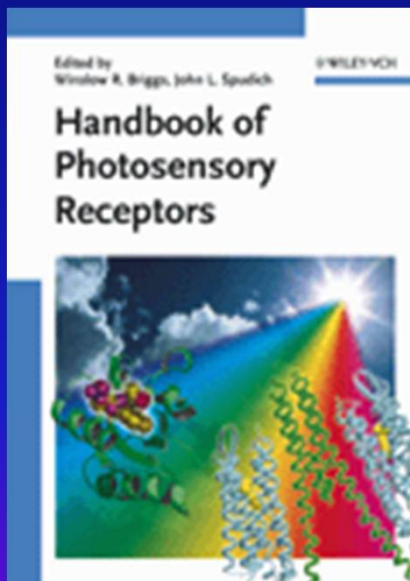


4) Reakce rostlin k modrému světlu

a) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem



Briggs WR, Spudis JL (eds) (2005)
Handbook of Photosensory
Receptors, Wiley-VCH



Schäfer E, Nagy F (eds) (2006)
Photomorphogenesis in Plants
and Bacteria, 3rd ed., Springer



Whitelam GC, Halliday KJ (eds) (2007)
Light and Plant Development
Blackwell Publishing

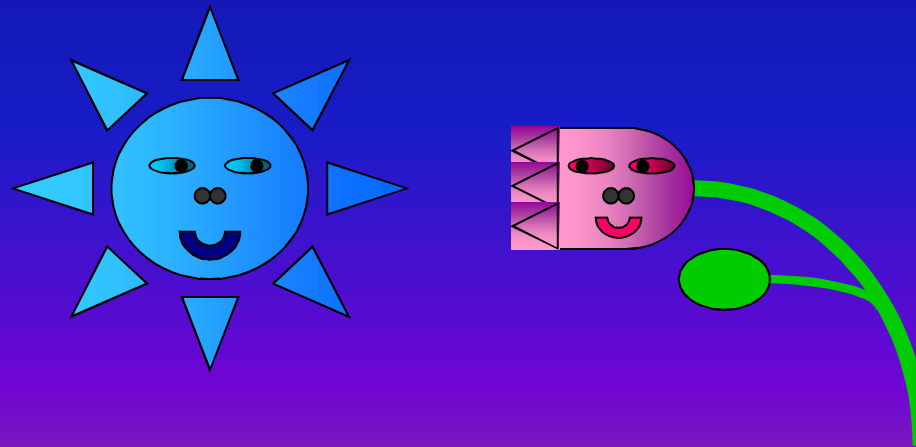
Martin Fellner

Laboratoř růstových regulátorů
PřF UP v Olomouci a ÚEB AVČR

a) Fotobiologie reakcí zprostředkovaných modrým světlem

Fotosyntéza – přijímané světlo slouží jako zdroj chemické energie

Fototropismus - světlo je přijímáno jako signál; specifická reakce k modrému světlu; růst směrem ke světlu



Reakce rostlin k modrému světlu (400 – 500 nm)

- 1) Fototropismus
- 2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu
- 3) Aktivace genové exprese
- 4) Stimulace otevírání průduchů

Stimulace syntézy chlorofylu a karotenoidů

Fototaxe

Stimulace pohybu jádra

Pohyb mitochondrií

Změna polohy listů

Heliotropická reakce květů

Stimulace plochosti listů

Reakce rychlé - sekundy (elektrické jevy na membráně)

Reakce pomalé - minuty, hodiny (stimulace biosyntézy pigmentů)

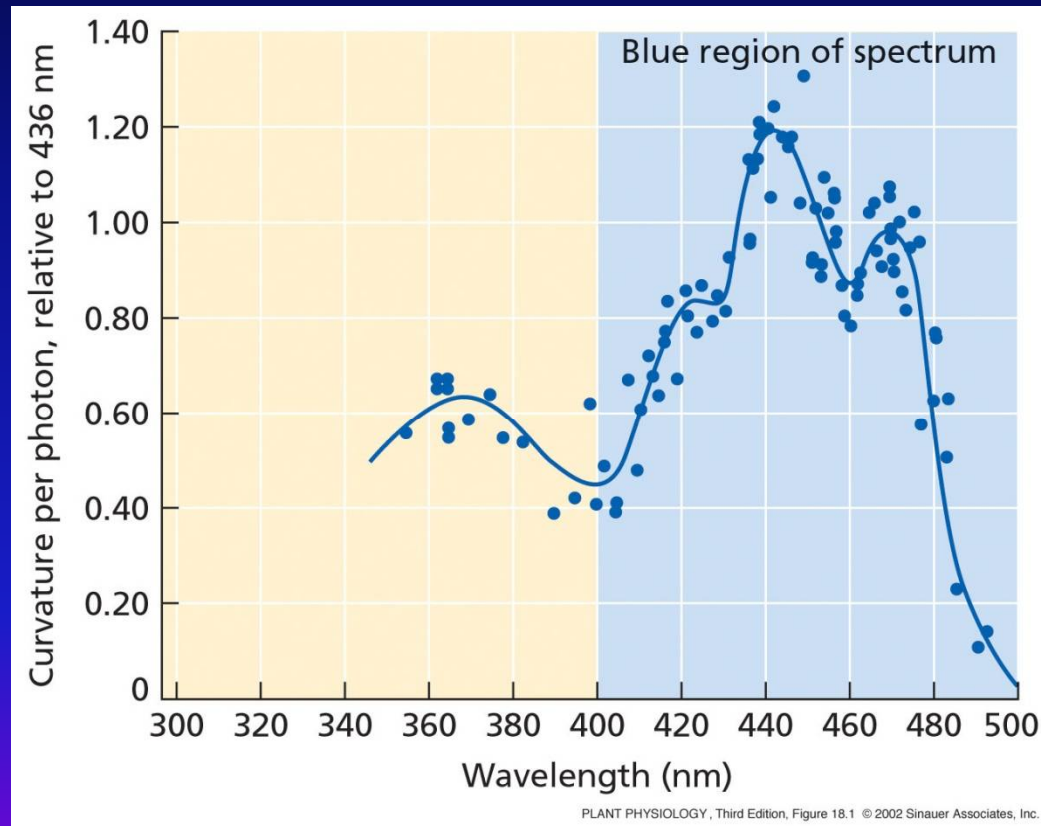
Modré světlo je absorbováno specifickými receptory modrého světla (SFR 4b-c), ale také fytochromy a chlorofylem



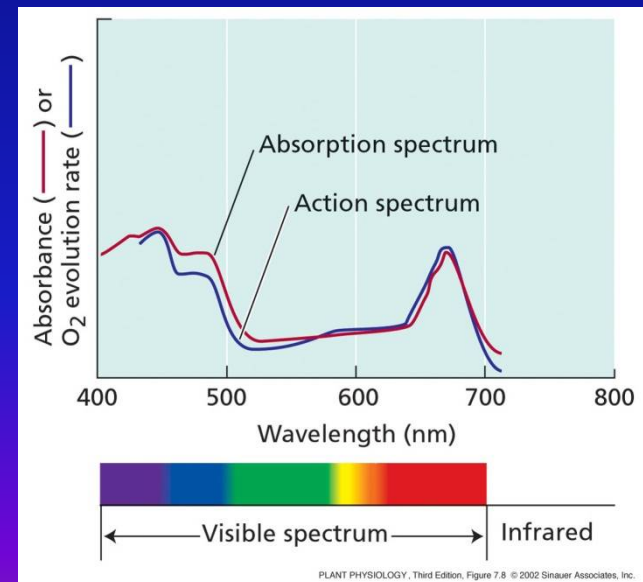
Jak odlišit specifické reakce k modrému světlu?

- 1) Modré světlo nemůže být nahrazeno červeným světlem**
- 2) Reakce není reverzibilní FR**
- 3) Akční spektrum a jeho srovnání s absorpčním světlem**

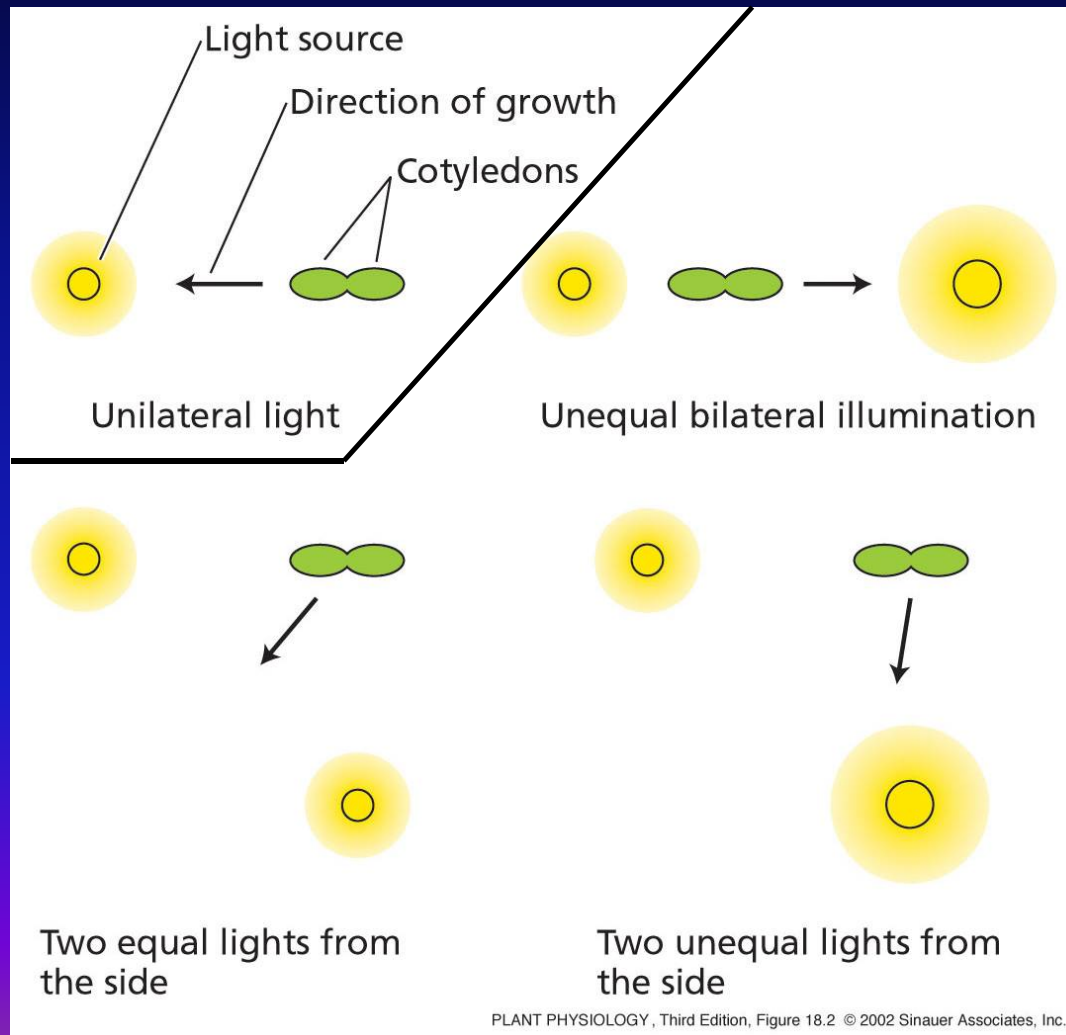
Akční spektrum - graf, který vyjadřuje závislost intenzity pozorované reakce na vlnové délce světla



Akční spektrum pro fototropismus



1) Fototropismus – asymetrický růst směrem ke světlu

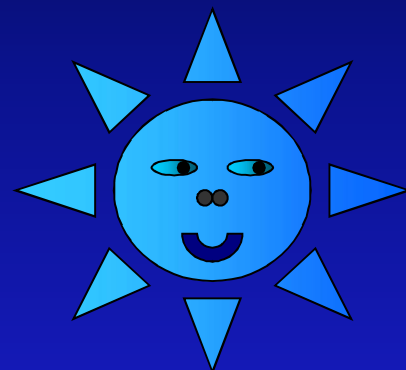
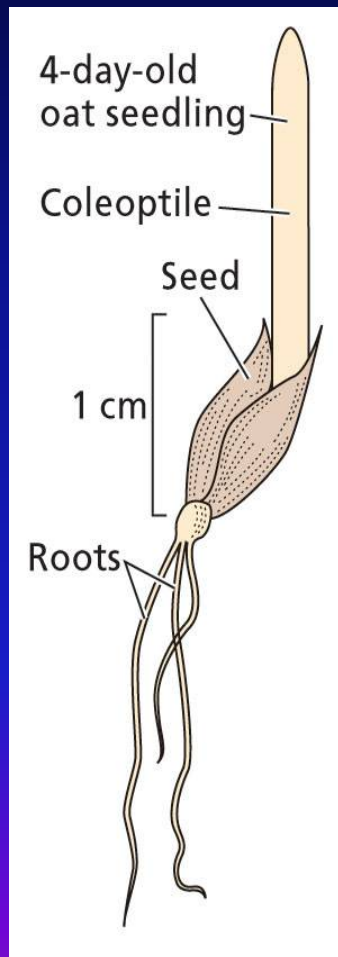


- houby

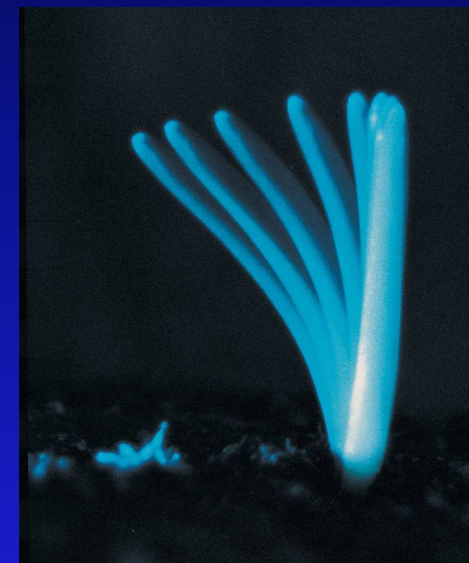
- kapradiny

- vyšší rostliny

Koleoptile (coleoptile) – modifikované listy u jednoděložných



Auxinový gradient

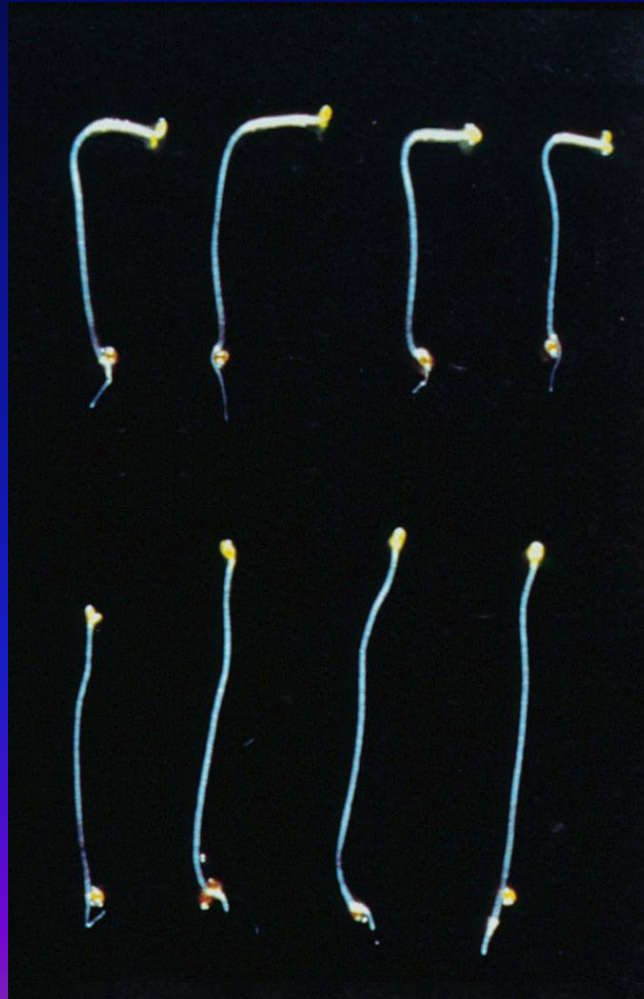


Zakřivení koleoptile

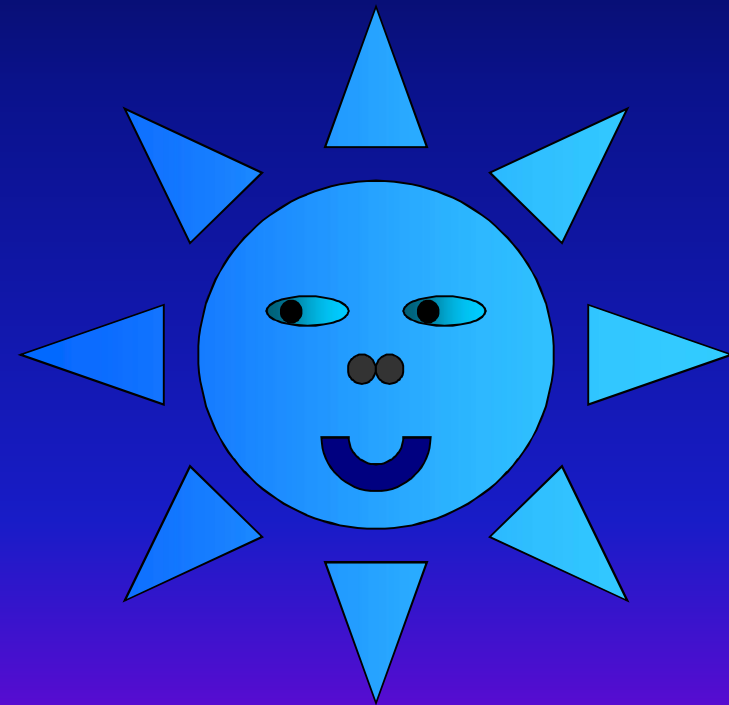
Auxin stimuluje růst buněk více na zastíněné než na ozářené straně koleoptile => zakřivení růstu

Arabidopsis mutant *phot1* s defektem ve fototropismu => (SFR 4b-c)

WT

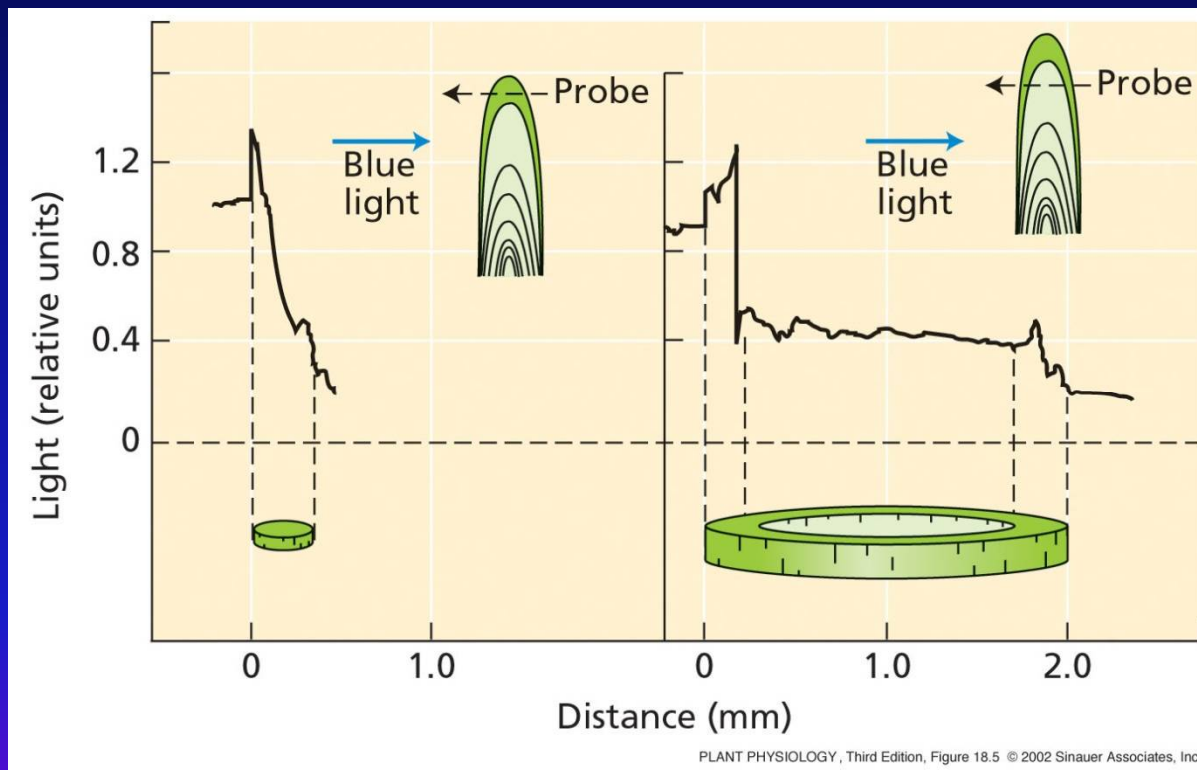


phot1



Jak rostliny vnímají směr světelného signálu?

Množství světla v jednotlivých částech pletiva (fotogradient) je převáděn do nerovnoměrné distribuce auxinu v pletivu.

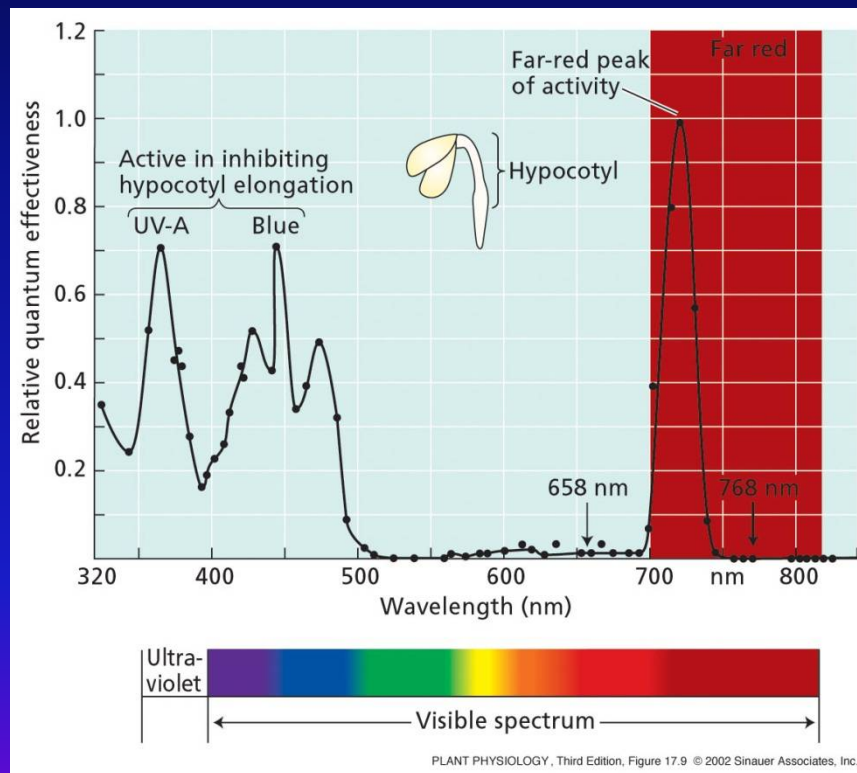


Místo příjmu světla a místo prodloužení (= zakřivení)

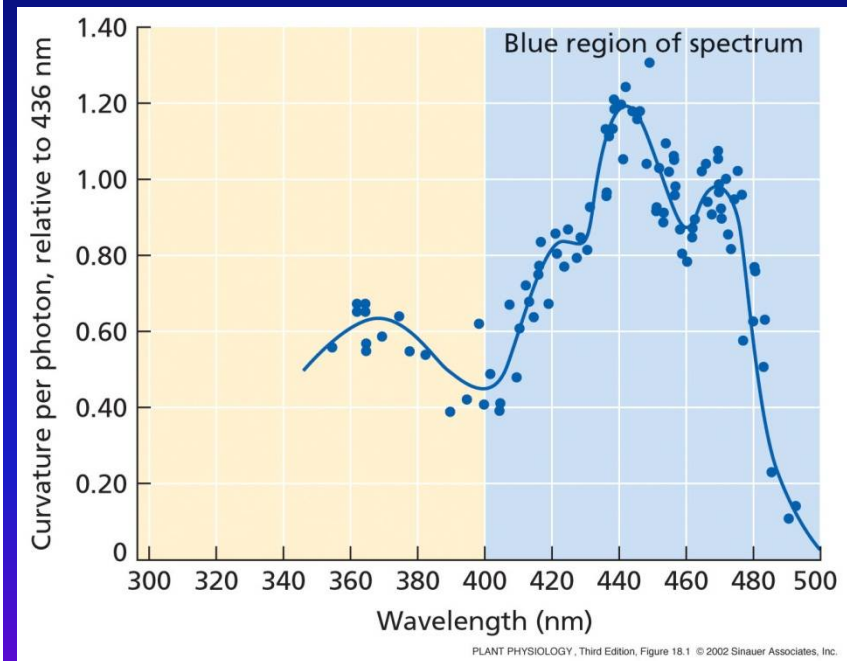
Pro fototropickou reakci hypokotylu je klíčová pouze vrchní prodlužovací část hypokotylu, a to v endodermálních, kortikálních a epidermálních buňkách. Místo příjmu signálu je totožné s místem fototropické reakce.

2) Rychlá inhibice prodlužovacího růstu

Klíčení → **Proniknutí z půdy** → **Fotomorfoenní reakce = inhibice růstu**



Akční spektrum pro inhibici růstu etiolovaných rostlin



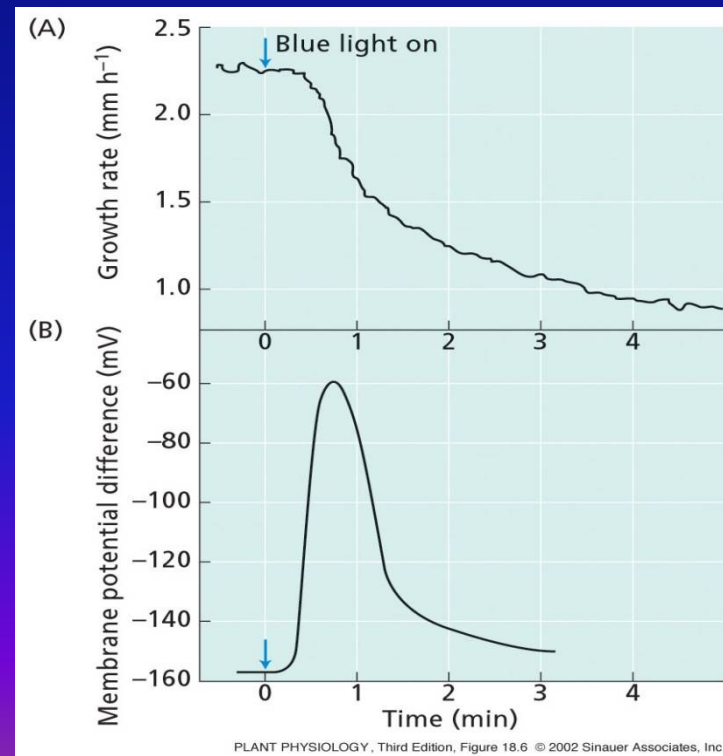
Akční spektrum pro fototropismus

Experimentální možnosti oddělení inhibice růstu zprostředkované fytochromem od inhibice zprostředkované specifickými receptory modrého světla

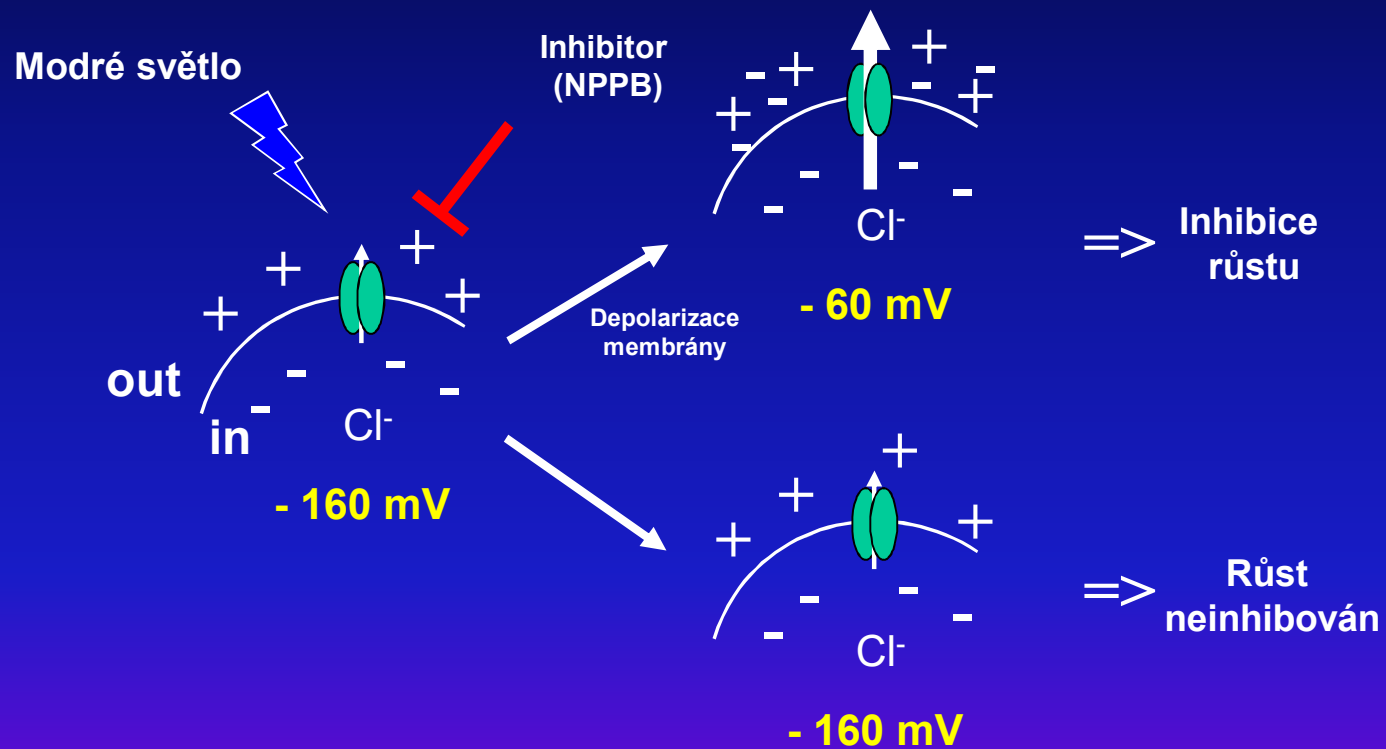
1) Aplikace silného žlutého světla => saturevaná inhibice růstu ~ 50%, stabilní Pr:Pfr. Následná aplikace slabého modrého světla => další inhibice růstu specificky zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo.

2) Změna v rychlosti růstu hypokotylu zprostředkovaná fytochromy ~ 8 – 90 minut; změna růstu zprostředkovaná fotoreceptory pro modré světlo ~ 15 – 30 sekund

3) Modré světlo indukuje depolarizaci membrány, která předchází inhibici růstu. Depolarizace je způsobena aktivací Cl⁻ kanálů.



Aniontové kanály zprostředkují inhibici růstu modrým světlem



3) Aktivace genové exprese

Modré světlo indukuje expresi genů, které kódují proteiny zapojené v řadě morfologických procesů.

a) Geny regulované **nespecificky** modrým světlem

- Gen pro enzym chalcone syntázu, zapojený v biosyntéze flavonoidů
- Gen, kódující protein vážící chlorofyl *a* a *b*.
- Gen pro subjednotku chloroplastového enzymu rubisco (ribulose biphosphate carboxylase/oxygenase)
- Gen *AthH2* primárně exprimován v expandujících a diferencujících se buňkách; kóduje membránový protein schopný transportovat molekuly vody = aquaporin (vodní kanál; water channel); regulován i ABA

b) Geny specificky regulované modrým světlem

Gen *SIG5* specificky regulovaný modrým světlem; hraje regulační roli v transkripci chloroplastového genu *psbD-BLRP* (*Blue Light Responsive Promoter*), který kóduje D2 podjednotku PSII reakčního centra.

SIG5 hraje roli v toleranci rostlin k osmotickému stresu tím, že indukuje opravy PSII

Dalších 5 genů skupiny *SIG* je aktivováno nesespecificky modrým i červeným světlem

c) Gen pro fotoreceptory CRY1 a PHOT1, 2 jsou regulovány modrým světlem

Modré světlo zvyšuje jak množství mRNA, tak i proteinu CRY1. Promoter genu *CRY1* nese cis-acting sekvence reagující k modrému světlu. Informací o expresi fototropinů je málo.

4) Stimulace otevírání průduchů (stomat)

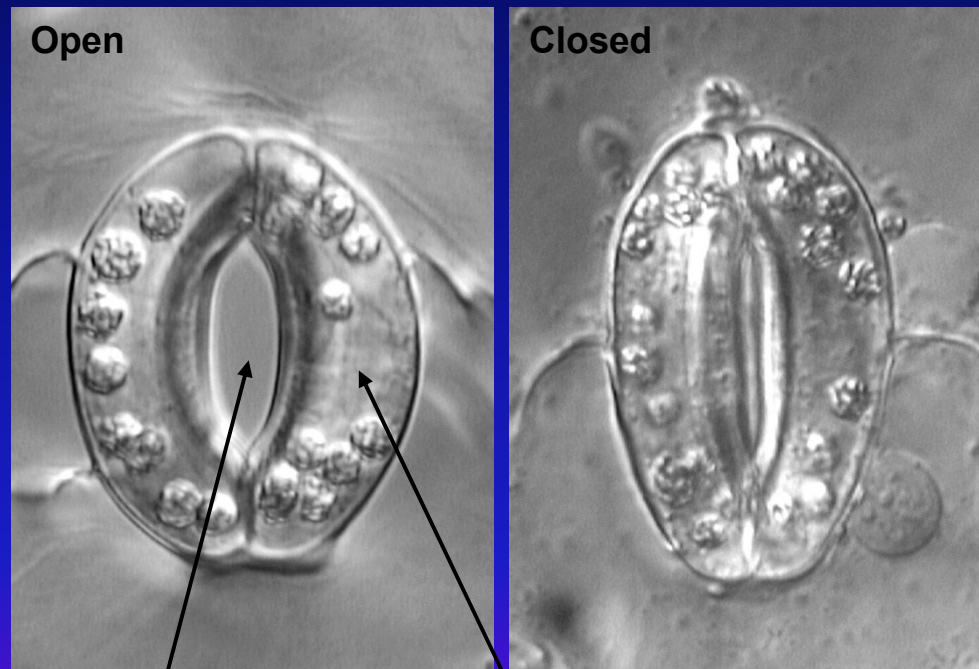
Průduchy hrají hlavní regulační roli ve výměně plynů v listech

Průduchy – modelový objekt pro studium reakcí k modrému světlu:

- reakce stomat k modrému světlu je rychlá a zvratná
- reakce stomat k modrému světlu je pozorovatelná po celý život rostliny
- signální dráha spojující místo příjmu modrého světla s průduchy je dobře prostudována

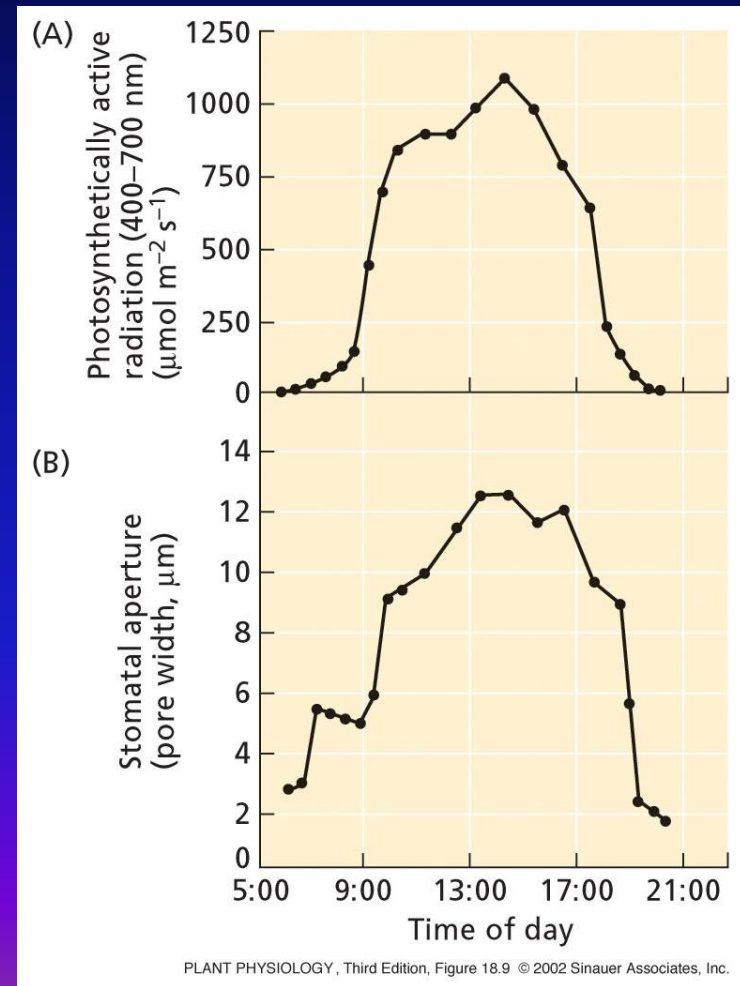
Světlo je dominantní faktor regulující otevírání a zavírání stomat dopadem na epidermální buňky listu.

Průduchy se otevírají při dosažení určité úrovně intenzity světla a zavírají se, když intenzita světla klesá.



Pór

Svěrací buňky
(guard cells)



DCMU (dichlorophenyl dimethylurea) – inhibitor fotosyntetického elektronového transportu – částečně inhibuje otevírání průduchů indukované modrým světlem



Fotosyntéza v chloroplastech svěracích buněk hraje roli ve světlem indukovaném otevírání stomat

+

Nefotosyntetická složka stomatální reakce ke světlu

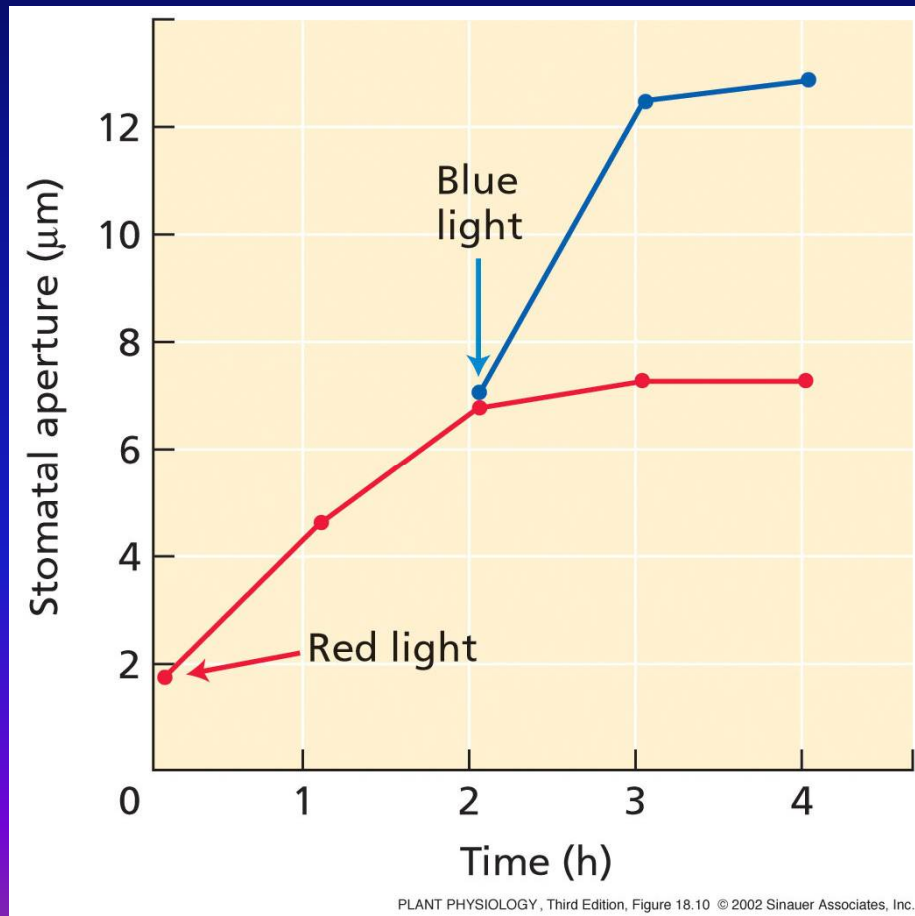


Světlo aktivuje dvě výrazné reakce svěracích buněk:

- fotosyntézu v chloroplastech svěracích buněk
- specifickou reakci k modrému světlu

Specifická stomatální reakce

Modré světlo způsobuje současně fotosyntetickou a specifickou nefotosyntetickou reakci

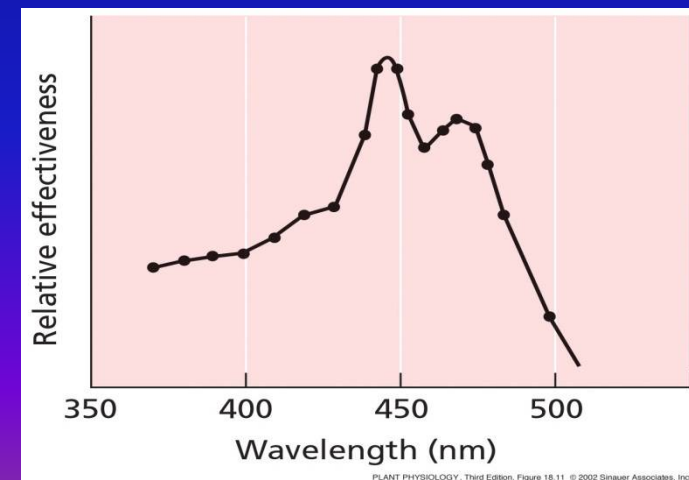


1) Saturace fotosyntetické reakce silným červeným světlem => částečné otevření stomat

2) Aplikace slabého modrého světla



Další, nefotosyntetické, otevření stomat vyvolané modrým světlem



Modré světlo indukuje zvětšování protoplastů izolovaných ze svěracích buněk průduchů



Světlo je opravdu vnímáno svěracími buňkami

Odhalení mechanismu fungování svěracích buněk, tj. otevírání a zavírání průduchů



Modré světlo indukuje proud iontů do buňky a akumulaci organických roztoků => zvýšení osmotického tlaku v buňce => čerpání vody do buňky => zvětšování protoplastů = svěracích buněk => vytvoření štěrbin = otevření průduchu



Modré světlo



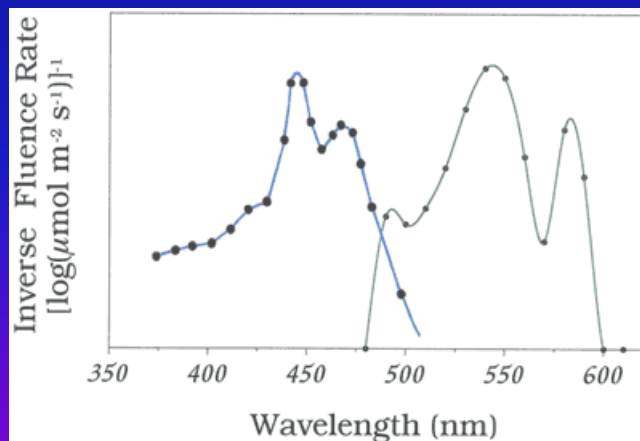
Otevírání průduchů indukované modrým světlem může být blokováno působením zeleného světla

Zelené světlo bylo považováno za „safe light“ – nevyvolává fyziologické reakce

Frechilla S (2000) Plant Cell Physiol 41: 171-176 – zelené světlo inhibuje otevírání průduchů indukované modrým světlem.

**Plná reverze: modré světlo $10 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$
zelené světlo $20 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$**

Talbott et al. (2002) Amer J Bot 89: 366-368 – fotoreverze pozorovaná u jiných druhů rostlin



Akční spektrum pro blue/green reverzibilitu

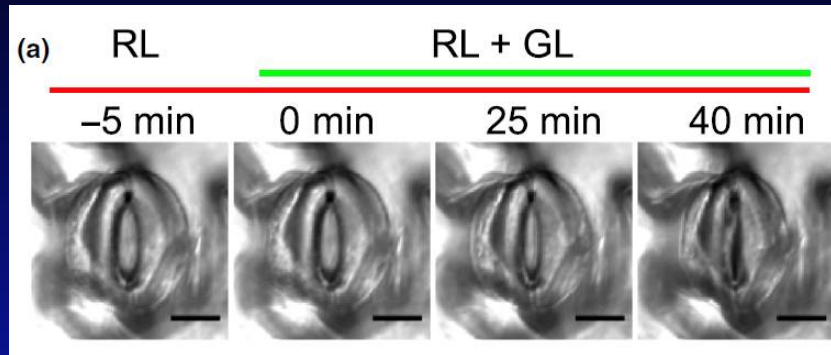
Mechanismus ?:

1) Nezávislý receptor pro zelené světlo – interaguje s receptorem pro modré světlo

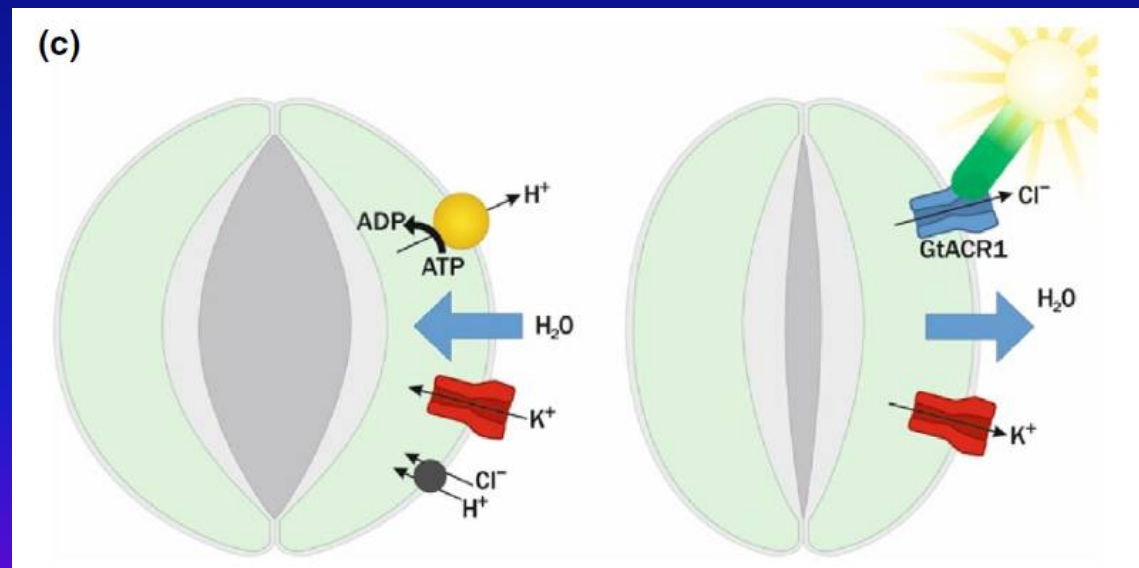
2) Fotoizomerizace receptoru modrého světla – fyziologicky neaktivní - po absorpci modrého světla přeměněn na formu fyziol. aktivní, která absorbuje světlo zelené. Tato forma absorbuje zelené světlo, které mění receptor zpět na formu neaktivní, absorbující modré světlo.

UPDATE 2022

Jones JJ et al. (2022) New Phytologist 236: 1237-1244



Zelené světlo (GL) aktivuje Cl^- kanál GtACR1 \Rightarrow transport Cl^- z buňky \Rightarrow depolarizace membrány svěřací buňky \Rightarrow únik K^+ a H_2O \Rightarrow smrštění buňky \Rightarrow zavírání průduchů.

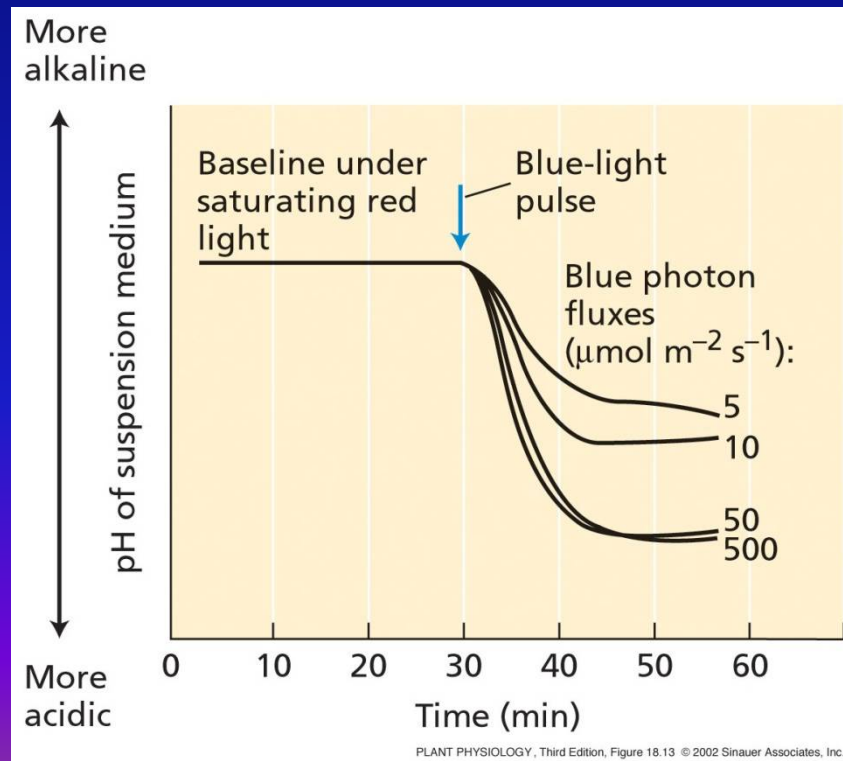


Zelené světlo může uzavírat průduchů i v podmínkách, kdy je současně stimulováno otevírání průduchů červeným světlem. Je tedy možné, že zelené světlo usměrňuje stomatální transpiraci a spotřebu vody.

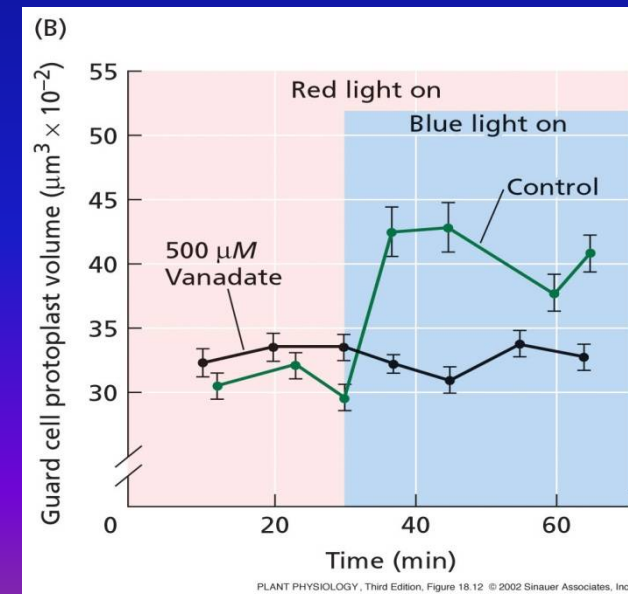
Mechanismus otevírání průduchů indukovaného modrým světlem – aktivace protonové pumpy (H^+ -ATPase)

Po ozáření protoplastů svěracích buněk modrým světlem se pH okolního média snižuje, prostředí se okyseluje.

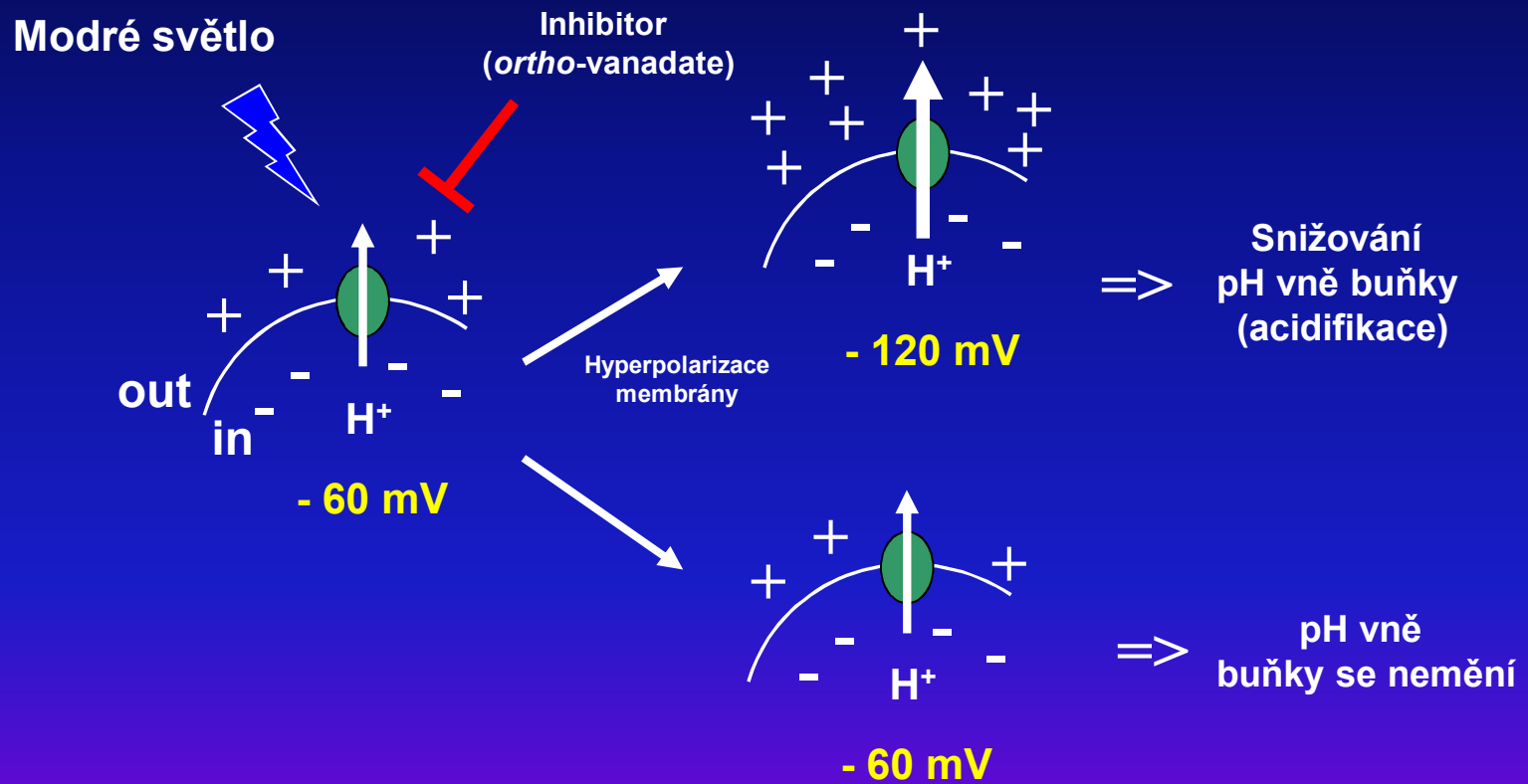
Acidifikace může být blokována aplikací CCCP (blokátor tvorby pH gradientu) nebo vanadatem (inhibitor protonové pumpy)



Acidifikace je způsobena aktivací protonové pumpy modrým světlem



Aktivace protonové pumpy modrým světlem

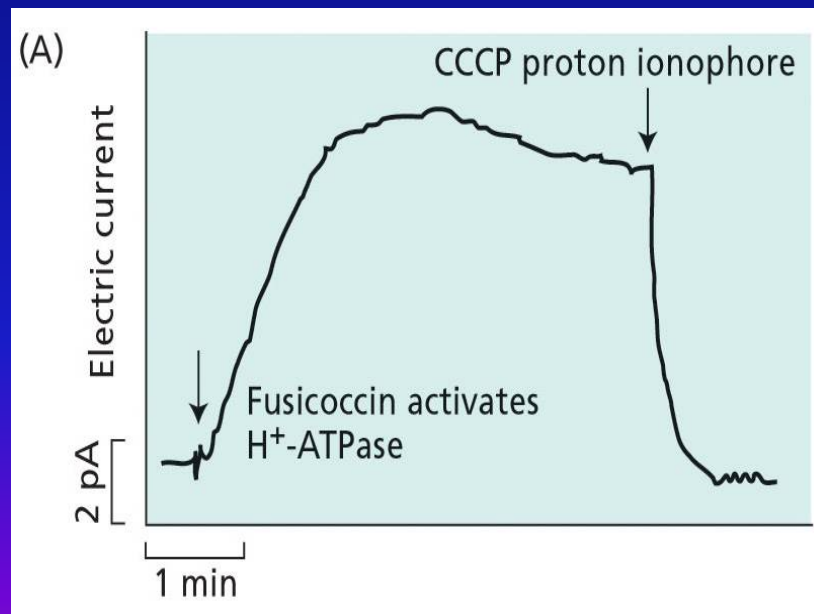


Aktivace protonové pumpy a další elektrické změny membrány se měří pomocí patch-clamp metod

Taiz L, Zeiger E (2010) Plant Physiology. 5th Edition, Sinauer Associates, Inc. Publishers, Sunderland, Massachusetts

<http://5e.plantphys.net/article.php?ch=6&id=50>

Houbový toxin fusicoccin – aktivátor protonové pumpy => aktivuje proud přes membránu, který může být inhibován CCCP.



- 1) Fusicoccin stimuluje pumpování protonů i otevírání stomat
- 2) CCCP inhibuje fusicoccinem indukované otevírání stomat

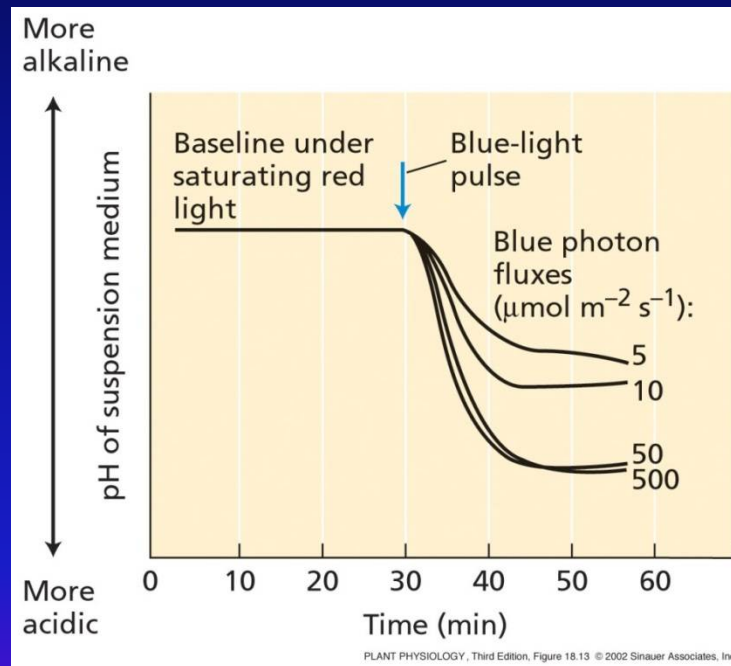


Jasně spojení mezi pumpováním protonů a otevíráním stomat

Zvýšení pumpování protonů a velikost otevření stomat jsou úměrné množství fotonů modrého světla dopadajících na list



Reakce stomat funguje jako senzor fotonů



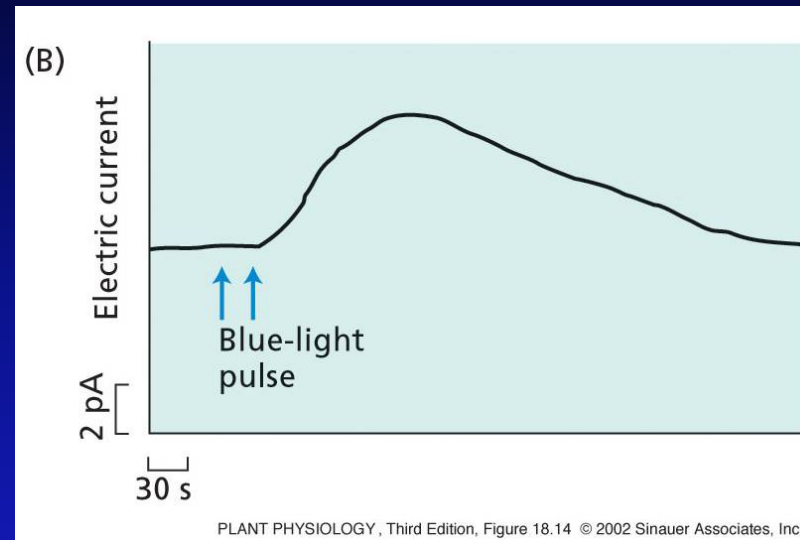
UPDATE 2014

Wang Y et al. (2014) PNAS 111: 533-538

Transgenní rostliny *Arabidopsis* s overexprimovanou H^+ -ATPasou ukazují zvýšené světlem-indukované otevření průduchů.



Reakce indukované modrým světlem mají některé důležité vlastnosti:



- 1) Maximální amplitudy reakce je dosaženo až za několik minut → modré světlo nejprve konvertuje neaktivní formu receptoru na formu aktivní
- 2) Reakce přetrvává i po vypnutí světelného signálu → při absenci světla se aktivní forma receptoru mění zpět na formu neaktivní
- 3) Výrazná doba lag fáze → doba požadována pro přenos signálu od receptoru k protonové pumpě a pro vytvoření gradientu

Modré světlo reguluje osmotický stav svěracích buněk aktivací protonové pumpy a stimulací syntézy organických látek

1908 – Francis Ernest Lloyd – hypotéza „škrob-cukr“: turgor svěracích buněk je regulován osmotickými změnami, které jsou následkem konverze škrobu na cukr.

1960 – objev změn v koncentraci K^+ - moderní teorie osmoregulace pomocí K^+ a jiných iontů

Otevřené průduchy:

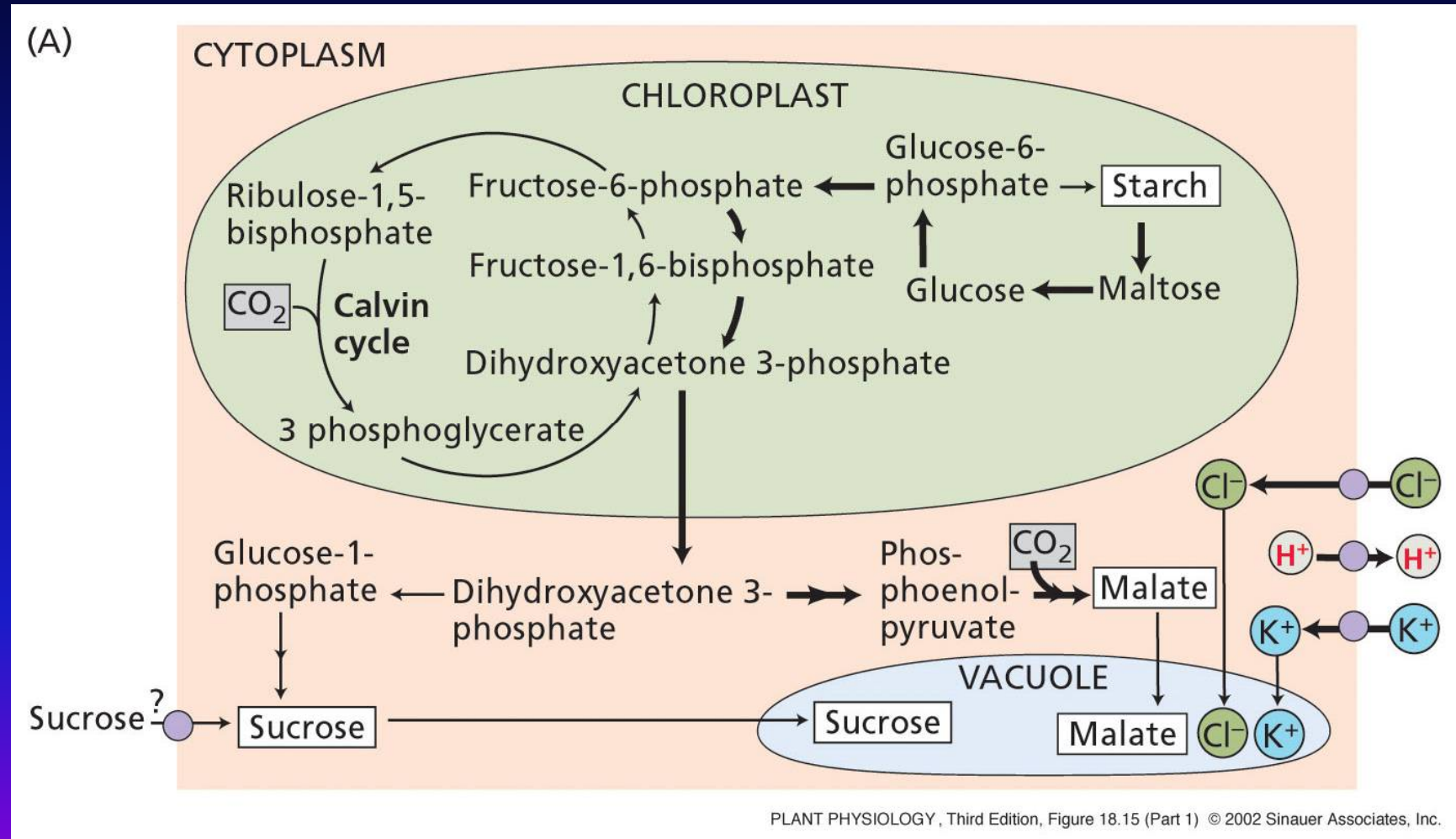
Koncentrace K^+ 400 - 800 mM \longrightarrow Balance pomocí Cl^- a malátu²⁻

Společně s K^+ , jsou dovnitř buňky transportovány Cl^- pomocí sekundárního transportního mechanismu řízeného gradientem elektrochemického potenciálu H^+ generovaného protonovou pumpou.

Malát²⁻ je syntetizován v cytozolu v metabolické cestě hydrolýzy škrobu. Obsah malátu se snižuje při zavírání průduchů.

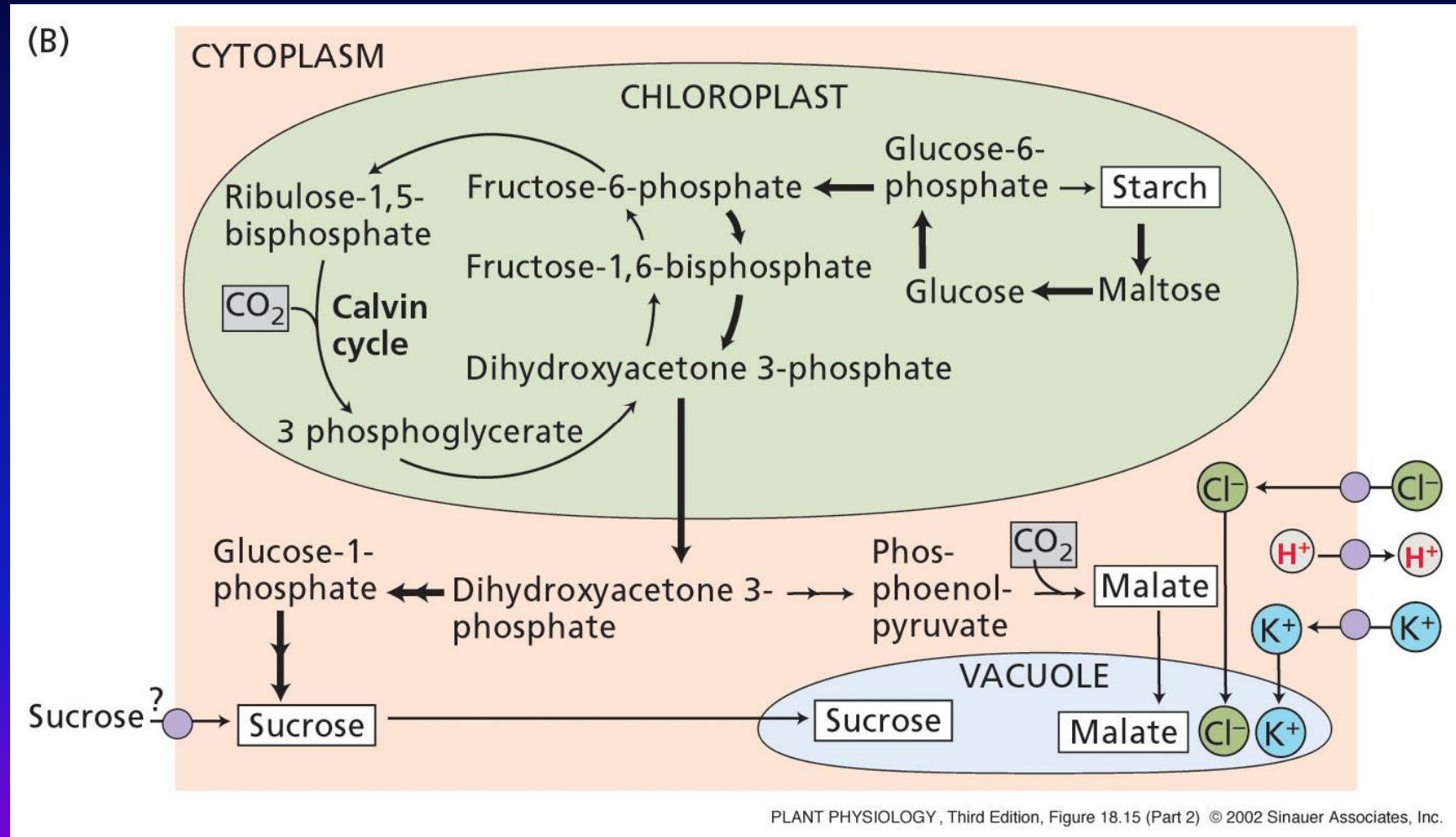
Tři odlišné cesty osmoregulace ve svěracích buňkách

1) Vlivem K^+ , Cl^- , a malátu²⁻ pocházejícího z hydrolýzy škrobu

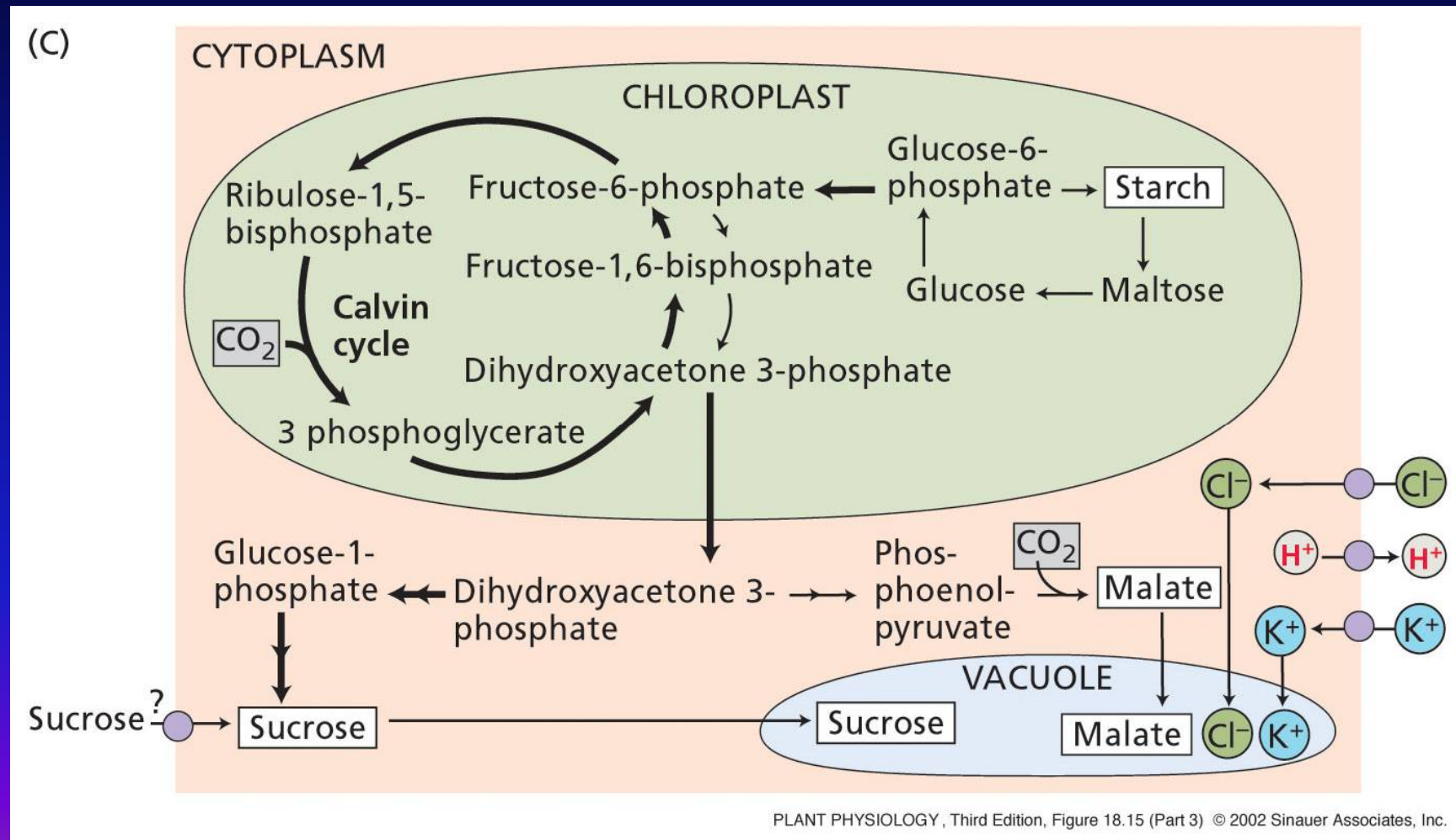


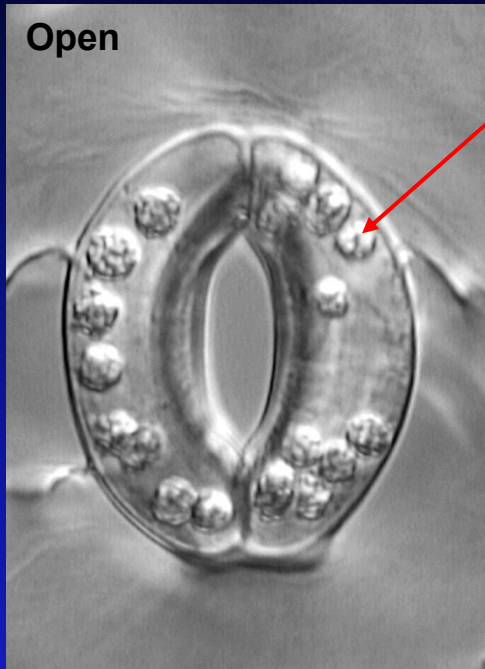
Poznámka – při stresu je malát²⁻ transportován ze svěrací buňky do apoplastu a indukuje zavírání průduchů.

2) Vlivem sacharózy vznikající hydrolyzou škrobu – původní hypotéza „škrob-cukr“



3) Vlivem sacharózy vznikající fotosyntézou (chloroplasty svěřacích buněk či chloroplasty v mezofylových buňkách)





Chloroplasty – obsahují škrobová zrna

Škrob je nerozpustný vysokomolekulární polymer glukózy – není osmoticky aktivní



Hydrolýza škrobu – vznikají rozpustné cukry – osmoticky aktivní



Osmotický tlak ↑ (osmotický potenciál ↓)



Stomata se otvírají

Zavírající se stomata: syntéza škrobu



Osmotický tlak ↓



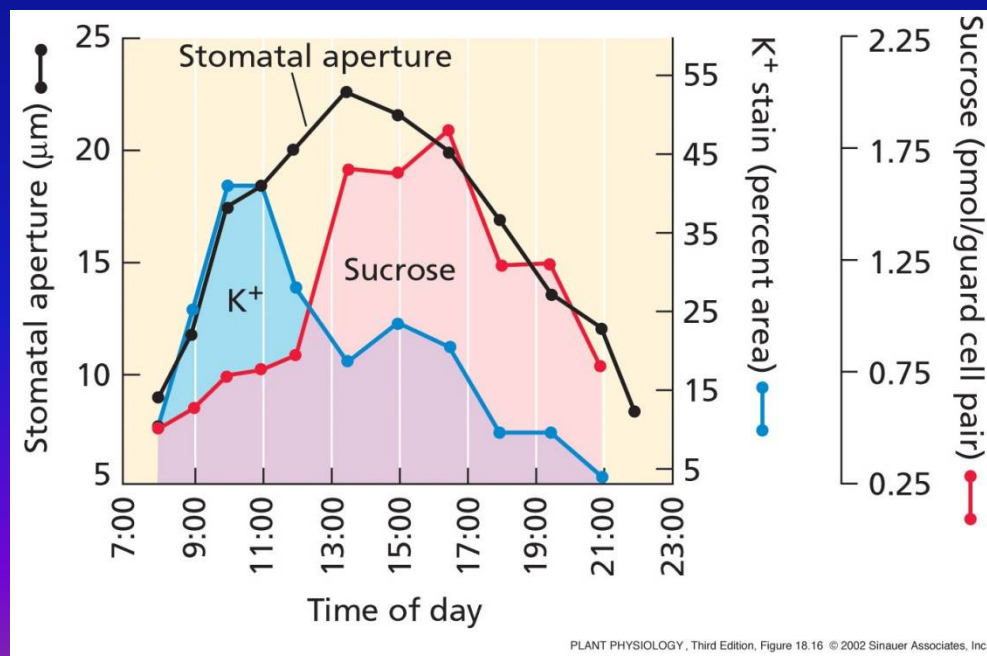
(osmotický potenciál ↑)



Cukr je osmoticky aktivní látka ve svěracích buňkách

Po objevení role K^+ , Cl^- a $malátu^{2-}$ byla „škrob-cukr“ hypotéza částečně opuštěna. Nedávné studie však ukázaly důležitou fázi osmoregulace svěracích buněk s dominantní úlohou cukru.

Studie: K^+ se zvyšuje s otevíráním průduchů brzy ráno; obsah cukru se pomalu zvyšuje. K^+ se snižuje odpoledne, ale otevírání průduchů pokračuje, obsah cukru se dále zvyšuje. Odpoledne se obsah cukru snižuje, což koresponduje se zavíráním průduchů.



Otevírání stomat: nárůst K^+

Zavírání stomat: pokles cukru

POZOR! Update 2018
Lima VF et al. (2018)

Úloha sacharózy během otevírání průduchů nebyla nikdy předtím přímo testována.
Nebyly zodpovězeny 3 základní otázky:

- 1) Je sacharóza schopna indukovat otevření průduchů?
- 2) Je sacharóza spojena s otevřením průduchů indukovaným K^+ a světlem?
- 3) Funguje sacharóza jako osmolyt nebo jako substrát během světlem indukovaného otevírání průduchů?

Update 2018
Medeiros DB et al. (2018) Plant J 94: 583-594



David B Medeiros
Max Planck Institute

- 1) Sacharóza není schopna sama o sobě indukovat otevírání průduchů.
- 2) Přítomnost sacharózy nezvyšuje rychlost otevírání průduchů indukované K^+ a světlem.
- 3) Sacharóza indukuje zavírání průduchů ve vysokých koncentracích (> 10 mM).



Sacharóza během světlem indukovaného otevírání průduchů nefunguje jako osmolyt.

UPDATE 2021
Flütsch S and Santelia D (2021) New Phytologist 230: 1754-1760

Review o současných znalostech metabolismu uhlíku ve svěracích buňkách a jeho vlivu na funkci průduchů.

Základní, dosud nevyřešená otázka týkající se průduchů:

**Je uhlík (tedy cukr), nikoli voda, zdrojem,
který omezuje otevírání průduchů?**

UPDATE 2023

Potkay A and Feng X (2023) New Phytologist 238: 506-528

V biologii existuje dlouhá tradice ptát se „proč“ – rozumět vzorcům forem a chování. Proto ukazujeme, jak formy a chování prospívají organismu, a že pravděpodobně vznikly přirozeným výběrem. Tato tradice vyústila i v modely vodivosti průduchů. Ekofyziologové zatím nenašli shodu o skutečném „cíli (důvodu)“ chování (otevírání/zavírání) průduchů => vzniklo mnoho odlišných modelů. Autoři letos publikovali nejnovější model, který ukazuje nový přístup a může tak pomoci vyřešit nejasnosti podstatu teorie chování průduchů.



Foto: Martin Rak - Lesní chrám