Yang H, Huang J, Lee J, Kaufman L, Lin C. Formation of nuclear bodies of *Arabidopsis* CRY2 in response to blue light is associated with its blue light-dependent degradation. *Plant Cell*. (2009); 21: 118–130

Zoznam použitých skratiek

ABA	kyselina abscisová
AHA	<i>Arabidopsis H⁺-ATPase gene</i> , gén <i>Arabidopsis</i> kódujúci H ⁺ -ATPázu
BL	<i>blue light</i> , modré svetlo
CCE	C-terminálna doména kryptochrómu
COP1	<i>Constitutively photomorfogenic</i>
CRY	krytochróm
D	<i>dark</i> , tma
FAD	oxidovaný flavínadenín dinukleotid
FADH	redukovaný flavínadenín dinukleotid
FR	<i>far red</i> , dlhovlnné červené svetlo
GA	giberelíny
LOV	<i>light/oxygen/voltage</i>
MTHF	methyltetrahydrofosfát
NHX1	<i>Na⁺/H⁺ exchanger 1</i>
PHR	doména kryptochrómu homológna s fotolýzou
PM	cytoplazmatická membrána
RL	<i>red light</i> , červené svetlo
SOS	<i>Salt overly sensitive</i> (SOS1, SOS2)
V-ATPáza	H ⁺ -ATPáza uložená v tonoplaste vakuoly