

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Bakalářská práce

Olomouc

Zuzana Crlíková

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra buněčné biologie a genetiky



**Cytogenetický a expresní profil
protoplastových kultur vzhledem k
jejich regeneraci**

Bakalářská práce

Zuzana Crlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: prezenční

Olomouc 2011

Vedoucí práce: **Doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D**

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem tuto práci na téma Cytogeneticky a expresní profil protoplastových kultur vzhledem k jejich regeneraci zpracovala osobně, pouze za užití literatury uvedené v přehledu použité literatury.

V Olomouci dne

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu práce Doc. RNDr. Vladanovi Ondřejovi, PhD. Za jeho cenné rady a připomínky, bez nichž by tato práce zcela jistě nevznikla. Mé díky patří i rodičům, kteří byli oporou a příteli, který měl se vším trpělivost.

Shrnutí

Protoplastové kultury, buňky zbavené buněčné stěny, jsou vhodným prostředkem pro studování buněčného osudu. Tyto buňky jsou schopny procházet dediferenciací a následnou diferenciací. V současné době je cílem zjistit pochody v buňce, především signály, které jsou uskutečňovány v jádře. V jádře dochází k dekonduzaci chromatinu a následné kondenzaci. To zajišťuje protoplastovým kulturám totipotenci, tedy možnost řídit svůj vlastní osud a tvořit nové buněčné linie. Tyto změny jsou primárně sledovány v chromatinovém vlákne a jeho modifikacích.

Součástí kultivace protoplastových kultur je i oxidační stres. Rostliny si vytvořily systém, který dokáže odstranit reaktivní oxidační látky. Tyto látky jsou natolik reaktivní, že ničí genetický materiál, buněčnou stěnu a vše v cytosolu. Na tento stres buňky reagují různě. Enzymy odstraňující reaktivní oxidativní látky jsou zakódovány v chromozomech. Geny tohoto systému jsou spouštěny v různých časových úsecích v době kultivace protoplastů, což je součástí praktické části této bakalářské práce.

Summary

Protoplast cultures, cells without cell wall, are an appropriate instrument for cell fate observation. These cells are able to undergo dedifferentiation and followed by differentiation. In these days the aim is to reveal processes that take part in cell, mainly signals that are generated by nucleus. The decondensation of chromatin, that take place in nucleus, is followed by condensation. These processes provide totipotency to protoplast cultures, possibility to rule their own fate and create new cell lineages. These changes are monitored directly on chromatin fibre and its modifications.

Oxidative stress is a component of protoplast culture cultivaton. The plants have evolved system, that is able to clear out reactive oxygen substances. These substances are so reactive that they destroy genetic material, cell wall and everything in cytosol. The cells react on stress variol ways. Enzymes clearing out reactive oxygen substances are encoded in chromosomes. Genes of this system are released in various time intervals as the culture undergo different stages of protoplast cultivation, this is the theme of this work.

Obsah

1	Cíl práce.....	9
2	Úvod.....	10
3	Současný stav řešené problematiky.....	11
3.1	Protoplast.....	11
3.1.1	Materiál a postup izolace	11
3.1.2	Faktory ovlivňující izolaci	11
3.1.3	Kultivační média.....	11
3.1.3.1	Typy médií.....	12
3.2	Totipotentní systém.....	12
3.2.1	Totipotentní systém živočichů	12
3.2.2	Totipotentní systém rostlin	12
3.2.3	Dekondenzace	13
3.2.3.1	Dekondenzace – 1. fáze	13
3.2.3.2	Dekondenzace – 2. fáze	13
3.2.4	Rekondenzace	14
3.2.5	Dediferenciacce	15
3.2.6	Buněčná smrt.....	15
3.3	Buněčná stěna (BS).....	15
3.3.1	Obnova BS v protoplastu	15
3.3.2	Geny zapojené do obnovy BS.....	16
3.4	Jádro buňky	17
3.4.1	Jaderná tělíska.....	17
3.4.2	Jadérko	18
3.4.3	Jaderné laminy.....	18
3.4.4	Chromatin.....	18
3.4.4.1	Uspořádání chromatinového vlákna.....	18
3.4.4.2	Euchromatin	19
3.4.4.3	Heterochromatin.....	20
3.4.4.3.1	Chromocentrum.....	20
3.4.4.3.2	Heterochromatin jako marker protoplastové diferenciacce.....	20
3.4.4.4	Modifikace základního uspořádání.....	21
3.4.4.5	Modifikace histonových konců: epigenetický kód pro genovou regulaci	21
3.4.4.5.1	Metylace	21
3.4.4.5.2	De/acetylace.....	22
3.4.4.5.3	Fosforylace.....	22
3.4.5	Vyšší řád chromatinového uspořádání.....	22
3.4.5.1	Růžicová struktura	22
3.5	Organizace interfázních chromozomů	23
3.5.1	Rabl model	23
3.5.2	CT-IC model (chromosome territory–interchromatin compartment).....	24
3.5.3	Mřížový model.....	24
3.5.4	ICN model (interchromosomal network).....	24
3.6	Oxidativní stres (OS) v protoplastových kulturách	25
3.6.1	Reaktivní oxidativní látky (ROS)	25
3.6.1.1	Tvorba ROS	25
3.6.1.2	Intra- a extracelulární akumulace ROS	26
3.6.2	Expresce genů zapojených do „Scavenging system“	27
3.6.3	Reakce buňky na ROS.....	27
3.6.3.1	Obnova BS.....	27
3.6.3.2	Dediferenciacce a buněčný cyklus (BC)	27
3.6.3.3	Vztah mezi CAT a protoplastovým dělením	28

3.6.3.4	Apoptóza	28
3.6.4	„Scavenging system“ a jeho látky	28
3.6.5	Askorbátový cyklus	29
3.6.6	Rekondenzační stupeň je limitován oxidativním stresem	29
3.6.7	Vliv askorbátu a dehydroaskorbátu na buněčný cyklus	29
3.6.8	Rostliny s rekalcitrací	30
4	Materiál a metody	31
4.1	Biologický materiál	31
4.2	Seznam použitých roztoků a médií	31
4.3	Vybavení laboratoře	31
4.4	Pěstování rostlin	32
4.5	Izolace a kultivace protoplastů	32
4.5.1	Kultivace v LCM1 médiu	32
4.5.2	Stanovení životnosti protoplastů	33
4.6	Provedení FISH	33
4.6.1	Příprava sondy SAT 1	33
4.6.2	Provedení FISH.....	34
4.6.3	Detekce sondy	34
4.7	Detekce genů zapojených do OS	35
4.7.1	Izolace DNA z listu	35
4.7.2	Izolace RNA z protoplastu a listu	35
4.7.3	Odstranění DNA z RNA	35
4.7.4	Přepis RNA do cDNA	36
4.7.5	RT PCR.....	36
4.7.6	Získání výsledků RT PCR	37
4.8	PCR a elektroforéza.....	37
5	Výsledky	38
5.1	Provedení FISH	39
5.2	Detekce genů zapojených do OS	40
6	Diskuze	45
7	Závěr	46
8	Seznam použitých zkratk	47
9	Seznam použité literatury	48
10	Příloha.....	52

1 Cíl práce

Cílem je shrnout dosavadní literaturu týkající se cytogenetiky a expresního profilu protoplastových kultur rostlin.

Bakalářská práce se týká popisu strukturních reorganizací chromatinu v jádře protoplastových buněk během diferenciaci a dediferenciaci. Expresní profil protoplastových kultur se zaměří na geny, které jsou zapojeny v antioxidantním systému rostlin.

Praktická část obsahuje kultivaci a izolaci protoplastů okurky seté (*Cucumis sativus* L.), provedení metody FISH, izolaci DNA a RNA, použití techniky PCR. Závěr je věnován detekci genů antioxidantního systému rostlin v DNA vyizolované z listu okurky.

2 Úvod

V posledních letech došlo k průlomu vědeckých poznatků z oblasti biotechnologií. Mezi tyto poznatky patří přeprogramování buněk ze stavu tzv. terminálně diferenciovaného do stavu nediferenciovaného. Toto přeprogramování následuje po znovuvstoupení buňky do buněčného cyklu, což je charakteristickým znakem pro přechod z diferenciovaného stavu do stavu podobného kmenovým buňkám. Tímto vznikají pluripotentní buňky. Aby buňka mohla tohoto stavu dosáhnout, musí dojít ke chromatinovým přestavbám. Dochází ke dvojité dekondenzaci genetického materiálu a následné rekondenzaci. Takto se stává buňka dediferenciovanou.

K tomuto studiu jsou využívány protoplastové kultury. Díky nim lze pozorovat tyto chromatinové změny. Avšak získání těchto kultur je spojen s invazivními zákroky do buněčné stěny pomocí enzymů. Kvůli těmto enzymům vzniká v buňce stres, a proto dochází ke vzniku reaktivních oxidativních látek. Tyto látky jsou velmi reaktivní, dokáží změnit strukturu buněčné stěny a dokonce i genetického materiálu. Tímto způsobem může být osud buňky ovlivněn až do té míry, že dochází buď ke změně buněčného osudu nebo k její smrti. Existuje však systém, který tyto látky dokáže z rostlinné buňky odstranit. Díky expresi genů kódujících enzymy, které eliminují reaktivní oxidativní látky, jsou buňky před tímto stresem chráněny.

Praktická část má dokázat chromatinové přestavby v jádře v protoplastu za pomoci sondy na satelitní repetice 1. Také je snahou dokázat expresi genů molekul, pomáhajících odstranit reaktivní oxidativní látky z rostliny a tím zamezit stresu. Mezi tyto látky patří askorbát peroxidáza, kataláza a glutathion peroxidáza, které se exprimují v různé míře během kultivace protoplastů.

3 Současný stav řešené problematiky

3.1 Protoplast

Primární buněčné pletivo obsahuje celulózní buněčné stěny s matrix bohatou na pektin. Protoplasma je ohraničena plazmatickou membránou a tvoří protoplast buňky. Použitím hypertonických nebo enzymatických roztoků se plazmatická membrána stahuje od její buněčné stěny. Její odstranění uvolní velké populace sférických osmoticky křehkých protoplastů (Davey *et al.*, 2005). Tyto buňky bez buněčné stěny mají totipotentní charakter, a to se využívá například k získávání nových druhů rostlin, které nemohou být fyziologickým způsobem kříženy (Klíma, 2009; Fu, 2004). Protoplastové kultury se také využívají při studiu membránových funkcí, buněčné struktury a syntézy látek (Davey *et al.*, 2005).

3.1.1 Materiál a postup izolace

Pro protoplastové kultury se využívá buněk izolovaných z kořínků, hypokotylů, tkání dělohy, kořenů, kořenových vlásků po několika dnech klíčení (Davey *et al.*, 2005). Tyto tkáně se nařežou a poté se ponoří do enzymatického roztoku, který rozpustí buněčné stěny. Často se využívá celulózový a pektinázový enzym. Pektináza separuje buňky od sebe a tím předchází shlukům a celulóza odstraní jejich buněčné stěny (Takebe *et al.*, 1968).

3.1.2 Faktory ovlivňující izolaci

Uvolnění protoplastů do prostoru je ovlivněno mnoha faktory: teplotou, délkou inkubace v enzymu, optimálním pH enzymového roztoku a lehkým protřepáním. Například pro *C. melo* nebo *C. metuliferus* se do enzymového roztoku přidává glycin. Ten maximalizuje uvolnění protoplastů z tkáně dělohy a hypokotylu, avšak jeho množství dále ještě závisí na druhu a kultivaru (Sutiojono *et al.*, 2002). Izolace protoplastů je proces indukující reakci buněk na stres, který probíhá zejména během enzymatické izolace, kdy vznikají peroxidy a produkty degradace buněčných stěn. I tento stresový faktor může výrazně snížit výtěžek (Davey *et al.*, 2005).

3.1.3 Kultivační média

Média jsou vyselektována na základě faktorů jako jsou nízké náklady, využití pro mnoho druhů a tkání. Nejpoužívanější jsou MS médium – tabulka č. 1 (Murashige *et* Skoog, 1962) a B5 – tabulka č. 2 (Gamborg *et al.*, 1968) s přísadkou manitolu nebo soritolu. Pokud se studují protoplastové kultury nízké denzity, využívá se média obsahující kokosové mléko – tabulka č. 3 (Kao *et* Michalyuk, 1975). Součástí jsou i růstové regulátory, auxiny a

cytokininy, které jsou důležité pro neustálý růst protoplastů. Cukry jako glukóza a sacharóza poskytují zdroj uhlíku (Davey *et al.*, 2005).

3.1.3.1 Typy médií

Pro vývoj protoplastů se používají tekutá, polotekutá média, nebo jejich kombinace s agarem. Polotekutá média (např. alginát) poskytují výhodu, že protoplasty zůstávají separované, podporují pozdější regeneraci buněčné stěny a mitotické dělení (Davey *et al.*, 2005).

3.2 Totipotentní systém

U některých živočichů a hlavně u rostlin jsou zralé, diferenciované buňky schopny zvrátit svůj směr vývoje, ztratit svůj stav diferenciaci a stanou se pluripotentními. Protoplastová dediferenciaci je charakterizovaná novou rovnováhou mezi euchromatinem, který je transkribován, a kondenzovaným heterochromatinem s potlačenou transkripcí (Ondřej *et al.*, 2009).

3.2.1 Totipotentní systém živočichů

Plasticita živočišných buněk byla zdokumentována a je dobře ilustrována pomocí klonování, kdy do bezjaderného oocyту je vloženo jádro a dojde k epigenetickému reprogramování vedoucímu ke znovuoobnovení totipotence (Wilmuť *et al.*, 1997).

3.2.2 Totipotentní systém rostlin

Dediferenciaci je běžně spojena se znovuvstoupením do buněčného cyklu. Charakteristickým znakem je odchod z daného diferenciovaného stavu do stavu podobného kmenovým buňkám, které jsou pluripotentní. Tomuto procesu předchází nejen nový vstup do buněčného cyklu, ale také trans- a rediferenciaci nebo rozhodnutí pro smrt buňky. Dediferenciaci je spojena se změnami v genové expresi (Zhao *et al.*, 2001). Expresi genů je založena na transkripci euchromatinu. Naopak heterochromatin je pro transkripci neaktivní. Ovšem záleží také na úpravách euchromatinu, ten může být acetylován, metylován nebo fosforylován a tím by došlo také k zamezení exprese genů. Těmito úpravami si buňka může určovat směr vývoje. Buď dojde k reprogramování, a tím získání pluripotence, nebo bude pokračovat v buněčném cyklu. Pluripotence je doprovázena také posttranskripčními modifikacemi histonu H3, redistribucí heterochromatinového proteinu 1 a disrupcí jadéřkové domény. První fáze chromatinové dekondezace je reprezentována jaderným reprogramováním vedoucímu k získání pluripotence. Tato fáze je velmi dobře zdokumentována a podložena důkazy. Na ni navazuje druhá fáze dekondezace. Tato fáze

však není dosud dopodrobna prozkoumána. Dosud se vede mnoho hypotéz, že bohatě dekonzenzovaný chromatin může odrážet změny vyvolané virovou infekcí nebo reakcí na enzymy. Protoplasty jsou získány enzymatickými roztoky, které vedou k odstranění buněčné stěny. Avšak tyto látky způsobují v protoplastových kulturách stres, který vede ke chromatinovým změnám. Chromatinové přestavby mohou být také vyvolány faktory remodelujícími chromatin ve vaječné buňce žáby Drápatky (*Xenopus*) (Grafi, 2004).

3.2.3 Dekonzace

Před vstupem do S fáze dochází u protoplastů ke dvěma fázím dekonzenzace. Tyto fáze byly zaznamenány u *C. sativus* L. (Ondřej *et al.*, 2009), *Tobacco* (Zhao *et al.*, 2001) a *Arabidopsis* (Tessadori *et al.*, 2007). V první dočasné fázi dochází k rozpoznání způsobilosti pro přepnutí buněčného osudu, které pak následuje. Za vhodných podmínek dochází k proteasom dependentní fázi, vstupu do mitotického cyklu a proliferaci. Dediferenciace zralých buněk je doprovázeno zvýšenou expresí genu pro ubiquitin, což je biochemická značka pro degradaci proteinů pomocí ubiquitin proteasomového komplexu. Dekonzace heterochromatinu protoplastů *Arabidopsis* je doprovázena rozvolněním centromerických, pericentromerických a 5S rDNA repetič a také transpozonů umístěných na chromocentrech listů (Tessadori *et al.* 2004). Je dokázáno, že v době vzniku chromocenter a kondenzace subtelomerních repetič dojde k posunu protoplastů z fáze supra G1 k S a G2/M (Ondřej *et al.*, 2009).

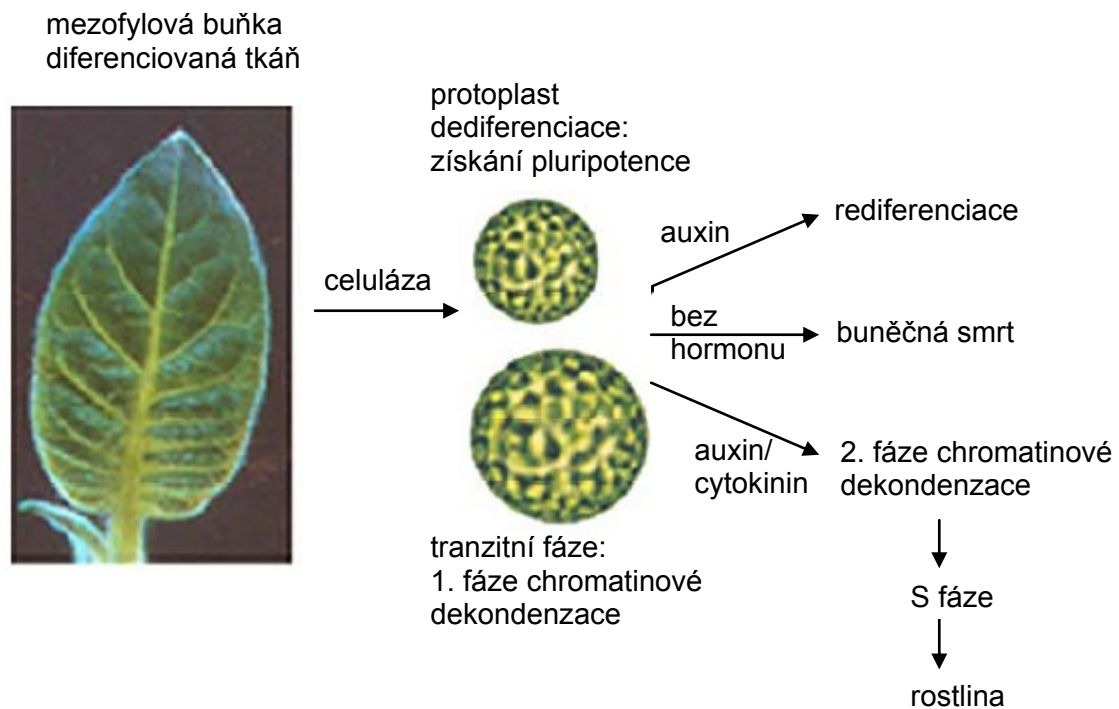
3.2.3.1 Dekonzace – 1. fáze

K této fázi odchází v průběhu izolace protoplastu a následném ošetření enzymatickými roztoky, to indukuje stresovou odpověď vedoucí ke konformačním změnám v chromatinu. V této dočasné fázi dochází k rozpoznání způsobilosti pro přepnutí buněčného osudu, které pak následuje. Protoplasty vykazovaly G0/G1 fázi buněčného cyklu. První fáze dekonzenzace se zřejmě vyskytuje u méně kondenzovaného fakultativního heterochromatinu, který se zřejmě vyskytuje v mezních oblastech mezi eu- a heterochromatinem (Zhao *et al.*, 2001).

3.2.3.2 Dekonzace – 2. fáze

Druhá fáze dekonzenzace se objevuje po indukci fytohormony, které způsobují vstoupení do buněčného cyklu. Pokud by byly homony vynechány, došlo by ke kondenzaci, následné dekonzenzaci a smrti protoplastu (Zhao *et al.*, 2001). Protoplasty inkubované 24 h obsahují buňky v G0/G1 fázi, chromatin postupně dekonzenzuje a vytváří se sub-G1 populace, které jsou typické pro apoptotické buňky. Po 48 h kultivace dosáhnou S fáze a po 72 h převažují

buňky v S a G2. Proteázový inhibitor MG132 ubiquitinového systému použitý v pokusu nemá vliv jak na přechod z S do G2 fáze, tak na výskyt první fáze dekondenzace chromatinu. To znamená, že tento ubiquitinový systém řídí protoplasty do S fáze (Zhao *et al.*, 2001). Protoplasty bez přítomnosti hormonů prochází chromatinovou kondenzací a dekondenzací a umírají (Papadakis *et al.*, 2002). Obrázek č. 1 shrnuje působení hormonů na protoplasty a jejich reakci na ně.



Obrázek č. 1: Model pro změnu buněčného osudu a jeho determinace. Upraveno dle Grafi 2004 a Zhao *et al.* 2001.

3.2.4 Rekondenzace

Soubor heterochromatinu ztrácí kompaktnost během dediferenciace. Heterochromatinová dekondenzace u protoplastů *Arabidopsis* je doprovázeno strukturálním uvolněním centromerických, pericentromerických a 5S rDNA repeticí a také transpozonů lokalizovaných na chromocentrech listů. Satelitní repetice DNA typu 1 jsou také součástí chromocenter uvnitř interfázního jádra, prochází také dekondenzací a jsou schopny indikovat chromatinové přestavby v telomerických oblastech během dediferenciace (Ondřej *et al.*, 2009). Při použití mezofylových protoplastů z *Arabidopsis* byly pozorovány změny ve velikosti a počtu chromocenter. Nejvíce dekondenzovaná oblast byla na chromozomu 4 lokusu 5S (Tessadori *et al.*, 2007). Tessadori *et al.* (2007) také pozorovali velkou míru reorganizace heterochromatinu beze změn v DNA metylaci nebo obsahu histonu HEK9me2. Výsledky ukazují, že dediferenciace je spojena s velkými změnami v heterochromatinu bohatém repetice. Tento proces je stupňovitý a repetice se rekondenzují v různém poměru. Opětovné

smotání satelitních repetitív typu 1 a chromocenter je následováno vstupem protoplastu do buněčného cyklu a změnami v expresním vzoru. V protoplastu ihned po izolaci dochází k rozvolňování a silné dekonenzaci chromatinu. Po 48 hodinách dochází ke vzniku chromocenter. Avšak podstatná část repetitív DNA satelitního typu 1 zůstává nekondenzována. To značí pomalejší obnovu chromocenter včetně následného vzniku chromocenter pomocí subtelomerních repetitív – jako jsou repetice DNA satelitního typu 1 (Ondřej *et al.*, 2009).

3.2.5 Dediferenciacie

Dediferenciované buňky procházející prochází velkými změnami jako jsou genová exprese a přepínání programu, který řídí specifické funkce. Dediferenciacie je doprovázena nárůstem genové exprese ubiquitinu, která reprezentuje kritický bod reorganizace. Ubiquitin degraduje proteiny zapojené v udržování předchozích funkcí buňky a v průvodní aktivaci proteinů, které jsou nezbytné pro buněčné dělení (Zhao *et al.*, 2001).

3.2.6 Buněčná smrt

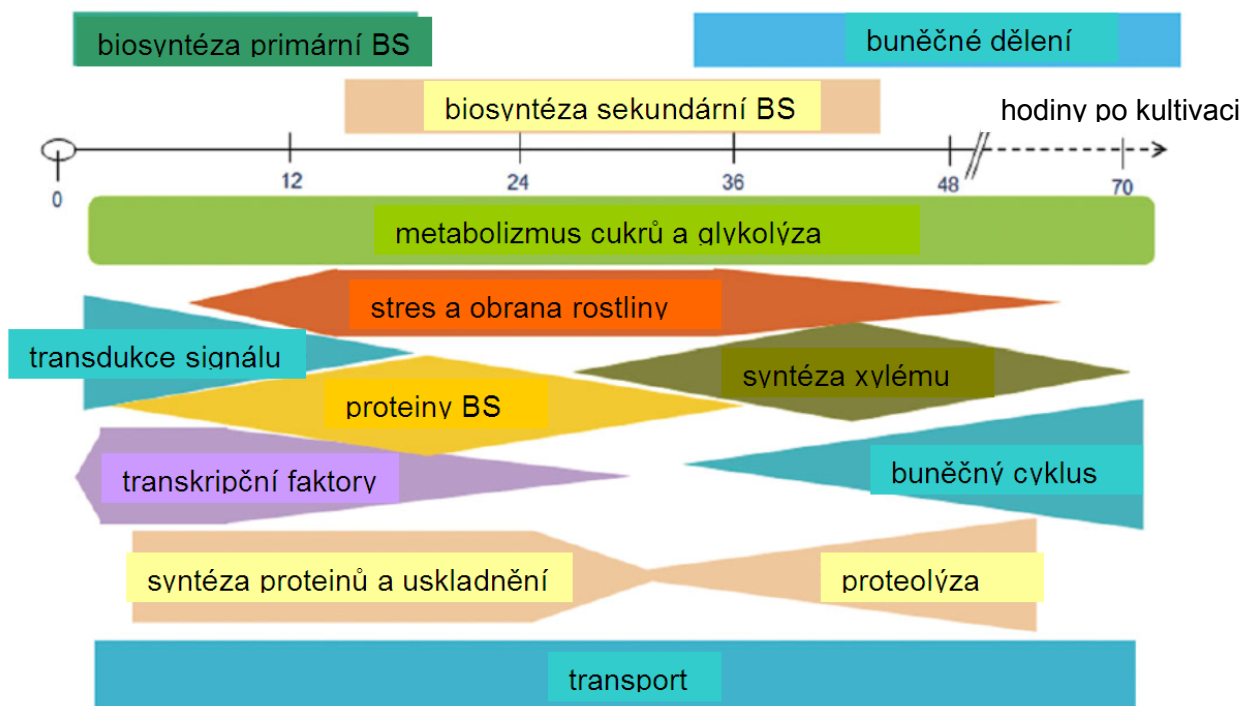
Vznik totipotence protoplastů zahrnuje dvě vývojové cesty: potlačení kaskád událostí vedoucích ke smrti a indukce buněčného dělení (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002). Buněčná smrt se vyskytuje u rostlin jako geneticky hlídáný program během vývoje a obranného mechanismu buněk. Znaky buněčné smrti jsou cytoplazmatická fragmentace, exprese odpovídajících endonukleáz a rozpad DNA (Maccarrone *et al.*, 2000).

3.3 Buněčná stěna (BS)

Buněčná stěna rostlin se skládá z polysacharidů, proteinů a aromatických látek – složení je charakteristické u každého druhu a také může být ovlivněno genetickými variacemi v druhu a stářím rostliny. Buněčná stěna je zapojena do mnoha pochodů jako jsou buněčný růst, diferenciacie nebo odpověď na abiotický stres nebo na jiný organizmus (Yang *et al.*, 2008).

3.3.1 Obnova BS v protoplastu

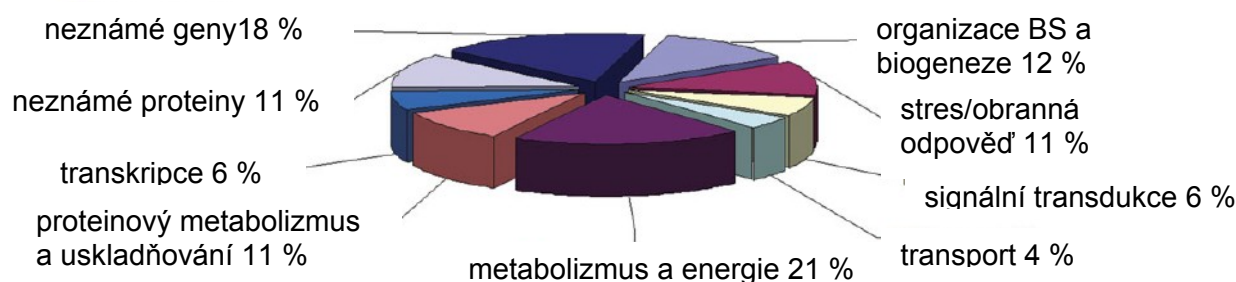
Podle Yanga *et al.* (2008) bylo provedeno pozorování zapínání genu pro celulózu a další geny zapojené do obnovy BS (obrázek č. 2). V době 0 h po izolaci protoplastu nebyla celulóza viditelná, což znamená, že BS byla naprosto degradována. V době 24 hodin došlo k expresi celulózy a u většiny buněk se zdálo, že formují nové BS. První biosyntéza BS byla zřetelná už v době 24 h, ale naprostá většina buněk prošla obnovou stěny až v době 48 h po izolaci.



Obrázek č. 2: Model regenerace buněčné stěny z protoplastů bavlníku. Upraveno dle Yang *et al.* 2008.

3.3.2 Geny zapojené do obnovy BS

Pomocí SSH knihovny protoplastů získaných v různých dobách po izolaci byly zjištěny geny zapojené do obnovy BS. 70,5 % EST (exprimovaných sekvenčních značek) je homologických ke známým genům, které patří do stejné genové rodiny. Druhá skupina 11,4 % EST vykazuje podobnost s neznámými nebo hypotetickými proteiny. Zbytek, 18,1 % EST, je neznámý. Tyto geny byly klasifikovány do funkčních skupin (obrázek č. 3). Většina genů je zapojena do metabolismu i energie a obsahuje dvě podskupiny. První obsahuje geny kódující proteiny BS jako jsou EPR1 (efektor buněčného peptidázového receptoru 1), PRPL (chloroplastový ribozomální protein), GRP (peptid uvolňující gastrin) atd., druhá skupina zahrnuje enzymy. Další geny jsou podobné genům odpovídajícím na stres: DNAJ (geny pro vytvoření proteinu sloužícího k mnoha funkcím v buňce), met-I (podjednotka transportéru DL-methioninu), Mn-SOD (hořečnatá superoxid dismutáza), apod. Další skupiny genů jsou vyznačeny na obrázku níže. Genů zapojených do regenerace BS je mnoho a zdaleka ne všechny jsou prozkoumány. Existuje i mnoho mechanismů a signálních transdukci ovlivňujících tvorbu BS u protoplastů (Yang *et al.*, 2008).



Obrázek č. 3: Funkční kategorie různě exprimovaných genů během obnovy BS z protoplastů bavlníku. Upraveno dle Yang *et al.* 2008.

3.4 Jádru buňky

Jádru buňky obsahuje a chrání genetický materiál eukaryotních buněk a je také místem mnoha klíčových procesů v buňce. Chromozomální vlákno je poskládáno tak, že jádru je rozděleno na domény, které buď podporují nebo potlačují expresi transkripce (van Driel *et Frasz*, 2004). Chromozomy zaujímají v jádru určitá místa a bylo zjištěno, že chromocentrum za tuto organizaci zodpovídá. V jádru dochází k RNA syntéze, která se objevuje ve velkém počtu domén rozptýlených po celé chromozomové oblasti. Transkripce probíhá výhradně těsně pod povrchem chromatinových domén a uvnitř těchto domén dochází buď k malé nebo žádné aktivitě exprese (Tessadori *et al.*, 2004). Chromozomy bohaté na geny jsou lokalizovány více v centru interfázního jádra. Bylo dokázáno, že jádru je na svém povrchu nerovné a může obsahovat různé rýhování, zvrásnění nebo invaginace. Invaginace se mohou protrhnout a tím byla prokázána dvojitá membrána na povrchu. Tyto modifikace podstatně zvětšují povrch a oblast v jádru. Proto se předpokládá, že mají signalizační funkci nebo koordinují transportní proces mezi cytoplazmou a jádrem (Collings *et al.*, 2000).

3.4.1 Jaderná tělíška

Několik jaderných komponent bylo rozděleno na jaderná tělíška, která jsou zřetelná jejím složením, morfologií a množstvím. PcG tělíška (tělíška s polymorfními cytokininovými geny) obsahují polycomb group proteiny a jsou umístěna na pericentromerním heterochromatinu. Tato tělíška se liší v množství a proteinovém složení. Není známo jakou přesně hrají roli – zřejmě funkci uskladňovací nebo v umlčování genů. „Nuclear speckles“ jsou rozptýleny v celé nukleoplazmě a jsou zapojeny do modifikace pre-mRNA. Dalšími jsou Cajalová tělíška, která jsou bohatá na proteiny genetického materiálu a jiné faktory zapojené v biogenezi malých jaderných ribonukleoproteinových částí (Branco *et Pombo*, 2006). Štípací tělíška jsou zapojena do štípání, a polyadenylačních kroků pre-mRNA (Spector, 2001).

3.4.2 Jadérko

Jadérko je velmi prostudovaná část buňky, která obsahuje místa aparátu důležitého pro transkripci 45S rRNA genů včetně RNA polymerázy. Chromozomy obsahující rRNA mají nukleolárně organizující regiony NOR (oblast organizující jadérko), které podporují jejich propojení s jadérkem, když jsou inaktivní (Branco *et Pombo*, 2006).

3.4.3 Jaderné laminy

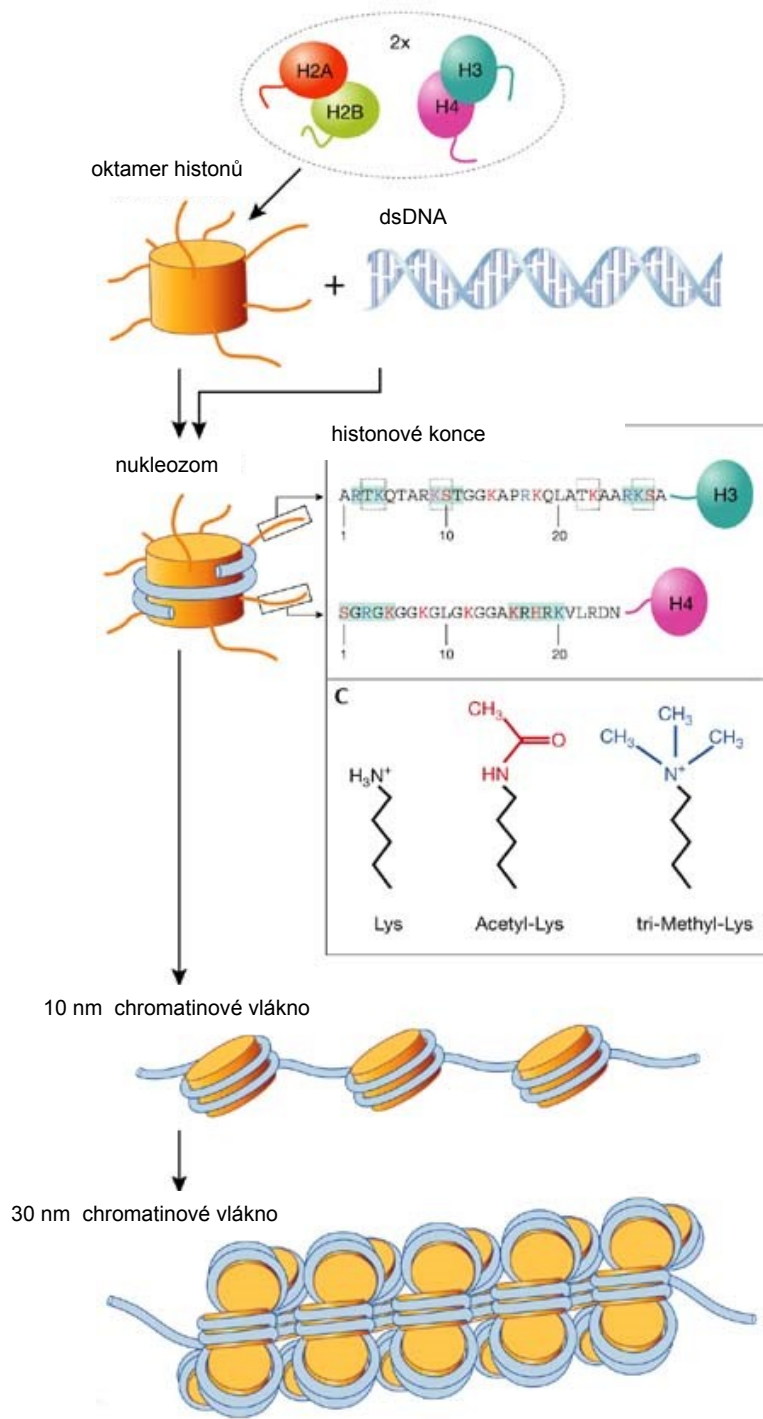
Laminy slouží k udržení jaderné velikosti i tvaru. Také mohou hrát roli v organizaci chromatinu, které zahrnují laminární ohniska spojená s místy DNA replikace (Moira *et al.*, 2000). Avšak u rostlin doposud nebyly prokázány proteiny příbuzné laminům. V nejnovější publikaci Fišerová *et al.* (2009) byla zjištěna vrstva na jaderné periferii spojená s jadernými póry. Důkaz připevnění DNA na této vrstvě nebyl zjištěn, avšak pokud existuje, bude realizováno jiným způsobem než u živočichů.

3.4.4 Chromatin

U rostlin s malým genomem obsahují chromozomy malé heterochromatinové segmenty značící pozici centromer a NOR. Genově bohatá euchromatinová ramena představují většinu chromozomu (>85%). Lineární uspořádání rostlin s větším genomem je složitější, například u pšenice nebo žita většina DNA představují tandemové repetice a transpozony (Tessadori *et al.*, 2004).

3.4.4.1 Uspořádání chromatinového vlákna

Vlákno chromatinu se skládá z deoxyribózy, fosfátu a nukleotidů (adenin, guanin, cytosin a uracil). Tento řetězec se váže s dalším antiparalelně – konec 3' s koncem 5'. Smotání začíná složením histonu H3-H4 tatrameru na DNA a následují dva histonové H2A-H2B dimery – tím vzniká oktamer s délkou 146 bp DNA a 1,7 otočky (obrázek č. 4). Jádrové histony jsou konzervované části, které obsahují doménu skládající histony. N-terminální konec je hodně variabilní a nestrukturovaný. Konce jsou posttranslačně modifikovány, to mění přístupnost k DNA a protein/protein interakce v nukleozomu. Spojující histony pojí oblast DNA mezi dvěma nukleozomy a jsou tvořeny třemi doménami. Mohou modulovat vyšší kompaktnost pomocí interakcí se sousedními nukleozomy. Po nasyntetizování histonů jsou modifikovány například acetylací. Další krok vyžaduje ATP k vytvoření rozestupu nukleozomových jader od nukleofilament. Vložení spojujících histonů je doprovázeno skládáním nukleofilament do 30nm vlákna a tvorbou solenoidu obsahujícího 6 nukleozomů na jeden závit (Ridgway *et Almouzni*, 2001).



Obrázek č. 4: Základní struktura chromatinového vlákna. Upraveno dle http://www.nature.com/embor/journal/v5/n5/fig_tab/7400146_f1.html.

3.4.4.2 Euchromatin

Euchromatin je část chromatinu, která je dekonzenzovaná. Je bohatý na geny a je transkripčně aktivní.

3.4.4.3 Heterochromatin

Heterochromatin je vysoce kondenzovaný a transkripčně inertní chromatin. Vyskytuje se u rostlin v telomerách, centromerických a pericentromerických oblastech, v oblasti organizátoru jadérka nebo v B chromozomech (Fransz *et al.*, 2000). Heterochromatin se dělí na konstitutivní, obsahující satelitní DNA převážně na centromerách, a fakultativní, inaktivní v určitých buněčných liniích, avšak v jiných liniích je aktivně exprimován (Avramova, 2002). Heterochromatin může být různě modifikován – deacetylován, acetylován, metylován, fosforylován – tyto modifikace jsou označovány jako umlčování genů a potlačují expresi těchto genů.

3.4.4.3.1 Chromocentrum

Chromocentrum se nevyskytuje jen u rostlin. Je tvořeno centromerickým a pericentromerickým heterochromatinem. Je také charakterizováno hypoacetylovanými nukleozomy, které obsahují metylace na lysinu 9 v histonech H3K9 (Driel *et al.*, 2004). Avšak obsahuje i nekódující DNA sekvence jako (peri)centromerické tandemové repetice, transpozony a inaktivované ribozomální geny. Bylo dokázáno u *Arabidopsis*, že tato chromocentra obsahují většinu hustě metylovaných sekvencí (Tessadori *et al.*, 2004). V chromocentrech se vyskytují segmenty, které jsou méně kondenzované a jsou organizovány do smyček (Tessadori *et al.*, 2007).

3.4.4.3.2 Heterochromatin jako marker protoplastové diference

Současný pokrok v oblasti cytogenetiky a genomiky rozšířil informace o strukturní organizaci rostlinného genomu v interfázním jádře a poskytl popis dynamických procesů, vzájemných vztahů mezi strukturou a funkcí v jádře. Bylo zjištěno, že dediference mezofylových buněk *C. sativus* po protoplastové izolaci, je doprovázeno dramatickou dekondukcí chromatinu. To bylo dokázáno díky absolutnímu vymizení chromocenter ve většině jader. Během izolace mezofylových buněk *Arabidopsis* došlo k podobnému poklesu ve velikosti a počtu chromocenter (Tessadori *et al.*, 2007). Tessadori *et al.* (2007) však ještě dokázali, že dochází i k dekondukcí většiny tandemových repetitivních oblastí obsažených v chromocentrech. Ondřej *et al.* (2010) využili měření relativního obsahu heterochromatinu (ROH) vzhledem k celkové ploše DNA barveného DAPI. U mezofylových buněk *C. sativus* se ROH rovnalo 5 až 20 % a bezprostředně po protoplastizaci se číslo sníží na 0-5%. Tato hodnota je ve vztahu k celkové kondenzaci heterochromatinu. Následná kultivace těchto protoplastů zasazených do média s vysokým obsahem manitolu a nižší osmolaritou se po 14 dnech změnilo ROH na 15-20%. Stádium buněk zůstalo ve fázi mikrokalusů po 4 týdnech kultivace. Avšak u protoplastů v médiu s nízkým obsahem manitolu a sníženou osmolaritou,

vykazovaly protoplasty první den kultivace ROH v rozmezí 10-15%. Tyto protoplasty byly schopné tvořit po 4 týdnech proembrya. Závěr je takový, že použití média s nízkou hodnotou osmolarity po vytvoření buněčné stěny, dojde k zabránění překondenzování chromatinu.

3.4.4.4 Modifikace základního uspořádání

Nově nasyntetizované histony jsou modifikovány – H4 histon je acetylován na Lys5 a Lys12. Během zrání vytváří ATP pravidelné rozestupy a histony jsou deacetylovány. Během prvních kroků smotání dochází k inkorporaci různě modifikované DNA a histonů – acetylace, fosforylace, metylace, ubiquitinace a poly-ADP-ribosylace – tím vznikají rozdíly ve struktuře a aktivitě. Různé vkládání spojujících histonů, MHG (protein vysoké pohyblivosti) proteinů a dalších specifických DNA-binding faktorů pomáhá skládat tento komplex. I toto skládání může být dále modifikováno. Například fosforylace H3 histonu hraje roli při kondenzaci a segregaci. Methylace na Lys9 histonu H3 způsobuje chromatinové utlumení. Také stimulační faktory ovlivňují skládání. CAF1 (faktor ovlivňující smotání chromatinu) sestavuje nukleozomy na nově syntetizované DNA během replikace a oprav. RCAF (komplex faktorů umožňující připojování nukleotidů při replikaci) podporuje nukleozomové smotání během replikace a koordinaci mezi Asf1p/H3/H4 a CAF-1. Další faktory jsou například dNLP (nukleoplazminový protein u *Drosophily*), NAP-1 (protein 1 ovlivňující vznik nukleozomu), NAP-2 (protein 2 ovlivňující vznik nukleozomu). Pohyblivé faktory a remodelující komplexy regulují DNA dostupnost a jsou kandidáty na mediátory na ATP-dependentní chromatinové zrání (např.: ACF, CHRAC, NURF, RSF) (Ridgway *et* Almouzni, 2001).

3.4.4.5 Modifikace histonových konců: epigenetický kód pro genovou regulaci

Kovalentní modifikace histonových konců na specifických zbytcích je známka epigenetické genové regulace (Tessadori *et al.*, 2004). Ta je důležitá pro mnoho funkcí jádra jako je například regulace transkripce (Grant, 2001). Chromatinová struktura je dynamicky se měnící systém. Bylo dokázáno, že pomocí posttranslační modifikace histonů je dosaženo mnoha regulačních změn.

3.4.4.5.1 Methylace

Methylace byla poprvé popsána v roce 1964 a je spojována s transkripcí. Nejčastější modifikace jsou na lysinu, který může být mono-, di- i trimetylován (Grant, 2001). U *Arabidopsis* byla popsána také methylace na H3 lysinu K4 (H3meK4) a K9 (H3meK9). H3meK4, která je spojována s aktivními geny umístěnými na euchromatinových doménách jádra. Naopak dimethylace H3K9 na heterochromatinu hraje roli v umlčování genů. Tento vzor byl nalezen i u dalších druhů, avšak tyto vzory jsou závislé na velikosti genomu a počtu umlčených rozptýlených repetitivních sekvencí (Houben *et al.*, 2003). Vztah mezi metylací

DNA a histonů se mění v závislosti na sekvenci přilehlých cytosinových zbytků. Bylo dokázáno, že metylace hlavních pericentromerických satelitních repetíci je kontrolováno pomocí SUV39h. Pericentromerický heterochromatin tedy obsahuje trimetylované H3K9, typické pro SUV39h, zatímco centromerický H3K9 je dimetylován. Závěr je tedy takový, že di- nebo trimetylace H3K9 je závislá na typu histonové metyltransferázy (Tessadori *et al.*, 2004).

3.4.4.5.2 De/acetylace

Acetylované histony jsou často spojovány s transkripčně aktivním chromatinem a deacetylované histony s inaktivním chromatinem. Acetylace je také zapojena do replikace, vzniku nukleozomu, vzniku vyšší organizace chromatinu a spojení nehistonových proteinů s nukleozomy (Grant, 2001). Histonová acetylace je však všeobecně spojena s transkripcí a DNA replikací. Například u ječmene a *Vicia faba* je acetylace lysinových zbytků 5. a 16. histonu H4 silně spojena s DNA replikací. Avšak v případě *Arabidopsis* je acetylace závislá na buněčném cyklu a byla pozorována jen u H4K16 a H3K18. Avšak acetylace byla vždy ve vztahu s euchromatinem bohatým na geny. To dokazuje, že acetylace stejných zbytků histonů u jiných organismů má jiný efekt a histonový kód je druhově specifický (van Driel *et* Franz, 2004).

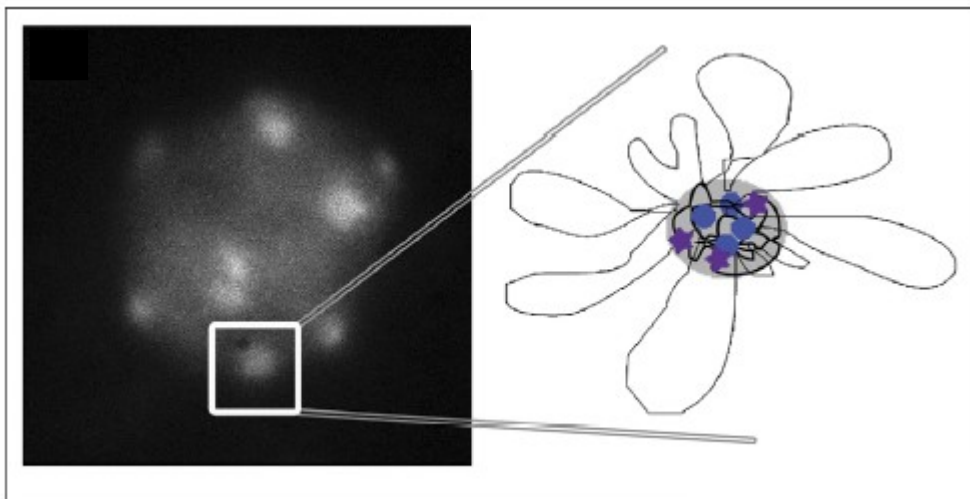
3.4.4.5.3 Fosforylace

Fosforylace se uplatňuje při transkripci, opravách DNA, apoptóze a chromozomové kondenzaci. Doposud však není podrobně znám mechanismus fosforylace. Připojení negativně nabitých fosfátových skupin na histonové konce neutralizuje jejich základní náboj a tím zřejmě redukuje jejich afinitu k DNA. Také je známo, že fosforylace H2A je spojována s kondenzací mitotických chromozomů, kde serin 10 hraje klíčovou roli. Fosforylace histonu H3 se objevuje při aktivaci signálních drah při poškození DNA (Grant, 2001).

3.4.5 Vyšší řád chromatinového uspořádání

3.4.5.1 Růžicová struktura

U rostlin s malým genomem (do 500 Mb) představuje chromocentrum organizační centrum, ze kterého vycházejí chromatinové smyčky. Chromatinová ramena obsahují lokusy, které zprostředkovávají spojení bází smyček ke chromocentru. Všechny chromozomy *Arabidopsis* obsahují jediné chromocentrum, kolem kterého se genově hutný euchromatin dekondenzuje a tvoří smyčky (obrázek č. 5). Tím se vytváří růžicová struktura. Avšak tyto struktury vznikají i u organismů se středním genomem (rajčata, myši, lidé). Podél chromozomů jsou heterochromatinové domény, které se shlukují v různých stupních (van Driel *et* Franz, 2004).



Obrázek č. 5: Heterochromatin je světlý, barveno DAPI. Růžicová struktura u malých genomů jako je například *Arabidopsis*. Střed je tvořen vysoce kondenzovanými chromocentry (šedá barva) formovanými transpozony a repeticemi (modré tečky), pericentromerickými regiony. Použito z Exner *et Henning*, 2008.

3.5 Organizace interfázních chromozomů

Umístění regulačních sekvencí genů a transkripčních faktorů ve vztahu jeden ke druhému a orientační body v jádře jsou důležité k určení transkripce. Určení chromatinové organizace během interfáze je důležité pro pochopení genové exprese. Jedna z úrovní regulace exprese je klíčová - tím je prostorová organizace faktorů a sekvencí v jádře. Každý chromozom zaujímá určitý nenáhodný prostor v jádře. V posledních letech došlo k vývoji nových modelů chromozomových organizací pro pochopení transkripčních pochodů v jádře (Branco *et Pombo*, 2006).

3.5.1 Rabl model

Vyskytuje se u rostlin s většími chromozomy obsahujícími obrovské bloky heterochromatinu, například žito nebo pšenice. Centromery se shromažďují na jedné straně nukleu, telomery na protější straně a tvoří longitudinální oblasti. Toto speciální uskupení je zřejmě způsobeno obrovskými rozměry chromozomů (van Driel *et Franz*s, 2004). Více než 70% genomu se vyskytuje v centromerní hemisféře a je velmi kondenzované, zatímco telomerní část obsahuje více dekonzenzovaný chromatin. Podle Rabl modelu velkých genomů jsou místem transkripce nejen více dekonzenzované oblasti, ale také ty více kondenzované – telomerní části. Vztah mezi chromozomálním uspořádáním a distribucí transkripčních míst může záviset na velikosti a lineární organizaci chromozomů. (Tessadori *et al.*, 2004).

3.5.2 CT-IC model (chromosome territory–interchromatin compartment)

Domény, které zřejmě rozdělují chromozomové oblasti, se nazývají interchromozomové domény ICD. Aktivní geny se vyskytují na periférii chromozomálních oblastí CT, proto aby byly přístupné pro transkripční a splicing faktory. Inaktivované geny jsou naopak umístěny uvnitř CT, čímž limitují přístup pro transkripci. Malé množství genů tvoří smyčky kolem jejich CT, což naznačuje přesun do ICD a tím se ulehčí transkripce. Transkripční místa jsou rovnoměrně rozptýlená napříč jádrem a CT. Bylo navrženo, že CT jsou rozštěpena do 1 Mbp chromatinových domén, která vytváří vlákno chromatinu nad 30 nm. ICD je síť mezer mezi chromatinovými doménami, které umožňují přístup proteinů do CT. Je navrženo, že 1Mbp domény jsou tvořeny růžicemi z malých smyček nebo z velkých o délce 3 Mbp. V tomto modelu dochází k malému mísení jako u mřížového modelu (Branco *et Pombo*, 2006).

3.5.3 Mřížový model

V tomto modelu dochází k tomu, že chromatinová vlákna jsou organizována převážně do 10 nm a 30 nm struktur s různými koncentracemi v jádře. Poté se tato vlákna skládají do struktur s vyšším řádem. Tento model se liší od CT-IC tím, že popírá kanály bez chromatinu. ICD se tedy skládají z mřížek 10 a 30 nm vláken chromatinu. Tento model je navržen tak, že vlákna z různých chromozomů jsou schopna se mísit do určité délky na okraj CT, takže vlákna tvoří téměř soustavnou mříž skrz celou nukleoplazmu. Uvažuje se, že RNA zřejmě vyplňuje mezery mezi chromatinovými doménami. Polymeráza II se vyskytuje na povrchu chromatinových vláken v celém jádře s výjimkou jadérka a heterochromatinu (Branco *et Pombo*, 2006).

3.5.4 ICN model (interchromosomal network)

V tomto modelu se objevuje další vrstva poziční regulace zahrnující chromozomální organizaci. Intrachromozomální spojení, ve smyslu chromatinového smyčkování, byl navržen jako mechanismus, díky kterému by zesilovače regulovaly geny vzdálené několik kb od nich. Byly také dokázány intra- a interchromozomální interakce napříč genomem. Stupeň genomové flexibility a dynamiky dokazuje vyšší míru míšení mezi CT. Difuze chromatinů je asi 0,4 μm , ale může být až 1,5 μm . Odhaduje se, že asi 20 % celého jaderného objemu obsahuje oblasti, které obsahují sekvence z více jak jednoho chromozomu. Oproti mřížovému modelu nebyly dokázány přímé hranice chromatinové organizace mezi vnitřní a vnější částí jádra. Absence interchromozomálních oblastí způsobuje, že se geny smyčkovují ven z jejich CT a mísí se zřejmě se sousedními CT. Polymeráza II se vyskytuje v místech míšení. Podle tohoto modelu je i zapojena lamina a jadérko, které upevňují pozici chromozomů (Branco *et Pombo*, 2006).

3.6 Oxidativní stres (OS) v protoplastových kulturách

Oxidativní stres vychází z nerovnováhy mezi tvorbou reaktivních oxidativních látek (ROS) a antioxidační schopností buněk. Tato produkce je indukována při stresu jako je salinita (Molina *et al.*, 2002), sucho, těžké kovy (Gomes-Junior *et al.*, 2006), vysoké a nízké teploty, UV nebo ozonový stres a také patogenní infekce (Sedlářová *et al.*, 2007). Produkce APX, POX (pyruvát oxidáza) a monodehydroaskorbát reduktázová aktivita se zvyšuje po izolaci. Tento stres může způsobovat rekalitranci (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.1 Reaktivní oxidativní látky (ROS)

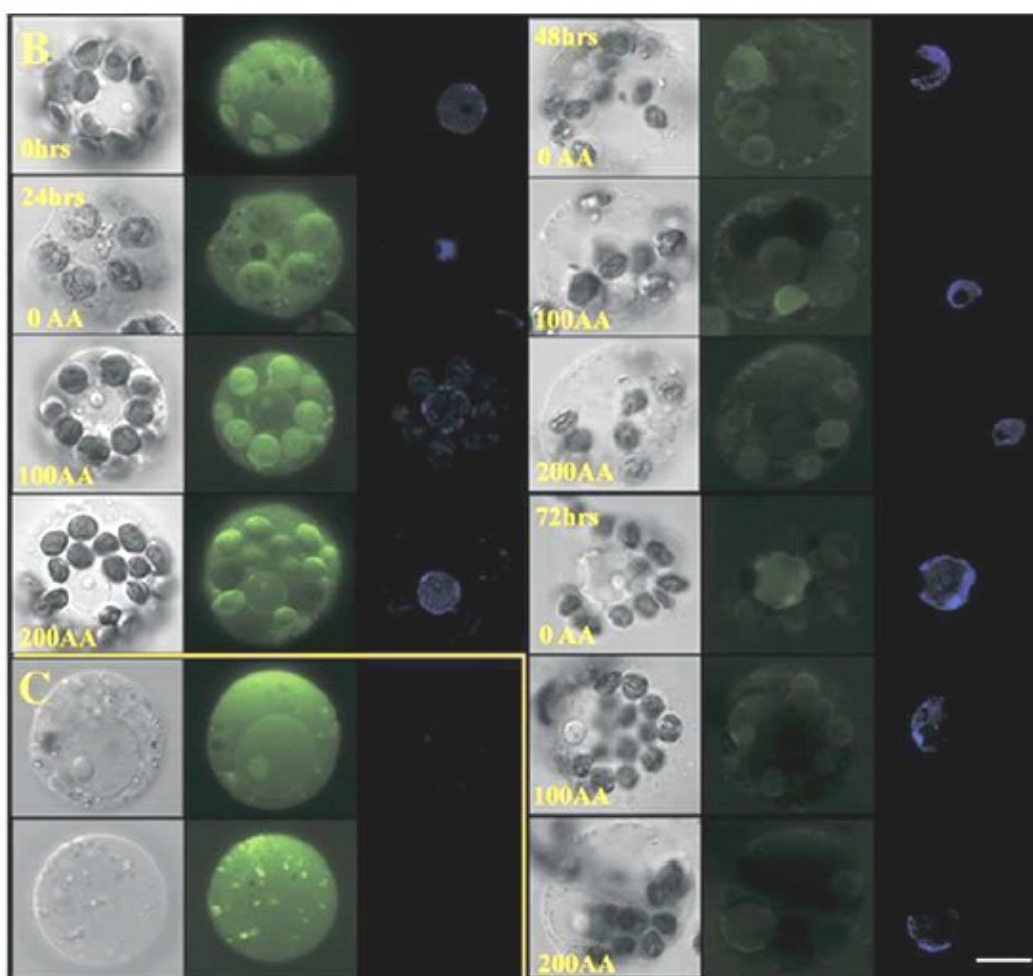
Všechny aerobní organizmy jsou absolutně závislé na redoxních reakcích a přenosu jednotlivých elektronů při životních pochodech (oxidativní dýchání, fotorespirace, fotosyntéza). Superoxidový anionový radikál $O_2^- \cdot$, peroxid vodíku H_2O_2 a hydroxylový radikál $\cdot OH$ jsou produkovány rostlinnou buňkou během normálního metabolismu (Ondřej *et al.*, 2010). ROS omezují rozšíření patogenu zesilováním buněčných stěn nebo ho zabijí přímo. Fungují jako signální molekuly při biotickém a abiotickém stresu nebo vznikají při buněčném stárnutí a smrti. ROS hrají roli jako kontrolní body při buněčném cyklu a uvolňování buněčné stěny při elongaci. ROS jsou produkovány také při enzymatické maceraci buněčných stěn během protoplastové izolace. Tyto látky oxidují lipidy, ničí nukleové kyseliny a proteiny a způsobují disfunkci buněk až jejich smrt. Rostliny se s těmito látkami vypořádají pomocí antioxidačního systému. Zde patří superoxid dismutáza, ta jako první reaguje na OS - $O_2^- \cdot$ přeměňuje na H_2O_2 , které je eliminováno peroxidázou a katalázou. Dalšími látkami jsou enzymy Haliwel-Asada cyklu jako jsou APX, glutathion reduktáza, monodehydroascorbát peroxidáza a dehydroaskorbát reduktáza (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.1.1 Tvorba ROS

Oxidativní stres, který se tvoří nerovnováhou mezi ROS a antioxidační schopností, je považován za původce rekalitrance rostlinných protoplastů. K získání protoplastů se používají enzymatické roztoky, které mohou tvořit $O_2^- \cdot$ a některé dokonce indukují smrt. Mechanizmy vzniku ROS ještě doposud nejsou plně známy. Existují 3 hypotézy. První tvrdí, že redukce O_2 na $O_2^- \cdot$ je způsobena fenolickými a NAD \cdot radikály produkovány peroxidázou a následuje formace H_2O_2 dismutázou z $O_2^- \cdot$. Druhý model naznačuje, že produkce H_2O_2 je indukována elicitorem buněčné stěny zapojeným v apoplastické peroxidáze. Komplex O_2 -hem je redukován na sloučeninu III, a tento komplex je za určitých podmínek hydrolyzován na H_2O_2 . Třetí hypotéza zahrnuje NAD(P)H oxidázu, která přenáší elektrony z cytoplazmatického NAD(P)H na O_2 a tím vznikne $O_2^- \cdot$, které je dismutováno na H_2O_2 (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.1.2 Intra- a extracelulární akumulace ROS

Papadakis popisuje pokus, při kterém byly tabákové protoplasty izolovány pomocí purifikované celulázy, která vykazovala nižší stupeň ROS a vyšší viabilitu. Naopak v nepurifikované celuláze vykazovaly více intra- a extracelulárního O_2^- a H_2O_2 , a tím pádem nižší viabilitu. Avšak pokud byla prodloužena doba macerace, došlo ke ztrátě totipotence a protoplasty se začaly chovat jako rekalcitrantní hroznové víno (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002). Například DMSO (dimethyl sulfoxid) produkuje O_2^- a pokud se přidá k regenerujícím protoplastům, dojde k zastavení regenerace. Opakem je pak reakce na askorbát (AA). Nejvyšší signály ROS buňky jsou detekovány v protoplastech izolovaných v čase 0 a 24 h. Ty se akumulují v chloroplastech, cytoplazmě, peroxizomech a také jádře (Ondřej *et al.*, 2010), jak je vidět na obrázku č. 6.



Obr. č. 6: Lokalizace a míra (zelené signály) ROS v buňce vzhledem k času a koncentraci AA. Výřez vlevo dole ukazuje protoplastovou kulturu kultivovanou bez AA a s 100 mg/l 24 a 48 hodin po izolaci. Protoplasty obsahují vysokou hladinu ROS s rozvolněným jádrem nebo bez jádra (Ondřej *et al.*, 2010).

3.6.2 Exprese genů zapojených do „Scavenging system“

Transkripce je pevně regulovaná, aby zajistila správnou expresi genů, která je vyžadována v každé fázi buněčného cyklu, stavu diferenciaci a reakce na vnější podmínky. Lineární DNA sekvence obsahuje regulační prvky, jako jsou promotory a zesilovače, které aktivují geny v závislosti na dostupnosti transkripčních faktorů. Přístupnost transkripčních faktorů a RNA polymerázy na DNA je ovlivněno mírou kondenzace chromatinu, která je regulována epigenetickými determinanty jako jsou histonové modifikace, HP1 (heterochromatinový protein) nebo PcG (polykombinací) proteiny a aktivita chromatin remodelující komplexy (Branco *et Pombo*, 2006).

3.6.3 Reakce buňky na ROS

Proces regenerace protoplastu zahrnuje obnovu buněčné stěny, prodloužení, dělení, tvoření kalusu a potažmo celé rostliny. Tyto pochody však mohou být ovlivňovány ROS (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.3.1 Obnova BS

Regenerace protoplastové kultury je závislá na reorganizaci a kontrole buněčného cyklu. Je známo, že POX ovlivňují biosyntézu ligninu, suberinu a dalších látek potřebných k tvorbě BS. Regenerující protoplasty obsahují vysokou hladinu POX. Bylo vyzkoušeno, že při přidání POX do média, roste počet regenerujících se protoplastů. Také bylo zjištěno, že molekula H₂O₂ může fungovat jako signální molekula pro diferenciaci BS (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.3.2 Dediferenciaci a buněčný cyklus (BC)

Dediferenciaci zajišťuje regeneraci tkání a také založení nových buněčných linií. BC je ovlivněn tvorbou, aktivací a následnou inaktivací cyklin-dependentních protein kináz (CDK). Pokud protoplasty rostou v médiu s hormonem ovlivňujícím dělení, exprese CDK vzroste. Například protoplasty *Petunia* vyžadují aktivitu CDK k uskutečnění G1 a G2, zatímco tabákové protoplasty tuto aktivitu vyžadují v S fázi. Většina buněk se zastaví v G1 fázi, avšak při oxidativním stresu mohou zůstat i v G2 a po stimulaci dál pokračují v cyklu. To zajišťuje buňkám zachovat energii a snížit pravděpodobnost dědičných chyb. Oxidativní stres u tabáku vede k inhibici exprese cyklinu A, aktivaci obranných genů, glutathion peroxidázy a Cu/Zn SOD (Papadakis *et Roubelakis-Angelakis*, 2002).

3.6.3.3 Vztah mezi CAT a protoplastovým dělením

Kataláza je hlavní obranný enzym proti buněčné oxidaci, která je umístěna převážně v mikrotělíscích. Katalyzuje přeměnu dvou molekul H_2O_2 na H_2O a O_2 a u rostlin se vyskytuje v různých izoformách. Kataláza se skládá z dvou podjednotek – α (57 kD) a β (55 kD). Složení podjednotek se časově liší – α podjednotka převažuje a šestý den dochází k vyšší expresi β podjednotky, ale dojde ke snížení enzymově specifické aktivity. Siminis *et al.* (1994) došli k závěru, že syntéza katalázy je spojena s protoplastovým dělením. Nedělící se protoplasty s vyšší viabilitou vykazují vyšší stupeň katalázové aktivity (Siminis *et al.*, 1994).

3.6.3.4 Apoptóza

Apoptóza je programovaná buněčná smrt a je to hypersenzitivní odpověď (HO) buňky. Při této HO dochází k uvolnění antimikrobiálních molekul, které zajistí smrt patogenu, ale i samotné buňky. Lipoxygenázová (LOX) cesta je zapojena do odpovědi na abiotický stres a rozvoj HO. Působením H_2O_2 na protoplasty došlo k DNA fragmentaci a žebříkovité formaci typické pro apoptózu. Fragmentace DNA je u rostlin pozorována při klíčení po vystavení stresu solí nebo chladu. První fáze apoptózy indukované H_2O_2 je charakterizovaná zesílenou LOX aktivitou, která dopovídá za upregulaci genové exprese na transkripční a posttranskripční úrovni. LOX způsobuje na membráně tvorbu hydroperoxidů. Tato změna může být původcem přeprogramování protoplastu na program buněčné smrti. Existují však inhibitory LOX na fragmentaci DNA: NDGA, ETYA a PA, které vylučují radikály. Po přidání do média s protoplasty nedochází k apoptóze (Maccarrone *et al.*, 2000).

3.6.4 „Scavenging system“ a jeho látky

Je to systém, který je schopen se vypořádat s ROS v buněčných tkáních a je schopen je eliminovat, aby nedošlo k poškození rostlinných tkání. Například peroxid vodíku je z buňky odstraňován katalázou v mikrotělíscích, mitochondriích a různými izoenzymy askorbát peroxidázy v chloroplastech, cytoplazmě, peroxizomálních membránách a mitochondriích. Glutathion peroxidáza hraje roli při ostraňování ROS z rostlinných tkání a udržuje normální buněčný metabolismus. CAT má vysokou afinitu k H_2O_2 , avšak není přítomna v cytoplazmě ani chloroplastech. Další je ascorbate-dependentní guaiacol-tyl peroxidáza, která se vyskytuje v pH neutrálních buněčných kompartmentech. Askorbát je schopen redukovat neenzymaticky volné radikály a dokáže předcházet polymerizaci buněčné stěny pomocí odstraňování meziproductů fenylových radikálů. To znamená, že redoxní stav musí regulovat míru regeneračního potenciálu při obnově stěny protoplastu (de Marco, 1997).

3.6.5 Askorbátový cyklus

Bylo zjištěno, že koordinovaná exprese různých enzymů zapojených do recyklování askorbátu je rozhodující v kontrole OS v rostlinných tkáních a jsou nezbytné pro dostatečné ostraňování ROS. De Marco popisuje, že médium obohacené o askorbát snižuje oxidativní stres a tím stimuluje protoplastovou regeneraci, to potvrdil i Ondřej *et al.* (2010). Avšak askorbát zpomaluje polymerizaci buněčné stěny, což znamená, že pokud je v médiu velké množství kyseliny askorbové (AA), dochází k inhibici protoplastové regenerace. Také bylo dokázáno, že protoplasty, které rostly na světle, vykazovaly větší množství izoenzymů APX a také vyšší neenzymatickou oxidaci askorbátu než ty, které rostly ve tmě. To znamená, že izolace a světlo jakožto další faktory způsobující vyšší efektivitu odstraňování ROS. Závěr je takový, že protoplasty mají specifický detoxifikační metabolismus založený na specifické indukci enzymů a izoforem, které zajišťují vhodné řešení pro odstraňování ROS. Ty se kumulují v jiných buněčných kompartmentech (Ondřej *et al.*, 2010).

3.6.6 Rekondenzační stupeň je limitován oxidativním stresem

Oxidativní stres je zodpovědný za buněčnou smrt protoplastů stejně jako odpověď na hypersenzitivní podráždění patogenů. Chromatin a rekondenzace jsou ovlivňovány stupněm oxidativního stresu a také reakcí antioxidantního systému. Rozsah poškození způsobeného ROS závisí na efektivitě antioxidantního systému, který zahrnuje nízkomolekulární látky jako jsou askorbát, glutathion a karotenoidy a také některé antioxidantní enzymy - askorbát peroxidáza, glutathion reductáza, kataláza a superoxid dismutáza. Použitím kyseliny askorbové se tedy snižuje stupeň ROS v protoplastech během kultivace a poté následuje reaktivace APX a CAT. Redukovaná forma kyseliny askorbové je vyžadována pro buněčné dělení a pro podporu postupu buněčného cyklu. Přidáním askorbátu také dochází k vyšší proliferaci buněk. Největší rekondenzační stupeň se objevuje při nejvyšší hladině ROS. Dekondenzace je spojena s reprogramováním buňky a dediferenciací. Avšak dekonzenzace chromatinu nemění expresní profil protoplastu. Regulace exprese je tedy spojena s geny zapojenými do obnovy buněčné stěny a buněčného cyklu. Při velkém stupni rekondenzace může docházet k poškození chromatinu ROS jako odpověď na degradaci buněčné stěny nebo na látky obsažené v enzymatickém roztoku pro rozpuštění této stěny. Smotání chromocenter a určitá dávka antioxidantů mohou podpořit znovuvstoupení do buněčného cyklu a zvýšit proliferaci (Ondřej *et al.*, 2010).

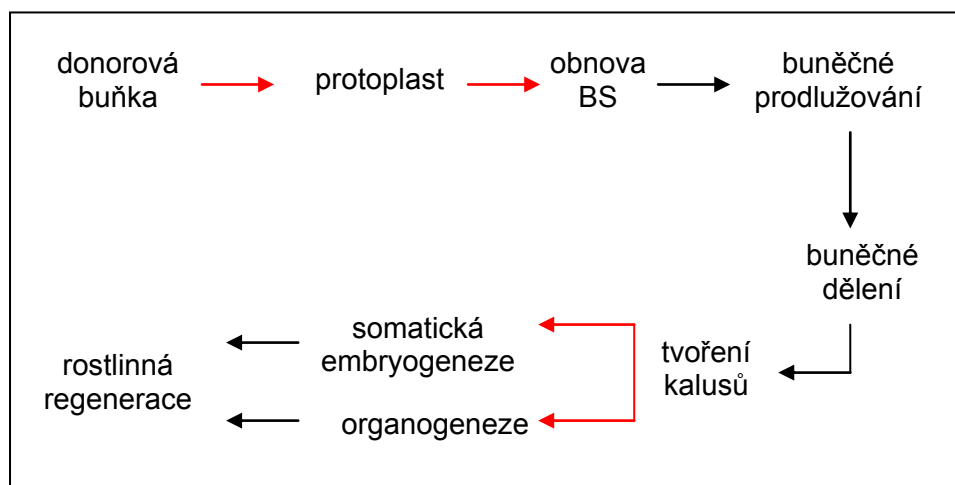
3.6.7 Vliv askorbátu a dehydroaskorbátu na buněčný cyklus

Antioxidantní látky jsou schopny ovlivnit buněčný cyklus. Už dříve bylo dokázáno, že dehydroaskorbát DHA (kyselina dokosaheptaenová) ovlivňuje zkracování G1 fáze nebo

stupeň buněčné proliferace u kukuřice a míra DHA je kontrolována expresí AA-oxidázou. To znamená, že snížení DHA může hrát roli jako nezbytný a pozitivní signál pro buňku pro postup do S fáze. DHA také hraje roli jako spojka mezi apoplastem a cytoplazmou. Protože AA je hlavní antioxidant v apoplastu, funguje zřejmě jako signální molekula stresového prostředí okolo rostliny. Působením DHA na buňky tabáku bylo dosaženo podobných odpovědí jako u buněk vystavených stresu. Došlo k zastavení buněčného cyklu a buňka poté vstoupí do nového cyklu, až po zlepšení okolních podmínek. Toto zastavení je zřejmě způsobeno destabilizací redoxní rovnováhy. Délka zpomalení cyklu je přímo úměrná času ke spotřebě DHA a tedy jeho redukci (Potters *et al.*, 2000).

3.6.8 Rostliny s rekalcitrancí

U protoplastů těchto rostlin dochází s časem k úbytku morfogenetické a totipotentní schopnosti, dochází tedy ke stárnutí tkání (Benson, 2000). Hlavní důvod rekalcitrance je genetická predispozice. Mezi tyto rostliny patří *Vitis vinifera*, některé druhy brambor, *Daucus carota*... Siminis *et al.* (1993) dokázal, že protoplasty těchto rostlin neexprimují peroxidázu. Tyto kultury jsou také charakterizovány vysokou lipidovou peroxidací a sníženou aktivitou SOD, což vede k extrémnímu stupni ROS. Rekalcitrantní protoplasty vykazují také nízký redoxní stav askorbátu a glutathionu, cytosolická superoxid dizmutáza se neexprimovala a MDHAR (monodehydroaskorbátperoxidáza), DHAR (dehydroaskorbát peroxidáza) a GR (glutathion reduktáza) aktivita byla mírná a poklesla během kultivace. Proto dochází k nekrotám a eventuálně ke smrti (Siminis *et al.*, 1993). V obrázku č. 7 jsou uvedena místa možného vzniku rekalcitrance.



Obr. č. 7: Fáze buněčné regenerace z protoplastu. Červené šipky ukazují pravděpodobná místa, kde může být exprimována rekalcitrance. Modifikováno dle Papadakis *et al.*, 2002.

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Semena *Cucumis sativus* L. (odrůda 439-0121 Marketer, SEMO Ltd., Smržice, Česká republika)

4.2 Seznam použitých roztoků a médií

20% sacharóza: 200 g sacharózy; 1 l destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním.

CTAB: 10 g polyvinylpyrrolidonu, 20 g cetyltrimethylamonium bromidu, 1 litr destilované vody.

Enzymatický roztok PGly: 0,5 g celulózy Onozuka (Duchefa biochemie); 0,15 g macerozymu R-10 (Duchefa biochemie); 50 ml PGly, pH 5,8; sterilizováno filtrací.

PGly: 0,000025 g $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$; 0,00016 g KI; 0,0272 g KH_2PO_4 ; 0,101 g KNO_3 ; 0,246 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$; 0,5857 g MES; 1,1176 g CaCl_2 ; 11,15 g glycinu; 18,016 g glukózy; 65,58 g manitolu; 1 litr destilované vody; pH = 5,8; sterilizováno filtrací.

OK médium: 0,1 mg IBA; 0,1 mg BAP; 4,405 g Murashige a Skoog média (Duchefa Biochemie); 8 g agaru; 20 g sacharózy; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno autoklávováním (Ondřej et Navrátilová, 2000).

Ostatní chemikálie: 70% etanol; fluorescein acetát; 2,5% chloramin; 3 M octan sodný; sterilní H_2O ; chloroform:izoamylalkohol (poměr 24:1); merkaptoetanol; izopropanol; tekutý dusík; Loading Dye Blue/orange 6x (Promega).

LCM1 médium: 0,0005 g BAP; 0,0005 g 2,4-D; 0,001 g NAA; 0,002 g kyseliny askorbové; 0,004 g alaninu; 0,008 g glycinu; 0,02 g glutaminu; 0,02 g prolinu; 0,1 g kasein hydrolysat; 0,586 g morfolinethansulfonové kyseliny (MES); Gamborg B5 médium (Duchefa); 0,9 g inositolu; 5 g glukózy; 10 g sacharózy; 70 g manitolu; 1 litr destilované vody; pH 5,8; sterilizováno filtrací (Debeaujon et Branchard, 1992).

Komerční kity: Spectrum Plant Total RNA Kit (Roche, Německo), Biotin-Nick Translation Mix (Roche, Německo), RNase – free DNase (Promega, USA), Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, USA).

4.3 Vybavení laboratoře

Chlazená centrifuga 5804 R (Eppendorf), centrifuga 5415D (Eppendorf), Light cycler, cytologická centrifuga, XP cycler (Bioer), Transluminátor UVT-20M (Herolab) s digitálním fotoaparátem Kodak 290, fluorescenční mikroskop (Olympus BX 60) s CCD kamerou (Cool

Snap, Photometrics), světelný mikroskop, biologický termostat BT120, autokláv, laminární box, digestoř, elektroforetická aparatura, mikrovlnná trouba, vodní lázeň, termoblok, mraznička, lednička, analytické váhy, váhy, magnetické míchadlo, pH metr, Pasteurovy pipety, Petriho misky, parafilm, mikrozkušavky, PCR mikrozkušavky, dávkovací mikropipety, sterilní špičky, uhelónové sítko, stříkačka, centrifugační zkumavky, ochranné rukavice, kahan, skalpel, pinzeta, ledová tříšť, podložní a krycí skla, kyvety na Light Cycler.

4.4 Pěstování rostlin

Semínka *Cucumis Sativus* L. (cv. Marketer, SEMO Smržice Ltd., 439-0121, CZ) byla vysterilizována v 1 min ve stříkačce se 70% etanolem, poté 30 min v chloraminu. Nakonec byla vysázena na Petriho misky na vlhký filtrační papír. Po naklíčení (5 dní v inkubátoru a teplotě 25 °C ve tmě) byla semínka přesazena do plastových boxů s OK médiem. Ty byly umístěny do růstové místnosti s režimem 16 hodin světlo/ 8 hodin tma o světelné intenzitě 32 až 36 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ s teplotou 22 °C na 14 dní.

4.5 Izolace a kultivace protoplastů

Apikální listy byly uříznuty skalpelem ve sterilním prostředí a poté nařezány v 1% enzymatickém roztoku celulózy Onozuky R-10 v promývacím roztoku PGly. Poté byly přeneseny na 18 hodin do termostatu při teplotě 27 °C. Získaná protoplastová suspenze je protlačena přes uhelónové sítko 72 μm a promyta 2 ml PGly. Poté je směs přenesena do centrifugační zkumavky a následuje centrifugování 5 min při 800 ot/min. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován ve 4 ml 20% sacharózy a opatrně převrstven 2 ml PGly tak, aby nedošlo ke smíchání obou vrstev a zcentrifugováno na 5 min při 800 ot/min. Na rozhraní kapalin se objeví flotující protoplasty, které jsou odebrány do další centrifugační zkumavky se 4 ml PGly. Následuje centrifugace 5 min při 800 ot/min. Dále byly protoplasty kultivovány dvěma způsoby.

4.5.1 Kultivace v LCM1 médiu

Protoplasty v čase 0 hod nejsou přeneseny do LCM1 média, ale ihned je izolována RNA. Supernatant byl odstraněn a sediment resuspendován v 2 ml LCM1 média a tato směs přenesena do Petriho misek. Ty byly utěsněny parafilmem a umístěny do inkubátoru při 25 °C a tmě. Po dvou dnech byly přemístěny do růstové místnosti den/noc s poměrem 16/8 h.

4.5.2 Stanovení životnosti protoplastů

Životnost protoplastů se provádí pomocí fluorescein diacetátu. K suspenzi protoplastů v LCM1 médiu je přidáno 10 µl fluorescein diacetátu a zbarvení je detekováno pod fluorescenčním mikroskopem Olympus BX 60.

4.6 Provedení FISH

4.6.1 Příprava sondy SAT 1

Sonda byla připravena PCR amplifikací satelitní repeticity typu I *Cucumis sativus* L. (GenBank access. No. X03769) a pomocí navržených primerů: forward primer 5'-CTG GGT GGC CTC ATT TTG-3' a reverse primer 5'-GAC CTT TGG CAC CGT TGT-3'. Reakční směs a doby působení PCR reakce jsou popsány v tabulce č. 5 a 6.

Tabulka č. 5: Složení mixu pro PCR na přípravu SAT 1 sondy.

<i>reakční složky</i>	<i>objemy</i>
FastStart PCR master mix	25 µl
forward primer (c = 0,3 µM)	0,5 µl
reverse primer (c = 0,3 µM)	0,5 µl
sterilní destilovaná voda	23,5 µl
genomická DNA o koncentraci 200 ng/µl	0,5 µl
celkový reakční objem	50 µl

Tabulka č. 6: Časové a teplotní nastavení PCR reakce pro přípravu SAT 1.

1 cyklus	počáteční denaturace	95 °C	4 min
35 cyklů	denaturace	95 °C	30 s
	hybridizace primerů (annealing)	55 °C	45 s
	prodlužování primerů (extension)	72 °C	45 s
1 cyklus	konečné prodloužení primerů	72 °C	7 min

Získaný produkt byl kitem označen biotinem a další složky byly nepipetovány podle tabulky č. 7.

Tabulka č. 7: Složení NICK-translačního mixu pro přípravu SAT 1.

<i>reakční složky</i>	<i>objemy</i>
1 µg amplifikované DNA	5 µl
NICK kit	4 µl
sterilní destilovaná voda	11 µl

Směs v mikrozkuhavce byla umístěna do termocykléru s teplotou 15 °C na dobu 90 minut a poté bylo přidáno 0,5 µl EDTA z důvodu zastavení štípání vzorku DNA. Poté byla směs zahřáta na 65 °C a 10 min. Tento vzorek byl vysrážen octanem sodným pomocí octanu sodného o koncentraci 0,3 M. Nakonec byl k tomuto objemu přidán dvojnásobný objem 96% etanolu a po dobu 30 minut umístěno do mrazáku s teplotou -20 °C. Nakonec byl vzorek

centrifugován v chlazené centrifuze při 4 °C, 11000 ot./min na 30 min. Supernatant byl odstraněn a pelet zalit formamidem s pH = 7 na konečnou koncentraci sondy 50 ng/μl.

4.6.2 Provedení FISH

Protoplasty kultivované 24 hodin byly zafixovány roztokem ethanol:kyselina octová v poměru 3:1. Poté byly protoplasty nakapány pasteuovou pipetou na vymražené podložní sklíčko a směs byla vysušena. Toto sklíčko bylo inkubováno v digestoři, doba působení a látky jsou popsány v tabulce č. 8.

Tabulka č. 8: Inkubace protoplastů před hybridizací sondy.

<i>reakční složky</i>	<i>doba působení</i>
0,1 M HCl	1 min
triton	8 min
1x PBS	5 min
1x PBS	5 min
1x PBS	5 min
50% formamid, pH = 7	30 min

Ke 4 μl získané sondy o koncentraci 50 ng/μl byl přidán 1 μl formamidu a doplněno 5 μl mastermixu. Materní mix je tvořen 20% dextransulfátem a 2x SSC. Termoblok byl nastaven na 80°C, sondy byly denaturovány 10 min a ihned umístěny na led. To zabrání renaturaci. Na sklíčko s protoplasty bylo nepipetováno 10 μl denaturované sondy a vše bylo překryto krycím sklíčkem. Pro uchování vzorku bylo sklíčko oblepeno lepidlem. Poté bylo umístěno do termocykléru po dobu 90 s na 78 °C. Sklíčko bylo inkubováno přes noc při 37 °C.

Následující den bylo podložní sklo inkubováno ve vodní lázni při 45 °C 15 min v 50% formamidu, poté dvakrát v 2x SSC po pěti minutách. Po této inkubaci bylo na sklo nepipetováno 300 μl 5% FBS z důvodu blokování nespecifických vazebných míst, aby nedošlo ke zkreslení výsledků. Poté byla směs nechána 30 min při pokojové teplotě. Do další mikroskopické komory bylo napipetováno 100 μl 5% FBS a 0,5 μl protilátky označené fluorescenční značkou. Tyto látky bylo nutné uchovat mimo dosah světla z důvodu vysvícení fluorochromových značek. Látky byly nanášeny na podložní sklo s protoplasty a inkubovány 1 hod ve tmě za pokojové teploty. Po této době bylo sklo propláchnuto třikrát v 2x SSC.

Aby došlo ke zviditelnění chromatinu, bylo na vzorek nepipetováno 1,5 μl roztoku DAPI v mounting médiu Vectashield (Vector Laboratories) o koncentraci 2 mg/ml.

4.6.3 Detekce sondy

Snímky hybridizovaných protoplastů pomocí sondy byly pořízeny CCD kamerou spojenou s fluorescenčním mikroskopem Olympus BX60. Zobrazeny byly pomocí programu Cool Snap (Photometrics) a konečná úprava byla provedena v programu Image J.

4.7 Detekce genů zapojených do OS

4.7.1 Izolace DNA z listu

Pomocí třecí misky s tloučkem a tekutého dusíku je rozetřeno 200 mg listu *Cucumis sativus* L. Do třecí misky byl napipetován 1 ml CTAB s 2 μ l 2-merkapt ethanolu o teplotě 65 °C. Tato směs byla napipetována do 2 ml mikrozkušky a inkubována 1,5 hodin při 65 °C v termobloku. K roztoku bylo přidáno 600 μ l směsi chloroform : izoamylalkohol 24:1 a poté bylo vše promícháno a zcentrifugováno v chlazené centrifuzě při 4 °C a 11000 ot/min na 15 min. Tato centrifugace byla ještě jednou provedena se supernatantem. Poté se přidalo 60 μ l 3M octanu sodného a 500 μ l izopropanolu o teplotě -20 °C. Poté je vše promícháno a vloženo na noc do mrazáku při -20 °C. Vzorek je promíchán a zcentrifugován 30 s při teplotě 11000 ot/s a 4°C. Supernatant je vylit a pelet je rozpipetován 200 μ l 70 % etanolem. Směs je centrifugována 15 min při 11000 ot/s a 4 °C. Supernatant je slit a získaná DNA se nechá 3 min sušit a poté se přidá sterilní H₂O. Tento vzorek se uchovává na kratší dobu při -20 °C nebo na delší časový úsek při -80 °C.

4.7.2 Izolace RNA z protoplastu a listu

Protoplasty získané v čase 0, 24, 48 a 72 h a listu jsou použity jako materiál pro izolaci RNA. Je připraven mix smícháním 10 μ l 2-merkapt ethanolu na každý 1 ml Lysis Solution. List se rozdrťí v třecí misce pomocí tekutého dusíku a tloučku. K protoplastům v eppendorfkách a listu je přidán mix po 0,5 ml. Směs je vortexována 30 s a poté inkubována při 56 °C na 3 min. Supernatant se přenesse na filtrační kolonu v 2 ml Collection Tube a následuje centrifugace při 12000 ot/min po dobu 3 min. Do roztoku, který protekl kolonou je přidáno 750 μ l Binding Solution a vše je promícháno. 700 μ l je odebráno na další kolonu Collection Column a minutu se nechá stát. Následuje centrifugace 1 min 13000 ot/min. Vše, co proteklo se vždy vylévá. Na kolonu se napipetuje 500 μ l Wash Solution a dá se na 1 min a 12000 ot/ min centrifugovat. 500 μ l Wash Solution je nadvakrát přidáno na kolonu a centrifugováno avšak jen na 30 s. Eppendorfka s kolonou je nasucho centrifugována 1 min a 12000 ot/min. Poté je kolona vložena do nové eppendorfky a je přidáno na kolonu 50 μ l Elute solution, 1 min se nechá stát. Poté následuje centrifugace 1 min a 12000 ot/min a zamrazení na -70 °C pro uchování RNA.

4.7.3 Odstranění DNA z RNA

K 8 μ l vzorku s RNA je přidán 1 μ l DNase Buffer a 1 μ l DNase. Vzorky jsou vloženy do termobloku na 30 min nahřátého na 37 °C. Poté je přidáno 1 μ l Stop Solution a vše je zahřáto na 65 °C po dobu 10 min.

4.7.4 Přepis RNA do cDNA

Pro přepis se používá Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit. Smícháním 8 µl RNA, 1 µl Anchored-oligo (dT)₁₈ Primeru a 2,4 µl Water PCR-grade vznikne směs, která je zahřívána na 65 °C po dobu 10 min, tím se zajistí denaturace sekundární struktury RNA. A ihned se směs chladí na ledě. Poté se přidá 4 µl Transcriptor High Fidelity Reverse, 0,5 µl Protector RNase Inhibitor; 2 µl Deoxynucleotide Mix; 1 µl DTT; 1,1 µl Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase a vše se zahřeje po dobu 30 min a 45 °C. Směs se dále zahřívá 5 min na 85 °C kvůli inaktivaci Transcriptor High Fidelity Reverse Transcriptase, pak se ihned vloží do ledu.

4.7.5 RT PCR

Vzorky s DNA, získaných z protoplastů v čase 0, 24, 48, 72 h a z listu, jsou zředěny na koncentraci 200 ng/µl. Složení mixu pro RT PCR je uvedeno v tabulce č. 5. Poté je celá směs napipetována do kapilár určených pro Light cycler a program je nastaven na režim pro peroxidázu (tabulka č. 6). Aktin je zde použit jako pozitivní kontrola.

Tabulka č. 4: Forward a reverse primery použité při realtime PCR.

<i>kataláza CAT access No. D63385</i>	CAT1	5'-TTG ACG ATA TTG GCA TCC-3'
	CAT2	5'-TAG CAT CTT CCT CCA GCA-3'
<i>askorbát peroxidáza APX access No. D88649</i>	AsP1	5'-CTC TGG TGG TCA CAC ATT GG-3'
	AsP2	5'-CCT CAT CGG CAG CAT ATT TT-3'
<i>glutathion peroxidáza GIP access No. FJ036896</i>	GIP1	5'-CAG CGC TTA CAA AGC AAA GG-3'
	GIP2	5'-GTG CAA GCA AAC TGC ACA AT-3'
<i>aktin ACT access No. AB010922</i>	ACT1	5'-GAGTCACACTGTTCCCATCT-3'
	ACT2	5'-CTTTGCAGTCTCGAGTTCTT-3'

Tabulka č. 5: Složení RT PCR mixu pro AsP, CAT a GIP.

<i>reakční složky</i>	<i>objemy</i>
master mix	4 µl
forward primer o c = 0,25 µM	1 µl
reverse primer o c = 0,25 µM	1 µl
destilovaná sterilní voda	9 µl
genomická DNA	5 µl

Tabulka č. 6: Průběh režimu Light cycleru pro peroxidázu.

<i>počet cyklů</i>	<i>název</i>	<i>teplota</i>	<i>doba</i>
1	preinkubace	95 °C	10 min
35	denaturace	95 °C	10 s
	hybridizace primerů	50 °C	30 s
	prodlužování primerů	72 °C	20 s
1	melting křivka	95 °C → 65 °C	1 min

4.7.6 Získání výsledků RT PCR

Výsledky jsou získány pomocí LightCycler software 4.1 určeného pro obsluhu Light cycleru, XP cycler (Bioer). Hodnoty exprese pro GIP, CAT a APX získané z protoplastů v době 0, 24, 48 a 72 h po izolaci jsou porovnány s hodnotami pro list.

4.8 PCR a elektroforéza

Pro potvrzení výsledků získaných pomocí RT PCR je použito techniky PCR. Mix pro PCR je uveden v tabulce č. 7 a cykly PCR v tabulce č. 8. Poté je 6 µl vzorku smícháno s µl barvičky Loading Dye Blue/orange a vše je napipetováno do jamek 1% agarózového gelu s 2 µl EtBr v TBE pufru v elektroforéze.

Tabulka č. 7: Mix pro PCR.

<i>reakční složky</i>	<i>objemy</i>
DNA	4 µl
forward primer o c = 0,25 µM	0,5 µl
reverse primer o c = 0,25 µM	0,5 µl
destilovaná voda pro PCR	5 µl
mastermix	10 µl

Tabulka č. 8: Průběh programu pro PCR.

<i>počet cyklů</i>	<i>název</i>	<i>teplota</i>	<i>doba</i>
1	preinkubace	95 °C	4 min
30	denaturace	95 °C	30 s
	hybridizace primerů	50 °C	30 s
	prodlužování primerů	72 °C	45 s
1	melting křivka	72 °C → 10 °C	7 min

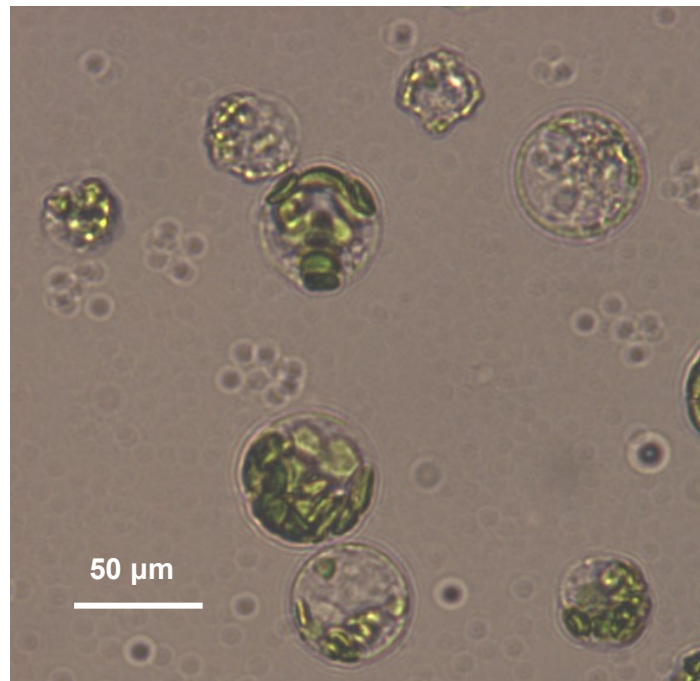
5 Výsledky

Protoplasty byly získány ze 2 týdních zelených listů *C. sativus* vypěstovaných ze semínek in vitro v místnosti s režimem světlo 16 h a tma 8 h.



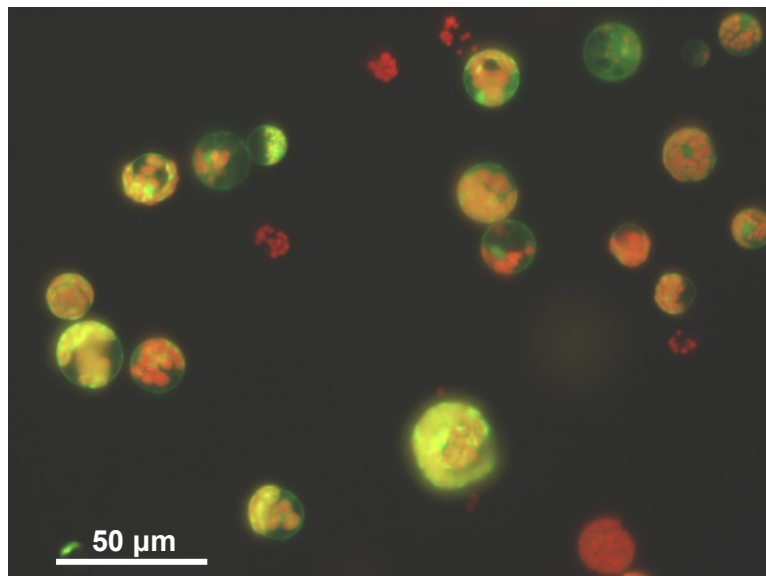
Obrázek č. 8: Pěstování mladých rostlin *C. sativus* v kultivační místnosti.

Získané protoplasty nevykazovaly dělení ani po 72 h. Za tuto dobu ještě nebylo možné dosáhnout replikačních pochodů. Izolace protoplastů byla z neznámých důvodů kontaminována, protoplasty často hnily a nebylo možné z nich získat RNA. Na obrázku č. 9 lze kromě protoplastů pozorovat neznámá tělíška, zřejmě bakterie.



Obrázek č. 9: Izolované protoplasty v čase 0 h a bakterie v okolí.

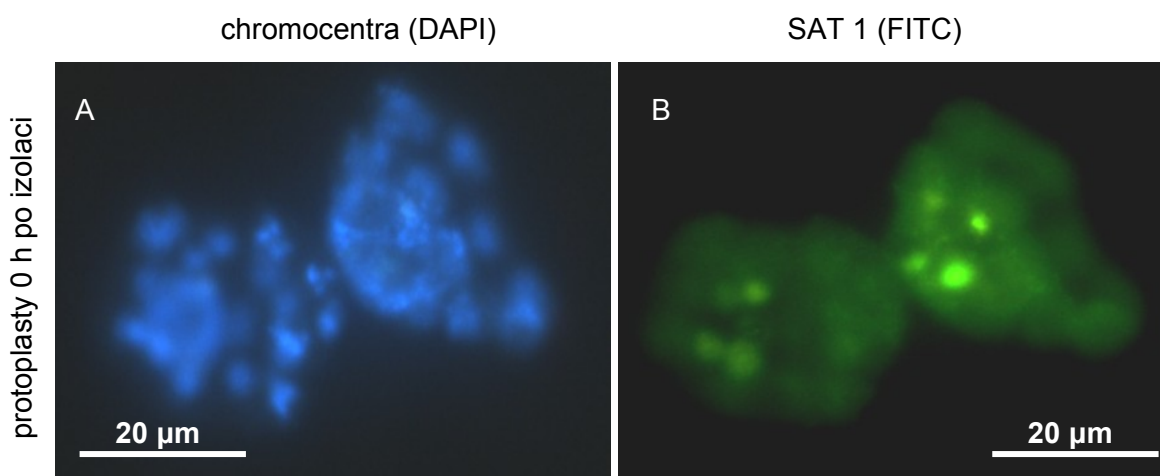
Pro zjištění životnosti protoplastů bylo využito techniky pomocí fluorescein diacetátu, který se v živých buňkách po použití fluorescenčního mikroskopu jeví jako zelený.



Obrázek č. 10: Stanovení životnosti protoplastů. Zelené protoplasty jsou živé a červené mrtvé.

5.1 Provedení FISH

Pomocí techniky FISH byly získány snímky protoplastů, ve kterých docházelo ke chromatinovým přestavbám. Po izolaci protoplastů dochází k vymizení chromocenter (A), která se později začnou kondenzovat. Dochází také k rekondenzaci satelitní repetice SAT 1 (B).



Obrázek č. 11: Chromatinové přestavby chromocenter a SAT 1 spojovaných s dekondenzací.

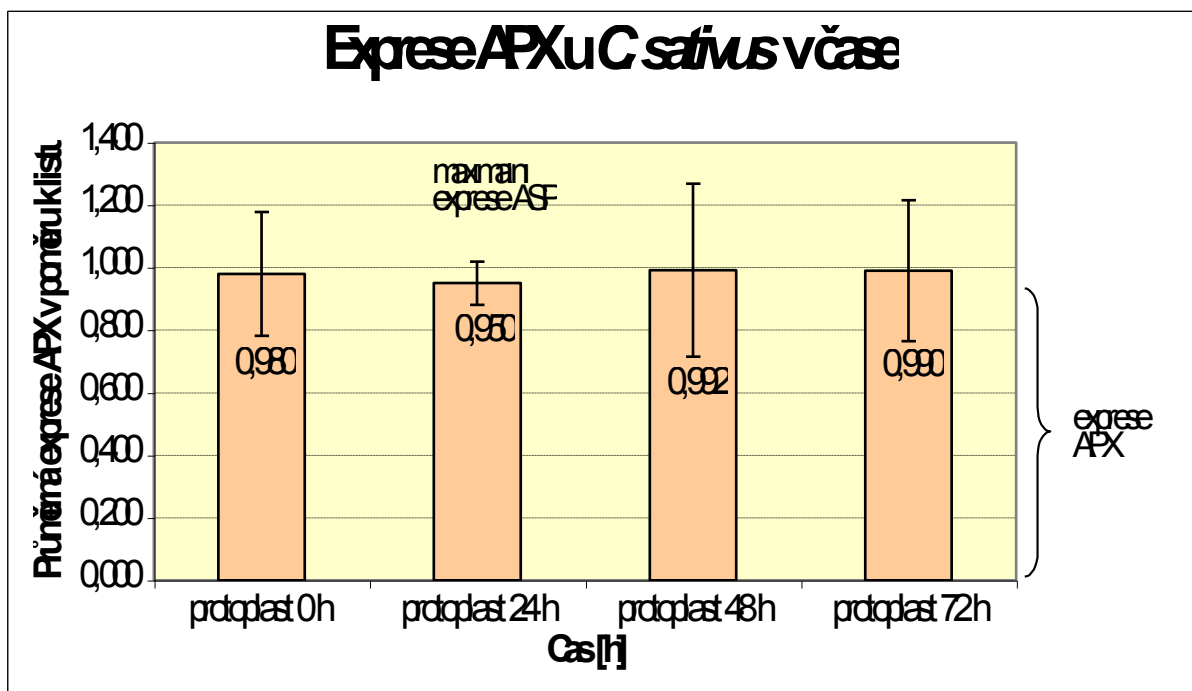
5.2 Detekce genů zapojených do OS

Z izolovaných protoplastů v čase 0, 24, 48 a 72 h bylo získáno RNA, které bylo dále přepsáno do cDNA. S cDNA se dále pracovalo. Byly použity primery pro APX, CAT a GIP k získání genů zodpovědných za jejich expresi. Za použití Light cycleru byly získány různé hodnoty exprese v protoplastech a listu. Výsledky exprese genů v protoplastu byly vztaženy na list. Tyto hodnoty jsou zobrazeny v tabulkách 9, 10 a 11 a grafy 1, 3 a 4. Melting analýza PCR produktů ukázala u většiny reakcí na jeden specifický produkt pro daný gen, graf 2 a 5.

Tabulka č. 9: Exprese APX v protoplastu v poměru k listu.

vzorek	měření č. 1	měření č. 2	měření č. 3	průměr	průměr/list
blank	30,750	31,000	31,400	30,980	x
list	30,960	31,180	30,320	30,820	x
protoplast 0 h	30,090	30,730	29,780	30,200	0,980
protoplast 24 h	29,560	29,520	29,250	29,440	0,950
protoplast 48 h	29,730	29,440	28,440	29,200	0,992
protoplast 72 h	29,520	29,670	30,540	29,910	0,990

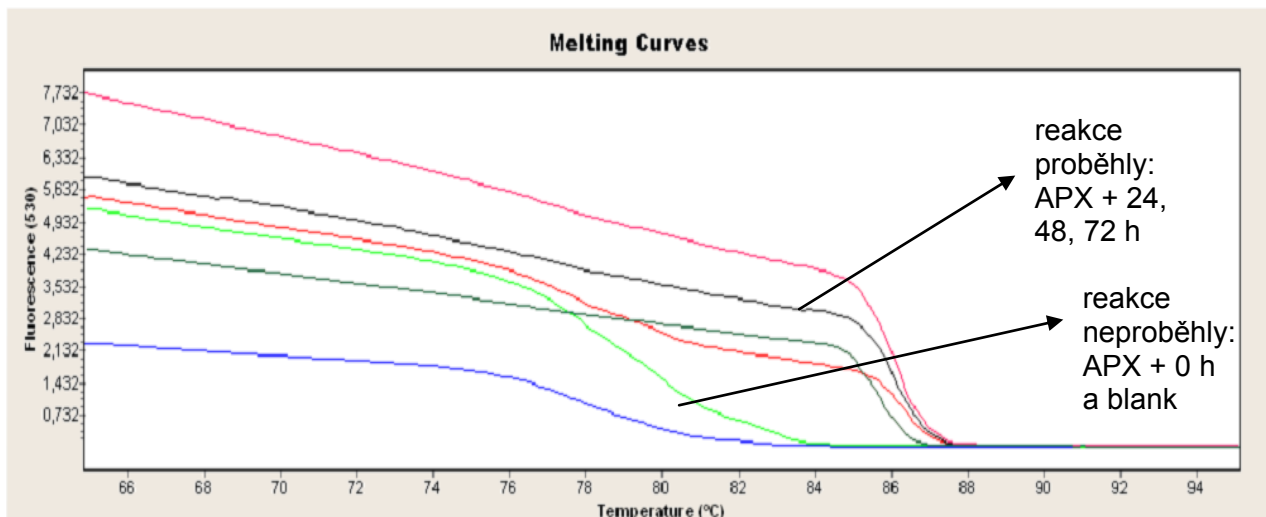
Graf č. 1 znázorňuje maximální expresi APX u protoplastu v době 24 h. Ostatní hodnoty také naznačují expresi u protoplastů získaných v dalších časech.



Graf č. 1: Exprese APX v protoplastech *C. sativus* v čase.

Nejvyšší expese APX je v protoplastech získaných 24 h po izolaci. Tyto protolasty prochází nejvyšším oxidativním stresem a brání se expresí APX. U sloupců grafu jsou zřejmé vysoké

odchylky v produkci APX, to je způsobeno různou mírou produkce APX v jednotlivých protoplastech. Melting křivka znázorňuje reakce při RT PCR, kde ve vzorku protoplastu 0h a blanku nedošlo ke vzniku produktů.

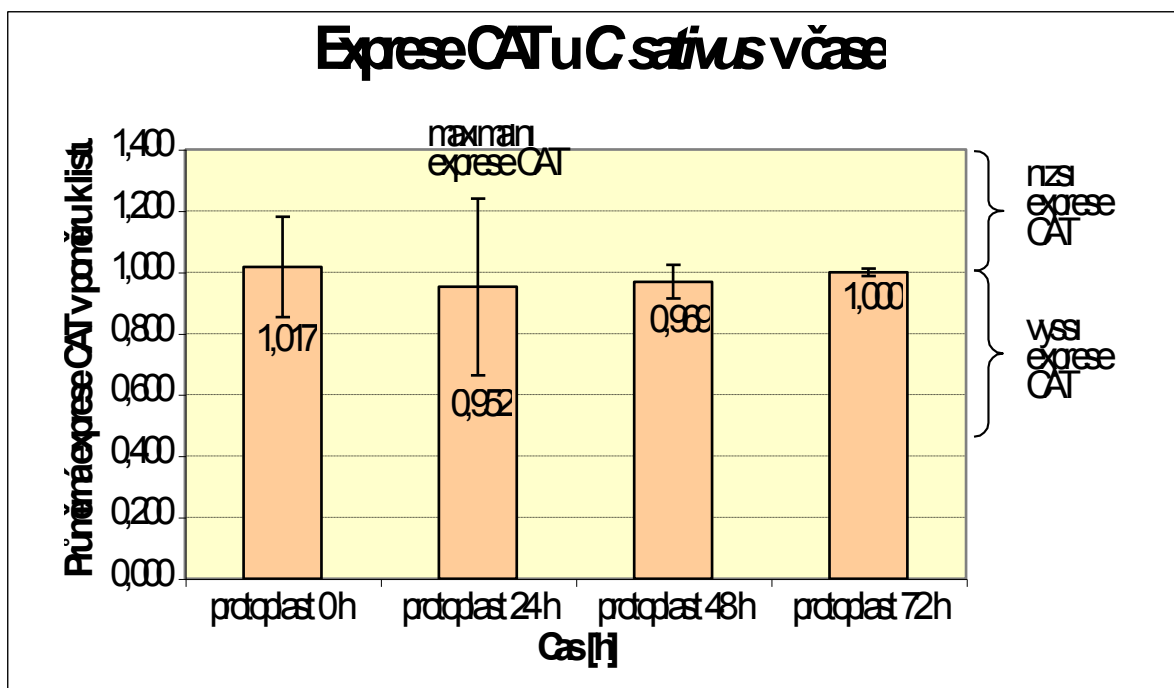


Graf č. 2: Melting křivka RT PCR - APX s protoplasty v čase 0, 24, 48, 72 h a listem pro 1 sadu vzorků.

Tabulka č. 10: Expres CAT v protoplastu v poměru k listu.

vzorek	měření č. 1	měření č. 2	měření č. 3	průměr	průměr/list
blank	28,820	33,080	32,300	31,400	x
list	32,970	32,800	33,230	32,990	x
protoplast 0 h	33,400	33,940	33,160	33,550	1,017
protoplast 24 h	31,420	32,110	30,700	31,410	0,952
protoplast 48 h	31,970	31,820	32,090	31,960	0,969
protoplast 72 h	32,990	32,960	33,020	32,990	1,000

Graf č. 3 zaznamenává maximální expresi CAT u protoplastu v době 24 h, zde se však projevuje i nejvyšší směrodatná odchylka. Oxidativní stres se zřejmě projevuje u každého protoplastu v různé míře, což způsobuje rozptyl hodnot expresie genů reagujících na tento stres. To je zachyceno ve směrodatných odchylkách expresí GIP v protoplastech. Nejnižší expresie byla u protoplastu v době 0 h po izolaci.

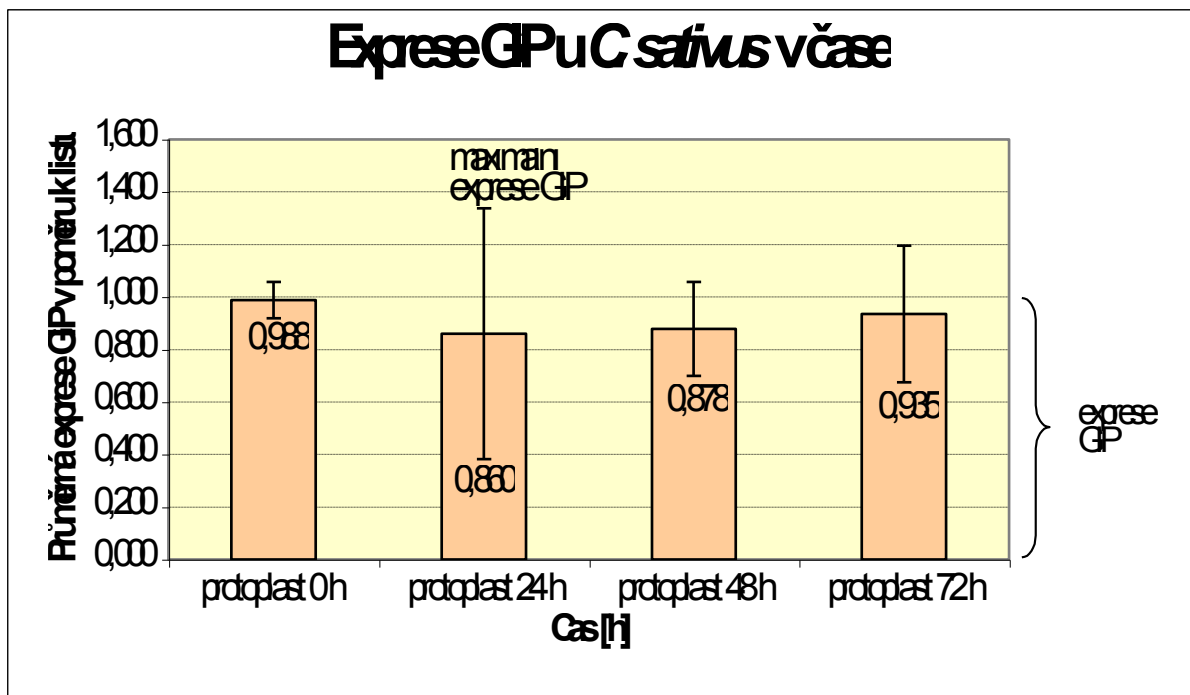


Graf č. 3: Expresce CAT v protoplastech *C. sativus* v čase.

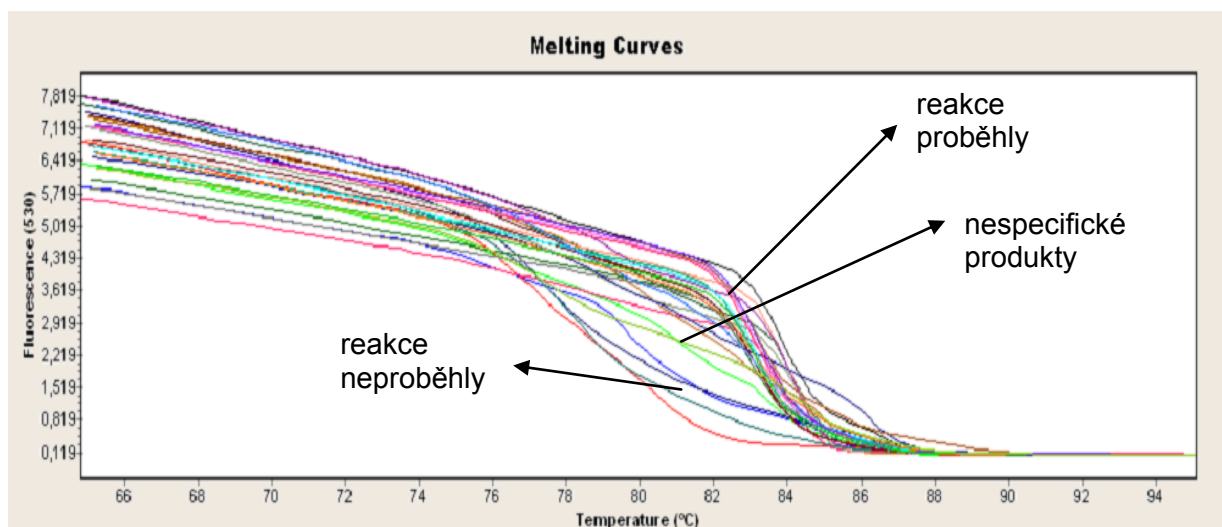
Tabulka č. 11: Expresce GIP v protoplastu v poměru k listu.

vzorek	měření č. 1	měření č. 2	měření č. 3	průměr	průměr/list
blank	35,010	34,500	34,200	34,600	x
list	35,210	34,790	35,000	35,000	x
protoplast 0 h	34,510	34,800	34,510	34,610	0,988
protoplast 24 h	29,180	30,080	31,500	30,250	0,860
protoplast 48 h	30,250	31,100	30,850	30,730	0,878
protoplast 72 h	31,990	32,950	33,200	32,710	0,935

Protoplasty testované na expresi GIP v různých časech vykazovaly také značnou expresi. Získali jsme křivku znázorňující hodnoty vyšší a nižší hladiny GIP. Nejvyšší expresce GIP byla v protoplastu inkubovaném 24 h, což je znázorněno v grafu č. 2. Směrodatná odchylka byla nejvyšší v protoplastu izolovaném v čase 24 h, to je zřejmě způsobeno různou produkcí GIP v protoplastech, které reagují na různou míru oxidativního stresu. Melting křivka GIP produkce zachycuje, že expresce tohoto genu v listu zcela neprobíhá a produkty tedy nevznikají.



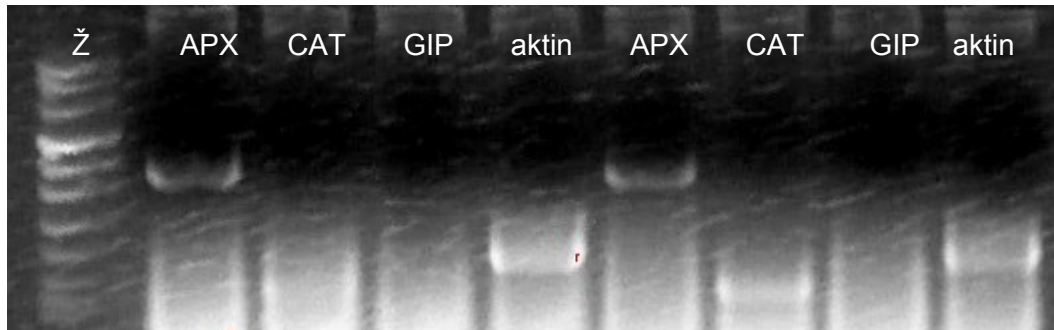
Graf č. 4: Expresa GIP v protoplastech *C. sativus* v čase.



Graf č. 5: Melting křivka RT PCR - CAT s protoplasty v čase 0, 24, 48, 72 h a listem pro 2 sady vzorků. Melting křivka RT PCR - GIP s protoplasty v čase 0, 24, 48, 72 h a listem pro 3 sady vzorků

Pro potvrzení výsledků byla použita elektroforéza vzorků z PCR reakce: DNA s primery CAT, GIP a AsP. Aktin byl zde použit jako pozitivní kontrola pro zjištění správné izolace DNA. Primery APX vytvořily dva bandy, CAT jen jeden, GIP žádný a aktin dva bandy. Dva bandy prokazují spolehlivost primeru, který tvoří PCR produkty. Avšak produkty CAT tvořily

jen jeden band. To znamená, že navržený primer na DNA ne vždy nasedá a neamplifikuje se. V případě primeru pro GIP nedošlo k žádné amplifikaci a tudíž nedošlo ke vzniku bandů. Výsledky jsou zobrazeny na obrázku č. 12.



Obrázek č. 12: Žebřík a vzorky PCR produktu: DNA listu s primery APX, CAT, GIP a aktinu.

6 Diskuze

Protoplasty jsou známy pro své plastické vlastnosti. Jsou to buňky zbavené buněčné stěny a dochází u nich k přechodu ze stavu terminálně diferenciovaného do stavu pluripotentního. To se děje na základě chromatinových přestaveb. V jádře dochází ke dvojité dekondenzaci a poté následuje rekondenzace, což bylo ukázáno Zhao *et al.* (2001), Tessadori (2007), Ondřej (2010). Změny ve struktuře chromatinu provázejí dediferenciaci protoplastů. Protoplastové kultury během izolace prochází velkým oxidativním stresem způsobeným enzymy, které odstraňují buněčnou stěnu (Ondřej *et al.*, 2010).

Protoplasty byly vyizolovány v čase 0, 24, 48 a 72 h. Častým problémem izolace byla kontaminace protoplastů i přes sterilizaci semínek. Bakterie zřejmě kontaminovali embryo *C. sativus* a následný donorový materiál.

Životnost protoplastů byla ověřena pomocí fluorescein diacetátu. Tato látka je po přidání k živým protoplastům přeměněna buněčnými esterázami na zeleně fluoreskující produkt. Při použití fluorescenčního mikroskopu se mrtvé protoplasty jeví jako červené. Životnost je přibližně 80%, což koreluje s Ondřej *et al.* (2010).

Pomocí techniky FISH byla pozorována dekondenzace chromatinu v protoplastech izolovaných v čase 0 h v podobě rozvolnění chromocenter a dekondenzace repetitivní sekvence SAT 1. To se shoduje s Tessadori *et al.* (2007) a Ondřej *et al.* (2010) kteří dokázali, že dediferenciace je spojena s rozpadem chromocenter a dekondenzací všech repetitivních oblastí v protoplastech rostlin.

Byla také sledována exprese genů pro APX, CAT a GIP. Exprese těchto genů je součástí odpovědi na oxidativní stres. Podle výsledků z RT PCR byla maximální exprese APX, CAT i GIP v protoplastech izolovaných v čase 24 h. Podle Ondřej *et al.* (2010) je exprese genů maximální v době 72 h po izolaci. Důvodem rozdílů může být různá úroveň oxidativního stresu i jiných stresových faktorů daných izolací protoplastů a jejich následnou kultivací. V případě aplikace kyseliny askorbové, která snižuje oxidativní stres, posunuje se maximum exprese APX a CAT na 48 h po izolaci protoplastů (Ondřej *et al.*, 2010).

7 Závěr

V této práci byla zpracována literární rešerše na téma Cytogenetický a expresní profil protoplastových kultur vzhledem k jejich regeneraci se zaměřením na změny v uspořádání chromatinu a na geny zapojené do „scavenging systému“ rostlin.

V praktické části byla analyzován rozpad chromocenter a dekondezace repetitivní sekvence SAT1. Také bylo ukázáno, že exprese genů jako jsou APX, CAT a GIP v protoplastových kulturách *Cucumis sativus* kulminuje 24 hodin po jejich izolaci a má souvislost s obranou buněk proti zvětšené míře oxidativního stresu doprovázející kultivaci protoplastů. Výsledky rovněž ukazují, že pro detekci exprese genů CAT a GIP u *Cucumis sativus* je nutné najít nové primerové sekvence, které by zkvalitnily expresní analýzu těchto genů.

8 Seznam použitých zkratk

APX	askorbát peroxidáza
CAT	kataláza
FISH	fluorescenční <i>in situ</i> hybridizace (angl. fluorescence <i>in situ</i> hybridisation)
GIP	glutathion peroxidáza
PCR	polymerázová řetězcová reakce (angl. polymerase chain reaction)

9 Seznam použité literatury

Avramova Z. V. (2002): Heterochromatin in animals and plants. Similarities and differences. *Plant Physiology* 129: 40-49.

Benson E. E. (2000): Do free radicals have a role in plant tissue culture recalcitrance? *In vitro cellular & developmental biology*, *Plant* 36: 163-170.

Branco M. R., Pombo A. (2006): Chromosome organization: new facts, new models. *Trends in cell biology* Vol. 17 No. 3: 127-134.

Collings A.D., Carter C. N., Rink J. C., Scott A. C., Wyatt S. E. (2000): Plant nuclei can contain extensive grooves and invaginations. *Plant cell* 12: 2425-2439.

Davey M.R., Anthony P., Power B. J. and Kenneth C. Lowe (2005): Plant protoplast: status and biotechnological perspectives. *Biotechnology advances* 23: 131-171.

de Marco A., Roubelakis-Angelakis K. A. (1999): Specific features of the ascorbate/glutathione cycle in cultured protoplasts. *Plant cell reports* 18: 406-411.

Exner V., Henning L. (2008): Chromatin rearrangements in development. *Current opinion in plant biology* 11: 64-69.

Fišerová J., Kiseleva E., Goldberg M. W. (2009): Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells. *The plant journal* 59: 243-255.

Fransz P. F., Armstrong S., de Jong J. H., Parnell L. D., van Drunen G., Dean C., Zabel P., Bisseling T., Jones G. H. (2000): Integrated cytogenetic map of chromosome arm 4S of *A. thaliana*: structural organization of heterochromatic knob and centromeric region. *Cell* 100: 367-376.

Fu C. H., Chen C. L., Guo W. W., Deng X. X. (2004): GISH, AFLP and PCR-RFLP analysis of an intergenic somatic hybrid combining Goutour sour orange and *Poncirus trifoliata*. *Plant cell reports* 23: 391-396.

Gamborg O. L., Miller R.A., Ojima K. (1968): Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental cell research* 50: 151-158.

Grant P. A. (2001): A tale of histone modifications. *Genome Biology* 2: reviews0003-reviews0003.6.

Grafi G. (2004): How cells dedifferentiate: a lesson from plants. *Developmental biology* 268: 1-6.

Gomes-Junior R. A., Moldes C. A., Delite F. S., Gratão, Mazzafera P., Lea P. J., Azevedo R. A. (2006): Nickel elicits a fast antioxidant response in *Coffea arabica* cells. *Plant physiology and biochemistry* 44: 420-429.

Houben (2003): Histone modifications in *Arabidopsis* – high methylation of H3 lysine 9 is dispensable for constitutive heterochromatin. *Plant journal* 33: 471-480.

Kao K. N., Michalyuk M. R. (1975): Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at a very low population density in liquid media. *Planta* 126: 105-110.

Klíma M., Abraha E., Vyvadilová M., Bechyně M. (2009): Protoplast culture and fusion between *Brassica carinata* and *Brassica napus*. *Agricultura tropica et subtropica* 42: 34-45.

Maccarrone M., van Zadelhoff G., Veldink G. A., Vliegenthart J. F. G., Finazzi-Agró (2000): Early activation of lipoxygenase in lentil (*Lens culinaris*) root protoplasts by oxidative stress induces programmed cell death. *European journal of biochemistry* 267: 5078-5084.

Moira R. D., Yoona M., Khuona S., Goldman R. D. (2000): Nuclear lamins A and B: different pathways of assembly during nuclear envelope formation in living cells. *The journal of cell biology* vol. 151 no. 6: 1155-1168.

Molina A., Bueno P., Marín M. C., Rodríguez-Rosales M. P., Belver A., Venema K., Donaire J. P. (2002): Involvement of endogenous salicylic acid content, lipogenase and antioxidant enzyme activities in the response of tomato cell suspension cultures to NaCl. *New phytologist* 156: 409-415.

Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant physiology* 15: 473-497.

Ondřej V., Kitner M., Doležalová I., Nádvorník P., Navrátilová B., Lebeda A. (2009): Chromatin structural rearrangement during dedifferentiation of protoplast of *Cucumis sativus* L. *Molecules and cells* 27: 443-447.

Ondřej V., Navrátilová B., Lebeda A. (2009): The heterochromatin as a marker for protoplast differentiation of *Cucumis sativus*. *Plant cell, tissue and organ culture* 96: 229-234.

Ondřej V., Navrátilová B., Protivánková I., Piterková J., Sedlářová M., Luhová L., Lebeda A. (2010): Recondensation level of repetitive sequences in the plant protoplast nucleus is limited by oxidative stress. *Journal of experimental botany* vol. 61 no.9: 2395-2401.

Papadakis K. A., Roubelakis-Angelakis A. (2002): Oxidative stress could be responsible for the recalcitrance of plant protoplasts. *Plant physiology and biochemistry* 40: 549-559.

Potters G., Horemans N., Caubergs R. J., Asard H. (2000): Ascorbate and dehydroascorbate influence cell cycle progression in tobacco cell suspension. *Plant physiology* 124: 17-20.

Ridgway P., Almouzni G. (2001): Chromatin assembly and organization. *Journal of cell science* 114: 2711-2712.

Sedlářová M., Luhová L., Petřivalský M., Lebeda A. (2007): Localisation and metabolism of reactive oxygen species during *Bremia lactucae* pathogenesis in *Lactuca sativa* and wild *Lactuca spp.* *Plant physiology and biochemistry* 45: 607-616.

Siminis C. I., Kanelis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (1993): Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Plant physiology* 87: 263-270.

Siminis C. I., Kanelis A. K., Roubelakis-Angelakis K. A. (1994): Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. *Plant physiology* 105: 1375-1383.

Spector D. L. (2001): Nuclear domains. *Cell science at a glance* 114: 2891-2893.

Sutiojono E., Kantharajah A. S., Nonhebel H. M., Ebert G. (2002): The effect of glycine and explant source on the yield of viable protoplasts from *Cucumis melo* cvs. Green Delica and Fastoso and *Cucumis metuliferus*. *Journal of applied botany* 76: 168-171.

Takebe I., Otsuki Y., Aoki S. (1968): Isolation of tobacco mesophyll protoplasts in intact and active state. *Plant and cell physiology* 9: 115-124.

Tessadori F., van Driel R., Fransz P. (2004): Cytogenetics as a tool to study gene regulation. *Trends in plant science*, Vol. 9 No.3: 147-153.

Tessadori F., Chupeau M. C., Chupeau Y., Knip M., Germann S., van Driel R., Fransz P., Gaudin V. (2007): Large-scale dissociation and sequential reassembly of pericentric heterochromatin in dedifferentiated *Arabidopsis* cells. *Cell science* 120:1200-1208.

van Driel R., Fransz P. (2004): Nuclear architecture and genome functioning in plants and animals: what can we learn from both? *Experimental cell research* 296: 86-90.

Wilmut I., Schnieke A. E., McWhir J., Kind A. J., Cambell K. H. (1997): Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature* 385: 810-813.

Yang X., Tu L., Zhu L., Fu L., Min L., Zhang X. (2008): Expression profile analysis of gene involved in cell wall regeneration during protoplast culture in cotton by suppression subtractive hybridization and macroarray. *Journal of experimental botany* Vol. 59 No. 13: 3661-3674.

Zhao J., Morozova N., Williams L., Libs L., Avivi Y., Grafi G. (2001): Two phases of chromatin decondensation during dedifferentiation of plant cells. *The journal of biological chemistry* Vol. 276 No.25: 227722-227728.

Internetové zdroje:

http://en.wikipedia.org/wiki/Murashige_and_Skoog_medium

<http://atlasgeneticsoncology.org/Educ/ChromatinEducEng.html>

http://www.nature.com/embor/journal/v5/n5/fig_tab/7400146_f1.html

10 Příloha

Tabulka č. 1: Složení MS media (Murashige et Skoog, 1962)

<i>makroprvky</i>		<i>organické přísady</i>	
NH ₄ NO ₃	1,650 mg/l	i-inositol	100 mg/l
H ₃ BO ₃	6.2 mg/l	niacin	0.5 mg/l
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440 mg/l	pyridoxin · HCl	0.5 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025 mg/l	thyamin · HCl	0.1 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370 mg/l	IAA	1–30 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025 mg/l	kinetin	0.04–10 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l	glycin	2.0 g/l
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8 mg/l	edamin S	1.0 g/l
KNO ₃	1,900 mg/l	sacharóza	20 g/l
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3 mg/l	agar	10 g/l
KI	0.83 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25 mg/l		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6 mg/l		
Na ₂ EDTA · 2H ₂ O	37.2 mg/l	pH = 5-6	

Tabulka č. 2: Složení B5 média (Gamborg et al., 1968)

<i>makroprvky</i>		<i>organické přísady</i>	
(NH ₄) ₂ SO ₄	134 mg/l	i-inositol	100 mg/l
H ₃ BO ₃	3 mg/l	niacin	1 mg/l
CaCl ₂	113,24 mg/l	pyridoxin · HCl	1 mg/l
CaCl ₂ · 6 H ₂ O	0,025 mg/l	thyamin · HCl	10 mg/l
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	0,025 mg/l	sacharóza	20 g/l
Na ₂ EDTA	37,3 mg/l		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8 mg/l		
MgSO ₄	122,09 mg/l		
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg/l		
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 mg/l		
KI	0,75 mg/l		
KNO ₃	2500 mg/l		
NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ O	150 mg/l		
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/l	pH = 5-6	

Tabulka č. 3: Složení kokosového média (Kao et Michalyuk, 1975)

složení			
NH ₄ NO ₃	600 mg/l	sacharóza	0,25 g/l
KNO ₃	1900 mg/l	glukóza	68,4 g/l
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	600 mg/l	inositol	100 mg/l
MgSO ₄ · 7H ₂ O	300 mg/l	nikotinamid	1 mg/l
KH ₂ PO ₄	170 mg/l	pyridoxin HCl	1 mg/l
KCl	300 mg/l	thyamin HCl	1 mg/l
Sequestrene R 330 Fe	28 mg/l	D-kalcium pantotenát	1 mg/l
KI	0,75 mg/l	k. listová	0,4 mg/l
H ₃ BO ₃	3 mg/l	p-aminobenzoová k.	0,02 mg/l
MnSO ₄ · H ₂ O	10 mg/l	biotin	0,01 mg/l
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	2 mg/l	cholin chlorid	1 mg/l
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 mg/l	riboflavin	0,2 mg/l
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025 mg/l	k. askorbová	2 mg/l
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025 mg/l	vitamin A	0,01 mg/l
2,4-D	0,2 mg/l	vitamin D3	0,01 mg/l
zeatin	0,5 mg/l	vitamin B12	0,02 mg/l
NAA	1 mg/l	pyruvát sodný	20 mg/l
fruktóza	250 mg/l	k. citrónová	40 mg/l
ribóza	250 mg/l	k. maleinová	40 mg/l
xylulóza	250 mg/l	k. fumarová	40 mg/l
manóza	250 mg/l	kasein hydrolyzát	250 mg/l
ramnóza	250 mg/l	kokosová voda	20 mg/l
celobióza	250 mg/l		
sorbitol	250 mg/l		
manitol	250 mg/l	pH = 5-6	