

# 11/ Faktory ovlivňující a regulující vývojové procesy

Vývojové procesy (růst a vývoj) rostlin jsou ovlivňovány (resp. regulovány) řadou přirozených faktorů, které můžeme klasifikovat jako **vnitřní** a **vnější**. Jsou to zejména:

|       |                                                                 |   |                                                |
|-------|-----------------------------------------------------------------|---|------------------------------------------------|
| 1.    | faktory genetické                                               | } | faktory vnitřní                                |
| 2.    | příjem a přenos signálů                                         |   |                                                |
| 3.    | fytohormony                                                     |   |                                                |
| 4.    | faktory nutriční                                                |   |                                                |
|       | – fotosyntázy                                                   |   |                                                |
|       | – aminokyseliny                                                 |   |                                                |
|       | – vitaminy                                                      |   |                                                |
| <hr/> |                                                                 |   |                                                |
|       | – voda                                                          | } | faktory vnější:<br>(A) chemické<br>a fyzikální |
|       | – kyslík                                                        |   |                                                |
|       | – minerální živiny                                              |   |                                                |
|       | – oxid uhličitý                                                 |   |                                                |
|       | – fotosynteticky účinné záření<br>(světlo jako faktor nutriční) |   |                                                |
| 5.    | teplota                                                         | } |                                                |
| 6.    | světlo jako faktor signální                                     |   |                                                |
| 7.    | gravitace                                                       |   |                                                |
| 8.    | mechanické tlaky                                                |   |                                                |
| <hr/> |                                                                 |   |                                                |
| 9.    | mikroorganismy a další složky<br>živého okolí                   | → | faktory vnější:<br>(B) biotické                |

**Poznámky:** 1) Termíny vnitřní (interní) a vnější (externí) jsou zde použity ve smyslu endogenní (vnitřního původu) a exogenní (vnějšího původu). 2) Tato klasifikace je však jen jednou z více možných. Závisí na použitém hledisku a konkrétní situaci. Např. při kultivaci izolovaných buněk, pletiv a orgánů *in vitro* jsou všechny nutriční faktory a často i některé fytohormony součástí kultivačního média, jsou tedy faktory vnějšími. 3) Přesto, že svou povahou a biologickým významem se uvedené faktory vzájemně značně liší, výsledné projevy jejich působení mohou být velmi podobné nebo dokonce shodné (např. indukce růstových a vývojových procesů, změna jejich rychlosti či směru, udržování homeostáze). Obvykle nepůsobí izolovaně, nýbrž společně, často v různých interakcích a kauzálních vztazích. 4) Vývojové procesy rostlin mohou být ovlivněny také xenobiotiky (viz Fyziologie stresu).

## 11.1 Faktory genetické

Všechny růstové a vývojové procesy rostlin (i ty, které probíhají v kulturách izolovaných buněk, pletiv a orgánů) patří do ontogeneze a jsou realizací jejich ontogenetického programu. Přímou nebo nepřímou

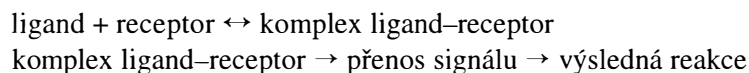
jsou regulovány molekulárně-genetickými faktory a mechanismy genové exprese. Molekulárně-genetické faktory ovlivňující růst a vývoj rostlin mohou být i vnějšího původu (exogenní), jak tomu je v případě virů a bakterií např. rodu *Agrobacterium*.

## 11.2 Příjem a přenos signálů

Rostlina po celý svůj život přijímá **signály** (tj. **informace a podněty – stimuly**) přicházející z jejího vnitřního a vnějšího prostředí a reaguje na ně. Přijímá je specifickými receptory a sensory a ve svých buňkách, mezi buňkami a v celém těle je přenáší po signálních drahách a sítích. Jako signály působí světlo, cukry (mono- a oligosacharidy), fytohormony, patogeny, změny vektorového rozložení mechanických tlaků v pletivech, gradienty iontů a další faktory ovlivňující růst a vývoj rostlin nebo vyvolávající jejich obranné a pohybové reakce. Většina signálů způsobuje změny genové exprese. Reakce rostliny na signál závisí na jejím vývojovém stavu, předchozích vlivech prostředí a na vnitřních biologických hodinách, které specifikují čas v rámci roku a dne (viz Biorytmy). Konečná reakce rostliny (resp. buňky) bývá projevem integrace různých signálních informací (viz Signální sítě).

### 11.2.1 Receptory a sensory

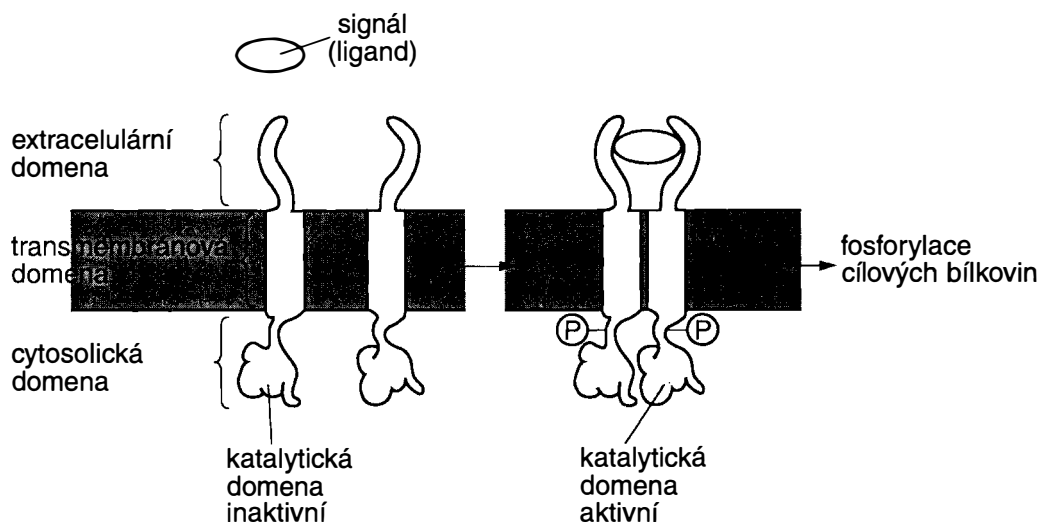
**Receptory signálů** jsou obvykle bílkoviny a jejich komplexy. Nejvíce prostudované jsou receptory plasmalemy, méně známé jsou ty, které fungují v cytoplasmě a dalších kompartmentech. Signál v podobě molekuly nebo iontu, který se váže na receptor a vyvolává změnu jeho konformace, je označován jako **ligand**. Některé receptory regulují genovou expresi prostřednictvím efektoru přímo. Tak působí např. některé receptory živočišných steroidních hormonů. Ve většině případů však vazba ligandu na receptor zahajuje řetěz biochemických reakcí, které vedou od signálu, resp. od vazby ligandu na receptor, k buněčné reakci. Vazba signální molekuly (ligandu) na receptor a výsledek této vazby mohou být znázorněny takto:



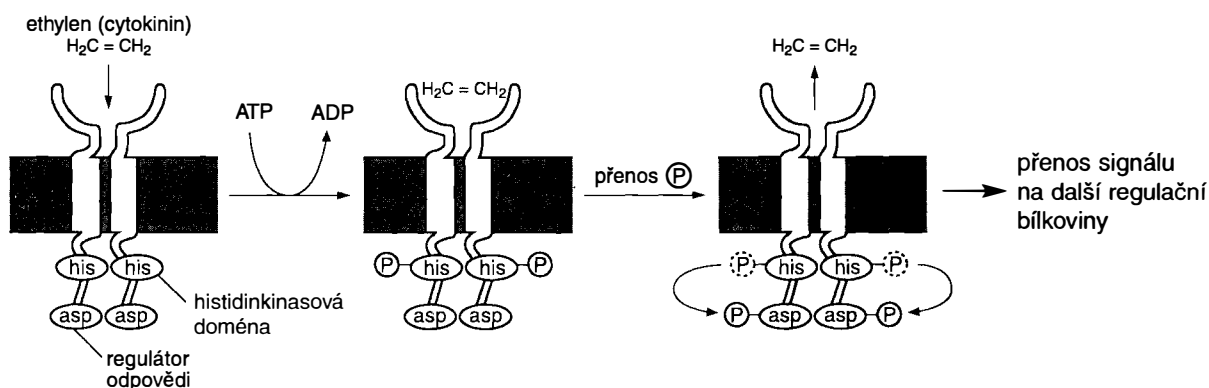
**Sensory** jsou bílkoviny (např. hexokinasa) či bílkovinné komplexy, které vnímají jako signál změnu průtoku signální molekuly (např. cukru). Tak mohou fungovat vedle metabolických enzymů také např. membránové přenašeče.

#### **K hlavním, dosud identifikovaným, rostlinným receptorům patří:**

1. Proteinkinasové receptory (RLK, receptor-like protein kinases). RLK je u rostlin skupina Ser/Thr proteinkinas, jejichž intracelulární kinasová doména se fosforyluje v důsledku agregace receptorových domén v plasmalemě, poté co došlo k vazbě ligandu (**obr. 89**).
2. Dvoukomponentní receptorové systémy tvořené receptorem a efektem, podobné těm, které jsou běžné u mikroorganismů (**obr. 90**).
3. Receptory charakterisované sedmi transmembránovými doménami, jednou doménou extracelulární a jednou cytoplasmatickou.
4. Receptory fungující jako iontové kanály. Do této skupiny patří např. receptor/vápníkový kanál v membráně ER, který váže inositol-1,4,5-trisfosfát (IP<sub>3</sub>).
5. Receptory červeného světla – fytochromy.
6. Receptory modrého světla – kryptochromy a fototropiny.
7. ABP1 (auxin binding protein 1) – který je lokalizován v ER (nese retenční signál KDEL, viz Struktura a funkce rostlinné buňky), ale aktivní je minoritní část jeho molekul unikající z ER exocytosou na plasmalemu, kde váže auxin.



**Obr. 89.** Proteinkinasový receptor RLK. Vazba ligandu vyvolává agregaci receptorů, jejich fosforylaci a přechod do aktivního stavu.



**Obr. 90.** Dvousložkový receptor ethylenu.

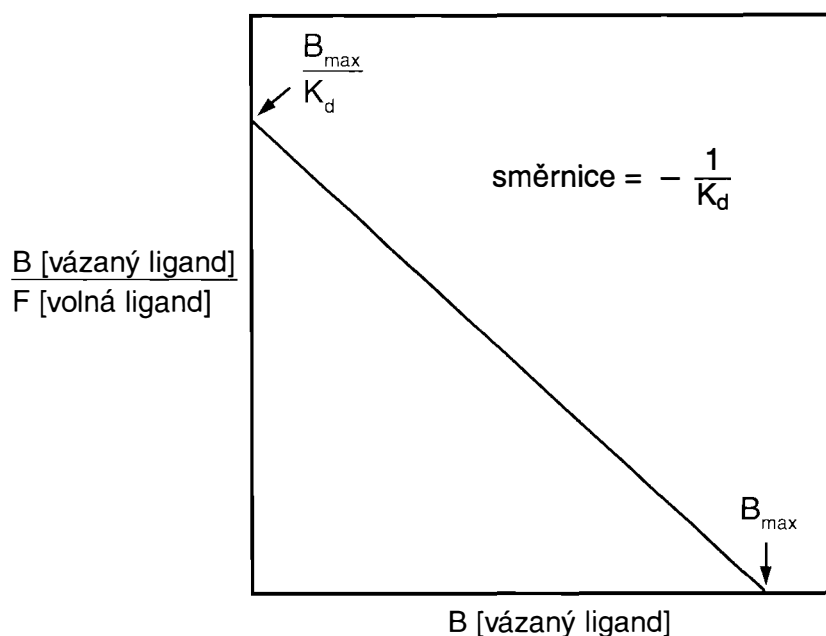
### Identifikace receptoru

Identifikovat nějakou molekulu jako receptor není snadné. Při rozhodování, zda se skutečně jedná o receptor, platí tato kritéria:

1. Receptor má k ligandu (signální molekule) vysokou afinitu.
2. Vazba ligandu je nekovalentní, reversibilní.
3. Vazba je (v závislosti na koncentraci ligandu) satureovatelná.
4. Receptor je specifický pro biologicky aktivní molekuly a vazba vyvolává reakci odpovídající fyziologické aktivitě *in vivo*.
5. Disociační konstanta ( $K_d$ ) komplexu ligand-receptor odpovídá koncentraci, při které je ligand aktivní *in vivo*.

### Disociační konstanta komplexu ligand-receptor

Afinita receptoru k ligandu (resp. síla vazby ligandu na receptor) se vyjadřuje pomocí disociační konstanty  $K_d$  komplexu ligand-receptor. Čím je disociační konstanta nižší, tím je vazba mezi ligandem a receptorem pevnější (tím vyšší afinitu má receptor k ligandu). Je-li hodnota disociační konstanty velmi nízká, lze komplex ligand-receptor izolovat různými metodami (např. centrifugací nebo gelovou



**Obr. 91.** Scatchardův graf.  $K_d$  = disociační konstanta komplexu hormon-receptor ve stavu rovnováhy.  $B_{\max}$  = maximální kapacita vazby.

filtrací) v neporušeném stavu. Jestliže však komplex ligand-receptor snadno disociuje ( $K_d$  je vysoká), lze vazbu ligandu na receptor prokázat jen za podmínek, kdy je v roztoku udržována rovnováha mezi volným a vázaným ligandem. Těmto podmínkám nejlépe vyhovuje metoda rovnovážné dialýzy za použití nádoby se dvěma prostory oddělenými dialyzační membránou. V jednom prostoru je roztok obsahující potenciální receptor a volný ligand, ve druhém prostoru roztok pouze volného ligandu. Za určitou dobu se mezi roztoky v obou částech nádoby ustaví rovnováha, při níž je koncentrace volného ligandu v obou roztocích stejná. Rozdíl mezi celkovou koncentrací ligandu v části s receptorem a koncentrací volného ligandu v části druhé odpovídá množství ligandu vázaného na receptor. K výpočtu disociační konstanty  $K_d$  (a dalších kinetických parametrů vazby ligandu na receptor) se používá Scatchardova metoda. Do grafu (**obr. 91**) se vynáší poměr koncentrace vázaného ligandu ku koncentraci volného ligandu (osa y) v závislosti na koncentraci vázaného ligandu (osa x). Je-li závislost přímková, jde o jeden typ vazebného místa, jehož koncentrace, resp. maximální kapacita vazby  $B_{\max}$  je dána průsečíkem s osou x. Směrnice přímky se rovná záporné převrácené hodnotě disociační konstanty ( $-1/K_d$ ).

### Koncentrace receptorů

Změny koncentrace receptorů v aktivním stavu mohou měnit citlivost buněk vůči signálům. K takovým změnám dochází v průběhu ontogeneze při diferenciaci buněk a pletiv. Tím lze vysvětlit velké rozdíly mezi pletivy a orgány v jejich schopnosti reagovat na určitý signál.

### 11.2.2 Signální dráhy

Sled reakcí, které vedou od receptoru aktivovaného signálem k buněčné reakci, se nazývá signální dráha. Typickým výsledkem přenosu signálu signální drahou je regulace transkripčních faktorů (efektorů) působících na promotorovou oblast genu. Téměř všechny signální dráhy zahrnují **proteinkinasy**, **proteinfosfatasy** a **transkripční faktory** – efekторы. Mnohé dráhy dále zahrnují **GTPasy** (G–proteiny), **fosfolipasy** a **druhé posly**. Různé signální dráhy, často příbuzné kvasinkovým, živočišným a bakteriálním, jsou postupně objevovány i u rostlin. Schématicky je můžeme rozřadit do následujících kategorií (jednotlivé jejich složky jsou popsány dále):

- 1a Signál → membránový receptor (viz Receptory, ad 2) → fosforylace efektoru → změny v organizaci a aktivitách cytoplasmy, regulace genové exprese.
- b Signál → membránový receptor → G-protein → aktivace enzymu (fosfolipasy, adenylátcyklasy nebo guanylátcyklasy) → druhý posel → aktivace proteinkinasy → fosforylace bílkoviny (efektoru) → změny v organizaci a aktivitách cytoplasmy, regulace genové exprese (**obr. 92** – pro případ heterotrimerního G-proteinu).
- c Signál → membránový receptor → G-protein → kaskáda proteinkinasy (MAPKKK → MAPKK → MAPK) → fosforylace efektoru → změny v organizaci a aktivitách cytoplasmy nebo plastmaleny, regulace genové exprese.
- 2 Signál → (cytoplasmatický receptor + inhibiční protein) → (receptor + ligand) → změny v organizaci a aktivitách cytoplasmy, regulace genové exprese.

**Aktivace v přenosu signálu (ale také např. aktivace enzymu, transkripce či translace) v řadě případů znamená odstranění (inaktivaci) represoru.**

### Druzí poslové

Součástí některých signálních drah jsou tzv. druzí poslové (second messengers) – přechodné sekundární signály uvnitř buňky, které jsou výsledkem (a prostředkem) velmi významné amplifikace (zesílení) prvotního signálu. Signál zachycený receptorem obvykle vyvolává zvýšení hladiny druhých poslů (jednoho nebo několika), což má za následek změnu aktivity enzymů nebo regulačních bílkovin. Častými druhými posly jsou:

1. Vápenaté ionty –  $[Ca^{2+}]_i$
2. Inositol-1,4,5-trisfosfát –  $IP_3$
3. Diacylglycerol – DAG
4. Vodíkové ionty (pH)
5. Cyklická adenosindifosfátribosa – cADPR
6. Cyklický guanosinmonofosfát – cGMP
7. Cyklický adenosinmonofosfát – cAMP

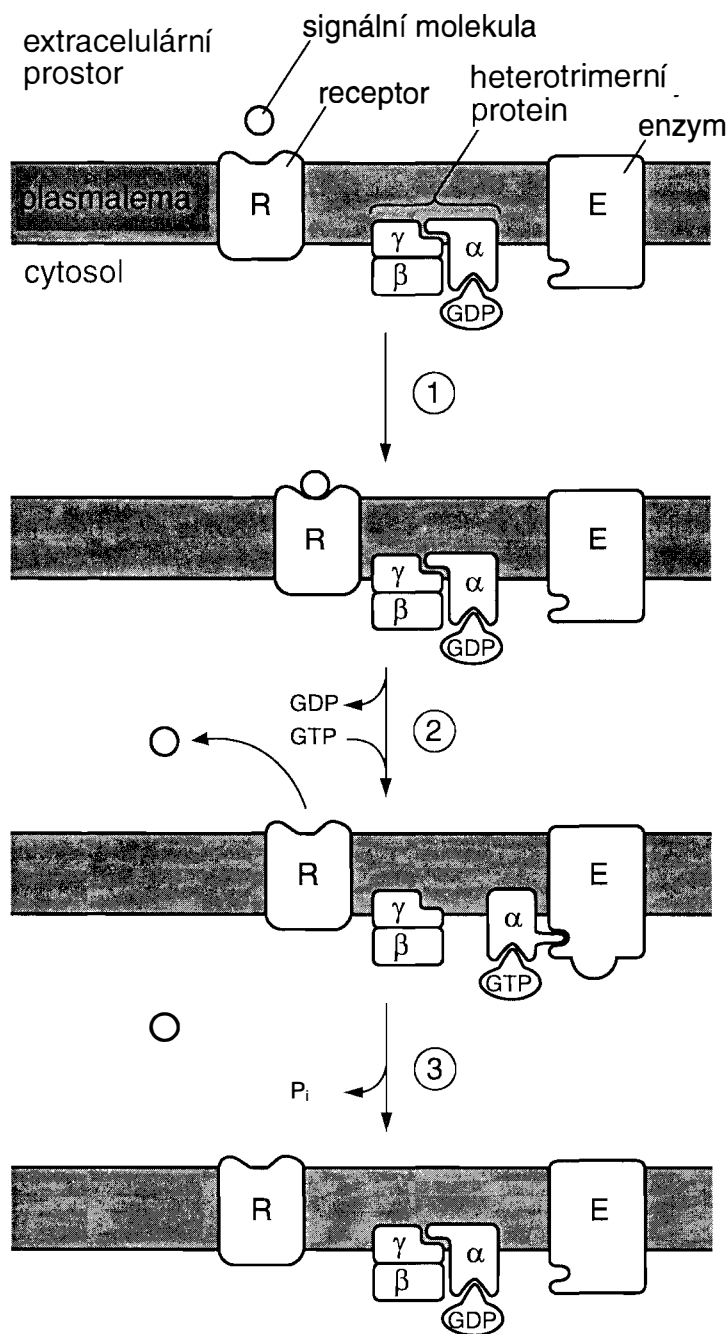
### GTPasy – G-proteiny

G-proteiny jsou zvláštní skupina GTPas – enzymů, hydrolyzujících guanosintrifosfát. Jejich funkcí je zvyšovat přesnost vzájemného rozeznávání interagujících molekul při přenosu signálů. Každý z mnohých G-proteinů funguje jako molekulární přepínač a GTPasy mají společný funkční cyklus. Stav zapnutí (aktivace) a vypnutí (inaktivace) jsou vyvolány navázáním GTP a jeho hydrolýzou (**obr. 93**). GTPasy přecházejí ze stavu inaktivního do stavu aktivního výměnou GDP za GTP katalyzovanou výměnným faktorem GDP/GTP (**GEF**, GDP/GTP exchange factor). V této konformaci se účastní signálních procesů. Hydrolýza GTP, katalyzovaná „proteinem aktivujícím GTPasu“ (**GAP**, GTPase-activating protein) inaktivuje bílkovinu odštěpením fosfátu – GTPasa přechází do inaktivní konformace.

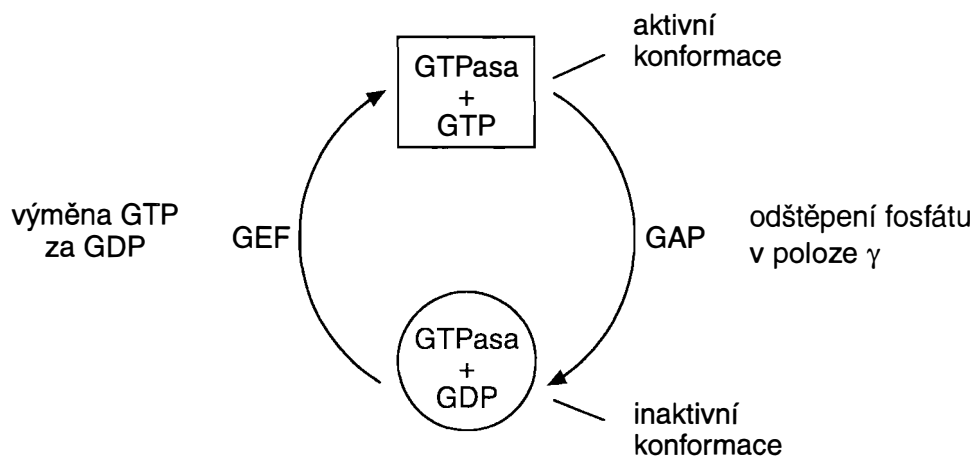
V eukaryotních buňkách existují dvě velké skupiny signálních GTPas:

1. **Heterotrimerní GTPasy** složené ze tří podjednotek ( $\alpha$ ,  $\beta$  a  $\gamma$ ) jsou lokalizovány na membráně a fungují v rozpoznávání aktivovaných stavů receptoru, přičemž vazebnou funkci GTP má podjednotka  $\alpha$ .
2. **Monomerní GTPasy** nadrodiny Ras zahrnují u rostlin řadu podskupin – především Rab (řízení transportu váčků, sekrece), Rho/Rop (organizace cytoskeletu, přenos signálu od RLK, řízení produkce kyslíkových radikálů a další) a Ran (řízení transportu mezi jádrem a cytoplasmou, řízení jaderného cyklu v buněčném cyklu). Ras není v rostlinách znám. Tyto GTPasy fungují nejčastěji jako periferní membránové bílkoviny zapojené do membrány hydrofobním prenylovým řetězcem, který je posttranslačně připojen nejčastěji na konci COOH. Mezi monomerní GTPasy patří také Arf (ADP-ribosylation factor), které se podílejí na iniciaci tvorby obalů COP a tím membránových váčků. Jako specifický inhibitor zde působí brefeldin A (BFA), který reversibilně zastavuje buněčnou sekreci. Malé GTPasy – zvl. Rho a Rab – spolu interagují prostřednictvím multimerních komplexů a patří mezi dominantní regulátory buněčné polarity a morfogeneze.

**Heterotrimerní G-proteiny** přenášejí signály z receptorů s několika (např. sedmi) transmembránovými doménami a cyklicky přitom mění svou formu mezi aktivní a neaktivní a fungují jako molekulární přepínače. Podjednotky  $\beta$  a  $\gamma$  tvoří komplex, který poutá trimerní G-protein na cytoplasmatické straně k membráně. G-protein je aktivován vazbou na receptor aktivovaný ligandem. V inaktivní formě G-protein existuje jako trimer s GDP vázaným k podjednotce  $\alpha$ . Vazba na receptor, spojený s ligandem, vyvolává v podjednotce  $\alpha$  výměnu GDP za GTP. Tato výměna způsobuje disociaci aktivované podjednotky



**Obr. 92.** Receptorový systém s heterotrimerním G-proteinem. (1) Receptor váže signální molekulu. (2) K receptoru se váže G-protein. Komplex ligand-receptor katalyzuje výměnu GDP za GTP na G-proteinu. (3) Vazba GTP vede k disociaci podjednotky  $\alpha$  od podjednotky  $\beta/\gamma$ . Podjednotka  $\alpha$  se váže na enzym, např. na fosfolipasu C – enzym se aktivuje. Vnitřní GTPasová aktivita podjednotky alfa hydrolyzuje GTP na GDP, což způsobuje návrat G-proteinu do výchozího neaktivního stavu a zpětné spojení podjednotky  $\alpha$  s podjednotkami  $\beta/\gamma$ .



**Obr. 93.** Cyklus signálních GTPas. Aktivní GTPasy jsou převáděny do stavu neaktivního hydrolyzou GTP, katalyzovanou proteinem hydrolyzujícím GTP (GAP, GTPase activating protein). Neaktivní GTPasy jsou převáděny do stavu aktivního působením GEF (GDP/GTP exchange factor).

$\alpha$  od komplexu  $\beta$  a  $\gamma$  a umožňuje její spojení s efektem, např. s PLD, iontovým kanálem či adenylát-cyklasou, které jsou aktivovány. Hydrolyzou GTP se podjednotka  $\alpha$  a tím i efektor inaktivují. Podjednotka  $\alpha$  s navázaným GDP se znovu spojí s komplexem  $\beta - \gamma$  a může být znovu reaktivována receptorem s navázaným ligandem.

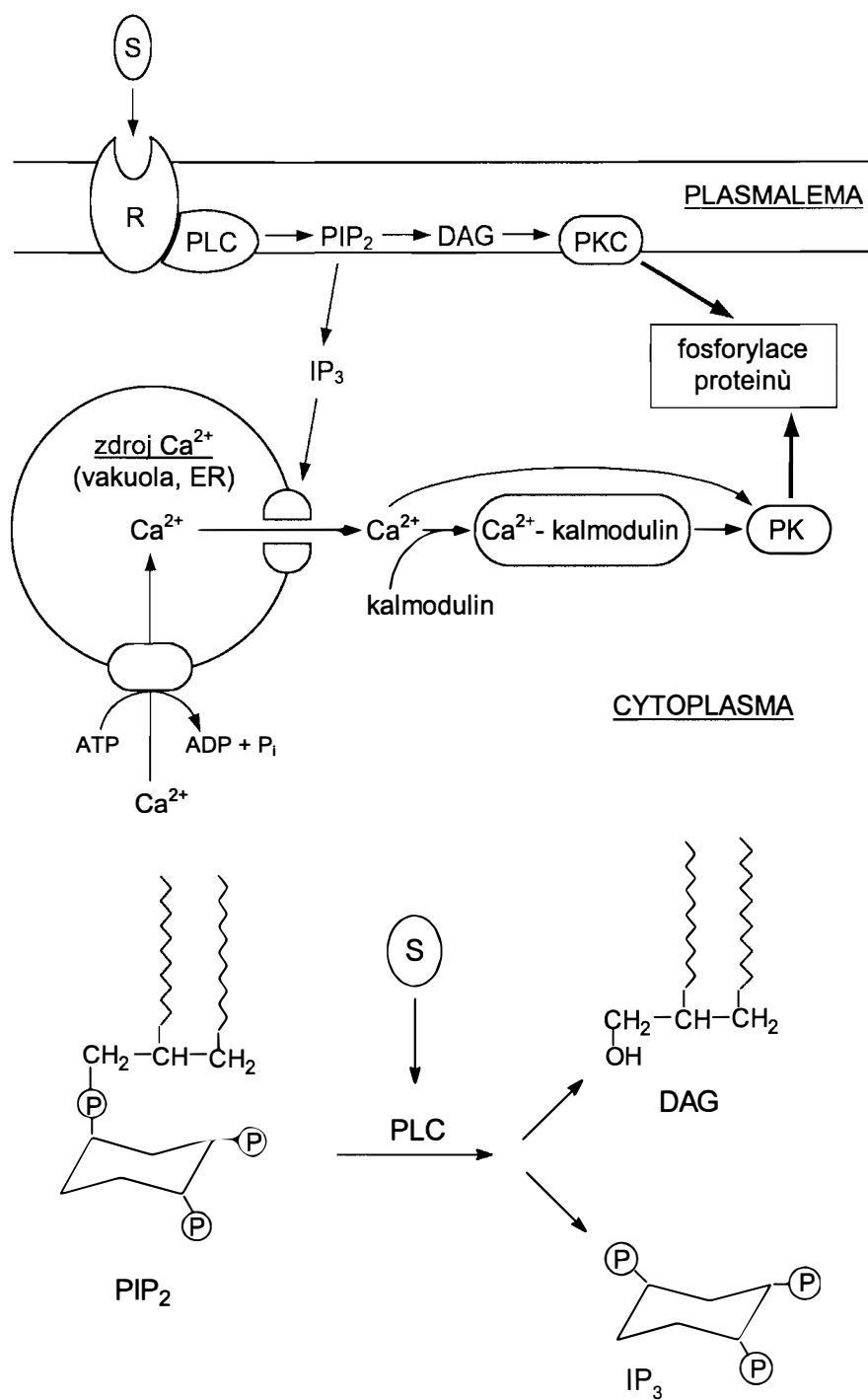
**Monomerní GTPasy** vytvářejí během svého funkčního cyklu několik různých komplexů a často jsou během tohoto cyklu také transportovány cytoplasmou např. vázané na membránové váčky či volně (např. v inaktivní konformaci GDI vázané na disociační inhibitor GDP).

**GTPasy zjištěné u rostlin** se podílejí na přenosu signálů např. modrého a červeného světla, giberelinu, signálů regulujících stupeň otevření průduchů, signálů odpovědných za organizaci meristemu a pod.

### Fosfolipasy

Fosfolipasy (A, C, D, resp. PLA, PLC, PLD) spolu s kinasami a fosfatasami jsou součástí cyklu syntézy a rozkladu fosfoinositidů (fosfolipidů obsahujících inositol). Produkují signální molekuly – druhé posly, jakými jsou např.  $IP_3$  a DAG. **Fosfolipasy C (PLC)** jsou enzymy vázané na plasmalemu a reagující na různé signály. Jsou často aktivovány G-proteinem spřaženým s komplexem receptor-ligand. Substrát PLC – fosfatidylinositol-4,5-bisfosfát ( $PIP_2$ ) je štěpen na rozpustný **inositol-1,4,5-trisfosfát ( $IP_3$ )** a **diacylglycerol (DAG)**, který zůstává vázán na membránu (**obr. 94**). Tvorba  $PIP_2$  je katalyzována dvěma kinasami, které postupně mění fosfatidylinositol (PI) na fosfatidylinositol-4-fosfát ( $PIP$ ) a pak na  $PIP_2$ . Vazba ligandu nebo aktivace červeným a modrým světlem vyvolává v G-proteinu výměnu vázaného GDP za GTP. Podjednotka  $\alpha$  s vázaným GTP se uvolní a aktivuje PLC.  $IP_3$  v cytoplasmě volně difunduje a váže se na specifické kanály pro  $Ca^{2+}$  v membránách vakuoly a ER. Tyto kanály se otevrou a uvolňují ionty vápníku do cytoplasmy.

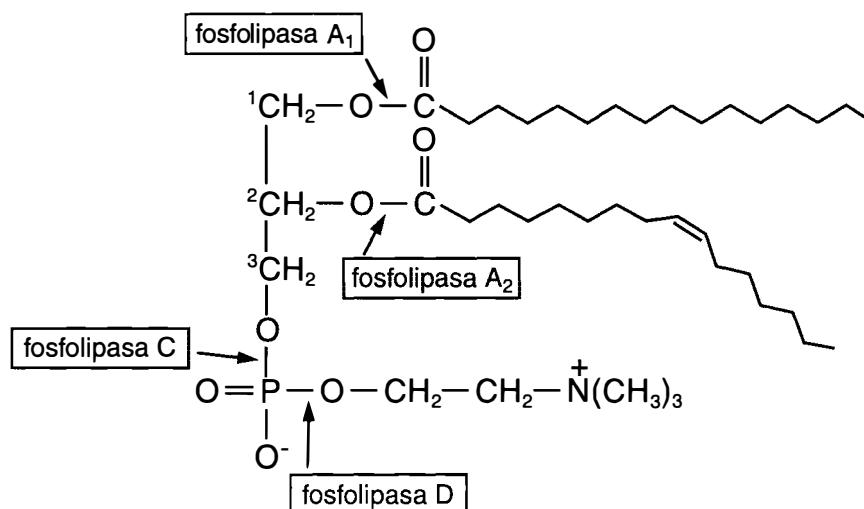
$PIP_2$  se může také vázat na dva důležité proteiny účastnící se organizace mikrofilament. Signál nesený inositoltrisfosfátem ( $IP_3$ ) je tlumen činností fosfatas, které postupně odštěpují fosfáty za vzniku  $IP_2$ , IP a inositolu, který může být znovu použit pro syntézu PI. Diacylglycerol (DAG) aktivuje proteinkinasy C (PKC) tím, že mění její citlivost k vápenatým iontům. PKC působí v mnoha signálních drahách spojených s dělením a růstem buněk. **Fosfolipasy A** ( $A_1$ ,  $A_2$ ) a **D** štěpí fosfolipidy v jiných částech molekuly než fosfolipasy C a produkují proto jiné signální molekuly (včetně mastných kyselin), jak je zná-



**Obr. 94.** Fosfoinositidový signální systém. S – signál, R – receptor, PLC – fosfolipasa C, PIP<sub>2</sub> – fosfatidylinositol–4,5-bisfosfát, DAG – diacylglycerol, IP<sub>3</sub> – inositol–1,4,5-trisfosfát, PKC – proteinkinasa C, PK – proteinkinasa

zorněno na **obr. 95**. PLD byly poprvé objeveny u rostlin a jejich strukturní i funkční bohatost v rámci jediného druhu *Arabidopsis* odpovídá jejich významu pro vývoj rostlin a zvláště jejich účasti na stresových reakcích rostlin na nepříznivé abiotické i biotické faktory prostředí.





Obr. 95. Štěpení membránových fosfolipidů různými fosfolipasami.

### Cyklické nukleotidy

Funkci druhých posílů při přenosu signálů v buňce mají také cyklický nukleotid cAMP syntetizovaný z ATP adenylátcyklasou a cyklický nukleotid cGMP syntetizovaný guanylátcyklasou z GTP. Jejich koncentrace v rostlinných buňkách je velmi nízká a to, že se účastní přenosu signálů, bylo prokázáno teprve nedávno.

### Vápník

Při přenosu signálů v rostlinné buňce má klíčovou úlohu volný cytoplasmatický vápník [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>. Mezi signály, které přenáší, patří mechanické tlaky (vyvolané např. větrem), tepelný šok, houbové elicitory, poranění, oxidační stres, červené světlo, modré světlo, anaerobiosa, ABA a osmotický stres.

#### a – Koncentrace Ca<sup>2+</sup> v cytosolu, vakuole, ER a buněčné stěně

Signální funkce iontů Ca<sup>2+</sup> závisí na jejich elektrochemickém gradientu přes plasmalemu a intracelulární membrány. Signalizace je umožněna nízkou základní koncentrací volného Ca<sup>2+</sup> v cytosolu (100 – 200 nM). Vakuola a ER jsou velkými vnitrobuněčnými zásobárnami Ca<sup>2+</sup> (asi 1 mM), který může být mobilizován inositoltrisfosfátem (IP<sub>3</sub>) a dalšími signálními molekulami syntetizovanými v plasmalemě. V buněčné stěně, kde vápník je také součástí molekulární struktury, je koncentrace jeho iontů asi 0,5 až 1 mM. Vápenaté ionty jsou ve vysoké koncentraci také v mitochondriích, chloroplastech a v jádru.

#### b – Vápenaté ionty přenášejí signál na cílové proteiny

Když buňka přijme určitý signál, kanály pro Ca<sup>2+</sup> se otevřou a hladina cytosolického vápníku se rychle asi stonásobně zvýší. Četné bílkoviny vázající Ca<sup>2+</sup>, včetně kalmodulinu a proteinkinasy s doménou podobnou kalmodulinu (CDPK – calcium dependent protein kinases), jsou tak aktivovány. Komplex Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin přenáší vápníkový signál na cílové proteiny, které aktivuje. Rostlinné buňky pravděpodobně obsahují několik set bílkovin, které vážou přímo Ca<sup>2+</sup> nebo Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin. Signály vápenatých iontů jsou tlumeny činností vápníkové pumpy (Ca<sup>2+</sup>-ATPasy), která vápenaté ionty přečerpává do extracytosolických kompartmentů. Přečerpávání a znovuoobnovení hotovosti vápníku v organelách (především ER a vakuole) se mohou účastnit vedle Ca<sup>2+</sup>-ATPas i vápníkové přenašeče.

#### c – Tři typy vápníkových kanálů

Kanály pro Ca<sup>2+</sup> jsou lokalizovány v plasmalemě a membránách endoplasmatického retikula, vakuoly a mitochondrií. **Jeden** typ vápníkových kanálů (voltage-gated channels) je regulován membránovým

potenciálem. **Druhý** typ je regulován druhými posly –  $IP_3$  a cADPR. **Třetí** je regulován mechanickým napětím plasmalemy a tonoplastu (viz 4.4.3.7).

#### **d – Koncentrační gradienty, vlny, oscilace**

Vápenaté ionty se v cytoplasmě pohybují mnohem pomaleji než v jednoduchém vodném roztoku. Příčinou toho je brždění jejich translokace/difuze transportem do organel (např. do chloroplastů, mitochondrií, ER a vakuoly) a vazba na proteiny. Nízká rychlost difuze je důležitou součástí signalizace: koncentrační gradient vápenatých iontů v cytoplasmě zesiluje jejich signalizační specifitu. Pomocí speciálních fluorescenčních a luminiscenčních technologií je možné získat obraz distribuce  $Ca^{2+}$  v živé buňce. Tak byly objeveny **dlouhodobé gradienty**  $Ca^{2+}$  v rostoucích pylových láčkách a kořenových vláscích a **koncentrační vlny** a **oscilace** ve svěracích buňkách a pylových láčkách. Tyto vlny a oscilace jsou zřejmě výsledkem střídavého vyprazdňování a plnění zásobáren  $Ca^{2+}$  v ER a snad i ve vakuole. Oscilace mohou buňkám umožňovat rozlišení skutečných signálů  $Ca^{2+}$  od „vápníkového šumu“, resp. pozadí. Buňky jsou schopné frekvenci oscilací nebo rychlost vln interpretovat.

#### **e – Vápníkem indukované uvolňování vápníku – CICR (calcium induced calcium release)**

Náhle zvýšení koncentrace  $[Ca^{2+}]_i$  v cytoplasmě je v řadě případů umožněno pozitivní zpětnou vazbou, která zajišťuje (např. aktivací dalších iontových kanálů), že malé zvýšení jednoho až čtyř vápenatých iontů  $[Ca^{2+}]_i$  vede k aktivaci (zesílení) dalšího výtoku vápníku z vnitrobuněčných zásob v organelách do cytoplasmy. Přechodnost tohoto signálu je zajišťována transportními pochody, které odstraňují vápník z cytoplasmy.

#### **f – Kalmodulin**

Primárním receptorem  $Ca^{2+}$  je kalmodulin – nízkomolekulární bílkovina přítomná v cytoplasmě i jádře. Je známa také forma, která je připojena k plasmalemě. Vazba  $[Ca^{2+}]$  vyvolává změnu terciární struktury kalmodulinu, která umožňuje jeho vazbu na cílové proteiny a tím jejich aktivaci.

#### **Proteinkinasy**

Proteinkinasy jsou přítomné ve všech buňkách a mnohé jsou signálově specifické. Katalyzují reversibilní přenos fosfátu z ATP na postranní řetězec cílových bílkovin – na řetězec obsahující aminokyselinu serin, threonin nebo tyrosin. Aktivita proteinkinas je vyvažována a regulována působením specifických fosfatas, které fosfát z bílkovin zase odštěpují. Fosforylací se aktivita bílkoviny obvykle změní. Jedna molekula proteinkinasy může fosforylovat mnoho set cílových bílkovin a tím značně zesilovat slabé signály. V genomu *Arabidopsis* bylo identifikováno více než tisíc genů pro různé proteinkinasy. Mezi nejdůležitější rostlinné proteinkinasy patří RLK popsané výše (viz Receptory), které jsou na rozdíl od tyrosinkinas živočichů specifické pro Ser a Thr (viz Úvodní část → Regulace aktivity enzymů).

#### **MAP kinasové kaskády**

Tyto proteinkinasy (MAPkinasy, mitogen-activated protein kinases) tvoří kaskádu, ve které MAPKKK (MAP kinasa kinasy kinasy) předává fosfátový zbytek proteinkinase MAPKK (MAP kinasa kinasy) a ta jej předává MAPK, která fosforyluje TF v cytoplasmě nebo se transportuje do jádra, kde aktivuje další proteinkinasy, specifické TF a regulační proteiny. U rostlin existuje řada dokladů pro účast MAP kinas v působení fytohormonů, mechanických signálů, osmotického stresu, poranění a houbových elicitorů.

#### **Proteinkinasy závislé na cyklinech – CDK (cyclin dependent kinases)**

Tyto proteinkinasy se podílejí na regulaci buněčného dělení (viz kap. 2) a samy jsou regulovány fosforylací.

### **Proteinkinasy transkripčních faktorů**

Některé proteinkinasy regulují transkripci na základě fosforylace transkripčních faktorů. Genová exprese závisí na vazbě transkripčních faktorů na promotorovou oblast genů. Fosforylace je základním prostředkem regulace transkripce. Mnohé transkripční faktory se nemohou vázat na DNA pokud nebyly fosforylovány, ačkoliv jiné jsou fosforylací inaktivovány. Chromatin, ve kterém probíhá přepis genů, je bohatý na proteinkinasovou aktivitu a na fosforylované bílkoviny. Každý gen je regulován několika různými transkripčními faktory, které interagují a vzájemně se aktivují či inhibují. Transkripční faktor může být fosforylován na více místech. Některé transkripční faktory jsou fosforylovány v cytoplasmě a fosforylace je podnětem k jejich transportu do jádra. Fosforylace většiny transkripčních faktorů však probíhá v jádře.

### **Proteinfosfatasy**

Tyto enzymy regulují mnoho různých procesů probíhajících v rostlinných buňkách. Rozsah fosforylace proteinů je výsledkem rovnováhy mezi aktivitou proteinkinasy a proteinfosfatasy. Některé proteinfosfatasy jsou aktivovány  $\text{Ca}^{2+}$ /kalmodulinem a inhibovány specifickými inhibitory. Analýzou mutantů *Arabidopsis* byla prokázána účast fosfatasy např. v regulaci auxinového signálu.

### **Signální sítě**

Signální dráhy mohou být přímočaré a samostatné, nebo propojené s jinými drahami, s nimiž vytvářejí signální síť. K propojení dochází ve společných uzlových bodech (složkách, reakcích), jejichž prostřednictvím spolu různé signály komunikují a interagují (tzv. cross talking, křížová komunikace). Takovým způsobem mohou interagovat např. signály světelné s hormonálními.

## **11.3 Fytohormony**

Fytohormony jsou nízkomolekulární, v rostlinách syntetizované, organické sloučeniny, které při velmi nízkých koncentracích regulují různé, zejména růstové a vývojové procesy, aniž by se při tom chemicky měnily. Působí v místě svého vzniku nebo i v jiných částech rostliny, do kterých jsou transportovány. Plní dvojí funkci: (1) Významně se podílejí na koordinaci vztahů mezi buňkami, pletivami a orgány a na vývojové integraci rostliny. (2) Fungují jako přenašeče signálů z vnějšího prostředí do rostliny.

**Fytohormony** bývají také označovány jako **růstové látky** nebo jako **růstové regulátory**, ačkoliv jejich působení se nemusí týkat jen regulace růstu a vývoje, nýbrž i jiných procesů. Fytohormony jsou látky přírodní (nativní). Růstové regulátory zahrnují růstově účinné látky přírodní i jejich umělé (syntetické) – strukturální analoga.

**Produkce fytohormonů** není vázána na nějaký zvláštní orgán, který by byl analogický živočišným orgánům s vnitřní sekrecí. Může probíhat v různých pletivech různých orgánů, ovšem různě rychle. Často jsou buňky určitého pletiva nebo orgánu podníceny k syntéze fytohormonu teprve nějakým faktorem vnějšího prostředí.

**Regulace hladiny fytohormonů:** Fytohormony podléhají rychlé metabolické inaktivaci prostřednictvím konjugace (např. glykosylace) nebo oxidace (např. působením cytokinin oxidasy). Tím je zabráněno tomu, aby se hromadily v aktivní formě v místě působení. Jejich účinná koncentrace může být regulována prostřednictvím jejich biosyntézy, inaktivace, degradace a transportu.

**Účinné koncentrace fytohormonů:** Fytohormony jsou v rostlinných buňkách přítomny ve velmi nízkých koncentracích ( $10^{-6}$ – $10^{-9}$  M i nižších) a při nich také působí. Jiné fyziologicky účinné látky, např. cukry a další nutriční faktory, působí teprve v koncentracích tisíckrát až milionkrát vyšších.

**Zvláštnosti působení:** Fytohormony jsou ve srovnání s živočišnými hormony méně specifické, mohou působit pleiotropně, ve více směrech. Týž fytohormon může vyvolávat kvalitativně rozdílné účinky nejen v různých pletivech, ale v závislosti na koncentraci i ve stejném pletivu. Fytohormony působí obvykle společně – synergicky nebo antagonisticky. Některé jejich účinky se projevují již po několika minutách od začátku působení (aplikace), jiné až po hodinách, dnech nebo dokonce týdnech.

**Transport:** V rostlinách jsou fytohormony transportovány různými cestami: vodivými drahami nebo z buňky do buňky. Jejich transport je přísně regulován.

**Mechanismus působení:** Fytohormony působí jako regulační signály. Nejprve se vážou na receptor lokalizovaný v plasmalemě nebo v cytoplasmě a jejich signál je přenesen do cílového místa, buď v jádře, kde vyvolává změnu v expresi určitých genů, nebo v buněčných membránách, kde vyvolává změnu transmembránového transportu (viz mechanismus působení jednotlivých fytohormonů).

**Fyziologická účinnost fytohormonů** závisí na koncentraci jejich aktivních forem a na citlivosti buněk. Koncentrace aktivních forem fytohormonů v buňce je regulována různými způsoby, zejména prostřednictvím jejich syntézy a rozkladu a chemickými modifikacemi, např. navázáním molekuly cukru. Citlivost buněk vůči fytohormonu závisí na:

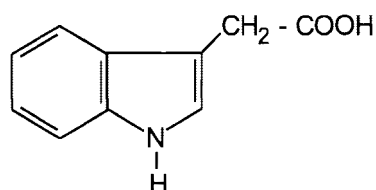
- počtu molekul receptoru
- afinitě receptoru k fytohormonu
- účinnosti přenosu signálu z komplexu hormon–receptor k cílovému místu.

### Klasifikace fytohormonů

Existuje 5 základních typů fytohormonů a několik skupin látek s regulační aktivitou, které jsou fytohormonům podobné, ale jejichž působení je méně obecné nebo se projevuje až při vyšších koncentracích. Základními fytohormony jsou: **auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová a ethylen**. Mezi látky podobné fytohormonům patří: **brassinosteroidy, jasmonáty, polyaminy, oligosachariny, některé fenolické sloučeniny, peptidový regulátor systemin příp. další nově objevované regulační peptidy** (např. Wuschel, viz Ontogeneze).

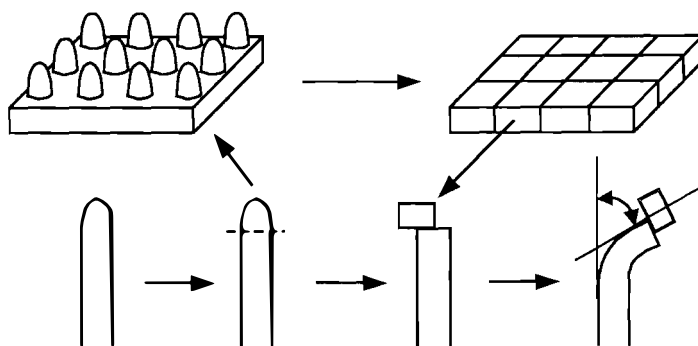
#### 11.3.1 Auxiny

Hlavním auxinem a prvním známým fytohormonem je **kyselina indol-3-octová (IAA)**, neboli „auxin“. Jako růstový stimulátor ji identifikoval holandský chemik Kögl (nositel Nobelovy ceny) se spolupracovníky v r. 1934 poté, co ji izolovali z lidské moči. (Jako chemická sloučenina byla ale popsána již 50 let před tím, když byla izolována z fermentační směsi.) V roce 1946 byla poprvé zjištěna v rostlinném materiálu.



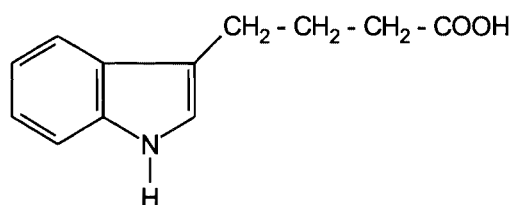
kyselina indol-3-octová (IAA)

Chemickou identifikaci auxinu předcházela řada pozoruhodných biologických pokusů, které v devatenáctém století započal již Charles Darwin. Pokus, který jednoznačně prokázal existenci transportovatelného a extrahovatelného hormonálního faktoru, provedl holandský botanik Went v r. 1926. Koleoptilím ovsu odřízl vrcholky a ty přenesl na agarovou plotnu. Po určité době plotnu rozřezal na bločky, které jednostranně umístil na řezné ploše koleoptilových pahýlů. V důsledku jednostranné stimulace auxinem, který difundoval z agarových bločků do pletiva, se koleoptile ohnuly. Úhel ohybu bylo možné měřit a z jeho velikosti usuzovat na množství účinného faktoru (**obr. 96**).

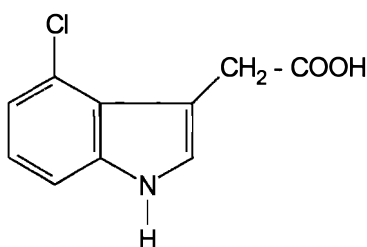


**Obr. 96.** Pokus Wenta (1926): Vrcholy ovsových koleoptilů byly přeneseny (ihned po odříznutí) na agarovou plotnu. Ta byla po určité době rozřezána na bločky, které byly asymetricky umístěny na řezné ploše dekapitovaných koleoptilů.

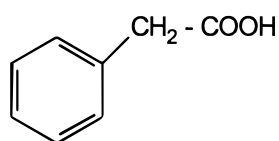
V rostlinách byly zjištěny i další látky auxinového typu, především **kyselina indol-3-máselná (IBA)**, **kyselina 4-chlorindol-3-octová (4-Cl-IAA)** a méně aktivní **kyselina fenylactová** (přítomná jen v některých druzích rostlin).



kyselina indol-3-máselná (IBA)



kyselina 4-chlorindol-3-octová  
(4-Cl-IAA)



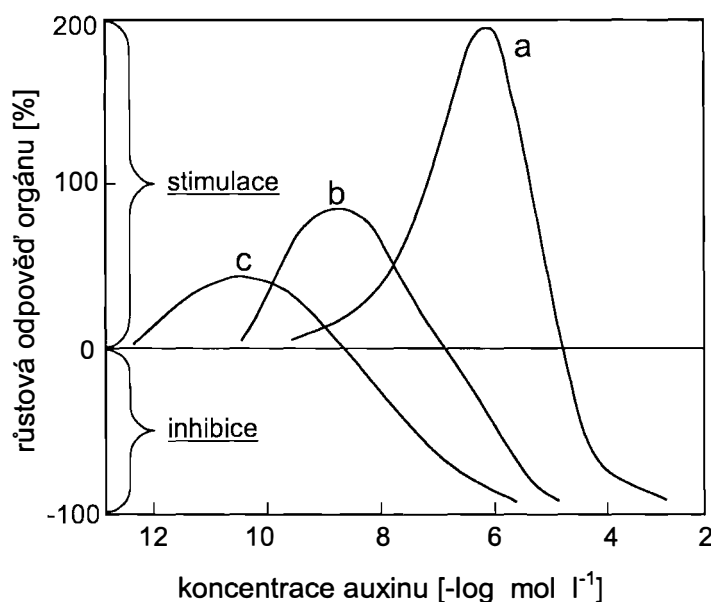
kyselina fenylactová

**Tvorba a transport:** IAA se tvoří hlavně v mladých apikálních pletivech, odkud je transportována do celé rostliny. Její syntéza vychází od indol-3-glycerolfosfátu a probíhá buď tzv. dráhou nezávislou na tryptofanu nebo (často za stresových podmínek) přes aminokyselinu tryptofan. Na dlouhou vzdálenost je IAA transportována vodivými pletivy, především floemem. Mimo to, z buňky do buňky, např. v parenchymu, probíhá tzv. polární transport auxinu – jak na krátkou vzdálenost, tak i na reaktivně dlouhou vzdálenost. Tento transport probíhá v nadzemních částech rostliny bazipetálně (od vrcholu k bazi) i radiálně, v kořenech bazipetálně, akropetálně i radiálně. Polarita transportu auxinu je dána asymetrickou lokalizací jeho plasmalemových přenašečů v buňce (influx a efflux carriers – viz dále). Polární transport IAA je aktivní proces vyžadující energii a je jedním z hlavních faktorů fyziologické polarity rostlin (viz 10.1.14). Do buňky IAA vstupuje buď pasivní difuzí jako nedisociovaná molekula nebo prostřednictvím přenašeče – jako aniont. Z buňky je transportována jako aniont.

Aktivní transport IAA z buňky do buňky u *Arabidopsis* je spojen s funkcí genu AUX1, který koduje vtokový membránový přenašeč (angl. influx carrier). U *Arabidopsis* byla molekulárně charakterizována také celá rodina výtokových přenašečů (angl. efflux carrier). První člen této skupiny genů byl naklonován jako lokus postižený mutací u mutantů *pin1*, které v nejsilnější fenotypové verzi netvoří na stonku květenství. Srovnání sekvencí genů PIN se známými sekvencemi ukázalo jejich podobnost s bakteriálními membránovými přenašeči. Tyto přenašeče zajišťují polární transport auxinu svou polární lokalizací jen do bazálních nebo apikálních nebo bočních domén plasmalemy (v závislosti na typu pletiva a interakci s prostředím). Např. po změně polohy kořene (tj. gravitropické stimulaci), dochází k jejich redistribuci (závislé na aktinovém cytoskeletu) do nové domény plasmalemy a tak ke změně polarity transportu IAA, která ústí do změny prodlužování buněk a ohybu kořene (viz Pohyby rostlin).

**Fyziologické účinky:** Auxin reguluje mnoho růstových a vývojových procesů: **1)** Stimuluje buněčné dělení, dlouhivý růst a buněčnou diferenciaci. Ve všech těchto procesech působí v interakci s cytokininy (viz také Regulace vývoj. procesů v kulturách izolovaných buněk, pletiv a orgánů). **2)** Na orgánové úrovni stimuluje tvorbu adventivních kořenů (např. při zakořeňování rostlinných řízků), působí v apikální dominanci, v tropismech, v procesech vedoucích k opadávání listů, květů a plodů a v mnoha dalších. **3)** Polárně distribuovaný auxin je jedním z dominantních morfogenu – zdrojů poziční informace buňkám (viz kap.) a tím jedním z hlavních faktorů celistvosti rostliny.

**Mechanismus působení:** Auxin po interakci s dosud neznámými receptory či sensory (ABP1 – auxin binding protein, Aux1, Pin1 ?) aktivuje ubikvitinační komplex (viz slovníček), který váže ubikvitin k transkripčním represorům Aux/IAA. Tyto represory se tak stávají substrátem proteolytického enzymového komplexu (proteasomu) a jsou degradovány. Tím jsou uvolněny specifické cis-DNA elementy v promotorech genů (tzv. elementy AuxRe), jejichž transkripce je aktivována auxinem. Uvolněny jsou pro transkripční aktivátory Arf (auxin responsive factor – nezaměňovat s ARF GTPasami) mezi něž patří také bílkovina kódovaná genem MONOPTEROS (viz Ontogeneze). Další přenos signálu směřuje např. k indukci buněčného dělení nebo k aktivaci *de novo* syntézy plasmalemové H<sup>+</sup>-ATPasy a k okyselení buněčné stěny, což má za následek snížení jejího pH a destabilizaci vodíkových můstků spojujících řetězce polysacharidů (viz Buněčná stěna).



**Obr. 97.** Vliv exogenního auxinu na růst rostlinných orgánů v závislosti na jeho koncentraci. a – stonky, b – pupeny, c – kořeny.

**Odeznění auxinové odpovědi** má charakter negativní zpětné vazby. V buňce je zajištěno mj. tím, že genová exprese samotných Aux/IAA represorů je stimulována aktivátory ARF (v promotorech totiž obsahují AuxRe elementy). Aux/IAA bílkoviny degradované v odpovědi na auxinový signál jsou resyntetizovány a reprimují opět elementy AuxRe čímž zastavují auxinovou odpověď.

**Citlivost:** Různé rostlinné orgány jsou vůči auxinu různě citlivé. Např. růst kořenů stimuluje auxin při koncentraci 10 000 krát nižší než růst stonků (**obr. 97**).

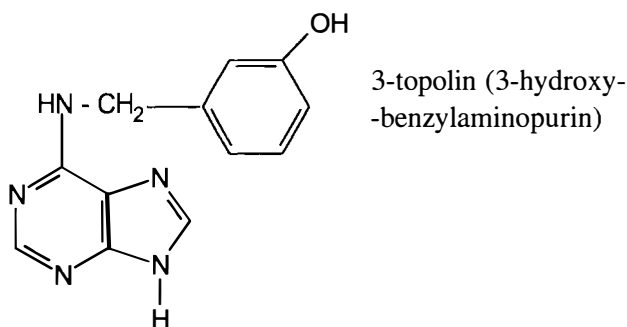
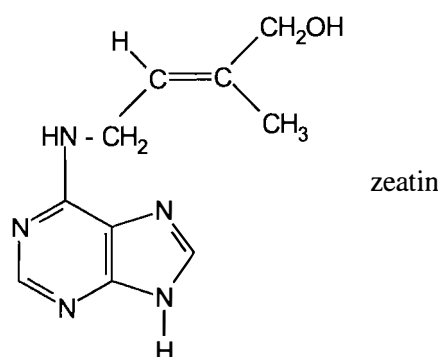
**Praktické uplatnění:** V praxi se častěji používají auxiny syntetické než IAA, neboť jsou chemicky stálější. Jsou to zejména **kyselina  $\alpha$ -naftyloctová (NAA)** a **kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D)**. Oba tyto regulátory se přidávají do živných médií při kultivaci některých rostlinných buněk a pletiv *in vitro*. 2,4-D se při vyšších koncentracích používala také jako herbicid k hubení dvouděložných plevelů. NAA a IBA slouží jako stimulanty zakořeňování rostlinných řízků.

### 11.3.2 Cytokiny

První cytokinin, nazvaný **kinetin** (furfurylaminopurin), byl izolován v 50. letech z DNA sledího spermatu (částečně rozložené autoklávováním) v laboratoři F. Skooga v USA. V rostlinách se volně nevyskytuje, vyrábí se synteticky. První přirozený cytokinin **zeatin** byl později izolován z nezralého endospermu kukuřice (*Zea mays*). V současné době známe více než 30 přirozených cytokininů. Jsou to látky odvozené od adeninu (neboli aminopurinu) substituovaného na aminoskupině v poloze 6. Substituenty mohou být:

A – isopentenyl nebo hydroxyisopentenyl (u zeatinu)

B – benzyl, nesoucí v poloze 2 nebo 3 hydroxylovou skupinu. Podle výskytu v topolu byly nazvány topoliny. Jsou to aromatické cytokiny. Neaktivnější z nich je **3-topolin**.



**Tvorba a transport:** Cytokiny jsou syntetizovány v intenzivně rostoucích částech rostliny, zvláště v meristemech rostoucích kořenů. Prvním krokem v syntéze cytokininů je isopentenylace ADP či ATP katalyzovaná isopentenyltransferasou (IPT). Výsledný produkt je modifikován transhydroxylací, defosforylací či deribosylací. Cytokiny jsou transportovány xylemem i floemem.

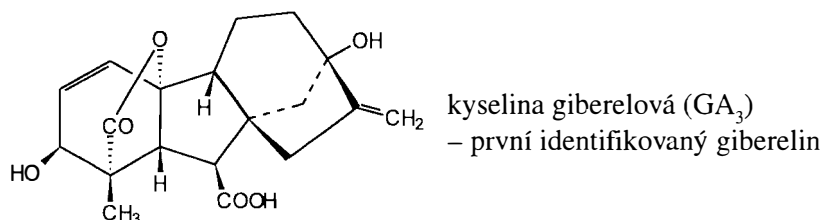
**Fyziologické účinky:** 1) Stimulace buněčného dělení (zvl. v meristemech), syntézy bílkovin, chlorofylu a škrobu. 2) Stimulace tvorby pupenů (viz Regulace vývoj. procesů v kulturách izolovaných buněk, pletiv a orgánů). 3) Zábava stárnutí (senescence) pletiv. Rostliny, u kterých byly enzymy podílející se na syntéze cytokininů exprimovány pod „senescenčním“ promotorem (tj. promotorem, který je aktivován na počátku stárnutí rostliny), zůstávaly zelené a fotosynteticky aktivní v době, kdy kontrolní rostliny již odumíraly.

**Mechanismus působení:** Receptorem cytokininu je transmembránový protein podobný mikrobiálnímu dvousložkovému histidinkinásám (viz receptory typ 2). Signální dráha zahrnuje autofosforylaci cytoplasmatické domény a přenos fosfátového zbytku na další doménu receptoru. Odtud je fosforylační signál přenesen prostřednictvím dvou bílkovin (regulátorů odpovědi) do jádra. Ty zde fosforylují transkripční faktory, které se vážou na promotory různých genů stimulovaných cytokininy (viz také Struktura a funkce rostlinné buňky).

**Praktické uplatnění:** Cytokininy jsou důležitou složkou živných medií pro kultivaci izolovaných rostlinných buněk, pletiv a orgánů. V zahradnictví slouží k indukci větvení stonků některých okrasných rostlin. V praxi se nejčastěji používají syntetické cytokininy **kinetin** a **BAP** (benzylaminopurin).

### 11.3.3 Gibereliny

Gibereliny jsou cyklické diterpeny, jejichž molekula má tzv. gibanovou strukturu. Byly objeveny ve 30. letech v Japonsku jako produkt houby *Gibberella fujikuroi*, která na rýžovištích vyvolává vyblhání a poléhání rostlin rýže. Jejich chemická povaha byla objasněna až v 50. letech na univerzitě v Cambridge v UK. Dnes známe více než 100 giberelinů, z nichž ale jen některé jsou fyziologicky účinné, ostatní jsou metabolickými meziprodukty. Označují se zkratkou GA s indexem 1 až n.

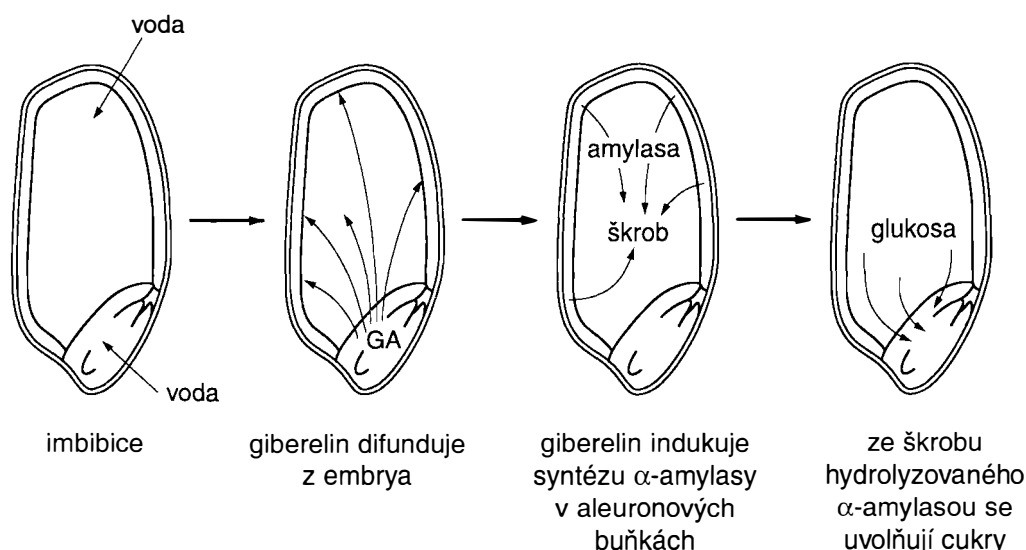


**Tvorba a transport:** Gibereliny jsou syntetizovány v terpenoidním metabolismu hlavně v rostoucích pletivech. Transportovány jsou převážně floemem, ale i xylemem.

**Fyziologické účinky giberelinů:** 1) Stimulují dlouhivý růst buněk v nadzemních orgánech. 2) Stimulují klíčení semen (**obr. 98**). Tento účinek byl podrobně studován na obilkách ječmene. V jejich embryu se při vhodné teplotě a vlhkosti syntetizují gibereliny, které odtud difundují do aleuronových buněk. Tam vyvolávají syntézu amylas a dalších hydrolytických enzymů, které štěpí zásobní látky v endospermu. Produkty této hydrolýzy slouží jako živiny pro vyvíjející se embryo (viz také Klíčení semen). 3) Gibereliny vyvolávají kvetení některých dlouhodobých rostlin (těch, které ve vegetativním stavu vytvářejí listovou růžici). 4) Ovlivňují pohlaví květů: Jejich aplikace zvyšuje u mnoha rostlin tvorbu samčích květů a silně potlačuje tvorbu květů samičích.

Gen, který významně přispěl ke zvýšení výnosů obilnin zkrácením stébla (zvětšenou odolností proti poléhání), kóduje N-acetylglukosamin-O-glukosyltransferasu. Ta se podílí na posttranslační O-glukosylaci bílkovin a snižuje citlivost rostlinných pletiv ke giberelinům.





**Obr. 98.** Vliv giberelinu na klíčení semene (obilka ječmene).

**Mechanismus působení:** Signální dráha giberelinu, indukujícího  $\alpha$ -amylasu v aleuronových buňkách ječmene, zahrnuje cGMP, vápenaté ionty, proteinkinasy typu MAPK a bílkovinný faktor stimulující gen pro  $\alpha$ -amylasu.

**Praktické uplatnění:** Gibereliny mohou zvýšit produkci sladu tím, že stimulují tvorbu  $\alpha$ -amylasy. U ovocných stromů může postřik roztokem giberelinů zvýšit násadu plodů a u vinné révy může vyvolat značné zvětšení bobulí. Aplikací giberelinů na jehličnany (např. na borovici) lze o řadu let zkrátit jejich juvenilní období (tzn. uspišit kvetení). Inhibitory syntézy giberelinů, tzv. retardanty, se používají k omezení prodlužovacího růstu některých květů a ke zkrácení stébla obilnin.

### 11.3.4 Kyselina abscisová

Kyselina abscisová (ABA) je seskviterpen (viz Sekundární látky). Izolována a identifikována byla v první polovině šedesátých let třemi vědeckými týmy téměř současně (v Kalifornii, na Novém Zélandě a v Británii). Izolována byla ze senescentních a dormantních orgánů.

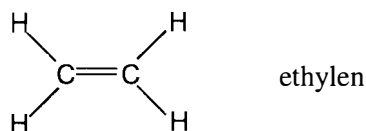
**Tvorba a transport:** ABA je syntetizována štěpením karotenoidního prekursoru zejména v mladých pletivech, ale nejvíc ji obsahují některé orgány v době sezónního odpočinku, např. dormantní pupeny, semena a hlízy. Vodní stres vyvolává její syntézu v kořenech i dalších orgánech. Transportována je xylemem a floemem.

**Fyziologické účinky:** 1) Na rozdíl od auxinů, giberelinů a cytokininů (které působí převážně stimulačně), ABA růstové procesy většinou inhibuje. 2) Urychluje opad listů, květů a plodů. 3) Vyvolává sezónní dormanci pupenů, semen a hlíz. 4) Urychluje stárnutí pletiv. 5) Vyvolává uzavření průduchů: Při nedostatku vody vzrůstá její syntéza v listech i kořenech. Z kořenů je transportována do listů, kde přechází do svěracích buněk. 6) Zvyšuje permeabilitu kořenů pro vodu.

**Mechanismus působení:** ABA působí po různých signálních drahách a vyvolává např. syntézu bílkovin vodního stresu nebo zavírání průduchů. V současnosti je nejlépe objasněno působení ABA ve svěracích buňkách průduchů (viz Rostlina a voda).

### 11.3.5 Ethylen

Ethylen je nejjednodušší uhlovodík s dvojnou vazbou a jediný plyný fytohormon. Již v roce 1901 popsal ruský fyziolog D. N. Neljubov některé účinky ethylenu (jako složky svítiplynu) na růst rostlin. Ve třicátých letech bylo prokázáno, že ethylen syntetizovaný v rostlinách je zodpovědný za zrychlené dozrávání plodů. Intenzivní výzkum ethylenu jako fytohormonu mohl začít až v šedesátých letech minulého století díky nové metodě pro jeho stanovení pomocí plynové chromatografie.



**Tvorba a transport:** Ethylen v rostlinách vzniká z aminokyseliny methioninu. Jeho bezprostředním prekursorem je **kyselina 1-aminocyklopropan-1-karboxylová (ACC)**. V buňce je jeho koncentrace nepatrná, daná jeho velmi nízkou rozpustností v cytoplasmě. Z cytoplasmy ethylen difunduje do intercelulár a odtud do atmosféry.

**Fyziologické účinky:** **1)** Prvním popsaným účinkem ethylenu na rostliny je tzv. trojná odezva (triple response). Projevuje se inhibicí dlouhivého růstu, stimulací radiálního růstu a ztrátou gravitropické reakce (např. epikotylu klíčící etiolované rostliny hrachu). Změna podélného růstu v růst radiální je spojena se změnou roviny buněčného dělení, reorientací mikrotubulů a celulosových mikrofibril. **2)** Stimuluje dozrávání některých plodů. Ve zrajících plodech se tvorba ethylenu silně zvyšuje. Ethylen je z nich uvolňován do vzduchu a zpětně působí na plody, ze kterých byl uvolněn, i na plody sousední. Autokatalyticky zesiluje vlastní syntézu. Dozrávání urychluje tím, že indukuje rozklad celulosy, pektinů a škrobu (viz Zrání plodů). **3)** Urychluje stárnutí pletiv a vyvolává opadávání listů, květů a plodů. K oddělení těchto orgánů od stonků a větví dochází působením enzymů štěpících polysacharidové složky buněčných stěn. Ethylen tvorbu těchto enzymů stimuluje. Pozoruhodné je působení ethylenu na diferenciaci kořenových vlásků (viz Ontogeneze).

**Mechanismus působení:** Receptorem ethylenu je transmembránový protein podobný mikrobiálním dvousložkovým histidinkinásám (viz Receptory typ 2, **obr. 90**). Signální dráha zahrnuje proteinkinasy typu MAPK a transkripční faktory stimulující několik různých genů.

**Praktické uplatnění.** Pomocí ethylenu může být urychleno dozrávání některých druhů ovoce. Syntetická sloučenina **ethrel**, ze které se v rostlinách uvolňuje ethylen, se používá v obilnářství jako **retardant** (brzdí růst stébel), často v kombinaci s retardantem **CCC** (chlorcholinchloridem). Ionty stříbra, rušící syntézu ethylenu, mohou prodloužit životnost řezaných květů a zlepšit regeneraci orgánů v kulturách izolovaných pletiv.

### 11.3.6 Brassinosteroidy

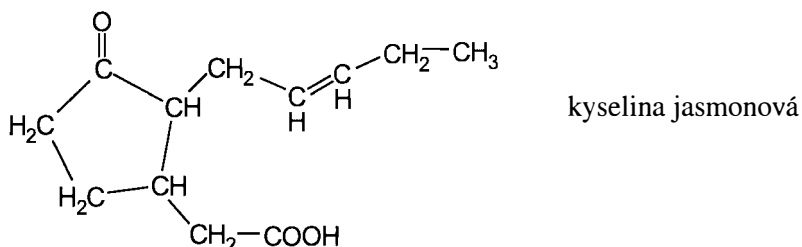
Brassinosteroidy je skupina více než třiceti fyziologicky aktivních steroidů přítomných v různých orgánech mnoha druhů rostlin (viz Sekundární metabolismus). Jen v kořenech nebyly zjištěny. Nejrozšířenější jsou **brassinolid**, **castasteron** a **typhasteron**. Syntéza brassinolidu vychází z kampesterolu, který je modifikován hydrogenací a opakovanými oxidacemi/hydroxylacemi. Mutace enzymů biosyntézy brassinosteroidů u *Arabidopsis* potvrzují, že to jsou látky pro rostliny nezbytné.

**Fyziologické účinky:** Při velmi nízkých koncentracích ( $10^{-8}$ – $10^{-10}$  M) brassinosteroidy stimulují dlouhý živý růst a významně zvyšují odolnost rostlin proti suchu a nízké teplotě.

**Mechanismus působení:** Receptorem brassinosteroidů jsou serin/threoninové kinasy (**obr. 81 a 89**).

### 11.3.7 Jasmonáty

Termínem „jasmonáty“ rozumíme **kyselinu jasmonovou** a její **methylester**. Izolovány byly z jasmínového a rozmarýnového oleje, ale obsaženy jsou v různých orgánech mnoha druhů rostlin a to v poměrně vysokých koncentracích. Působením vnějších vlivů, jako je poranění, mechanický tlak, rostlinné patogeny a osmotický stres, se jejich koncentrace zvyšuje. Biosyntéza jasmonátů vychází od kyseliny linolenové.



**Fyziologické účinky:** Kyselina jasmonová působí v několika směrech. **1)** Podobně jako kyselina abscisová inhibuje některé růstové procesy a je důležitou signální látkou chránící rostlinu před útokem patogena. **2)** Reguluje prostorově směřovaný růst úponků posedu (*Bryonia dioica*). Jestliže úponky této rostliny narazí na pevný předmět, např. stonek jiné rostliny, nastane u nich specifická ohybová reakce spojená se zvýšením hladiny kyseliny jasmonové. Externě aplikovaná kyselina jasmonová vyvolává stejnou ohybovou reakci, což svědčí o tom, že je přenašečem dotekových signálů (viz Pohyby rostlin).

**Mechanismus tvorby a působení:** Signální dráha vedoucí k tvorbě jasmonátu začíná aktivací specifických receptorů (mechanickým tlakem, působením patogenu – systeminem – viz dále, poraněním) a dále zahrnuje zvýšení aktivity fosfolipas A a D. Mechanismus působení v případě obranných reakcí zahrnuje aktivaci genů pro syntézu inhibitorů proteas a polyfenoloxidas (**obr. 99**).

### 11.3.8 Polyaminy

Polyaminy jsou jednoduché organické látky, které ve své molekule obsahují několik aminoskupin. V rostlinách se nejčastěji vyskytují polyaminy **putrescín**, **spermin** a **spermidin**. Pravděpodobně se účastní regulace buněčného cyklu. V buněčných a tkáňových kulturách stimulují somatickou embryogenezi.

### 11.3.9 Oligosachariny

Oligosachariny jsou oligosacharidy uvolněné z buněčných stěn rostliny nebo patogenní houby působením hydrolytických enzymů. Rostlina napadená houbou produkuje glukanasu a chitinasu, jejichž působením se uvolňují oligosacharidy a chito oligosacharidy z buněčné stěny houby. patogen produkuje enzymy, které rozkládají pektin ve stěně rostlinných buněk za vzniku oligo-galakturonidů. Všechny tyto oligosacharidy (oligosachariny) působí jako elicitory vyvolávající obrannou reakci napadené rostliny. Působí také jako inhibitory dlouhivého růstu.

### 11.3.10 Fenolické regulátory

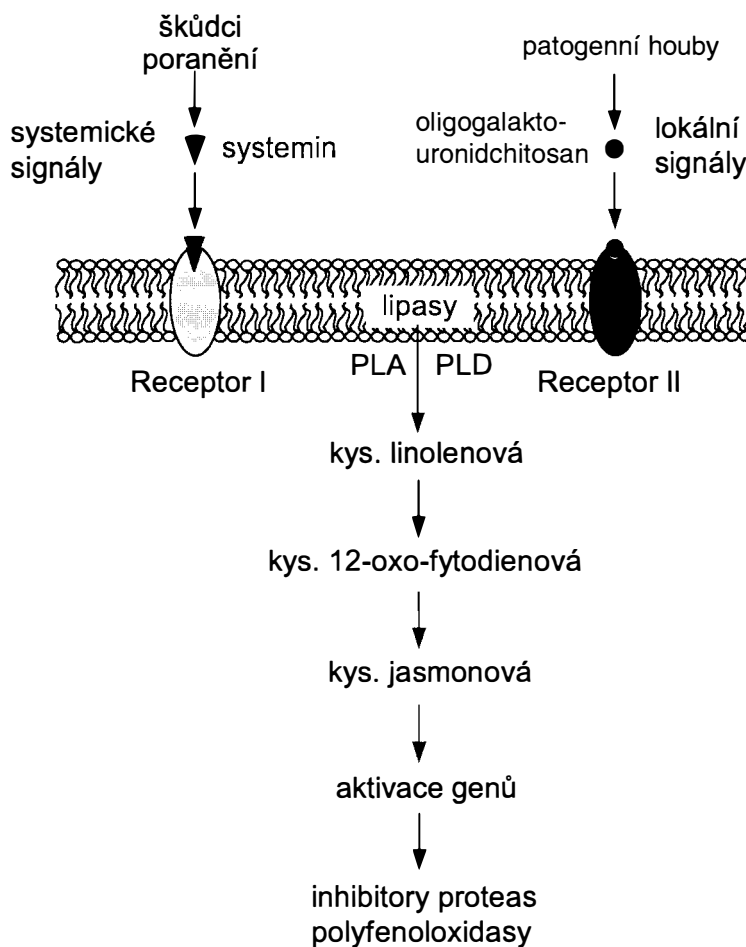
Některé fenolické sloučeniny (viz Sekundární metabolismus) působí jako **inhibitory dlouhivého růstu**. Jsou to zejména deriváty kyseliny skořicové (kyseliny *p*-kumarová, ferulová, kávová), deriváty kyseliny benzoové a některé flavonoidy.

### 11.3.11 Systemin

Důležitou součástí signální sítě živočichů jsou peptidové hormony. Také u rostlin byl objeven peptid, který funguje jako signální sloučenina. Je tvořen 18 aminokyselinami a nazývá se **systemin**. Buňky pletiva, poraněného např. housenkami nebo patogeny, jej uvolňují do apoplastu. Odtud se dostává do floemu, jehož prostřednictvím se transportuje do různých částí rostliny. V plasmalemě cílových buněk se váže na receptor a iniciuje syntézu kyseliny jasmonové (**obr. 99**). Ta vyvolává expresi genů, které kódují inhibitory proteas, jež mohou brzdit rozklad bílkovin proteasami patogena a když se dostanou do zažívacího ústrojí herbivora (např. hmyzího), brzdí tam hydrolýzu bílkovin při jejich trávení. U rostlin jsou objevovány další peptidové regulátory jako např. Clavata 3 (viz Ontogeneze).

### 11.3.12 Extrakce, identifikace a stanovení fytohormonů

Extrakce, identifikace a kvantitativní stanovení většiny fytohormonů je technicky poměrně obtížný a časově náročný úkol. Souvisí to s tím, že tyto látky jsou v rostlinných pletivech obsaženy v extrémně nízkých koncentracích. Např. koncentrace nejvíce studovaného fytohormonu – auxinu je 1–100 mg



**Obr. 99.** Vznik a přenos jasmonátového signálu jako induktoru obranných genů. Úloha fosfolipasy A (PLA) a fosfolipasy D (PLD).

v 1 kg č.h.m. Ke kvantifikaci fytohormonu v přečištěném extraktu lze použít 1) **metody fyzikálně-chemické** a **imunochemické** a 2) **biotesty**. Z fyzikálně-chemických metod to jsou především plynová a vysokoúčinná kapalinová chromatografie a hmotnostní spektrometrie. Imunochemické metody jsou založeny na specifické interakci antigen–protilátka. Protilátky specifické proti fytohormonům lze získat po imunizaci zvířete konjugátem fytohormonu s bílkovinou. **Biotesty** jsou založeny na snadno měřitelné biologické nebo biochemické reakci vyvolané působením fytohormonu, jakou je např. růst kalusu v závislosti na množství cytokininu přidaného do kultivačního media. Většinou jsou jednoduché a citlivé, avšak poměrně málo specifické. Přesto mohou být velmi užitečné.

## 11.4 Faktory nutriční

Vývojové procesy, spjaté s tvorbou buněčné hmoty, jsou závislé na nutričních faktorech, kterými jsou: **fotosyntázy, aminokyseliny, vitaminy, voda, kyslík, minerální živiny, oxid uhličitý a fotosyntetický účinné záření**. Nutriční (výživné) funkce těchto faktorů spočívají v zásobování rostliny stavebním materiálem a/nebo energií pro buněčné syntézy. Dostatek nebo nedostatek nutričních látek a zářivé energie působí hlavně na rychlost růstových a vývojových procesů, ale často i na jejich směr. Např. rostliny rostoucí při nadbytku dusíku se obvykle vyznačují bohatým olistěním a minimálním objemem kořenového systému, tedy vysokým poměrem *stonek – kořen*. Při nedostatku dusíku je tento poměr obrácený. Rostliny bramboru mají při nadměrném zásobení dusíkem silně vyvinutou nadzemní část, ale jejich hlízy jsou malé. Přechod z vegetativní do generativní fáze je u mnohých druhů ovlivňován poměrem mezi dusíkem a fosforem. Nadbytek dusíku tento přechod zpomaluje, nadbytek fosforu jej urychluje.

Některé z uvedených nutričních faktorů mají v růstových a vývojových procesech **i jiné než nutriční funkce**. To se týká zejména vápníku (viz Příjem a přenos signálů), vody (viz Rostlina a voda) a fotosyntátů (viz dále).

**Fotosyntázy**, tj. cukry (mono- a oligosacharidy) a zásobní polysacharidy (škrob a fruktany) jsou důležitými zdroji uhlíkatých metabolitů a metabolické energie. **Cukry** mají současně i centrální signální a koordinační úlohu v regulaci růstu a vývoje rostlin. V interakci s dalšími faktory (např. fytohormony) regulují mnoho genů na transkripční úrovni včetně genů pro cyklin typu D a genů pro různé oblasti metabolismu. Signálně-regulační působení cukrů (nezávislé na jejich katabolismu) bylo prokázáno pomocí nemetabolizovatelných analogů hexos a sacharosy. Přítomnost cukrů je v buňce vnímána několika různými sensory, resp. receptory. Dosud nejznámějším je **hexokinasový sensor** – hexokinasa (enzym katalyzující reakci  $\text{glukosa} + \text{P}_i \rightarrow \text{glukosa-6-P}$ ). Funkce tohoto enzymu je dvojitá: metabolická (v glykolyse) a signální. Zatímco glykolytická hexokinasa je lokalizována v cytoplasmě, signální je spojena s mitochondriemi, plastidy, Golgiho aparátem a snad i dalšími strukturami. Signální dráhy, vedoucí od sensorů cukrů k regulovaným genům zahrnují různé proteinkinasy, proteinfosfatasy, druhé posly a transkripční faktory.

**Aminokyseliny.** Při dostatku ostatních nutričních faktorů limitují některé aminokyseliny vývoj heterotrofních částí rostlin jako jsou kořeny a embrya, neboť se v nich nesyntetizují.

**Vitaminy.** Jsou to organické sloučeniny, které rostlina v malých množstvích potřebuje k tvorbě buněčné hmoty a které si některé heterotrofní orgány nebo pletiva, např. embrya a kořeny, nejsou schopny samy vytvářet. Patří k nim:

thiamin (vitamin B<sub>1</sub>)

pyridoxin (vit. B<sub>6</sub>)

kyselina nikotinová a nikotinamid

myo-inositol

Vitaminy jsou transportovány z listů a dalších zelených částí rostliny do kořenů floemem. Thiamin získávají kořeny výhradně z nadzemních orgánů, zatímco jiné vitaminy si některé kořeny syntetizují částečně samy. Důležitost vitaminů (a některých aminokyselin) pro růst a vývoj heterotrofních částí rostlin se jasně projevuje v kulturách izolovaných buněk, pletiv a orgánů.

**Kyslík** může působit jako limitní faktor vývojových procesů zvláště při své nízké koncentraci v půdě (viz Respirace a Fyziologie stresu).

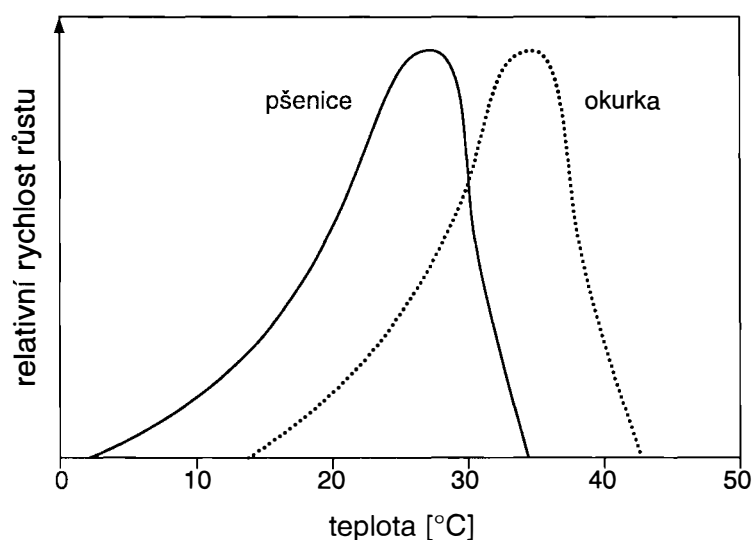
## 11.5 Teplota (také v kap. Fyziologie stresu)

Růstové a vývojové procesy rostlin jsou silně závislé na teplotě vnějšího prostředí, neboť rostliny jsou schopné regulovat teplotu svého těla jen velmi málo a jen za určitých podmínek (snižovat ji mohou transpirací a zvyšovat dýcháním). Patří mezi organismy poikilotermní. Nepřekvapuje proto, že teplota je hlavním ekologickým faktorem ovlivňujícím rozšíření rostlinných druhů na zemském povrchu a že rostliny jsou adaptovány na teploty svého přirozeného stanoviště.

Teplota ovlivňuje růstové a vývojové procesy v podstatě dvojím způsobem. **Za první** tím, že působí na jejich rychlost, podobně jako na rychlost jiných procesů. To je působení obecné, kvantitativní, růstově nespecifické. **Za druhé** tím, že vyvolává kvalitativní vývojové změny v rámci ontogeneze.

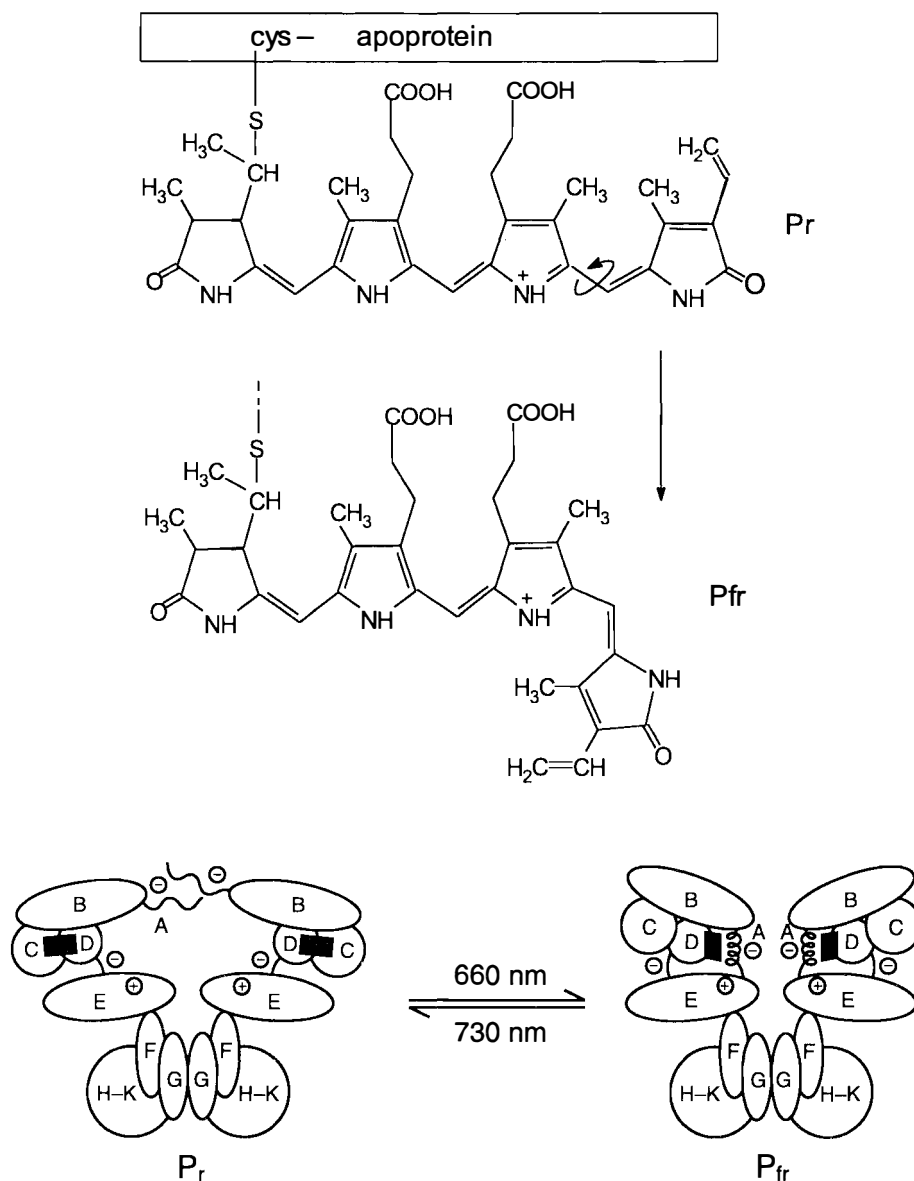
### 11.5.1 Obecný vliv teploty na rychlost růstu a vývoje

Každý druh a odrůda má pro různé etapy ontogeneze a pro určité životní podmínky (týkající se výživy a fotoperiodického režimu) **teplotní minimum**, pod kterým neroste, **teplotní optimum**, při kterém roste maximálně rychle a **teplotní maximum**, nad kterým již neroste a popřípadě odumírá. To jsou tzv. kardinální teploty. Teplotní minimum je vždy vyšší než 0 °C a maxima pro rostliny mírného pásma většinou nepřesahují 30–35 °C. Teploty nad 35 °C obvykle působí škodlivě (**obr. 100**). Rostliny jsou ke změnám teploty velmi citlivé. Při zvýšení teploty o 10 °C se rychlost růstu (za optimálních podmínek) obvykle zvýší 2–3 krát°. (Teplotní kvocient  $Q_{10}$  pro růstové procesy je 2 až 3.)



**Obr. 100.** Závislost růstu pšenice a okurky na teplotě.

**Teplotní optimum pro růst kořenů bývá nižší než pro růst stonků.** Na jaře proto kořeny začínají růst dříve než listy. Také různá pletiva téže rostliny mívají rozdílné kardinální teploty. Existují např. rozdíly v teplotních optimech pro růst svrchní a spodní strany okvětních lístků tulipánu a krokusu. Při nízkých teplotách (3–7 °C), které jsou optimální pro růst spodní strany, dochází k uzavření květů, zatímco při vyšších teplotách (10–17 °C), optimálních pro růst svrchní strany, dochází k jejich otevření. Náhlá změna teploty jen o 0,2–1,0 °C má často za následek rychlý růst a zavření nebo otevření květů, ačkoliv rozdíl mezi optimálními teplotami pro růst obou stran korunních lístků je asi 10 °C. Opakované otvírání květů po východu slunce a zavírání večer, závislé na změnách teploty, patří mezi pohyby rostlin označované jako termonastie (viz Pohyby rostlin).



**Obr. 101.** Struktura a konformační změny chromoforu (nahore) a kompletního dimeru fytochromu (dole) v závislosti na světle. Nahore je znázorněn otevřený tetrapyrrolový řetězec chromoforu, který je připojen na apoprotein sulfidickou vazbou přes cystein v blízkosti N– konce bílkoviny (domény C a D na dolním obrázku), který je hlavním nositelem konformační změny v závislosti na kvalitě červeného světla. Přechod mezi *cis*- a *trans*- formou chromoforu se přenáší na konformační změnu celého dimeru.

Rostliny bývají v přírodě často vystaveny teplotám extrémně nízkým i extrémně vysokým. Odolnost jednotlivých druhů vůči takovýmto teplotám, tj. jejich **chladuvzdornost**, **mrazuvzdornost** a **tepluvzdornost**, je velmi různá a v průběhu ontogeneze se může měnit. Značné rozdíly v toleranci vůči extrémním teplotám existují také mezi různými orgány téže rostliny, např. mezi květy, listy a pupeny (viz Fyziologie stresu).

**Při pohlavním rozmnožování** je na zvýšení teploty obecně citlivější pyl než pestíky s vajíčky. Na vrub citlivosti pylu je tak možné přičíst snížení výnosů zrna v obdobích horka, např. u kukuřice.

### 11.5.2 Teplota jako specifický regulátor vývoje

Určité teplotní režimy mohou vyvolávat kvalitativní vývojové změny: klíčení semen, přechod rostlin ze stavu vegetativního do generativního, nástup a ukončení dormance. Teplota přitom často působí společně s dalšími faktory prostředí – s ozářeností, fotoperiodou a vlhkostí (viz Ontogeneze).

## 11.6 Světlo jako faktor signální

Jedním z nejdůležitějších faktorů životního prostředí, ovlivňujícím růst a vývoj rostlin, je světlo, resp. elektromagnetické záření o vlnových délkách 320 (UV-A) – 770 nm (viz také Fotosyntéza). Růstové a vývojové procesy jsou světlem ovlivňovány prostřednictvím jeho dvou základních funkcí:

**1 – funkce nutriční** (ve fotosyntéze),

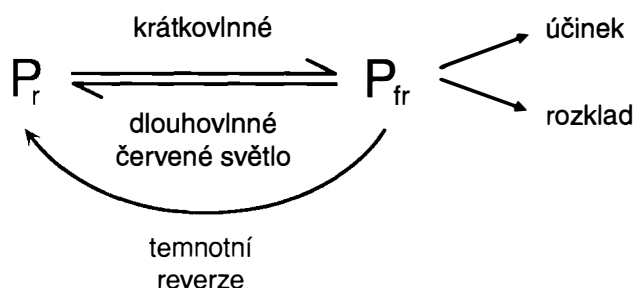
**2 – funkce signální** (ve fotoperiodismu, fotomorfogenezi a fototropismu založeném na růstu).

Fotosyntézou jsme se již zabývali a fotosyntetické asimiláty jsme klasifikovali jako jeden z hlavních faktorů limitujících růst a vývoj rostlin. Pozornost nyní zaměříme na procesy ovlivňované světlem jako faktorem signálním, resp. signálně–regulačním. Takto působí především záření červené a záření modré, v některých zvláštních případech i záření ultrafialové. (Fototropismu se budeme věnovat v kap. Pohyby rostlin.)

### 11.6.1 Signální funkce červeného světla

#### Biologické pokusy, které vedly k objevu fytochromu

K poznání signálních funkcí světla významně přispěl H.A. Borthwick se spolupracovníky na začátku padesátých let. Zjistili, že krátkovlnné červené světlo silně stimuluje klíčení semen salátu a že jeho vliv může být zrušen ozářením dlouhovlnným červeným světlem. Účinky obou druhů záření byly vzájem-



**Obr. 102.** Schéma přeměn a působení fytochromu.



ně reversibilní a výsledná odezva (klíčení, nebo neklíčení) závisela na typu posledního ozáření. (Výsledky jednoho takového pokusu uvádí **Tab. 7.**) Dále zjistili, že nejúčinnější je **krátkovlnné červené světlo (red, r, R) o vlnové délce 660 nm** a **dlouhovlnné červené světlo (far-red, fr, FR) o vlnové délce 730 nm**. Na základě svých pokusů vyslovili hypotézu, že oba druhy záření jsou absorbovány jediným fotoreceptorem, který může existovat ve dvou strukturálních konformacích schopných po působení světla o příslušné vlnové délce přecházet jedna v druhou. Nazvali jej fytochrom (phytochrome, P) a jeho formy označili jako **Pr (P660)** a **Pfr (P730)**.

**Tab. 7.** Klíčení semen salátu (cv. Grand Rapids) po ozáření krátkovlnným červeným (R) a dlouhovlnným červeným (FR) světlem. Semena byla nějakou dobu ponechána ve vodě (za tmy) a poté ozařována 5 minut jedním nebo druhým světlem (příklad experimentálních výsledků).

| světelný režim                    | % vyklíčených semen |
|-----------------------------------|---------------------|
| R                                 | 70                  |
| R / FR                            | 6                   |
| R / FR / R                        | 74                  |
| R / FR / R / FR                   | 6                   |
| R / FR / R / FR / R               | 76                  |
| R / FR / R / FR / R / FR          | 7                   |
| R / FR / R / FR / R / FR / R      | 81                  |
| R / FR / R / FR / R / FR / R / FR | 7                   |

### Izolace a identifikace fytochromu

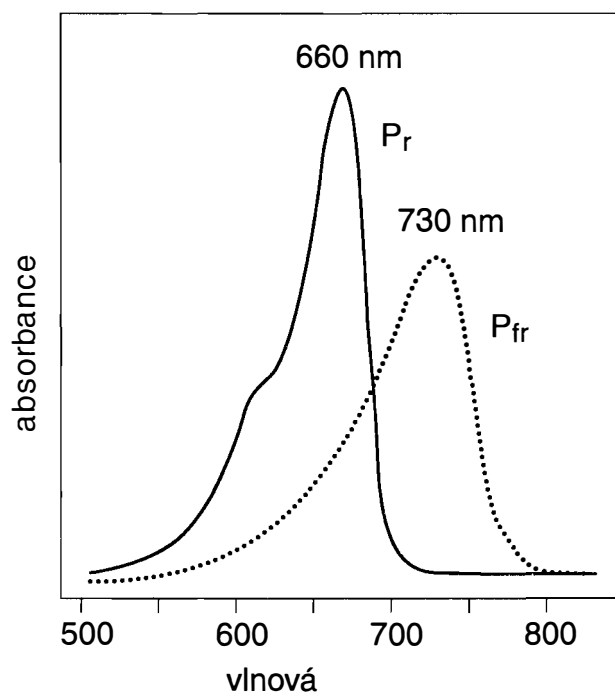
Fytochrom byl zanedlouho poté izolován a identifikován jako chromoprotein, jehož chromoforem je tetrapyrol (**obr. 101**, srovnej s tetrapyrolelem chlorofylů). Základní vazba tetrapyrolu na apoprotein vytváří fytochrom Pr, který maximálně absorbuje při asi 660 nm (R). Absorpce záření této spektrální oblasti vyvolává změnu chromoforu: dvojná vazba mezi dvěma pyrolovými kruhy se mění z konfigurace *trans* v *cis* a to způsobuje změnu konformace proteinu. Fytochrom v této nové konformaci, Pfr, maximálně absorbuje při asi 730 nm (FR). Pfr je aktivní forma fytochromu signalizující stav ozáření. Forma Pr je poměrně stálá, zatímco forma Pfr se ve tmě rychle mění zpět na Pr a zčásti se rozkládá (**obr. 102**). Absorpční spektra obou forem se částečně překrývají (**obr. 103**). Na plném slunečním světle mírně převažuje R nad FR a fytochrom je převážně ve formě Pfr.

### Biologické funkce fytochromu

Fytochrom zprostředkovává působení světla na řadu růstových a vývojových procesů, např. na klíčení některých semen, zelenání klíčících rostlin a otevírání plumulárních háčků. Účastní se adaptace listů na plné sluneční světlo nebo na stín, fotoperiodismu a seřizování cirkadiálních rytmů světlem.

### Jak dlouho musí Pfr působit, aby vyvolal biologickou reakci?

Doba, po kterou musí Pfr takto působit, může být v různých procesech různá. Může trvat několik minut až několik hodin. Během této doby proběhne reakce vyvolaná ozářením R do takového stadia, ve kterém již není světlem ovlivnitelná. U semen salátu byla tato doba stanovena pokusem, jehož výsledky jsou uvedeny v **Tab. 8**. Dlouhovlnné červené světlo, aplikované 1 h po aplikaci R, úplně zvrátilo účinek R. To znamená, že po celou tuto dobu musela být hladina Pfr udržována na vysoké úrovni, měl-li být jeho stimulační účinek maximální. Po osmi hodinách neměl již FR téměř žádný inhibiční vliv, což svědčí o tom, že procesy vedoucí ke klíčení se staly nevratnými. Mezi 1. a 8. hodinou procento klíčících semen vzrůstalo, navzdory aplikaci FR.



**Obr. 103.** Absorpční spektra fytochromů.

**Tab. 8.** Klíčení semen salátu (cv. Grand Rapids) po 5 minutovém ozáření krátkovlnným červeným zářením (R) a následném 5 min. ozáření dlouhovlnným červeným zářením (FR), které bylo od ozáření R odděleno různě dlouhými intervaly tmy.

| Způsob ozáření      | % vyklíčených semen |
|---------------------|---------------------|
| R                   | 100                 |
| R / tma 0 hod. / FR | 15                  |
| R / tma 1 hod. / FR | 15                  |
| R / tma 2 hod. / FR | 20                  |
| R / tma 4 hod. / FR | 40                  |
| R / tma 6 hod. / FR | 60                  |
| R / tma 8 hod. / FR | 80                  |

### Fytochromy A, B, C, D, E

U *Arabidopsis* bylo identifikováno 5 různých fytochromů (A-E). Fytochrom A je přítomen hlavně v etiolovaných pletivech, kde je zodpovědný za indukci fotomorfogenetických procesů vedoucích k tvorbě zelených listů. Jeho aktivní forma (Pfr) má poločas rozpadu 30–60 min. Je nevratně proteolyticky degradován poté, co reagoval s nízkomolekulární bílkovinou ubikvitinem (viz Slovníček). Fytochromy B-E mají delší životnost než fytochrom A. Účastní se světelné regulace růstových a vývojových procesů v zelených pletivech.

### Mechanismus působení fytochromů

Fytochromy jsou serinové kinasy, schopné jak autofosforylace, tak fosforylace partnerských bílkovin. Aktivní formy fytochromů působí primárně na transkripci – aktivují transkripční faktory. U rostlin ve

tmě jsou fytochromy lokalizovány v cytoplasmě. Pomocí fuze fytochromu s GFP bylo zjištěno, že **1 minutu po přijetí světelného signálu se PhyA translokuje z cytoplasmy do jádra**, kde se v interakci s transkripčními faktory přímo podílí na regulaci transkripce.

### 11.6.2 Signální funkce modrého světla

Modré světlo o vlnových délkách 380 – 450 nm se uplatňuje zejména :

1. ve fototropismech a fotonastiích (viz Pohyby rostlin),
2. při otevírání listových průduchů (viz Rostlina a voda),
3. v inhibici dlouhivého růstu stonku (viz Ontogeneze),
4. v reakci na zastínění,
5. při deetiolaci.

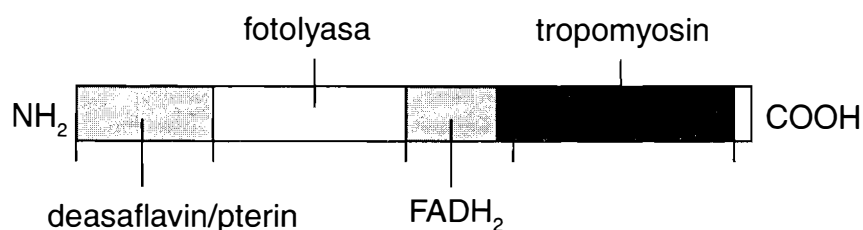
Modré světlo je absorbováno flavoproteiny **kryptochromem (obr. 104)** a **fototropinem**. Fototropin, v souladu se svým jménem, se účastní – jako membránová kinasa – fototropických reakcí (viz 14.5) a reorientace plastidů – v odpověď na změnu intenzity světla. Kryptochromy se účastní stejných morfogenických a fotoperiodických procesů jako fytochromy. Oba typy fotoreceptorů (tj. kryptochromy a fytochromy) spolu v jádře interagují a ve vzájemné souhře a v interakci s transkripčními faktory řídí genovou expresi jako reakci na světelné signály. Předpokládá se, že kryptochromy mění po přijetí světelného signálu svůj redoxní stav a konformaci.

#### Působení ultrafialového záření

Sluneční světlo dopadající na zemský povrch obsahuje ultrafialové (UV) záření, které podle vlnové délky dělíme na **UV-A** (380–320 nm), **UV-B** (320–280nm) a **UV-C** (280–200 nm). UV-složka slunečního záření může na rostliny působit **pozitivně i negativně**. Pozitivní působení se projevuje např. zesílenou syntézou flavonoidů v důsledku zvýšené aktivity hlavních enzymů jejich biosyntézy – PAL (fenylalaninamoniaklyasy) a chalkonsyntasy. V některých případech působí UV-záření v interakci s modrým zářením. Receptor UV-záření nebyl dosud identifikován. **Negativně** může UV-záření působit hlavně tím, že vyvolává změny ve struktuře DNA. Čím kratší vlnovou délku UV-záření má, tím působí škodlivěji. Změny vyvolané UV-zářením mohou být pro buňku letální.

### 11.6.3 Fotoperiodismus

Fotoperiodismus je regulace růstových a vývojových procesů délkou denního osvětlení. Doba, po kterou jsou rostliny (případně jiné organismy) vystaveny působení světla ve 24 hodinovém cyklu, se nazývá světelná perioda nebo **fotoperioda**. Určité fotoperiodě odpovídá určitá **temnotní perioda**. Jednodenní cyklus světla a tmy, resp. dne a noci, obsahující účinnou fotoperiodu, se nazývá indukční cyklus. K vyvolání fotoperiodického efektu mohou stačit jeden nebo dva cykly, obvykle jich je ale zapotřebí



**Obr. 104.** Struktura kryptochromu.

více. Fotoperioda může být dlouhá, nebo krátká. Častěji používanými termíny jsou **dlouhý den** a **krátký den**. Tyto termíny nevyjadřují absolutní délku světla v rámci 24 hodinového cyklu, ale vztahují se k časovému rozhraní, kterým je **kritická délka dne**. Je-li např. kritická délka dne 15 h jsou fotoperiody kratší než 15 h považovány za krátký den, delší než 15 h za dlouhý den. Krátkodenní typ odpovědi je reakce na fotoperiodu kratší než kritická délka, dlouhodenní reakce je navozena fotoperiodou delší než kritická délka (viz Fotoperiodická indukce kvetení). Ve fotoperiodismu je často rozhodující délka noci. Proto se používají i termíny dlouhá noc, krátká noc a kritická délka noci (viz Ontogeneze).

### Objevitelé fotoperiodismu

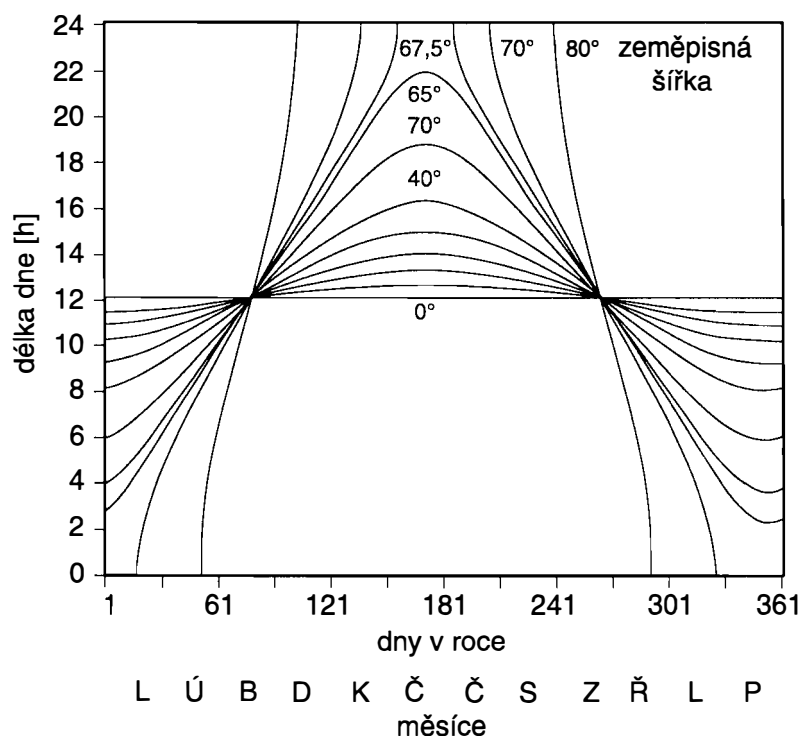
V r. 1910 pozoroval francouzský biolog J. Tournois, že rostliny chmele a konopí pěstované v zimním období ve skleníku a vystavené světlu pouhých asi 6 h denně vykvétaly velmi brzy, přestože jejich růst byl velmi pomalý. Termín fotoperiodismus zavedli američtí rostlinní fyziologové W.W. Garner a H.A. Allard, kteří v r. 1920 ukázali, že přechod mnohých rostlin z vegetativního stavu ke kvetení závisí na fotoperiodickém režimu. Fotoperiodismus se brzy poté stal předmětem výzkumu i v dalších oborech, zejména zoologických, a nyní je jedním ze základních principů biologie.

### Fotoperiodismus se netýká jen kvetení

Fotoperiodismus se může týkat také procesů vegetativních, jakými jsou růst prýtů do délky, velikost a tvar listů, charakter větvení, tvorba vegetativních rozmnožovacích a zásobních orgánů (cibulí a hlíz), odnožování, opad listů a dormance pupenů.

### Ekofyziologický význam fotoperiodismu

Fotoperiodismus je ekologickou adaptací organismů umožňující jim optimálně využít příznivé období roku a přežít nepříznivé období (tj. období zimy nebo sucha). V přírodě je nejspolehlivějším indikáto-

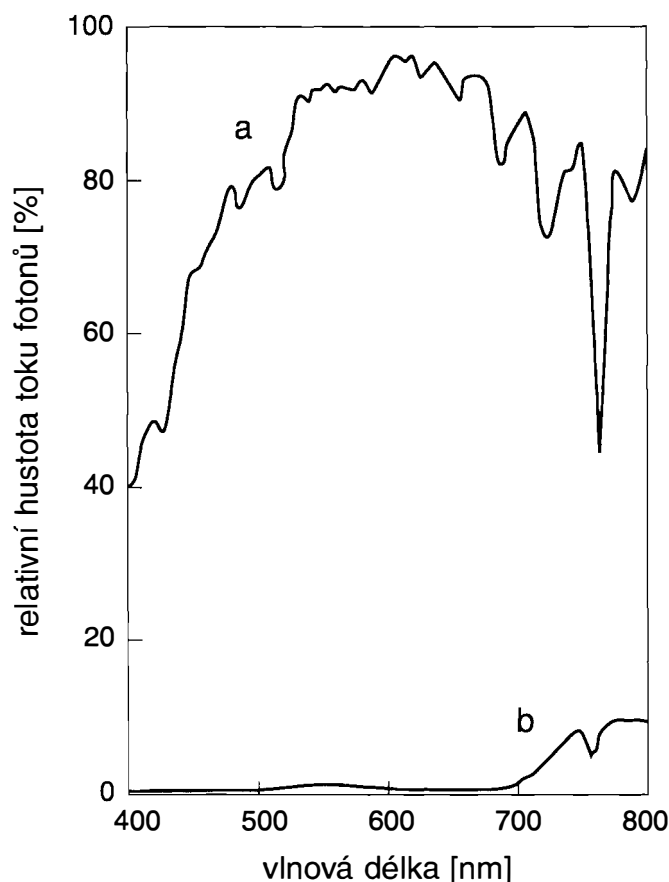


**Obr. 105.** Délka dne jako funkce roční doby v různých zeměpisných šířkách severní polokoule.

rem ročního období pravidelně se mění délka dne. Signalizuje nástup období pro život příznivého nebo naopak nepříznivého. Se stoupající zeměpisnou šířkou jsou rozdíly mezi délkou dne a noci výraznější a rychlost změny těchto rozdílů větší. Nejpomaleji se poměr mezi délkou dne a noci mění uprostřed léta a zimy, nejrychleji na podzim a na jaře (**obr. 105**). Některé rostliny kvetou zjara, kdy se dny prodlužují, jiné kvetou na podzim, kdy se dny zkracují. Donedávna se předpokládalo, že rostliny jsou schopny rozpoznat, zda se dny prodlužují (a je jaro) nebo zkracují (a je podzim). To se však pokusně nepotvrdilo. Rostliny potřebují k rozlišení jara a podzimu kromě délky dne ještě jeden další znak prostředí, např. teplotu nebo dešťové srážky. Existuje proto mnoho různých ekologických adaptací rostlin, ve kterých je důležitý fotoperiodismus. Např. u některých rostlinných druhů se květní primordia zakládají na podzim, když se délka dne zmenší na kritickou hodnotu. Další jejich vývoj je zastaven nízkou zimní teplotou a pokračuje teprve zjara, když se teplota zvýší.

### Jak rostliny vnímají délku dne a noci?

Reakce rostlin na délku dne, resp. na délku noci, svědčí o tom, že mají schopnost délku těchto časových period vnímat. Ale jak? Odpověď poskytly pokusy s fotoperiodickou regulací kvetení, ve kterých byla temnotní perioda (noc) přerušena krátkým ozářením listů krátkovlnným červeným světlem a zjištění, že účinek takového přerušování temnotní periody byl zvrácen ozářením dlouhovlnným červeným světlem. Z toho bylo možné vyvodit, že fotoreceptorem, který vnímá délku fotoperiody, je fytochrom (viz také Regulace kvetení). Pokusy dále ukázaly, že účinek přerušování temnotní periody do značné míry závisel na tom, ve které její části došlo k přerušování. To vedlo k představě, že měření času fytochromovým systémem se účastní biologické hodiny s cirkadiálním (24 hodinovým) rytmem. Biologické hodi-



**Obr. 106.** Spektrální složení slunečního světla nefiltrovaného (a) a filtrovaného listovým pokryvem (b).

ny pravděpodobně regulují citlivost buněk vůči Pfr. Předpokládáme, že v určité fázi endogenního rytmu vymezují dobu potřebnou k tomu, aby aktivní forma fytochromu vyvolala fotoperiodický účinek (viz Biorytmy).

#### 11.6.4 Fotomorfogeneze

Fotomorfogenezi rozumíme vývojové procesy vyvolané signálně–regulačním působením světla, závislým spíše na jeho kvalitě a intenzitě než na fotoperiodě. Kromě níže zmíněných procesů patří do fotomorfogeneze i světlem vyvolaný dorziventrální charakter (rozlišení svrchní a spodní strany) listů a jejich tvar, větvení stonku a mnohé další.

##### Klíčení semen závislé na světle

Klíčení některých druhů semen, např. salátu, je silně stimulováno krátkovlnným červeným světlem a inhibováno dlouhovlnným červeným světlem. V obou případech je receptorem záření fytochrom (viz také Ontogeneze).

##### Morfogenetické reakce na zastínění listovým pokryvem

Rostliny, které jsou zastíněny listovým pokryvem, absorbují méně zářivé energie než rostliny nezastíněné a navíc, sluneční záření, které na ně dopadá, má spektrální složení jiné než záření normální, nefiltrované. Chlorofyl je velmi účinným světelným filtrem (**obr.106**). Záření, které prošlo listovým pokryvem obsahuje převážně dlouhovlnnou červenou složku a na růst některých rostlin působí stimulačně. Rostliny se v hustém zápoji vyhýbají stínu – soutěží o světlo. Receptorem aktivním v této souvislosti je především fytochrom B. Podle reakce na zastínění můžeme rozlišovat (1) rostliny světlomilné a (2) rostliny stínomilné.

- (1) **Rostliny světlomilné:** Většina našich planě rostoucích bylin, kulturní trávy, brambor a další rostliny. Jejich růst je stimulován dlouhovlnným červeným zářením, které je absorbováno fytochromem.
- (2) **Rostliny stínomilné, nebo stín tolerantní:** Mezi ně patří lesní rostliny přízemního patra, např. *Mercurialis perennis* a *Hepatica nobilis*. Pomalu rostou, mají delší vegetační periodu, vysokou účinnost fotosyntézy i při nižších ozářeních a velkou listovou plochu. Tyto rostliny nemají možnost proniknout pokryvem stromů a na dlouhovlnné červené záření nereagují.

##### Morfogenetické reakce rostlin vyvolané vysokou ozářeností

Vysoká ozářenost ovlivňuje charakter listů i habitus celé rostliny. Při vysoké ozářenosti jsou listy obvykle menší a silnější než při nízké ozářenosti. Efekty vyvolané vysokou ozářeností mohou být zprostředkovány fytochromem a (nebo) fotosyntézou a jejich rozlišení bývá nesnadné (viz také Fotosyntéza a Fyziologie stresu).

##### Etiolace

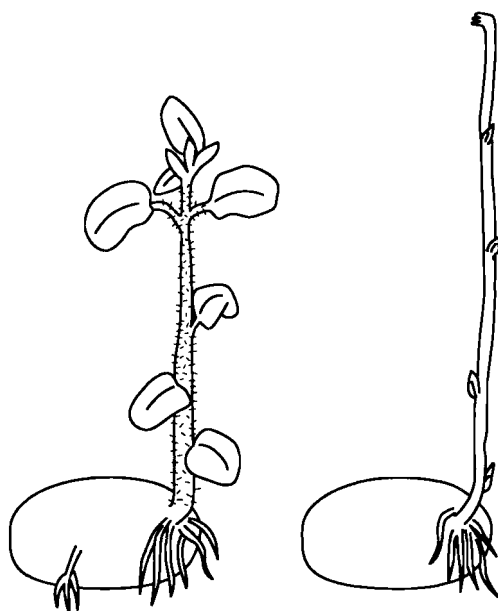
Rostliny rostoucí delší dobu v úplné tmě rostou rychleji, než kdyby rostly na světle, jsou však zažloutlé a vytáhlé. Říkáme, že jsou etiolované. Etiolace je zvláštní druh fotomorfogeneze vyvolané nepřítomností světla a označované jako **skotomorfogeneze** (skotos = řecky tma). Listové čepele etiolovaných dvouděložných jsou zakrnělé a jejich stonky jsou zakončené plumulárním nebo hypokotylovým háčkem (**obr. 107**). Listy některých jednoděložných jsou úzce protáhlé. Listová pletiva etiolovaných rostlin jsou minimálně diferencovaná a postrádají chlorofyl. Ekofyziologickým smyslem etiolace je rychlý únik z nepříznivých životních podmínek. Rostlina velmi úsporně využívá zásobních látek k pouhému prodlužování stonku (nebo listů v případě jednoděložných), a má tak možnost dostat se rychleji do příznivějších světelných podmínek. Výživa etiolované rostliny je heterotrofní. Etiolace je řízena fytochromem.

### Deetiolace a tvorba chloroplastů

Deetiolace je ozářením vyvolané zezelenání etiolované rostliny, tj. její přechod ze stavu heterotrofního do autotrofního. Tato změna je charakterizována otvíráním plumulového háčku a zpomalením dlouhého růstu. Je regulována fytochromem a receptorem modrého záření. Při zelenání etiolovaných listů se tvoří chloroplasty. Chloroplasty se normálně vyvíjejí z proplastidů, z nichž však ve tmě (v etiolovaných rostlinách) vznikají nezelené etioplasty. Ozářením vznikají z etioplastů chloroplasty. Ozáření přitom působí ve dvou směrech: Prostřednictvím fytochromu a receptoru modrého záření (přítomných v cytoplasmě) vyvolává transkripci jaderných genů, které kódují část proteinů chloroplastů. Vedle toho je absorbováno v etioplastu prekursorem chlorofylu protochlorofylidem a vyvolává jeho postupnou přeměnu v chlorofyly *a* a *b*.

### Genetická analýza fotomorfogeneze

Genetický přístup vedl k získání mutantů *Arabidopsis*, u kterých dochází k částečné deetiolaci klíčících rostlinek ve tmě, tj. bez světelného signálu. Proto se označují **det** (deetiolated) či **cop** (constitutive photomorphogenesis). Patří k nim také část tzv. **fusca** mutantů, jejichž pletiva akumulují nadměrné množství anthokyanů. Bílkovina kódovaná lokusem **COP 1** je ubikvitinligasa; ve tmě je lokalizována do jádra a po osvětlení se transportuje do cytoplasmy. Působí jako represor genové exprese fotomorfogenních genů tak, že ve tmě v jádře ubikvitinuje transkripční faktory řídící fotomorfogenezi (jako např. Hy5) a tím je předurčuje k degradaci proteasomem. Další bílkoviny z této skupiny jsou stabilně lokalizovány v jádře a jsou součástí vysokomolekulárního komplexu osmi bílkovin **COP**, nalezeného také u živočichů jako tzv. **signalosom**. Signalosom je homologní části proteasomu a jeho regulačních funkce je spojena se specifickou degradací jaderných bílkovin ve tmě navazující na ubikvitinaci působenou Cop1. Dále se COP komplex/signalosom podílí na procesech regulace genové exprese specifickou degradací regulačních bílkovin – velmi výrazně např. v reakci buněk na auxin. Klonování mutantního lokusu u mutantu **det1** ukázalo, že kóduje bílkovinu chromatinu, která se podílí na regulaci acetylace histonů. Je to jeden z mnohých případů, které ukazují na mimořádnou důležitost bílkovin regulujících dynamiku chromatinu v regulaci genové exprese u rostlin.



**Obr. 107.** Rostliny bramboru vyrostlé v přirozených světelných podmínkách (den – noc) a ve tmě.

## 11.7 Gravitace

Zemská přitažlivost, gravitace, je všudypřítomným a stále působícím faktorem ovlivňujícím růst rostlin. Pomocí zvláštních mechanismů lokalizovaných ve špičkách kořenů a vrcholcích stonků ji rostliny vnímají a na ni reagují. Mnohé kořeny rostou (nebo mají schopnost růst) ve směru gravitace, zatímco prýty rostou převážně proti směru jejího působení (viz Pohyby rostlin – gravitropismus).

## 11.8 Mechanické tlaky

Buňky jsou v rostlinném těle vystaveny mechanickým tlakům vycházejícím z okolních pletiv a orgánů i z vnějšího prostředí. Působení těchto tlaků se může projevit ve změnách růstu a morfogeneze. Mezi sensory tlakových signálů patří určitý druh kanálů pro  $\text{Ca}^{2+}$ , které se aktivují změnou mechanického pnutí membrány. Vnitrobuněčný mechanismus těchto změn zahrnuje reorganizaci periferních mikrotubulů v cytoplasmě a celulosových vláken v buněčných stěnách. Mitotické figury se uspořádávají rovnoběžně s vektorem tlaku – tzn. nové buněčné přepážky se orientují k vektoru tlaku kolmo.

## 11.9 Faktory biotické

Růst a vývoj rostlin ovlivňují také biotické faktory prostředí – tedy živé okolí. Biotickými faktory v nejširším pojetí rozumíme:

1. mikroorganismy (patogeny a symbionty)
2. živočichy (býložravce, hmyz a další)
3. rostliny (parazitické i normální v rámci allelopatie)
4. člověka

V této kapitole se zmíníme jen o bakterii *Agrobacterium tumefaciens*, jejíž přítomnost v rostlinách se projevuje tvorbou stonkových nádorů (crown gall). O dalších patogenech a o allelopatii je pojednáno v kap. Fyziologie stresu a o bakteriích rodu *Rhizobium*, fixujících vzdušný dusík, v kap. Minerální výživa. Živočichové a člověk ovlivňují růst a vývoj rostlin mnoha způsoby, mimo jiné jejich poraněním (viz Hojení ran).

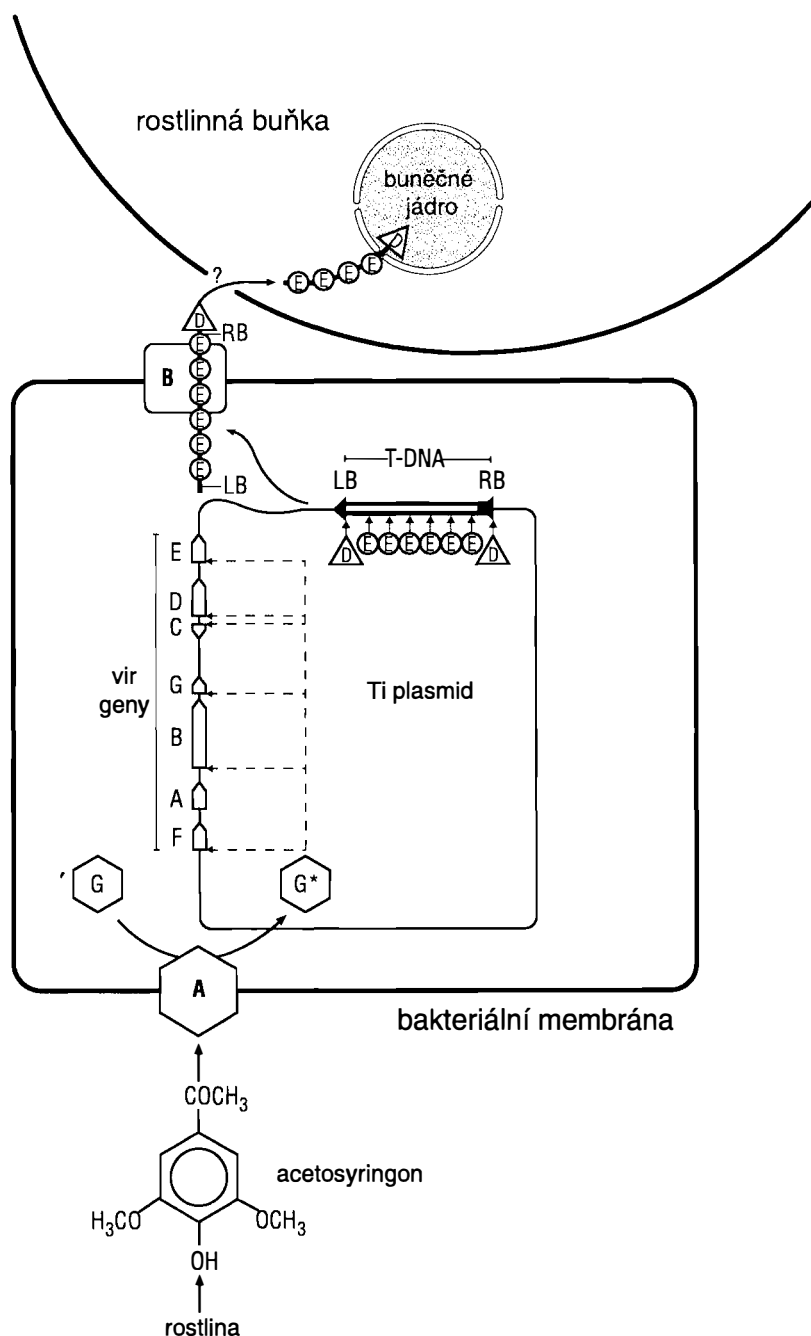
### ***Agrobacterium tumefaciens* (At) jako nástroj molekulární biologie rostlin (vektor cizorodé DNA)**

Schopnost indukovat tvorbu nádorů je u *At* spojena se schopností přenést a náhodně integrovat část bakteriálního Ti plasmidu (od tumor inducing), zvanou T-DNA, do jaderného genomu rostlin (**obr. 108**). Tento úsek DNA pak zajišťuje expresi bílkovin (zejména enzymů biosyntézy auxinu a cytokininů), které způsobují vývojový zvrat v transformovaném pletivu – postižené buňky se začnou chaoticky dělit a produkovat zvláštní třídu aminokyselin (opinů). Bakterie pak tyto aminokyseliny využívají. Jedná se o zvláštní případ parazitismu.

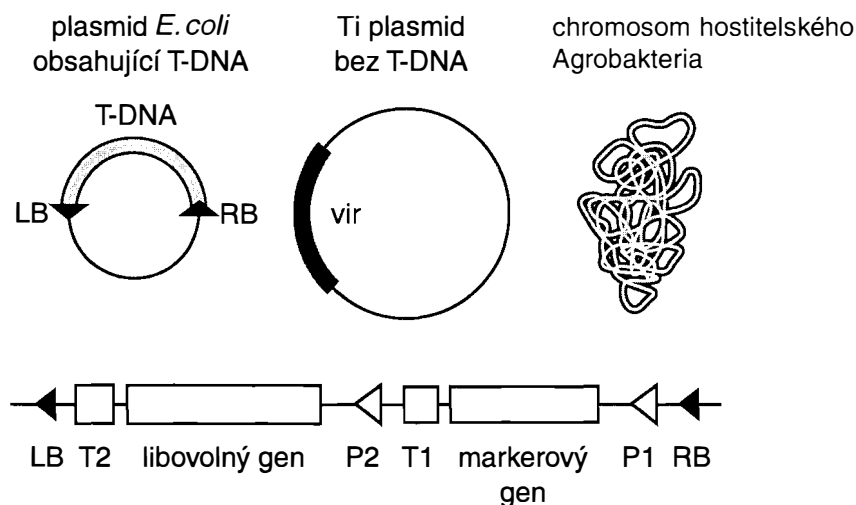
**Interakce bakterie *Agrobacterium tumefaciens* s buňkou** a přenos T-DNA z bakterie do jádra buňky jsou vzájemně dokonale koordinovány. Účastní se jich řada bílkovin, které jsou kódovány v takzvané oblasti vir Ti-plasmidu, která se nepřenáší (**obr. 108**). Infekce buněk bakterií je indukována poraněním pletiva, při kterém se uvolňují různé fenoly, které indukují expresi genů vir. T-DNA se přenáší do rostliny jako jednořetězcová DNA. Je pravděpodobné, že mechanismus přenosu DNA z buňky bakterie do rostliny je odvozen z procesu konjugace mezi bakteriálními buňkami.

**Chaotické (nádorové) dělení buněk** po transformaci T-DNA připomíná růst kalusu v tkáňových kulturách s nadbytkem auxinů a cytokininů v médiu. Analýza genů nesených T-DNA prokázala, že jsou mezi nimi geny biosyntézy těchto fytohormonů. Gen *Tmr* kóduje isopentenyltransferasu, klíčový enzym syntézy cytokininů a geny *Tms-1* a *2* kódují enzymy schopné syntetizovat IAA z tryptofanu.

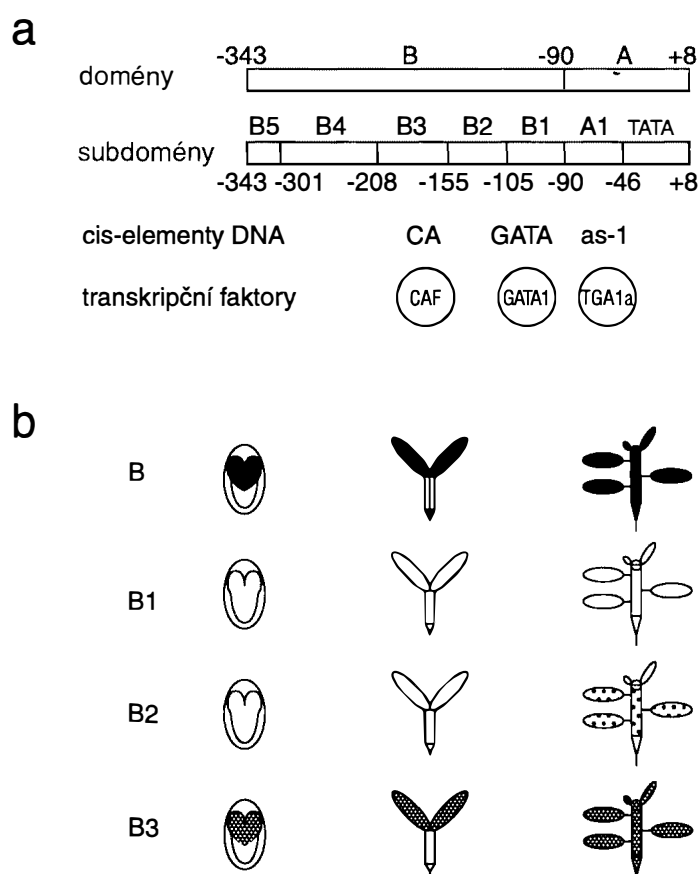




**Obr. 108.** Přenos T-DNA z Ti plasmidu agrobacteria do rostlinné buňky – funkce *vir* genů. Interakce mezi bakteriemi a rostlinou je iniciována řadou flavonoidů (zde acetosyringon), které rostlina vylučuje do svého okolí a které se vážou na membránovou bílkovinu bakterie kódovanou genem *virA* (bílkovina A). Takto aktivovaný receptor fosforyluje bílkovinu VirG, která aktivuje expresi ostatních *vir* genů a také svou vlastní. Bílkovina VirD2 je endonukleasa, která štěpí specificky v místě levé a pravé hranice T-DNA (LB a RB – přímá opakování 25pb) a zůstává napojena na 5' konec minus vlákna DNA u pravé hranice T-DNA. VirE2 je bílkovina vážící jednořetězcovou DNA a tak uvolňuje a stabilizuje jednořetězcový DNA fragment, který je přenášen do rostlinné buňky. Chybějící úsek v donorové DNA je dosyntetizován opravnými mechanismy DNA (DNA repair). K exportu T-DNA z bakteriální buňky slouží 11 bílkovin kódovaných v oblasti *virB*, které vytvářejí bílkovinný translokační komplex, který umožňuje přenos komplexu T-DNA přes membránu. Vzhledem k tomu, že jak VirD2 tak VirE2 bílkoviny mají eukaryotický jaderný lokalizační signál, je komplex T-DNA transportován do jádra rostlinné buňky. Integrace T-DNA do jaderného genomu probíhá mechanismem nelegitimní rekombinace, který je řízen jadernými bílkovinami hostitelské buňky. Vzhledem k tomu, že T-DNA se nejprve váže na cílové místo (jednořetězcový zlom) v jaderném genomu přes D2 bílkovinu, je pravá hranice T-DNA po integraci zpravidla zachována lépe, než úseky u levé hranice.



**Obr. 109.** schéma **binárního vektoru** odvozeného od Ti plasmidu, který je běžně využíván při přípravě transgenních rostlin. T-DNA je přenášený úsek Ti plasmidu ohraničený levou a pravou hranicí (LB a RB). Malý plasmid nesoucí tento úsek je schopen replikace jak v *E. coli* tak v agrobakteriích, je zbaven genů kódujících růstové regulátory a opiny, a nese místo pro klonování cizorodého genu a selekční (markerový) gen pod promotory P1 a P2, transkripce těchto genů je ukončena terminátory T1 a T2. Větší plasmid (derivát Ti plasmidu) množící se pouze v agrobakteriích nese *vir* oblast, která katalyzuje mobilizaci a přenos T-DNA z prvního menšího plasmidu.



**Obr. 110.** Mozaikovitá struktura konstitutivního virového promotoru 35S mozaiky kvěťáku (CaMV, genom dsDNA). **a)** – 35S promotor byl rozdělen na vyznačené domény DNA (A1-B5) a každá z nich byla nezávisle připojena k minimálnímu promotoru (s TATA úsekem) a řídila expresi reporterové bílkoviny (GUS). **b)** – schéma vyznačující transkripční aktivitu jednotlivých úseků promotoru v embryu, klíčící rostlince a dospělé rostlině transgenního tabáku. Konstitutivnost promotoru je zajištěna spojením řady tkáňově specifických *cis*-DNA elementů, které dohromady zajišťují expresi v celé rostlině.

### **Nástroje molekulární biologie rostlin – Ti plasmid *Agrobacteria tumefaciens* a 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (CaMV).**

Molekulární biologové používají *Agrobacterium* ke vnášení cizorodé DNA do rostlinného genomu. Aby bylo možné z transgenního pletiva regenerovat celou rostlinu, byly metodami genového inženýrství z T-DNA odstraněny všechny sekvence kódující enzymy metabolismu fytohormonů. Pro přenos a integraci T-DNA dostačují intaktní pravá a levá hranice T-DNA tvořená přímým opakováním sekvence 25 párů bazí DNA. Takto „odzbrojený“ Ti plasmid byl pak rozdělen na dvě části – na menší plasmid nesoucí T-DNA s klonovacím místem pro cizorodou DNA, který má také schopnost množit se v *E. coli*, což usnadňuje klonování. Zbytek původního plasmidu nesoucí vir oblast zůstává jako „pomocný“ plasmid v buňkách *Agrobacteria*. Jeho jedinou funkcí je řídit přenos T-DNA (**obr. 109**). **Tyto binární vektory** spolu s rozvojem různých postupů transformace způsobily revoluci v přípravě transgenních rostlin pro teoretické účely i pro zemědělskou praxi.

Hlavním promotorem využívaným k ektopické expresi cizorodých genů v rostlinách je **promotor 35S viru mozaiky kvěťáku CaMV**. Tento promotor zajišťuje konstitutivní expresi transgenu ve všech pletivech rostliny s výjimkou pylu. Tato schopnost spočívá v jeho mozaikové struktuře (**obr. 110**) – promotor obsahuje různé tkáňově specifické cis-DNA elementy, které interagují s tkáňově specifickými transkripčními faktory.