

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Vliv aktinové mutace u rostlin
Arabidopsis thaliana na integritu a
dynamiku cytoskeletu v kontrolních
a stresových podmínkách**

Diplomová práce

**Bc. Lenka
Vaškebová**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: doc. Mgr. Miroslav Ovečka, Ph.D.

„Prohlašuji, že jsem práci vypracovala samostatně s použitím odborné literatury a pod dohledem vedoucího.“

V Olomouci dne:

.....

SOUHRN

Dnešní výrazné klimatické změny a rapidní nárůst populace klade čím dál vyšší tlak na vývoj odolnějších a produktivnějších zemědělských plodin. Proto lepším prozkoumáním vlivu abiotických i biotických stresů na rostliny na molekulární a buněčné úrovni můžeme lépe pochopit adaptačních mechanismy, které si rostliny vůči těmto stresům vyvinuly. Tyto znalosti jsou prvním krokem v dlouhé cestě vývoje odolnějších rostlin. Diplomová práce byla zaměřena na vliv aktinové mutace u druhu *Arabidopsis thaliana* v reakcích na stresové podmínky. Byla použita linie *der1-3*, která má mutaci v *ACT2* genu, kódujícím nejdůležitější aktin ve vegetativních pletivech. Sledoval se vývoj a růst kořenových vlásků, snažilo se přijít na příčinu vlnitého vzoru růstu kořene linie *der1-3*. Byly změřeny růstové parametry rostlin linií C24 a *der1-3*, a transgenních linií s nadprodukcí fluorescenčně značených markerů aktinového a mikrotubulového cytoskeletu v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu. Ukázalo se, že všechny linie *der1-3* byly odolnější vůči oxidativnímu stresu než kontrolní linie C24. Byl vyhodnocen i vliv solného stresu na buněčné úrovni, konkrétně kvalitativní a kvantitativní změny v morfologii a dynamice aktinového a mikrotubulového cytoskeletu.

SUMMARY

Current significant climatic changes and rapid increase in human population requires development of better crops, which should be more resistant and productive. Therefore, exploring how plants react to abiotic and biotic stresses at the molecular and cellular levels is important in the understanding of adaptive mechanisms, which plants have evolved. This is a first step in a long way of developing more resistant plants. In this thesis, we focused on the influence of actin mutation in *Arabidopsis thaliana* to its response to abiotic stress conditions. We used *der1-3* mutant, which have a mutation in *ACT2* gene. *ACT2* gene encodes a major actin in vegetative tissues. We confirmed described phenotype in development and growth of root hairs and we tried to explain, why *der1-3* line has a wavy morphological pattern of the root. We measured root growth parameters of control C24 plants and *der1-3* mutants, and transgenic lines expressing fluorescently labelled markers of actin and microtubule cytoskeleton, in salt, osmotic and oxidative stress conditions. We found that *der1-3* line was more resistant to the oxidative stress than C24 control line. Influence of salt stress to changes in morphology and dynamic properties of actin and microtubule cytoskeleton was also described. Results showed broader influence of altered actin to whole plant physiology as was initially thought.

Poděkování

„Především bych chtěla poděkovat svému vedoucímu diplomové práce doc. Mrg. Miroslavovi Ovečkovi, Ph.D., který obětoval čas, kdykoliv bylo potřeba a byl vždy ochotný a vstřícný v jakékoliv situaci. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Oddělení buněčné biologie, ve kterém jsem se vždy cítila příjemně a spokojně. Poslední poděkování patří vedoucímu oddělení Prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc., který mi umožnil pracovat v laboratoři. Práce byla také podpořena granty IGA (projekty č. IGA_PrF_2015_015 a IGA_PrF_2016_012) ze Studentské grantové soutěže na Univerzitě Palackého v Olomouci.“

OBSAH

| | |
|--|-----------|
| 1. ÚVOD | 1 |
| 2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ | 4 |
| 2.1 <i>Arabidopsis thaliana</i> jako modelový organismus..... | 4 |
| 2. 1. 1 Anatomická stavba kořene <i>Arabidopsis thaliana</i> | 4 |
| 2. 1. 2 Post-embryonální vývoj kořene..... | 5 |
| 2. 1. 3 Diferenciace epidermy kořene a vývoj kořenových vlásků | 7 |
| 2. 2 Sub-celulární struktura kořenových buněk..... | 9 |
| 2. 2. 1 Vnitrobuněčná organizace a dynamika transportu membrán..... | 10 |
| 2. 2. 2 Strukturní a molekulární organizace cytoskeletu | 12 |
| 2. 3 Rostliny ve stresových podmínkách..... | 15 |
| 2. 3. 1 Biologická podstata abiotických stresů..... | 15 |
| 2. 3. 2 Reakce rostlin na abiotické stresy..... | 16 |
| 2. 3. 3 Aktivace signálních drah rostlin při abiotických stresech | 17 |
| 2. 3. 4 Vliv abiotických stresů na cytoskelet rostlin..... | 18 |
| 2. 3. 5 Adaptace a rezistence rostlin na abiotické stresy | 19 |
| 2. 4 Charakterizace experimentálních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> | 20 |
| 2. 4. 1 Kontrolní rostliny <i>Arabidopsis thaliana</i> , ekotyp C24 | 20 |
| 2. 4. 2 Mutace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> postihující aktinový cytoskelet | 20 |
| 2. 5 Mikroskopické metody studia rostlin metodou „live cell imaging“ | 22 |
| 3. CÍL PRÁCE | 24 |
| 4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST | 25 |
| 4. 1 MATERIÁL..... | 25 |
| 4. 1. 1 Použité chemikálie..... | 25 |
| 4. 1. 2 Použité přístroje..... | 25 |
| 4. 1. 3 Použité roztoky a média | 26 |

| | |
|--|-----------|
| 4. 1. 4 Biologický materiál..... | 28 |
| 4. 2 METODIKA | 28 |
| 4. 2. 1 Příprava kultivačních médií pro <i>in vitro</i> kultivaci rostlin <i>Arabidopsis</i> | 28 |
| 4. 2. 2 Povrchová sterilizace semen | 29 |
| 4. 2. 3 Transformace rostlin a selekce transgenních linií | 30 |
| 4. 2. 4 Stanovení klíčivosti semen a kultivace na médiích indukujících stres | 32 |
| 4. 2. 5 Dokumentace a vyhodnocování morfologie rostlin při růstu ve stresových podmínkách..... | 33 |
| 4. 2. 6 Příprava celých rostlin pro vitální mikroskopické pozorování na sledování cytoskeletu (SD, Ligh-sheet) | 33 |
| 4. 2. 7 Značení buněk kořene v mikroskopických preparátech..... | 36 |
| 4. 2. 8 Dokumentace a vyhodnocování výsledků..... | 36 |
| 5. VÝSLEDKY..... | 37 |
| 5. 1 Vývin a růst kořenových vlásků linií C24 a <i>der1-3</i> | 37 |
| 5. 1. 1 Porovnání růstu kořenových vlásků mezi liniemi C24 a <i>der1-3</i> | 37 |
| 5. 1. 2 Rychlost růstu kořenových vlásků linií C24 a <i>der1-3</i> | 40 |
| 5. 2. Rovina buněčného dělení kořenových buněk | 41 |
| 5. 2. 1 Kvalitativní a kvantitativní stanovení roviny dělení kořenových buněk | 41 |
| 5. 2. 2 Sledování růstu kořene metodou Light-sheet mikroskopie..... | 42 |
| 5. 3 Reakce linií C24 a <i>der1-3</i> na stresové podmínky (solný, osmotický a oxidativní stres) | 43 |
| 5. 3. 1 Klíčení semen v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu..... | 43 |
| 5. 3. 2 Růst primárního kořene a fenotyp kořenových vlásků při klíčení rostlin na solném, osmotickém a oxidativním stresu..... | 45 |
| 5. 3. 2. 1 Délky primárních kořenů a jejich přírůsteky za 24 h..... | 45 |
| 5. 3. 2. 2 Fenotyp kořene a kořenových vlásků..... | 48 |
| 5. 3. 2. 3 Změny morfologie celých rostlin po ovlivnění NaCl, sorbitolem a PQ..... | 53 |

| | |
|--|------------|
| 5. 3. 3 Parametry kořene a fenotyp kořenových vlásků po překladu rostlin na solný, osmotický a oxidativní stres..... | 56 |
| 5. 3. 3. 1 Délky primárních kořenů a jejich přírůstky za 24 h..... | 56 |
| 5. 3. 3. 2 Fenotyp kořene a kořenových vlásků..... | 59 |
| 5. 3. 3. 3 Změny morfologie celých rostlin po ovlivnění NaCl, sorbitolem a PQ..... | 64 |
| 5. 4 Změny ve struktuře a dynamice aktinového a mikrotubulového cytoskeletu po působení 100 mmol.l ⁻¹ NaCl u linií C24-ABD2-GFP, <i>der1-3</i> -ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a <i>der1-3</i> -MAP4-GFP..... | 67 |
| 5. 4. 1 Morfologie cytoskeletu hypokotylových buněk a buněk kořenové špičky linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, <i>der1-3</i> -ABD2-GFP a <i>der1-3</i> -MAP4-GFP v kontrolních podmínkách..... | 67 |
| 5. 4. 2 Vliv solného stresu (100 mmol.l ⁻¹ NaCl) na cytoskelet linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, <i>der1-3</i> -ABD2-GFP a <i>der1-3</i> -MAP4-GFP..... | 70 |
| 5. 4. 3 Kvantifikace dynamiky cytoskeletu hypokotylových buněk a buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách a při solném stresu | 76 |
| 6. DISKUZE..... | 82 |
| 7. ZÁVĚR..... | 86 |
| 8. SEZNAM LITERATURY | 88 |
| 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ | 102 |
| 10. PŘÍLOHY | 105 |

1. ÚVOD

Pro tuto práci byla jako modelový organismus použita dvouděložná rostlina *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, u které byl kompletně fyzicky zmapován genom v roce 2000 (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). S tímto rostlinným druhem se ovšem pracovalo dlouho před tím, a proto se stal v různých ohledech modelovým. Zavedení *A. thaliana* do vědecké praxe, a zejména pak přečtení genomu, znamenalo velkou revoluci ve vývoji poznání a metod rostlinné biologie, genetiky, fyziologie a molekulární biologie (Meyerowitz, 2001). Z hlediska vývojové a buněčné biologie jsou hlavní výhody druhu *A. thaliana* krátký životní cyklus, dostatek semen v další generaci, jednoduchá anatomická a morfologická organizace pletiv a orgánů, což značně zjednodušuje manipulaci a přípravu celých rostlin k mikroskopickému pozorování. Jednotlivé orgány rostliny *A. thaliana* mají ve všeobecnosti malý počet buněčných vrstev, a proto je můžeme mikroskopicky pozorovat jako celek bez nutnosti přípravy fyzických řezů (Boerjan a kol., 1992; Drews a kol., 1991; Jack a kol., 1992).

Hlavním zaměřením buněčné biologie je studium organizmů na buněčné úrovni. Centrální pomůckou pro zkoumání na buněčné úrovni je mikroskop. Díky němu vidíme struktury, které pouhým okem nejsou viditelné. Moderní mikroskopy navíc umožňují všechny pozorované objekty prostorově a časově zdokumentovat. Jako první pozoroval jednobuněčné organizmy okolo roku 1600 Anton von Leeuwenhoek a to svým „jednoduchým mikroskopem“, který tvořila jednoduchá sestava čoček. Od té doby se vývoj mikroskopie začal rozvíjet všemi směry, od základních mikroskopů až po složitější. Tento vývoj pokračuje i v dnešní době (Olympus Microscopy Resource Center, 2012). Pro studium struktury, růstu a vývoje rostlin v rámci krátkodobých i dlouhodobých experimentů se používají různé typy mikroskopů, od světelných, přes epifluorescenční, až po konfokální laserové skenovací mikroskopy. Při nesporných výhodách mikroskopického pozorování jsou tu ovšem i určité nevýhody. Živé rostliny jsou vystaveny fototoxickému stresu, protože při indukci fluorescence se na ně neustále svítí silnými paprsky excitačního světla, prostor mezi podložním a krycím sklem je relativně malý, a proto mají po krátkém čase nedostatek živin a životně důležitých plynů. Tyto podmínky nedovolují dlouhodobé pozorování živých rostlin. Navíc, zmíněné mikroskopické techniky, mají i limitovanou hloubku zobrazení, proto buňky ležící v hlubších vrstvách tkání a orgánů rostlin, nebo složitější rostlinné orgány, není možné dostatečně vizualizovat. Pro krátké a středně dlouhé experimenty jsou však tyto klasické mikroskopické techniky vhodné a užitečné, ale pro delší pozorování, dovolující zaznamenávat i vývojové procesy, byla nedávno vyvinuta zcela nová vyhovující technika, Light-sheet fluorescenční mikroskopie (Maizel a kol.

2011; Ovečka a kol., 2015). Tento druh mikroskopie přispívá především k výzkumu ve vývojové biologii, kde je možné v reálném čase dlouhodobě pozorovat růst a vývoj embryí i celých organismů (Huisken a kol., 2004). Tato technika je ale vhodná i ke sledování vývoje a formování jednotlivých orgánů, pletiv a buněk rostlin (Ovečka a kol., 2015). Dlouhodobější monitorování je možné proto, že Light-sheet mikroskopie podstatně snižuje míru fototoxického stresu, rostliny rostou v přirozeném směru a v kultivačním médiu, kde je více prostoru pro vývoj než v běžných mikroskopických preparátech. Rostlinný materiál ale musí mít fluorescenčně značenou určitou strukturu a i příprava samotných vzorků do mikroskopu je časově náročnější (Dunsby, 2008; Huisken a kol.; 2004, Ovečka a kol., 2015).

K historickému vývoji buněčné biologie výrazně přispěl také Robert Hook (Provat a kol., 2015). Pomocí svého zkonstruovaného mikroskopu pozoroval buňky korku, jež mu připomínaly pokoje (cely) mnichů, a proto je nazval buňkami (Hook, 1665). Dnes už víme, že každý organismus se skládá z buněk a každá buňka má i své organely. Tato práce se věnuje především rostlinnému cytoskeletu, což je tzv. dynamická kostra buňky, která se u eukaryotních organismů skládá z aktinových filament a z mikrotubulů. U rostlin hraje cytoskelet hlavní roli zejména při buněčném růstu a morfogenezi (Fu a kol., 2005; Sampathkumar a kol., 2011), ale je taky nezbytný při buněčném dělení a pro vezikulární transport (Petrásek a Schwarzerová, 2009). U rostlin chybí intermediální vlákna, která se u živočišných a kvasinkových buněk vyskytují, ale i morfologie cytoskeletu rostlin je celkově odlišná. Je to dáno zřejmě tím, že rostlinné buňky mají pevnou buněčnou stěnu, velkou centrální vakuolu a chybí jim lokalizovaná cytoskeletální organizační centra. Navíc, jako přisedlé organismy, se rostliny musí vyrovnávat s měnícími se životními podmínkami v dané lokalitě (Breuer a kol., 2014; Ehrhardt a Shaw, 2006; Wasteneys, 2000). Rostlinné buňky odpovídají na různé vnější a vnitřní podněty rychlou a dramatickou přestavbou cytoplazmy. Tento děj většinou zabezpečuje signální soustava a dynamika cytoskeletu, tedy sítě mikrotubulů, aktinových filament a jejich asociačních proteinů (Kropf a kol., 1998; Staiger, 2000). Cytoskelet u rostlin je důležitý i při odpovědích na stresové podmínky, jako je abiotický a biotický stres. Významné proteiny, které zprostředkovávají signalizaci, a to nejen stresových signálů, jsou mitogen-aktivované protein kinázy (MAPK). Jsou to klíčové proteiny v regulaci odpovědí rostlin na stresové faktory, které ovlivňují i interakce cytoskeletu (Sinha a kol., 2011; Smékalová a kol., 2014). Proto jsou změny morfologie cytoskeletu, při vystavení rostliny stresovým podmínkám, dalším důležitým vodítkem k pochopení těchto mechanismů. V dnešní době je důležité v rostlinách tyto děje důkladně prostudovat, protože jsou velice komplexní a složité (Cushman a Bohnert, 2000).

Především proto, že se v současné době výrazně mění životní podmínky (zasolená půda, sucho apod.), které negativně ovlivňují výnos zemědělských rostlin (Boyer, 1892; Olesen a Bindi, 2002). Vyvinout tolerantnější a odolnější zemědělské plodiny je hlavním cílem snahy rostlinných biologů (Khush, 1999).

Předkládaná práce se věnuje reakci rostlin na vybrané abiotické stresy s cílem studovat odpovědi na stres na úrovni cytoskeletu. K tomuto účelu byly použity mutované rostliny *A. thaliana*, *der1* (*deformed root hairs1*). Genový lokus *DER1* kóduje ACTIN2, což je hlavní aktin ve vegetativních pletivech rostlin *A. thaliana*. Tato mutace negativně ovlivňuje formování kořenových vlásků (Ringli a kol., 2002).

2. SOUČASNÝ STAV POZNÁNÍ

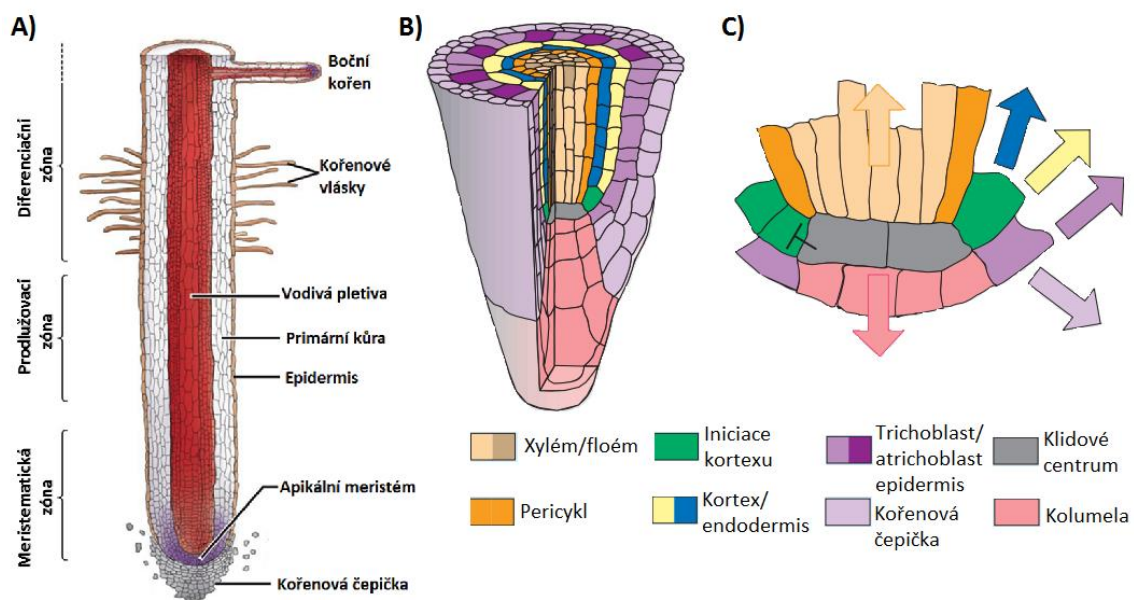
2.1 *Arabidopsis thaliana* jako modelový organismus

Rostlinný druh *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh z čeledi *Brassicaceae* byla díky svým genetickým, vývojovým, růstovým a fyziologicko-biologickým parametrům zvolena jako modelový organismus. Bylo to oznámeno v září roku 1985 v článku časopisu *Science* (Meyerowitz a Pruitt, 1985). Od té doby je *A. thaliana* hojně využívána ve všech odvětvích rostlinné biologie. Tato práce využila modelový objekt *A. thaliana* především na studium buněčné biologie.

2. 1. 1 Anatomická stavba kořene *Arabidopsis thaliana*

Rostlina se skládá z nadzemní a podzemní části. Nadzemní část je přizpůsobena k získávání energie pomocí fotosyntézy, a podzemní část, kořen, ukotvuje rostlinu pevně v půdě, kde přijímá vodu a živiny. Podzemní část rostliny se skládá z primárního kořene a z bočních kořenů (Boerjan a kol., 1992). Primární kořen *Arabidopsis* je dobře kontrolovatelný model pro studium rostlinné organogeneze. Je tvořen z buněčných vrstev uspořádaných v soustředných válcích. Skládá se ze tří vnějších vrstev (Obr. 1B) – epidermis, kortex a endodermis, střední válec pak z pericyklu, který obklopuje střední část kořene, cévní svazky (vodivé pletivo). Cévní svazky se skládají z xylému (transportuje vodu směrem nahoru) a floému (transportuje produkty fotosyntézy a různé druhy signálních molekul oběma směry). Vnější vrstva epidermis se skládá ze dvou typů buněk – buňky tvořící kořenové vlásky (trichoblasty – nazval je tak Cormack už roku 1949) a buňky netvořící kořenové vlásky (atrachoblasty). Vnitřní vrstvy primární kůry tvoří kortex a endodermis, skládající se z morfologicky shodných buněk (Benfey a Scheres, 2000). Kořenová špička je celkově složena ze tří odlišných zón (Obr. 1A) – meristematická zóna, obsahující iniciační buňky a dělicí se buňky kořene. Následuje přechodná zóna, ve které se buňky po ukončení buněčného dělení připravují na rychlé prodlužování. K rapidnímu prodloužení pak dochází v další zóně – elongační. Na konci této zóny se začínají vytvářet i kořenové vlásky. Další je zóna diferenciační, kde prodloužené buňky získávají svou konečnou funkci a kořenové vlásky se dále vyvíjejí a rostou (Dolan a kol., 1993). V rámci rostoucího kořene vznikají nové buňky v meristematické zóně (Obr. 1C). Meristematická zóna kořene začíná čtyřmi sadami iniciačních buněk, které obklopují klidové centrum. Klidové centrum je tvořeno z výjimečně se dělicích buněk. Meristém, který popsal von Guttenberg (1964), je chráněn několika vrstvami buněk kořenové čepičky. Kořenová čepička je tvořena ze stejných iniciačních buněk jako epidermis. Nejspodnější část kořenové špičky tvoří kolumela, která má

vlastní sadu iniciačních buněk, podobně jako vodivé pletivo. Poslední sada iniciačních buněk je pro kortex a endodermis (Benfey a Scheres, 2000; Dolan a kol., 1993). Jak už bylo zmíněno, z buněk epidermis vznikají kořenové vlásky. Podobně z buněk pericyklu vznikají endogenně boční kořeny sekvenčně za sebou v určité vzdálenosti od meristematické zóny primárního kořene. Jejich formování začíná antiklinálním a posléze i periklinálním dělením iniciálních buněk pericyklu primárního kořene. Meristematické buňky bočního kořene se vytvářejí z primordiálních buněk bočního kořene, což jsou vlastně deriváty buněk pericyklu primárního kořene. Organizace primárního a bočního kořene je stejná, což determinuje i stejné uspořádání pletivových vrstev. Odlišují se ale jiným počtem buněčných sad v jednotlivých vrstvách (Dolan a kol., 1993). Boční kořeny zvětšují kořenovou plochu, aby rostlina mohla efektivněji přijímat živiny a vodu. K tomu také výrazně přispívají kořenové vlásky (Grierson a Schiefelbein, 2002; Hofer, 1991).

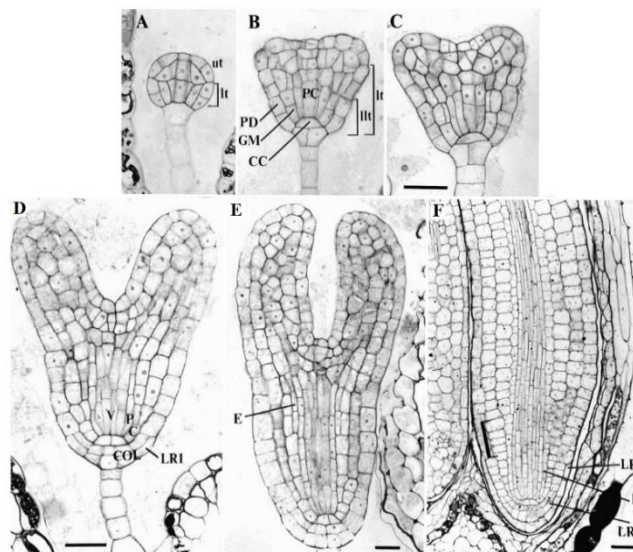


Obr. 1: Morfologie kořene, kořenové špičky a meristematické zóny *Arabidopsis thaliana* (podle Benfey a Scheres, 2000).

2. 1. 2 Post-embryonální vývoj kořene

Embryogeneze *Arabidopsis* a vývoj embrya jsou už delší dobu detailně prozkoumány (Mansfield a Briarty, 1991). Bylo popsáno 6 stádií vývoje embrya (Obr. 2): 1) preglobulární stádium 2) globulární stádium 3) přechodné stádium 4) stádium srdce 5) torpedovité stádium 6) zralé embryo (Jürgens a Mayer, 1994). Z histologického hlediska rozeznáváme 3 stadia embryogeneze: 1) diferenciaci pletiv 2) zvětšování buněk 3) zrání embrya. První asymetrické dělení zygoty produkuje dvě odlišné buňky, terminální a bazální. Terminální buňka dává základ

embryu a z bazální buňky se tvoří suspensor, který je důležitý pro transport živin a podílí se na tvorbě kořenového pólu. V globulárním stádiu (Obr. 2A) je terminální buňka rozdělena díky příčnému buněčnému dělení na spodní (lt) a horní (ut) vrstvu. V přechodném, též nazývaném trojúhelníkovém, stádiu (Obr. 2B) se příčně dělí spodní vrstva. Vznikají tak základy pro děložní lístky ve vrchní části (lt), spodní část (llt) se pak skládá z podlouhlých buněk prokambium (PC), z jedné vrstvy buněk protodermy (PD), ze dvou buněk základního meristému (GM) a jedné centrální buňky (CC). V pozdním stádium srdce (Obr. 2D) se dále dělí ta část embrya, kde z nejspodnějších protodermálních buněk se stane rozpoznatelný kořenový meristém (Scheres a kol., 1994). Tento meristém periklinálním dělením (rovnoběžně s povrchem) dává základ první vrstvě buněk kořenové čepičky (LR1; Dolan a kol., 1993). Dají se už definovat i sousední buňky, deriváty buněk llt-vrstvy. Jsou to iniciační buňky kořenového kortexu (C), pericyklu (P) a vodivého pletiva (V). Deriváty buněk llt-vrstvy sousedící s iniciačními buňkami endodermis, která je už viditelná v torpédovitém stádiu (E; Obr. 2E), jsou iniciační buňky kolumely (COL; Obr. 2D). Tyto buňky posléze tvoří vrstvy buněk kolumely kořene. Ve zralém embryu je rozdělená první (LR1) a druhá vrstva (LR2) buněk kořenové čepičky (Obr. 2F; Scheres a kol., 1994).



Obr. 2: Stádia embryogeneze a vývoj protomeristému během zrání embrya. A) Globulární stádium B) přechodné (trojúhelníkové) stádium C) brzké stádium srdce D) pozdější stádium srdce E) torpédovité stádium F) zralé embryo. Jednotlivé dělení je znázorněno textem: ut, vrchní vrstva; lt, spodní vrstva; llt, spodní část lt; PD, protoderma; PC, prokambium; GM kořenový základní meristém; CC, centrální buňky; VP, cévní primordium; C, kortex; COL, kolumela; LR1, první vrstva buněk kořenové čepičky; E, endodermis; LR2, druhá vrstva buněk kořenové čepičky. Měřítka jsou 25 µm (podle Scheres a kol., 1994).

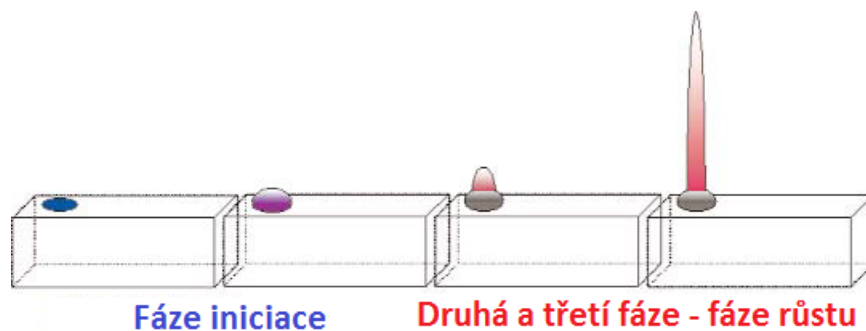
Post-embryonální vývoj kořene začíná ve zralém embryu suchého semena. Z radiálních řezů kořene před vyklíčením rostlin už lze rozeznat, že nejbliže ke kořenové špičce je soubor 12cti kolumelových buněk, které jsou obklopeny buňkami kořenové čepičky. Uprostřed se nacházejí 4 centrální buňky a sousedící 4 epidermální buňky, které jsou o něco větší. Kolem se nachází první cévní buňky a nad i pod nimi je 8 kortikálních/endodermálních iniciačních buněk. Nad tímto regionem je v embryonálním kořeni stejné uspořádání jako ve zralém post-embryonálním kořeni. I když zde chybí ještě typické rysy zralého kořene, jako je typická hustota cytoplazmy v trichoblastech nebo zralé cévní svazky. Lze to shrnout tak, že anatomie zárodečného kořene je velmi podobná kořenu v post-embryonálním vývoji. Přesné umístění meristamatických iniciačních buněk je dáno už během embryogeneze, jak v podélném, tak v radiálním rozměru (Dolan a kol., 1993).

V embryu ale není předurčena hranice mezi hypokotylem a kořenem, tudíž nelze zjistit, zda buňky kořenového promeristému jsou jediné, které dávají základ post-embryonálnímu kořeni. Bylo ale definováno, že region nad většinou apikálně rostoucích vlásků jsou buňky hypokotyly a kořen začíná na bazálním konci těchto kořenových vlásků. U klíčících semenáčků je tato hranice definována přítomností větve kořenových vlásků („collet region“) a přítomností chlorofylu. Kortexové buňky hypokotyly mají značné množství chlorofylu. Přejít k nízkému obsahu chlorofylu v kortexových buňkách kořene probíhá na úrovni jedné buňky. Dalším poznávacím znakem je, že na hranici těchto dvou částí se vyskytují dvě vrstvy kortexových buněk a je zajímavé, že buňky v tomto regionu jsou méně podlouhlé, více než buňky na apikálním a bazálním konci od tohoto regionu. Tato hranice se musela vytvořit až post-embryonicky, protože kdyby byla odvozena od promeristému v embryonálním stádiu, byla by všude jen jedna vrstva kortexových buněk (Scheres a kol., 1994).

2. 1. 3 Diferenciace epidermy kořene a vývoj kořenových vlásků

Kořenové vlásky jsou dlouhé tenké tubulární výrůstky epidermálních buněk, které se začínají vytvářet na konci elongační zóny kořene (Carol a Dolan, 2002). U *Arabidopsis* jsou samostatné sloupce trichoblastů a atrichoblastů uspořádány střídavě v epidermě kořene, takže kořenové vlásky jsou vytvářeny v neměnném a jednoduchém „pruhovaném“ vzoru (Dolan a kol., 1994; Dolan a Costa, 2001). Z pohledu radiální organizace, jsou trichoblasty umístěny nad antiklinálními stěnami kortikálních buněk a atrichoblasty jsou umístěny po vnějších periklinálních stěnách kortikálních buněk (Dolan a kol., 1994; Peterson, 1967). Trichoblast se dotýká se dvěma kortikálními buňkami a atrichoblast jen s jednou (Dolan a kol., 1994; Dosier

a Riopel, 1978). Toto postavení zajišťuje buňkám tvořících kořenové vlásky lepší přístup k živinám, než jiným epidermálním buňkám, a mezibuněčný prostor okolo trichoblastů slouží jako rezervoár materiálu, např. pro cukry (Cormack a Lemay, 1963; Dolan a kol., 1994). Vlásky mohou v závislosti na růstových podmínkách dorůst až 1 mm i více a mít v průměru okolo 11 μm (Carol a Dolan, 2002; Galway a kol., 1997). Obvyklá rychlost růstu se uvádí v průměru kolem 1 $\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ (Grierson a Schiefelbein, 2002). Kořenové vlásky vyrůstají z trichoblastů na bazálním (dolním) konci, což je nejbližší k meristematické zóně kořene. Atrichoblasty jsou o mnoho delší než buňky tvořící kořenové vlásky. Tento velikostní rozdíl je viditelný už v dělicí se zóně kořene před vytvořením vlásků. Růst kořenového vlásku je rozdělený do tří fází (Dolan a kol., 1994; Foreman a Dolan, 2001). První je iniciační fáze (Obr. 3), kdy se nejprve musí určit místo vytvoření vlásků, což je vždy na bazální straně trichoblastu. Pak se začne jádro přesouvat do středu buňky tvořící vlasek, následně se pak dostane do místa vytvoření vlásku. Výduť („bulge“) se vytvoří díky lokální acidifikaci buněčné stěny, která způsobí její ztenčení a uvolnění. Druhá fáze (Obr. 3) je pomalý růst z místa výdutě a třetí fáze začíná, jakmile má vlasek mezi 20-40 μm . Vlasek ve třetí fázi roste velmi rychle (Obr. 3), což způsobuje trvalou a rychlou elongaci. Elongace vlásku je způsobená správnou organizací polarizované cytoplazmy, rychlou exocytózou a endocytózou, biosyntézou buněčné stěny a inkorporací membránového materiálu ve špičce kořenového vlásku. Tento mechanismus růstu se nazývá polární vrcholový růst. Jádro migruje do kořenového vlásku. V diferenciační zóně kořene vlásky dorůstají konečné velikosti, jsou plně vyvinuty a dochází k vakuolizaci jejich špiček (Carol a Dolan, 2002; Dolan a kol., 1994; Foreman a Dolan, 2001).



Obr. 3: Grafické znázornění fází vývoje a růstu kořenového vlásku (podle Grierson a Schiefelbein, 2002).

Živé organizmy jsou velice komplexní a vykazují složité interakce mezi geny, jejich produkty, vnějšími a vnitřními signály. Studium morfogeneze je tedy dost komplikované,

a nejuvhodnější je proto kombinovat více přístupů, a pokud možno, studovat orgány, pletiva a typy buněk s jednoduchou organizací. Výhodnou možností je použití mutantů, které mají mutaci v jednom genu a vykazují určitý fenotyp. Můžeme tak studovat funkci postihnutého genu v organismu. V posledních desetiletích byl zaznamenán výrazný pokrok díky kombinaci různých metod. Populární se stalo i studium genetické kontroly vývoje specializovaných buněk, jako jsou trichomy a kořenové vlásky (Galway a kol., 2011).

2. 2 Sub-celulární struktura kořenových buněk

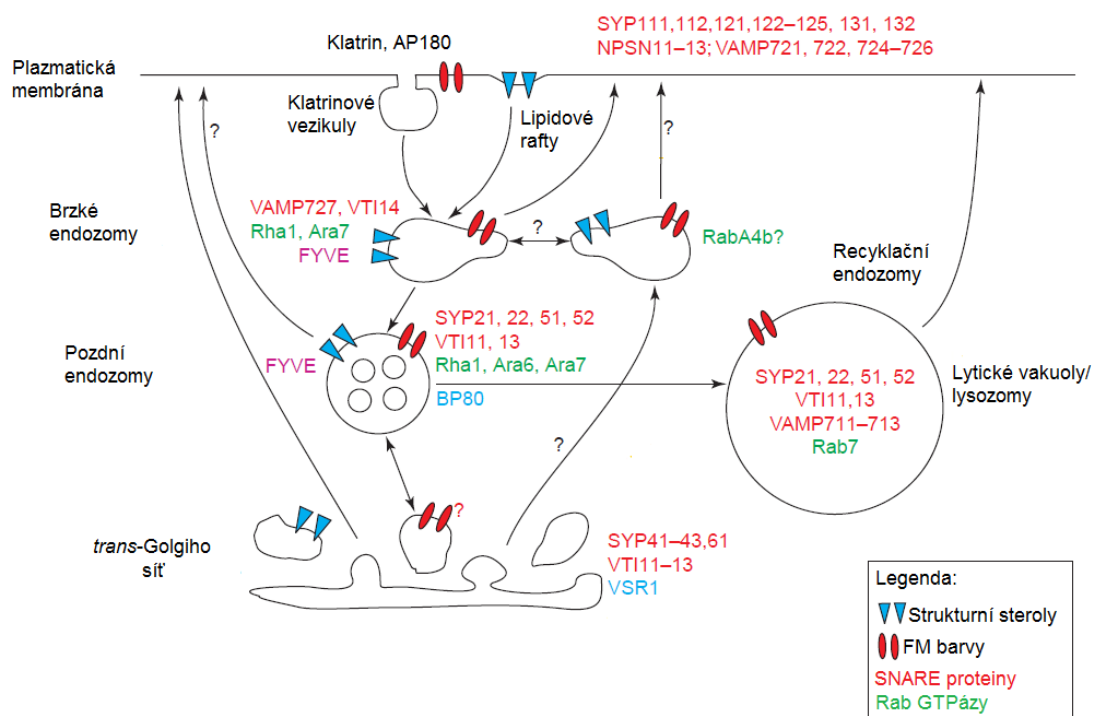
Buňky kořene obsahují organely, jako všechny ostatní buňky v jiné části rostliny. Ale každá část má svá specifika a zde je uvedeno pár rozdílů. Kořenový systém se nachází v půdě bez přístupu světla, naproti tomu stonky a listy se vyvíjí v nadzemním prostoru při plném osvětlení. Hlavní rozdíl na subcelulární úrovni je tedy přítomnost či nepřítomnost chlorofylu. Nadzemní část rostliny využívá chlorofyl ke tvorbě energie pomocí fotosyntézy. Kořenový systém chloroplasty s chlorofylem neobsahuje (Scheres a kol., 1994). Kořen drží rostlinu v půdě a směr růstu kořene je určen díky pozitivnímu gravitropismu. Vnímání gravitropického vektoru je zprostředkován pomocí citlivých buněk kolumely, statocytů (Sack, 1991). Statocyty mají charakteristickou organizaci buněčných komponent. Jádro se nachází ve vrchní části buňky a endoplazmatické retikulum vytváří na spodní části buňky strukturu ve tvaru sítě (Driss-Ecole a kol., 2003; Hashiguchi a kol., 2013). V bazální části statocytů se nachází velké množství amyloplastů, obsahujících škrob. Nadzemní část také obsahuje statocyty. Sedimentovatelné amyloplasty se nacházejí ve stoncích květů a v hypokotylu (Fukaki a kol., 1998; Hashiguchi a kol., 2013). Proto tyto orgány mohou na gravistimuly reagovat a ohýbat se v opačném směru gravitace (negativní gravitropismus; Hashiguchi a kol., 2013). Další rozdíly můžeme pozorovat v buněčné výbavě k příjmu důležitých živin, iontů a vody. Např. sodíkové ionty (Na^{2+}) způsobují zasolení půdy, před kterým se rostlina brání a snaží se snížit hladinu Na^{2+} v buňkách na netoxickou hodnotu (Munns a Tester, 2008; Zhu, 2002). Na^{2+} je ale přijímán pouze buňkami epidermis kořene a to pasivně pomocí neselektivních kationtových kanálů. Sodíkový iont se dostane do cévních svazků a je transportován do nadzemní části a tak se snižuje jeho hladina v kořenech. Podzemní a nadzemní část rostliny přijímá jiné ionty, tudíž potřebují i rozdílné transportéry, kanály a přenašeče. Přesto jsou tyto části rostlin vzájemně propojeny a pomocí signalizace tyto aktivity koordinují (Jiang a kol., 2012).

2. 2. 1 Vnitrobuněčná organizace a dynamika transportu membrán

Jedním ze základních procesů vnitrobuněčné dynamiky je vnitrobuněčný transport membrán. Strukturně a regulačně jsou jednotlivé komponenty a dráhy vnitrobuněčného transportu membrán vysoce konzervovány jak u jednobuněčných kvasinek, tak u rostlin a živočichů. Eukaryotické buňky zabezpečují endomembránový transport pomocí vezikul, které se pohybují mezi endoplazmatickým retikulem (ER), Golgiho aparátem (GA), plazmatickou membránou (PM), endozomy (Baluška a kol., 2002) a vakuolou, kde dochází především k degradaci dopravovaného obsahu (Geldner N., 2004). Zprvu se pochybovalo, že by v nepohyblivých rostlinách s pevnou buněčnou stěnou a vysokým turgorovým tlakem (vnitřním pnutím) mohla endocytóza fungovat, protože by se vezikuly musely pohybovat proti silnému turgorovému tlaku (Hawes a kol., 1995). Avšak záhy se pomocí buněčných lokalizačních a funkčních studií s použitím endocytotických markerů zjistilo, že rostlinná buňka má velice dynamickou endocytotickou aktivitu (Baluška a kol., 2002; Šamaj a kol., 2004). Neocenitelným nástrojem pro studium endocytózy a endozomů v rostlinách jsou styrylová barviva, kupříkladu FM4-64, která se váží na lipidickou strukturu membrán. Do buněk se může dostat především procesem endocytózy, tudíž je následně lokalizována v komponentech endocytózní a endomembránové dráhy, jako jsou endozomy, trans-Golgiho sítě-TGN a tonoplast (Šamaj a kol., 2005).

Endocytóza je základním procesem ve všech eukaryotních buňkách. Podílí se na internalizaci molekul z plazmatické membrány a z vnějšího prostředí, na recyklaci plazmatické membrány a na příjmu a degradaci signálních molekul. V rostlinách je endocytóza a endocytotické váčky důležitá pro polární růst, kde jsou sekreční a endocytotické dráhy úzce propojeny. Dále pak hrají roli při auxinem zprostředkované mezibuněčné komunikaci, gravitropických odpovědích, pohybech průduchů, cytokinezi a morfogenezi buněčné stěny (Šamaj a kol., 2005). Endocytóza je definována jako příjem molekul z extracelulárního prostoru do buňky. Existují i další procesy, jako je exocytóza, což je opak endocytózy. Dále byly popsány fagocytóza, pohlcování větších částic, a pinocytóza, pohlcování malých částic, převážně extracelulárních tekutin či plynů (Campanoni a Blatt, 2007; Holstein, 2002). Je dokázané, že v rostlinách se vyskytují aspoň 4 druhy endocytózy: endocytóza závislá na klatrinu, endocytóza závislá na lipidových raftech, fagocytóza a endocytóza tekuté fáze („fluid-phase“; Šamaj a kol., 2004). Rostliny mají 5 druhů endozomálních kompartmentů: 1) Brzké endozomy – jsou první stanicí a bod rozvětvení endocytotických cest u rostlin. Nejsou zatím úplně strukturně popsány, ale předpokládá se, že se podílejí na rychlých procesech recyklování membránových molekul v cytoplazmě. 2) Endozomy recyklace – volně se pohybující

kompartmenty, které se podílejí na recyklaci a sekreci materiálů plazmatické membrány. Jsou ekvivalentní k trans-Golgi síti (TGN). 3) Pozdní endozomy – jsou identické s multivezikulárními tělisky a/nebo prevakuolárními kompartmenty, kde se sbíhají endocytotické a syntetické dráhy. Hrají důležitou roli v třídění nově syntetizovaných proteinů do vakuoly. Tyto endozomy jsou důležitým rozhodovacím bodem, jestli materiál půjde buď do vakuoly, nebo přes plazmatickou membránu do vnějšího prostředí. Pozdní endozomy jsou popsány jak strukturálně (obsahují uvnitř malé váčky), tak molekulárně. 4) Sekreční endozomy – účastní se exocytózy, kdy buď dál produkují sekreční váčky, nebo úplně splynou s plazmatickou membránou. 5) Lytické vakuoly, což jsou kompartmenty, které jsou specializované na degradaci nebo k přeměně směru transportu materiálu (Obr. 4). Jsou to ekvivalenty k savcím lysozomům a kvasinkovým lytickým vakuolám (Šamaj a kol., 2005).



Obr. 4: Endocytotická síť v rostlinných buňkách (podle Šamaj a kol., 2005).

Nejdůležitější typ endocytózy v rostlinách je zmíněná klatrinem zprostředkovaná endocytóza. Klatrin je hlavní obal-tvořící protein vezikul. Pomocí dvou adaptorových proteinů (AP180, α C-adaptin) se klatrinový obal vytvoří na plazmatické membráně a na endocytotických váčkách. α C-adaptin se váže na AP180 a vytváří se tak klatrinový skelet (Šamaj a kol., 2004). Tyto vezikuly mají u rostlin přibližně 70-90 nm (Barth a Holstein, 2004) oproti 120 nm u savců (Conner a Schmid, 2003). Tento rozdíl je dán turgorovým tlakem rostlinných buněk. Hlavními regulátory endocytózy při pučení váček nebo jejich fúze s membránou jsou Rab-GTPázy.

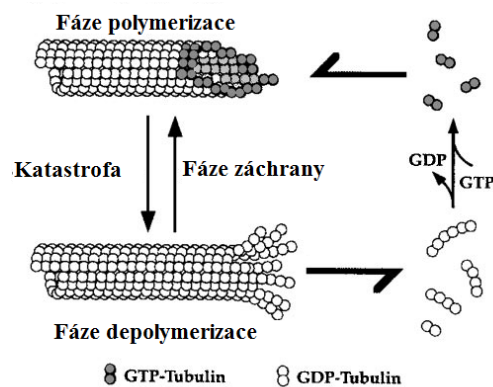
V genomu *Arabidopsis* jich bylo nalezeno přes 30, které hrají esenciální roli pro endocytózu (Šamaj a kol., 2004; Ueda a Nakano, 2002). Tři z nich (Ara6, Ara7 a Rha1) jsou specifické pro rostliny. Ara7 a Rha1 byly lokalizovány v brzkých (Ueda a kol., 2004) i pozdních endozomech (Lee a kol., 2004; Šamaj a kol., 2005). Dobře popsaná vazebná doména pozdních endozomů je FYVE doména, která je důležitá pro přenos signálu z PI(3)P-vazebných proteinů na brzké endozomy. Specificita membránové fúze je zabezpečena především membránovými asociačními proteiny, zvanými SNARE proteiny. Před fúzi membrán spolu interagují t-SNARE (cílové) a v-SNARE (vezikulární) proteiny a až poté mohou spolu dva membránové kompartmenty interagovat (Uemura a kol., 2004). Pro štěpení vezikul z membrány slouží dynamin, což je velká GTPáza, vyskytující se u všech vyšších eukaryontů (Pelkmans a kol., 2002). Neodmyslitelnou roli v pučení a transportu vezikul hraje aktinový cytoskelet. V kořenových buňkách, zejména pak v kořenových vláscích je to F-aktin, který je regulován malými GTPázami, zvanými Rho-GTPázy (Yang, 2002).

2. 2. 2 Strukturní a molekulární organizace cytoskeletu

V eukaryotickém buňkách tvoří cytoskelet aktinové a mikrotubulové sítě, což jsou dynamické struktury, které zajišťují vnitrobuněčné procesy a usnadňuje jejich reorganizaci. U rostlin hraje aktinový a mikrotubulový cytoskelet důležitou roli při buněčném růstu, morfogenezi (Sampathkumar, 2001), ale i v dalších procesech jako je buněčné dělení nebo vezikulární transport (Fu a kol., 2005; Goode a kol., 2000). Obě formy cytoskeletu tvoří rozsáhlé, nekovalentní vláknité polymery, které dosahují různých délek (Komis a kol., 2015).

Mikrotubuly (MT) jsou duté filamenty, které mají v průměru asi 24 nm. Skládají se z heterodimerů, které obsahují jeden polypeptid α -tubulinu a jeden polypeptid β -tubulinu. Oba polypeptidy mají molekulovou hmotnost okolo 50 000 Da (Goddard a kol., 1994; Weisenberg a kol., 1968). Genom *Arabidopsis thaliana* kóduje 6 izoformami α -tubulinu, označovaných jako AtTUA1-AtTUA6 (Kopczac a kol., 1992), 9 izoformami β -tubulinu, zkráceně AtTUB1-AtTUB9 (Snustad a kol., 1992) a 2 izoformy γ -tubulinu, který je funkčně redundantní (Liu a kol., 1994). Heterodimery spolu tvoří protofilamenty. Vždy na sebe nasedají střídavě α -tubulin a β -tubulin, nikdy ne dva α -tubuliny nebo dva β -tubuliny. Filament (mikrotubul) je tvořen většinou 13 protofilamenty, záleží na druhu rostliny. Mikrotubulové filamenty mají počátek ve specifických místech, nazývaných mikrotubulová organizační centra (MTOC). S MTOC jsou spojeny mínus (-) konce mikrotubulů. Mínus konce jsou tedy stabilní. Na volných koncích (plus konce) mikrotubuly rostou, zkracují se či dochází k rychlému rozpadu (dynamická nestabilita).

Mikrotubuly jsou tedy velice dynamické struktury na jednom konci rostoucí, na druhém zkracující se, v závislosti na buněčných potřebách (Goddard a kol., 1994). Dynamika MT je závislá na navázání GTP-tubulinu na + konec MT (může se navázat i na – konec, tento proces je ale pomalejší). Když se GTP-tubulin naváže (polymerizace), uvolní se fosfát (P_i). Rostoucí MT se skládají pak převážně z GDP-tubulinu. Dynamika MT je charakterizována jako dynamická nestabilita, je to koexistence polymerizace (růstu) a depolymerizace (rozpadu) MT. Z polymerizace se mohou MT rychle depolymerizovat (katastrofa), a z katastrofy se MT mohou zase prodlužovat, což je tzv. záchranná polymerizace (Obr. 5). Depolymerizace je charakteristická rychlou ztrátou GDP-tubulinových podjednotek z konců mikrotubulů (Desai a Mitchison, 1997; Walker a kol., 1988). Poločas rozpadu jednoho mikrotubulu je velice variabilní, může to být několik minut, ale i mnohem méně. Aby byl mikrotubul stabilizován, nasedne na konec stabilizační čepička, která zabráni nasednutí dalšího heterodimeru. Stabilizace může vyplývat i z přechodné interakce konce mikrotubulu s jinými buněčnými faktory (Caplow, 1992; Goddard a kol., 1994).



Obr. 5: Grafické znázornění dynamické nestability mikrotubulů (podle Inoué a Salmon, 1995).

Aby mikrotubulová vlákna mohla plnit nespočet funkcí, musí být schopna komunikovat s ostatními složkami buňky, jako jsou další mikrotubuly, aktinová filamenta, organely, plazmatická membrána, ale i další makromolekuly a makromolekulární komplexy. K této komunikaci slouží MAP proteiny (proteiny asociované s mikrotubuly; Goddard a kol., 1994). Rostlinné MAP proteiny můžeme rozdělit do skupin podle funkce. MAP, které zajišťují zesíťování MT, se vážou na + konce MT. Regulující růst a spojení GTP-tubulinů MT, sloužící jako motorové proteiny (Gardiner, 2013; Komis a kol., 2015). Další skupinou MAP jsou ty, které regulují správné složení tubulinových jednotek (Gu a kol., 2008; Komis a kol., 2015). Nejdůležitější funkcí MT je zajištění správného rozdělení buňky. V buněčném dělení MT tvoří preprofázní svazek (PPB), který určuje správnou rovinu dělení, dále pak dělicí vřeténko, které

zajišťuje správné rozdělení chromozomů (genetické informace), a fragmoplast, který zabezpečuje rozdělení obsahu buňky (Goddard a kol., 1994).

Aktin je globulární protein (G-aktin), který má okolo 42 000 Da (Sheterline a kol., 1998). Genom *Arabidopsis thaliana* obsahuje 10 *AKTIN* genů, dva z nich jsou zřejmě pseudogeny (McDowell a kol., 1996). Jednotlivé izoformy jsou specifické pro určité části rostliny např. ve vegetativních orgánech se exprimují *ACT2*, *ACT7* a *ACT8* geny (Gilliland a kol., 2003) a v reprodukčních pletivech jsou exprimovány *ACT1*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT11* a *ACT12* geny (Huang a kol., 1997). Ve srovnání s mikrotubuly mají aktinová vlákna rozmanitější intracelulární organizaci. Závisí to také na typu buňky a jejímu způsobu růstu a diferenciaci. V difúzně rostoucích rostlinných buňkách tvoří aktin propracovanou síť kortikálních, paralelně uspořádaných mikrofilament, které často kolokalizují s kortikálními mikrotubuly. Aktinová vlákna se podílejí na buněčném dělení společně s mikrotubuly, na růstu buňky, podporují cytoplazmatické proudění a polohu organel. Aktinová vlákna také asociují s tonoplastem, což určuje velikost a tvar vakuoly a může to mít souvislost s udržení funkce tonoplastových iontových kanálů, které koordinují růst buňky, pohyb prùduchů a osmotickou rovnováhu (Higaki a kol., 2006; Komis a kol., 2015). Při normálních růstových podmínkách se tyto monomerní jednotky G-aktinu samy asociují do polymerních struktur nazývaných filamenta aktinu (F-aktin) nebo též aktinová mikrofilamenta (MF). Aktinová filamenta se podobají šňůrce perel, které mají v průměru 7 nm a strukturu pravotočivé spirály, kdy na půl otáčky náleží 13-14 podjednotek. Polymerizace je dána hydrolyzou ATP. Polarita aktinových filament je zabezpečena vnitřní asymetrií podjednotky a prodlevou mezi hydrolyzou a připojením další ATP molekuly. Aktinová filamenta mají také + a – konec jako MT. Na plus konci se rychle hydrolyzují ATP molekuly, dochází k růstu MF a na mínus konci dochází k pomalejšímu růstu. Musí ale být zachována rovnováha mezi růstem a smršťováním (Staiger, 2000). Dynamická povaha aktinového cytoskeletu je dána přítomností proteinů asociovaných s aktinem (ABP) a jejich rozložením v buňce. Jsou opět rozdělené do kategorií podle funkce, podobně jako MAP proteiny. Jsou to proteiny, které se váží a/nebo kryjí monomerní aktinové jednotky (proteiny vážící se na G-aktin); regulátory polymerizace/depolymerizace F-aktinu; proteiny zajišťující síťování F-aktinu a myozinové motorové proteiny. Nejznámější proteiny vážící se na G-aktin jsou profiliny (Komis a kol., 2015; McCurdy a kol., 2001; Staiger, 2000). V genomu *Arabidopsis* bylo osekvenováno 5 genů (*AtPRF1–AtPRF5*). Profiliny plní úlohu maskování monomerních jednotek, čím dochází k depolymerizaci F-aktinu (Xue a Robinson,

2013). Profiliny jsou spojeny i s MAPK (mitogen-aktivované protein kinázy) signalizací (Komis a kol., 2011; Komis a kol., 2015).

2. 3 Rostliny ve stresových podmínkách

Rostliny jsou přisedlé organizmy, a proto si vyvinuly různé mechanismy pro kontrolu růstu a vývoje v nepříznivých environmentálních podmínkách a při působení různých stresů, aby přežily. Kontrola buněčných procesů a růstu hraje zásadní roli při reakcích celých rostlin na nedostatek vody. Růst buněk v důsledku buněčné expanze je regulován díky udržování turgorového tlaku, což je fyziologická síla, která působí proti buněčné stěně. Je udržován osmotickou regulací pomocí osmoticky aktivních látek, jako jsou např. ionty draslíku (K^+), cukry nebo aminokyseliny (Osakabe a kol., 2013). Environmentální stresové podmínky mohou mít často společný nepříznivý účinek. Největším rizikem pro rostliny je nedostatek vody, způsobený extrémním suchem nebo též způsobené vysokým osmotickým tlakem (vysoké koncentrace rozpuštěné látky), což rostlině ztěžuje přístup k vodě (Kumari a kol., 2014). Stresové podmínky snižují výnos plodin. Podle studií OSN se v roce 2050 zvýší počet obyvatel planety až na 9 miliard, takže tlak na větší výnos zemědělským plodin bude neustále narůstat. Další tlak na vývoj odolnějších rostlin je dán klimatickými změnami, aby rostliny odolávali vyšším teplotám, většímu zasolení půd a vody, a také vyššímu druhovému počtu škůdců. Poznání biologické podstaty stresových faktorů a působení těchto faktorů na buněčné a molekulární úrovni rostliny je prvním předpokladem k nalezení vědeckého a účinného řešení tohoto globálního problému (Godfray a kol., 2010; Smith a Smet, 2012).

2. 3. 1 Biologická podstata abiotických stresů

2. 3. 1. 1 Solný stres

Tomuto druhu stresu je věnován největší zřetel, protože vysoká koncentrace soli v půdě má největší vliv na růst rostlin. Odpověď rostlin na solný stres má společné rysy s odpovědí na zhoršené podmínky i s ostatními stresy (Zagorchev a kol., 2014). Solný stres je dán vysokou koncentrací chloridu sodného (NaCl). Koncentrace NaCl se zvyšuje díky mnoha faktorům, jako lidská činnost, vypařování a srážení vody a zvětrávání hornin (Smékalová a kol., 2013). Účinek solného stresu funguje na několika úrovních. Prvním a nejpatrnějším účinkem je snížení osmotického potenciálu půdního roztoku, což způsobuje sníženou dostupnost vody pro rostliny. Z biochemického hlediska je to stejný účinek jako nedostatek vody (suchá půda). Příjem solných iontů, zejména pak Na^+ , je přímo toxický pro rostlinné buňky. Do buňky jsou

transportovány pomocí nespecifických kationtových kanálů. Zvýšená koncentrace těchto iontů v cytoplazmě způsobuje závažné inhibiční účinky enzymatické aktivity, což následně ovlivňuje funkci metabolických drah. Solný stres může vést i k nutriční nerovnováze (Zagorchev a kol., 2014).

2. 3. 1. 2 Osmotický stres

Osmotický (hyperosmotický) stres úzce koreluje se solným stresem. Při vysokých koncentracích solí může zhoršit jejich negativní účinky. V experimentálních podmínkách se ale spíše navozuje přidávkem vysokých koncentrací inertních cukrů, jako je mannitol nebo sorbitol, než přidávkem NaCl (Smékalová a kol., 2013). Přítomnost těchto látek v půdním roztoku opět koreluje se sníženou dostupností vody pro rostliny. Osmotický stres v rostlinách navozuje syntézu kyseliny abscisové (ABA). Kutikula nejenže hraje roli jako bariéra před ztrátou vody, ale zprostředkovává i signalizaci tolerance k osmotickému stresu a tedy k syntéze a signalizaci ABA kyseliny (Wang a kol., 2011).

2. 3. 1. 3 Oxidativní stres

Oxidativní stres je navozen zvýšenou koncentrací ROS (reaktivních forem kyslíku), které se za normálních podmínek produkují aerobním metabolismem. Jejich vysoká koncentrace je vyvolána různými formami abiotických stresů, jako je extrémní teplota, genotoxické záření, stres daný nedostatkem vody nebo naopak velkým množstvím vody, ale také patogenními invazemi. ROS hrají významnou roli jako signální molekuly, které regulují nespočet biologických procesů, jako je růst a vývoj. Uplatňují se ale i v odpovědích rostlin na biotické a/nebo abiotické stimuly, což dále vede k MAPK signalizaci. Koncentrace ROS v buňce musí být regulována. Vysoké koncentrace ROS jsou toxické. Detoxifikace v rostlinách je zajišťována NADHP oxidázami, ale také antioxidačními enzymy, např. katalázou a superoxid dismutázou (Baxter a kol., 2014; Capone a kol., 2004; Smékalová a kol., 2013; Suzuki a kol., 2012).

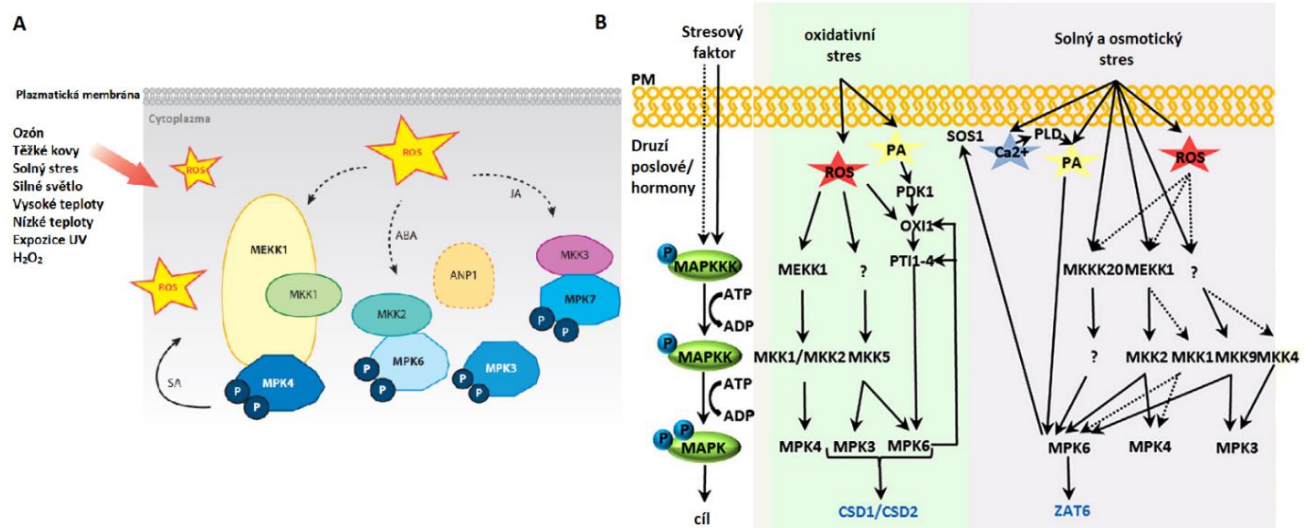
2. 3. 2 Reakce rostlin na abiotické stresy

Abiotické stresy ovlivňují rostliny v různých stádiích vývoje, vegetativního růstu, rozmnožování i produkce (pokud je rostlina zemědělsky důležitá; Vallejo a kol., 2010). Většinou je při nedostatku vody nejvíce postižena nadzemní část, která má výrazně zredukovaný růst oproti kořenům. Menší poměr ve velikosti nadzemní části ke kořenům je pro rostliny výhodnější pro přežití ve stresových podmínkách. Je možné, že rostliny si vyvinuly

systemy pro redukci růstu za nepříznivých podmínek, aby se jim zvětšila šance pro přežití. Dá se říct, že redukce růstu je za těchto podmínek aktivním procesem. V případě solného stresu je dokázáno, že je redukce růstu částečně modulována represorovými proteiny (Achard a kol., 2006; Kumari a kol., 2014). Ale ani kořen nezůstane beze změn. Stresové faktory, a především solný stres, mohou snižovat prodlužování kořene, měnit jeho architekturu, ovlivňovat gravitační odpovědi, měnit anatomii kořene přes zmenšování velikosti buněk a snížení četnosti buněčného dělení (Jiang a kol., 2016).

2. 3. 3 Aktivace signálních drah rostlin při abiotických stresech

Každá forma abiotického stresu má svůj specifický vliv na rostliny. Nacházíme ale i hodně společných faktorů v odpovědích rostlin na buněčné úrovni. Prvotními faktory jsou zejména změna redoxního potenciálu, tvorba ROS a zvýšení hladiny vápníku (Ca^{2+}). Následně jsou abiotickými strese indukované signální dráhy MAPK (Obr. 6A; Rodriguez a kol., 2010; Smékalová a kol., 2013). MAPK tvoří rozmanitou serin/treoninovou rodinu kináz, které jsou přítomné u všech eukaryontních organizmů. Signální modul tvoří sekvenci 3 kináz, které se postupně fosforylují. Jako první jsou MAPKKK, které fosforylují MAPKK. Posledním článkem jsou MAPK, které předávají signál dál. U *Arabidopsis thaliana* bylo identifikováno 80 různých MAPKKK, 10 MAPKK a 20 MAPK kináz (Komis a kol., 2011).



Obr. 6: MAPK signalizace indukovaná stresovými faktory. A) Hromadění ROS uvnitř buněk při působení různých druhů abiotických stresů. Indukce MAPK kaskády díky vzniklému oxidativnímu vzplanutí, která může regulovat koncentraci ROS. MAPK signalizace může být zprostředkována i pomocí hormonální aktivace (podle Rodriguez a kol., 2010). B) Identifikované MAPK dráhy, které se aktivují při působení konkrétních stresových faktorů (podle Smékalová a kol., 2013).

Primárním faktorem při aktivaci signálních drah solným nebo osmotickým stresem je aktivace specifických kanálů a změny koncentrace iontů v buňce. Následně dochází k produkci sekundárních posílů nebo hormonů, které dále předávají signál MAPK kaskádě. Pro solný stres je typická produkce Ca^{2+} , pro osmotický stres je typická produkce ABA. Tyto dva stesy jsou úzce spojené a vedou k hromadění ROS, indukci produkce fosfatidové kyseliny, což zprostředkovává PLD (fosfolipáza D), a ke hromadění oxidu dusnatého (NO). Pro oxidativní stres je také typické hromadění ROS. Následně u signalizace všech stresových faktorů dochází k aktivaci MAPK kaskád. Nejdůležitějšími MAPK, které jsou indukovány abiotickými stresovými faktory u *A. thaliana*, jsou MPK3, MPK4 a MPK6. Přesné fosforylační dráhy jsou znázorněny na obrázku 6B. Takto zprostředkované signalizační dráhy jsou časově delší, a jejich konečným cílem je aktivace genové exprese (Colcombet a Hirt, 2008; Rodriguez a kol., 2010; Smékalová a kol., 2013).

2. 3. 4 Vliv abiotických stresů na cytoskelet rostlin

Aktivace signálních MAPK kaskád abiotickými stesy vede buď ke změnám v regulaci genové exprese, což může být proces poněkud delší, nebo dochází k rychlejší subcelulární reorganizaci, která je způsobena aktivací cytoplazmatických faktorů. To zahrnuje modulaci cytoskeletu, což je dáno fosforylací substrátů spojených s cytoskeletem (Šamajová a kol., 2012). Bylo dokázáno, že reorganizace kortikálních mikrotubulů je spojena s odpovědí rostlin na solný stres. Mikrotubuly hrají roli v regulaci aktivity vápníkových kanálů, což vede k změně buněčné koncentrace Ca^{2+} , který je důležitý jako sekundární posíl v reakcích rostlin na solný stres. ROS, které se produkují u všech abiotických stresů, se podílejí na fragmentaci MT. ABA, která je další hlavní signalizační molekulou při působení abiotických stresů, také způsobuje reorganizaci MT. Reorganizace, depolymerizace a fragmentace MT ale napomáhají k tomu, aby rostlina přežila při působení abiotických stresů, a přispívají i ke zvýšení rezistence vůči těmto faktorům (Wang a kol., 2007; Wang a kol., 2010). Bylo dokázáno, že i dynamika aktinového cytoskeletu koreluje s odpověďmi rostlin na abiotické stesy. Např. při nízkých teplotách se aktinový cytoskelet depolymerizuje a stimuluje tím příjem Ca^{2+} iontů do buňky. Solný stres indukuje depolymerizaci aktinu, což koreluje se snížením rychlosti růstu buněk a následně pak celých rostlin. Po aplikaci látek stabilizujících aktin na rostliny (jako je faloidin) se ovšem rezistence rostlin na solný stres zvyšuje. Dynamika aktinových filament je důležitá i při regulaci lokální koncentrace ROS, což je esenciální zejména pro růst kořenových vlásků. Uplatňuje se ale i při působení abiotických stresů, při kterých se ROS hromadí (Liu a kol., 2012; Orvar a kol., 2000).

2. 3. 5 Adaptační a rezistence rostlin na abiotické stresy

Rostliny jsou přilehlé organismy, takže si museli vyvinout mechanismy, které jim pomohou k přežití v různých environmentálních podmínkách. Tyto mechanismy musí přizpůsobit své fyziologii, růstu a vývoji, což zahrnuje rychlou a dynamickou regulaci enzymatické aktivity, ale také změny v genové expresi. V těchto procesech tedy hrají důležitou roli MAPK signální kaskády, které vedou k aktivaci exprese, nebo naopak k potlačení exprese různých genů, což je důležité při adaptaci na stresové faktory (Colcombert a Hirt, 2008; Smékalová a kol., 2013). Např. oxidativní stres vede k aktivaci MAPK fosfátazy 2 (MKP2), která defosforyluje MPK3 a MPK6, což zvyšuje toleranci rostliny k oxidativnímu stresu. U oxidativního stresu je však nejdůležitější přítomnost a aktivita antioxidantních enzymů, které snižují toxicitu ROS. U solného a osmotického stresu se aktivuje MPK4 a MPK6 pomocí nadřazené MKK2. Zjistilo se, že tato aktivace je důležitá při toleranci na tyto dva stresy, protože *mkk2* mutanti vykazují vyšší citlivost (Colcombert a Hirt, 2008; Šamajová a kol., 2013; Teige a kol., 2004). Na druhou stranu MKK9, která fosforyluje MPK3 a MPK6, má negativní vliv na toleranci rostlin k solnému a osmotickému stresu, protože *mkk9* mutanti jsou odolnější k těmto stresům (Lee a Ellis, 2007; Smékalová a kol., 2013). Většina stresových faktorů způsobuje sekundárně nedostatek vody v rostlině, a proto musí rostliny zabezpečit, aby ji dále neztrácely. Mají k tomu uzpůsobené dva mechanismy, krátkodobý a dlouhodobý. Jako krátkodobá reakce na nedostatek vody se uplatňuje uzavření průduchů. Uzavřením průduchů rostlina zamezuje vypařování vody, ale inhibuje se tak i příjem CO₂. Proto tato odpověď je kompromis mezi ochranou před ztrátou vody a efektivitou fotosyntézy. Dlouhodobější mechanismus zahrnuje produkci různého rostlinného materiálu, který kompenzuje změny cytoplazmatického osmotického potenciálu, Tento mechanismus sice zpomaluje růst, ale zabezpečuje ochranu buněk (Kumari a kol., 2014). V reakci rostlin na biotické stresové faktory se uplatňuje vrozený imunitní systém rostlin, který se aktivuje při napadení patogeny. Aktivuje se buď imunita spouštěná patogen-asociovaným molekulárním vzorem (PTI), anebo spouštěná efektoem (ETI; Rasmussen a kol.; 2012; Smékalová a kol., 2013).

2. 4 Charakterizace experimentálních rostlin *Arabidopsis thaliana*

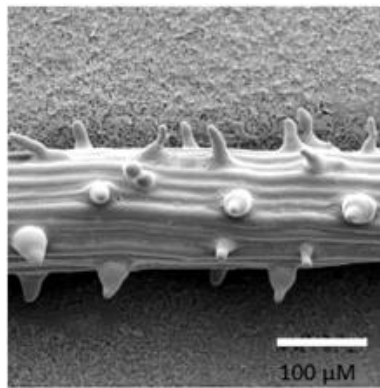
2. 4. 1 Kontrolní rostliny *Arabidopsis thaliana*, ekotyp C24

Ekotyp *Arabidopsis thaliana* C24 se v experimentální praxi využívá méně v porovnání s ekotypy Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (*Ler*) nebo Wassilewskija (Ws). C24 je laboratorním ekotypem s neznámým původem. Na rozdíl od Col-0, která má původ v Polsku (výběr z originální Landsberg populace). Fenotypově tyto dva ekotypy na první pohled nejsou odlišné. Některé růstové rozdíly však byly popsány. C24 má pomalejší průměrný růst kořene než Col-0, a to skoro o polovinu. Platí to i pro délku zralých kortikálních buněk kořene. Průměr dělicích se buněk je skoro stejný a to samé platí i pro průměrnou dobu trvání buněčného cyklu (Beemster a kol., 2002). C24 se převážně využívá ve výzkumu kvetení, protože se ukázalo, že je středně-pozdně kvetoucí ekotyp. Znamená to, že kvete později než jiné využívané kontrolní ekotypy, jako jsou Col-0 nebo *Ler* (Landsberg *erecta*) rostliny (Stangeland a kol., 2009).

2. 4. 2 Mutace rostlin *Arabidopsis thaliana* postihující aktinový cytoskelet

Jak už bylo zmíněno, *Arabidopsis* obsahuje 8 hlavních aktinových izoform (ACT1-ACT8), které jsou převážně exprimovány ve vegetativních pletivech nebo v reprodukčních orgánech. Ve vegetativních pletivech jsou exprimovány ACT2, ACT7 a ACT8. Izoformy ACT2 a ACT8 jsou skoro stejné, liší se jen v jednom aminokyselinovém reziduu (McDowell a kol., 1996; Ringli a kol., 2002). To, že se několik aktinových izoform exprimuje ve stejné části rostliny ukazuje, že jsou si tyto izoformy velice podobné. Avšak komplementární interakce jednotlivých izoform je důležité při flexibilní a dynamické reakci rostlin na měnící se podmínky (Meagher a kol., 1999; Ringli a kol., 2002). Bylo připraveno mnoho mutantních rostlin *Arabidopsis* při specifikaci funkcí jednotlivých izoform aktinu. Mutantní rostliny se připravovaly buď chemicky-indukovanou bodovou mutagenézí pomocí EMS (ethylmethan sulfonát), nebo T-DNA inzerční mutagenézí. V této práci byl použit aktinový mutant *der1-3* (*deformed root hair1*). *DER1* lokus kóduje AKTIN2 (ACT2), což je hlavní aktin produkovaný ve vegetativních orgánech. Tento mutant byl připraven EMS mutagenézí kontrolních rostlin ekotypu C24. Bylo izolováno více forem mutací, tedy mutace v různých alelách *DER1* lokusu. Byly dosaženy tři alelické mutace *DER1* lokusu (*der1-1*, *der1-2*, *der1-3*), kdy každá měla jinou sílu při změně fenotypu. Charakterizace *der1* rostlin ukázala, že ACT2 je důležitý v celém procesu tvorby kořenového vlásku. Nejvíce byly ovlivněny tyto procesy: určení místa vytvoření výdutě vlásku; poloha růstu vlásků z „bulge“; celkový růst kořenového vlásku. Mutant *der1-3* a *der1-2* mají

nejsilnější fenotyp, nejvíce postihují délku kořenových vlásků, a „bulge“ se občas vytvoří buď ve středu trichoblastu nebo i na distálním konci buňky (Obr. 7).



Obr. 7: Fenotyp aktinového mutanta *der1-3* (podle Ringli a kol., 2002).

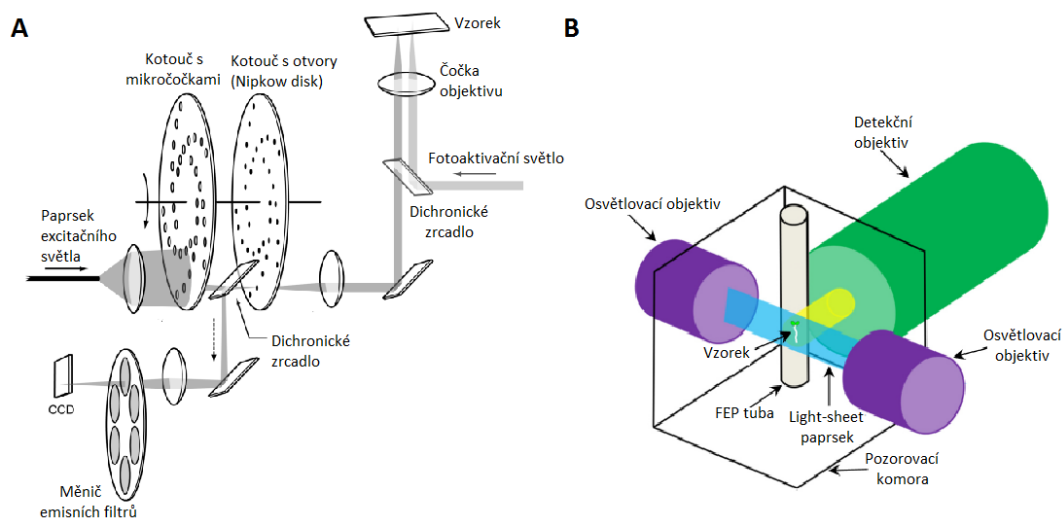
C24 ekotyp byl vybrán proto, že DNA polymorfismus v *der1-2* alele, vybrané k mapování mutace *DER1* genu, má podobnou frekvenci jako u Col-0 a *Ler* ekotypu. Tudíž byly použity oba tyto ekotypy, které už jsou zmapované (Ringli a kol., 2002). Byly připravené i další mutantní rostliny v *ACT2* genu. Mutace *act2-1*, která byla připravena pomocí T-DNA inzerce je umístěná na začátku prvního exonu (Exon 1/2) kódující *ACT2* protein. Zjistilo se, že tato inzerce plně narušuje expresi *ACT2* RNA a celkově snižuje hladinu aktinového proteinu ve vegetativních orgánech. Fenotypicky se rostliny podobají *der1* mutantům, protože mají kratší kořenové vlásky než kontrolní rostliny (o 10-70%), ale výdutě se tvoří na správném místě, tedy na bazálním konci trichoblastu. Když byla *act2-1* mutace zkombinována s další mutací ve vegetativním aktinu *act7-1*, vykazoval vzniklý dvojitý mutant rozsáhlé synergické fenotypy v rozmezí od vysoké vývojové úmrtnosti přes velice malý vzrůst. *Act2-1* mutace byla zvrácena jak transgenní nadexpresí *ACT7* (izoforma ve vegetativních pletivech), tak ektopickou expresí *ACT1* (izoforma v reprodukčních orgánech). Kořenové vlásky rostly korektně, což naznačuje, že normální regulace *ACT2* genu je zásadní pro správnou elongaci kořenového vlásku a už jen malé rozdíly v regulaci exprese mohou způsobovat defekty (Gilliland a kol., 2002). Ukazuje to na škodlivý účinek těchto mutací, protože mutantní alely se vyskytují v nižší frekvenci u potomstva heterozygotních rostlin. Tyto druhy aktinových genů mohou být důležité při rostlinném vývoji (Gilliland a kol., 1998). Jako poslední příklad uvedeme mutanta *fiz1* (*fizzy1*), dominantního aktinového mutanta, který má vyměněnou jednu aminokyselinu v hydrofobní smyčce *ACT8*, což je důležitá část pro polymerizaci aktinových filament. Pomocí vitální mikroskopie bylo prokázáno, že u *fiz1* mutanta se semi-dominantně vyskytuje fragmentace aktinového cytoskeletu, což mělo za následek i ovlivnění dynamiky pohybu mitochondrií a Golgiho váčků. Z těchto výsledků bylo stanoveno, že *fiz1* mutace má dominantně-negativní

účinek na polymerizaci aktinu, což způsobuje narušení funkce dynamiky aktinového cytoskeletu i pohybu organel. Tyto mutantní rostliny byly izolovány z EMS mutagenese rostlin mutantů *sgr2* (*shoot gravitropism 2*), které mají problém v gravitropismu nadzemní části. Fenotypově tyto rostliny měli vůči kontrole menší nadzemní části (až o 40-70%). Délka buněk v bazální části nadzemních orgánů byly o 60-90% menší. Tyto výsledky ukazují, že defekty ve velikosti nadzemních částí *fiz1* mutantu byly především způsobeny inhibicí buněčné elongace a částečně pak inhibicí buněčné proliferace. Semi-dominantní inhibice růstu byla rovněž pozorována i v kořenech a ostatních rostlinných orgánech. Aktinový mutant *fiz1* je nový a odlišný od mutantů, které byly charakterizovány jako aktinová mutanti s defektem ve vývoji kořenových vlásků v publikacích Ringli a kol., 2002 (*der1* mutant jako recesivní alela) a Nishimura a kol., 2003 (mutace v genu *ACT2*, ale jako semi-dominantní alela *act2-2D*). Fenotyp těchto mutantních rostlin je odlišný vůči *fiz1* mutantu (Kato a kol., 2010).

2. 5 Mikroskopické metody studia rostlin metodou „live cell imaging“

Cytoskelet je dynamická struktura buňky, proto musíme k pozorování zvolit takovou mikroskopickou techniku, která dokáže tento pohyb zaznamenat. Zvoleny byly dvě moderní mikroskopické techniky: 1. Spinning-disk konfokální mikroskopie (SD), 2. Light-sheet fluorescenční mikroskopie (LS). SD mikroskopie se často využívá na krátkodobější pozorování cytoskeletu na buněčné úrovni. LS mikroskopie slouží k dlouhodobějšímu sledování vývoje a růstu rostlin na buněčné, pletivové a orgánové úrovni. SD je vysokorychlostní metoda pořizující optické řezy, můžeme ní pozorovat a analyzovat intracelulární distribuci fluorescenčně značených markerů při vysokém prostorovém i časovém rozlišení. Tato metoda je založena na přítomnosti rychle rotujícího disku s perforacemi (Nipkow disk), což vytváří tisíce světelných bodů (paprsků; Obr. 8A). Všechny paprsky svítí na vzorek současně a pomocí kamer s vysoko výkonnými čipy se přímo zachycuje konfokální obraz s nízkým nespecifickým pozadím. Může být dosaženo rychlosti snímání až 1000 snímků za sekundu. SD mikroskopie se používá hlavně kvůli rychlosti snímání, ale má i své nevýhody. Při nízké intenzitě fluorescence je nutné zvýšit intenzitu osvětlení, což může způsobit větší foto-poškození preparátu. Každý bod se během snímání rozsvítí několik set krát, a obraz je výsledkem mnoha krátkých expozic při nízké intenzitě excitačního světla. Oproti tomu, u typické konfokální mikroskopie je každý bod rozsvícen jen jedenkrát při pořízení jednoho snímku (řezu), ale má to za následek velké prodlevy při snímání preparátu a vyžaduje to vysokou intenzitou excitačního světla. Konfokální mikroskopii proto nelze využít ke sledování dynamických procesů v buňce (Stehbens a kol., 2012; Wang a kol., 2005). U LS fluorescenční mikroskopie

se využívá tenký plochý paprsek fotonů („light-sheet“), který svítí na vzorek z obou stran a detekce probíhá kolmo k těmto paprskům (Obr. 8B). Excitace fluoroforů je limitovaná jen na excitační paprsek a emise nevychází z jiné zóny kromě tohoto paprsku, což výrazně snižuje vysvícení sousedních částí vzorku. Důležité ale je, aby ohnisková rovina spojení dvou tenkých osvětlovacích paprsků byla shodná s rovinou zaostření objektivu používaného ke snímání vzorku (Ovečka a kol., 2015). Tato metoda byla vyvinuta, aby splnila prostorové, časové a fyziologické standardy pro dlouhodobé snímání živých preparátů při optimálních podmínkách ve vývojové biologii (Huisken a kol., 2004).



Obr. 8: Diagram světelného paprsku A) Spinning-disk konfokální mikroskopie (podle Stehbens a kol., 2012); B) Light-sheet fluorescenční mikroskopie (Ovečka a kol., 2015).

Hlavní výhodou LS mikroskopie je možnost pozorovat celý organizmus, např. semenáčky *Arabidopsis thaliana*, delší dobu. Možnost dlouhého pozorování živých vzorků slouží převážně k vývojovým studiím. U běžně používaných mikroskopických metod se vzorky připravují do mikroskopických komůrek (skel), kde má rostlina malý prostor pro růst, v mikroskopu je v nesprávné poloze vůči gravitaci a rychle vyčerpává živiny z malého množství média. Tyto limitace neumožňují dlouhodobější skenování bez ovlivnění viability. Další výhodou LS je již zmíněný „light-sheet“ paprsek, což výrazně snižuje fototoxicitu a vysvícení fluorescenčního signálu ve vzorcích. Vzorky jsou připraveny např. v FEP tubách, které jsou vyplněny větším množstvím média s živinami a rostliny jsou umístěny v mikroskopu ve směru gravitace. Rostliny tak mají lepší podmínky pro růst než v mikroskopických komůrkách. Příprava vzorků může být však časově náročná a musí zabezpečit optimální podmínky pro dlouhodobé snímání. Vzorek musí mít fluorescenčně značenou buněčnou strukturu. Následné zpracování získaných dat je časově velice náročné, protože je nutné zpracovávat data až v řádech gigabytů a terabytů (Dunsby, 2008; Huisken a kol., 2004; Maizel a kol. 2011; Ovečka a kol., 2015).

3. CÍL PRÁCE

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše na téma odpověď rostlinných buněk na abiotický stres se zaměřením na podíl cytoskeletu. Souhrn fenotypových projevů u stresovaných rostlin na úrovni pletiv, orgánů a celých rostlin, aktivace signálních drah při odpovědi na stres a význam cytoskeletu v řízení fenotypových změn.

Praktická část

1. Optimalizace kultivačních podmínek kontrolních a mutantních rostlin *A. thaliana in vitro* pro řízenou aplikaci abiotických stresových faktorů, charakteristika fenotypových změn v reakci na stres, kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování růstových parametrů kořene.
2. Transformace kontrolního a mutantního genotypu konstrukty nesoucí geneticky kódované markery pro aktinový a mikrotubulový cytoskelet, selekce transformovaných rostlin a jejich charakteristika v podmínkách abiotických stresů.
3. Mikroskopické studium změn struktury a dynamických parametrů cytoskeletu v živých buňkách kořene transformovaných rostlin v podmínkách abiotických stresů.
4. Popis vývojových změn kořenových buněk na mikroskopické úrovni se zřetelem na podíl cytoskeletu při buněčném dělení, expanzi a diferenciaci.

4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4. 1 MATERIÁL

4. 1. 1 Použité chemikálie

- 70 % a 96 % etanol (Penta)
- Destilovaná voda
- FM 4-64, N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(8-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid (Life Technologies)
- Fosfotricin - Basta (Duchefa)
- Hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich)
- Kanamycin (Sigma-Aldrich)
- LB (Lysogeny broth) médium (Sigma-Aldrich)
- Médium (Murashige and Skoog medium, Duchefa)
- MiliQ voda
- NaCl (Sigma-Aldrich)
- Paraquat (Sigma-Aldrich)
- Phytigel (Sigma-Aldrich)
- Rifampicin (Duchefa Biochemie)
- Sacharóza (Sigma-Aldrich)
- Silwet L-77 (AgroBio)
- Sorbitol (Duchefa-Biochemie)
- Ticarcillin (Duchefa Biochemie)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich)
- YEB (Yeast extract beef) médium (Plant Media)

4. 1. 2 Použité přístroje

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Waga Elektroniczen)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO, Germany)
- Epifluorescenční mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Fotoaparát (Nikon 7000, makroobjektiv Sigma 50 mm, 2.8)

- Fytotron (WEISS Gallenkamp)
- Chladnička laboratorní (Electrolux, Space Plus, ERB 34633W)
- Konfokální mikroskop (LSM 710, Axio Imager Z2, ZEISS, operační program ZEN Black 2012)
- Kultivační komora (AR-41L2I, Percival)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL-Engineering)
- Laminární box biohazard (Faster, FERRARA Italy)
- Laserový mikroskop pro live cell imaging (Spinning disk, Axio Observer Z1, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Lightsheet mikroskop (Lightsheet Z. 1, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- Parní sterilizátor (Sterivap, BMT MMM Group Medical Technology)
- pH metr stolní (TEMP RS232, PL-600 pH/mV/Temp Meter, EZODO)
- Skener (Image Scanner III)
- Spektrofotometr (Smart SpecTM plus, Bio-Rad)
- Stereomikroskop (binokulární mikroskop, Leica M165FC, operační program LAS V 4.0, Leica)
- Třepačka ES-20 (Orbital Shaker-Incubator ES-20, BioSan)

4. 1. 3 Použité roztoky a média

Sterilizační roztok na povrchovou sterilizaci semen

1% hypochlorid sodný, 0,05% Tween 20

10 ml 10 % hypochlorid sodný

90 ml dH₂O

Doplněno do 100 ml s přídatkem pár kapek Tween 20

Pevné kultivační ½ MS médium

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)

10 g.l⁻¹ sacharóza

6 g.l⁻¹ phytigel

dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

Tekuté kultivační ½ MS médium

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)

10 g.l⁻¹ sacharóza
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
5,844 g.l⁻¹ NaCl
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
36,44 g.l⁻¹ sorbitol
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,1 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním
100 µl paraquat

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,2 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza
6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním
200 µl paraquat

Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,5 µmol.l⁻¹ PQ

2,2 g.l⁻¹ Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l⁻¹ sacharóza

6 g.l⁻¹ phytigel
dH₂O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním
500 µl paraquat

YEB médium

16,3 g.l⁻¹ YEB médium
dH₂O, pH 7,2, sterilizováno autoklávováním

LB médium

25 g.l⁻¹ LB médium
dH₂O, pH neupravováno, sterilizováno autoklávováním

4. 1. 4 Biologický materiál

Agrobacterium tumefaciens GV3101 (pMP90) – bakteriální glycerolová inokula nesoucí konstrukty 35S::*FABD2-GFP*; 35S::*MBD-GFP*

Arabidopsis thaliana – divoký typ (ekotyp C24)

Arabidopsis thaliana - mutant *der1-3* (*deformed root hairs1*) na pozadí ekotypu C24

4. 2 METODIKA

4. 2. 1 Příprava kultivačních médií pro *in vitro* kultivaci rostlin *Arabidopsis*

- Pro kultivaci rostlin *in vitro* bylo použito komerčně dostupné kompletní MS (MURASHIGE & SKOOG) médium (Duchefa Biochemie), které slouží jako zdroj mikro a makro elementů. Pro kultivaci rostlin *Arabidopsis* bylo připraveno v poloviční koncentraci. Jako zdroj uhlíku byla přidávána sacharóza (Sigma-Aldrich) v koncentraci 1% (10 g/l) a pro zpevnění média Phytigel (Sigma-Aldrich) o koncentraci 0,6% (6 g/l), což je syntetická látka, která nahrazuje agar. Médium bylo ředěno destilovanou vodou a v našem případě nebyly přidávány vitamíny.
- Bylo připraveno 250 ml kultivačního média (0,75 g MS média, 2,5 g sacharózy a 1,5 g Phytagelu) do skleněných autoklávovacích lahví. V kádince s magnetickým míchadlem byly smíchány všechny komponenty a doplněny destilovanou vodou do 200 ml. Pomocí

0,1 mol.l⁻¹ KOH (hydroxid sodný) bylo upraveno pH na 5,8 a kvantitativně přeneseno do láhve. Po doplnění destilovanou vodou na 250 ml bylo médium následně sterilizováno v autoklávu.

- Média byla rozlévána a ponechána ke ztuhnutí v Petriho miskách v laminárních boxech. Skladují se zalepené při 4 °C.
- Abiotické stresy byly indukovány u rostlin kultivovaných na tuhých médiích s přidavkem konkrétních stres-vyvolávajících látek v účinné koncentraci (Tab. 1). Solný a zároveň osmotický stres byl indukován pomocí 100 mmol.l⁻¹ NaCl (chloridu sodného; Sigma-Aldrich), osmotický stres 200 mmol.l⁻¹ sorbitolem (Duchefa Biochemie) a oxidativní stres třemi různými koncentracemi paraquatu (PQ; Sigma-Aldrich).

| Typ stresu | Účinná koncentrace použité látky | Hmotnost či objem v 250 ml média |
|-------------------------|-----------------------------------|----------------------------------|
| Solný a osmotický stres | 100 mmol.l ⁻¹ NaCl | 1,461 g |
| Osmotický stres | 200 mmol.l ⁻¹ sorbitol | 9,11 g |
| Oxidativní stres | 0,1 μmol.l ⁻¹ PQ | 25 μl |
| | 0,2 μmol.l ⁻¹ PQ | 50 μl |
| | 0,5 μmol.l ⁻¹ PQ | 125 μl |

Tab. 1: Účinná koncentrace a objem použitých látek v kultivačním médiu pro indukci abiotických stresů.

4. 2. 2 Povrchová sterilizace semen

- Semena *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh, ekotyp C24, a mutanta *der1-3* (Ringli et al, 2002) byla připravena v plastových mikrozkuškových Eppendorf.
- V laminárním boxu byl přidán 1 ml 70% etanolu za občasného protřepání po dobu 2 min.
- Po odebrání poloviny množství byl přidán 1 ml roztoku 1% hypochloridu sodného s 0,05% Tween 20, který za neustálého protřepání působil 8 min.
- Po odebrání celého objemu byla semena promývána v 1 ml sterilizované destilované vody. Při promývání 3x po 2 min byl vždy odebrán veškerý objem, ale při posledním vymytí byla ponechána ve zkumavce nejméně čtvrtina objemu. Semena tak byla připravena k vysazení na média v Petriho miskách.

- K výsevu byly požitý sestrížené špičky na automatické pipety (2-20 µl), aby byl otvor stejně velký jako 1 semeno.
- Pomocí automatické pipety se semena natáhla do špičky a po jednom byla vysázena na připravené médium.
- Pro indukci a synchronizaci klíčení byly Petriho misky se semeny ponechány 2-3 dny ve 4 °C a následně přeneseny do fytotronu.

4. 2. 3 Transformace rostlin a selekce transgenních linií

- Transformace slouží k tomu, aby byl do rostliny vnesen určitý konstrukt za účelem fluorescenčního značení konkrétního proteinu prostřednictvím značky GFP (zelený fluorescenční protein). Naším cílem bylo značení proteinů vážících se na mikrotubulový cytoskelet (MBD-GFP, označovaný též jako MAP4-GFP; Tab. 2) a na aktinový cytoskelet (ABD2-GFP, označovaný též jako FABD2-GFP; Tab. 2).

| Typ konstruktů | Značení |
|-----------------------|---|
| <i>35S::FABD2-GFP</i> | „actin-binding domain of fibrin1" - jsou značena aktinová filamenta (Voigt et al., 1995, Wang a kol., 2008) |
| <i>35S::MBD-GFP</i> | „microtubule-binding domain of mammalian MAP4 protein" - jsou značeny mikrotubuly (Marc a kol., 1998; Komis a kol., 2014) |

Tab. 2: Seznam použitých konstruktů

- Pro transformaci byly použity rostliny divého typu (ekotyp C24) a mutanta *der1-3* staré 3 týdny, které rostly v květináčích. Před samotnou transformací (den předem) byly sestříhány už zralé tobolky se semeny, protože nejvhodnější jsou pro transformaci ještě nerozvinuté květy.
- Stabilní transformace u rostlin *Arabidopsis thaliana* byla provedena metodou Floral Dip (Clough a Bent, 1998; Davis a kol., 2009; Zhang a kol., 2006).

Postup transformace rostlin: První den večer byla připravena startovací kultura bakterií *Agrobacterium tumefaciens* kmen GV3101 (pMP90) s potřebným vloženým

konstruktem. U všech použitých konstruktů byl využit stejný bakteriální kmen. Do skleněných zkumavek bylo napipetováno 5 ml LB média, 15 µl hluboko zmraženého glycerolového inokula (- 80 °C) spolu s kombinací dvou selekčních antibiotik (Tab. 3). Směs byla třepána přes noc při 28 °C 150-200 RPM ve tmě. Zbylé inokulum bylo znovu zmrazeno pomocí kapalného dusíku a uloženo v hlubokomrazícím boxu.

| Konstrukt | Antibiotika (konečná koncentrace a objem v 5 ml) |
|-----------------------|---|
| <i>35S::FABD2-GFP</i> | Kanamycin (25 µg.ml ⁻¹ ; 2,5 µl) Rifampicin (100 µg.ml ⁻¹ ; 10 µl) |
| <i>35S::MBD-GFP</i> | Kanamycin (25 µg.ml ⁻¹ ; 2,5 µl) Rifampicin (100 µg.ml ⁻¹ ; 10 µl) |

Tab. 3: Seznam použitých antibiotik pro jednotlivá inokula

- Druhý den večer byla startovací kultura sterilně přelita do 200 ml YEB média v Erlenmayerové baňce, bez antibiotik, a třepána přes noc při 28 °C 150-200 RMP ve tmě.
- Třetí den, v den transformace, byly rostliny přeneseny do laboratoře, aby se adaptovaly. Následně byl ze suspenzí sterilně odebrán objem 1 ml do 2 ml plastových kyvet, pro měření optické density bakterií (OD₆₀₀) na spektrofotometru. Jako kontrola bylo použito čisté YEB médium. Optimální je hodnota OD₆₀₀ = 1, kulturu pak ředíme na hodnotu 0,8. Výpočet ředění: např. naměříme OD₆₀₀=0,966 a chceme vědět, kolik přidáme do 200 ml suspenze YEB média, abychom získali hodnotu 0,8.

$$x = 0,966/0,8*200-200 = \underline{41,5 \text{ ml}}$$

Kdyby se naměřila hodnota OD menší než 0,8, nechá se kultura bakterií ještě dále růst. V případě naměřené hodnoty OD větší jak 1, se nechá kultura bakterií třepat ve tmě při 100 RPM, aby se okysličovala.

- Následně, už nesterilně, byla nalita suspenze do kádinek, přidáno smáčedlo Silvet (100 µl/500 ml), které je důležité, aby se bakterie dostaly lépe do květů. Rostliny byly do suspenze postupně celé namáčeny, a to po dobu max. 10 sekund, jinak by mohlo dojít ke spálení květů.

- Do květináčů byly napíchny špejle a rostliny upevněny pomocí provázku. Všechny transformované rostliny byly posléze přikryty černým plastovým sáčkem a ponechány do druhého dne stabilizovat.
- Další den byly rostliny přeneseny do fytotronu a kultivované až do donesení semen T₁ generace.
- Transformace byla aspoň jednou zopakována, ovšem už bez stříhání zralých tobolek.

Selekce - Sesbíraná semena T₁ generace byla vysázena na tuhé médium s přidáním selekčním faktorem, specifickým pro daný značený protein (Tab. 4). Selekční faktory byly do média přidávány až po vyautoklávování. Přidán byl i ticarcilin, a to 250 µl na 250 ml. Ticarcilin blokuje růstu *Agrobacterií*, kdyby ještě nějaké přežily, což by mohlo negativně působit na selekci.

| Značený protein | Selekční faktor | Účinná koncentrace | Objem faktoru v 250 ml |
|-----------------|---------------------|-----------------------|------------------------|
| ABD2-GFP | BASTA (fosfotricin) | 8 µg.ml ⁻¹ | 40 µl |
| MAP4-GFP | BASTA (fosfotricin) | 8 µg.ml ⁻¹ | 40 µl |

Tab. 4: Účinné koncentrace selekčních faktorů v pevných médiích.

- Selekcce probíhala minimálně 2 týdny, přičemž přežily jen transformované rostliny. Ty byly ještě zkontrolovány v mikroskopu, zda mají správnou expresi fluorescenčního markeru. Posléze byly rostliny opět vysázeny do půdy, abychom získali další generaci semen, T₂ generaci.
- Z T₂ generace byly vybrány nejlepší rostliny, u kterých byla dosažena další generace, která by už měla mít stabilní expresi vloženého konstruktů (homozygotní linie).

4. 2. 4 Stanovení klíčivosti semen a kultivace na médiích indukujících stres

- Po vysazení semen na média byly misky přeneseny do 4°C, aby došlo k chladové indukci a synchronizaci klíčení semen. Po synchronizaci semena ve fytotronu klíčila během 24-48 h. Klíčivost semen byla sledována takovou dobu, než semena dosáhla 100 % vyklíčení. Klíčivost byla vyjádřena poměrem vyklíčených semen k celkovému počtu semen. Tento poměr byl stanoven v procentech.
- Vyklíčené rostliny (3 dny staré) byly v laminárním boxu přeneseny na média s chemickou látkou v účinné koncentraci vyvolávající abiotický stres.

- Rostliny byly přeloženy na testovaná média opatrnou manipulací pomocí sterilní jemné pinzety. Rostliny byly na povrchu nových medií stabilizovány adhezí.
- Pomocí Parafilmu byly Petriho misky uzavřeny a přeneseny do fytotronu. Rostliny byly pravidelně sledovány po dobu 5 dnů.

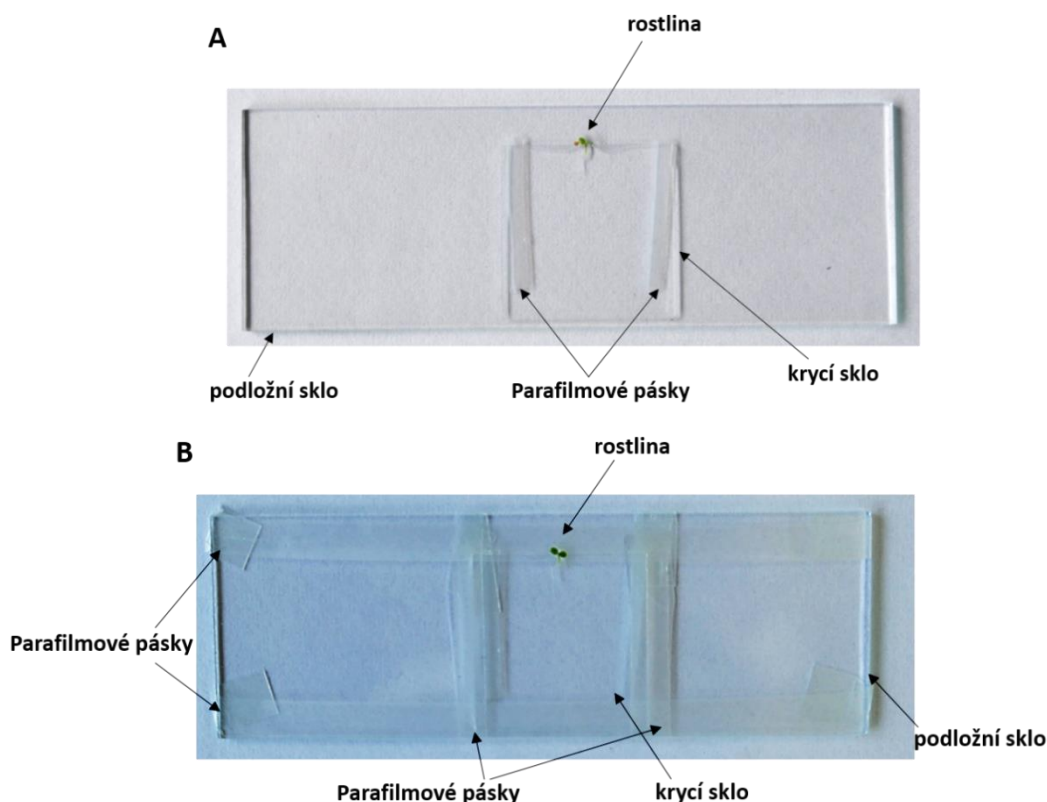
4. 2. 5 Dokumentace a vyhodnocování morfologie rostlin při růstu ve stresových podmínkách

- Petriho misky s rostlinami byly ihned po překlada a pak každý následující den skenovány na skeneru. Pomocí programu ImageJ byly elektronické snímky s interním měřítkem ze skeneru použity pro měření kvantitativních parametrů kořene (délky kořene).
- Pro kvalitní dokumentaci morfologie kořene, následně i kořenových vlásků a změn fenotypu mezi jednotlivými liniemi pod vlivem stresových faktorů byly rostliny dokumentovány pomocí stereomikroskopu. Rostliny byly fotografovány přímo v Petriho miskách.

4. 2. 6 Příprava celých rostlin pro vitální mikroskopické pozorování na sledování cytoskeletu (SD, Ligh-sheet)

SD (Spinning disk) - Laserový mikroskop pro „live cell imaging“

- Rostliny byly připraveny pro vitální mikroskopické sledování v mikroskopických komůrkách (Ovečka a kol., 2005). Po 24 h stabilizaci byly druhý den použity k mikroskopické analýze. Komůrky byly připraveny z podložního a krycího skla, které musí být dostatečně čisté a odmaštěné. Čistota byla zajištěna umytím ve vodě, saponátu, následně v 96 % etanolu a nakonec v destilované vodě. V kvetě byly následně sklíčka sterilizována v 96 % etanolu po dobu 30 minut v laminárním boxu. Při nedostatečném odmaštění by mohl být problém s použitím lipofilních barviček, protože by se mohla snížit účinnost barvení a vytvořilo by se silně zbarvené nespécifické pozadí.
- Na připravená a vysušená podložní skla se připevnily 2 tenké pásky Parafilmu, které jsou umístěny uprostřed skel a mezi sebou mají takový prostor, který odpovídá velikosti krycího skla. Do prostoru mezi pásky bylo napipetováno asi 10 μ l tekutého média (Obr. 9A). Bylo použito speciální médium pro růst *Arabidopsis* (Tab. 5). Po smíchání komponentů bylo upraveno pH na 5,7 – 5,8 pomocí KOH a médium bylo vysterilizováno pomocí stříkačky s bakteriologickým filtrem, nikoliv autoklávováním.



Obr. 9: Návod na přípravu vzorku A) do skleněných kyvet B) do mikroskopu.

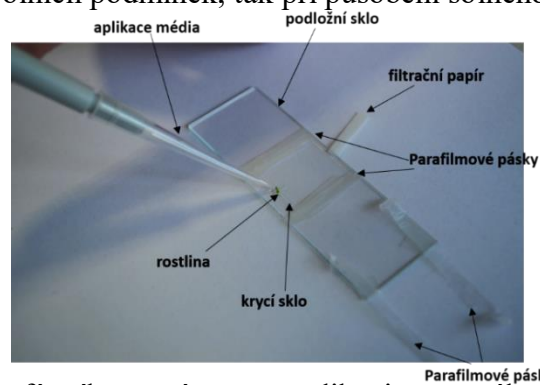
| Komponent | Objem (množství) na 50 ml média |
|--|---------------------------------|
| Makroelementy - 10x ředěné (KNO_3 , KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$) | 5 ml |
| Mikroelementy - 100x ředěné (H_3BO_3 , $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, NaCl , $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) | 0,5 ml |
| Železo - 100x ředěné (Na_2EDTA , $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) | 0,5 ml |
| Sacharóza | 0,5 g |
| MiliQ voda | 44 ml |
| Celkový objem | 50 ml, upravit pH na 5,7-5,8 |

Tab. 5: Složení tekutého média pro mikroskopické preparáty

- Do média na sklu byla pomocí pinzety šetrně přeložena 1 rostlina z Pethriho misky (2-3 dny od vyklíčení).
- Krycí sklo bylo opatrně přiloženo pod úhlem 45 °C, a při doteku s médiem v oblasti hypokotylu rostliny, bylo pomalu dáno na pásky Parafilmu. Takto připravené vzorky

byly dány do květy s tekutým kultivačním médiem a přeneseny do fytotronu na 24 h stabilizaci.

- Na druhý den byly vzorky vyjmuty, překryty ze všech 4 stran krycího skla Parafilmem (Obr. 9B) a připraveny na sledování v mikroskopu.
- Pro aplikaci stresového média byla zvolena perfúzní metoda: nejprve byly odlepeny 2 parafilmové pásky (vrchní a spodní) a 10x po 10 µl bylo v horní části krycího skla aplikováno kultivační médium s obsahem stresového faktoru. Ve spodní části krycího skla byl přiložen filtrační pásek, aby se médium dostalo do celé komůrky (Obr. 10). Pásky Parafilmu byly vráceny zpět a preparát byl pozorován pod Laserovým mikroskopem pro „live cell imaging“ (Spinning disk) Axio Observer Z1, ZEISS. Hypokotylové buňky byly skenovány každých 30 s po dobu 30 min a buňky kořenové špičky byly skenovány každých 45 s po dobu 30 min. Takto nastavené parametry byly jak za kontrolních podmínek, tak při působení solného stresu.



Obr. 10: Způsob perfúzního systému pro aplikaci stresového faktoru.

Light-sheet fluorescenční mikroskopie

- Příprava rostlin pro tuto mikroskopii byla provedena podle publikovaného protokolu (Ovečka a kol., 2015).
- Vysterilizovaná semena vysázená na Petriho miskách s ½ MS médiem byla ponechána 4-5 dnů při 4°C.
- Semena, která praskla nebo už začínala klíčit, byla přenesena sterilní jemnou pinzetou na Petriho misky s vyšší vrstvou ½ MS média. V médiu byly opatrně udělány malé otvory pomocí 100 µm špičky pro automatickou pipetu. Na tyto otvory pak byla položena vyklíčená semena. Tím bylo zabezpečeno, že kořen bude růst dovnitř média.
- Následně byla rostlina buď hned nebo po 24h stabilizaci ve fytotronu přímo v kultivačním médiu vsunuta do FEP tuby (Fluorovaná Ethylen-Propylénová tuba).

- Rostliny v tubách byly ponechány ke stabilizaci podle toho, které stádium růstu kořene bylo pozorováno.
- Připravené rostliny s FEP tubami byly vybrány z média, a pomocí skleněné kapiláry uchyceny v držáku preparátů.
- Při této přípravě se nadzemní část rostliny nacházela v prostoru nad válcem pevného kultivačního média.
- Takto připravený vzorek byl pozorován v Light-sheet fluorescenčním mikroskopu (Lightsheet Z.1, ZEISS).

4. 2. 7 Značení buněk kořene v mikroskopických preparátech

- Pracovní roztok FM4-64 byl připraven zředěním zásobního roztoku o koncentraci $1,6 \text{ mmol.l}^{-1}$ v poměru 1:400 ½ MS kultivačním médiem. Konečná koncentrace byla tedy $4 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$. Zásobní roztok FM4-64 byl uchováván při -20°C a pracovní roztok uzavřen v alobalu, protože je senzitivní na světlo.
- Na podložní sklo byl přidán 10 μl pracovního roztoku, do kterého byly opatrně pinzetou přeneseny 2-3 denní rostliny. Vzorky byly barveny 30 min ve tmě v kyvetě naplněné médiem, aby rostliny byly ve svislé (přirozené) poloze a nezakroutily se.
- Po barvení byl roztok FM4-64 vymyt 100 μl ½ MS kultivačním médiem, aby se rostliny po dobu skenování v mikroskopu nepřebarvily.
- Vzorky se snímaly v Laserovém mikroskopu pro live cell imaging (Spinning disk) Axio Observer Z1, ZEISS při nastavených parametrech pro detekci mCherry s excitací při 587 nm a v emisním spektru 610 nm (emisní filtr BP 690/50).

4. 2. 8 Dokumentace a vyhodnocování výsledků

- Na úpravu a export obrázku či videí z mikroskopu byl použit program ZEN 2012 blue a black edition (Zeiss).
- Pomocí programu ImageJ (<http://imagej.nih.gov/ij/>) byly měřeny růstové parametry kořene z naskenovaných obrázků v programu EpsonScan, jednotlivé úhly sklonu plazmatických membrán v kořenech, hodnota „skewness“ (šikmost) a „integrated density“ (intenzita na $1 \text{ } \mu\text{m}^2$) cytoskeletu, která slouží pro kvantifikaci.
- Program Exel (Microsoft) a program Statistica sloužily ke statistickému vyhodnocení naměřených dat.

5. VÝSLEDKY

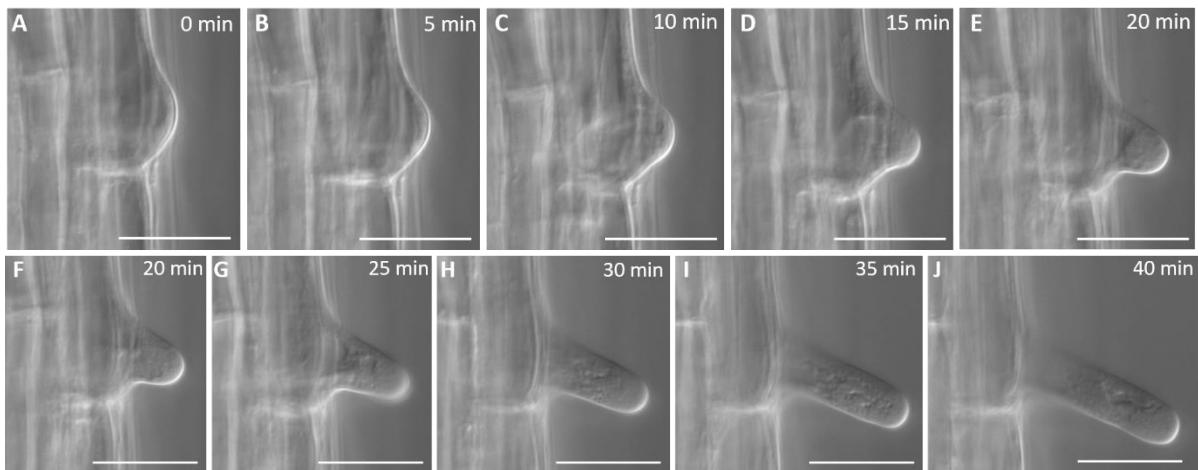
V této diplomové práci jsou dosažené výsledky prezentovány ve čtyřech samostatných kapitolách. První kapitola se zabývá studiem kořenových vlásků, jejich vývinem a růstovými parametry, protože použitý *der1-3* mutant je popsán především jako mutant kořenových vlásků (*deformed root hairs 1*; Ringli a kol., 2002). Druhá kapitola popisuje změny v orientaci buněčného dělení kořenových buněk pomocí dvou různých metod. Třetí kapitola je zaměřena na reakci rostlin ovlivněných různými stresovými faktory (solný, osmotický a oxidativní stres), kde byly sledovány především růstové parametry kořene, změna fenotypu kořenových vlásků a zaznamenána byla i klíčivost rostlin na jednotlivých médiích. Čtvrtá kapitola prezentuje změny ve struktuře a dynamice cytoskeletu u transformovaných linií po působení solného stresu.

5. 1 Vývin a růst kořenových vlásků linií C24 a *der1-3*

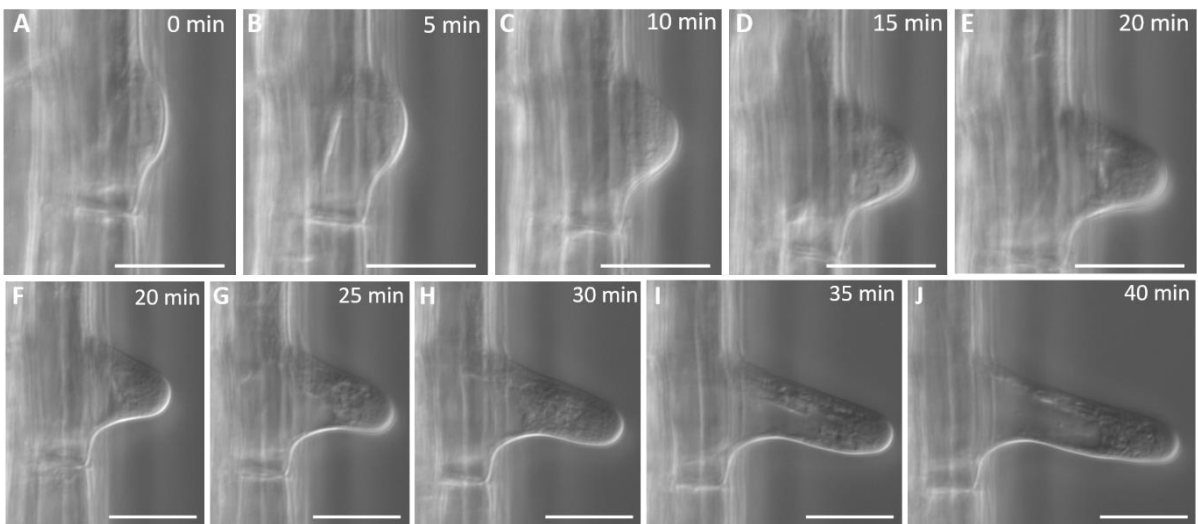
5. 1. 1 Porovnání růstu kořenových vlásků mezi liniemi C24 a *der1-3*

Ke sledování růstu kořenových vlásků byly 2-3 dny staré rostliny přeneseny pomocí jemné sterilní pinzety na podložní skla s Parafilmovými pásky a s 10 μ l speciálního tekutého kultivačního média pro *Arabidopsis*. Pod úhlem 45° bylo v oblasti hypokotylu přiloženo krycí sklo a tímto způsobem připravené preparáty byly vloženy do skleněné kyvety s přibližně 20 ml tekutého média pro *Arabidopsis*. Připravené rostliny byly stabilizovány do druhého dne ve fytotronu. Další den byly preparáty vytaženy, rozhraní krycích skel překryty ze všech čtyř stran Parafilmem k zabránění vypařování média a sledovány ve fluorescenčním mikroskopu. Ke snímání byla použita metoda Nomarského diferenciálního kontrastu, a při nastaveném expozičním času 200 ms bylo vybrané místo v diferenciační zóně kořene snímáno každých 60 s po dobu 20 min.

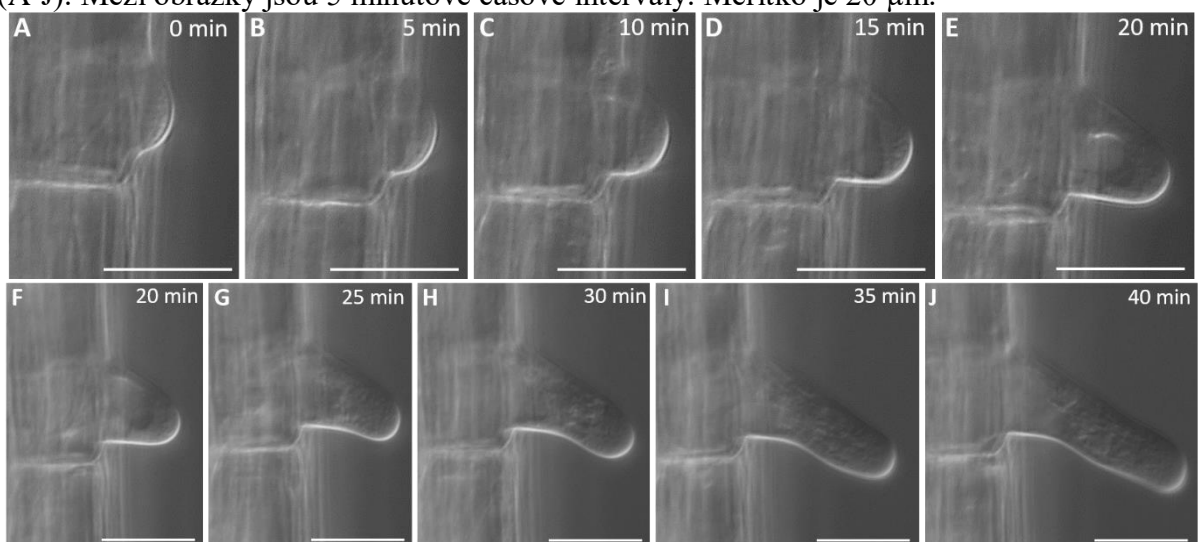
Zaznamenáván byl vždy vyvíjející se „bulge“ a následně růst kořenového vlásku. Byly provedeny dvě snímání po dobu 20 min u stejného vlásku (celková délka snímání 40 min). U kontrolní linie C24, jako i u transgenních linií C24 s expresí *pro35S::FABD2:GFP* (označována v práci jako C24-ABD2-GFP) a *pro35S::MBD:GFP* (označována v práci jako C24-MAP4-GFP) se vlásky vyvíjeli normálně a vykazovali normální růst (Obr. 11, 12 a 13). U linií *der1-3*, jako i u transgenních linií *der1-3* s expresí *pro35S::FABD2:GFP* (označována v práci jako *der1-3-ABD2-GFP*) a *pro35S::MBD:GFP* (označována v práci jako *der1-3-MAP4-GFP*) se vlásky do stádia „bulge“ vyvíjeli normálně, následně už ale dále nerostli (Obr. 14, 15 a 16).



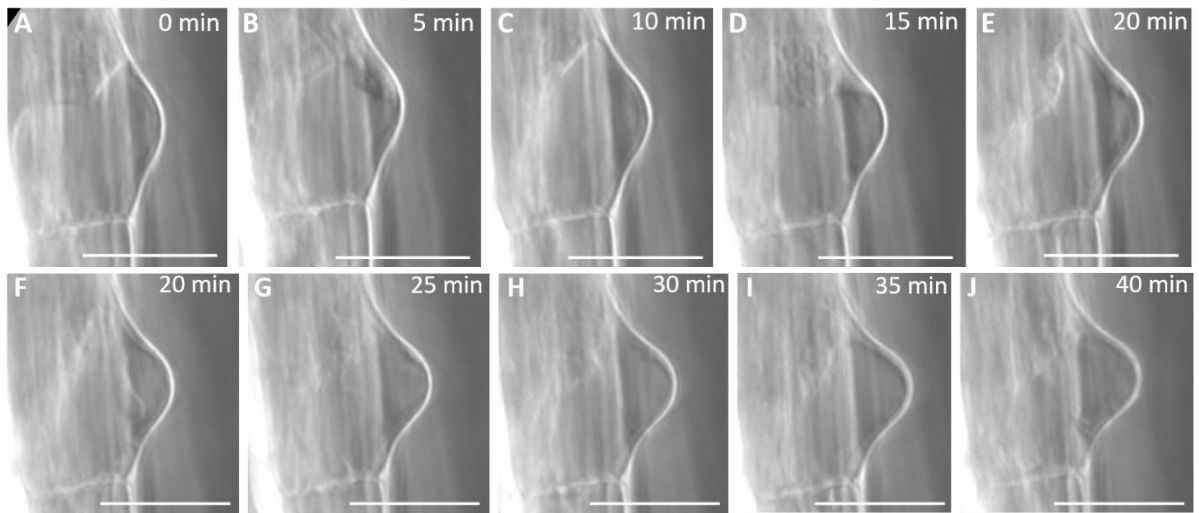
Obr. 11: Růst kořenového vlásku u kontrolní linie C24. Vlasek byl snímán po dobu 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μ m.



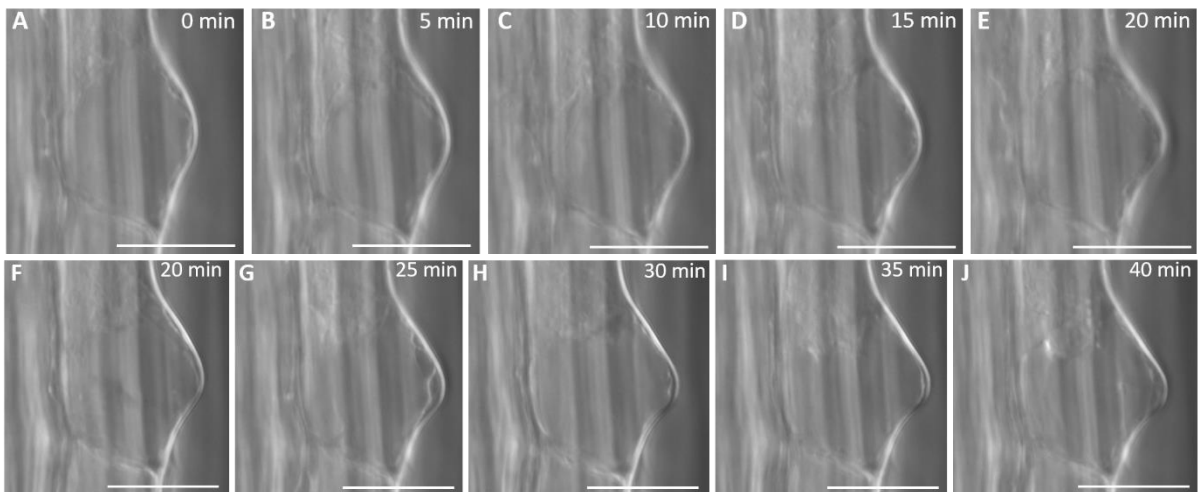
Obr. 12: Růst kořenového vlásku linie C24-ABD2-GFP. Vlasek byl snímán prvních 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μ m.



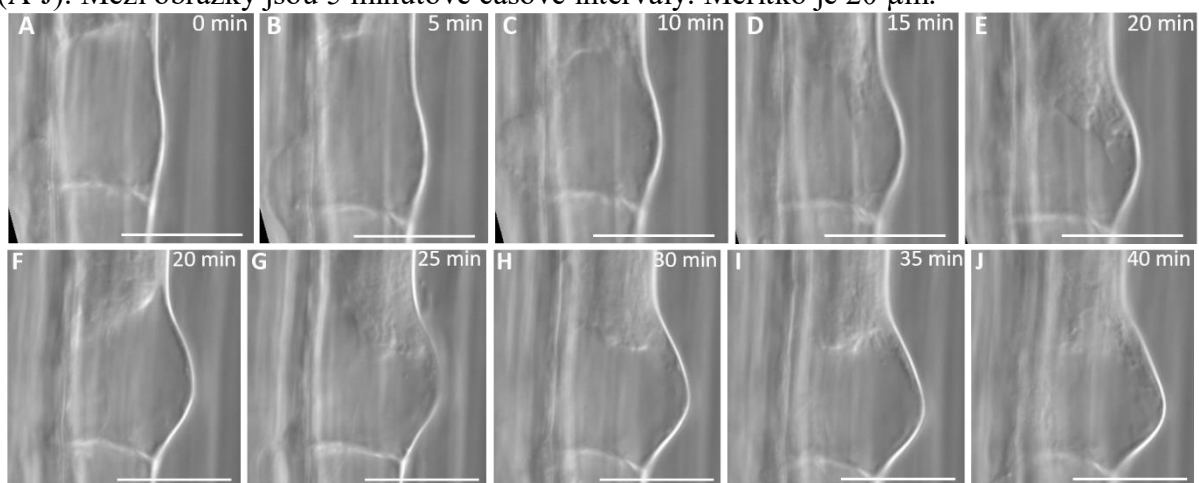
Obr. 13: Růst kořenového vlásku linie C24-MAP4-GFP. Vlasek byl snímán prvních 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μ m.



Obr. 14: Růst kořenového vlásku linie *der1-3*. Vlasek byl snímán prvních 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μm .



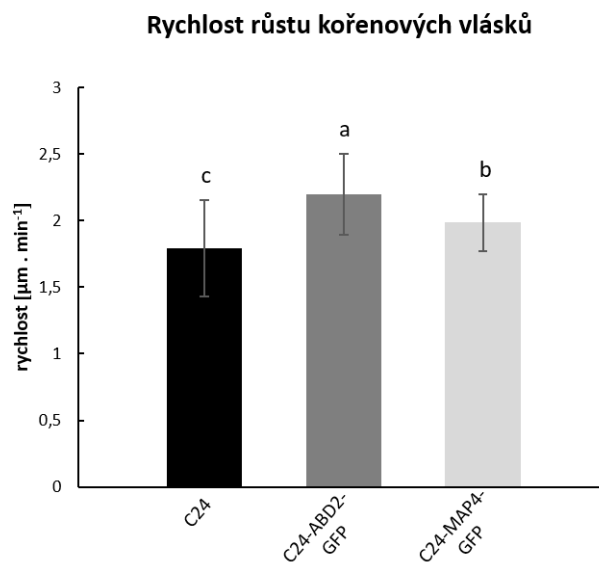
Obr. 15: Růst kořenového vlásku linie *der1-3-ABD2-GFP*. Vlasek byl snímán prvních 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μm .



Obr. 16: Růst kořenového vlásku linie *der1-3-MAP4-GFP*. Vlasek byl snímán prvních 40 min (A-J). Mezi obrázky jsou 5 minutové časové intervaly. Měřítka je 20 μm .

5. 1. 2 Rychlost růstu kořenových vlásků linií C24 a *der1-3*

V programu ZEN blue 2012 (Zeiss) byla z nasnímaných videí naměřena rychlost růstu kořenových vlásků v μm za minutu. Růst vlásků byl snímán každých 60 s po dobu 20 minut. Byly změřeny jen linie C24, C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP (Graf 1), protože jak už bylo zmíněno, u linií *der1-3* vrcholový růst kořenových vlásků zaznamenán nebyl. Z každé linie bylo měřeno 7-11 kořenových vlásků z 3-4 rostlin, které byly 2-3 dny staré. Nejrychleji rostly kořenové vlásky linie C24-ABD2-GFP ($2,196 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$), o něco pomaleji linie C24-MAP4-GFP ($1,985 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$) a nejpomaleji linie C24 ($1,794 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$; Graf 1). Potvrdila to i statistická metoda ANOVA na následný Fisherův LSD test, který ukázal mezi všemi třemi liniemi statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$).

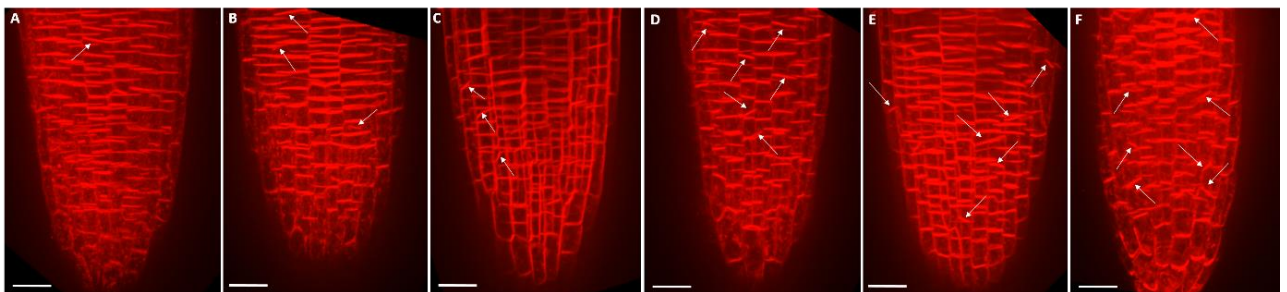


Graf 1: Rychlost růstu kořenových vlásků v kontrolních podmínkách u linií C24, C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP. Data reprezentují průměr \pm SD z 3-4 biologických replik, vždy ze 7-11 kořenových vlásků. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými liniemi, určené metodou ANOVA a následného Fisherova LSD testu.

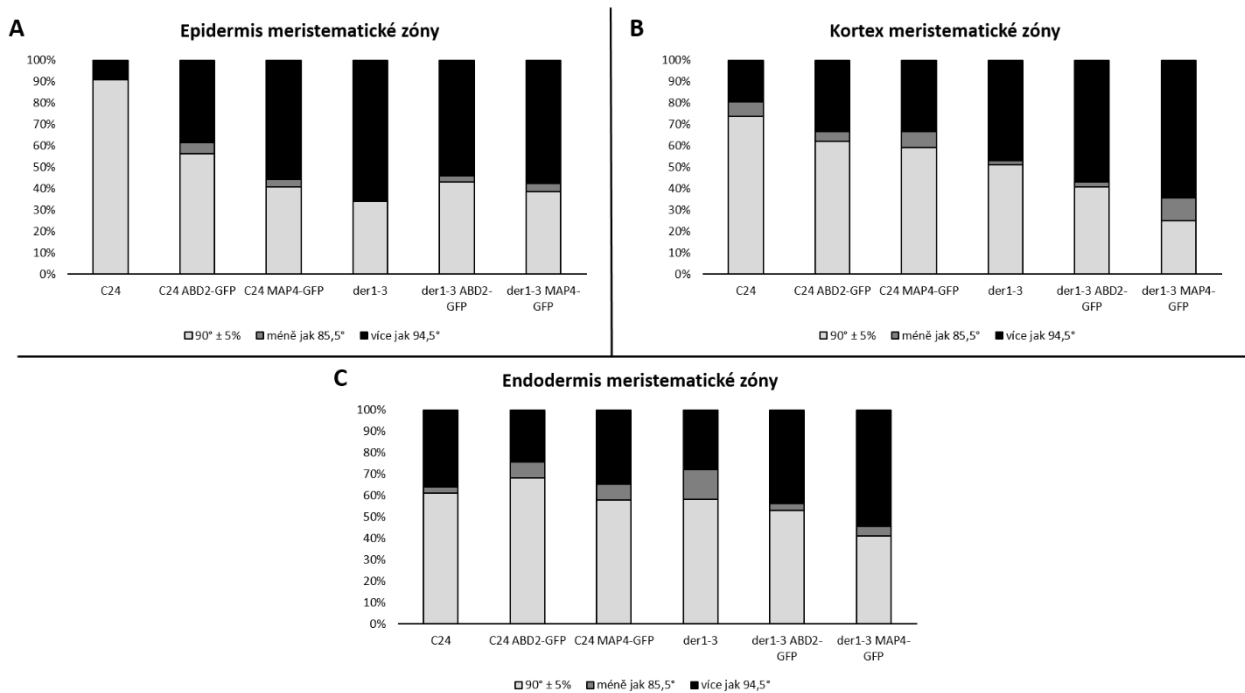
5. 2. Rovina buněčného dělení kořenových buněk

5. 2. 1 Kvalitativní a kvantitativní stanovení roviny dělení kořenových buněk

Mutant *der1-3* vykazuje typický vlnivý vzor při růstu kořene (Ringli a kol., 2002). Záměrem bylo zjistit, zda může být tento vzor způsoben změnami v rovině buněčného dělení kořenových buněk. Normální poloha příčné buněčné stěny a plazmatické membrány nově rozdělených buněk je kolmo (transverzálně) ke směru růstu kořene. Proto byly nabarveny buněčné membrány v kořenech a změřeny úhly rovin buněčného dělení. Buňky kořene 2-3 denních rostlin byly barveny 30 min v roztoku 4 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ barviva FM4-64 v mikroskopických komůrkách. Před sledováním v mikroskopu, byl roztok FM4-64 vymyt 100 μl tekutým $\frac{1}{2}$ MS médiem. Obrázek 17 ukazuje přehled nabarvených kořenových špiček u všech linií C24 a *der1-3*. Šipky ukazují změny v rovině plazmatické membrány u příčných buněčných stěn dceřiných buněk. U linií *der1-3* jich bylo větší množství, a proto se změřili úhly příčných membrán v poměru k podélným membránám v programu ImageJ. Bylo určeno procentuální zastoupení úhlů membrán v kolmém postavení ($90^\circ \pm 5\%$) a v odlišném postavení (šikmém) ke směru růstu kořene (méně jak $85,5^\circ$; více jak $95,5^\circ$). Tyto úhly se změřili ve třech vrstvách kořene: epidermis, kortex a endodermis v rámci meristemické zóny (Obr. 18). Největší množství šikmých rovin v epidermis (Obr. 18A) měla linie *der1-3* a tato situace byla podobná u všech transgenních linií *der1-3*. U transgenních linií C24 se v epidermis (Obr. 18A) vyskytovalo o něco více šikmě orientovaných rovin než u kontrolní linie C24. Ve vrstvě buněk kortexu (Obr. 18B) měli opět *der1-3* linie 50 % a více příčných buněčných stěn postavených jinak než kolmě. Nejmenší rozdíl mezi liniemi C24 a *der1-3* byl nalezen u endodermis (Obr. 18C), ale i tak se šikmých rovin u linií *der1-3* vyskytovalo více.



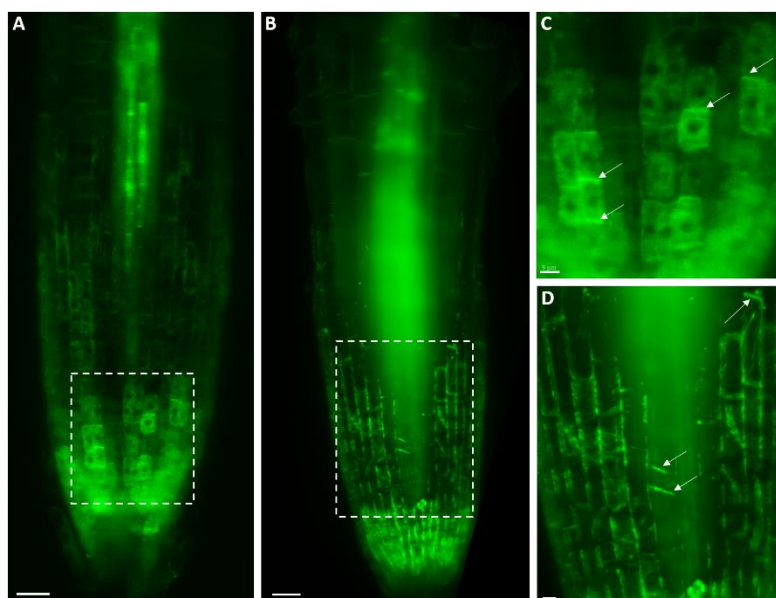
Obr. 17: Kořenové špičky značené pomocí FM4-64 linií A) C24, B) C24-ABD2-GFP, C) C24-MAP4-GFP, D) *der1-3*, E) *der1-3*-ABD2-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP. Šipky ukazují změny v rovině buněčného dělení. Měřítka je 20 μm .



Obr. 18: Procentuální zastoupení úhlů ($90^\circ \pm 5^\circ$; méně jak $85,5^\circ$; více jak $95,5^\circ$) roviny buněčného dělení kořenových špiček ve vrstvách meristematické zóny A) epidermis B) kortex C) endodermis. Sloupce prezentují poměr u jednotlivých linií.

5. 2. 2 Sledování růstu kořene metodou Light-sheet mikroskopie

Pomocí metody Light-sheet mikroskopie byl sledován vývoj a růst kořenů linií C24 a *der1-3* s fluorescenčně značeným aktinovým a mikrotubulovým cytoskeletem i po dobu několika hodin. Potvrdilo se, že u linie *der1-3* se vyskytuje více buněčných stěn postavených jinak než kolmo, oproti kontrolním liniím C24 (Obr. 19).

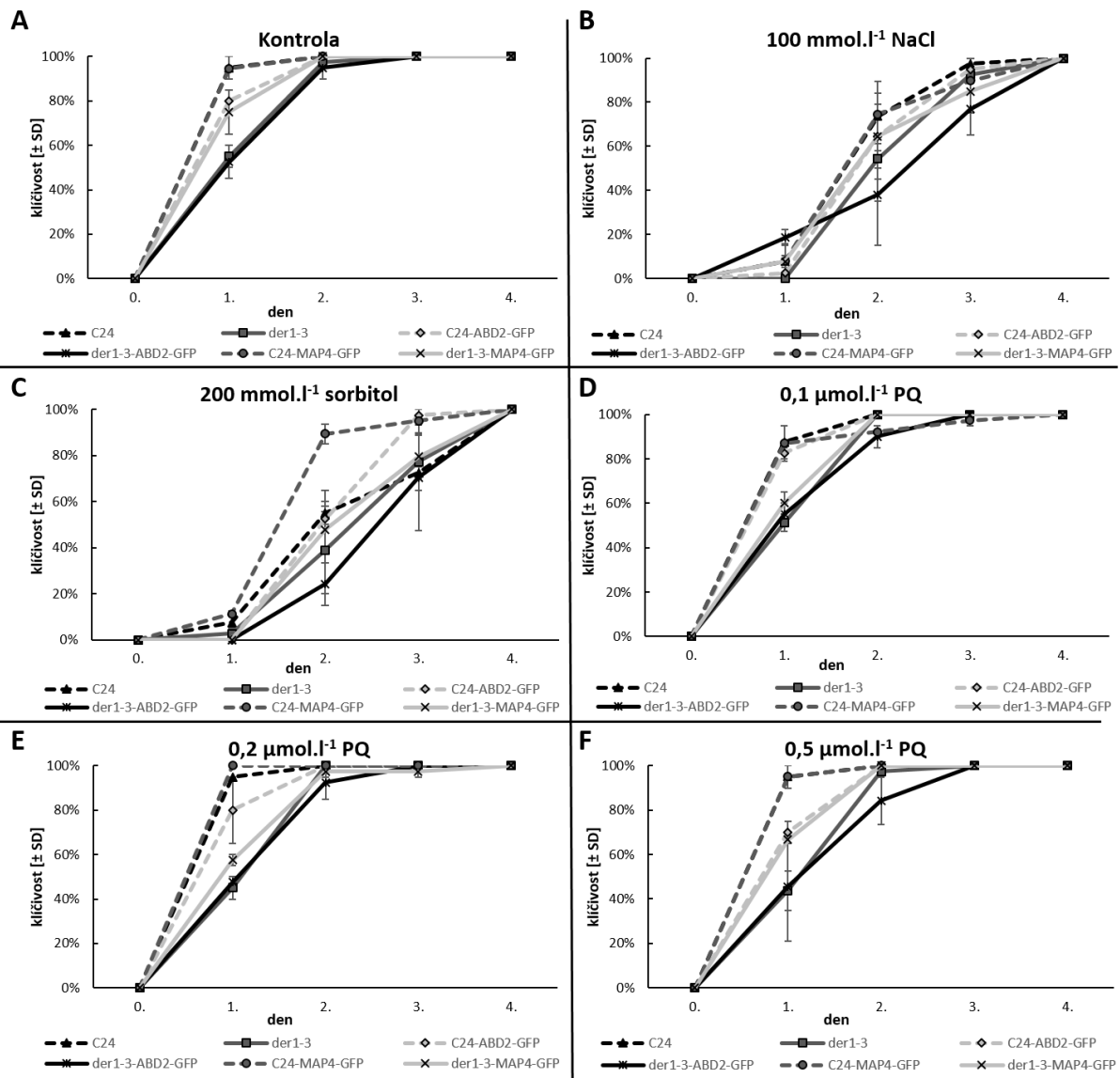


Obr. 19: Vývoj a růst kořenů v kontrolních podmínkách linií A, C) C24-ABD2-GFP; B, D) *der1-3*-MAP4-GFP. Šipky ukazují postavení buněčných stěn. Měřítka je A, B) $20 \mu\text{m}$ a C, D) $5 \mu\text{m}$.

5. 3 Reakce linií C24 a *der1-3* na stresové podmínky (solný, osmotický a oxidativní stres)

5. 3. 1 Klíčení semen v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu

Sterilizovaná semena byla vysázena na kontrolní $\frac{1}{2}$ MS kultivační média a na $\frac{1}{2}$ MS kultivační média s obsahem NaCl (100 mmol.l^{-1}), sorbitolu (200 mmol.l^{-1}), a paraquat (PQ; $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, $0,2 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Jako první byla sledovaná klíčivost všech linií na jednotlivých médiích. Klíčivost je vyjádřena v procentech. Tato hodnota byla vypočítána z poměru vyklíčených semen k celkovému počtu semen. Počet vyklíčených semen se stanovoval v 24 h intervalech od přenesení misek do fytotronu a to tak dlouho, pokud byla všechna semena vyklíčena. V našem případě trvala tato perioda 4 dny. V kontrolních podmínkách nejrychleji klíčily linie C24 a C24-MAP4-GFP, o něco pomaleji linie *der1-3*-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP a nejpomalejší klíčení bylo zaznamenáno u linie *der1-3*-ABD2-GFP a *der1-3* (Obr. 20A). Solný stres způsobil všeobecně pomalejší klíčení u všech linií. Kromě linie *der1-3*-ABD2-GFP, která měla v počáteční fázi nejlepší klíčivost, byla jinak rychlost klíčení semen všech linií porovnatelná (Obr. 20B). Osmotický stres způsobil zpomalení klíčení, přičemž její rychlost byla porovnatelná s rychlostí klíčení při solném stresu. Nejrychlejší klíčení bylo zaznamenáno u linií C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP (Obr. 20C). Oxidativní stres měl na klíčivost minimální vliv, některé linie dokonce klíčily i rychleji než při kontrolních podmínkách. Až při koncentraci PQ $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ byla klíčivost semen výrazněji zpomalena (Obr. 20D, E, F).



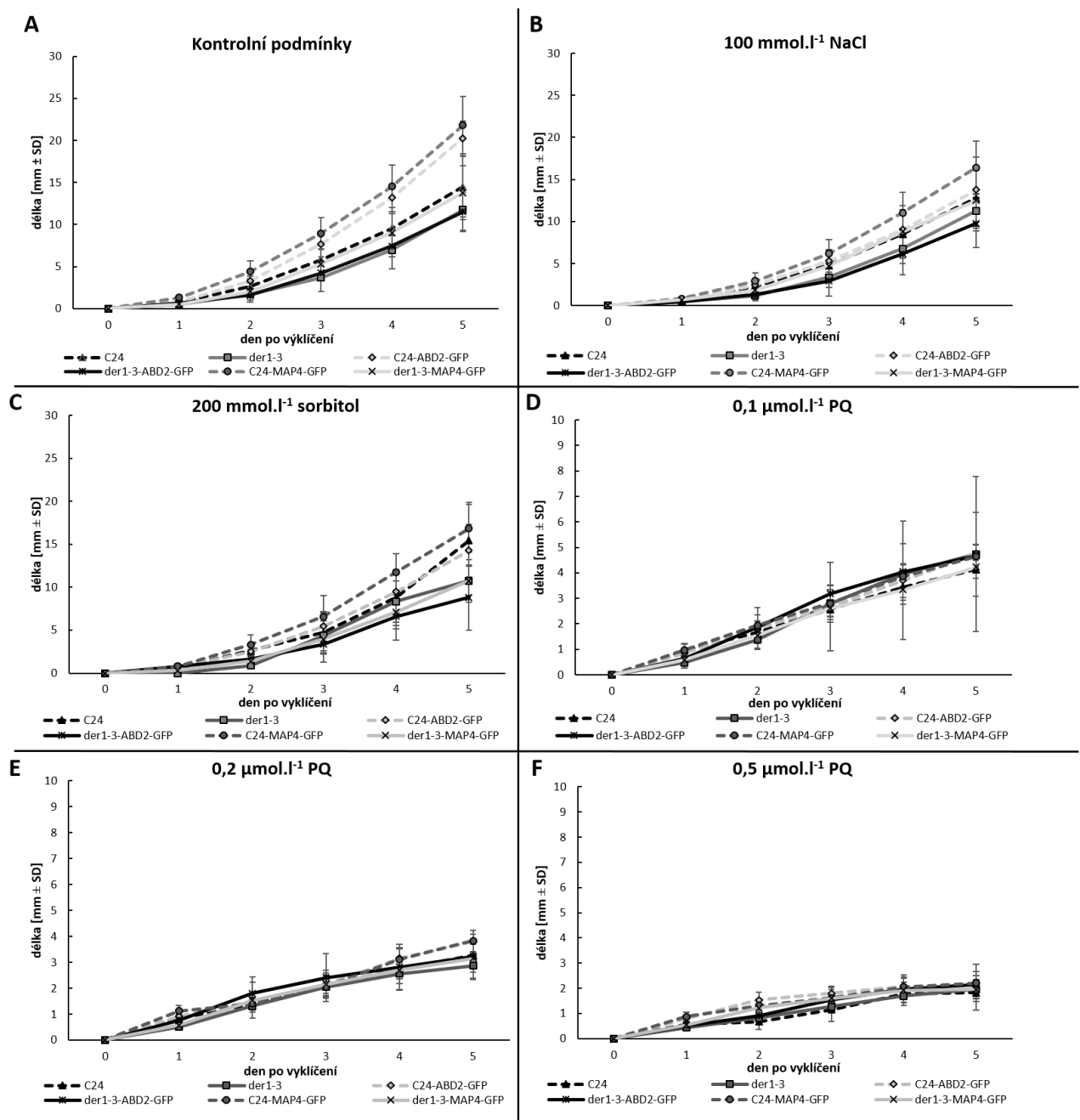
Obr. 20: Porovnání klíčivosti semen linií C24, *der1-3*, C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP při solném, osmotickém a oxidativním stresu. Klíčivost byla stanovena po dobu 4 dnů od začátku experimentu v kontrolních podmínkách (A), a při působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl (B), 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu (C), 0,1 μmol.l⁻¹ PQ (D), 0,2 μmol.l⁻¹ PQ (E), a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (F). Data reprezentují průměr ± SD z 2 biologických replik, vždy po 20 semenech.

5. 3. 2 Růst primárního kořene a fenotyp kořenových vlásků při klíčení rostlin na solném, osmotickém a oxidativním stresu

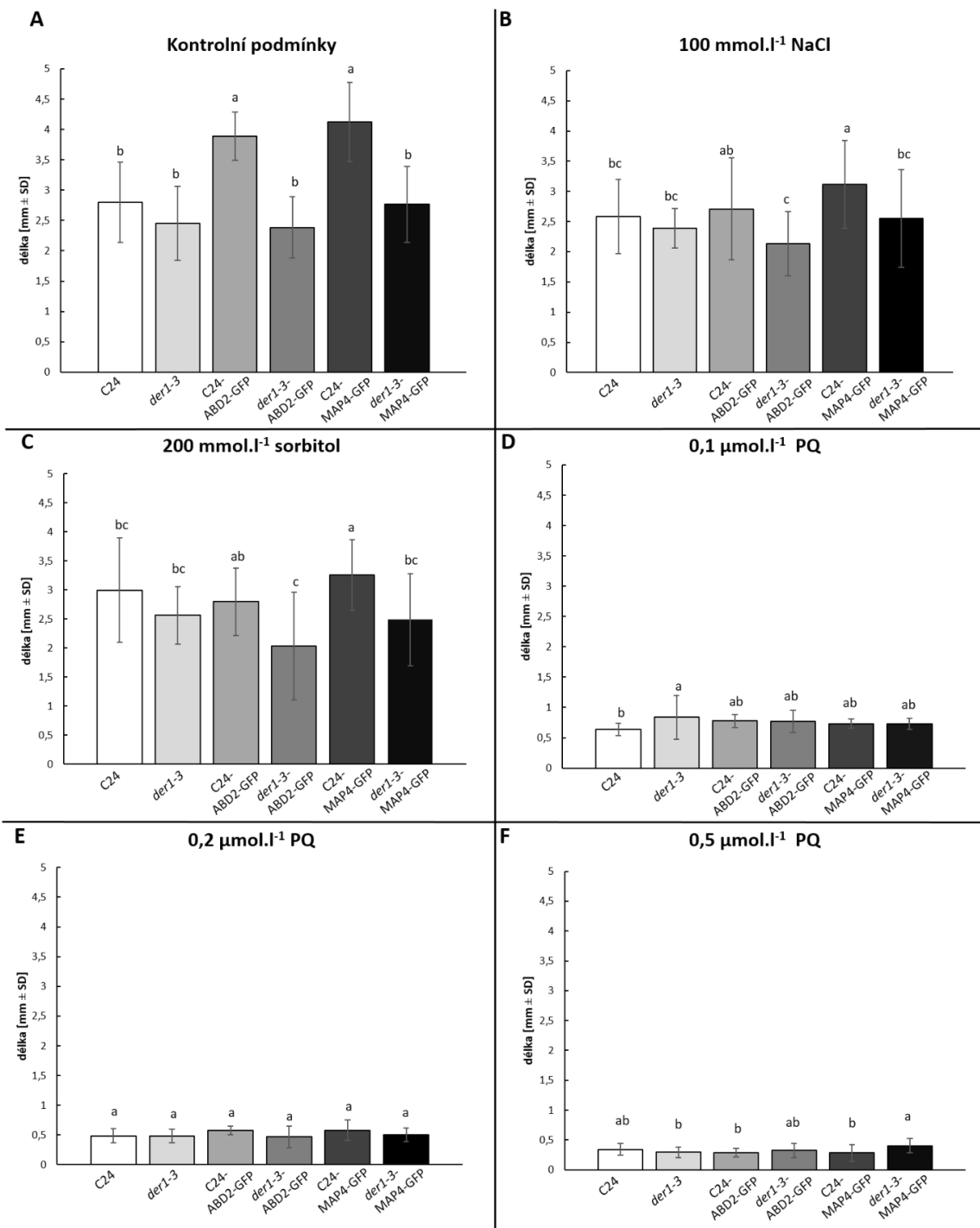
5. 3. 2. 1 Délky primárních kořenů a jejich přírůstky za 24 h

Semena byla vysázena na kontrolní $\frac{1}{2}$ MS kultivační média a na $\frac{1}{2}$ MS kultivační média s obsahem NaCl (100 mmol.l^{-1}), sorbitolu (200 mmol.l^{-1}), a paraquatu (PQ; $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$, $0,2 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ a $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$). Po indukci a synchronizaci klíčení v chladu při 4°C byly misky umístěné do fytotronu a od prvního dne po vyklíčení byly rostliny v Petriho miskách každý následující den skenovány plošným skenerem. Celkově byly rostliny skenovány po dobu 5 dnů a z fotografií byly následně změřeny délky primárních kořenů pomocí programu ImageJ, pro každý druh použitého stresového faktoru samostatně. Trend růstu primárních kořenů po dobu celého experimentu je dokumentován v grafech na obrázku č. 21. Při solném a osmotickém stresu byl růst kořenů o něco málo pomalejší než v kontrolních podmínkách, přičemž u oxidativního stresu byl růst výrazně redukován, a to až o 20 mm. Nejrychlejší růst kořenů byl zaznamenán u linií C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP a to jak v kontrolních podmínkách (Obr. 21A), tak při působení solného (Obr. 21B) a osmotického stresu (Obr. 21C). Linie *der1-3* vykazovala celkově pomalejší růst kořene, a to ve všech podmínkách. Při oxidativním stresu (Obr. 21D, E, F) se všechny rozdíly mezi jednotlivými liniemi ztráceli, což může naznačovat, že linie *der1-3* může být více rezistentní za těchto podmínek.

Z hodnot délek primárních kořenů byly pak následně vypočítány průměrné přírůstky kořenů za 24 h (Obr. 22). V porovnání s kontrolou, při solném a osmotickém stresu, byly přírůstky mírně redukovány, na rozdíl od oxidativního stresu, kde byl zaznamenán rapidní rozdíl vůči kontrole. Nejvyšší přírůstek v kontrolních podmínkách měli linie C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP (Obr. 22A), což koreluje i s celkovou délkou kořenů (Obr. 21). Tato tendence se potvrdila i při solném (Obr. 22B) a osmotickém stresu (Obr. 22C), i když byl celkový rozdíl menší. V souladu s celkově menší délkou primárního kořene linií *der1-3*, byl i přírůstek kořene za 24 h menší (Obr. 22). Při oxidativním stresu byly přírůstky u všech linií porovnatelné (Obr. 22D, E, F), tudíž byl potlačován rozdíl mezi liniemi C24 a *der1-3*. Potvrzuje to předpoklad, že linie *der1-3* může být rezistentnější na tento typ stresu. Ilustruje to situace při koncentraci $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, kde bylo pomocí ANOVA analýzy a následně Fisherovým LSD testem dokázáno, že linie *der1-3* má nejvyšší přírůstek kořene (rozdíl statisticky významný při $p < 0,05$).



Obr. 21: Průměrný růst primárních kořenů linií C24, C24, *der1-3*, C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP, které klíčily v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dnů od vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl (B), 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu (C), 0,1 μmol.l⁻¹ PQ (D), 0,2 μmol.l⁻¹ PQ (E), a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (F). Data reprezentují průměr ± SD z 2 biologických replik u solného a osmotického stresu při počtu 8 rostlin a u oxidativního stresu ± SD z 1 biologické repliky při počtu 12 rostlin.



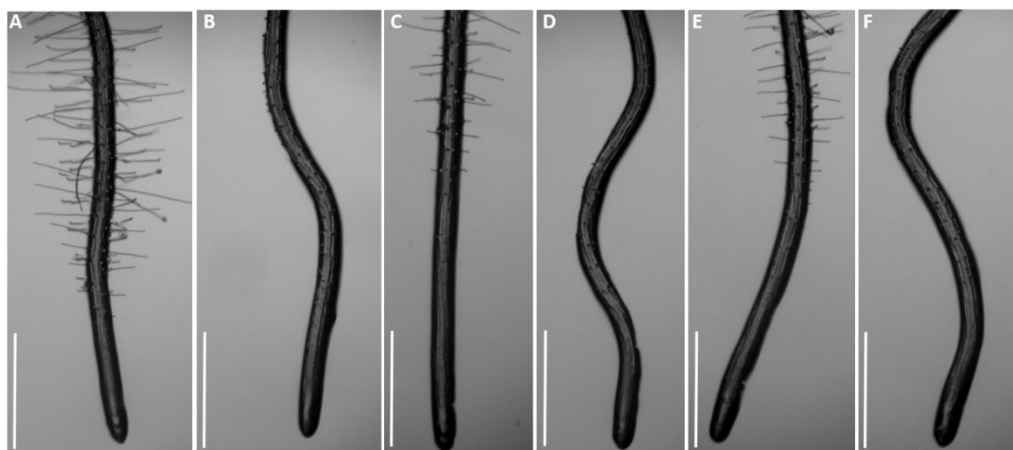
Obr. 22: Průměrný přírůstek kořenů za 24 h u linií C24, C24, *der1-3*, C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP, které klíčily v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dnů od vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl (B), 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu (C), 0,1 μmol.l⁻¹ PQ (D), 0,2 μmol.l⁻¹ PQ (E), a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (F). Data reprezentují průměr ± SD z 2 biologických replik u solného a osmotického stresu při počtu 8 rostlin a u oxidativního stresu ± SD z 1 biologické repliky při počtu 12 rostlin. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými liniemi, určené pomocí ANOVA a následného Fisherova LSD testu.

5. 3. 2. 2 Fenotyp kořene a kořenových vlásků

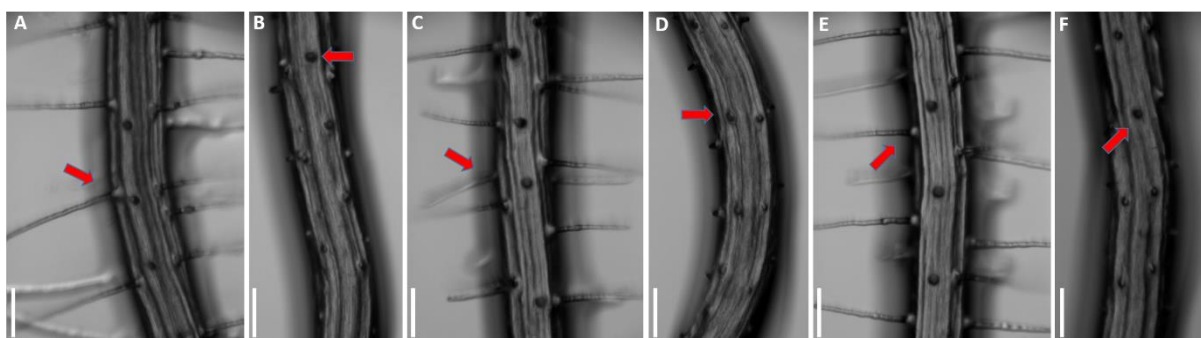
Rostliny byly po ukončení experimentů (5. den od vyklíčení) fotograficky dokumentovány přímo v Petriho miskách pomocí stereomikroskopu. Z fotografické dokumentace byl zhodnocen fenotyp celého kořene a následně pak změny ve fenotypu kořenových vlásků po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, 200 mmol.l^{-1} sorbitolu, $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, $0,2 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ a $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ.

V kontrolních podmínkách měli linie C24 typický kontrolní fenotyp, který při růstu nevykazoval žádné změny (Obr. 23A, C, E). U linií C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP byl zřetelný aktivnější růst kořene, protože délka od špičky kořene k prvním kořenovým vláskům byla viditelně delší. Linie *der1-3* si uchovávali svůj typický vlnitý vzor růstu kořene (Obr. 23B, D, F). Fenotypy kořene *der1-3* linií se po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl (Obr. 25), 200 mmol.l^{-1} sorbitolu neměnily (Obr. 27), s výjimkou oxidativního stresu, kdy docházelo k občasnému ohýbání kořenových špiček (Obr. 29 a 31), což bylo nejčastěji při koncentraci $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (Obr. 30).

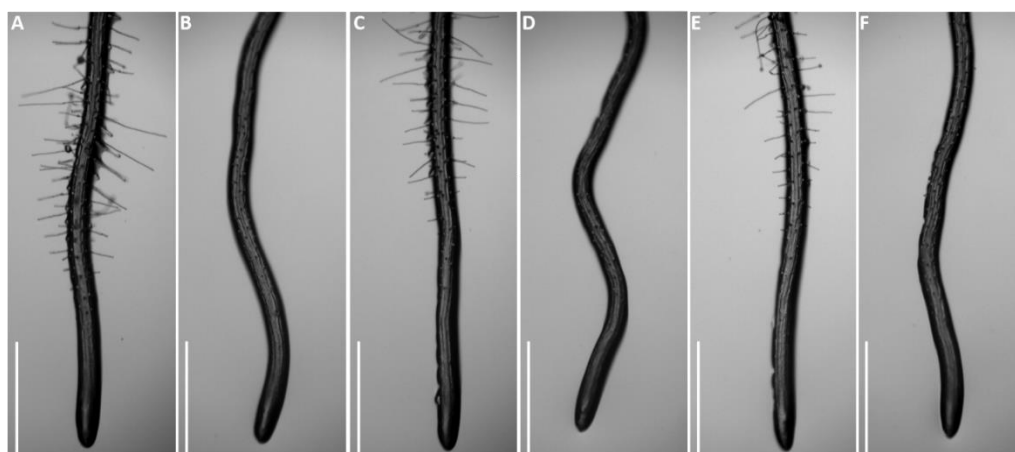
Typický fenotyp kořenových vlásků byl u všech linií v kontrolních podmínkách zachován. Linie C24 (i transformované) měli vlásky dlouhé a nerozvětvené (Obr. 24A, C, E). Linie *der1-3* (i transformované) měli vlásky nevyvinuté a krátké (Obr. 24B, D, F). Po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl a 200 mmol.l^{-1} sorbitolu byly změny ve fenotypu vlásků u porovnávaných linií podobné. U linií C24 se vyskytovaly rozvětvené kořenové vlásky, někdy i kratší (Obr. 26A, C, E). U osmotického stresu se výskyt těchto abnormalit snížil (Obr. 28A, C, E). Kořenové vlásky linií *der1-3* měli tendenci se prodlužovat a vyskytovaly se ve shlucích (Obr. 26B, D, F), přičemž u osmotického stresu to bylo opět v menší míře (Obr. 28B, D, F). Oxidativní stres měl celkově výrazný vliv, jak na růst kořene, tak i na vývin kořenových vlásků. Se zvyšující se koncentrací PQ se vlásky už skoro nevyskytovaly. Při koncentraci $0,1 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ měly linie C24 vlásky kratší, vyskytovaly se i zóny bez nich (Obr. 30A, C, E). Linie *der1-3* měly většinou vlásky bez abnormalit a vyskytovaly se i zóny s hustějším výskytem kořenových vlásků, ale i bez kořenových vlásků (Obr. 30B, D, F). Koncentrace $0,2 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ vyvolávala stejné efekty (Obr. 32) a u média s obsahem $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ se vlásky skoro u žádné linie nevyvinuly (Obr. 34).



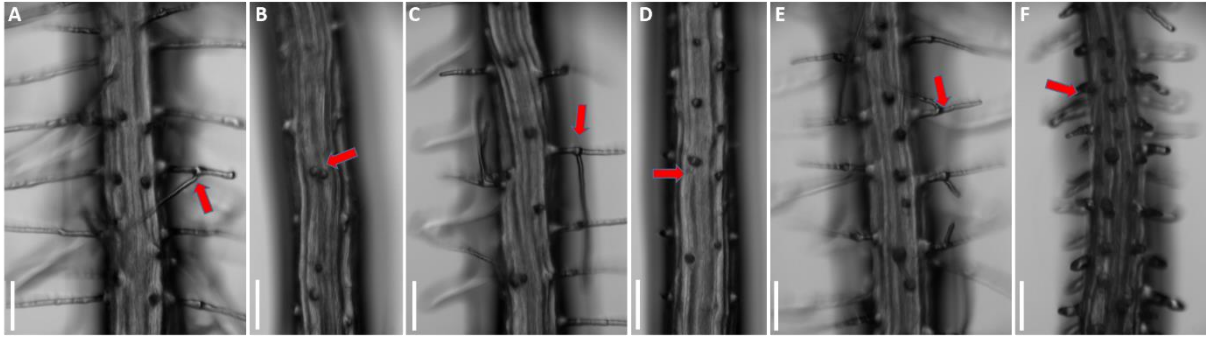
Obr. 23: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) v kontrolních podmínkách. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.



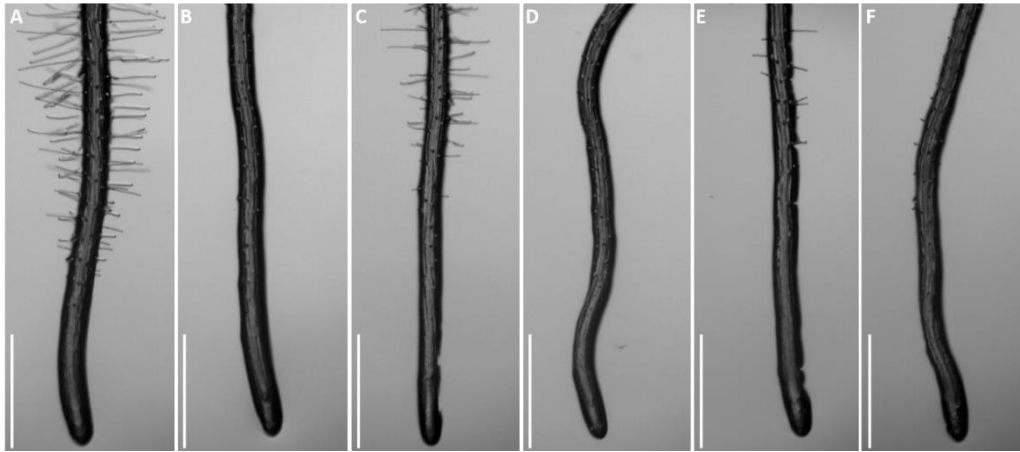
Obr. 24: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) v kontrolních podmínkách. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka je 100 μm .



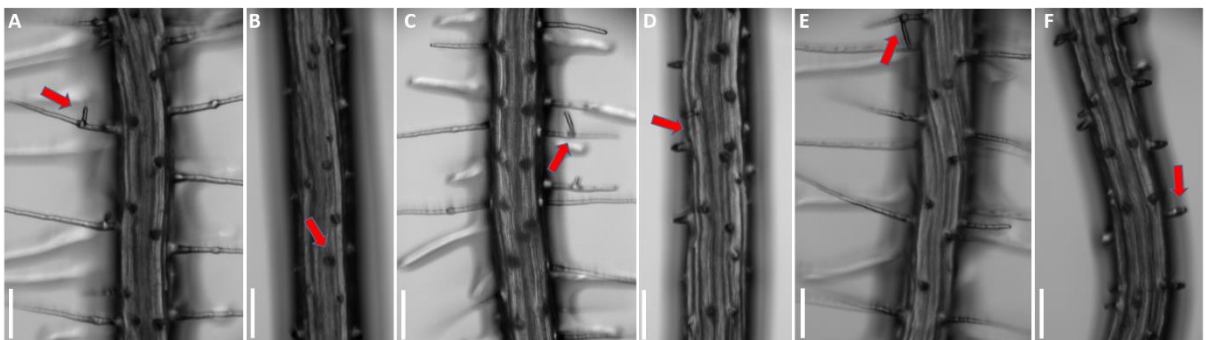
Obr. 25: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.



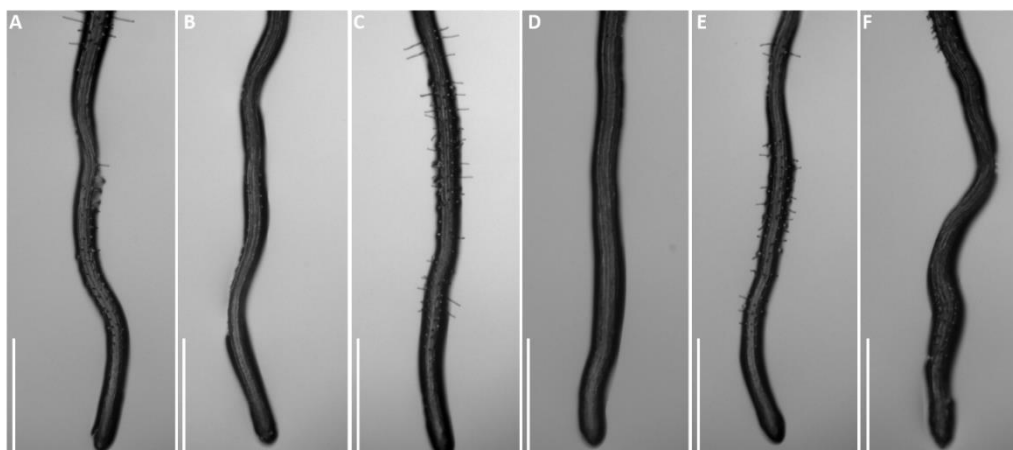
Obr. 26: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 100 μm.



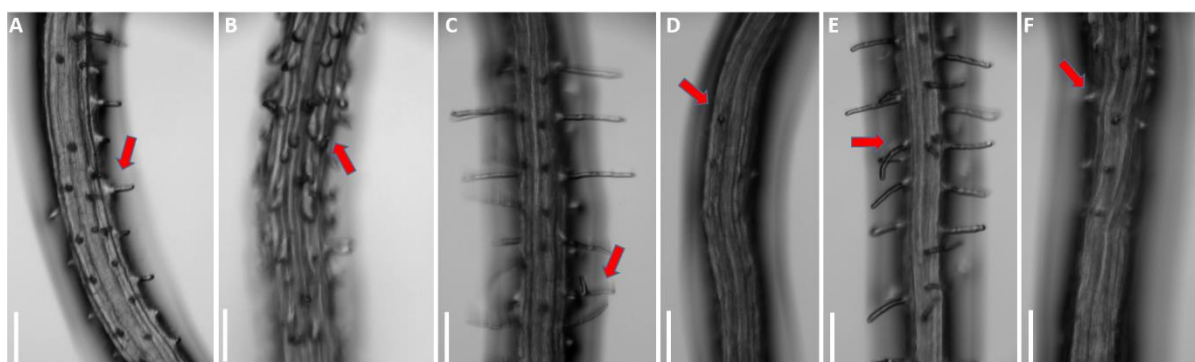
Obr. 27: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.



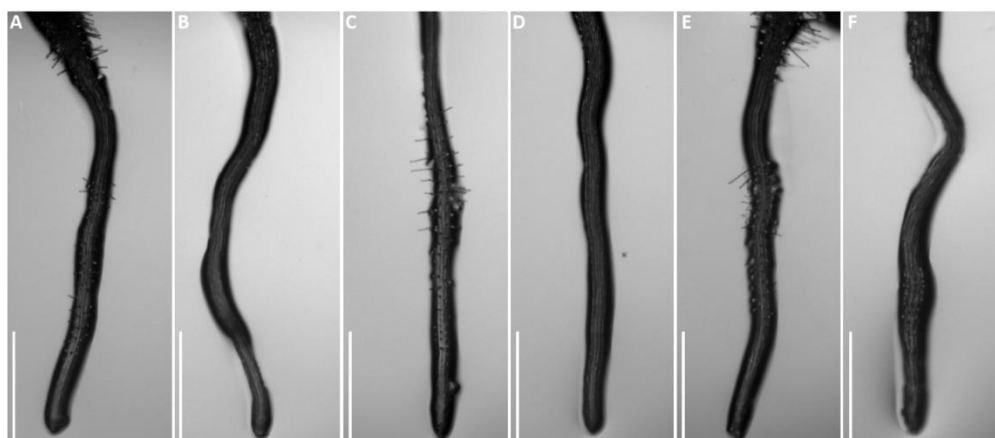
Obr. 28: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 100 μm.



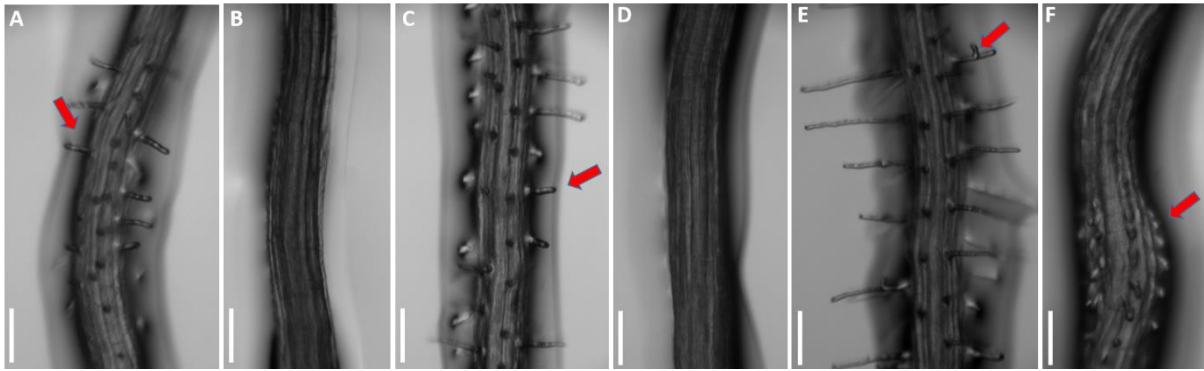
Obr. 29: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.



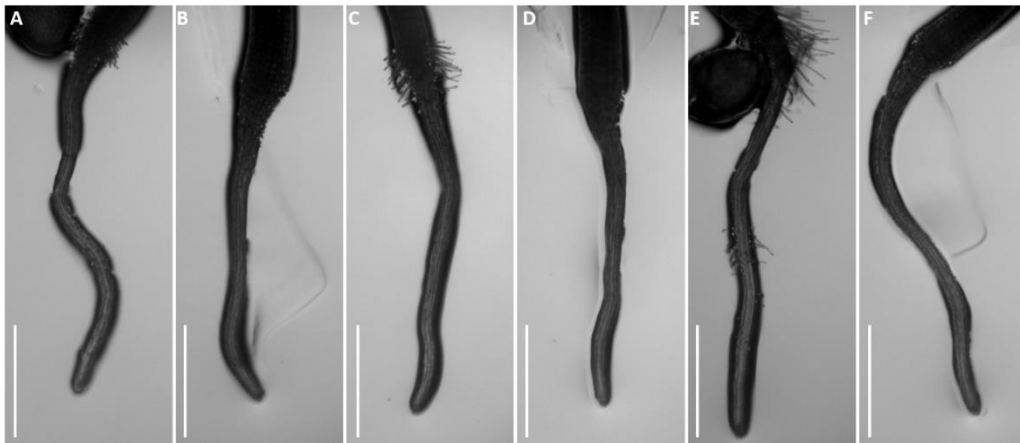
Obr. 30: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 100 μm .



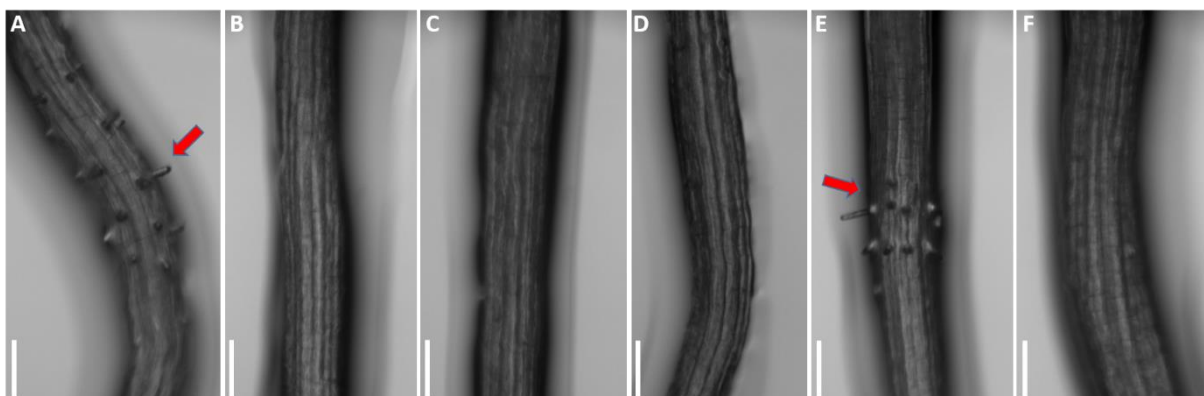
Obr. 31: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.



Obr. 32: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 100 μm .



Obr. 33: Fenotyp apikální části kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, měřítko je 1 mm.

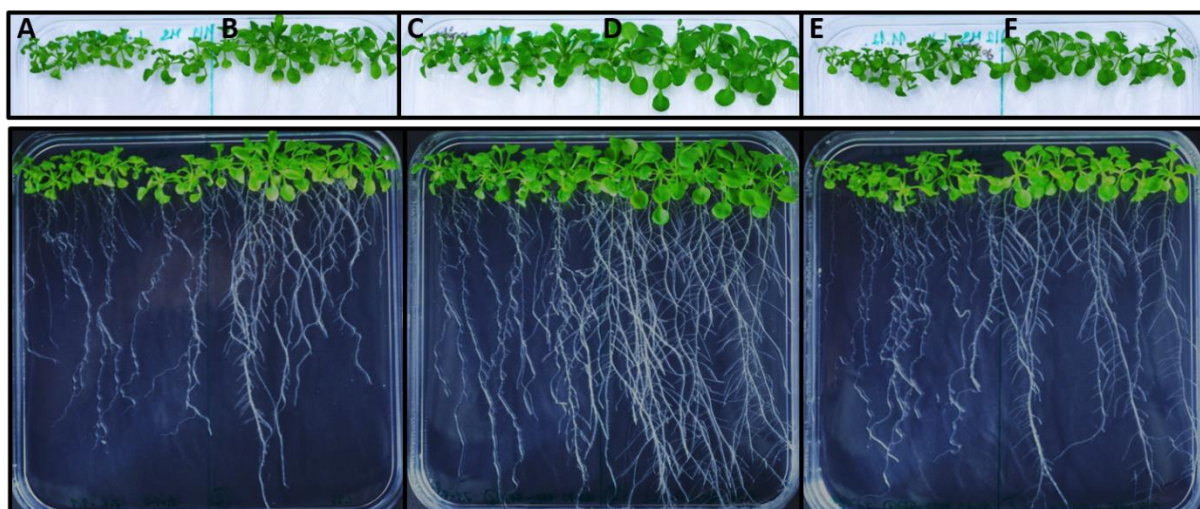


Obr. 34: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 5. den od vyklíčení, šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 100 μm .

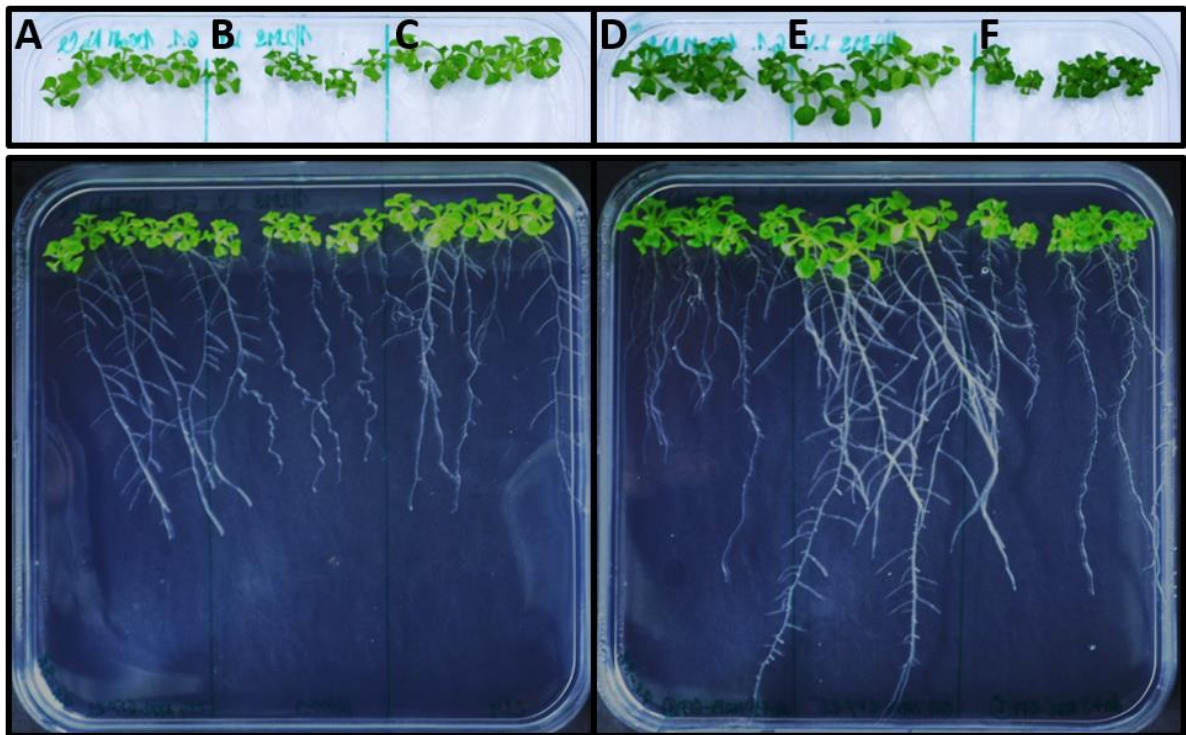
5. 3. 2. 3 Změny morfologie celých rostlin po ovlivnění NaCl, sorbitolem a PQ

Rostliny byly po ukončení experimentu fotograficky dokumentovány přímo v Petriho miskách a to vždy 11. den od vyklíčení a následně pak 18. den od vyklíčení. U rostlin byly pozorovány změny v morfologii nadzemní i podzemní části.

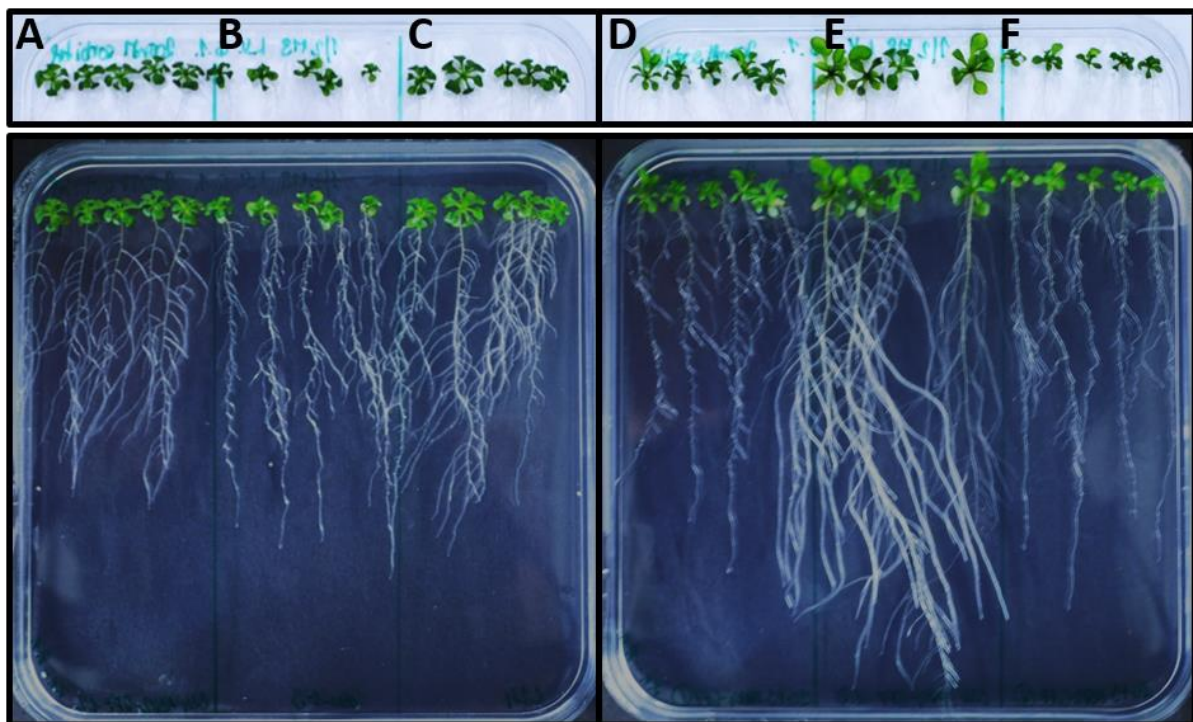
V kontrolních podmínkách vykazovali linie *der1-3* vlnitý vzor růstu kořene. Navíc bylo zřetelné, že rostli pomaleji, měli tedy kratší kořeny a i menší nadzemní část. Linie C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP rostli nejrychleji (Obr. 35). Po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl byly všechny rostliny menší, a to jak nadzemní, tak i podzemní část. U linií *der1-3* se zachoval vlnitý vzor růstu kořene. Od 11. dne byla zachována proporce velikostí rostlin, přičemž linie C24 byly větší oproti liniím *der1-3*. 18. den od vyklíčení se ale tyto rozdíly zmenšovali (Obr. 36). Nejvýrazněji se odlišovala linie C24-MAP4-GFP, která měla největší rostliny (Obr. 36E). Po působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu byla morfologie linií podobná jako u solného stresu, přičemž se opět po 18. dni od vyklíčení stírali velikostní rozdíly mezi liniemi C24 a *der1-3* (Obr. 37). Rostliny linie C24-MAP4-GFP byly však opět největší (Obr. 37E). Po působení oxidativního stresu byly všechny linie velikostně porovnatelné, což opět naznačuje, že linie *der1-3* mohou být o něco málo odolnější vůči tomuto typu stresu. Dokumentují to hlavně fotografie rostlin 18. den od vyklíčení, které byly u linie *der1-3* výrazně větší (Obr. 38B, D, F a 39B, D, F). U koncentrace 0,5 μmol.l⁻¹ PQ byly tyto rozdíly viditelné, ale už ne tak výrazné (Obr. 40B, D, F). Obecně oxidativní stres redukoval u všech linií velikost kořenového systému (Obr. 38-40).



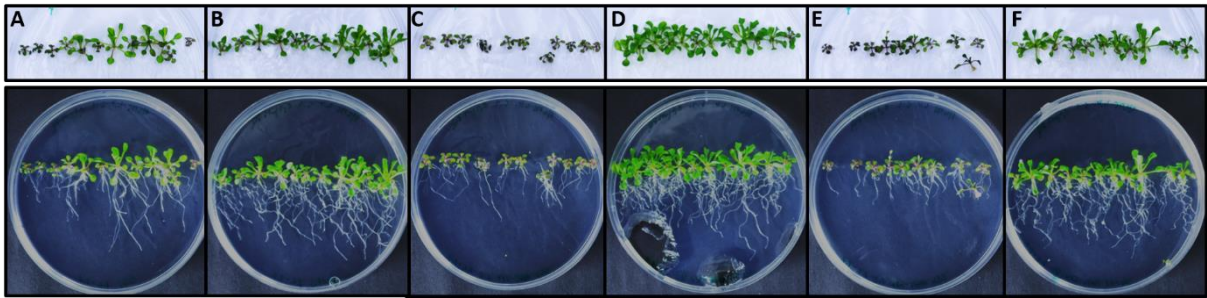
Obr. 35: Morfologie rostlin jednotlivých linií v kontrolních podmínkách po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) *der1-3*, B) C24, C) *der1-3*-ABD2-GFP, D) C24-ABD2-GFP, E) *der1-3*-MAP4-GFP, F) C24-MAP4-GFP.



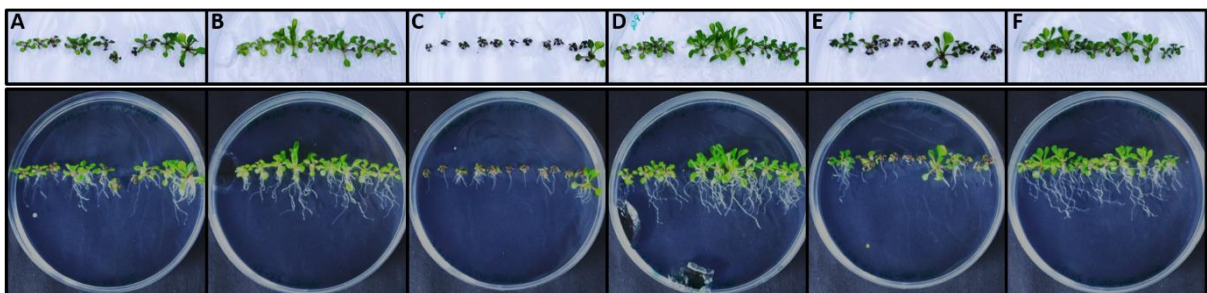
Obr. 36: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) C24-ABD2-GFP, B) *der1-3*, C) C24, D) *der1-3*-MAP4-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-ABD2-GFP.



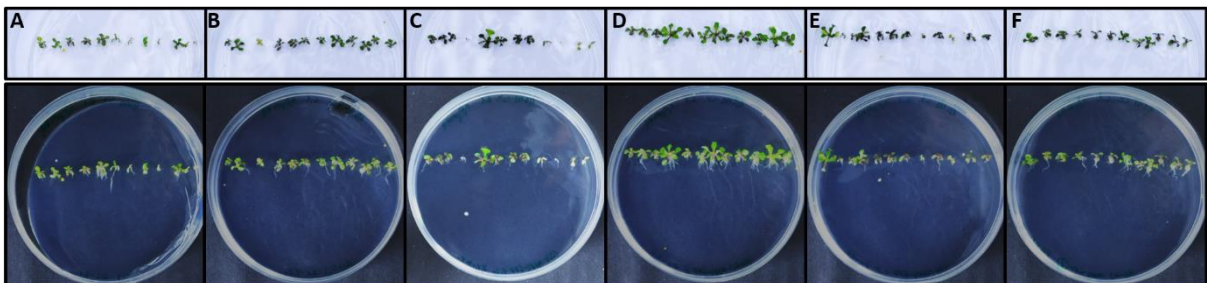
Obr. 37: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení 200 mmol.l^{-1} sorbitolu po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) C24-ABD2-GFP, B) *der1-3*, C) C24, D) *der1-3*-MAP4-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-ABD2-GFP.



Obr. 38: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.



Obr. 39: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.



Obr. 40: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 18. den od vyklíčení. A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.

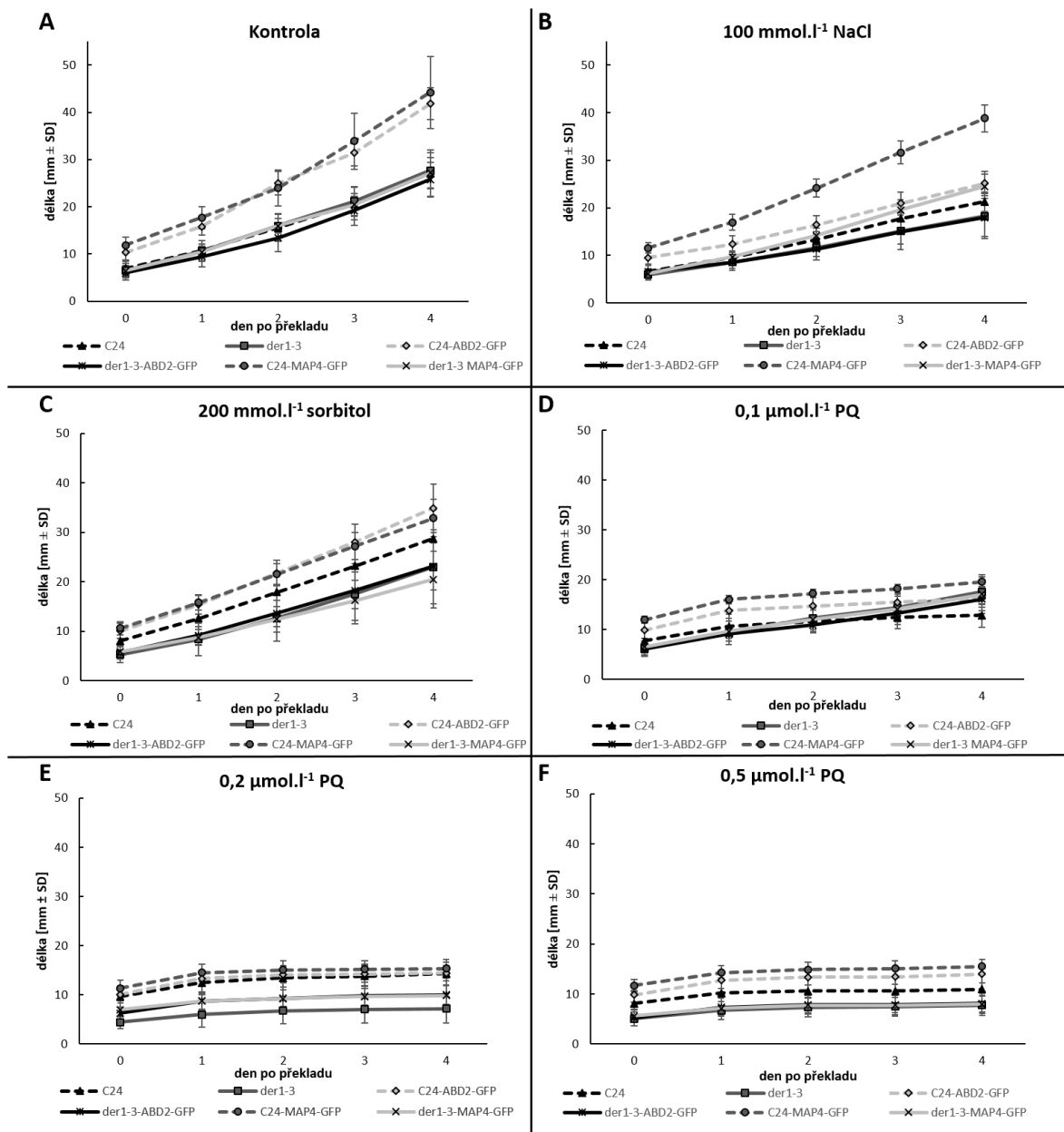
5. 3. 3 Parametry kořene a fenotyp kořenových vlásků po překladu rostlin na solný, osmotický a oxidativní stres

5. 3. 3. 1 Délky primárních kořenů a jejich přírůstky za 24 h

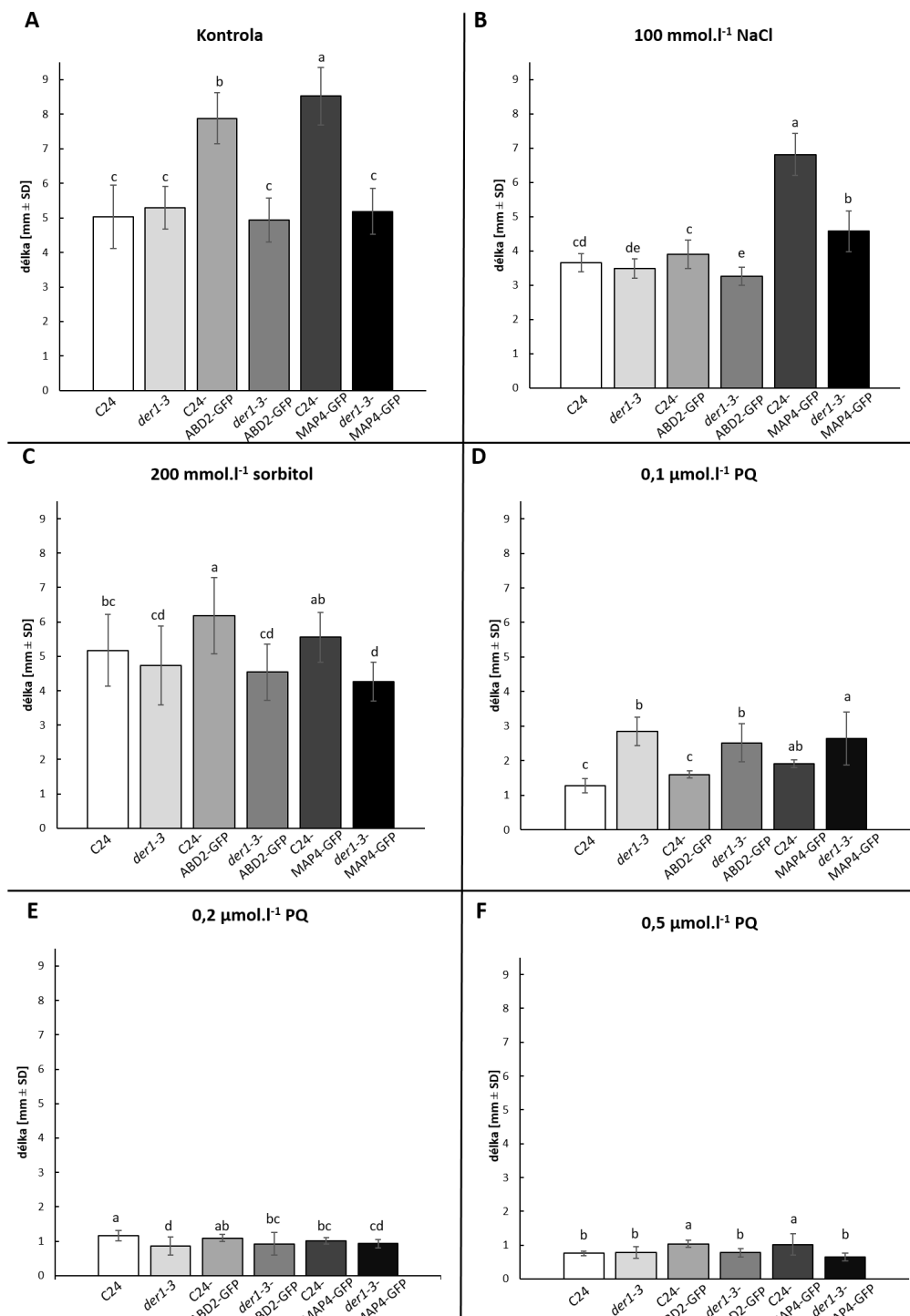
Semena po sterilizaci byla vysázená na ½ kultivační média a po indukci a synchronizaci klíčení při 4°C byly Petriho misky umístěné do fytostronu. Třetí den po vyklíčení byly rostliny ve sterilních podmínkách jemnou manipulací pomocí pinzety přeloženy na ½ kultivační média s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl, 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu, 0,1 μmol.l⁻¹ PQ, 0,2 μmol.l⁻¹ PQ a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ. Hned po překladu a každý následující den byly rostliny skenované přímo v Petriho miskách po dobu 5 dnů. Z naskenovaných obrázků byly následně změřeny délky primárních kořenů v programu ImageJ a zaznamenal se tak růst jednotlivých linií na použitých médiích (Obr. 41). V kontrolních podmínkách vykazovali nejrychlejší růst linie C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP. U ostatních linií nebyly zaznamenány žádné rozdíly (Obr. 41A). Po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl nejlépe rostla linie C24-MAP4-GFP, u ostatních linií byly přírůstky kořene porovnatelné (Obr. 41B). U 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu byl růst kořenů podobný jako v kontrolních podmínkách, tedy všechny linie C24 rostli rychleji než linie *der1-3* (Obr. 41C). Přírůstek primárních kořenů byl ale o necelých 10 mm menší. Oxidativní stres ve všech koncentracích ovlivnil růst primárních kořenů nejvíce. Všechny linie byly porovnatelné, neprojevil se ani rozdíl v růstu kořenů mezi liniemi C24 a *der1-3*. Lze říct, že linie *der1-3* byly na tento druh stresu, poněkud více, rezistentnější. U koncentrace 0,1 μmol.l⁻¹ PQ můžeme pozorovat, že linie *der1-3*-ABD2-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP měli relativně značný přírůstek primárního kořene, přičemž další linie rostli už jenom minimálně (Obr. 41D). Se zvyšující se koncentrací PQ se rostliny adaptovali hůře (Obr. 41D, E, F).

Z hodnot délek primárních kořenů byly následně vypočítány průměrné přírůstky kořenů za 24 h (Obr. 42). Při solném a osmotickém stresu byly přírůstky mírně redukovány, na rozdíl od oxidativního stresu, kde byl rapidní rozdíl vůči kontrole. Se zvyšující se koncentrací PQ byla redukce přírůstku kořenů větší. Nejvyšší přírůstek v kontrolních podmínkách měli linie C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP (Obr. 42A), což korelovalo i s délkou kořenů (Obr. 41A). U solného stresu měla největší přírůstek linie C24-MAP4-GFP, u ostatních linií byl přírůstek porovnatelný (Obr. 42B). U osmotického stresu se projevil stejný trend jako v kontrolních podmínkách, jen už ne s tak výrazným rozdílem (Obr. 42C). Linie *der1-3* celkově rostli pomaleji, tedy i přírůstek za 24 h byl menší. U oxidativního stresu byly přírůstky všech linií porovnatelné (Obr. 42D, E, F), tudíž se stírali rozdíly mezi liniemi C24 a *der1-3*, což potvrzuje,

že linie *der1-3* může být, na tento typ stresu, více rezistentní. Při koncentraci $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ měli linie *der1-3* nejvyšší přírůstek, kde byl potvrzen i statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$), určený ANOVA a následně Fisherovým LSD testem (Obr. 42D).



Obr. 41: Průměrný růst primárních kořenů linií C24, C24, *der1-3*, C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP, přeložených na média s indukcí solného, osmotického a oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 4 dnů od překlade na kontrolní médium (A), na médium s obsahem 100 mmol.l^{-1} NaCl (B), 200 mmol.l^{-1} sorbitolu (C), $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (D), $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (E), a $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ (F). Data reprezentují průměr \pm SD ze 2 biologických replik u solného a osmotického stresu při počtu 8 rostlin a u oxidativního stresu \pm SD z 1 biologické repliky při počtu 12 rostlin.



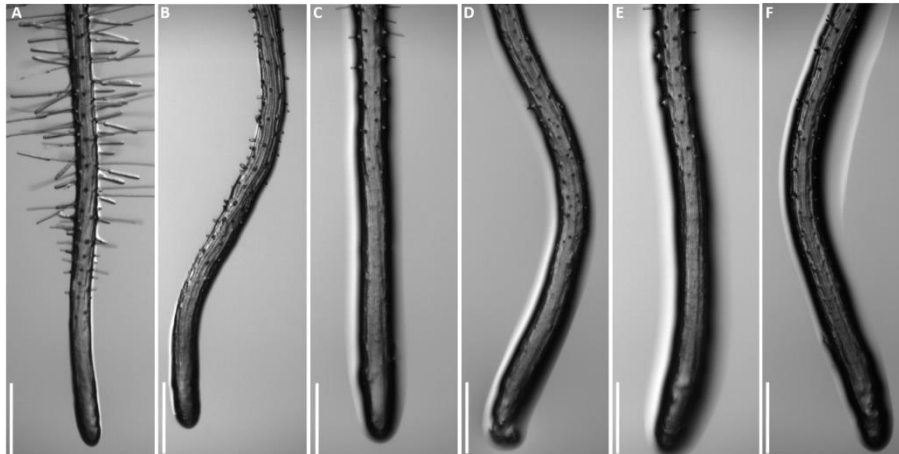
Obr. 42: Průměrný přírůstek kořenů za 24 h linií C24, C24, *der1-3*, C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP, přeložených na média s indukcí solného, osmotického a oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dnů od vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l⁻¹ NaCl (B), 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu (C), 0,1 μmol.l⁻¹ PQ (D), 0,2 μmol.l⁻¹ PQ (E), a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (F). Data reprezentují průměr ± SD ze 2 biologických replik u solného a osmotického stresu, vždy po 8 rostlinách a u oxidativního stresu ± SD z 1 biologické repliky, vždy po 12 rostlinách. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi jednotlivými liniemi, určené pomocí ANOVA a následného Fisherova LSD testu.

5. 3. 3. 2 Fenotyp kořene a kořenových vlásků

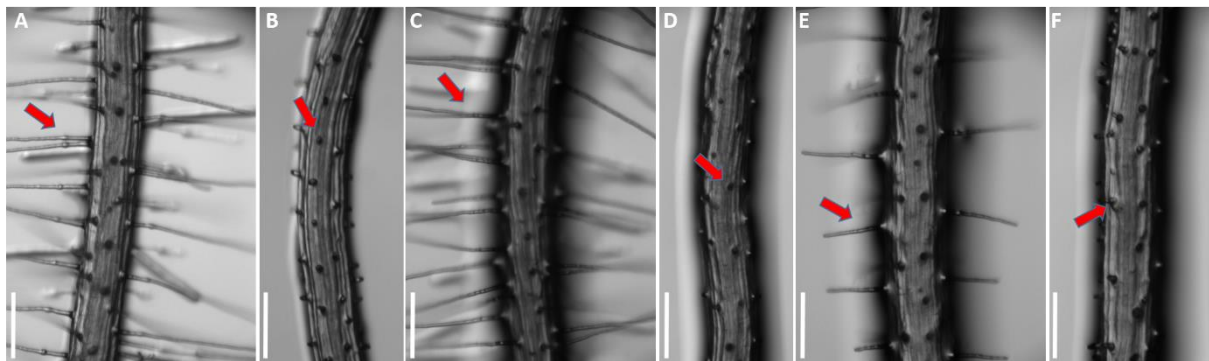
Rostliny byly po ukončení experimentů, což bylo 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), nafoceny přímo v Petriho miskách ve stereomikroskopu. Fotografie dokumentují fenotyp celého kořene a následně pak změny ve fenotypu kořenových vlásků po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl, 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu, 0,1 μmol.l⁻¹ PQ, 0,2 μmol.l⁻¹ PQ a 0,5 μmol.l⁻¹ PQ.

Linie C24 vykazovaly typický kontrolní fenotyp kořene (Obr. 43A, C, E), jejich růst byl normální. Linie C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP byly větší a kořen měly delší, protože délka od špičky kořene k prvním kořenovým vláskům byla viditelně delší. Linie *der1-3* měly svůj typický vlnitý vzor růstu kořene (Obr. 43B, D, F). Fenotypy kořene se po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl (Obr. 45), 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu (Obr. 47) nezměnil, jenom u oxidativního stresu docházelo k občasnému ohýbání kořenových špiček (Obr. 49 a 51), nejčastěji však při koncentraci 0,5 μmol.l⁻¹ PQ (Obr. 51).

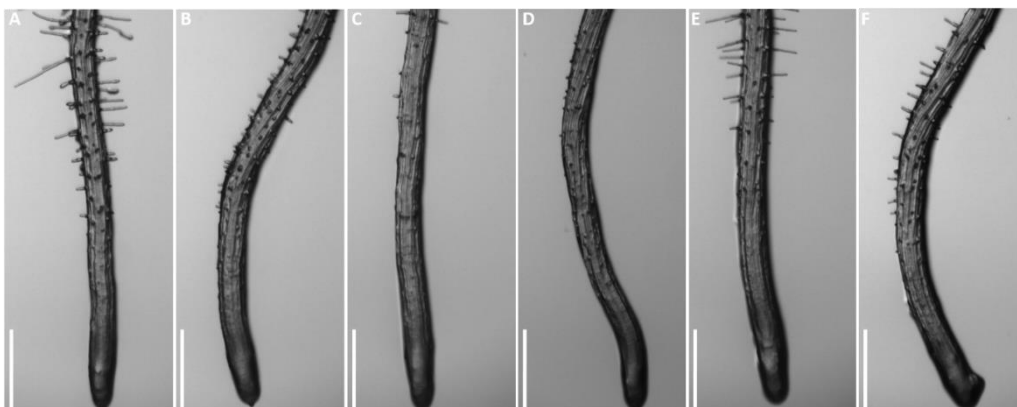
Fenotyp kořenových vlásků byl v kontrolních podmínkách u všech linií zachován. Linie C24 (i transformované) měly vlásky dlouhé a nerozvětvené (Obr. 44A, C, E) a linie *der1-3* (i transformované) měly vlásky nevyvinuté a krátké (Obr. 44B, D, F). Po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl a 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu byly změny ve fenotypu vlásků podobné. U linií C24 se vyskytovaly kratší a rozvětvené kořenové vlásky (Obr. 46A, C, E a 48A, C, E). Kořenové vlásky linií *der1-3* se občas prodloužily a vyskytovaly se ve shlucích (Obr. 46B, D, F), přičemž se u osmotického stresu vyskytovala převážně jen nahromadění kořenových vlásků (Obr. 48B, D, F). Oxidativní stres měl celkově výrazný vliv, jak na růst kořene, tak i na vývin kořenových vlásků, se zvyšující se koncentrací se vlásky už skoro nevyskytovaly. U 0,1 μmol.l⁻¹ PQ měly linie C24 vlásky kratší a po adaptaci se vyskytovaly zóny bez vlásků (Obr. 50A, C, E). Linie *der1-3* měly většinou vlásky bez abnormalit, jen se občas vyskytovaly zóny s vyšší hustotou, nebo bez kořenových vlásků (Obr. 50B, D, F). Koncentrace 0,2 μmol.l⁻¹ PQ vyvolávala stejné efekty jako u předchozí koncentrace (Obr. 52). Na médiu s obsahem 0,5 μmol.l⁻¹ PQ se vlásky po překladu snažily vyvíjet, což způsobilo, že linie C24 měly kratší vlásky a *der1-3* nahromaděné vlásky. Posléze se pak už vůbec nevyvíjely, takže byly přítomné zóny bez kořenových vlásků (Obr. 54).



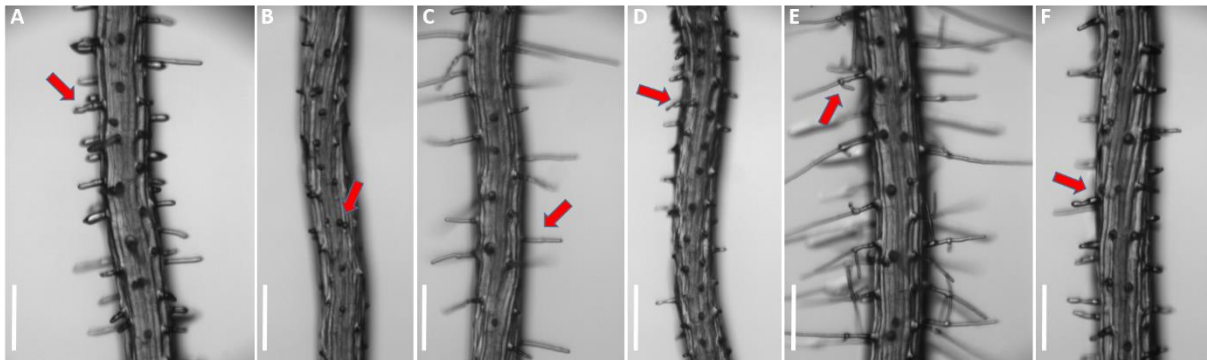
Obr. 43: Fenotyp kořenů linií C24 (A) *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) v kontrolních podmínkách. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm .



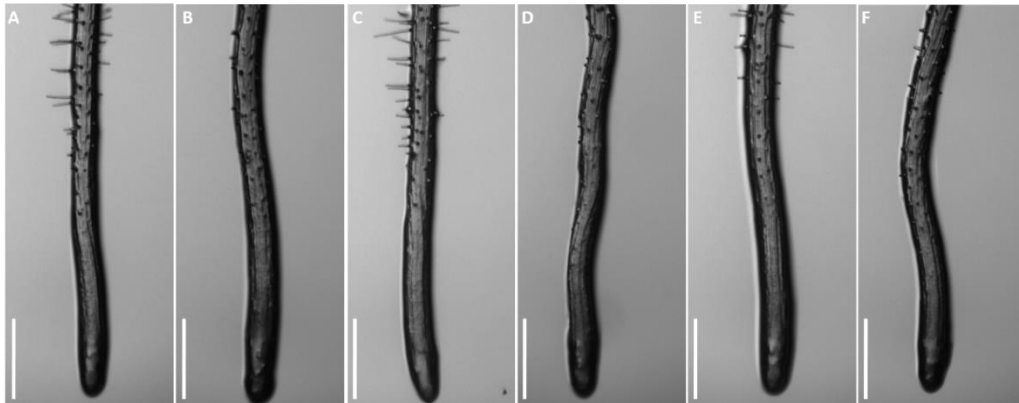
Obr. 44: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) v kontrolních podmínkách. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítko je 200 μm .



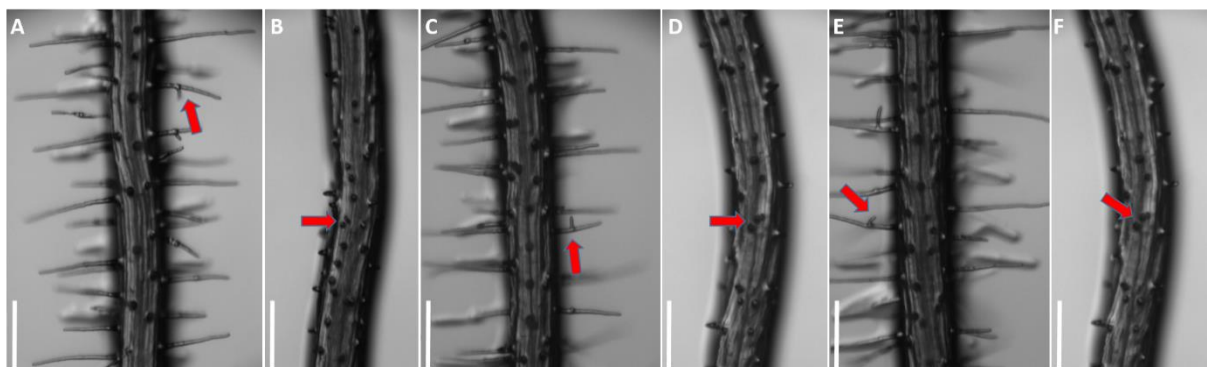
Obr. 45: Fenotyp kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm .



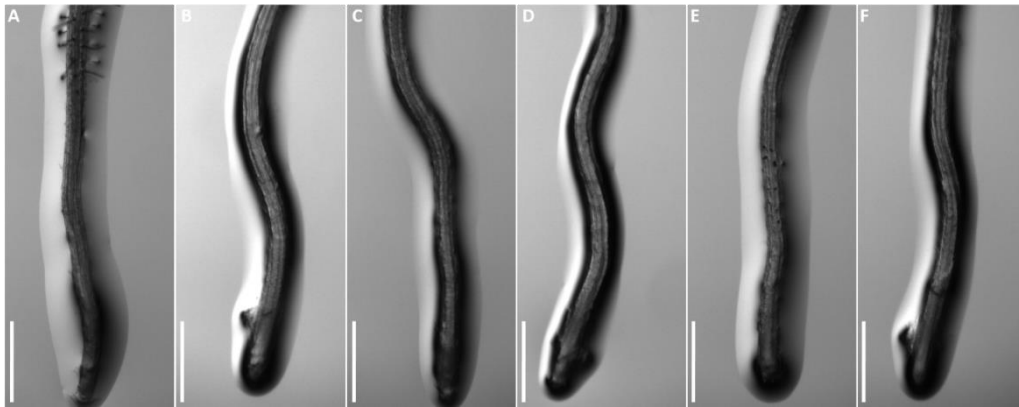
Obr. 46: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítko je 200 μm.



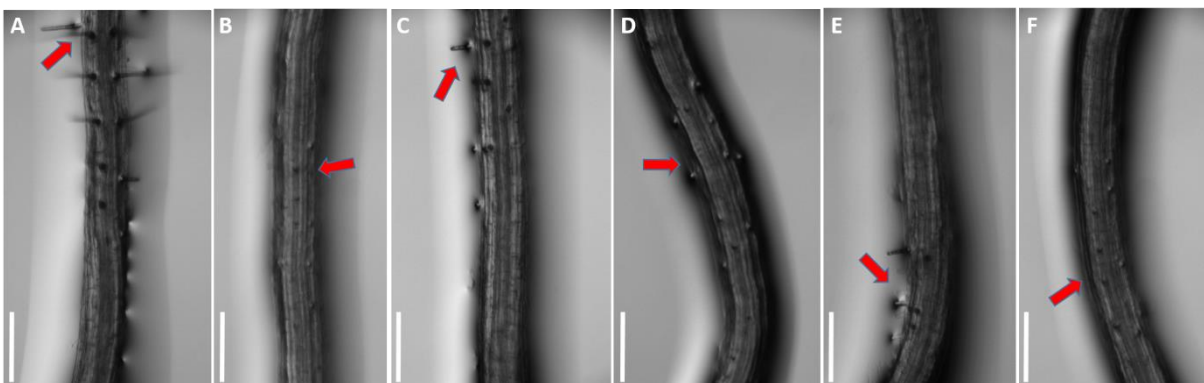
Obr. 47: Fenotyp kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm.



Obr. 48: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3-ABD2-GFP* (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3-MAP4-GFP* (F) při působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítko je 200 μm.



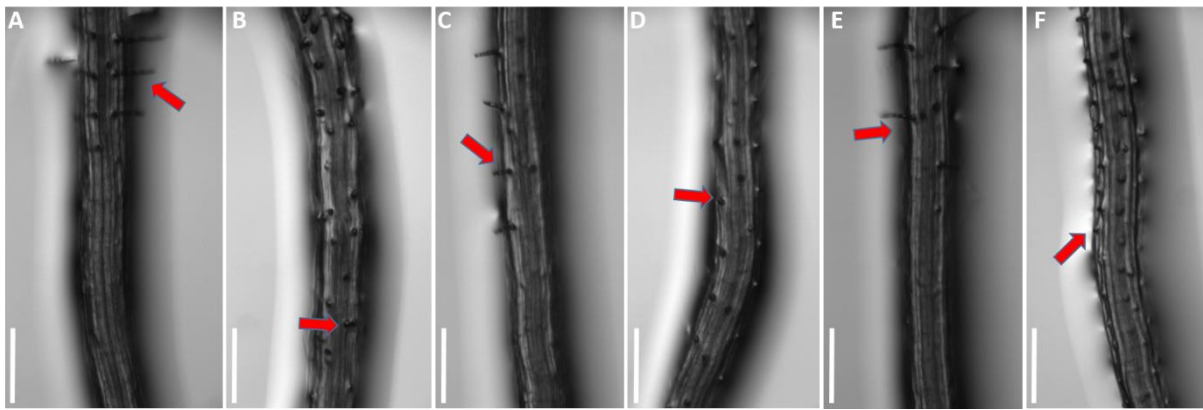
Obr. 49: Fenotyp kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm .



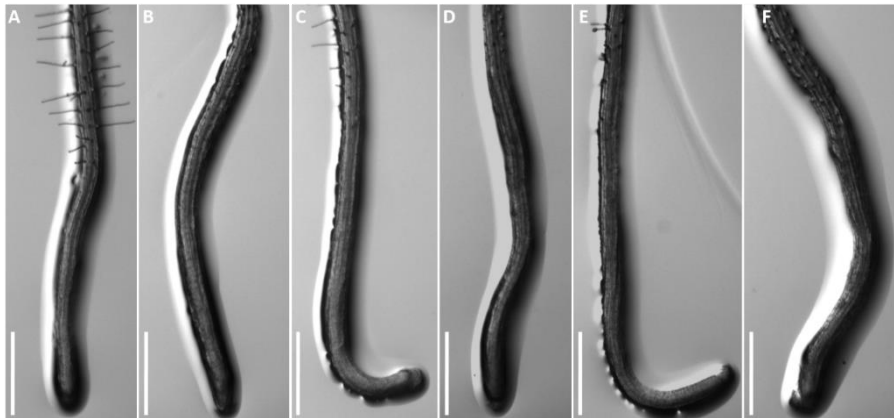
Obr. 50: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,1 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 200 μm .



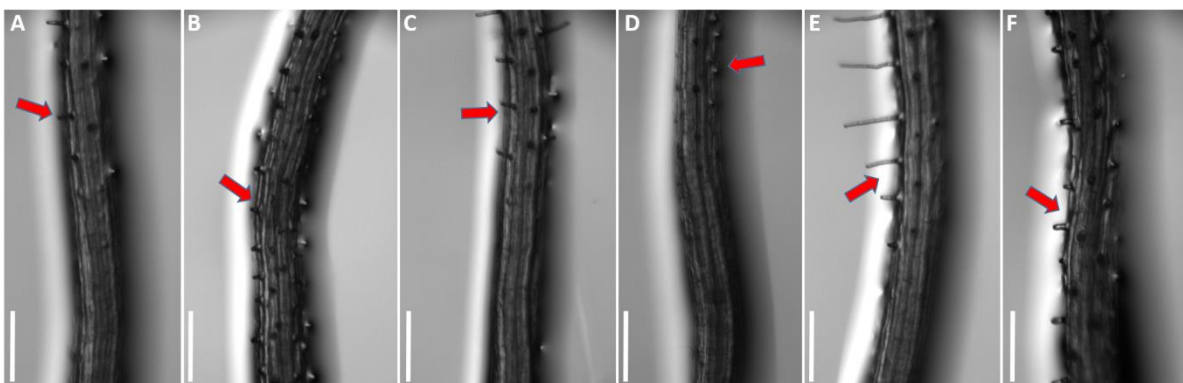
Obr. 51: Fenotyp kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm .



Obr. 52: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,2 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 200 μm .



Obr. 53: Fenotyp kořenů linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), měřítko je 500 μm .

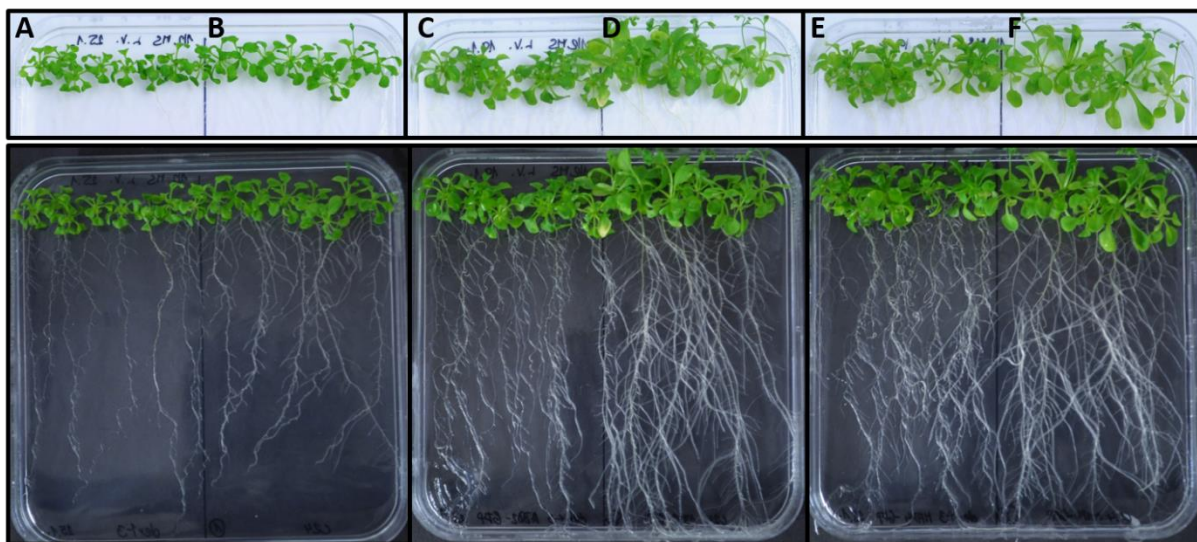


Obr. 54: Fenotyp kořenových vlásků linií C24 (A), *der1-3* (B), C24-ABD2-GFP (C), *der1-3*-ABD2-GFP (D), C24-MAP4-GFP (E), a *der1-3*-MAP4-GFP (F) při působení 0,5 $\mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ. Rostliny jsou 8. den od vyklíčení (5. den po překladu), šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií v daných podmínkách. Měřítka je 200 μm .

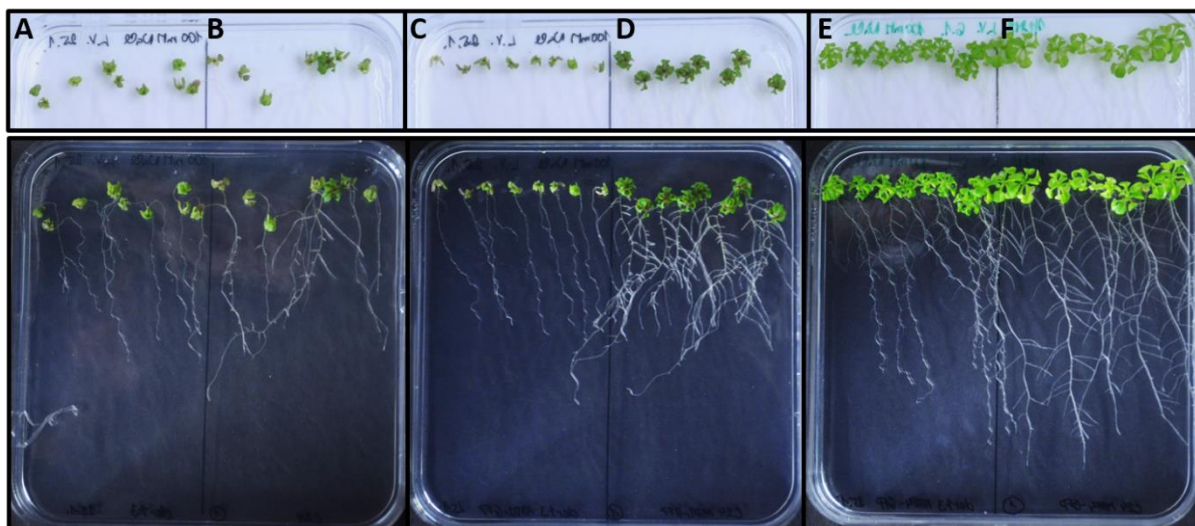
5. 3. 3. 3 Změny morfologie celých rostlin po ovlivnění NaCl, sorbitolem a PQ

Rostliny po ukončení experimentu byly přímo vyfoceny v Petriho miskách, a to vždy 11. den po překladu (14. den od vyklíčení) a následně pak 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). Dokumentovány jsou změny v morfologii nadzemní i podzemní části.

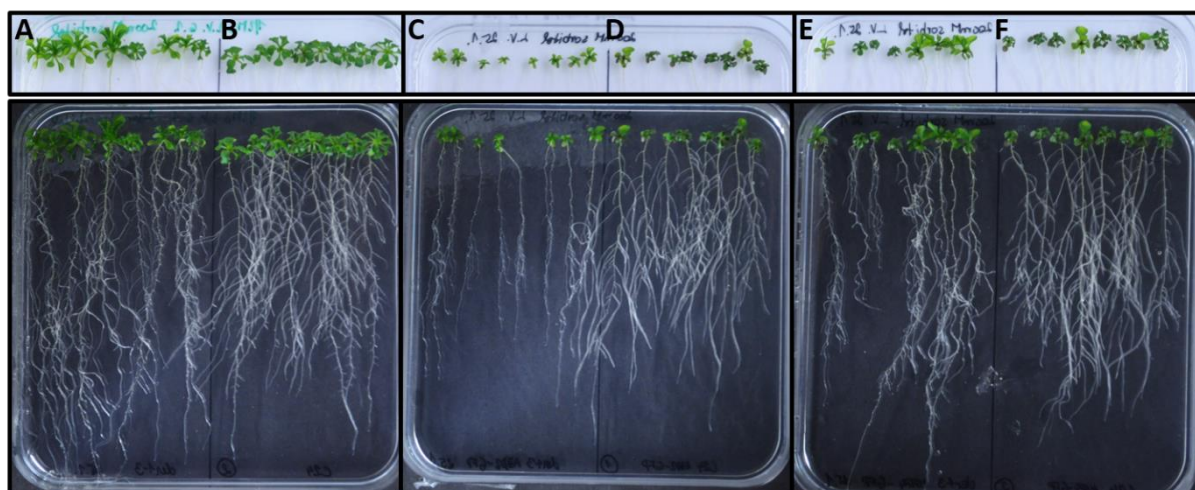
V kontrolních podmínkách linie *der1-3* měly vlnitý vzor růstu kořene a rostly pomaleji, měly tedy kratší kořeny a i menší nadzemní část. Linie C24-ABD2-GFP a C24-MAP4-GFP rostly nejrychleji (Obr. 55). Po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl byly všechny rostliny menší, a to jak jejich nadzemní, tak podzemní část. U linií *der1-3* se zachoval vlnitý vzor kořene. Po 11. dni po překladu už byly linie C24 a *der1-3* velikostně porovnatelné. 17. den po překladu byl stav podobný (Obr. 56), nejrapidněji se vyvíjela linie C24-MAP4-GFP, která byla největší (Obr. 56E). Po působení 200 mmol.l⁻¹ sorbitolu nebyly růstové rozdíly mezi liniemi C24 a *der1-3* patrné (Obr. 57). 11. den po překladu vykazovala nejvyšší odolnost linie C24-ABD2-GFP. Ovšem 17. den po překladu se zdály nejodolnější linie *der1-3* a *der1-3*-MAP4-GFP (Obr. 57A, E). Po oxidativním stresu byly linie *der1-3* o mnoho větší a měly i zelenější nadzemní část (Obr. 58-60 B, D, F). Nejlépe to bylo patrné u koncentrace 0,1 μmol.l⁻¹ PQ, a to 18. den po překladu (Obr. 58). U koncentrace 0,5 μmol.l⁻¹ PQ byly tyto rozdíly méně patrné, ovšem stále viditelné (Obr. 60). Při oxidativním stresu byl u všech linií nejvíce redukován kořenový systém, se zvyšující se koncentrací PQ byla zřetelná i redukce celkového vývoje rostlin (Obr. 58-60).



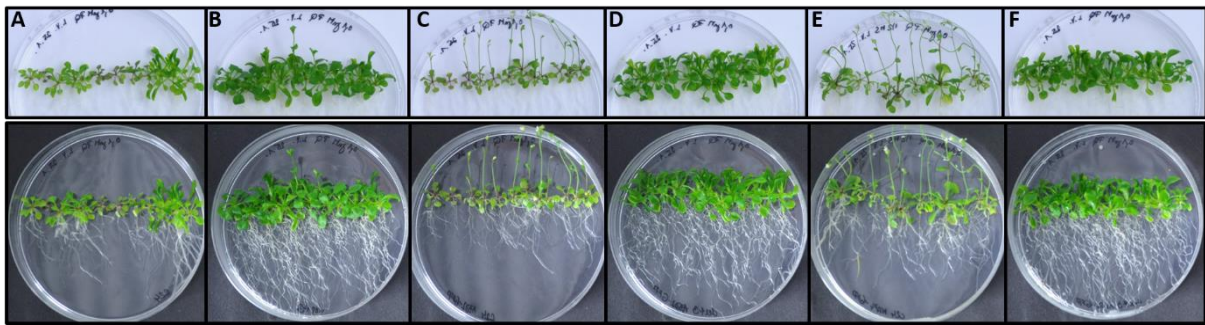
Obr. 55: Morfologie rostlin jednotlivých linií v kontrolních podmínkách po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) *der1-3*, B) C24, C) *der1-3*-ABD2-GFP, D) C24-ABD2-GFP, E) *der1-3*-MAP4-GFP, F) C24-MAP4-GFP.



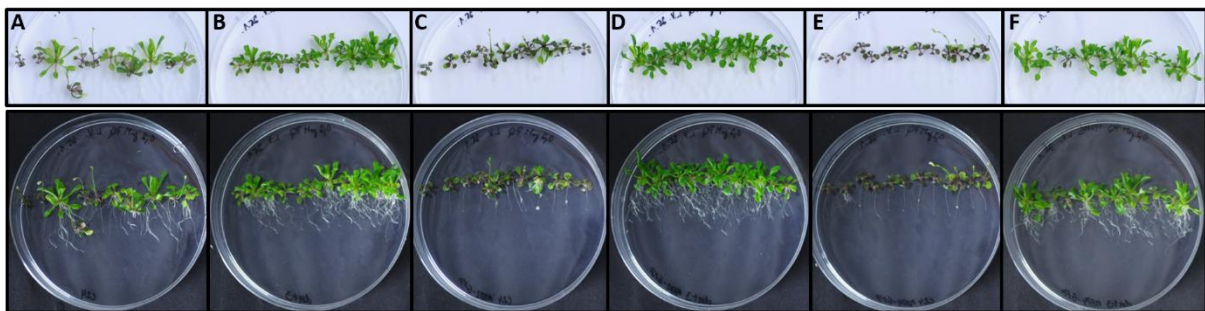
Obr. 56: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) *der1-3*, B) C24, C) *der1-3-ABD2-GFP*, D) C24-ABD2-GFP, E) *der1-3-MAP4-GFP*, F) C24-MAP4-GFP.



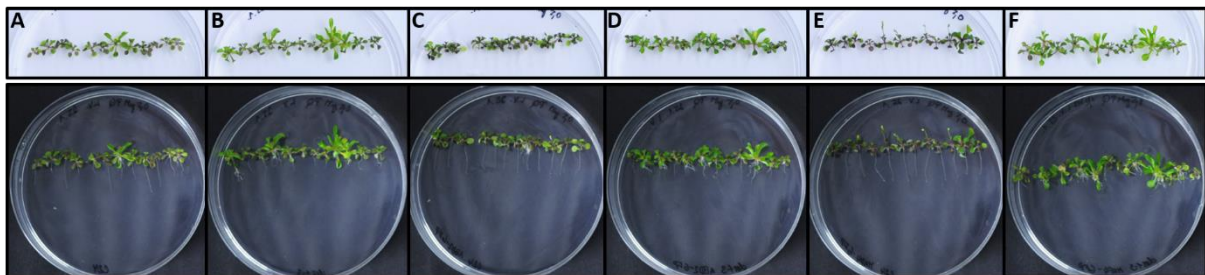
Obr. 57: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení 200 mmol.l^{-1} sorbitolu po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) *der1-3*, B) C24, C) *der1-3-ABD2-GFP*, D) C24-ABD2-GFP, E) *der1-3-MAP4-GFP*, F) C24-MAP4-GFP.



Obr. 58: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.



Obr. 59: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.



Obr. 60: Morfologie rostlin jednotlivých linií při působení $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ po ukončení experimentu. Rostliny jsou 17. den po překladu (20. den od vyklíčení). A) C24, B) *der1-3*, C) C24-ABD2-GFP, D) *der1-3*-ABD2-GFP, E) C24-MAP4-GFP, F) *der1-3*-MAP4-GFP.

5. 4 Změny ve struktuře a dynamice aktinového a mikrotubulového cytoskeletu po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl u linií C24-ABD2-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP

Vysterilizovaná semena byla vysázena na ½ kultivační médium a po dobu 2-3 dnů ponechána ve 4°C pro synchronizaci klíčení. Poté byly misky přeneseny do fytotronu. Pro experiment byly použity 2-3 denní rostliny. Pro sledování hypokotylů byly rostliny připraveny těsně před snímáním do mikroskopických komůrek, krycí skla byla přikryta Parafilmem ze všech 4 stran. Rostliny tak byly připraveny na mikroskopické pozorování. 100 mmol.l⁻¹ NaCl byl aplikován pomocí perfúzní metody, pipetováním 10 x po 10 µl po dobu přibližně 10 min. Rostliny byly sledovány v Laserovém mikroskopu pro live cell imaging (Spining disk) Axio Observer Z1, ZEISS při nastavených parametrech pro detekci GFP s excitací při 488 nm a s emisním spektrem 509 nm (emisní filtr BP 525/50). Autofluorescence chlorofylu byla snímána při excitaci při 488 nm v emisním spektru 667 nm (emisní filtr BP 690/50).

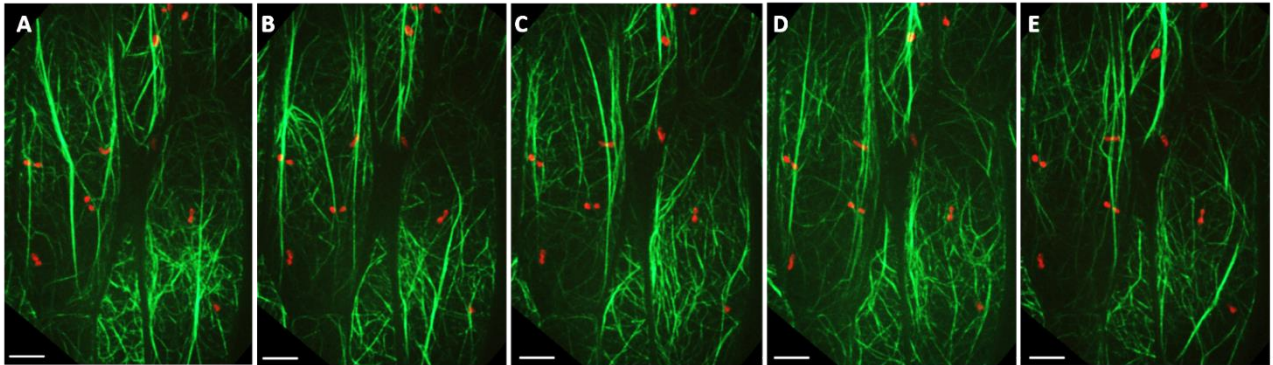
Pro snímání kořenových špiček byly rostliny připraveny den předem do mikroskopických komůrek a stabilizovány 24 h ve skleněných kyvetách ve fytotronu. Další den před skenováním byly vzorky přikryty ze všech čtyř stran krycího skla Parafilmem a připraveny na pozorování. Aplikace solného stresu byla stejná jako u skenování buněk hypokotylu. Rostliny byly opět sledovány v Laserovém mikroskopu pro live cell imaging (Spining disk) Axio Observer Z1, ZEISS při nastavených parametrech pro detekci GFP s excitací při 488 nm a s emisním spektrem 509 nm (emisní filtr BP 525/50).

5. 4. 1 Morfologie cytoskeletu hypokotylových buněk a buněk kořenové špičky linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP a *der1-3*-ABD2-GFP, *der1-3*-MAP4-GFP v kontrolních podmínkách

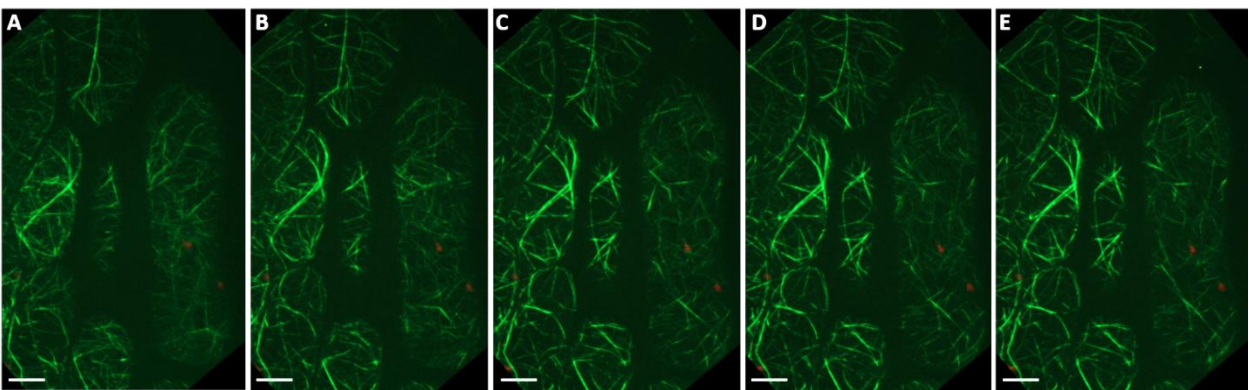
Rozdíly v morfologii cytoskeletu mezi liniemi C24 a *der1-3* byly porovnány na úrovni buněk hypokotylu a buněk kořenové špičky. Aktinový cytoskelet v hypokotylových buňkách byl u mutantní linie *der1-3*-ABD2-GFP (Obr. 62) tvořen kratšími a tenčími vlákny než u kontrolní linie C24-ABD2-GFP (Obr. 61). U mikrotubulového cytoskeletu se výrazné rozdíly mezi liniemi nevyskytovaly, jen buňky hypokotylu linie *der1-3*-MAP4-GFP (Obr. 64) byly menší než u C24-MAP4-GFP (Obr. 63) a MT síť byla trochu denznější.

U kořenových špiček byl patrný rozdíl ve velikosti buněk mezi liniemi C24 a *der1-3*, který byl zmíněn už v předchozí kapitole. Buňky linií C24 v porovnatelných zónách kořene

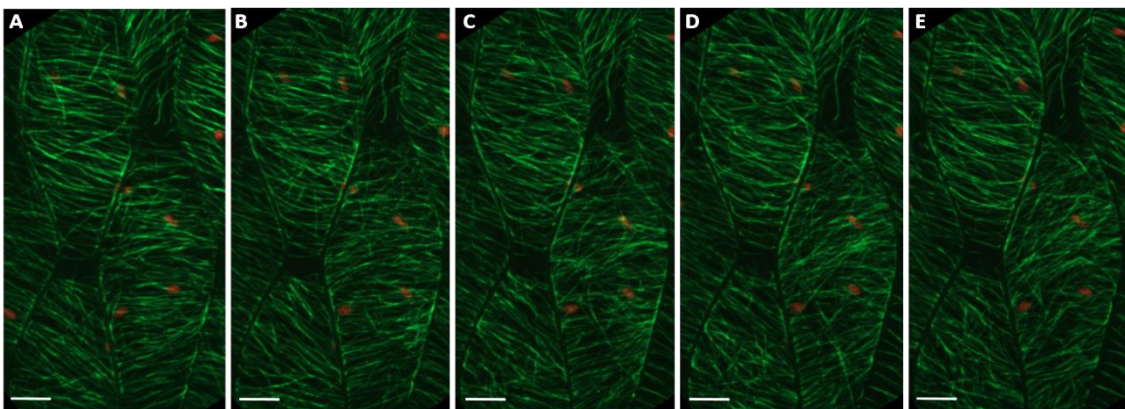
byly větší. Porovnáním aktinového cytoskeletu mezi liniemi C24-ABD2-GFP a *der1-3*-ABD2-GFP ukázalo, že linie *der1-3* má aktinová vlákna kratší a jemnější než linie C24 (Obr. 65A, B, E a F). Tento rozdíl byl patrný už v hypokotylových buňkách. Mikrotubulový cytoskelet se mezi liniemi výrazně neodlišoval (Obr. 65 C, D, G a H).



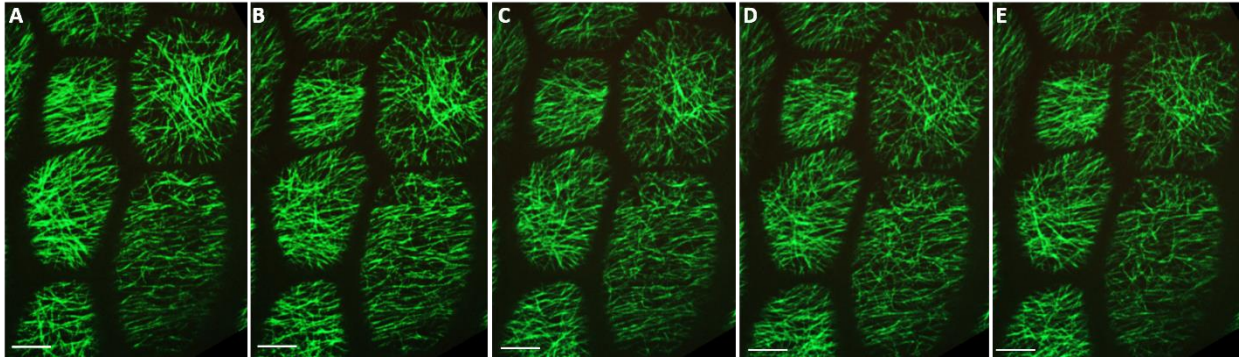
Obr. 61: Buňky hypokotyly linie C24-ABD2-GFP v kontrolních podmínkách. Obrázky znázorňují morfologii aktinového cytoskeletu v časových intervalech snímání A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Měřítka je 10 μ m.



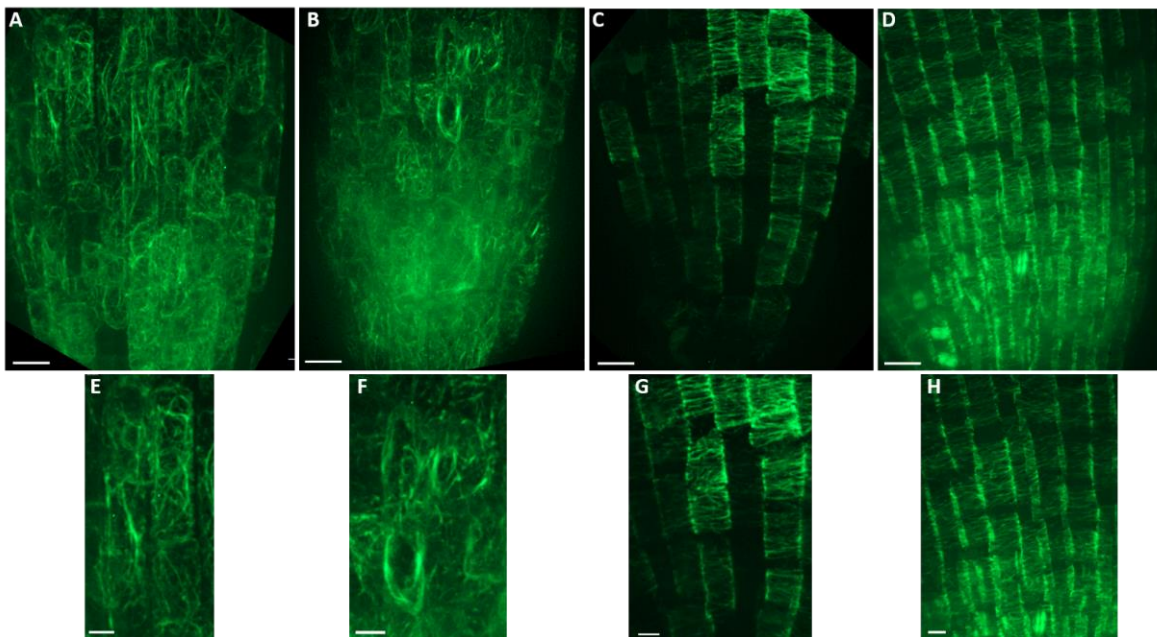
Obr. 62: Buňky hypokotyly linie *der1-3*-ABD2-GFP za kontrolních podmínek. Obrázky znázorňují morfologii aktinového cytoskeletu v časových intervalech snímání A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Měřítka je 10 μ m.



Obr. 63: Buňky hypokotyly linie C24-MAP4-GFP v kontrolních podmínkách. Obrázky znázorňují morfologii mikrotubulového cytoskeletu v časových intervalech snímání A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Měřítka je 10 μ m.



Obr. 64: Buňky hypocotylu linie *der1-3-MAP4-GFP* v kontrolních podmínkách. Obrázky znázorňují morfologii mikrotubulového cytoskeletu v časových intervalech snímání A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Měřítka je 10 μm .



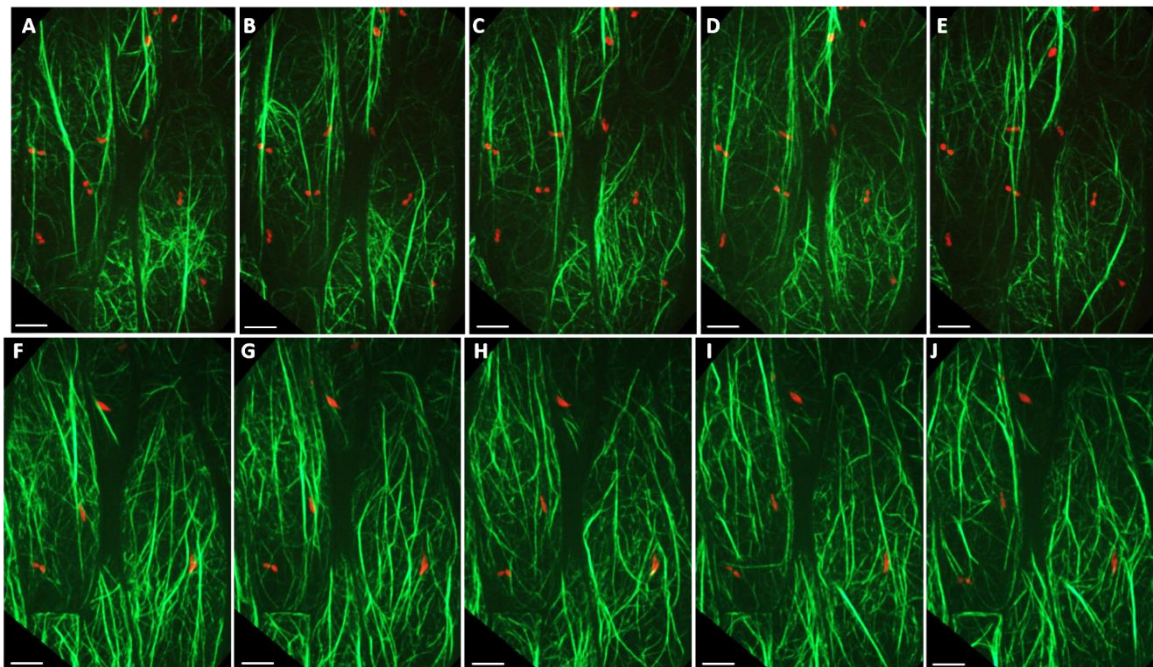
Obr. 65: Cytoskelet kořenových špiček v kontrolních podmínkách. Obrázky znázorňují pohled na celou kořenovou špičku a výřez několika buněk ze stejné zóny kořenové špičky linie C24-ABD2-GFP (A, E), *der1-3-ABD2-GFP* (B, F), C24-MAP4-GFP (C, G), a *der1-3-MAP4-GFP* (D, H). Měřítka je 10 μm u A-D a 5 μm u E-H.

5. 4. 2 Vliv solného stresu ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$) na cytoskelet linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, *der1-3-ABD2-GFP* a *der1-3-MAP4-GFP*

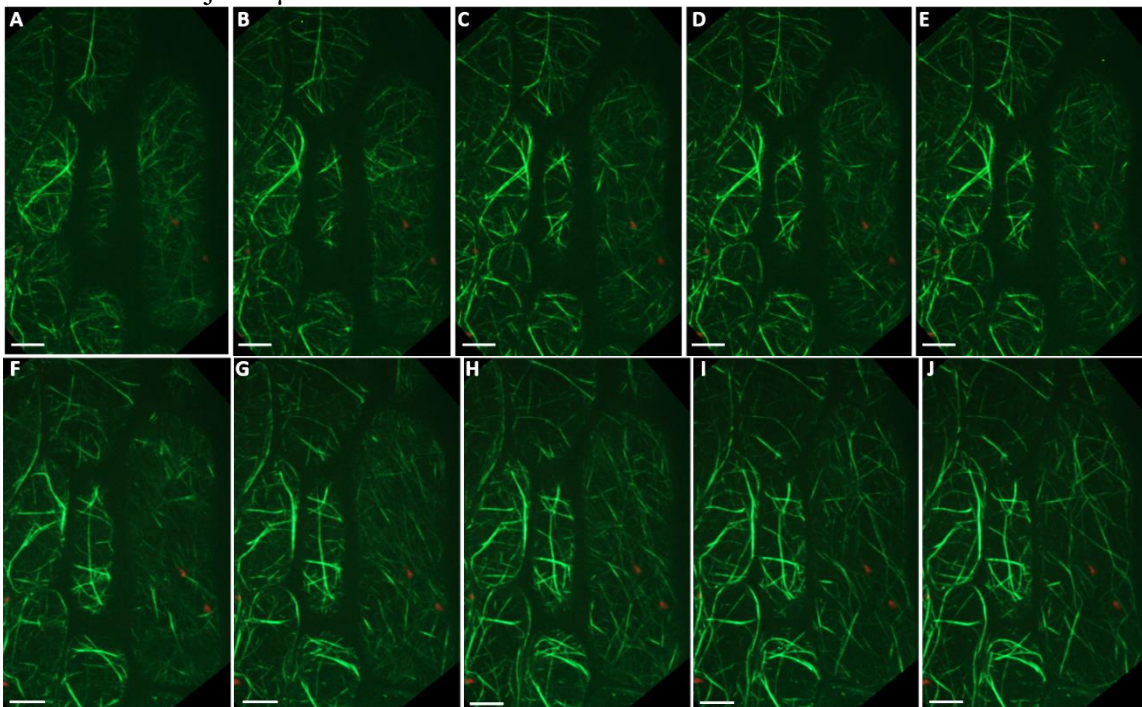
2-3 denní rostliny byly skenovány nejprve v kontrolních podmínkách každých 30 s po dobu 30 min v případě hypokotylových buněk a každých 45 s po dobu 30 min u kořenové špičky. Po prvním snímání byl k rostlinám šetrně aplikován NaCl v koncentraci 100 mmol.l^{-1} přibližně po dobu 10 min. Mikroskopické preparáty byly následně skenovány stejným způsobem jako v kontrolních podmínkách ve stejné zóně buněk.

U hypokotylových buněk byly mezi liniemi v reakci na solný stres vidět rozdíly. U linie *der1-3-ABD2-GFP* byl aktinový cytoskelet citlivější než linie C24-ABD2-GFP (Obr. 66). V kontrolních podmínkách se aktinová vlákna už mírně svazkovala (Obr. 67A-E). Po působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ se během 10 minut u linie *der1-3-ABD2-GFP* krátká aktinová vlákna rozpadla a vznikala dlouhá, tlustší vlákna (Obr. 67F-J). U linie C24-ABD2-GFP se během působení solného stresu také tvořila dlouhá a tlustší vlákna, ale zůstala zachována i ta jemnější. Silnější efekt byl zaznamenán až mezi 20 a 30 min (Obr. 66F-J). Mikrotubulový cytoskelet linie C24-MAP4-GFP byl rezistentnější, protože depolymerizace a vytváření bodových útvarů (spotů) bylo pozorováno až ke konci 30 min snímání (Obr. 68F-J). Vzorek byl proto nasnímán dalších 30 min (Obr. 68K-O), aby byl efekt porovnatelný s linií *der1-3-MAP4-GFP*. Tato linie vykazovala silný efekt během 10. minuty skenování, mikrotubuly depolymerizovaly a tvořily se spoty (Obr. 69F-J).

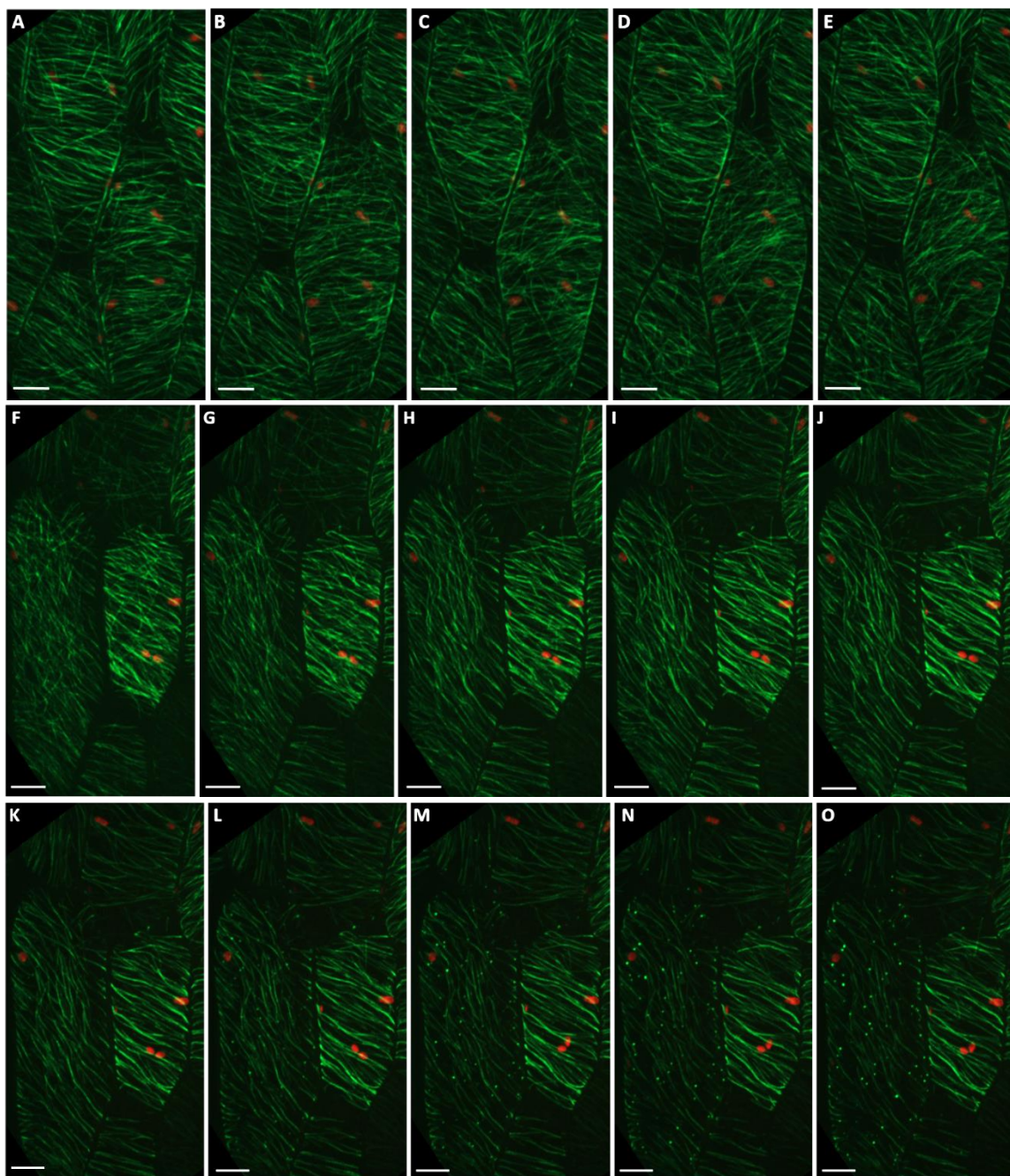
Působení solného stresu na buňky kořenové špičky vyvolalo rozdílné reakce mezi liniemi. U linie C24-ABD2-GFP se aktinová vlákna začala svazkovat (svazky byly dlouhé), ale jemnější vlákna byla i po 30 minutách ještě přítomná (Obr. 70F-J). Linie *der1-3-ABD2-GFP* byla o trošku citlivější než linie C24-ABD2-GFP. Po 30 minutách se už jemná krátká vlákna téměř nevyskytovala (Obr. 71F-J). U mikrotubulového cytoskeletu se ukázal stejný trend. U *der1-3-MAP4-GFP* se efekt solného stresu projevil skoro okamžitě po aplikaci (během 5 min skenování). Mikrotubuly depolymerizovaly a tvořily se spoty (Obr. 73F-J). Tvoření spotů a depolymerizace mikrotubulů se u linie C24-MAP4-GFP objevovalo až během 15-20 minuty (Obr. 72F-J). Kořeny u všech linií po působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ přestávaly růst.



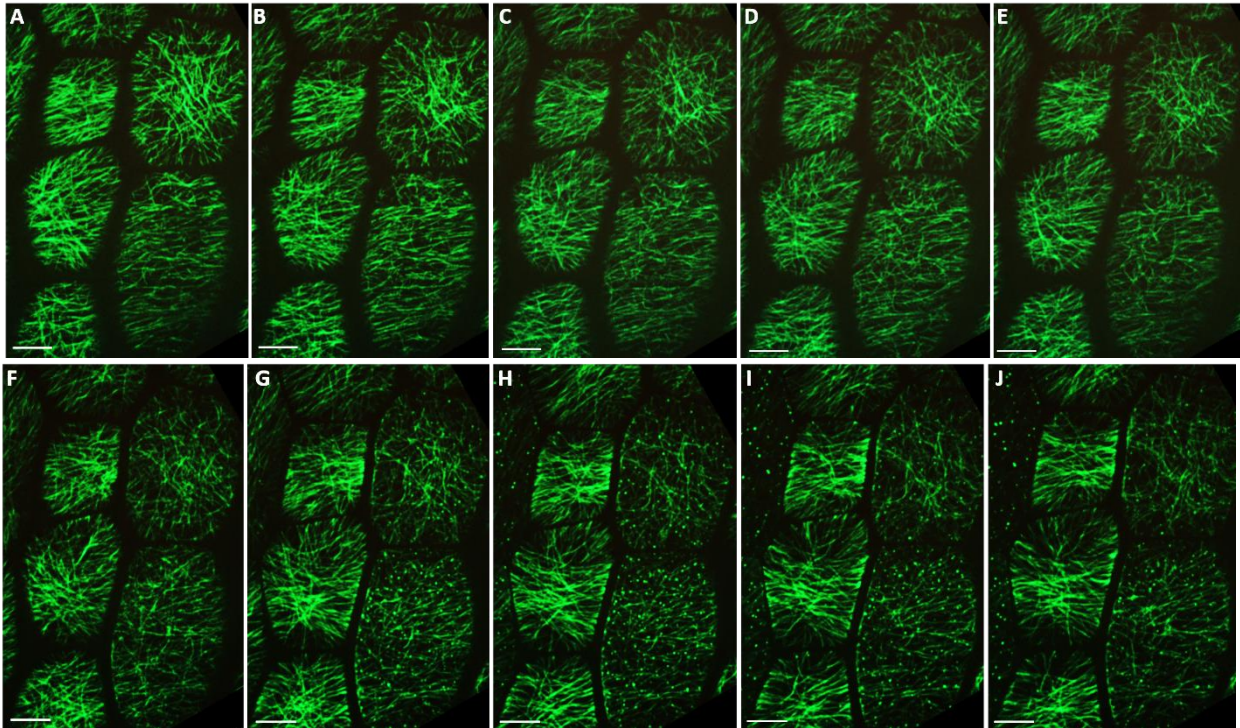
Obr. 66: Buňky hypokotyly linie C24-ABD2-GFP. Obrázky znázorňují reakci aktinového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 30 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítko je $10 \mu\text{m}$.



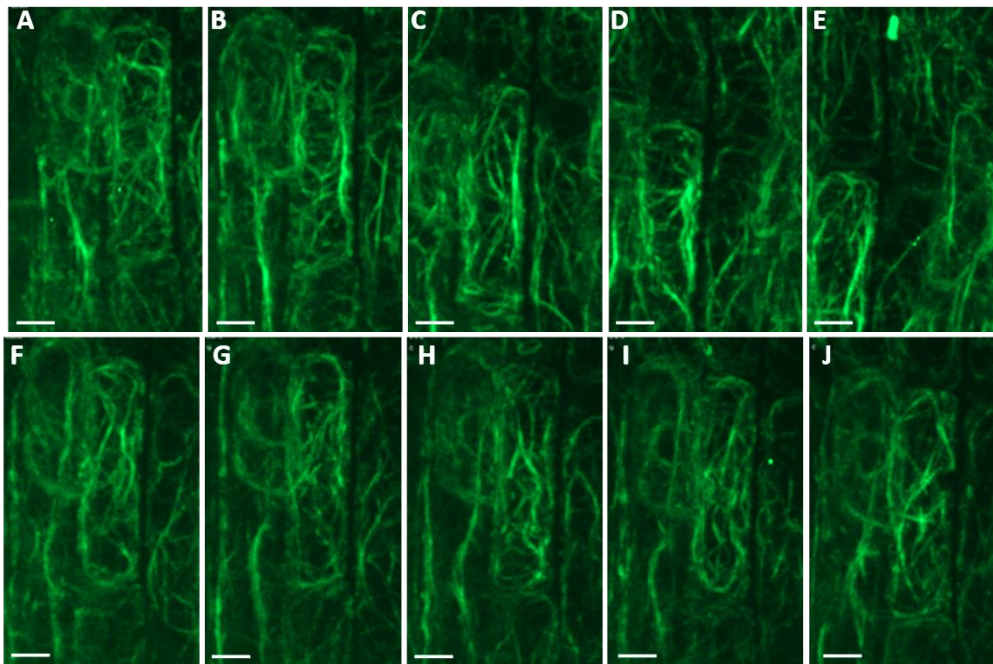
Obr. 67: Buňky hypokotyly linie *der1-3-ABD2-GFP*. Obrázky znázorňují reakci aktinového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 30 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítko je $10 \mu\text{m}$.



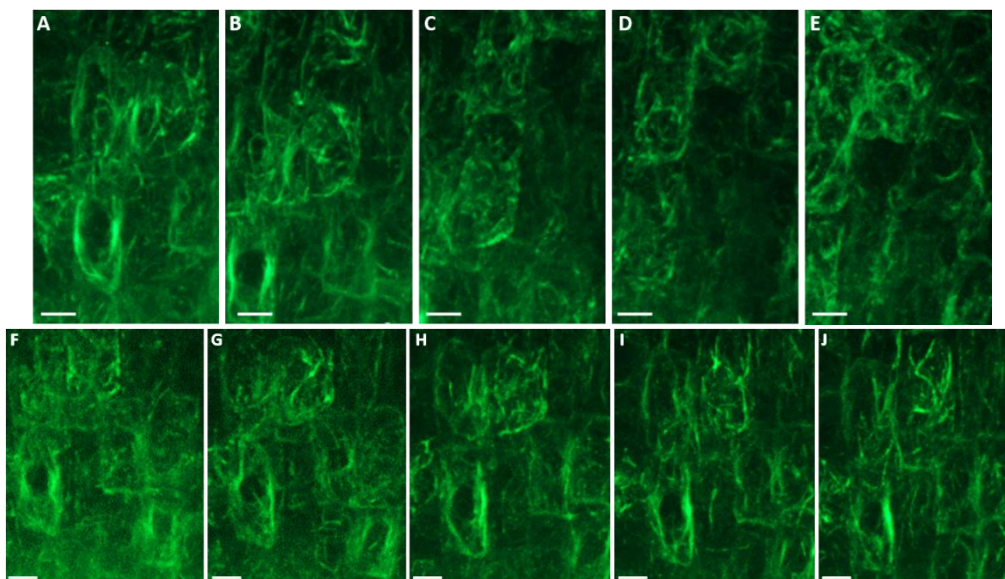
Obr. 68: Buňky hypokotylu linie C24-MAP4-GFP. Obrázky znázorňují reakci mikrotubulového cytoskeletu po působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 30 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Pro porovnání stejného efektu jako u linie *der1-3-MAP4-GFP* byla rostlina skenována dalších 30 minut a obrázky ukazují časové intervaly K) 0 min, L) 7,5 min, M) 15 min, N) 22,5 min, O) 30min. Měřítka je $10 \mu\text{m}$.



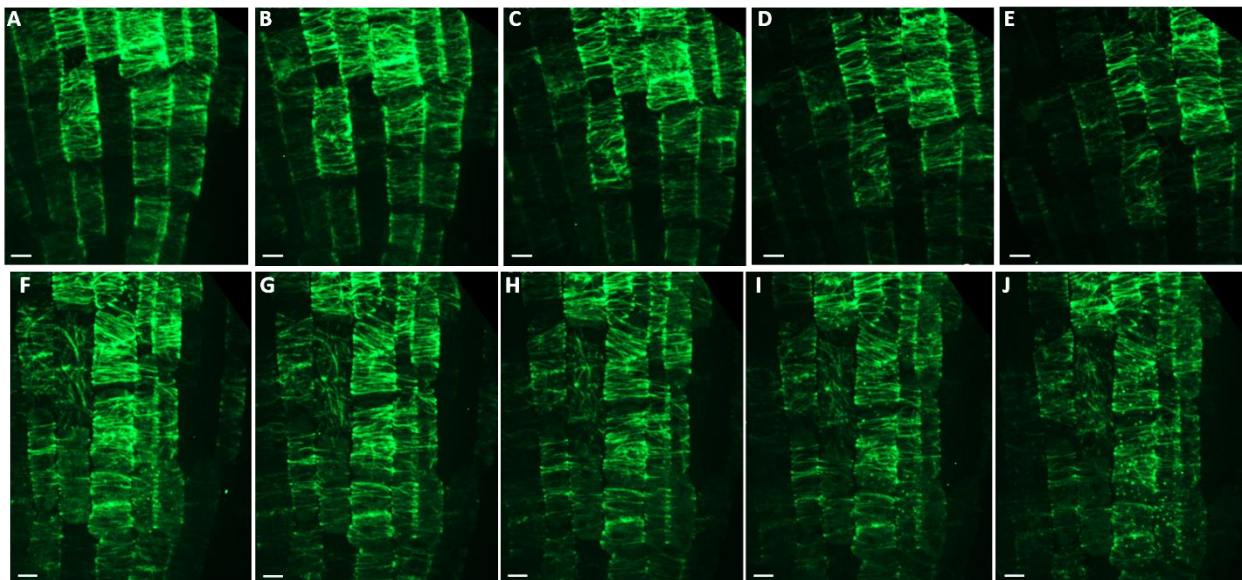
Obr. 69: Buňky hypokotylu linie *der1-3-MAP4-GFP*. Obrázky znázorňují reakci mikrotubulového cytoskeletu po působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 30 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítko je $10 \mu\text{m}$.



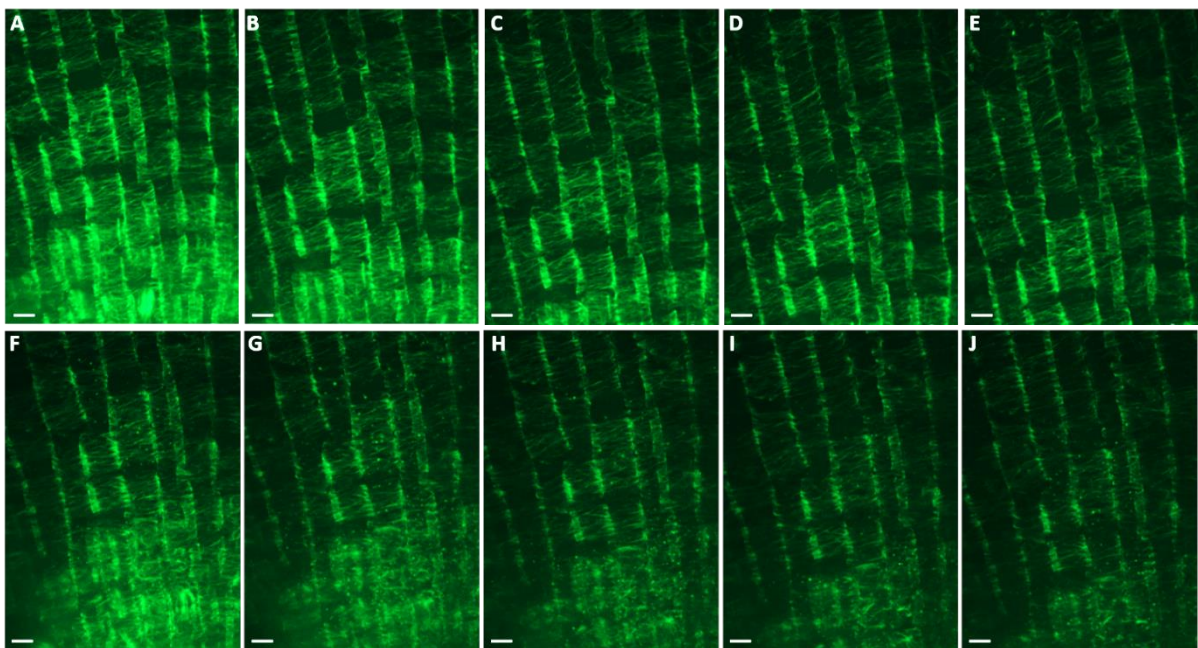
Obr. 70: Buňky kořenové špičky linie C24-ABD2-GFP. Obrázky znázorňují reakci aktinového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 45 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítka je $5 \mu\text{m}$.



Obr. 71: Buňky kořenové špičky linie *der1-3-ABD2-GFP*. Obrázky znázorňují reakci aktinového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována za kontrolních podmínek každých 45 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítka je $5 \mu\text{m}$.



Obr. 72: Buňky kořenové špičky linie C24-MAP4-GFP. Obrázky znázorňují reakci mikrotubulového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 45 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl, jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítko je $5 \mu\text{m}$.



Obr. 73: Buňky kořenové špičky linie *der1-3*-MAP4-GFP. Obrázky znázorňují reakci mikrotubulového cytoskeletu po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. Rostlina byla skenována v kontrolních podmínkách každých 45 s po dobu 30 min. Zobrazené časové intervaly A) 0 min, B) 7,5 min, C) 15 min, D) 22,5 min, E) 30min. Další obrázky ukazují skenování rostliny při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl a jsou vybrány časové intervaly F) 0 min, G) 7,5 min, H) 15 min, I) 22,5 min, J) 30min. Měřítko je $5 \mu\text{m}$.

5. 4. 3 Kvantifikace dynamiky cytoskeletu hypokotylových buněk a buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách a při solném stresu

Pro kvantifikaci dynamických změn cytoskeletu byly použity data z mikroskopického časosběrného pozorování v Laserovém mikroskopu pro „live cell imaging“ (Spining disk) Axio Observer Z1, ZEISS. Vybraly se časové úseky ze začátku (0 min), uprostřed (15 min) a u konce (30 min) experimentu. Stejný výběr časových intervalů a snímků byl vybrán z kontrolních podmínek a po působení solného stresu, a to jak pro hypokotylové buňky, tak pro buňky kořenových špiček. Obrázky z mikroskopu byly zpracovány v programu ImageJ podle metodiky Higaki a kol., 2010. Byly naměřeny dvě hodnoty: hodnota vyjadřující svazkování vláken „skewness“ a hodnota vyjadřující intenzitu signálu na $1 \mu\text{m}^2$ „integrated density“ (Higaki a kol., 2010; Scheuring a kol., 2015). Výsledky jsou vyjádřeny v grafech (Obr. 74 a 75). Dynamika cytoskeletu byla vyjádřena také vizuálně (Obr. 76-79). Byla využita data z 30 min experimentů v Laserovém mikroskopu pro „live cell imaging“ (Spining disk) Axio Observer Z1, ZEISS v programu ZEN blue 2012. V kontrolních podmínkách byly pro hypokotylové buňky vybrány první tři časové sekvence snímání (0 s, 30 s a 60 s), při působení solným stresem poslední tři časové intervaly (29 min, 29,5 min a 30 min). Pro kořenové špičky byly v kontrolních podmínkách vybrány tři časové sekvence 0 s, 45 s a 90 s, a při působení solným stresem sekvence 28,5 min, 29,25 min a 30 min. V každém záběru časové sekvence byl cytoskelet označen jinou barvou (zelená, červená a modrá) a pak byla použita funkce „Add channels“, která spojila tyto tři časové intervaly do jednoho obrázku. Části cytoskeletu, které jsou statické, vykazují bílou barvu (překryv všech tří barev). Dynamické části jsou na každém záběru v jiné pozici, na společném snímku se nepřekrývají, a proto jsou různobarevná.

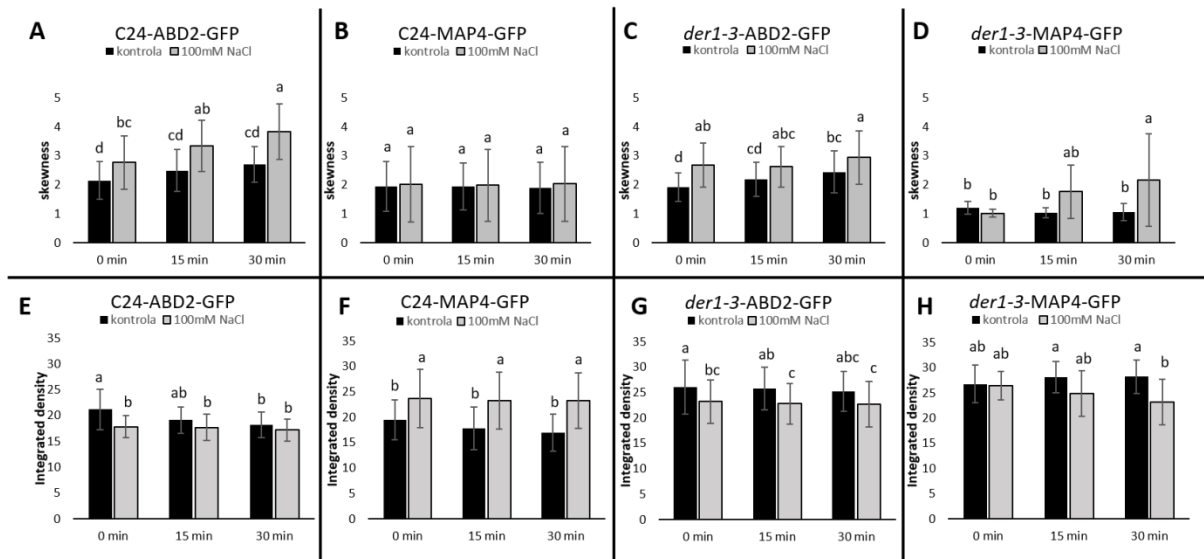
Hodnota „skewness“ vyjadřuje, jak moc je cytoskelet svazkovaný. Platí to především pro aktinový cytoskelet, ale může se to použít i k charakterizaci mikrotubulů. Čím je hodnota „skewness“ vyšší, tím jsou svazky vláken aktinového cytoskeletu delší a širší. V případě mikrotubulů větší hodnota „skewness“ vyjadřuje větší množství vytvořených spotů. U hypokotylových buněk měly linie C24-ABD2-GFP (Obr. 74A) vyšší hodnoty „skewness“, vytvářely tedy delší a širší svazky aktinových vláken než u linie *der1-3*-ABD2-GFP (Obr. 64C). Linie C24-MAP4-GFP (Obr. 74B) byla vůči působení 100 mmol.l^{-1} NaCl nejodolnější, protože se u hodnot „skewness“ neprokázal žádný statisticky významný rozdíl mezi kontrolními a stresovými podmínkami. U linie *der1-3*-MAP4-GFP (Obr. 74D) se i přes velkou směrodatnou odchylku prokázal statistický významný rozdíl ($p < 0,05$) po 15 min a 30 min působení 100 mmol.l^{-1} NaCl. U buněk kořenové špičky byly linie C24-ABD2-GFP (Obr. 75A) a C24-MAP4-

GFP (Obr. 75B) mírně rezistentnější vůči působení solného stresu než linie *der1-3-ABD2-GFP* (Obr. 75C) a *der1-3-MAP4-GFP* (Obr. 75D), protože se u nich v hodnotě „skewness“ neprokázal tak výrazný statisticky významný rozdíl.

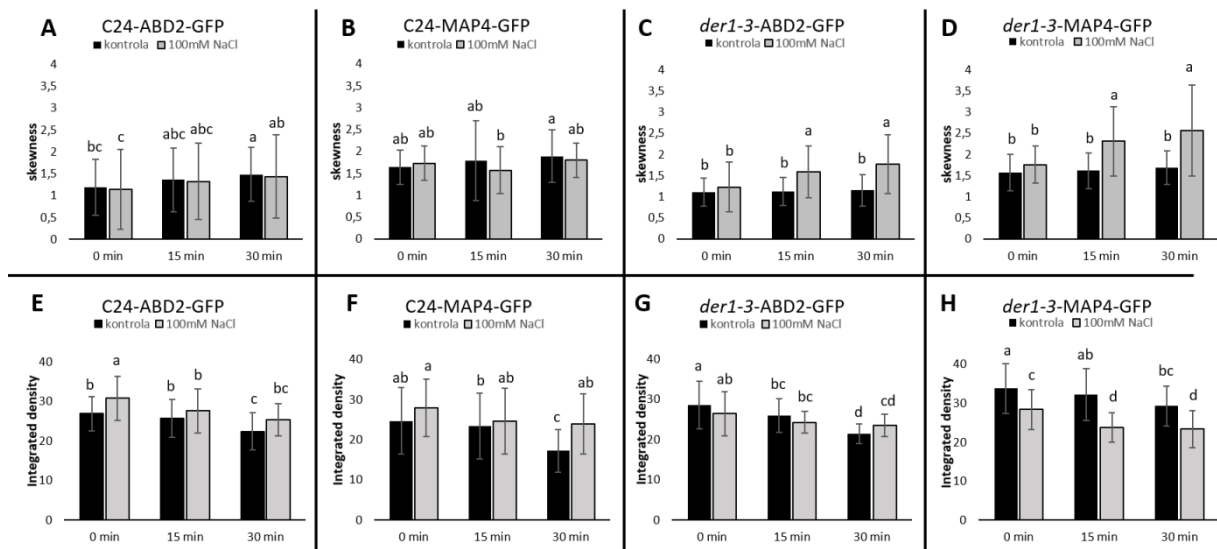
Hodnota „integrated density“ vyjadřuje intenzitu signálu, přepočtenou na $1 \mu\text{m}^2$. Čím vyšší hodnota je v buňce dosažena, tím intenzivnější je hustota (hodnota fluorescenčního signálu) vláken na plochu buňky. U hypokotylových buněk se ukázalo, že u obou linií se značeným aktinovým cytoskeletem, C24-ABD2-GFP (Obr. 74E) a *der1-3-ABD2-GFP* (Obr. 74G), se po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl tato hodnota snižovala. Přibývala tlustší a intenzivnější svazkovaná vlákna, ale kratší a tenčí vlákna se rozpadala. Intenzita signálu na plochu buňky se tedy snížila. Rozdílný efekt se ukázal u linie C24-MAP4-GFP (Obr. 74F), kde se tato hodnota po působení solným stresem zvýšila. Je to způsobeno tím, že je tato linie odolnější. Navíc, před depolymerizací se mikrotubuly mírně svazkovaly a tím vykazovali po měření vyšší intenzitu signálu. Spoty se při působení NaCl vytvářely až po 30 min a více. U linie *der1-3-MAP4-GFP* (Obr. 74H) se hodnota „integrated density“ po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl o trochu snížila, co se navíc prohloubilo po 30 min. Je to dáno tím, že se mikrotubuly rozpadaly na jednotlivé spoty. Spoty zabíraly menší plochu buňky než samotné mikrotubuly, i když občas svítily intenzivněji. U buněk kořenové špičky se ukázaly rozdíly mezi liniemi C24 a *der1-3*, jak u mikrotubulového, tak i u aktinového cytoskeletu. U linií C24 se po působení 100 mmol.l^{-1} NaCl hodnota „integrated density“ zvyšovala (Obr. 75A, B), naproti tomu u linií *der1-3* snižovala (Obr. 75G, H). Je to opět dáno morfologií cytoskeletu. Linie *der1-3-ABD2-GFP* (Obr. 75G) měla v kontrolních podmínkách více drobných a krátkých vláken, a pak intenzivně svítící tlustší vlákna. Po působení solného stresu zůstávaly už jenom tlustší svazky vláken. Sice svítily více, ale na plochu buňky to byla celkově nižší intenzita. U linie C24-ABD2-GFP zůstávaly po působení solného stresu i ta jemnější vlákna, protože tato linie byla odolnější. Z tlustších vláken vznikaly ještě hrubší, které svítily více a tudíž hodnota „integrated density“ se zvyšovala. U linií se značeným mikrotubulovým cytoskeletem se ukazoval podobný trend, kdy linie C24-MAP4-GFP (Obr. 75F) byla odolnější a spolu se spoty se vyskytovaly ještě intenzivně svítící mikrotubuly (hodnota intenzity se zvyšovala). U linie *der1-3-MAP4-GFP* (Obr. 75H) se vyskytovaly převážně už jen spoty (hodnota intenzity se snižovala).

Na obrázcích 76-79 je ukázáno, jak lze stanovit dynamiku cytoskeletu pomocí spojení tří časových intervalů ze skenování rostlin v Laserovém mikroskopu pro „live cell imaging“ (Spinning disk), kde je naznačen cytoskelet vždy jinou barvou (zelený, červený a modrý). Spojením těchto barev vzniknou vlákna s bílou barvou (vlákna statická) a barevná vlákna

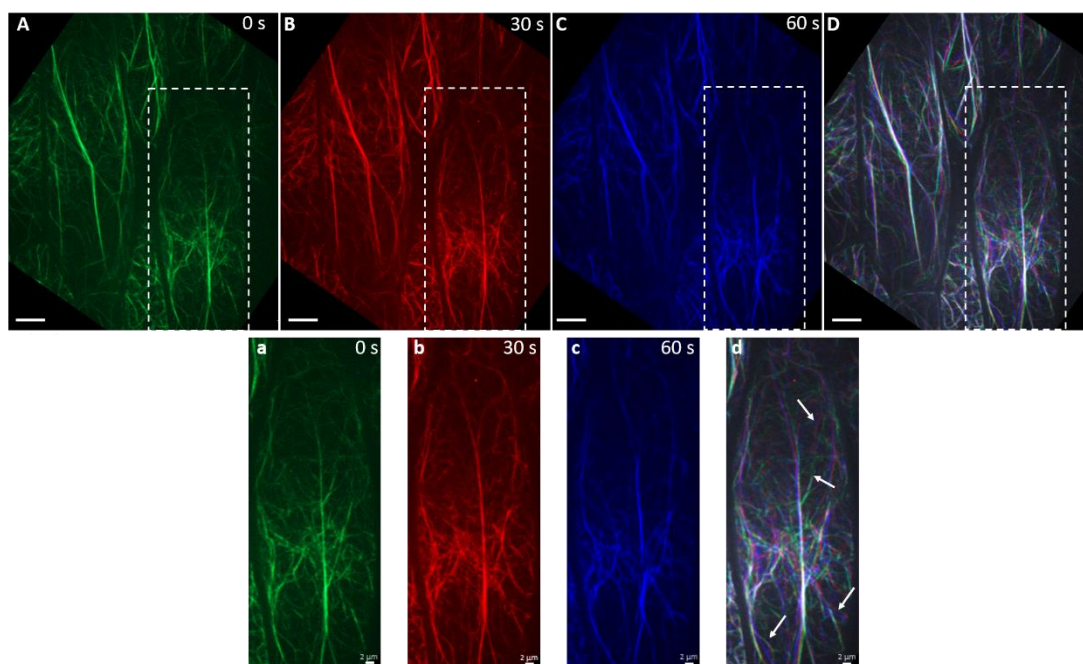
(vlákna dynamická). Jsou zde prezentovány jen nejreprezentativnější data u hypokotylových buněk z linie C24-ABD2-GFP (Obr. 76 a 77) a linie *der1-3*-ABD2-GFP (Obr. 78 a 79). V obou případech se po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl aktinová vlákna více svazkovala a stávala se stabilnější. Zbytek výsledků z ostatních linií jsou přiloženy v přílohách této práce.



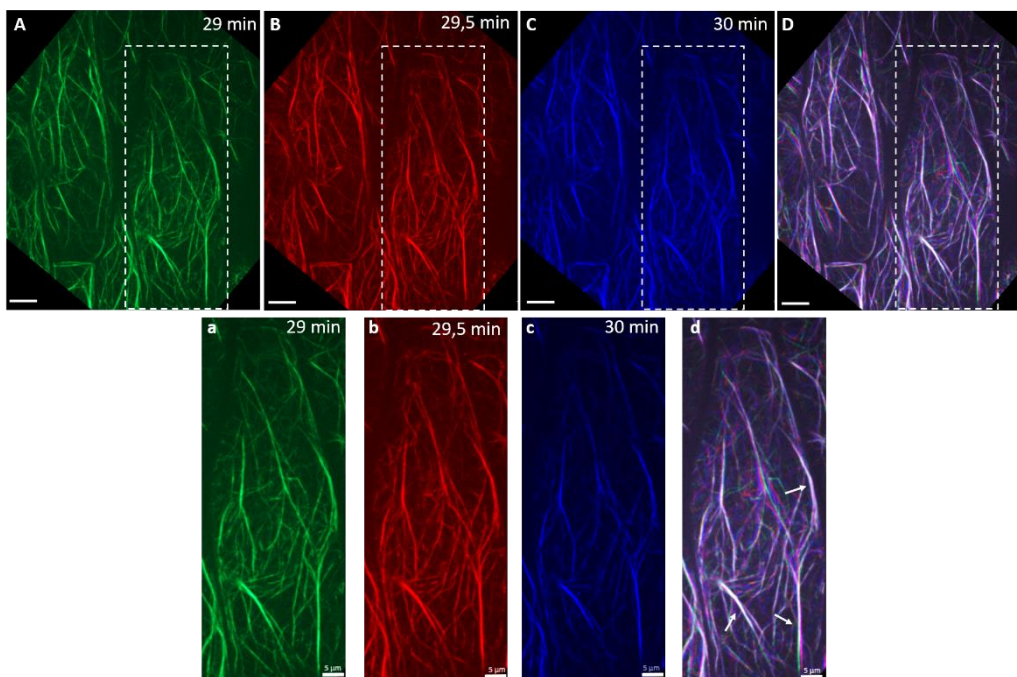
Obr. 74: Hodnota „skewness“ (svazkování vláken; A-D) a „integrated density“ (intenzita signálu na 1 μm^2 ; E-H) měřena u hypokotylových buněk linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP. Data reprezentují průměr \pm SD z 1-6 biologických replik u hodnoty „skewness“, vždy po 8-25 buňkách a u hodnoty „integrated density“ \pm SD z 1-6 biologických replik, vždy po 8-23 buňkách. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolními a stresovými podmínkami ve třech časových intervalech, určené pomocí ANOVA a následného Fisherova LSD testu.



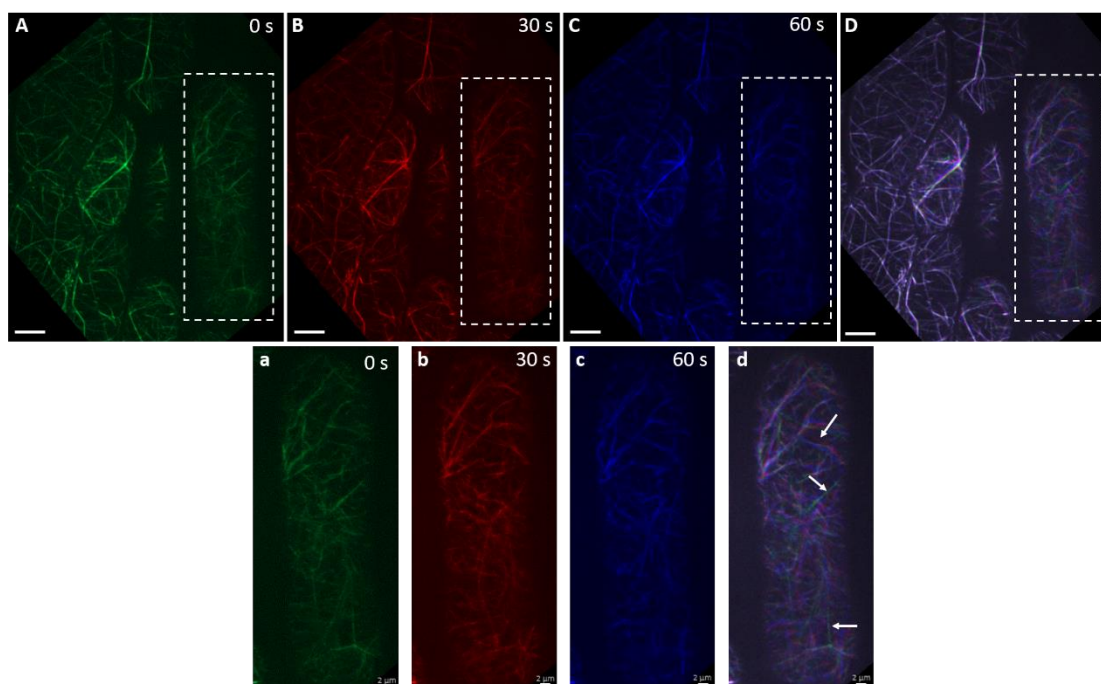
Obr. 75: Hodnota „skewness“ (svazkování vláken; A-D) a „integrated density“ (intenzita signálu na $1 \mu\text{m}^2$; E-H) měřena u kořenových buněk linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP. Data reprezentují průměr \pm SD z 1-6 biologických replik u hodnoty „skewness“, vždy po 8-25 buňkách a u hodnoty „integrated density“ \pm SD z 1-6 biologických replik, vždy po 8-23 buňkách. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ($p < 0,05$) mezi kontrolními a stresovými podmínkami ve třech časových intervalech, určené pomocí ANOVA a následného Fisherova LSD testu.



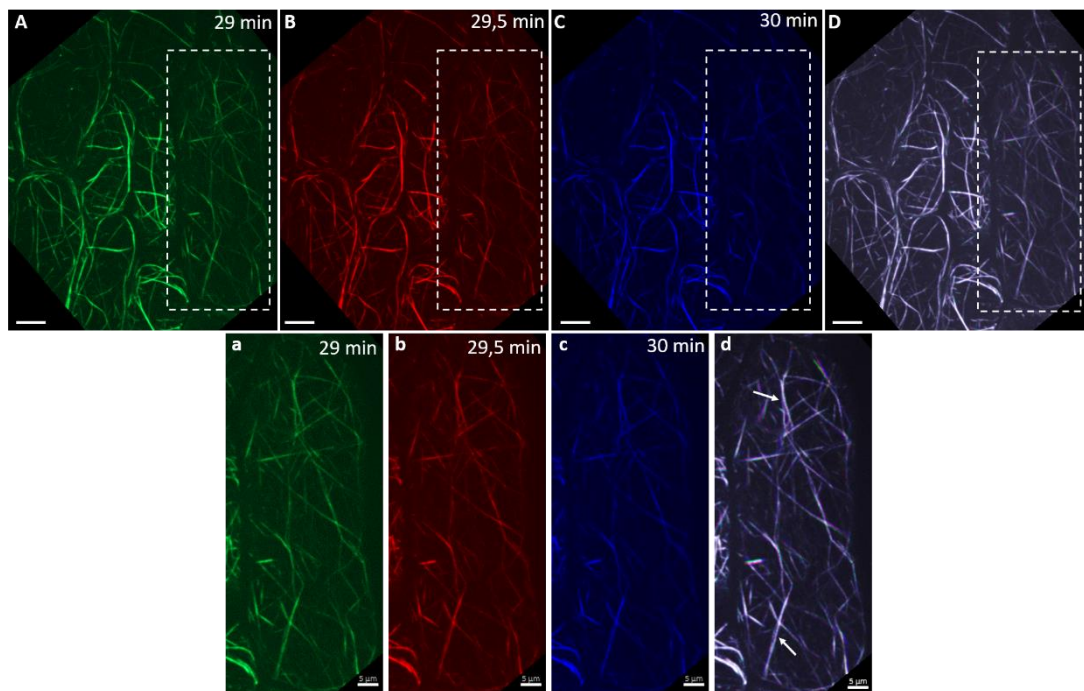
Obr. 76: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu hypokotylových buněk v kontrolních podmínkách linie C24-ABD2-GFP. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je $10 \mu\text{m}$ (A-D) a $2 \mu\text{m}$ (a-d).



Obr. 77: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu hypokotylových buněk při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl linie C24-ABD2-GFP. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítka je $10 \mu\text{m}$ (A-D) a $5 \mu\text{m}$ (a-d).



Obr. 78: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu hypokotylových buněk v kontrolních podmínkách linie *der1-3-ABD2-GFP*. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítka je $10 \mu\text{m}$ (A-D) a $2 \mu\text{m}$ (a-d).



Obr. 79: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu hypocotylových buněk při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl linie *der1-3-ABD2-GFP*. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítka je $10 \mu\text{m}$ (A-D) a $5 \mu\text{m}$ (a-d).

6. DISKUZE

Použitý mutant *der1-3* (*deformed root hairs 1*; Ringli a kol., 2002) má mutovanou alelu *ACTIN2* genu. *ACTIN2* je nejdůležitější aktin ve vegetativních orgánech rostlin. Mutant *der1-3* byl selektován pouze na základě typického fenotypu kořenových vlásků. Zakládání kořenových vlásků do stádia „bulge“ probíhá normálně, ale z tohoto stádia nejsou schopny přejít k vrcholovému růstu. V našich experimentech se tento fenotyp rostlin potvrdil a ani nadprodukce dvou konstruktů *pro35S::MBD:GFP* a *pro35S::FABD2:GFP* tento fenotyp nezměnila. U kontrolní linie C24 jsou vlásky dlouhé, vyvíjejí se a rostou bez abnormalit (Beemster a kol., 2012). Podobně ani transformace kontrolní linie C24 se zmíněnými konstrukty tento fenotyp nezměnila. V literatuře se uvádí, že rychlost růstu kořenových vlásků *A. thaliana* je přibližně 1-2 μm za minutu (Dolan a kol., 1994; Foreman a Dolan, 2001). Námi změřená rychlost růstu byla přibližně 2 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ a u linie C24-ABD2-GFP to bylo dokonce víc než 2 $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$. Studie Ringli a kol., (2002, 2005) se u mutantu *der1-3* zaměřili na výrazný fenotyp kořenových vlásků. Bylo prokázáno, že *ACT2* je důležitý ve všech stádiích vývoje a růstu kořenového vlásku. U mutantu byla narušena správná pozice vývoje „bulge“ a následně též růst kořenového vlásku z místa výdutě. To bylo způsobeno ovlivněním exocytózy ve špičce kořenových vlásků, přičemž hlavní roli hraje aktinový cytoskelet. Aktinový cytoskelet, zejména pak F-aktin, zabezpečuje transport vezikul obsahující materiál pro rychle rostoucí buněčnou doménu ve špičce vlásku, především při biosyntéze plazmatické membrány a buněčné stěny (Baluška a kol., 2000; Bibikova a kol., 1999). Mutant *der1-3* má však i další výrazný fenotypický znak, a to vlnitý tvar kořene. Při mikroskopických studiích byly pozorovány šikmě orientované příčné buněčné stěny v kořenových špičkách. Stanovila se proto hypotéza, že by mutace v *ACTIN2* genu mohla mít vliv na regulaci roviny buněčného dělení. Jako první krok této regulace je tvorba preprofázního svazku (PPB) mikrotubulů. Bylo prokázáno, že se tvoří reorganizací kortikálních mikrotubulů. Předurčení roviny buněčného dělení se účastní i svazky F-aktinu, co posléze vede k vytvoření nové buněčné stěny v této rovině (Fowler a Quatrano, 1997; Staehelin a Hepler, 1996). Změny aktinového cytoskeletu způsobené mutací *ACT2* by mohly ovlivnit správný průběh tohoto procesu a nárůst počtu šikmě orientovaných příčných buněčných stěn by mohl mít za následek vlnitý vzor růstu kořene *der1-3* mutantů. Membrány na příčných buněčných stěnách byly vizualizovány lipofilní barvičkou FM4-64. Ukázalo se, že linie *der1-3* měly více jak 50 % buněčných stěn postavených jinak než v úhlu $90^\circ \pm 5\%$. Kontrolní rostliny měly přitom jen kolem 10 % takto šikmě postavených buněčných stěn. U transformovaných rostlin s nadprodukcí MBD-GFP a FABD2-GFP se nějak výrazně nelišil počet šikmě postavených buněčných stěn. Pro potvrzení, že mutant *der1-3* má opravdu více

šikmě postavených stěn, byl růst kořenů transformovaných linií studován metodou Light-sheet mikroskopie, která dovoluje sledování buněčného dělení v rostoucím kořenu po dobu několika hodin. Tyto data potvrdily, že příčné buněčné stěny s odlišným úhlem se tvoří ve větším množství u linií *der1-3* než u kontrolních rostlin C24. Domněnku o možné roli ACT2 v procesu regulace roviny buněčného dělení podporuje i fakt, že ACT2 je silně exprimován v mladých částech rostliny a to jak v hlavním kořeni, tak i ve vedlejších kořenech (An a kol., 1996). Exprese byla silná především v kořenové čepičce, meristematické zóně kořene, elongační zóně kořene, ale i v primordiích bočních kořenů. To jsou zóny s nejvyšší frekvencí výskytu dělicích se buněk. Avšak aby se tato hypotéza zcela potvrdila, musí se provést další studie a měření.

V podmínkách solného a osmotického stresu klíčily semena o mnoho pomaleji v porovnání s kontrolními podmínkami. Tyto dva typy stresu mezi sebou úzce souvisí, proto mají i podobné účinky na rostliny. Pomalejší klíčivost je dána tím, že se mění membránový potenciál díky nadměrnému množství nepřírodných iontů (např. Na^+), který je udržovaný ATP-ázou P-typu (Gaxiola a kol., 2001). ATP-áza pumpuje H^+ -ionty ven z buňky a zabezpečuje tak příjem důležitých živin. Nadměrná koncentrace Na^+ iontů také negativně ovlivňuje příjem K^+ iontů, který je důležitý v udržování buněčného turgoru, membránového potenciálu a zabezpečuje aktivitu mnoha enzymů (Seranno a kol., 1999; Xiong a Zhu, 2002). Klíčivost semen se tedy v takovýchto podmínkách výrazně snižuje. Rostliny si ale vyvinuly adaptační mechanismy, a proto při nižších koncentracích látek indukujících solný a osmotický stres nehynou. Vyvíjejí se dále, i když pomaleji a s menším vzrůstem (Achard a kol., 2006; Kumari a kol., 2014). Při působení oxidativního stresu semena klíčila ve většině případů rychleji než v kontrolních podmínkách. U oxidativního stresu se nadměrně produkují reaktivní formy kyslíku (ROS), které hrají důležitou roli v signalizaci vývoje a růstu buněk. ROS také regulují příjem Ca^{2+} iontů do buňky, které jsou také nepostradatelné v signalizaci a v regulaci buněčného růstu (Carol a Dolan, 2006; Mortimer a kol., 2008). Proto krátkodobé zvýšení ROS může mít částečně pozitivní účinek na klíčení rostlin. Vysoká koncentrace oxidujících látek je ovšem toxická, což se projevilo už při koncentraci $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, kdy semena všech testovaných linií klíčily výrazně pomaleji. Tato toxicita má vliv i na růstové parametry rostlin, kdy při vyšších koncentracích některé rostliny mohou i hynout. Ukázalo se však, že linie *der1-3*, i její transformované linie, jsou vůči tomuto stresu odolnější než kontrolní rostliny C24. Nejvýraznější rozdíl se projevilo při delším působení u koncentrací $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ a $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ, kdy *der1-3* linie měly nadzemní část lépe vyvinutou s výraznější zelenou barvou oproti kontrolním C24 liniím, které předčasně hynuly, nadzemní část měly menší

s výrazně fialovějším zabarvením. Kořenový systém byl při oxidativním stresu výrazně redukován. Produkci ROS v kořenových vláscích zprostředkovává NADPH oxidáza, konkrétně AtrbohC (Foreman a kol., 2003; Mortimer a kol., 2008). AtrbohC je regulována aktinovým cytoskeletem. Když je aktinový cytoskelet nějak ovlivněn, např. Latrunculinem B (Lat-B), který narušuje polymerizaci a dynamiku aktinového cytoskeletu, transport a tvorba ROS v buňkách se zpomaluje, tudíž se ROS méně hromadí v buňkách (Liu a kol., 2012). Linie *der1-3*, které mají mutaci ACT2 tudíž mohou být na tento stres rezistentnější, protože může být narušen transport a tvorba ROS. Toxická koncentrace ROS může být dosažena pomaleji a navíc buňky ji mohou aktivně odbourávat, přičemž se ROS nemusí tak hromadit ve vnitrobuněčném prostoru. Degradace ROS se zprostředkovává pomocí antioxidantních enzymů (hlavně superoxid dismutáza a kataláza), které jsou přítomné například v peroxizomech. Peroxizomy jsou malé sférické buněčné organely, obklopené membránou, tvořící se v endoplazmatickém retikulu. Hlavní funkcí peroxyzomů je odbourávání H_2O_2 (patří do skupiny ROS), ale jsou taky místem degradace mastných kyselin s dlouhým řetězcem. Vnitrobuněčná dynamika peroxizomů je taktéž zabezpečená aktinovým cytoskeletem, ale i když *der1-3* může mít tuto dynamiku postihnutou, nenarušuje to správnou aktivitu těchto organel a v nich obsažených enzymů (Mathur a kol., 2002; Rodríguez-Serrano a kol., 2009). U kontrolních rostlin není aktinový cytoskelet ovlivněn, tudíž se ROS hromadí na toxickou hladinu ve vnitrobuněčném prostoru a rostliny je nejsou schopny tak intenzivně odbourávat a rychleji hynou, i když není ovlivněna ani dynamika peroxizomů.

Touto prací bylo potvrzeno, že aplikace solného stresu ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$) na živé buňky způsobuje depolymerizaci mikrotubulů (tvoří se jednotlivé spoty), rozpad jemného F-aktinu a tvorbu delších a tlustších svazkovaných vláken aktinových mikrofilamentů. Jak MT, tak MF hrají důležitou roli při reakci a toleranci rostlin na solný stres. Když se na rostliny aplikuje taxol, který stabilizuje MT, rostliny při solném stresu rychleji hynou. Naopak látky, které MT depolymerizují (oryzalin, propyzamid), způsobují, že jsou rostliny méně náchylné na solný stres (Wang a kol., 2007). Podobný efekt byl zaznamenán i pro aktinový cytoskelet. Když aplikujeme látku, která stabilizuje MF (faloidin), rostliny byly odolnější vůči solnému stresu. Naopak aplikace látek, které depolymerují MF (Lat-B, cytochalasin D), snížila přežívání rostlin při působení solného stresu (Wang a kol., 2010). Linie *der1-3-ABD2-GFP* měla odlišnou strukturu a morfologii aktinového cytoskeletu než linie C24-ABD2-GFP. Aktinová vlákna byla u *der1-3-ABD2-GFP* složena z kratších a tenčích vláken, která se po aplikaci NaCl rychleji svazkovala a tenká vlákna úplně zmizela, což ale může ukazovat i na rychlejší odezvu

a přizpůsobení se stresovým podmínkám. U kontrolní line C24-ABD2-GFP po působení 100 mmol.l⁻¹ NaCl zůstávala i tenčí F-aktinová vlákna zachována. Tento trend byl zaznamenán i u mikrotubulového cytoskeletu. V morfologii mezi liniemi C24-MAP4-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP nebyly žádné viditelné rozdíly, ale u linie *der1-3* MT po solném stresu rychleji depolymerizovaly a tvořily se spoty. Bylo prokázáno, že MT a MF spolu interagují při mnoha fyziologických procesech, a to platí při odpovědích na solný stres (Wang a kol., 2010). Bylo tedy zjištěno, že linie *der1-3* rychleji a citlivěji reagují na solný stres reorganizací jak aktinového, tak mikrotubulového cytoskeletu. Potvrdila to i následná kvantifikace změn v dynamice cytoskeletu dvěma různými metodami.

7. ZÁVĚR

Literární úvod je zaměřený na detailní popis kořenového systému modelového organismu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Byl popsán jak z anatomického hlediska, tak s hlediska vývojového, na buněčné a molekulární úrovni. Vzhledem k tomu, že v této práci byla použita mutantní linie *der1-3*, která má krátké a nevyvinuté kořenové vlásky, zaměřila se první kapitola i na vývoj kořenových vlásků. Použitá linie *der1-3* má mutaci v aktinovém cytoskeletu, tudíž byla zmíněna i organizace buňky a následně byl pak popsán cytoskelet, a to aktinový i mikrotubulový. V praktické části byly sledovány reakce rostlin ve stresových podmínkách, proto nedílnou součástí literární rešerše byl popis abiotických stresů z biologického hlediska, z hlediska vlivu abiotických stresů na rostliny, a to jak na buněčné tak na molekulární úrovni, a také jak se rostliny umí na stresové podmínky adaptovat. Buněčná biologie se neobejde bez pozorování vzorků v mikroskopech, tudíž zde byly popsány i dvě metody (Spinning-disk konfokální mikroskopie a Light-sheet mikroskopie), které jsou vhodné pro sledování dynamických struktur v buňce, jako byl v této práci cytoskelet. Light-sheet mikroskopie pak slouží v pozorování vývojových stádií rostlin. Nesměl být opomenut ani detailní popis použitých kontrolních linií C24 a aktinového mutantu *der1-3*, který má mutaci v *ACT2*, a další zdokumentované mutantní aktinové linie *A. thaliana*.

V praktické části byl pozorován vývoj a růst kořenových vlásků v kontrolních podmínkách. Byl potvrzen již popsáný fenotyp kořenových vlásků linie *der1-3*, které se vyvíjejí jen do stádia „bulge“ a dále nerostou. Ani transformace rostlin s expresí FABD2-GFP a MBD-GFP tento fenotyp nezměnil. U linií C24 byly kořenové vlásky dlouhé, bez abnormalit, a ani zde se po transformaci rostlin s expresí fluorescenčně značených markerů pro cytoskelet fenotyp nezměnil. Rychlost růstu kořenových vlásků byla u všech C24 linií vždy okolo $2 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$.

Druhá část experimentální práce poukazuje na další výrazný fenotypický znak *der1-3* linie. Jedná se o vlnitý vzor růstu kořene. Snažilo se zjistit, čím může být tento morfologický znak způsoben. Na základě mikroskopických pozorování byla stanovena hypotéza, že by se mohlo jednat o ovlivnění roviny buněčného dělení, protože linie *der1-3* měla až 50 % příčných buněčných stěn v kořenové špičce orientovaných jinak než $90^\circ \pm 5\%$. U kontrolní linie C24 to bylo jen 10 % buněčných stěn. Výsledky byly získány softvérovou analýzou dat po vitálním nabarvení kořenových buněk. Aby se tato hypotéza ověřila, linie s fluorescenčně značeným cytoskeletem se pozorovala metodou Light-sheet mikroskopie, která dovolila snímat rostoucí kořenový meristém a zaznamenávat buněčné dělení v reálném čase.

Ovlivnění rostlin solným ($100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$), osmotickým (200 mmol.l^{-1} sorbitol) a oxidativním ($0,1$; $0,2$ a $0,5 \text{ } \mu\text{mol.l}^{-1}$ PQ) stresem ukázalo, že linie *der1-3* je více odolná vůči oxidativnímu stresu než C24 linie. Po působení měla linie *der1-3* méně redukovaný jak kořenový systém, tak i nadzemní část. U solného a osmotického stresu měli nejvyšší přírůstek kořenů za 24 h linie C24-MAP4-GFP a C24-ABD2-GFP, které se jeví jako nejodolnější za těchto podmínek. Byly také sledovány změny ve fenotypu kořenových vlásků. U linií C24 docházelo většinou k jejich větvení a zkracování, naopak u linií *der1-3* se vlásky občas prodlužovaly, či docházelo k jejich nahromadění (tzn. ke zkracování délek kořenových buněk).

Pozorováním morfologie a dynamiky cytoskeletu linií C24-ABD2-GFP, C24-MAP4-GFP, *der1-3*-ABD2-GFP a *der1-3*-MAP4-GFP byly zjištěny mírné rozdíly. Linie *der1-3* se značeným aktinovým cytoskeletem (*der1-3*-ABD2-GFP) měla aktinová vlákna tenká a krátká oproti linii C24, která měla aktinová vlákna dlouhá, i přes celou buňku, a vyskytovala se jak tenká tak tlustší vlákna. V morfologii mikrotubulového cytoskeletu ale výrazné rozdíly nebyly. Po působení solným stresem se linie *der1-3* ukázala jako citlivější, protože u *der1-3*-ABD2-GFP se aktinová vlákna už po 10 min viditelně svazkovala a zmizela i tenká vlákna F-aktinu. U linie C24-ABD2-GFP se aktinová vlákna svazkovala pomaleji, a po 30 min byla viditelná ještě i tenčí vlákna F-aktinu. U mikrotubulového cytoskeletu se u linie *der1-3*-MAP4-GFP už po 5 min začaly vyskytovat spoty (depolymerizovaná mikrotubulová vlákna), ale u linie C24-MAP4-GFP se spoty vytvářely až po 30 minutách. Tento trend potvrdila i následná kvantifikace dynamických změn cytoskeletu provedena dvěma různými metodami.

8. SEZNAM LITERATURY

Achard P., Cheng H., De Grauwe L., Decat J., Schoutteten H., Moritz T., Van Der Straeten D., Peng J. a Harberd N. P. (2006); Integration of plant responses to environmentally activated phytohormonal signals. *Science* **311**: 91–94

An Y.-Q., McDowell J. M., Huang S., McKinney E. C., Chambliss S. a Meagher R. B. (1996); Strong, constitutive expression of the *Arabidopsis* *ACT2/ACT8* actin subclass in vegetative tissues. *The Plant Journal* **10**: 107–121

Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.-H., Barlow P. W. a Volkmann D. (2000); Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* **227**: 618–632

Baluška F., Salaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.-H., Barlow P. W. a Volkmann D. (2000); Root hair formation: F-actin-dependent tip growth is initiated by local assembly of profilin-supported F-actin meshworks accumulated within expansin-enriched bulges. *Developmental Biology* **227**: 618–632

Baluška F., Hlavacka A., Šamaj J., Palme K., Robinson D. G., Matoh T., McCurdy D. W., Menzel D. a Volkmann D. (2002); F-actin-dependent endocytosis of cell wall pectins in meristematic root cells. Insights from Brefeldin A-induced compartments. *Plant Physiology* **130**: 422–431

Bao Y., Kost B. a Chua N.-H. (2001); Reduced expression of α -tubulin genes in *Arabidopsis thaliana* specifically affects root growth and morphology, root hair development and root gravitropism. *The Plant Journal* **28(2)**: 145-157

Barth M. a Holstein S. E. H. (2004); Identification and functional characterization of *Arabidopsis* AP180, a binding-partner of plant α C-adaptin. *Journal of Cell Science* **117**: 2051–2062

Baxter A., Mittler R. a Suzuki N. (2014); ROS as key players in plant stress signalling. *Journal of Experimental Botany* **65(5)**: 1229–1240

Beemster G. T. S., De Vusser K., De Tavernier E., De Bock K. a Dirk Inzé D. (2012); Variation in growth rate between *Arabidopsis* ecotypes is correlated with cell division and A-type Cyclin-Dependent kinase activity. *Plant Physiology* **129**: 854-864

- Benfey P. N. a Scheres B. (2000); Root development. *Current Biology* **10**: R813-R815.
- Bibikova T. N., Jacob T., Dahse I. a Gilroy S. (1998); Localized changes in apoplastic and cytoplasmic pH are associated with hair development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* **125**, 2925–2934
- Bibikova T. N., Blanclor E. B. a Gilroy S. (1999); Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **17**: 657–665
- Boerjan W., Den Boer B. a Van Montagu M. (1992); Molecular genetic approaches to plant development. *The International Journal of Developmental Biology* **36**: 59-66
- Bohnert H. J., Nelson D. E. a Jensenay R. G. (1995); Adaptations to environmental stresses. *The Plant Cell* **7**: 1099-1111
- Boyer J. S. (1982); Plant productivity and environment. *Science* **218**: 443-448.
- Breuer D., Ivakov A., Sampathkumar A., Hollandt F., Persson S. a Nikoloski Z. (2014); Quantitative analyses of the plant cytoskeleton reveal underlying organizational principles. *Journal of the Royal Society Interface* **11**: 20140362.
- Campanoni P. a Blatt M. R. (2007); Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of Experimental Botany* **58(1)**: 65–74
- Caplow M. (1992) Microtubule dynamics. *Current Opinion of Cell Biology* **4**: 58-65
- Capone R., Tiwari B. S. a Alex Levine A. (2004); Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from roots to shoots in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **42**: 425–428
- Carol R. J a Dolan L. (2002); Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *Philosophical Transactions. R. Soc. Lond. B* **357**: 815–821
- Carol R. J. a Dolan L. (2006); The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1829-1834
- Clough S. J. a Bent A. F. (1998); Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16(6)**: 735–743

- Colcombet J. a Hirt H. (2008); Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *The Biochemical Journal* **413**: 217–226
- Conner S. D. a Schmid S. L. (2003); Regulated portals of entry into the cell. *Nature* **422**: 37–44
- Cormack, R. G. H. (1949); The development of root hairs in angiosperms. *Botanical Review* **15**: 583-612
- Cormack R. G. H. a Lemay P. (1963); Sugar in the intercellular spaces of white mustard roots. *Journal of Experimental Botany* **14**: 232-236
- Cosgrove D. (1986); Biophysical control of plant cell growth. *Annual Reviews of Plant Physiology* **37**: 377-405
- Cosgrove D. J. (2000) Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature* **407**: 321–326
- Cushman J. C. a Bohnert H. J. (2000); Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* **3(2)**: 117-124
- Davis A. M., Hall A., Millar A. J., Darrah Ch. a Davis S. J. (2009); Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **5(3)**: 1-7
- Desai A. a Mitchison T. J. (1997); Microtubule Polymerization Dynamics. *Annual Review Cell and Developmental Biology* **13**: 83–117
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K. a Scheres B. (1993); Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**: 71-84
- Dolan L., Duckett C. M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C. a Roberts K. (1994); Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465–2474
- Dolan L. a Costa S. (2001); Evolution and genetics of root hair stripes in the root epidermis. *Journal of Experimental Botany* **52**, 413–417
- Dosier L. W. a Riopel J. L. (1978); Origin, development, and growth of differentiating trichoblasts in *Elodea canadensis*. *American Journal of Botany* **65**: 813-822

Drews G. N., Bowman J. L. a Meyerowitz E.M. (1991); Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene *AGAMOUS* by the *APETALA2* product. *Cell* **65**: 991-1002

Driss-Ecole D., A. Lefranc A. a Perbal G. (2003); A polarized cell: The root statocyte. *Physiologia Plantarum* **118**: 305 – 312

Dunsby C. (2008); Optically sectioned imaging by oblique plane microscopy. *Optics Express* **16** (25): 20306-20316

Ehrhardt D. W. a Shaw S. L. (2006); Microtubule dynamics and organization in the plant cortical array. *The Annual Review of Plant Biology* **57**: 859–875

Favery B., Ryan E., Foreman J., Linstead P., Boudonck K., Steer M., Shaw P. a Dolan L. (2001); KOJAK encodes a cellulose synthase-like protein required for root hair cell morphogenesis in *Arabidopsis*. *Genes and Development* **15**: 79-89

Foreman J., Demidchik V., Bothwell J. H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones J. D. G., Davies J. M. a Dolan L. (2003); Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446

Fowler J. E. a Quatrano R. S. (1997); PLANT CELL MORPHOGENESIS: Plasma membrane interactions with the cytoskeleton and cell wall. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **13**: 697–743

Fu Y., Gu Y., Zhen Z., Wasteneys G. a Yang Z. (2005); *Arabidopsis* interdigitating cell growth requires two antagonistic pathways with opposing action on cell morphogenesis. *Cell* **120**: 687–700

Fukaki H., J. Wysocka-Diller J., Kato T., Fujisawa H., Benfey P. N. a M. Tasaka M. (1998); Genetic evidence that the endodermis is essential for shoot gravitropism in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal* **14**: 425 – 430

Galway M. E., Heckman Jr. J. W. a Schiefelbein J. W. (1997); Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta* **201**: 209–218

Galway M. E., Lane D. C. a Schiefelbein J. W. (2011); Defective control of growth rate and cell diameter in tip-growing root hairs of the *rhd4* mutant of *Arabidopsis thaliana*, *Canadian Journal of Botany* **77**(4): 494-507

- Gardiner J. (2013); The evolution and diversification of plant microtubule-associated proteins. *Plant Journal* **75**: 219–229
- Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S., Dang L. M., Allen G. J., Alper S. L. a Fink G. R. (2001); Drought- and salt-tolerant plants results from overexpression of the AVP1 H⁺-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **98**: 11444-11449
- Geldner N. (2004); The plant endosomal system-it's structure and role in signal transduction and plant development. *Planta* **219**: 547–560
- Gilliland L. U., McKinney E. C., Asmussen M. A. a Meagher R. B. (1998); Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies. I. Disruptions in individual Arabidopsis actin genes. *Genetics* **149**: 717–725
- Gilliland L. U., Kandasamy M. K., Pawloski L. C. a Richard B. Meagher R. B. (2002); Both vegetative and reproductive actin isoforms complement the stunted root hair phenotype of the Arabidopsis *act2-1* mutation. *Plant Physiology* **102**: 2199-2209
- Gilliland L. U., Pawloski L. C., Kandasamy M. K. a Meagher R. B. (2003); Arabidopsis actin gene ACT7 plays an essential role in germination and root growth. *Plant Journal* **33**: 319–328
- Goddard R. H., Wick S. M., Silflow C. D., a Snustad D. P. (1994); Microtubule components of the plant cell cytoskeleton. *Plant Physiology* **104**: 1-6
- Godfray H. C., Beddington J. R., Crute I. R., Haddad L., Lawrence D., Muir J. F., Pretty J., Robinson S., Thomas S. M., Toulmin C. (2010); Food security: the challenge of feeding 9 billion people. *Science* **327**: 812–818
- Goode B. L., Drubin D. G. a Barnes G. (2000) Functional cooperation between the microtubule and actin cytoskeletons. *Current Opinion in Cell Biology* **12**: 63–71
- Grierson C. a Schiefelbein J. (2002); Root hairs, *The Arabidopsis book*, **1**: e0060. doi: 10.1199/tab.0060
- Gu Y., Deng Z., Paredez A. R., DeBolt S., Wang Z. Y. a Somerville C. (2008); Prefoldin 6 is required for normal microtubule dynamics and organization in Arabidopsis. *PNAS of the USA* **105**: 18064–18069

- Hashiguchi Y., Tasaka M. a Morita M. T. (2013); Mechanism of higher plant gravity sensing. *American Journal of Botany* **100**(1): 91–100
- Hawes C., Crooks K., Coleman J. a Satiat-Jeuematrie B. (1995); Endocytosis in plants: fact or artefact? *Plant, Cell and Environment* **18**: 1245–1252
- Higaki T., Kutsuna N., Okubo E., Sano T. a Hasezawa S. (2006) Actin microfilaments regulate vacuolar structures and dynamics: dual observation of actin microfilaments and vacuolar membrane in living tobacco BY-2 Cells. *Plant Cell Physiology* **47**: 839–852
- Higaki T., Kutsuna N., Sano T., Kondo N. a Hasezawa S. (2010); Quantification and cluster analysis of actin cytoskeletal structures in plant cells: role of actin bundling in stomatal movement during diurnal cycles in *Arabidopsis* guard cells. *The Plant Journal* **61**: 156-165
- Hofer, R.-M. (1991); Root hairs. In: *Plant Roots The Hidden Half*, Y. Waisel, A. Eshel, and U. Kafkafi, eds., pp 129-148
- Holstein S. E. H. (2002); Clathrin and Plant Endocytosis. *Traffic* **3**: 614–620
- Hooke R. (1665); *Micrographia: or some physiological descriptions of minute bodies made by magnifying glasses?: with observations and inquiries thereupon*. London, UK: *The Royal Society*
- Huang S., An Y. Q., McDowell J. M., McKinney E. C. a Meagher R. B. (1997) The *Arabidopsis* ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Molecular Biology* **33**: 125–139
- Huisken J., Swoger J., Del Bene F., Wittbrodt J., Stelzer E. H. K. (2004); Optical sectioning deep inside live embryos by selective plane illumination microscopy. *Science* **305**: 1007-1009
- Inoué S. a Salmon E. D. (1995); Force generation by microtubule assembly/disassembly in mitosis and related movements. *Molecular Biology of the Cell* **6**: 1619–1640
- Jack T., Brockmam L. L. a Meyerowitz E. M. (1992); The homeotic gene APETALA3 of *Arabidopsis thaliana* encodes a MADS box and is expressed in petals and stamens. *Cell* **68**: 683-697

- Jiang C., Belfield E. J., Mithani A., Visscher A., Ragoussis J., Mott R., Smith J. A. C. a Harberd N. P. (2012); ROS-mediated vascular homeostatic control of root-to-shoot soil Na delivery in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **31**: 4359–4370
- Jiang K., Moe-Lange J., Henet L. a Feldman L. J. (2016); Salt Stress Affects the redox status of *Arabidopsis* root meristems. *Frontiers in plant science* **7**: 81
- Jürgens G. A Mayer U. (1993); In *A colour Atlas of Developing Embryos* (ed. J. Bard). London: Wolfe Publishing.
- Kato T., Morita M. T. a Tasaka M. (2010); Defects in dynamics and functions of actin filament in *Arabidopsis* caused by the dominant-negative actin *fiz1*- induced fragmentation of cctin filament. *Plant & Cell Physiology* **51(2)**: 333–338
- Khush G. S. (1999); Green revolution: preparing for the 21st century. *Genome* **42**: 646-655.
- Komis G., Illés P., Beck M. a Šamaj J. (2011); Microtubules and mitogen-activated protein kinase signalling. *Current Opinion of Plant Biology* **14**: 650–657
- Komis. G., Mistrik M., Šamajová O., Doskočilová A., Ovečka M., Illés P., Bartek J., a Šamaj (2014); Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiology* **165**: 129–148
- Komis G., Luptovčiak I., Doskočilová A. a Šamaj j. (2015); Biotechnological aspects of cytoskeletal regulation in plants. *Biotechnology Advances* **33**: 1043-1062
- Kopczak S. D., Haas N. A., Hussey P. J., Silflow C. D. a Snustad D. P. (1992); The small genome of *Arabidopsis* contains at least six expressed α -tubulin genes. *Plant Cell* **4**: 539-547
- Kropf D. L., Bisgrove S. R. a Hable W. E. (1998); Cytoskeletal control of polar growth in plant cells. *Current Opinion in Cell Biology* **10**: 117–122
- Kumari A., Jewaria P. K., Bergmann D. C. a Kakimoto T. (2014); *Arabidopsis* reduces growth under osmotic stress by decreasing SPEECHLESS protein. *Plant Cell Physiology* **55(12)**: 2037–2046
- Lee G. J., Sohn E. J., Lee M. H., Hwang I. (2004); The *Arabidopsis* Rab5 homologs Rha1 and Ara7 localize to the prevacuolar compartment. *Plant & Cell Physiology* **45**: 1211–1220

- Lee J. S. a Ellis B. E. (2007); Arabidopsis MAPK phosphatase 2 (MKP2) positively regulates oxidative stress tolerance and inactivates the MPK3 and MPK6 MAPKs. *The Journal of Biological Chemistry* **282**: 25020–25029
- Lew R. (1991); Electrogenic transport properties of growing Arabidopsis root hairs: The plasma membrane proton pump and potassium channels. *Plant Physiology* **97**: 1527-1534
- Liu B., Joshi H. C., Wilson T. J., Silflow C. D., Palevitz B. A. a Snustad D. P. (1994); Gamma-tubulin in Arabidopsis: gene sequence, immunoblot, and immunofluorescence studies. *Plant Cell* **2(6)**: 303-314
- Liu S. G., Zhu D. Z., Chen G. H., Gao X.-Q. a Zhang X. S. (2012); Disrupted actin dynamics trigger an increment in the reactive oxygen species levels in the Arabidopsis root under salt stress. *Plant Cell Reports* **31**: 1219–1226
- Maathuis F. a Saunders D. (1994); Mechanism of high-affinity potassium uptake in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* **91**: 9272-9276
- Maizel A., von Wangenheim D., Federici F., Haseloff J. a Stelzer E. H. (2011); High-resolution live imaging of plant growth in near physiological bright conditions using light sheet fluorescence microscopy. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **68(2)**: 377-385
- Mahajan S. a Tuteja N. (2005) Cold, salinity and drought stresses: an overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**: 139–158
- Mansfield S. G. a Briarty L. G. (1991); Early embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. II. The developing embryo. *Canadian Journal of Botany* **69**: 461-476
- Marc J., Granger C. L., Brincat J., Fisher D. D., Kao T., McCubbin A. G. a Cyr R. J. (1998) A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell* **10**: 1927–1940
- Mathur J., Mathur N. a Hulskamp M. (2002); Simultaneous visualization of peroxisomes and cytoskeletal elements reveals actin and not microtubule-based peroxisome motility in plants. *Plant Physiology* **128**: 1031–1045
- McCurdy D. W., Kovar D. R. a Staiger C. J. (2001); Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma* **215**: 89–104

McDowell J. M., Huang S., McKinney E. C., An Y. Q. a Meagher R. B. (1996); Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics* **142**: 587–602

Meagher R. B., McKinney E. C. a Kandasamy M. K. (1999) Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family. *Plant Cell* **11**: 995–1005

Meyerowitz E. M. a Pruitt R. E. (1985); *Arabidopsis thaliana* and Plant Molecular Genetics. *Science* **229**:1214–1218

Meyerowitz E. M. (2001); Prehistory of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* **125**: 15-19

Montimer J. C., Laohavisit A., Miedema H. a Davies J. M. (2008); Voltage, reactive oxygen species and the influx of calcium. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 698-699

Munns R., Tester M. (2008); Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* **59**: 651–681

Nishimura T., Yokota E., Wada T., Shimmen T. a Okada K. (2003); An *Arabidopsis* *ACT2* dominant-negative mutation, which disturbs F-actin polymerization, reveals its distinctive function in root development. *Plant & Cell Physiology* **44**: 1131–1140

Olesen J. E. a Bindi M. (2002); Consequences of climate change for European agricultural productivity, land use and policy. *European Journal of Agronomy* **16**: 239-262

Olympus Microscopy Resource Center. *Olympus America Inc.*. [online]. 2012 [cit. 2015-12-03]. Dostupné z: <http://www.olympusmicro.com/primer/anatomy/introduction.html>

Orvar B. L., Sangwan V., Omann F. a Dhindsa R. S. (2000); Early steps in cold sensing by plant cells, the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *Plant Journal* **23**:785–794

Osakabe Y., Arinaga N., Umezawa T., Katsura S., Nagamachi K., Tanaka H., Ohiraki H., Yamada K., Seo S.-U., Abo M., Yoshimura E., Shinozaki K. a Yamaguchi-Shinozaki K. (2013); Osmotic stress responses and plant growth controlled by potassium transporters in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 609–624

Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illeš P. a Lichtscheidl I. K. (2005); Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* **226**: 39-54

- Ovečka M., Vaškebová L., Komis G., Luptovčíak I., Smertenko A. a Šamaj J. (2015); Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols* **10** (8): 1234-1247
- Pelkmans L., Puntener D. a Helenius A. (2002); Local actin polymerization and dynamin recruitment in SV40-induced internalization of caveolae. *Science* **296**: 535–539
- Peterson R. L. (1967); Differentiation and maturation of primary tissue in white mustard root tips. *Canadian Journal of Botany* **45**: 319-331
- Petrásek, J. a Schwarzerová, K. (2009); Actin and microtubule cytoskeleton interactions. *Current Opinion in Plant Biology* **12**: 728–734.
- Provart N. J., Alonso J., Assmann S. M., Bergmann D., Brady S. M., Brkljacic J., Browse J., Chapple C., Colot V., Cutler S., Dang J., Ehrhardt D., Friesner J. D., Frommer W. B., Grotewold E., Meyerowitz E., Nemhauser J., Nordborg M., Pikaard C., Shanklin J., Somerville Ch., Stitt M., Torii K. U., Waese J., Wagner D. a McCourt P. (2015); 50 years of Arabidopsis research: highlights and future directions. *New Phytologist* doi: 10.1111/nph. 13687
- Rasmussen M. W., Roux M., Petersen M. a Mundy J. (2012); MAP kinase cascades in Arabidopsis innate immunity. *Frontiers in Plant Science* **3**: 169
- Ringli Ch., Baumberger N., Diet A., Frey B. a Keller B. (2002); ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of Arabidopsis. *Plant Physiology* **129**: 1464–1472
- Ringli Ch., Baumberger N. a Keller B. (2005); The Arabidopsis root hair mutants *der2–der9* are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiology* **46**: 1046–1053
- Rodriguez M. C. S., Petersen M. a Mundy J. (2010); Mitogen-Activated Protein Kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**: 621–649
- Rodríguez-Serrano M., Romero-Puertas M. C., Sparkes I., Hawes C., del Río L. A. a Sandalio L. M. (2009); Peroxisome dynamics in Arabidopsis plants under oxidative stress induced by cadmium. *Free Radical Biology and Medicine* **47**: 1632-1639
- Sack F. D. (1991); Plant gravity sensing. *International Review of Cytology* **127**: 193–252

Sampathkumar A., Lindeboom J. J., Debolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D. W., Ketelaar T. a Persson S. (2011); Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**: 2302-2313

Serrano R., Mulet J. M., Rios G., Marguez J. A., de Larrinoa I. F., Leube M. P., Mendizabal I. M., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros R. a Montesinos C. (1999); A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1023-1036

Sheterline P., Clayton J. a Sparrow J. C. (1998); Actin. *Protein profile* **4**: 1-272

Scheres B., Wolkenfelt H., Willemsen V., Terlouw M., Lawson E., Dean C. a Weisbeek P. (1994); Embryonic origin of the Arabidopsis primary root and root meristem initials. *Development* **120**: 2475-2487

Scheuring D., Löfke Ch., Krüger F., Kittelmann M., Eisa A., Hughes L., Smith R. S., Hawes Ch., Schumacher K. a Kleine-Vehn J. (2015); Actin-dependent vacuolar occupancy of the cell determines auxin-induced growth repression. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **113**(2): 452-457

Schiefelbein J. W., Shipley A. a Rowse P. (1992); Calcium influx at the tip of growing root-hair cells of *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **187**: 455–459

Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011); Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**:196–203.

Smékalová V., Doskočilová A., Komis G. a Šamaj J. (2014); Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**: 2-11

Smith S. a De Smet I. (2012); Root system architecture: insights from *Arabidopsis* and cereal crops. *Philosophical Transaction of the Royal Society* **367**: 1441–1452

Snustad D. P., Haas N. A., Kopczak S. D. a Silflow C. D. (1992); The small genome of *Arabidopsis* contains at least nine expressed β -tubulin genes. *Plant Cell* **4**: 549-556

Staehein L. A. a Hepler P. K. (1996); Cytokinesis in higher plants. *Cell* **84**: 821–24

Stainger Ch. J. (2000); Signaling to the actin cytoskeleton in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **51**: 257-288

- Stangeland B., Rosenhave E. M., Winge P., Berg A., Amundsen S. S., Karabeg M., Mandal A., Bones A. M., Paul E. Grini P. E. a Reidunn B. Aalen R. B. (2009); *AtMBD8* is involved in control of flowering time in the C24 ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **136**: 110–126
- Stehbens S., Pemble H., Murrow L. a Wittmann T. (2012); Imaging intracellular protein dynamics by spinning disk confocal microscopy. *Methods in Enzymology* **504**: 293-313
- Suzuki N., Koussevitzky S., Mittler R. a Miller G. (2012); ROS and redox signalling in the response of plants to abiotic stress. *Plant Cell & Environment* **35**: 259–270
- Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D. a Menzel D. (2004); Endocytosis, actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiology* **135**: 1150–1161
- Šamaj J., Read N. D., Volkmann D., Menzel D. a Baluška F. (2005); The endocytic network in plants. *TRENDS in Cell Biology* **15**: 425-433
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H. a Šamaj J. (2013); Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**: 118–128
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Doczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L. a Hirt H. (2004); The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**: 141–152
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000), Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815
- Tiaz L. (1984); Plant cell expansion. *Annual Reviews of Plant Physiology* **35**: 585-657
- Ueda T. a Nakano A. (2002); Vesicular traffic: an integral part of plant life. *Current Opinion in Plant Biology* **5**: 513–517
- Ueda, T., Uemura T., Sato M. S. a Nakano A. (2004); Functional differentiation of endosomes in *Arabidopsis* cells. *The Plant Journal* **40**: 783–789
- Uemura T., Ueda T., Ohniwa R. L., Nakano A., Takeyasu K. a Sato M. H. (2004); Systematic analysis of SNARE molecules in *Arabidopsis*: Dissection of the post-Golginetwork in plant cell. *Cell structure and function* **29**: 49-65

- Vallejo A. J., Yanovsky M. J. a Botto J. F. (2010); Germination variation in *Arabidopsis thaliana* accessions under moderate osmotic and salt stresses. *Annals of Botany* **106**: 833–842
- von Guttenberg H. (1964); Die Entwicklung der Wurzel. *Phytomorph.* **14**: 265-287
- Walker R. A., O'Brien E. T., Pryer N. K., Soboeiro M. F., Voter W. A., Erickson H. P. a Salmon E. D. (1988); Dynamic instability of individual microtubules analyzed by video light microscopy: rate constants and transition frequencies. *The Journal of Cell Biology* **107**: 1437–1448
- Wang C., Li J. a Yuan M. (2007); Salt Tolerance Requires Cortical Microtubule Reorganization in *Arabidopsis*. *Plant & Cell Physiology* **48(11)**: 1534–1547
- Wang C., Zhang L. J., Yuan M., Ge Y. X., Liu Y. J., Fan J. J., Ruan Y., Cui Z., Tong S. a Zhang S. (2010); The microfilament cytoskeleton plays a vital role in salt and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Biology* **12**: 70-78
- Wang E., Babbey C. M. a Dunn K. W. (2005); Performance comparison between the high-speed Yokogawa spinning disc confocal system and single-point scanning confocal systems. *Journal of Microscopy* **218**:148–159
- Wang Y.-S., Yoo Ch.-M. a Blancaflor E. B. (2008); Improved imaging of actin filaments in transgenic *Arabidopsis* plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytologist* **177**: 525–536
- Wang Z.-Y., Xiong L., Li W., Zhu J.-K. a Jianhua Zhud J. (2011); The plant cuticle is required for osmotic stress regulation of abscisic acid biosynthesis and osmotic stress tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **23**: 1971–1984
- Wasteneys G. O. (2000); The cytoskeleton and growth polarity. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 503–511
- Weber M. a Huisken J. (2011); Light sheet microscopy for real-time developmental biology. *Current Opinion in Genetics & Development* **21**: 566-572
- Weisenberg R. C., Borisy G. G. a Taylor E. W. (1968); The colchicine-binding protein of mammalian brain and its relation to microtubules. *Biochemistry* **7**: 4466–4479
- Xiong L. a Zhu J.-K. (2002); Salt stress. *The Arabidopsis book* **1**: e0048. doi:10.1199/tab.0048

Xue B. a Robinson R. C. (2013); Guardians of the actin monomer. *European Journal of Cell Biology* **92**: 316–332

Yang Z. (2002); Small GTPases: versatile signaling switches in plants. *Plant Cell* **14**: S375–S388

Zagorchev L., Kamenova P. a Odjakova M. (2014); The role of plant cell wall proteins in response to salt stress. *The Scientific World Journal Article ID*: 764089, 9 stránek

Zhang X., Henriques R., Lin S.-S., Niu Q.-W. a Chua N.-H. (2006); *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature Protocols* **1**: 1-6

Zhu J.-K. (2002); Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**: 247–273

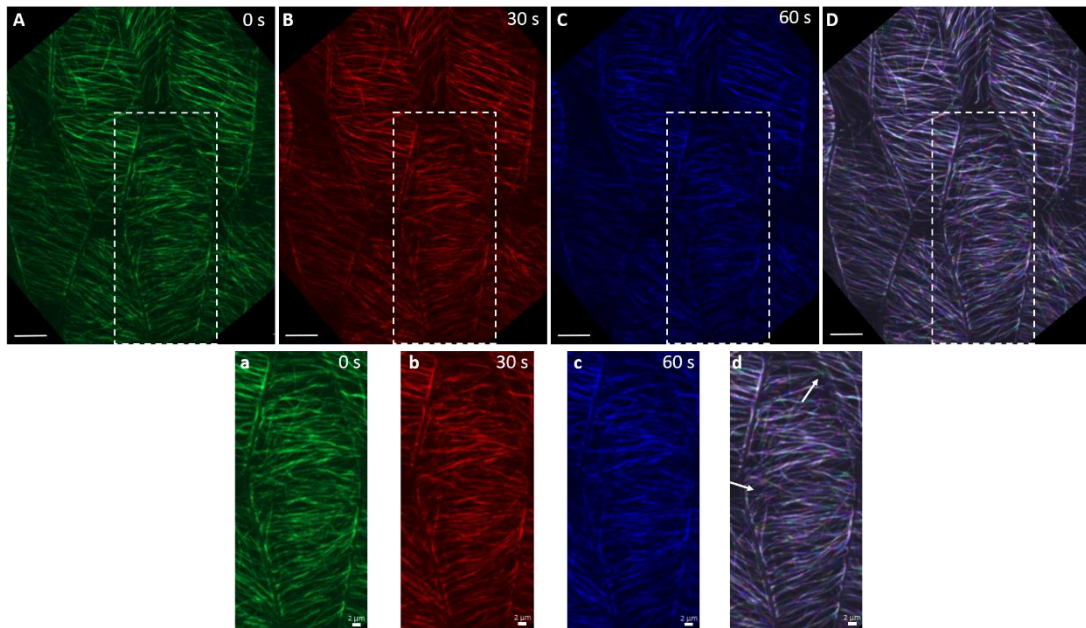
9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

| | |
|------------------------|--|
| \pm SD | \pm směrodatná odchylka |
| $\mu\text{mol.l}^{-1}$ | mikromol na litr |
| <i>A. thaliana</i> | <i>Arabidopsis thaliana</i> |
| ABA | abscisová kyselina |
| ABP | proteiny asociované s aktinem |
| ACT | aktinový gen |
| ATP | adenosintrifosfát |
| AtPRF1–AtPRF5 | profiliny |
| AtrbohC | druh NADPH oxidázy |
| AtTUA1–AtTUA6 | isoformy α -tubulinu |
| AtTUB1–AtTUB9 | isoformy β -tubulinu |
| BASTA | fosfinotricin |
| C | iniciační buňky kortexu |
| C24 | kontrolní linie |
| Ca^{2+} | vápenatý iont |
| CC | centrální buňky |
| CCD | „Charge-Coupled Device“ |
| CO_2 | oxid uhličitý |
| COL | iniciační buňky kolumely |
| Col-0 | Columbia-0 |
| <i>der1</i> | „deformed root hair 1“ |
| DNA | deoxyribonukleová kyselina |
| E | iniciační buňky endodermis |
| EMS | ethylmethan sulfonát |
| ER | endoplazmatické retikulum |
| ETI | patogen-asociovaná imunita spuštěná efektozem |
| FABD2 | „actin-binding domain of fibrin1“ |
| FEP | „Fluorinated Ethylene Propylene“ |
| <i>fiz1</i> | „fizzy1“ |
| FM4-64 | N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(8-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid |
| GA | Golgiho aparát |
| GDP | guanosindifosfát |

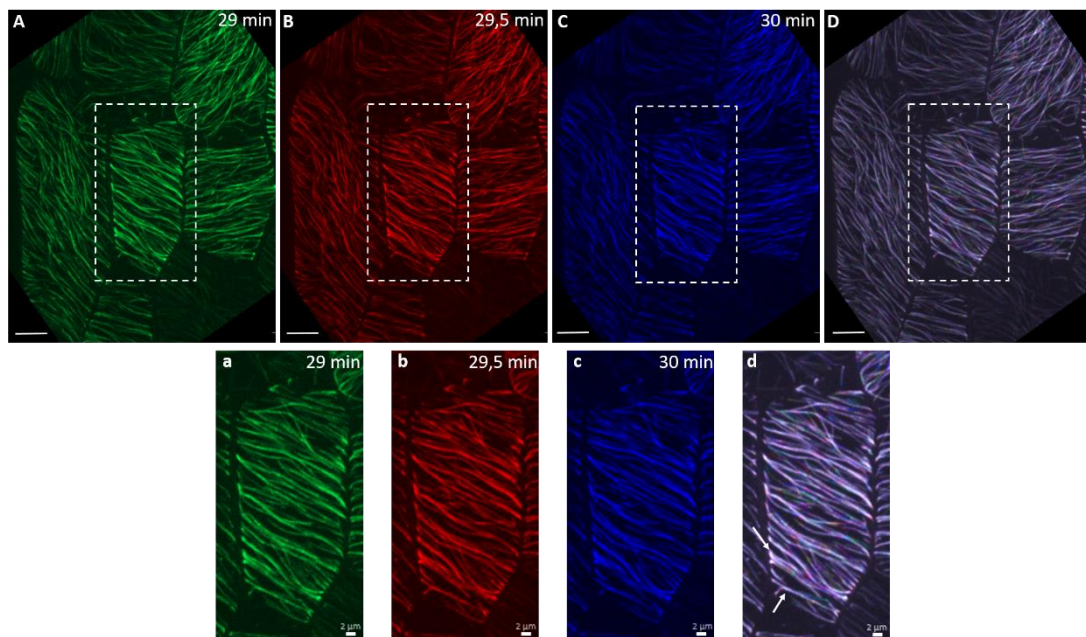
| | |
|-----------------------------------|--|
| GFP | zelený fluorescenční protein |
| GM | základní kořenový meristém |
| GTP | guanosintrifosfát |
| GUS | β -glukuronidáza |
| H⁺ | vodíkový iont |
| H₂O₂ | peroxid vodíku |
| K⁺ | draselný iont |
| KOH | hydroxid draselný |
| Lat-B | Latrunculin B |
| LB médium | Lysogeny broth médium |
| Ler | Landsberg <i>erecta</i> |
| lt | dolní část spodní vrstvy terminální buňky |
| LR1 | první vrstva buněk kořenové čepičky |
| LR2 | druhá vrstva buněk kořenové čepičky |
| LS | Light-sheet fluorescenční mikroskopie |
| lt | spodní vrstva terminální buňky |
| MAP | proteiny asociované s mikrotubuly |
| MAPK | Mitogen-aktivované protein kinázy |
| MAPKK | MAP kinázy kinázy |
| MAPKKK | MAP kinázy kinázy kinázy |
| MBD | „microtubule-binding domain of mammalian MAP4 protein“ |
| MF | mikrofilamenty aktinu |
| MKK2, 9 | mitogen-aktivovaná protein kináza kináza 2, 9 |
| MKP2 | MAPK fosfatáza 2 |
| mmol.l⁻¹ | milimol na litr |
| MPK3, 4, 6 | mitogen-aktivovaná protein kináza 3, 4, 6 |
| MS médium | Murashige and Skoog médium |
| MT | mikrotubuly |
| MTOC | mikrotubulové organizační centrum |
| Na⁺ | sodný iont |
| NaCl | chlorid sodný |
| NADPH | nikotinamidadeninukleotidfosfát |
| NO | oxid dusnatý |
| Obr. | obrázek |

| | |
|-------------------------------|---|
| OD₆₀₀ | optická denzita bakterií |
| OSN | Organizace spojených národů |
| P | iniciační buňky pericyklu |
| PC | buňky prokambia |
| PD | buňky protodermy |
| pH | „potential of hydrogen“ |
| P_i | fosfát |
| PI(3)P | fosfatidylinositol 3-fosfát |
| PLD | fosfolipáza D |
| PM | plazmatická membrána |
| PPB | preprofázní svazek |
| PQ | paraquat |
| PTI | patogen-asociovaná imunita spuštěná molekulárním vzorem |
| Rab | Rab GTPáza |
| Rho | Rho GTPáza |
| ROS | reaktivná formy kyslíku |
| RPM | „revolutions per minute,, (otáčky za minutu) |
| SD | Spinning-disk konfokální mikroskopie |
| <i>sgr2</i> | „ <i>shoot gravitropism 2</i> “ |
| SNARE | „ SNAP (Soluble <u>NSF</u> Attachment Protein) Receptor “ |
| T₁ generace | první generace transgenních rostlin |
| T₂ generace | druhá generace transgenních rostlin |
| Tab. | tabulka |
| T-DNA | transferová deoxyribonukleová kyselina |
| TGN | trans-Golgiho síť |
| ut | vrchní vrstva terminální buňky |
| V | iniciační buňky vodivého pletiva |
| YEB médium | Yeast extract beef médiu |

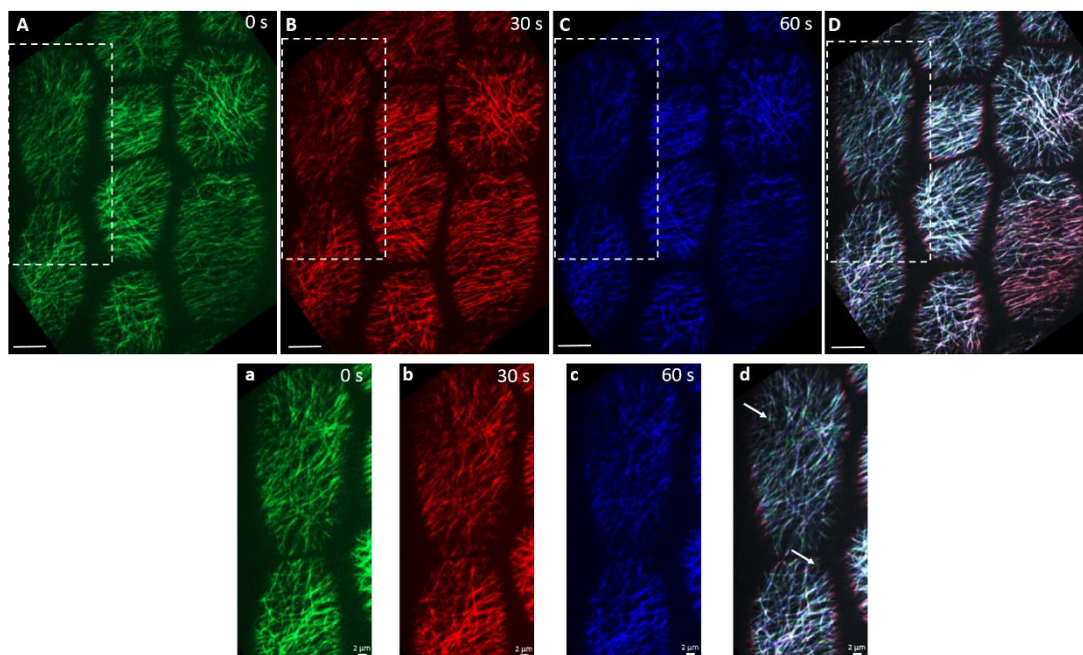
10. PŘÍLOHY



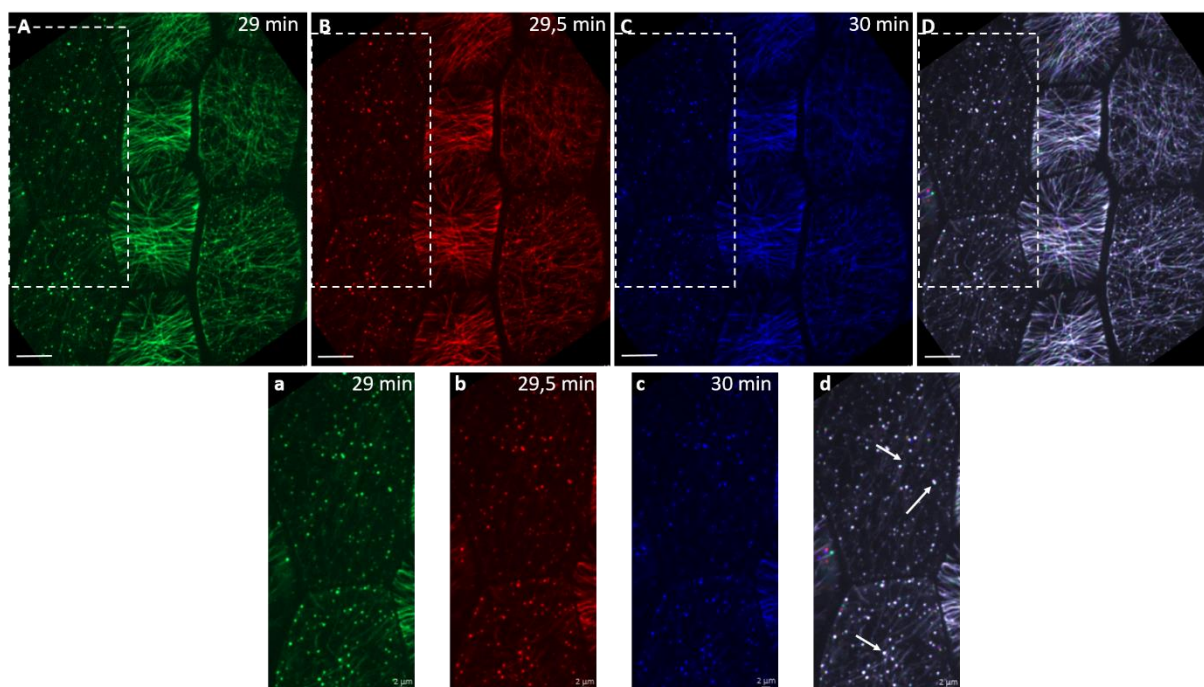
Obr. 1: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu hypokotylových buněk v kontrolních podmínkách linie C24-MAP4-GFP. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



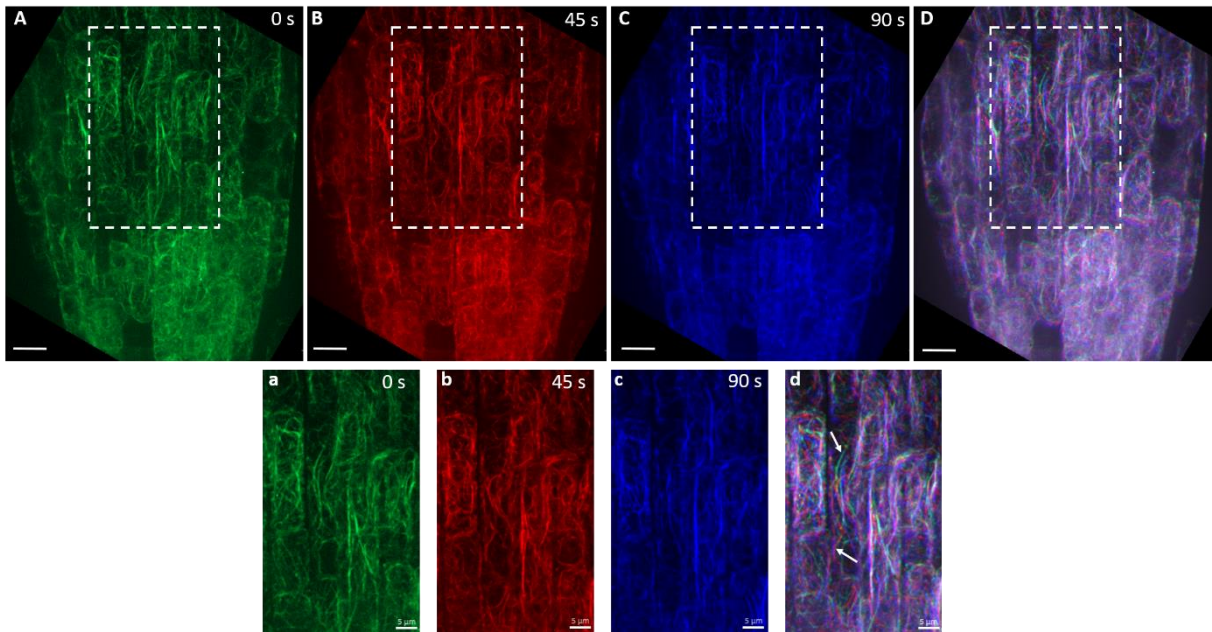
Obr. 2: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu hypokotylových buněk při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ linie C24-MAP4-GFP. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



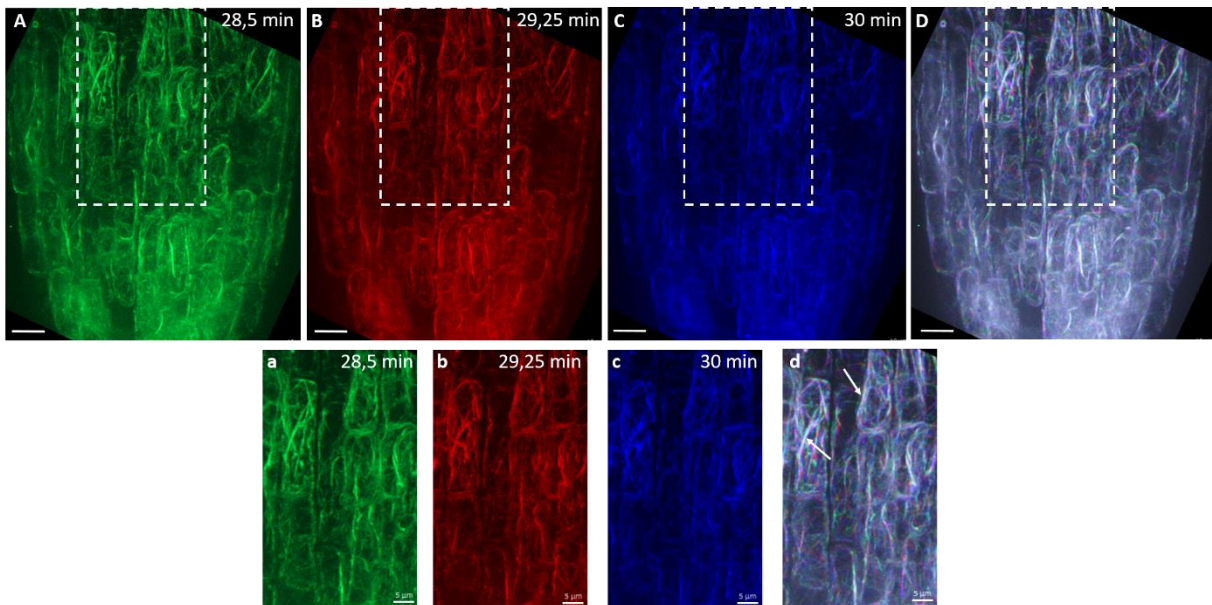
Obr. 3: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu hypokotylových buněk v kontrolních podmínkách linie *der1-3-MAP4-GFP*. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



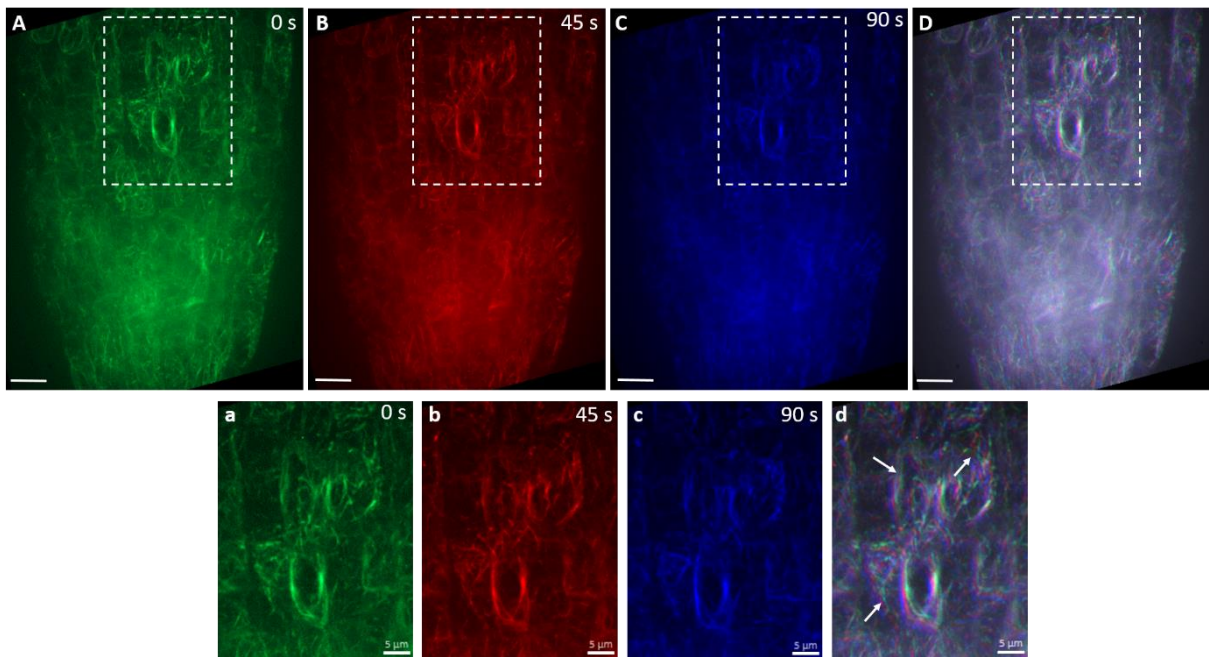
Obr. 4: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu hypokotylových buněk při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl linie *der1-3-MAP4-GFP*. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



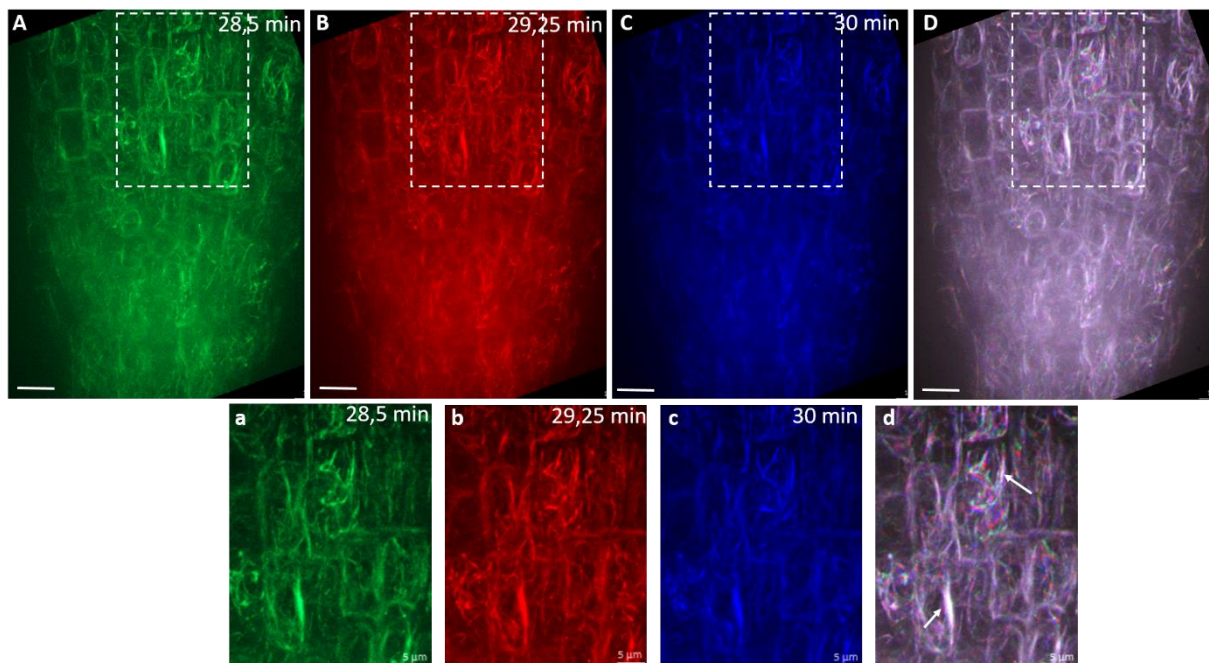
Obr. 5: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách linie C24-ABD2-GFP. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).



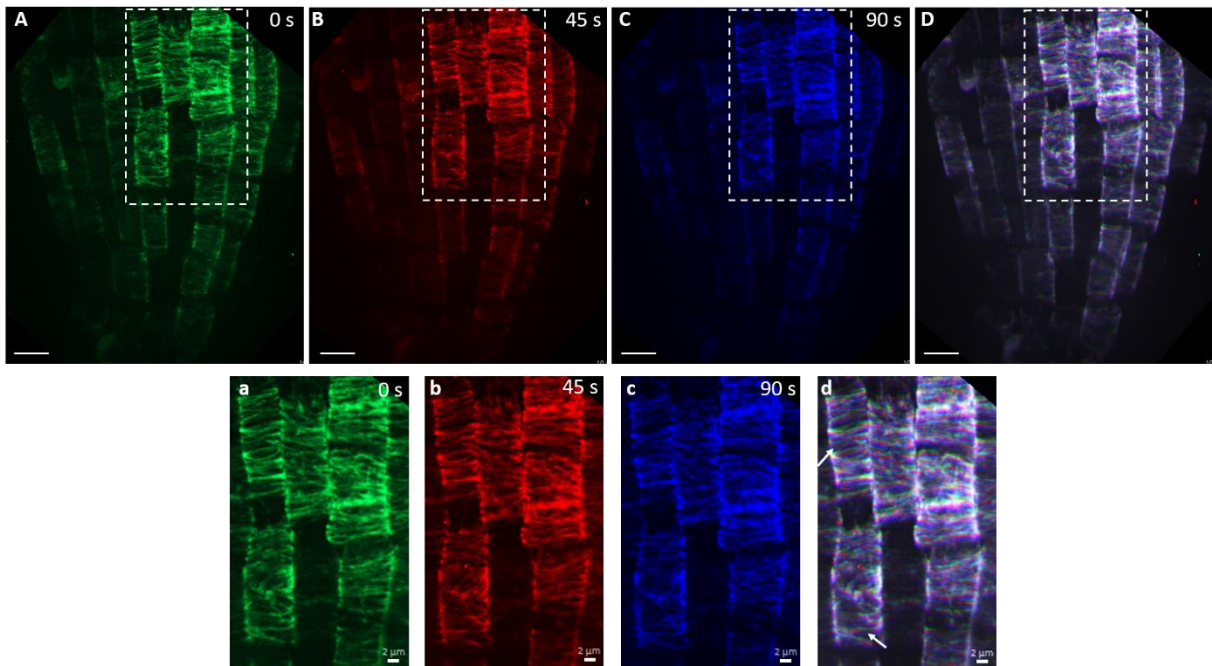
Obr. 6: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu buněk kořenové špičky při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ linie C24-ABD2-GFP. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).



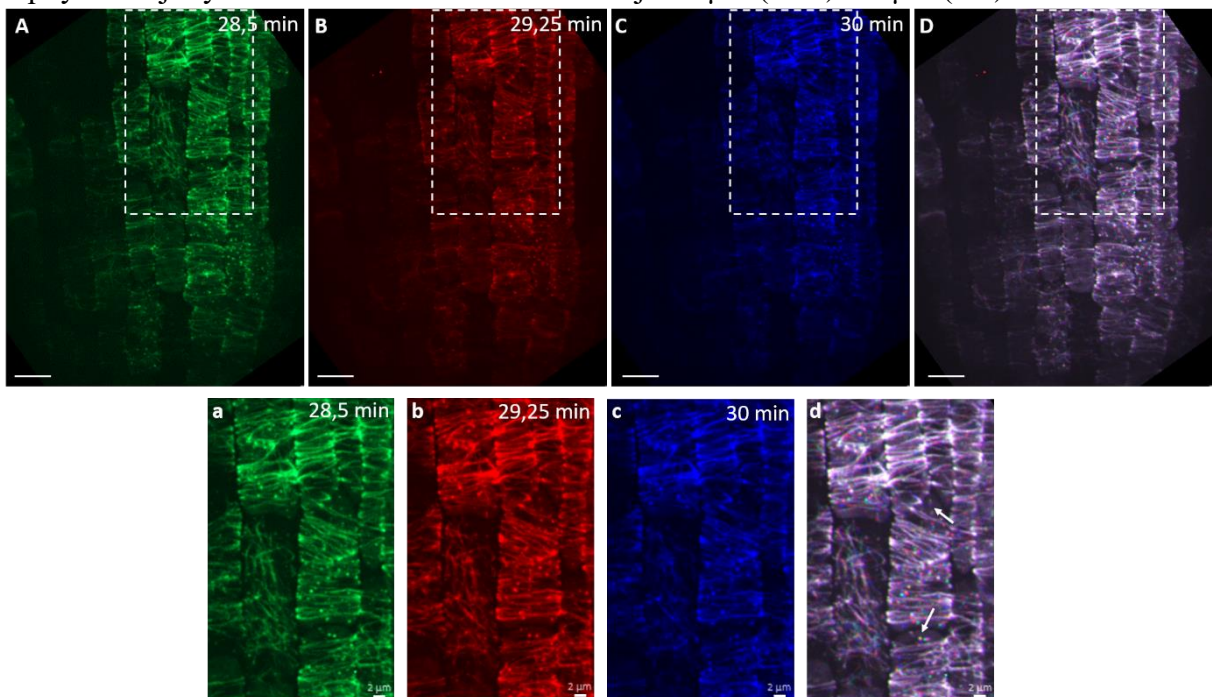
Obr. 7: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách linie *der1-3-ABD2-GFP*. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).



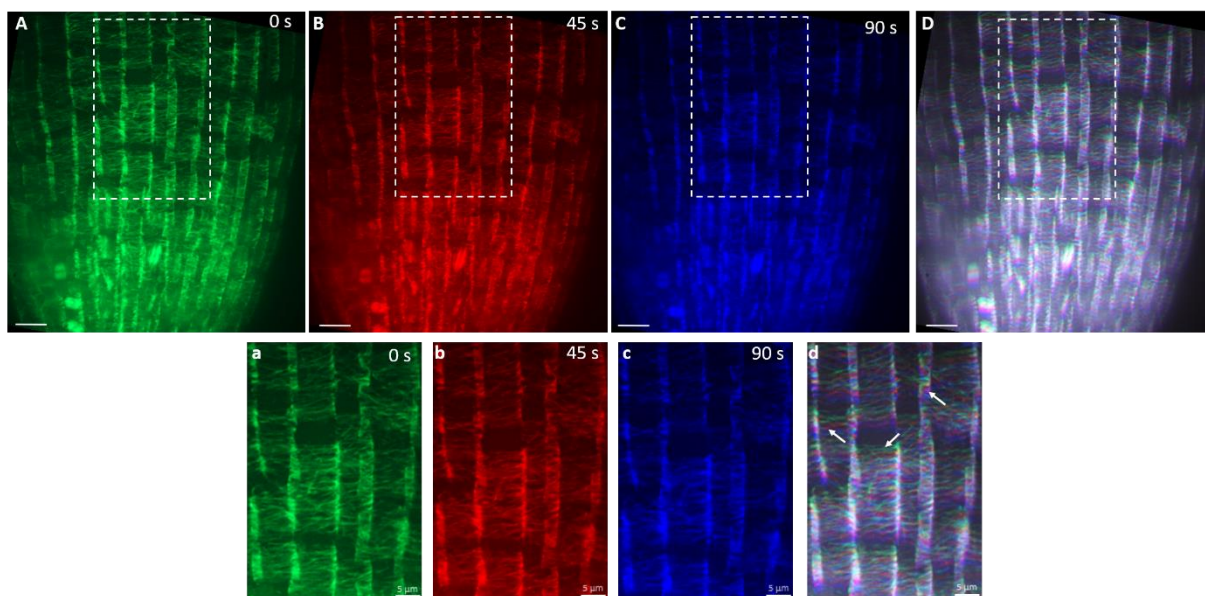
Obr. 8: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky aktinového cytoskeletu buněk kořenové špičky při působení 100 mmol.l^{-1} NaCl linie *der1-3-ABD2-GFP*. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).



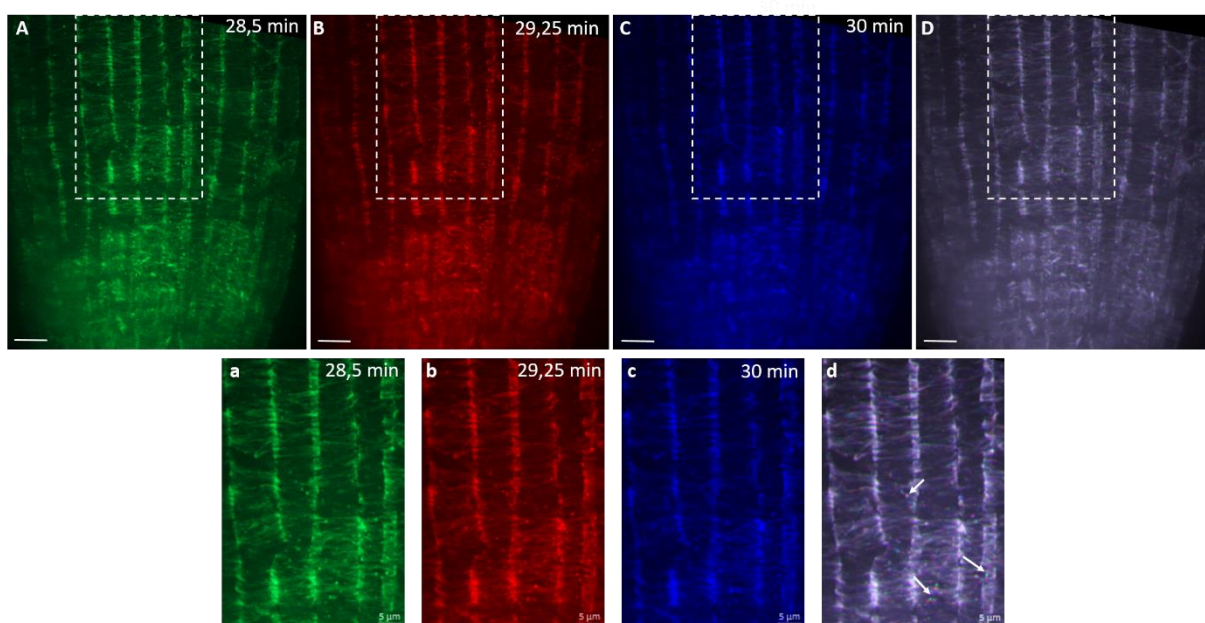
Obr. 9: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách linie C24-MAP4-GFP. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



Obr. 10: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu buněk kořenové špičky při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ linie C24-MAP4-GFP. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 2 μm (a-d).



Obr. 11: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu buněk kořenové špičky v kontrolních podmínkách linie *der1-3-MAP4-GFP*. Aa) začátek snímání, Bb) první časový snímek, Cc) druhý časový snímek, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují dynamická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).



Obr. 12: Překryv tří vybraných časových intervalů ke stanovení dynamiky mikrotubulového cytoskeletu buněk kořenové špičky při působení $100 \text{ mmol.l}^{-1} \text{ NaCl}$ linie *der1-3-MAP4-GFP*. Aa) počáteční časový snímek sekvence, Bb) předposlední časový snímek experimentu, Cc) poslední časový snímek experimentu, Dd) překryv tří kanálů. Šipky ukazují statická vlákna aktinu. Měřítko je 10 μm (A-D) a 5 μm (a-d).