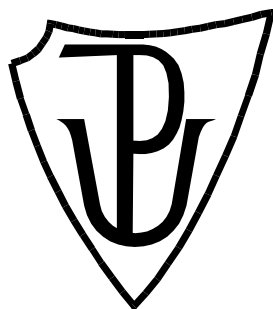


# UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Analýza kořenových vlásků a jejich polárního růstu u  
vybraných mutantů *Arabidopsis thaliana*.**

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	<b>Jan Haberland</b>
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	<b>Mgr. Lenka Kuběnová</b>
Rok:	2021

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne .....

## Poděkování

Chtěl bych hlavně poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Lence Kuběnové za její čas, ochotu a cenné rady, které mi během psaní práce věnovala. Také bych chtěl poděkovat prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. a oddělení buněčné biologie za příjemné prostředí a rady při práci v laboratoři. Práce byla podpořena grantem GAČR, project Nr. 19-18675S.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Jan Haberland
Název práce	Analýza kořenových vlásků a jejich polárního růstu u vybraných mutantů <i>Arabidopsis thaliana</i> .
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Oddělení buněčné biologie, CRH
Vedoucí práce	Mgr. Lenka Kuběnová
Rok obhajoby práce	2021

### Abstrakt

*Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní) je malá jednoletá dvouděložná rostlina, která se díky svému krátkému životnímu cyklu a malému genomu stala populárním modelovým organismem v mnoha odvětví rostlinné biologie. Kořenové vlásky *A. thaliana* jsou používány ke zkoumání polárního růstu u rostlin, protože jsou snadno vizualizovatelné a rychle rostou. Kromě toho můžeme zkoumat mutace vedoucí ke změnám funkcí a vývoje kořenových vlásků, protože nejsou stěžejní pro přežití samotné rostliny. V této práci byly použity mutantní rostliny *rhd2-1*, které jsou defektní v příjmu  $\text{Ca}^{2+}$ . To způsobuje poruchu polárního růstu a rostliny tak mají fenotyp velmi krátkých kořenových vlásků. Tento fenotyp *rhd2-1* (*root hair defective2*) je zapříčiněn mutací genu pro RHD2, NADPH oxidasu zodpovědnou za produkci reaktivních forem kyslíku (ROS) v kořeni a kořenových vláscích. Kromě *rhd2-1* byly také použity linie Col-0, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2. Byla pozorována klíčivost a růst primárního kořene. Je zde ukázáno, že linie *rhd2-1* má v porovnání s ostatními liniemi trochu pomalejší růst.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>rhd2-1</i> , primární kořen, kořenové vlásky, polární růst, NADPH oxidasa, mikroskopie
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Jan Haberland
Title	Analysis of root hairs and their polar growth in selected <i>Arabidopsis thaliana</i> mutants.
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of cell biology, CRH
Supervisor	Mgr. Lenka Kuběnová
The year of presentation	2021

### Abstract

*Arabidopsis thaliana* is a small annual dicotyledonous plant that has become a popular model organism in many branches of plant biology due to its short life cycle and small genome. *A. thaliana* root hairs are used to study polar growth in plants because they are easy to visualize and grow quickly. Moreover, we can examine mutations leading to changes in the function and development of root hairs, because they are not crucial for the survival of the plant itself. In this work were used mutant *rhd2-1* plants that are defective in Ca<sup>2+</sup> uptake. This causes a disruption of polar growth and the plants have a phenotype of very short root hairs. This *rhd2-1* (*root hair defective2*) phenotype is caused by a mutation in the gene for RHD2, the NADPH oxidase responsible for the production of reactive oxygen species (ROS) in the root and root hairs. In addition to *rhd2-1* were also used Col-0, Col-0 GFP-RHD2 and GFP-RHD2 lines. Germination and growth of the primary root were observed. It is shown here that the *rhd2-1* line has a slightly slower growth compared to others.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>rhd2-1</i> , primary root, root hairs, tip growth, NADPH oxidase, microscopy
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

# OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....</b>	<b>3</b>
2.1. Modelový organismus <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
2.2. Kořen <i>Arabidopsis thaliana</i> a jeho struktura.....	4
2.3. Kořenové vlásky .....	6
2.3.1. Buněčná polarita a struktura vlásku.....	7
2.4. Faktory ovlivňující polární růst vlásku.....	8
2.4.1. Regulace polárního růstu vlásku reaktivními formami kyslíku.....	8
2.4.2. Strukturní steroly .....	10
2.4.3. Buněčný cytoskelet.....	11
2.5. Fenotypové projevy mutací genů zahrnutých ve vývinu kořenových vlásků u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	13
2.6. Vybraní mutanti <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
2.6.1. Mutant <i>rhd2</i> .....	15
2.6.2. Mutant <i>der1</i> .....	16
2.7. Vybrané mikroskopické metody.....	17
2.7.1. Světelná a fluorescenční mikroskopie .....	17
2.7.2. Light-sheet fluorescenční mikroskopie .....	18
2.7.3. Super-rozlišovací mikroskopie .....	19
2.8. Nejpoužívanější fluorescenční proteiny .....	21
<b>3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>22</b>
3.1. Materiál.....	22
3.1.1. Chemikálie.....	22
3.1.2. Roztoky a média .....	23
3.1.2. Přístroje.....	24
3.1.3. Rostlinný materiál.....	24

3.2. Metody.....	25
3.2.1. Příprava kultivačního média pro <i>in vitro</i> kultivaci rostlin.....	25
3.2.2. Příprava tekutého ARA média.....	25
3.2.3. Povrchová sterilizace a výsev semen.....	26
3.2.4. Příprava preparátů ke snímání růstu kořenových vlásků.....	26
3.2.5. Analýza a zpracování dat.....	27
<b>4. VÝSLEDKY .....</b>	<b>28</b>
4.1. Klíčivost semen .....	28
4.2. Délka primárního kořene a denní přírůstek .....	29
4.3. Počet bočních kořenů, jejich délka a průměrný počet bočních kořenů na 1 mm délky primárního kořene .....	32
4.4. Fenotyp .....	34
4.5. Růst kořenových vlásků.....	35
<b>5. DISKUZE .....</b>	<b>38</b>
<b>6. ZÁVĚR .....</b>	<b>40</b>
<b>7. LITERATURA.....</b>	<b>41</b>
<b>8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....</b>	<b>47</b>

## **Cíle práce**

- 1) Vyhledání literárních zdrojů a zpracování literární rešerše na dané téma zejména: a) struktury, morfologie, vývinu a genetiky kořene rostlin, b) biologie kořenových vlásků a fenotypové projevy mutací genu zahrnutých ve vývinu kořenových vlásků, c) polární růst kořenových vlásků se zřetelem na NADPH oxidasu, steroly a aktinový cytoskelet.
- 2) Naučit se a samostatně zvládat základní laboratorní metody výzkumu rostlinných buněk na buněčné úrovni a využití mikroskopie.
- 3) Optimalizace kultivačních podmínek *in vitro* pro kontrolované a neinvazivní pozorování růstu kořenových vlásků pomocí moderních mikroskopických metod.
- 4) Kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování fenotypu kořene a kořenových vlásků u vybraných mutantů kořenového vlášení.



## 1. ÚVOD

*Arabidopsis thaliana* je dnes bezpochyby nejstudovanější kvetoucí rostlinou. Ve srovnání počtu publikací jsou jiné rostliny, jako například kukuřice, rajče nebo i rýže, oproti *Arabidopsis* daleko pozadu. *Arabidopsis* byla přijata jako modelový organismus hlavně kvůli její využitelnosti pro různé genetické experimenty (Koornneef a Meinke, 2010). Krátká doba růstu, velké množství semen a malá velikost, se kterou souvisí nenáročné požadavky k pěstování, jsou dalšími důležitými vlastnostmi (Meyerowitz, 1987). Za objevitele experimentálního výzkumu *Arabidopsis* se považuje Friedrich Laibach, který určil její počet chromozomů (5) v roce 1907 v rámci svého PhD studia. Laibach také začal s vystavováním rostlin *Arabidopsis* RTG záření, což umožnilo v roce 1947 jeho studentovi Ernu Reinholzovi izolovat první indukované mutantní rostliny *Arabidopsis* (Koornneef a Meinke, 2010). Mutace jsou dobře využitelné pro studium genů důležitých pro specifické vývojové fáze (Dolan *et al.*, 1993). Až do konce 70. let 20. století však nebyl o *Arabidopsis* takový zájem, protože byly negativně vnímány vlastnosti jako špatná regenerace tkáňových kultur a malý genom (Koornneef a Meinke, 2010). Její „znovuobjevení“ nastalo po tom, co George Rédei v roce 1975 napsal článek o jejím použití jako organismu pro genetické manipulace v molekulární biologii (Meyerowitz, 2001). Průlomem pak bylo osekvenování jejího celého genomu v roce 2000 (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). V dnešní době nám takto dobře zavedený modelový organismus, jako je *Arabidopsis*, poskytuje skvělý základ pro nové objevy v pochopení toho, jak rostliny fungují, jak se vyvíjejí a jak regulují svůj růst (Koornneef a Meinke, 2010). Následně pak můžeme naše poznatky a pokroky v tomto směru aplikovat například při výzkumech zemědělsky významných plodin a zvyšovat tak jejich odolnost vůči různým typům stresu.

Malé velikosti *A. thaliana* se využívá při mikroskopické analýze jejích orgánů a pletiv. Jejich struktura je totiž díky nízkému počtu buněčných vrstev velmi jednoduchá. Květy nebo třeba meristémy se dají dobře pozorovat v podélných řezech. Kořen lze dokonce sledovat bez řezů. Buňky samotné jsou natolik malé, že můžeme sledovat i jednotlivé buněčné vrstvy (Boerjan *et al.*, 1992). Ve spojení s *in situ* hybridizací je pak možné studovat expresi genů v celých orgánech, například v květu (Drews *et al.*, 1991; Jack *et al.*, 1992). Morfogeneze rostlinných buněk je ovlivněna správnou kontrolou směru a rozsahu růstu buněčné expanze. Růst rostlinných buněk je dobře charakterizovaný polárním růstem (Schieffelbein *et al.*, 1993). Najdeme ho v celé říši rostlin. Během

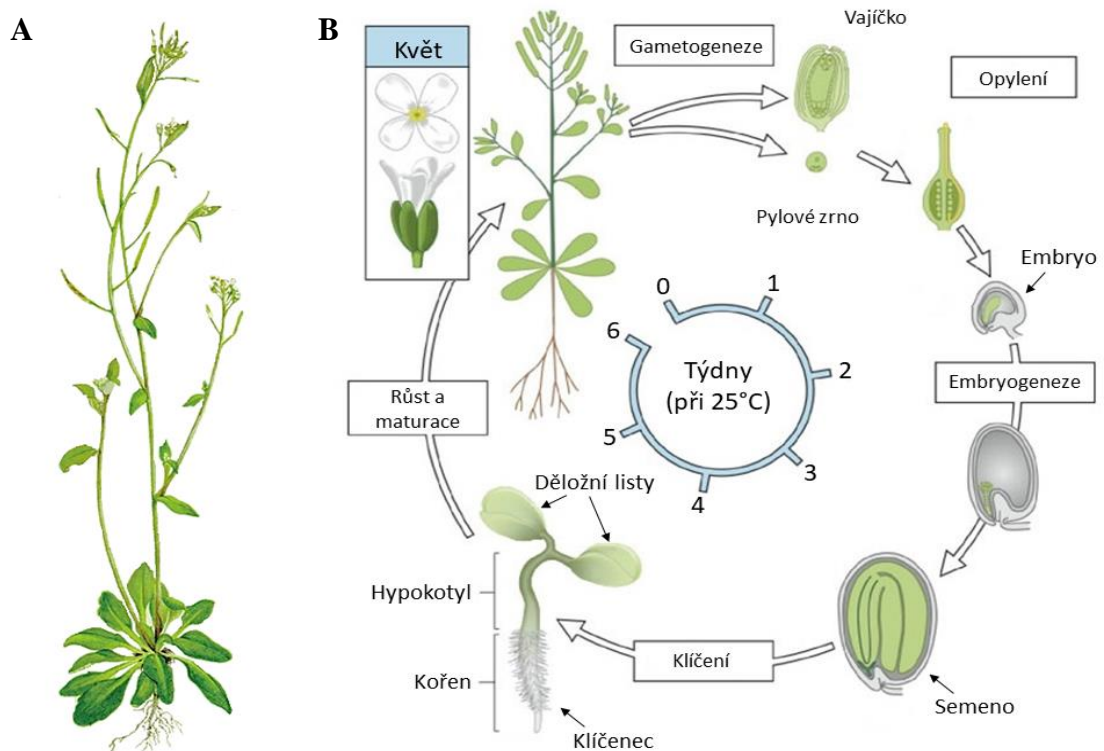
evoluce rostlin zůstaly vláknité buňky v místech, kde rostlina přichází do kontaktu se substrátem. Tyto vláknité buňky mají polární strukturu, spojenou s transportem materiálu do rostoucí buněčné stěny, díky čemuž dochází k prodlužování buňky. Takové prodlužování se označuje jako polární růst (Rounds a Bezanilla, 2013), při kterém vznikne buňka tubulárního tvaru (Schiefelbein *et al.*, 1993). Nejen u *A. thaliana* se ke zkoumání polárního růstu hojně využívá pylová láčka nebo kořenové vlásky. Studium těchto polárně rostoucích struktur s využitím molekulární biologie nám umožňuje chápat funkci buněčné signalizace, cytoskeletu nebo proteinů zapojených do polárního růstu (Rounds a Bezanilla, 2013). V této práci jsou použity rostliny *A. thaliana* mutanta *rhd2-1* (*root hair defective2*), které mají velmi krátké kořenové vlásky. Tento fenotyp je zapříčiněn defektním příjmem  $\text{Ca}^{2+}$ , které jsou důležité pro správný polární růst vlásků. Je to způsobeno mutací genu pro RHD2, což je NADPH oxidasa zodpovědná v kořeni a kořenových vláscích za produkci reaktivních forem kyslíku (ROS; Foreman *et al.*, 2003).

## 2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 2.1. Modelový organismus *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Huseníček rolní) je malá jednoletá dvouděložná rostlina patřící do čeledi *Brassicaceae* (Obr. 1A). Roste většinou do výšky 15-20 cm, má zelené listy 1-5 cm velké, které jsou situovány do přízemní růžice. Listy pokrývají malé jednobuněčné chloupky zvané trichomy. Dospělé rostliny produkují několik stovek šesulí s více než 5000 semeny. Dozrálá semena dosahují délky 0,5 mm. Celý životní cyklus (Obr. 1B), včetně klíčení, kvetení a dozrávání semen trvá jen 6 týdnů. Tento krátký cyklus a její malý genom jsou hlavními důvody, proč se stala populárním modelovým organismem v mnoha odvětví rostlinné biologie (Meinke *et al.* 1998).

*Arabidopsis* byla objevena v 16. století Johannesem Thalem (odtud *thaliana*), který ji nazval *Pilosella siliquos*. Současný název navrhnul de Candolle roku 1821. Z celého světa bylo shromážděno více než 750 přírodních ekotypů (Passardi *et al.* 2007). Mezi nejpoužívanější standardy pro genetické a molekulární studie patří ekotypy Columbia (Col-0), Landsberg *erecta* (Ler), Wassilewskija (Ws). *A. thaliana* při rozšíření po Evropě a Asii čelila rozsáhlé škále biotopů se změnami teplot, světla a vystavení



**Obrázek 1:** A) Ilustrační obrázek rostliny *A. thaliana*; upraveno podle Janet Wehr. B) Životní cyklus *A. thaliana*; upraveno podle <http://www.mun.ca/biology>.

patogenům. S těmito faktory mohou souviset rozdíly mezi ekotypy. *Ler* má oproti ostatním kompaktnější vzhled, *Ws* rychleji roste (Passardi *et al.* 2007). Dalším používaným ekotypem je linie C24, která později kvete (Stangeland *et al.*, 2009). Genom *A. thaliana* je organizován do pěti chromosomů a obsahuje odhadem 20 000 genů (Meinke *et al.* 1998). Studiemi mutací byly popsány tisíce rostlin defektních ve vývoji, či signálních a metabolických drahách, díky čemuž jsou známy jednotlivé funkce těchto genů.

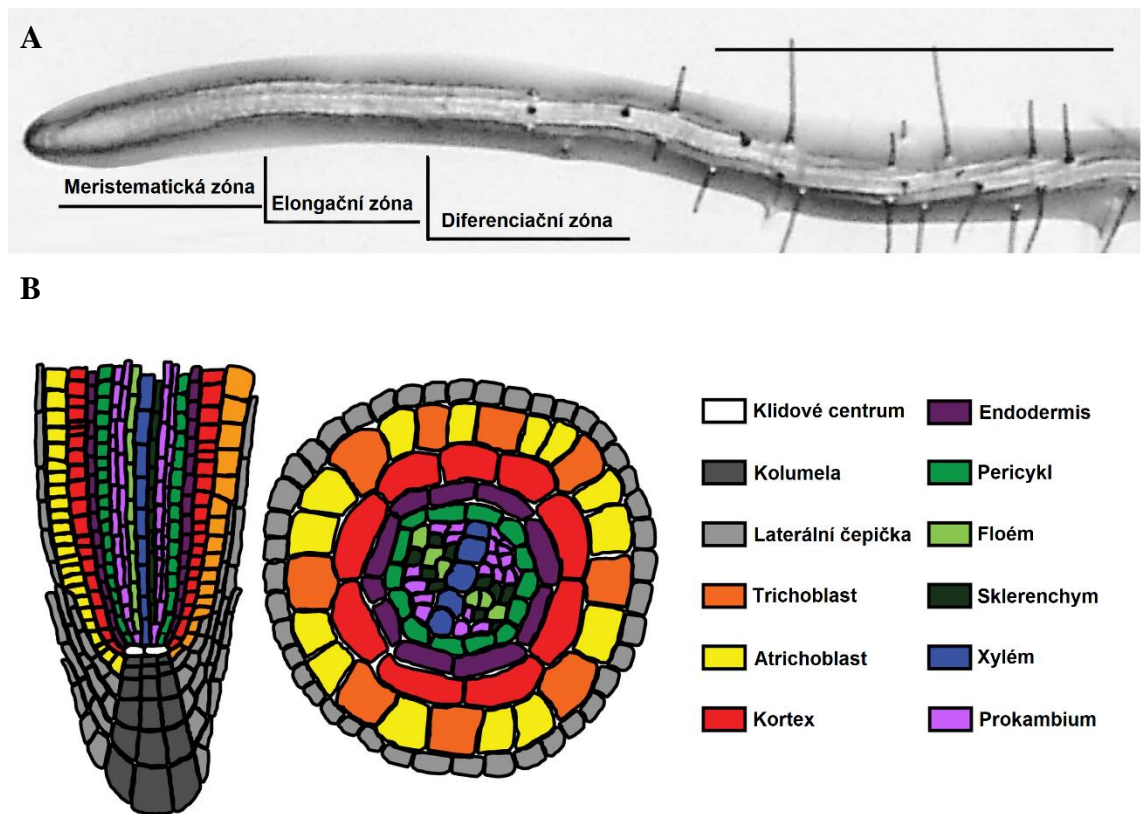
## 2.2. Kořen *Arabidopsis thaliana* a jeho struktura

Kořen je vegetativní, bezlistý, podzemní orgán rostlin. Mezi jeho funkce patří především příjem vody a minerálních látek z půdy, gravitropický růst, prostředí pro vztah rostliny s půdními mikroorganismy a pevné ukotvení rostliny v půdě. Dvouděložné rostliny mají jeden hlavní kořen s bočními kořeny a kořenovými vlásky. Struktura kořene *A. thaliana* je jednoduchá, neměnná a slouží jako užitečný model pro studium vývoje rostlin (Foreman a Dolan, 2001).

Kořenová špička se skládá ze tří odlišných organizačních zón (Obr. 2A). První je meristematická zóna, kterou tvoří iniciující se a dělící se buňky kořene. V této fázi už se trichoblasty (buňky, ze kterých vyrůstají kořenové vlásky) morfologicky liší od atrichoblastů (buňky bez vlásků). Následuje zóna elongační, ve které dochází k prodlužování buněk. Kořenové vlásky se zde iniciují. Další zóna se nazývá diferenciacní a obsahuje prodloužené buňky, dozrávající do úplně diferenciovaných buněk. V této fázi se kořenové vlásky plně diferencují (Dolan *et al.*, 1993).

Apikální meristémy kořene jsou uspořádány do čtyř primárních meristémů, které vznikají ze čtyř vrstev iniciálních buněk. Dermatogen, který je základem pro rhizodermis a vnější část kořenové čepičky neboli laterální kořenovou čepičku. Periblem, základ pro kortex a endodermis, a plerom, který dává základ střednímu válci s prokambiem, z něhož vznikají vodivá pletiva. Kořenová čepička (kolumela) má svoji vlastní vrstvu iniciál. V kontaktu se všemi iniciálami je malý počet centrálních buněk. Tyto buňky jsou mitoticky neaktivní a označují se jako klidové centrum. Rhizodermis, kortex, endodermis a pericykl jsou po sobě jdoucí vrstvy, které obklopují vaskulární pletivo. To je tvořené xylémem, floémem s podpůrným pletivem sklerenchymem, a prokambiem (Scheres *et al.*, 2002). Všechny tyto vrstvy jsou radiálně symetrické a společně vytváří strukturu kořene (Obr. 2B). Rhizodermis je vnější jednovrstvá pokožka plně vyvinutého kořene a je tvořena dvěma typy buněk. Buňky, které překrývají antiklinální stěny mezi sousedními

kortikálními buňkami, se diferencují na trichoblasty, ze kterých rostou kořenové vlásky. Buňky, které překrývají periklinální stěny, se diferencují na atrichoblasty, ze kterých kořenové vlásky nerostou (Dolan *et al.*, 1993). Kořenová čepička vylučuje sliz, čímž chrání kořen, a hlavně apikální meristémy. Je tvořena buňkami statocytů, obsahující přesýpavá škrobová zrna statolity, které sedimentují a pomáhají tak rostlině v orientaci po směru gravitace. Kořen pak roste směrem dolů, je pozitivně gravitropický. Ve srovnání se stonkem má kořen relativně jednodušší vnitřní strukturu, což je způsobeno hlavně absencí listů a odpovídající absencí nodí a internodií (Evert *et al.*, 2006).

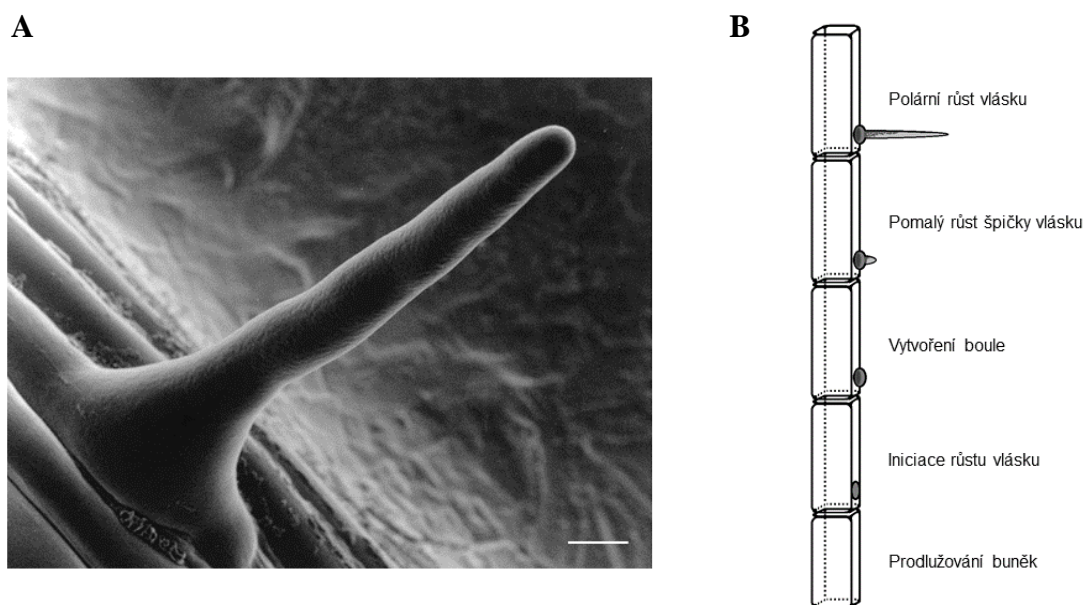


**Obrázek 2:** Kořenová špička *A. thaliana*. A) Apikální část kořene pětidenní sazenice; měřítko 1 mm. B) Schématické znázornění typů buněk v podélném a příčném řezu apikálního meristému kořene *A. thaliana*. Upraveno podle Bargmann *et al.*, 2013.

### 2.3. Kořenové vlásky

Kořenové vlásky jsou jednobuněčné tubulární útvary rostoucí z bazálního konce buněk trichoblastů (Obr. 3A). Jejich důležitou funkcí je pevnější ukotvení kořene v půdě a zvětšení jeho povrchu pro příjem vody a živin z půdy. Kořenové vlásky *A. thaliana* mají mnoho výhod pro studium buněčné a vývojové biologie a fyziologie. Díky tomu, že se nacházejí na povrchu kořene, jsou lehce vizualizovatelné a během experimentů se s nimi snadno zachází. Nedostatečná vrstva kutikuly také umožňuje jednoduché použití fyzikálních a chemických sond. Nejsou ale nezbytné pro životaschopnost rostliny, což nám umožňuje izolovat a analyzovat různé typy mutantních rostlin, které mají změny ve funkci a vývoji kořenových vlásků (Grierson a Schiefelbein, 2002).

Vývoj kořenového vlásku u *A. thaliana* má několik strukturálních fází (Obr. 3B). První fází je stanovení polarity buňky trichoblastu a výběr místa pro růst vlásku na jejím bazálním konci. Dále následuje migrace jádra postupně do středu trichoblastu a do základny vyvíjejícího se vlásku. Ve vybraném místě nastane okyselení buněčné stěny, dojde k jejímu ztenčení a uvolnění, které vede k vytvoření boule (Carol a Dolan, 2002). Během druhé fáze dochází k pomalému růstu špičky z místa v oblasti boule. Třetí fáze začíná, když jsou vlásky dlouhé 20 až 40  $\mu\text{m}$  a zahrnuje zvýšení rychlosti růstu vlásků na 1 až 2  $\mu\text{m}$  za minutu (Dolan *et al.*, 1994). Jádro se přesouvá dále do rostoucího vlásku, probíhá rychlá exocytóza buněčné stěny a membránových komponentů lokalizovaných



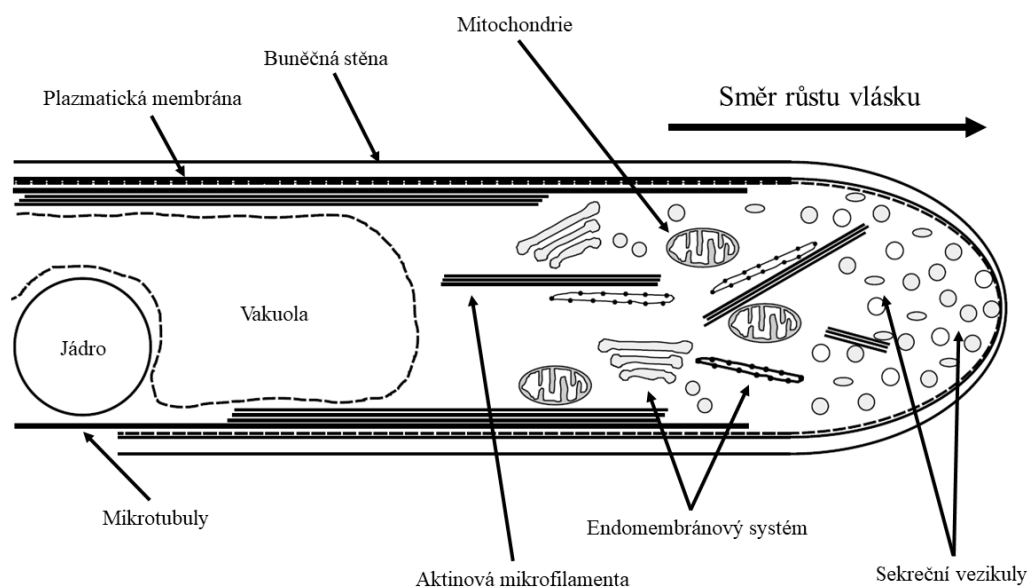
**Obrázek 3:** A) Snímek kořenového vlásku rostoucího z bazálního konce trichoblastu, měřítko 40  $\mu\text{m}$ , elektronová mikroskopie, upraveno podle Carol a Dolan, 2002. B) Schéma růstu kořenového vlásku, vytvořeno podle Grierson *et al.*, 2001.

na konci vlásků. V poslední fázi je kořenový vlásek plně vyvinutý a jeho růst je zastaven (Carol a Dolan, 2002). Vlázky u divokého typu dosahují délky okolo 0,8 mm, v závislosti na ekotypu a podmínkách růstu (Galway *et al.*, 1997). Díky rychlému polárnímu růstu a snadné vizualizaci jsou kořenové vlázky *A. thaliana* používány jako model pro zkoumání polárního růstu u rostlin.

### 2.3.1. Buněčná polarita a struktura vlásku

Buněčná polarita je obecně definovaná jako asymetrie v buňce neboli stav, při kterém je organizace kompartmentů uvnitř buňky asymetrická vůči určité ose. U rostlin je polarita buněk zásadní pro vývoj, růst a morfogenezi (Yang, 2008). Polární růst buněk můžeme popsat jako morfologický proces, při kterém se buňka prodlužuje v určitém směru. Typickým modelem pro pozorování polárního růstu jsou kořenové vlázky a pylová láčka.

Rostoucí kořenový vlásek má charakteristickou polarizovanou organizaci (Obr. 4). Ve špičce rostoucího vlásku je vrstva buněčné stěny a plazmatické membrány (Carol a Dolan, 2002). Dále následuje cytoplazma s nahromaděnými vezikulami. Jsou to hlavně vezikuly exocytózy, ale také endocytózy (Ovečka *et al.*, 2005). Za touto oblastí špičky se nacházejí další organely jako jsou mitochondrie, drsné a hladké endoplazmatické retikulum (ER), Golgiho aparát (GA) a plastidy (Carol a Dolan, 2002). Rostoucí kořenové vlázky mají kondenzované ER. Ke kondenzaci dochází už v trichoblastu, v místě, kde se iniciuje kořenový vlásek. Zůstává kondenzované, dokud



**Obrázek 4:** Schématické znázornění struktury apikální části kořenového vlásku. Upraveno podle Carol a Dolan, 2002.

vlásek nedosáhne své maximální délky a růst se nezastaví. Poté se ER vrací do své původní formy a je přítomno po celé délce vlásku (Ridge *et al.*, 1999). Podél ER se pak často shlukuje GA (Zheng a Chen, 2011). Jádro se také přesouvá ze své středové polohy v trichoblastu k místu iniciace a poté do rostoucího vlásku. Aktinová vlákna jsou lokalizována mezi sekrečními vezikulami v apikální části, kde tvoří svazky. Vezikuly a organely se nachází podél těchto svazků. Většina mikrotubulů je těsně pod plazmatickou membránou. Mikrotubuly a svazky aktinových vláken jsou orientovány rovnoběžně s podélnou osou vlásku (Galway *et al.*, 1997; Era *et al.*, 2009). Centrální vakuola vyplňuje bazální část rostoucího vlásku. Po ukončení růstu je vlásek rozsáhle vakuolizován po celé jeho délce a ve špičce se již nenachází exocytotické vezikuly (Galway *et al.*, 1997).

## **2.4. Faktory ovlivňující polární růst vlásku**

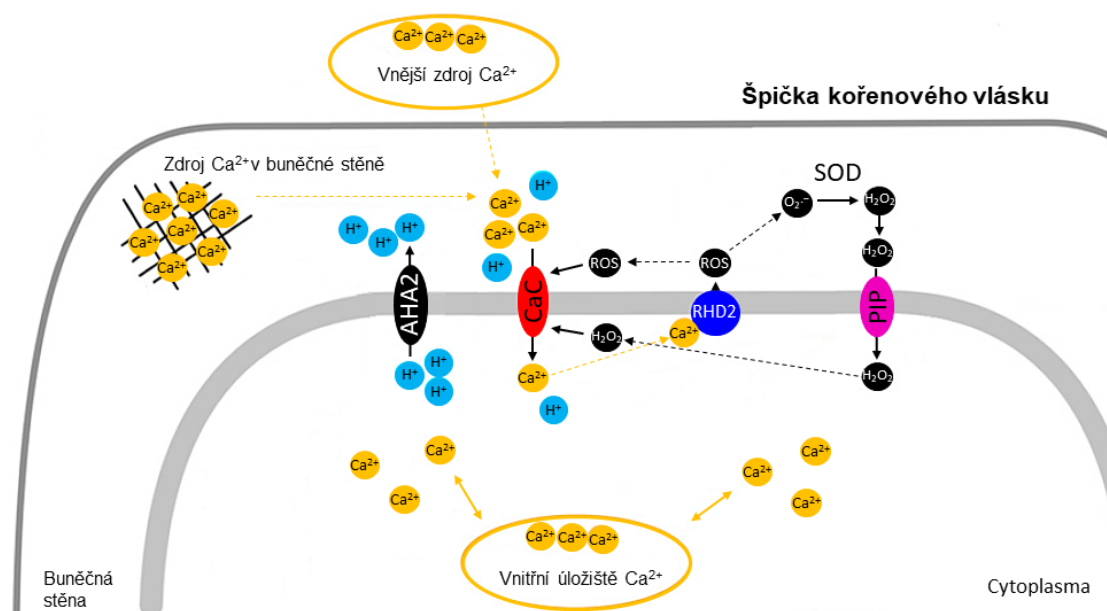
### **2.4.1. Regulace polárního růstu vlásku reaktivními formami kyslíku**

Růst a prodlužování buněk musí být regulováno, aby bylo dosaženo správného tvaru a velikosti. Důležitou roli v této regulaci polárního růstu hrají oscilující smyčky se zpětnou vazbou, kde jsou jednou z hlavních složek reaktivní formy kyslíku (ROS). Společně s vápenatými ionty ( $\text{Ca}^{2+}$ ) a pH udržují průběh polárního růstu (Obr. 5; Mangano *et al.*, 2016). ROS zahrnují singletový kyslík ( $^1\text{O}_2$ ), superoxidový anion ( $\text{O}_2^-$ ), peroxid vodíku ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) a hydroxylové radikály ( $\cdot\text{OH}$ ; Qi *et al.*, 2017).  $\text{H}_2\text{O}_2$  je nejstabilnější a vzniká z  $\text{O}_2^-$  v apoplastu reakcí katalyzovanou enzymem superoxid dismutasou (Mangano *et al.*, 2016). ROS mohou být produkovány uvnitř buňky (intracelulárně) a v apoplastu (extracelulárně). Intracelulární ROS jsou produkovány hlavně v chloroplastech, peroxisomech, glyoxysomech a v menší míře v mitochondriích. Apoplastické ROS jsou produkovány v rostlinách peroxidasami buněčné stěny, aminooxidasami, a hlavně NADPH oxidasami (NOX) lokalizovanými v plazmatické membráně (Qi *et al.*, 2017). Tyto rostlinné NOX jsou homologní s  $\text{gp91}^{\text{phox}}$ , což je podjednotka savčí NOX2. NOX jsou proteiny převádějící elektrony z NADPH na akceptor elektronů vedoucí k tvorbě ROS. U *A. thaliana* se vyskytuje 10 genů pro NOX, které jsou označovány jako ATRBOH (*Arabidopsis thaliana* respirační oxidasové homology; Jones *et al.*, 2007). Funkce většiny z nich byly objeveny a popsány. ATRBOH B je exprimována v embryu, kde se zapojuje do signalizace kyseliny abscisové (ABA) a podporuje dozrávání semen (Müller *et al.*, 2009). ATRBOH C je zodpovědná za tvorbu ROS v kořeni a kořenových vláscích (Foreman *et al.*, 2003). ATRBOH D vytváří ROS v odpovědi na stres indukovaný



endogenními molekulami (DAMPs; Liu a He, 2016) a je zapojena do signalizace ABA v endospermu (Penfield *et al.*, 2006). Také je společně s ATRBOH F důležitá při obranných reakcích rostliny proti patogenům (Torres *et al.*, 2002). ATRBOH E se zapojuje do vývoje pylu (Xie *et al.*, 2014). ATRBOH H/J jsou důležité při polárním růstu pylové láčky (Lassig *et al.*, 2014). ATRBOH I funguje v odpovědi na stres ze sucha (He *et al.*, 2017). Funkce ATRBOH A/G zatím nejsou známy.

Během polárního růstu vlásku je pro apikální zónu typický gradient  $\text{Ca}^{2+}$  v cytoplazmě a produkce apoplastických ROS (Obr. 5).  $\text{Ca}^{2+}$  jsou nezbytné k prodloužení buňky, protože výrazně stimulují exocytózu (Carroll *et al.*, 1998) a určují směr růstu (Bibikova *et al.*, 1997). Buňka přijímá  $\text{Ca}^{2+}$  z vnějšího prostředí, nebo jsou uloženy v buněčné stěně a kompartmentech (např. vakuoly). Z těchto míst jsou pak uvolňovány do cytosolu díky změnám apoplastického pH, řízených  $\text{H}^+$ -ATPasami (Mangano *et al.*, 2016).  $\text{H}^+$ -ATPasy (AHA) jsou elektrogenní pumpy exportující protony ( $\text{H}^+$ ) z buňky. Vytvářejí gradient  $\text{H}^+$  na vnější straně cytoplazmatické membrány (tedy kyselý apoplastický pH) a zároveň vytváří elektrický gradient, negativní membránový potenciál na vnitřní straně membrány (Falhof *et al.*, 2006), což umožňuje transport kationtů do buňky (Lew *et al.*, 1991). V kořenových vláscích je vysoce exprimována AHA2. Přes cytoplazmatickou membránu prochází  $\text{Ca}^{2+}$  díky vápníkovým kanálům (CaC). ROS, produkované ATRBOH C, tyto kanály aktivují zatím neznámým



**Obrázek 5:** Schéma zapojení RHD2, ROS,  $\text{Ca}^{2+}$  a pH do regulace a udržování růstu kořenového vlásku. Upraveno podle Mangano *et al.*, 2016.

mechanismem z vnější i vnitřní strany cytoplazmatické membrány. Z vnější strany jsou to apoplastické ROS (hlavně  $O_2^-$ ) a z vnitřní strany  $H_2O_2$ , který se do cytoplazmy dostává přes aquaporiny (PIPs; Mangano *et al.*, 2016). Pro správný polární růst kořenových vlásků je tedy nezbytná činnost ATRBOH C. Její činnost je dále regulována partnery, se kterými tvoří komplex, včetně  $Ca^{2+}$ , kinas a Rop (Rho-příbuzné GTPasy). Proteiny Rop je aktivují (Mangano *et al.*, 2016).

## 2.4.2. Strukturální steroly

Nepostradatelnou složkou plazmatické membrány jsou strukturální steroly. Jedná se o molekuly odvozené od isoprenoidů (Ovečka *et al.*, 2010). Nejvíce zastoupenými membránovými steroly jsou u vyšších rostlin  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol a kampesterol. Ve formě volných sterolů jsou součástí membránových lipidových dvojvrstev, kde interagují s některými typy fosfo- a sfingolipidů a mění tak fluiditu a permeabilitu membrán (Valitova *et al.*, 2016). Kromě svojí strukturální role mají i funkci regulační. Jsou prekurzory rostlinných hormonů brassinosteroidů, které jsou důležité při vývoji a růstu rostlin (Lindsey *et al.*, 2003). Dále se steroly přímo účastní tvorby specifických mikrodomén v membránách, nazývaných lipidové rafty (Valitova *et al.*, 2016). Ty potom slouží jako platformy pro komplexy signálních enzymů a jsou v nich mimo jiné lokalizovány NOX.

Důležitost sterolů při vývoji rostlin byla objasněna popsáním mutantů defektních v biosyntéze sterolů. Mutací genu pro FACKEL (sterol-C14-reduktasa) byly izolovány mutantní rostliny *fk*, které mají zkrácený hypokotyl a kotyledony napojené přímo na krátký kořen. Tento fenotyp je způsoben defektním buněčným dělením při embryogenezi (Schrack *et al.*, 2000). Mutantní rostliny *dwf7* (*dwarf7*) / *ste1* (*sterol1*) byly objeveny mutací sterol-C5(6)-desaturasy (Gachotte *et al.*, 1995; Choe *et al.*, 1999), *dwf5* mutací sterolreduktasy (Choe *et al.*, 2000) a *dim* (*diminuto*) / *dwf1* mutací sterolizomerasy/reduktasy (Klahre *et al.*, 1998). Všechny mají trpasličí fenotyp jako důsledek nedostatku brassinosteroidů (Choe *et al.*, 2000). Mutací sterolmethyltransferasy1 vznikají mutantní *smt1*, dochází u nich k poruchám buněčné polarita v kořeni a narušení gravitropismu (Willemsen *et al.*, 2003). *smt2;1* mají snížený růst a fertilitu, způsobenou mutací sterolmethyltransferasy2;1, která je důležitá pro udržování správného poměru kampesterolu a sitosterolu (Schaeffer *et al.*, 2001).

Pro strukturální steroly je specifická lokální akumulace v trichoblastech před a během vytváření boule a apikální akumulace v rostoucích kořenových vláscích. Tato

lokální akumulace slouží jako jeden z prvních ukazatelů určujících iniciační místo. Naproti tomu se nevyskytují ve vyvinutých vláscích. Strukturní steroly hrají důležitou roli při polárním růstu kořenových vlásků u *A. thaliana*, protože regulují vezikulární transport (Ovečka *et al.*, 2010), který zajišťuje velké množství materiálu potřebného pro růst buněčné stěny (Hepler *et al.*, 2001).

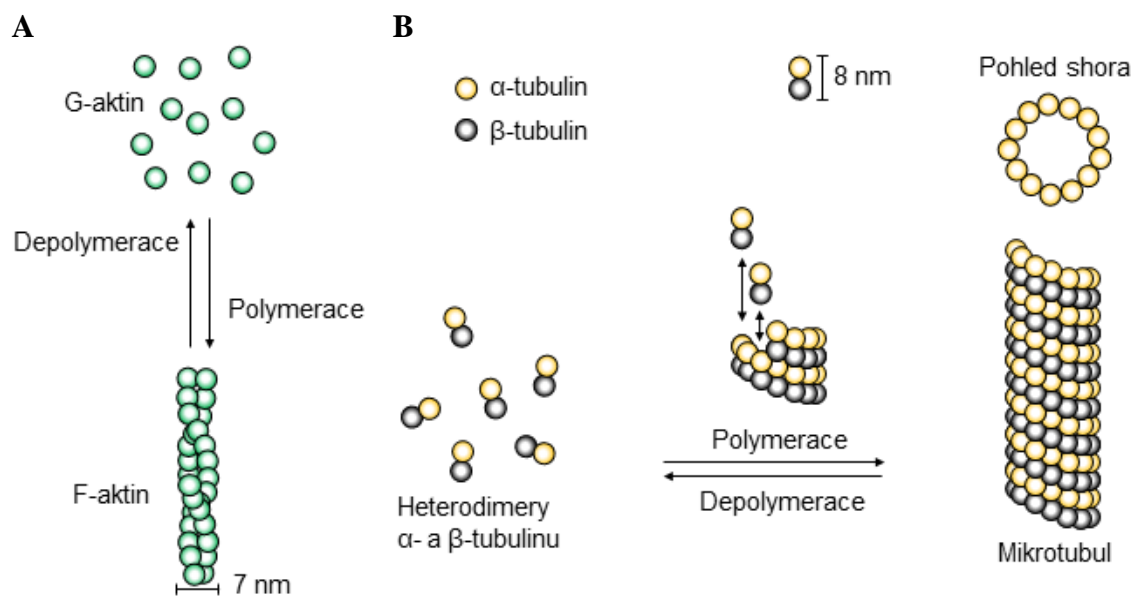
Hlavní formou vezikul v kořenových vláscích jsou sekreční vezikuly exocytózy (Ovečka *et al.*, 2005). Během exocytózy dochází ke splynutí vezikul s plazmatickou membránou. Je posledním krokem v sekreční dráze, která začíná v endoplazmatickém retikulu, prochází Golgiho aparátem a končí na vnější straně buňky (Battey *et al.*, 1999). Dále jsou to endocytotické vezikuly, které jsou vytvářeny za účelem dopravení přebytečného materiálu membrány a buněčné stěny zpět do cytosolu (Ovečka *et al.*, 2005).

### **2.4.3. Buněčný cytoskelet**

Cytoskelet rostlinných buněk je tvořen aktinovými mikrofilamenty a mikrotubuly. Dohromady vytváří flexibilní síť, která se výrazně podílí na buněčném růstu a polaritě. Mimo to je důležitý k udržení struktury buněk a je zapojen do buněčné morfogeneze z hlediska řízení směru růstu (Foreman a Dolan, 2001). Díky cytoskeletu může probíhat exocytóza, která je potřebná k dopravování komponent ke stavbě nové buněčné stěny. Dále hraje důležitou roli při migraci organel, signalizaci a dělení buňky.

Aktinové mikrofilamentum je tvořeno dvoušroubovicí F-aktinu, která vzniká polymerizací aktinu (Obr. 6A). Nepolymerizovaná globulární forma aktinu se označuje jako G-aktin. Polymerací a depolymerací aktinových vláken mohou buňky rychle změnit tvar cytoskeletu. Takové přeskupení aktinových vláken je regulováno řadou proteinů vázajících se na aktin (ABP; Ramachandran *et al.*, 2000). Do regulace dynamiky aktinového cytoskeletu během růstu špičky vlásku se společně zapojují profiliny a ADF (= aktinový depolymerizační faktor), které patří mezi tyto proteiny (Carol a Dolan, 2002). Profiliny se akumulují ve špičkách nově vznikajících kořenových vlásků (Baluška *et al.*, 2000), kde je jejich produkce důležitá k regulaci polymerace aktinu. Naproti tomu ADF usnadňuje depolymeraci aktinu (Carol a Dolan, 2002). Po vytvoření boule dochází k reorganizaci cytoskeletu a aktinová filamenta se výrazně akumulují v místě boule a poté ve špičce rostoucího vlásku. Při ošetření kořenů latrunculinem B (depolymerizuje F-aktin) se F-aktin neakumuluje v žádné s kořenových buněk a zastaví se růst vlásků (Baluška *et al.*, 2000). To dokazuje, že je aktin nezbytný k udržení růstu vlasových buněk.

Mikrotubuly jsou složeny ze svazků protofilamentů, vzniklých uspořádáním heterodimerů  $\alpha$ - a  $\beta$ -tubulinů (Obr. 6B). Stejně jako aktinový cytoskelet i mikrotubulový cytoskelet je vysoce dynamický v reakci na vnitřní i vnější podněty (Ma a Han, 2020). V kořenových vláscích se nachází dvě sítě mikrotubulů. Mikrotubuly spojené s plazmatickou membránou po celé délce vlásku a vnitřní svazky mikrotubulů mezi jádrem a špičkou (Foreman a Dolan, 2001). Mikrotubuly na začátku růstu vlásku v bouli chybí, ale v pozdějším stádiu, kdy migruje jádro do rostoucího vlásku, se ve vlásku objevují spojené s jádrem a jsou orientovány rovnoběžně s vláskem (Carol a Dolan, 2002). Při depolymeraci mikrotubulů (při ošetření oryzalinem) dochází k rozvětvení a vlnění vlásků, ale rychlost růstu zůstává stejná (Bibikova *et al.*, 1999). Mikrotubuly jsou tedy potřebné k udržení směru růstu, ale ne pro samotný růst špičky vlásku (Carol a Dolan, 2002).



**Obrázek 6:** Schéma polymerace a depolymerace A) aktinových filament, vytvořeno podle Oda *et al.*, 2009; B) mikrotubulů, vytvořeno podle Dumontet a Jordan, 2010.

## 2.5. Fenotypové projevy mutací genů zahrnutých ve vývinu kořenových vlásků u *Arabidopsis thaliana*

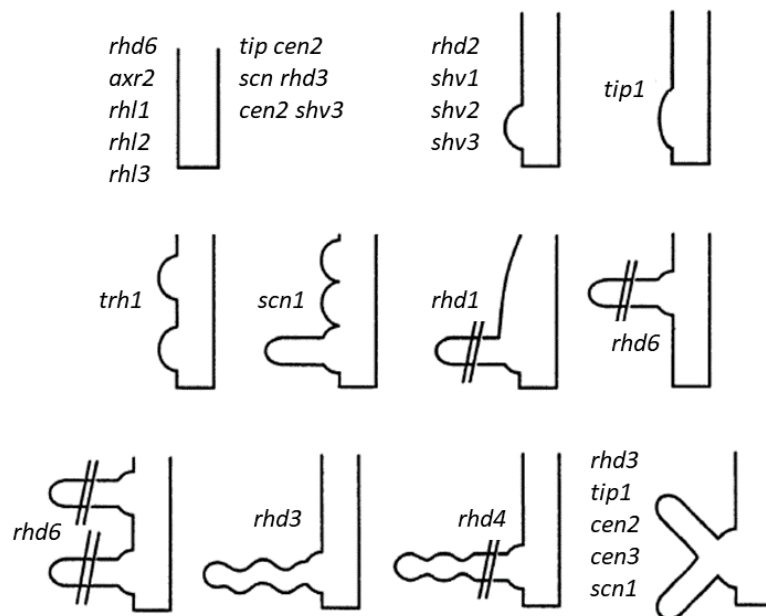
Studiemu mutací genů u *A. thaliana* byla objevena řada proteinů důležitých při vývoji kořenových vlásků. Mutace v těchto genech vedou k abnormalitám kořenových vlásků. Pozorujeme fenotypy s kořeny bez vlásků, nebo pouze s boulemi, nebo také kořeny mající krátké, široké, zvlněné, či rozvětvené vlásy (Obr. 7; Carol a Dolan, 2002). Několik genů ovlivňuje uspořádání buněk při diferenciaci a také kontrolují, jestli tyto buňky budou tvořit vlásy. Patří mezi ně *WER* (*WEREWOLF*), *TTG* (*TRANSPARENT TESTA GLABRA*), *ERH1* (*ECTOPIC ROOT HAIR*), *ERH3*. Například *WER* je transkripční faktor, který je exprimován pouze v budoucích atrichoblastech (Grierson *et al.*, 2001). Mutace v těchto genech způsobuje tvorbu vlásků většinou epidermálních buněk, tedy i buňkami, které je tvořit nemají (Galway *et al.*, 1994; Schneider *et al.*, 1997; Lee a Schiefelbein, 1999).

Geny, které ovlivňují iniciaci vlásků, ale ne diferenciaci buněk jsou *GL2* (*GLABRA2*) a *ERH2*. Zabraňují v atrichoblastech tvorbě vlásků bez jejich ovlivnění při diferenciaci (Grierson *et al.*, 2001). U mutantních rostlin se ztrátou funkce v těchto genech opět tvoří vlásy i většina atrichoblastů (Masucci a Schiefelbein, 1996; Schneider *et al.*, 1997). Mutace v genech *RHL1* (*ROOT HAIRLESS*), *RHL2*, *RHL3*, *RHD6* (*ROOT HAIR DEFECTIVE6*) a *AXR2* (*AUXIN RESISTANT2*) představují fenotyp s malým množstvím vlásků. Epidermis kořenů mutantních rostlin *rhl1*, *rhl2* a *rhl3* je dokonale hladká, bez známek iniciace kořenových vlasů (Masucci a Schiefelbein, 1994; Cernac *et al.*, 1997; Schneider *et al.*, 1997). *RHL1* je malý protein potřebný pro iniciaci (Schneider *et al.*, 1998). U mutantních rostlin *rhd6* a *axr2* se tvoří vlásy v různých pozicích podél vnějšího povrchu trichoblastu (Carol a Dolan, 2002).

*rhd2* (*root hair defective2*), *shv1* (*shaven*), *shv2* a *shv3* je skupina mutantních rostlin, mající fenotyp velmi krátkých kořenových vlásků. Vlásy začínají růst z trichoblastů, ale neprodlužují se (Schiefelbein a Somerville, 1990; Parker *et al.*, 2000). Mutantním rostlinám *rhd3* rostou krátké zvlněné a občas rozvětvené vlásy. *rhd4* vytváří krátké vlásy s různým průměrem po celé délce a během procesu prodlužování vytvářejí různé boule a zúžení (Schiefelbein a Somerville, 1990). Buňky rostlin divokého typu tvoří jednu bouli, vyvíjející se ve vlásce. Rostliny bez *SCN1* (*SUPERCENTIPEDE1*) mají buňky až s pěti boulemi (Parker *et al.*, 2000). Mutace v *TRH1* (*TINY ROOT HAIR1*) způsobují také větší množství boulí (Rigas *et al.*, 2001). *SCN1*, *CEN1* (*CENTIPEDE*),

*CEN2* a *TIP1* (*TIP GROWTH DEFECTIVE1*) zajišťují, aby z trichoblastu rostl jeden vlásek. Jejich mutací se z jednoho iniciačního místa tvoří více vlásků (Schiefelbein *et al.*, 1993; Parker *et al.*, 2000). *tip1* a *rhd1* rostliny mají velmi široké vyboulení v místě, kde vlásek začíná svůj růst. U *tip1* je zvětšení až 3x oproti divokému typu a u *rhd1* zabírá vyboulení většinu povrchu buňky (Grierson *et al.*, 2001).

Studie dvojitých mutantů potvrzují role genů zjištěné jednoduchými mutacemi, dále odhalují další role, které nejsou z jednoduchých mutací zjevné, nebo funkční vztahy mezi geny (Parker *et al.*, 2000). Funkce *RHD6* je podřízená genům *GL2* a *TTG* (Masucci a Schiefelbein, 1996). Mutace *rhd6* je dále nadřazená mutacím, jako je *rhd2-2*, *shv3*, *tip1-2* a dalším. Rostliny mají fenotyp velmi malého množství vlásků. Dále byl objeven efekt společného fungování mezi mutacemi *tip1* a *cen2*, *cen2* a *shv3*, *scn1* a *rhd3*. Tyto dvojité mutace brání tvorbě kořenových vlásků a ukázaly, že *TIP1*, *CEN2* a *SHV2* postihují tvorbu vlásků v dřívější fázi růstu, než bylo zjištěno u jednoduchých mutací. Rostliny mají téměř hladké kořeny bez vlásků. *TIP1* omezuje velikost vyboulení mechanismem, do kterého je zahrnut i *RHD1* (Parker *et al.*, 2000). Toto je jen pár z mnoha příkladů, proč jsou důležité studie dvojitých mutantů.

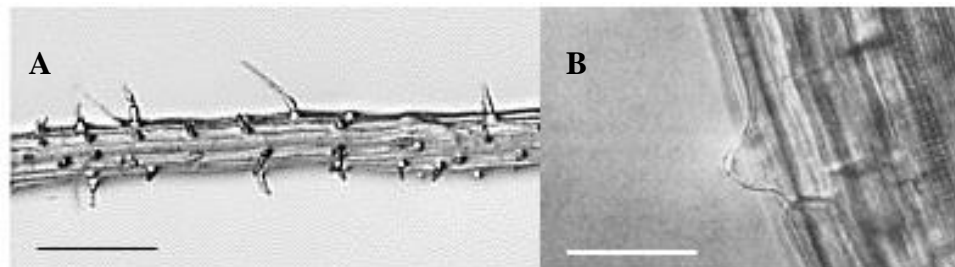


**Obrázek 7:** Ilustrační znázornění vybraných fenotypových projevů mutací genů zahrnutých ve vývinu kořenových vlásků u *A. thaliana*. Upraveno podle Grierson *et al.*, 2001.

## 2.6. Vybraní mutanti *Arabidopsis thaliana*

### 2.6.1. Mutant *rhd2*

Mutantní rostliny *rhd2* jsou defektní v příjmu  $\text{Ca}^{2+}$ , čímž je narušen polární růst a vykazují tak fenotyp velmi krátkých kořenových vlásků (Obr. 8; Foreman *et al.*, 2003).  $\text{Ca}^{2+}$  stimuluje exocytózu spojenou s prodlužováním buňky (Carroll *et al.*, 1998). Fenotyp *rhd2* je způsoben mutací At5g51060, což je gen pro ATRBOH C, také označována jako RHD2 (ROOT HAIR DEFECTIVE2). Transkript RHD2 je u divokého typu přítomen v epidermis v oblastech meristému, v prodlužovací zóně, v diferenciací zóně a v prodlužujících se kořenových vláscích. RHD2 produkuje ROS, které dále aktivují vápníkové kanály (Foreman *et al.*, 2003). Dochází k přílivu  $\text{Ca}^{2+}$ , které se podílí na modulaci dynamiky aktinu (usnadňuje např. jeho depolymeraci; Pei *et al.*, 2012) a dalších procesů potřebných pro růst. Lokální tvorba ROS v místě růstu může být také součástí mechanismu stanovujícího polaritu vlásků. Mutantní rostliny mají tedy poruchu v produkci ROS, která způsobuje nefunkční mechanismus přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  přes vápníkové kanály. To znamená, že RHD2 je potřebná ke stimulaci přílivu  $\text{Ca}^{2+}$ . Vrcholy kořenů *rhd2* produkuje přibližně poloviční množství ROS produkovaných divokým typem, což je v souladu se sníženou aktivitou NOX u mutantu *rhd2*. U divokého typu dochází ke zvýšené akumulaci ROS v oblasti boule a poté v apikální špičce vlásku. Naproti tomu u *rhd2* k žádné akumulaci ROS nedochází. Při ošetření kořenů *rhd2* pomocí ROS dochází k přílivu  $\text{Ca}^{2+}$  a částečnému potlačení mutantního fenotypu (Foreman *et al.*, 2003). Bylo také zjištěno, že  $\text{Ca}^{2+}$  stimuluje aktivitu RHD2, je zde tedy pozitivní zpětná vazba (Takeda *et al.*, 2008).



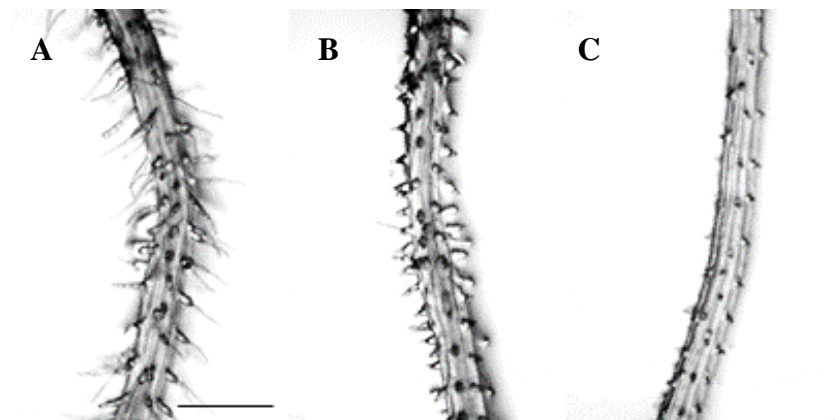
**Obrázek 8:** A) Fenotyp kořene mutantu *rhd2*, měřítko 300  $\mu\text{m}$ , upraveno podle Ringli *et al.*, 2005. B) Detailní pohled na zastavený růst vlásku mutantu *rhd2*, měřítko 50  $\mu\text{m}$ , upraveno podle Schiefelbein a Somerville, 1990.

## 2.6.2. Mutant *der1*

Geny pro aktin u *A. thaliana* slouží jako skvělý modelový systém ke studiu rostlinných aktinů. U *A. thaliana* je silně exprimováno 8 genů pro aktin, které lze rozdělit do dvou tříd exprimovaných převážně ve vegetativních nebo reprodukčních orgánech a tkáních. Mezi reprodukční izoformy aktinu patří ACT1 (ACTIN1), ACT3, ACT4, ACT11 a ACT12 a jsou silně exprimovány v pylové láčce, kde pravděpodobně řídí její růst. Vegetativní izoformy aktinu ACT2, ACT7 a ACT8, jsou exprimovány hlavně v kořenech, stoncích a listech klíčících sazenic, mladých rostlin i dospělých rostlin (Meagher *et al.*, 1999).

Provedením EMS mutagenese na semenech *A. thaliana* ekotypu C24 byly získány a izolovány mutantní rostliny *der1-9* (*deformed root hairs*; Ringli *et al.*, 2002; Ringli *et al.*, 2005). Pro *der1* bylo identifikováno několik alelických mutantů pojmenovaných *der1-1* až *der1-3*, mezi kterými je pozorován jasný rozdíl v síle fenotypu. *der1-2* a *der1-3* mají mnohem výraznější fenotyp než *der1-1* (Obr. 9). Vlázky mají velmi krátkou délku a obvykle se nevyvíjí dále než do počátečního vyboulení. Boule bývají špatně umístěné a zvětšují se přes velkou část buňky (Ringli *et al.*, 2002). Samotné kořeny se výrazně neliší svojí délkou od divokého typu C24, kořeny mutantu *der1-3* ale vykazují vlnitý vzor spojený s vyššími frekvencemi posunutých rovin dělení (<90°) v kořenových buňkách (Vaškebová *et al.*, 2018).

Pomocí mapovacího klonování lokusu *DER1* se zjistilo, že je mutace způsobena jednobodovou mutací genu kódujícího ACT2. Z charakteristiky fenotypu *der1* lze vyvodit, že ACT2 se podílí na růstu špičky kořenových vlásků a je nezbytný pro správný výběr místa iniciace v trichoblastu. Mutanti *der1* jsou tedy užitečnými nástroji pro lepší



**Obrázek 9:** Fenotyp kořenů mutantů *der1-1* (A.), *der1-2* (B) a *der1-3* (C), měřítko 1 mm. Upraveno podle Ringli *et al.*, 2002.

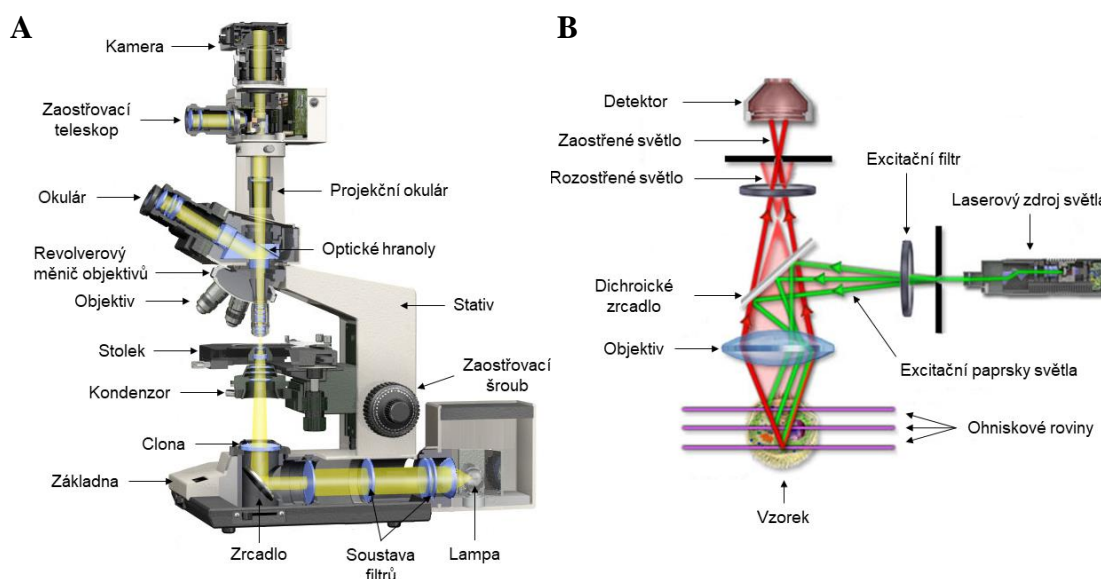


pochopení funkce aktinového cytoskeletu při růstu kořenových vlásků. Navíc výskyt tří alelických mutantů s různou mírou fenotypu poskytuje prostředky ke studiu účinku částečně funkčního ACT2 (Ringli *et al.*, 2002).

## 2.7. Vybrané mikroskopické metody

### 2.7.1. Světelná a fluorescenční mikroskopie

Mikroskopie patří mezi nejběžnější metody pozorování v biologických oborech. Umožňuje nám lépe pozorovat samotné buňky, pletiva a morfologické znaky rostlin, které nejsou viditelné pouhým okem. Základním typem je světelná mikroskopie (Obr. 10A). Součástí světelného mikroskopu je světelný zdroj, odkud vychází světlo, které je usměrňováno pomocí soustavy čoček a dopadá na zkoumaný vzorek. Od vzorku se světlo odráží, nebo jím prochází do objektivu a okuláru. Ze světelné mikroskopie vychází i fluorescenční metody. Při fluorescenční mikroskopii se svítí na vzorek zářením o určité vlnové délce a poté se snímá emitované světlo ze vzorku. Zdroj světla – lampa vytváří světelné paprsky, které jsou filtrovány excitačním filtrem na určitou vlnovou délku. Poté se záření odráží od dichroického zrcadla a dopadá seshora na vzorek. Dochází k excitaci fluoroforů ve vzorku a emitované záření se vrací zpět, prochází přes dichroické zrcadlo a emisní filtr do okuláru nebo detektoru. Mezi pokročilé fluorescenční metody patří konfokální laserová skenovací mikroskopie (CLSM; Obr. 10B). Konfokální mikroskop



Obrázek 10: A) Schéma základního světelného mikroskopu a B) schéma konfokálního fluorescenčního mikroskopu. Upraveno podle <https://www.olympus-lifescience.com>.

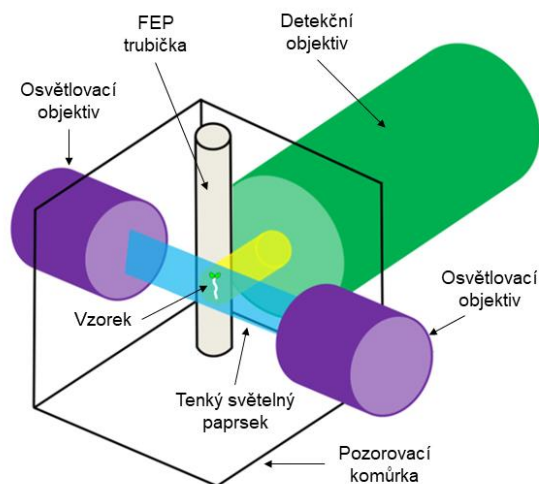
má jako světelný zdroj laser. Jedná se o monochromatický zdroj světla, tedy zdroj záření o jedné vlnové délce. Světlo je zaostřeno na vzorek do jednoho bodu v jedné rovině a zbytek rovin je odfiltrován. Takto lze bod po bodu nasnímat celý vzorek, v různých rovinách a vytvořit tak sérii řezů, které poté mohou být použity k sestavení 3D obrazu vzorku. CLSM byla po dlouhou dobu nejoblíbenější metoda pro fluorescenční zobrazování fixovaných i živých vzorků (Tichá *et al.*, 2020).

Nevýhodou je, že intenzita excitačního světla používaná při konfokální a epifluorescenční mikroskopii je poměrně vysoká, způsobuje fototoxicitu a bělení fluoroforů a není tak použitelná pro dlouhodobé zobrazovací experimenty. Dále jsou tyto mikroskopické metody omezeny hloubkou zobrazení a není tak možné pozorovat hlubší vrstvy tkání v rostlinných orgánech (Ovečka *et al.*, 2015).

### **2.7.2. Light-sheet fluorescenční mikroskopie**

Vývoj dynamických subcelulárních změn v celých rostlinných orgánech lze dlouhodobě sledovat pomocí light-sheet fluorescenční mikroskopie (LSFM). Jedná se o fluorescenční mikroskopickou metodu umožňující vysokorychlostní zobrazování (Komis *et al.*, 2018). Vzorek je osvětlován velmi tenkým světelným paprskem, který je orientován kolmo k detekční dráze (Obr. 11). Dochází k excitaci fluoroforů pouze v objemu této tenké vrstvy paprsku, čímž je eliminována rozostřená excitace fluoroforů a emise světla. Energie excitačního zdroje použitá při light-sheet mikroskopii bývá o několik řádů nižší než v epifluorescenčních nebo konfokálních mikroskopech a tím se fototoxicita a bělení fluoroforů minimalizuje (Ovečka *et al.*, 2015).

Mikroskopy, u kterých jsou pracovní stoly pro upevnění vzorků v horizontální poloze, mají omezené využití při dlouhodobém snímání růstu rostlin. Rostliny jsou totiž v tomto případě v nepřírozené poloze. Růst konkrétních typů buněk, jako jsou kořenné vlásky, je navíc extrémně citlivý na namáhání při přípravě vzorků a na intenzitu osvětlení. S ohledem na tyto okolnosti byla vyvinuta metoda, při níž lze pozorovat rostoucí rostliny pomocí light-sheet mikroskopu ve vertikální poloze. Při této metodě jsou semena nebo sazenice rostlin umístěny do pevného média ve skleněné kapiláře nebo trubičce fluorované ethylenem a propylenem (FEP). Rostlina pak roste volně v médiu, což je výhoda oproti klasické přípravě vzorku, kdy je rostlina v těsném prostoru mezi dvěma mikroskopickými skly (Ovečka *et al.*, 2005; Ovečka *et al.*, 2015).

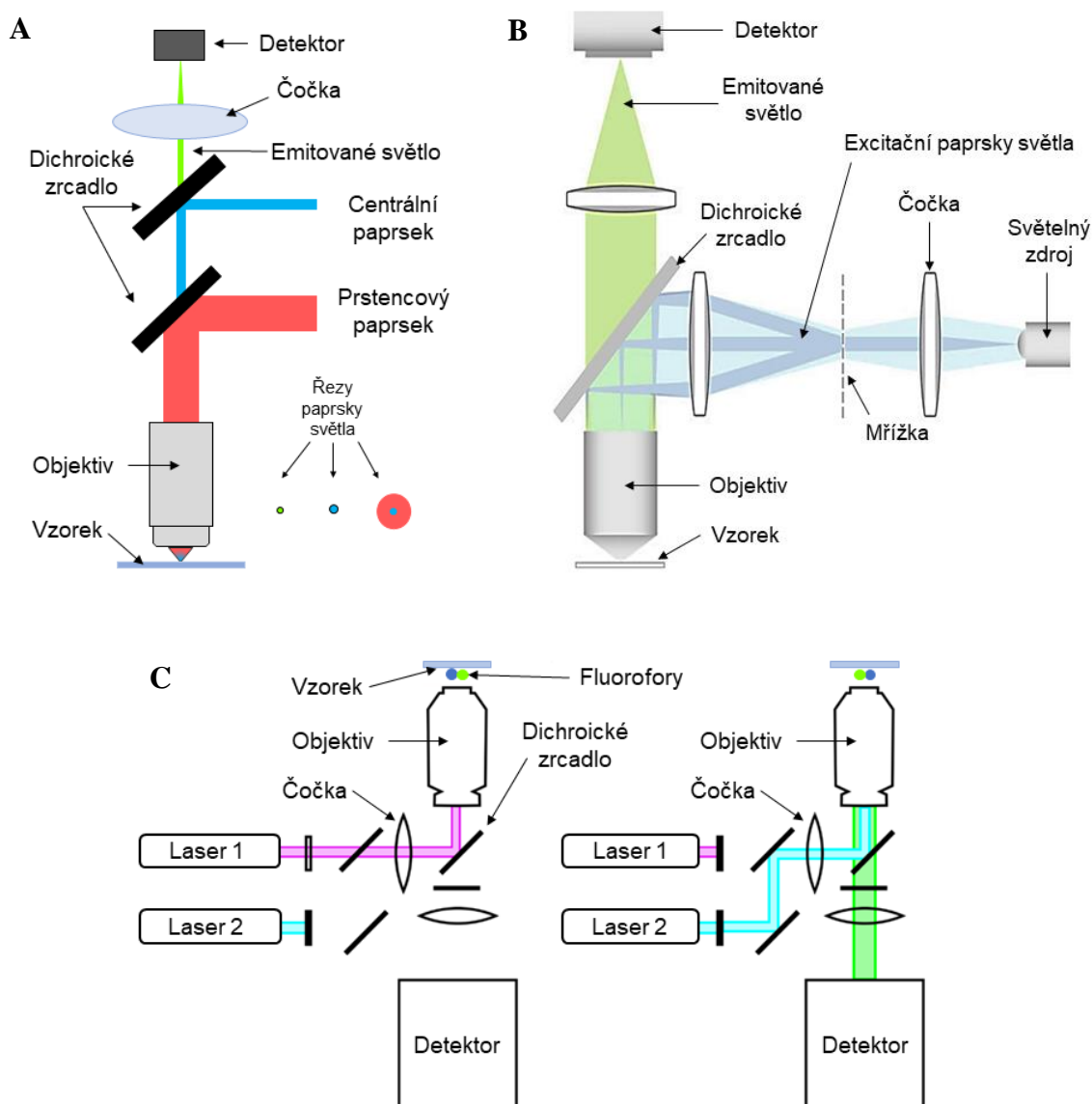


**Obrázek 11:** Schéma LSFM mikroskopu. Upraveno podle Ovečka *et al.*, 2015.

### 2.7.3. Super-rozlišovací mikroskopie

Strukturu buněk lze už v dnešní době zkoumat v nanoměřítku s použitím super-rozlišovacích metod. Jedná se o souhrn různých technik ohýbajících nebo překonávajících difrakční omezení, které jsou limitující pro rozlišení klasických mikroskopů. Rozlišení u těchto klasických mikroskopů je přímo úměrné vlnové délce excitačního světla a nepřímo úměrné numerické apertuře čočky. Jednou z hlavních kategorií mikroskopů s vysokým rozlišením využívá technik, které osvětlují vzorek strukturovaným světlem (Komis *et al.*, 2018). Do této kategorie patří mikroskopie snižující stimulaci emise (STED), která využívá centrální paprsek k excitaci vzorku a prstencovitý paprsek k navrácení excitovaných fluoroforů do základního stavu, kromě toho centrálního (Obr. 12A). Dále mikroskopie se strukturovaným osvětlením (SIM), která vzorek osvětluje strukturovaným světlem (Obr. 12B; Tichá *et al.*, 2020). SIM se využívá při pozorování živých buněk jakékoli velikosti, může vizualizovat různé struktury buněk jako jsou mikrodomény plazmatické membrány, aktinová filamenta, mikrotubuly a je dostatečná k zachycení dynamických událostí jako výkyvy délek mikrotubulů (Komis *et al.* 2014; Komis *et al.* 2018). Druhá hlavní kategorie super-rozlišovacích technik je založena na lokalizování jedné molekuly. Mezi ně patří stochastická rekonstrukční mikroskopie (STORM), pomocí které dosáhneme až 10 nm rozlišení pomocí přepínání fotografií různých fluorescenčních sond (Tichá *et al.*, 2020). Fluorofory se neaktivují a neexcitují současně, ale postupně pomocí laserů o odlišné

vlnové délce, aby byly jednotlivě lokalizovány a odděleny (Obr. 12C; Xia a Fu, 2018). Pro dosažení dobré kvality obrazu ale musí být vzorky fixovány a navázány s toxickým pufrem. Velký potenciál při studiu vývoje rostlin mají také hybridní systémy kombinující CLSM se super-rozlišením, CLSM s LSFM, nebo LSFM se SIM. (Tichá *et al.*, 2020).



**Obrázek 12:** A) Schéma STED mikroskopu, upraveno podle Blom a Widengren 2014. B) Schéma SIM mikroskopu, upraveno podle Appelt a Heintzmann, 2013. C) Schéma STORM mikroskopu, upraveno podle Xia a Fu, 2018.

## 2.8. Nejpoužívanější fluorescenční proteiny

Zelený fluorescenční protein (GFP) pochází z medúzy *Aequorea victoria* (Shimomura *et al.*, 1962) a je jedním z nejvíce studovaných a využívaných proteinů v biochemii a buněčné biologii. GFP je dobrým „markerem“ genové exprese a proteinů v nepoškozených buňkách a organismech díky jeho schopnosti generovat vysoce viditelný fluorofor (Tsien, 1998). Po tom, co byla poprvé ukázána jeho aplikace jako fluorescenčního „markeru“ pro značení *in vivo* v roce 1994 (Chalfie *et al.*, 1994) vzrostl zájem o strukturu, biochemické a fyzikální vlastnosti fluorescenčních proteinů (FP) podobných GFP. Vzniklo velké množství vědeckých publikací o FP a jejich použití při základním výzkumu v molekulární a buněčné biologii (Chudakov *et al.*, 2010). Byla objevena řada dalších proteinů podobných GFP u dalších evolučně vzdálených druhů, jako jsou třeba žebertatky (Haddock *et al.*, 2010). Vedle GFP bylo objeveno také několik jeho dalších modifikovaných variant, jako červený DsRed (Matz *et al.*, 1999).

GFP, jeho mutantní varianty a homology různých barev se dnes různě využívají ke studiu v živých organismech. Barevná škála FP pokrývá téměř celé viditelné spektrum od fialové po červenou, což nám umožňuje i použití více barev současně (Chudakov *et al.*, 2010). Pro fialovou část spektra je to fialovomodrý FP Sirius (Tomosugi *et al.*, 2009). V modré části jsou to např. EBF (Heim a Tsien, 1996) a Azurite (Mena *et al.*, 2006), v tyrkysové např. Cerulean (Rizzo *et al.*, 2004), v zelené GFP a jeho vylepšené verze (Heim *et al.*, 1995; Cormack *et al.*, 1996) nebo Emerald GFP (Cubitt *et al.*, 1999). Ve žluté části jsou to např. TagYFP (Qiu *et al.*, 2008) nebo Citrine (Griesbeck *et al.*, 2001), v oranžové mOrange (Shaner *et al.*, 2004) a v červené DsRed (Matz *et al.*, 1999) nebo TagRFP (Merzlyak *et al.*, 2007), který je nejjasnější z červených FP.

Pro zobrazení studovaného proteinu pomocí FP technologie se musí daný protein z rostliny izolovat a společně s genem pro vybraný FP a určitým promotorem naklonovat do plazmidu. Tento plazmid se stabilní transformací začlení do rostliny, která pak exprimuje studovaný protein fúzovaný s FP. Vzorky z těchto rostlin poté můžeme pozorovat některou z fluorescenčních technik.

### 3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

#### 3.1. Materiál

##### 3.1.1. Chemikálie

- 70% ethanol (Penta)
- 96% ethanol (Penta)
- Chlorid vápenatý (Sigma-Aldrich)
- Destilovaná voda
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Dusičnan draselný (Sigma-Aldrich)
- Gellan gum (Thermo Fisher)
- Heptahydrát síranu hořečnatého (AppliChem)
- Heptahydrát síranu zinečnatého (Sigma-Aldrich)
- Heptahydrát síranu železnatého (Sigma-Aldrich)
- Hexahydrát chloridu kobaltnatého (Penta)
- Hydroxid draselný (Sigma-Aldrich)
- Hydroxid sodný (Sigma-Aldrich)
- Hypochlorid sodný (Sigma-Aldrich)
- MilliQ voda
- MES-pufr (Sigma-Aldrich)
- MS médium (Sigma-Aldrich)
- Dihydrát Molybdenanu sodného (Sigma-Aldrich)
- Na<sub>2</sub>EDTA (Sigma-Aldrich)
- Kyselina boritá (Sigma-Aldrich)
- Pentahydrát síranu měďnatého (Sigma-Aldrich)
- Sacharosa (Sigma-Aldrich)
- Tetrahydrát chloridu manganatého (AppliChem)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Sigma-Aldrich)
- Tween-20 (Sigma-Aldrich)

### 3.1.2. Roztoky a média

#### Pevné ½ MS (Murashige and Skoog) médium

3 g·l<sup>-1</sup> MS médium

10 g·l<sup>-1</sup> Sacharosa

1 g·l<sup>-1</sup> MES pufr

6 g·l<sup>-1</sup> Gellan gum

MilliQ H<sub>2</sub>O, pH 5,7, sterilizováno autoklávováním

#### Roztok na povrchovou sterilizaci semen (100 ml)

10 ml 10% hypochlorid sodný

90 ml destilovaná voda

pár kapek Tween-20

#### Tekuté ARA médium (modifikované médium pro *Arabidopsis*; 100 ml)

10 ml zás. roztok Makro prvků

0,1 ml zás. roztok Mikro prvků (přidáno až po sterilizaci)

1 ml zásobní roztok Fe

1,11 mg CaCl<sub>2</sub>

1 g Sacharosa

88,9 ml MilliQ voda

pH 5,7, sterilizováno autoklávováním

#### 10x koncentrovaný zásobní roztok Makro prvků (1000 ml)

5,06 g KNO<sub>3</sub>

3,40 g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

4,93 g MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

4,72 g Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O

### **1000x koncentrovaný zásobní roztok Mikro prvků (250 ml)**

1,075 g	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>
560 mg	MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O
32,5 mg	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O
12,5 mg	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O
145 mg	NaCl
72,5 mg	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O
0,625 mg	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O

### **100x koncentrovaný zásobní roztok Fe (50 ml)**

186,1 mg	Na <sub>2</sub> EDTA
55,75 mg	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O

### **3.1.2. Přístroje**

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Waga Elektroniczen)
- Autokláv – parní sterilizátor (Sterivap, MMM Group)
- Fytotron (WEISS Gallenkamp)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO, Germany)
- Laboratorní chladnička (Electrolux, Space Plus, ERB 34633W)
- Laboratorní váhy (S1502, BEL-Engineering)
- Laminární box (Faster, FERRARA Italy)
- Skener (Image Scanner III)
- Stolní pH metr (TEMP RS232, PL-600 pH/mV/Temp Meter, EZODO)
- Epifluorescenční mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS Germany, operační program ZEN Black 2012)

### **3.1.3. Rostlinný materiál**

Semena *Arabidopsis thaliana* divoký typ Columbia (Col-0)

Semena *Arabidopsis thaliana* mutantní linie *rh2-1* (*root hair defective2*)



Semena *Arabidopsis thaliana* transgenní linie Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 (transformace *rhd2-1* mutanta; Takeda *et al.*, 2008) – N-terminální fúze s GFP pod nativním RHD2 promotorem a terminátorem

## 3.2. Metody

### 3.2.1. Příprava kultivačního média pro *in vitro* kultivaci rostlin

- K *in vitro* kultivaci rostlin *A. thaliana* bylo použito MS (Murashige & Skoog) médium připravené v poloviční koncentraci bez přídavku vitamínů.
- Do kádinky s 200 ml MilliQ vody bylo přidáno 0,75 g MS média, 2,5 g sacharosy a 0,25 g MES pufru za stálého míchání pomocí elektromagnetické míchačky. MS médium je zdrojem mikro a makro prvků, sacharosa slouží jako zdroj uhlíku a MES pufr k udržení stabilního pH.
- Dále bylo upraveno pH pomocí 1M KOH na hodnotu 5,7 a celý objem byl přelit do uzavíratelné láhve.
- Nakonec bylo přidáno 1,5 g Gellan gum, který nahrazuje agar ke ztuhnutí média a celkový objem byl doplněn MilliQ vodou na 250 ml.
- Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu (teplota 121 °C, přetlak 1,2 kg·cm<sup>-2</sup>) a po 50 ml rozlito v laminárním boxu do sterilních Petriho misek.
- Po zatuhnutí média byly Petriho misky zalepeny páskou a skladovány při 4 °C.

### 3.2.2. Příprava tekutého ARA média

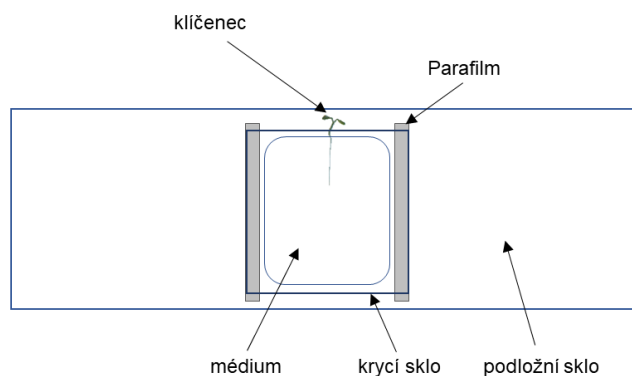
- Do kádinky bylo nalito 10 ml ze zásobního roztoku Makro prvků a 1 ml ze zásobního roztoku Fe. Následně bylo přidáno 11,1 mg chloridu vápenatého a 1 g sacharosy. Vše bylo promícháváno pomocí elektromagnetické míchačky.
- Dále byl objem doplněn o 88,9 ml MilliQ vody a pomocí 0,1 M KOH bylo upraveno pH na hodnotu 5,7.
- Připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu (teplota 121 °C, přetlak 1,2 kg·cm<sup>-2</sup>). Po vyautoklávování bylo v laminárním boxu přes sterilní membránový filtr přidáno 0,1 ml ze zásobního roztoku Mikro prvků.
- Takto připravené médium bylo uchováno v uzavřené láhvi při 4 °C.

### 3.2.3. Povrchová sterilizace a výsev semen

- Do prázdné zkumavky typu Eppendorf bylo nasypáno potřebné množství semen dané linie.
- Další postup probíhal v laminárním boxu. Následně byl do zkumavky se semeny přidán 1 ml 70% ethanolu a semena byla promývána 2 minuty.
- Poté bylo odebráno 0,5 ml a byl přidán 1 ml 1% hypochloridu sodného s kapkou Tween-20. Takto byla semena protřepávána po dobu 8 min.
- Nakonec byl celý objem bez semen odpipetován a semena byla promyta 3x 1 ml sterilní MilliQ vody.
- Následně byla semena vyseta za sterilních podmínek pomocí automatické pipety na pevné ½ MS médium v Petriho miskách. 20 µl špičky pro pipetu byly sestříhány, aby otvorem prošlo vždy jedno semeno. Semena se pipetou nasála a byla jednotlivě vysázena na médium.
- Poté byla stratifikována 2 dny při 4 °C v chladničce a následně kultivována ve fytotronu (21 °C, fotoperioda 16/8 h světlo/tma).

### 3.2.4. Příprava preparátů ke snímání růstu kořenových vlásků

- Preparáty byly připraveny podle následujícího protokolu (Ovečka *et al.*, 2005)
- Skleněná kyveta, podložní a krycí skla byla sterilizována 96% ethanolem ve flowboxu po dobu 30 min.
- Na suchá podložní skla byly uprostřed vertikálně připevněny 2 tenké proužky Parafilmu, které od sebe byly vzdáleny na délku krycího skla. Tyto pásky Parafilmu slouží k upevnění krycího skla a k vytvoření prostoru mezi krycím sklem a podložním sklem pro pozorovanou rostlinu. Dále mezi tyto pásky byla napipetována kapka tekutého ARA média (asi 10 µl).
- Třídenní klíčenec *A. thaliana* byl pomocí pinzety přenesen na podložní sklo, do kapky tekutého ARA média.
- Poté byl opatrně přikryt krycím sklem pod úhlem 45° tak, aby byl zakrytý celý kořen až po hypokotyl a nadzemní část byla nepřikrytá (viz. Obr. 13).
- Takto připravené preparáty byly dány do skleněné kyvety s tekutým ARA médiem a kultivovány do druhého dne ve fytotronu.



**Obrázek 13:** Schéma preparátu připraveného ke kultivaci.

- Před samotným pozorováním pomocí mikroskopu bylo krycí sklo ještě přelepeno tenkými proužky Parafilmu vertikálně i podélně přes nadzemní část rostliny, aby nedocházelo k odpařování tekutého média během snímání.

### 3.2.5. Analýza a zpracování dat

- Rostliny byly skenovány každých 24 h přímo na Petriho miskách pomocí skeneru Image Scanner III 1. – 5. den a 8. – 12. den od vyklíčení.
- Získané snímky ze skeneru byly použity pro měření délky primárního kořene a bočních kořenů pomocí softwaru ImageJ.
- Veškeré grafy byly zpracovány v programu Microsoft Excel 2016 a naměřená data vyhodnocena v programu Statistica 13.4.0.
- Snímky z epifluorescenčního mikroskopu (ZEISS Axio Imager M2) byly zpracovány pomocí programů ZEN blue 3.3 a Microsoft PowerPoint 2016

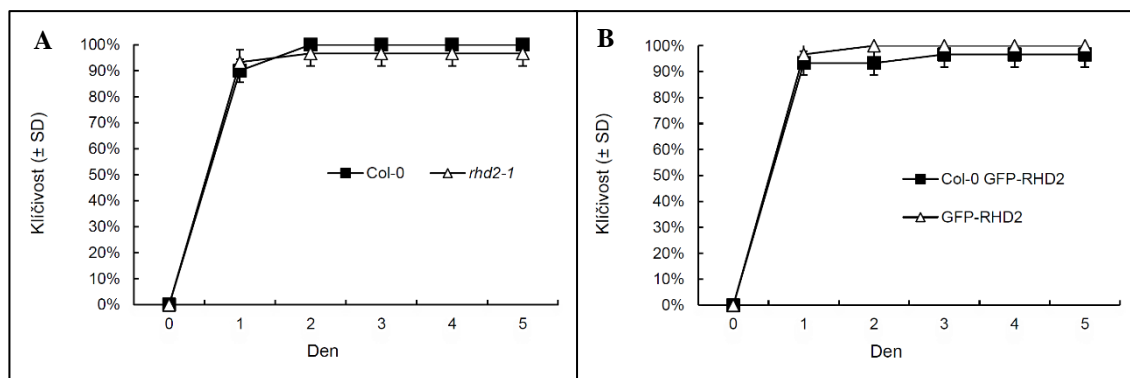
## 4. VÝSLEDKY

Rostliny *Arabidopsis thaliana* linie Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 byly pěstovány v *in vitro* kontrolních podmínkách na ½ MS médiu a byly skenovány vždy s 24 h intervalem první až pátý den a osmý až dvanáctý den od vyklíčení. Celkem bylo vyseto 30 semen od každé linie. V jedné misce bylo na první polovině vysázeno vždy 10 semen linie Col-0 a na druhé polovině 10 semen linie *rh2-1*. V další misce byly vysety stejným způsobem linie Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2. Zmíněné rozložení sloužilo k lepšímu porovnání linií mezi sebou a celkem byly použity 3 biologické repliky. Z naskenovaných obrazových dat byla vypočítána klíčivost, průměrná délka primárního kořene, denní přírůstek primárního kořene, počty bočních kořenů osmý den od vyklíčení, průměrná délka těchto bočních kořenů a jejich počet na 1 mm délky primárního kořene. Dále byl snímán růst kořenových vlásků u linie GFP-RHD2 pomocí epifluorescenčního (ZEISS Axio Imager M2) mikroskopu. Ze snímků z mikroskopu byla vypočítána rychlost růstu těchto vlásků.

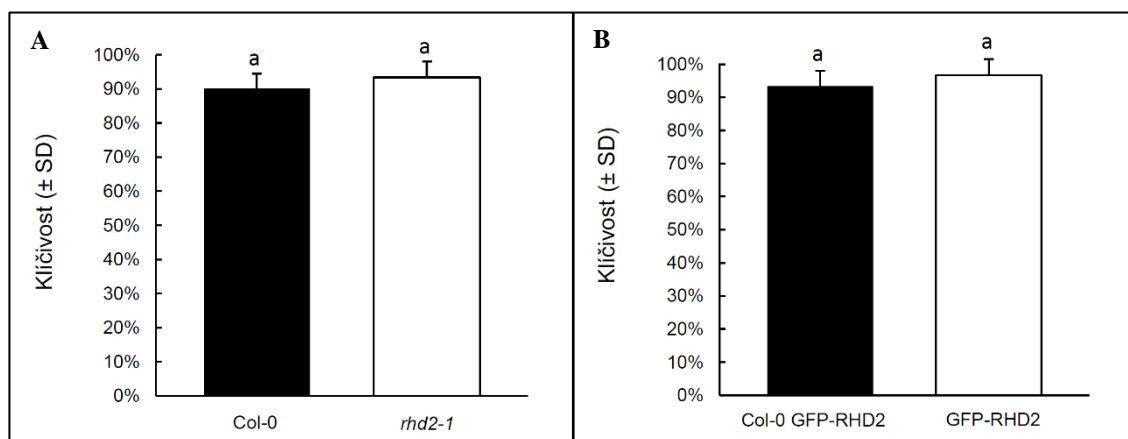
### 4.1. Klíčivost semen

Semena *Arabidopsis thaliana* linií Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 byla povrchově sterilizována a vysázena na ½ MS médium bez vitamínů, 2 dny stratifikována při 4 °C za účelem překonání jejich dormance a kultivována v *in vitro* kontrolních podmínkách. Poté byla každých 24 h skenována přímo na Petriho miskách. Celkem bylo vyseto 30 semen od každé linie a jejich klíčivost byla sledována prvních pěti dní.

Na obrázku 14 můžeme vidět klíčivost semen linií Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 během prvních pěti dní. Nepozorujeme mezi nimi žádné výrazné rozdíly. U všech linií vyklíčila téměř všechna semena, a to už během prvních 24 hodin. To nám ukazují grafy na obrázku 15, kde je klíčivost vždy >90%.



**Obrázek 14:** Klíčivost semen linií A) Col-0 a *rhd2-1*, B) Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách během pěti dní; N=30.



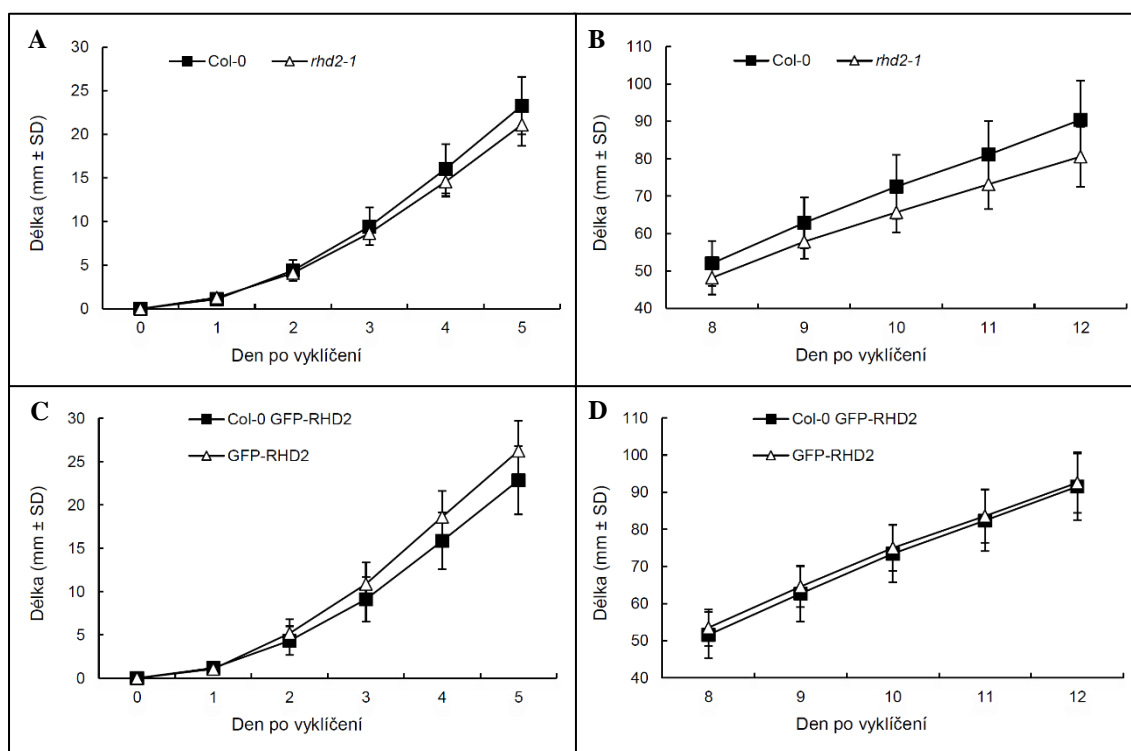
**Obrázek 15:** Klíčivost semen linií A) Col-0 a *rhd2-1*, B) Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách během prvních 24 h; N=30; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

## 4.2. Délka primárního kořene a denní přírůstek

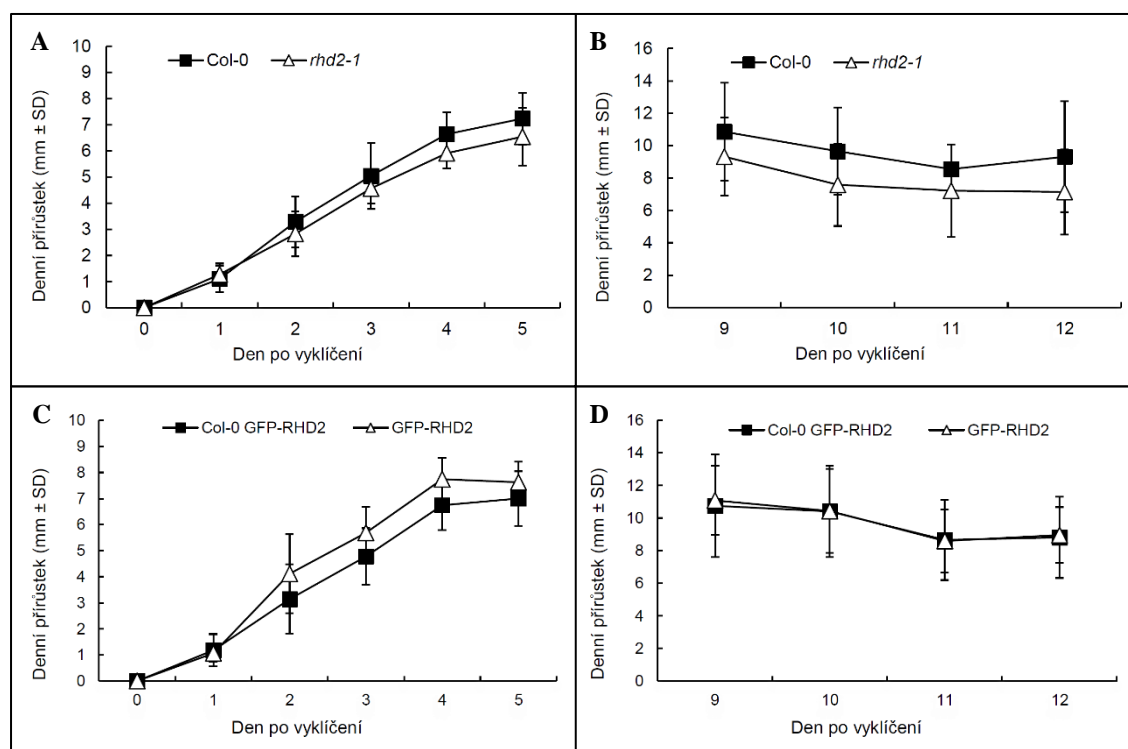
Povrchově sterilizovaná semena *A. thaliana* linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 byla vysázena na  $\frac{1}{2}$  MS médium bez vitamínů. Po dvoudenní stratifikaci při 4 °C byla následně kultivována v *in vitro* kontrolních podmínkách. Dohromady bylo vysázeno 30 semen každé linie. Během kultivace byly vyklíčené rostliny skenovány každých 24 h přímo na Petriho miskách. Pro určení délky primárního kořene byly rostliny skenovány první až pátý den a osmý až dvanáctý den od vyklíčení.

Průměrné délky primárního kořene linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 během prvních pěti dní vidíme v části A a C na obrázku 16. Tyto hodnoty se od sebe nijak výrazně neliší, ale můžeme si všimnout, že linie *rhd2-1* roste v porovnání s ostatními o něco pomaleji, naopak linie GFP-RHD2 trochu rychleji. Na obrázku 16 v části B a D jsou průměrné délky primárního kořene osmý až dvanáctý den od vyklíčení. Linie *rhd2-1* zde roste oproti ostatním pomaleji. I přesto, že linie GFP-RHD2 rostla prvních 5

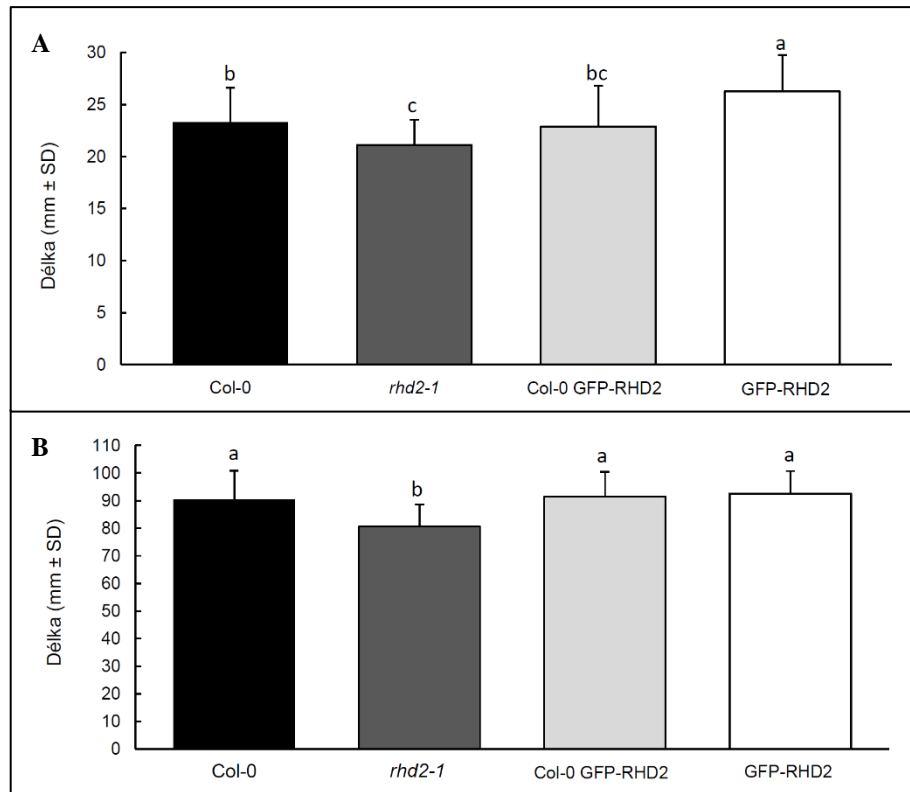
dní o něco málo rychleji, je růst linií Col-0, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v tyto dny téměř stejný. Srovnání průměrného denního přírůstku primárního kořene můžeme vidět na obrázku 17 (první až pátý den v částech A a C; devátý až dvanáctý den v částech B a D). První až pátý den od vyklíčení byly přírůstky velmi podobné, opět můžeme vidět, že linie *rh2-1* má přírůstky o něco menší a linie GFP-RHD2 trochu větší. Devátý až dvanáctý den jsou přírůstky Col-0, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 linií skoro stejné. Linie *rh2-1* má opět přírůstky menší. Celkově jde vidět, že se přírůstky v pozdějších dnech postupně nezvětšují, jako tomu bylo prvních 5 dní, ale spíše se mírně zmenšují. Porovnání průměrné délky primárních kořenů pátý den od vyklíčení je na obrázku 18A. Pozorujeme, že u linie GFP-RHD2 jsou zde nejdelší kořeny, u linie Col-0 a Col-0 GFP-RHD2 kořeny o něco kratší a u linie *rh2-1* nejkratší. Na obrázku 18B jsou porovnány průměrné délky primárních kořenů dvanáctý den od vyklíčení, kde linie Col-0, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 mají srovnatelné délky kořenů, naproti tomu linie *rh2-1* je má menší, což potvrdila i statistická data. Statisticky významný rozdíl  $p < 0,05$  je vyjádřen rozdílnými písmeny nad sloupci grafů. Ze statistiky byly vyřazeny rostliny, které nevyklíčily nebo přestaly během experimentu růst.



**Obrázek 16:** Průměrná délka primárního kořene linií Col-0 a *rhd2-1* (A, B) a Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 (C, D) v *in vitro* kontrolních podmínkách první až pátý den (A, C) a osmý až dvanáctý den (B, D) od vyklíčení; N=27-29.



**Obrázek 17:** Průměrný denní přírůstek primárního kořene linií Col-0 a *rhd2-1* (A, B) a Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 (C, D) v *in vitro* kontrolních podmínkách první až pátý den (A, C) a devátý až dvanáctý den (B, D) od vyklíčení; N=27-29.



**Obrázek 18:** Průměrná délka hlavního kořene linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách A) 5. den od vyklíčení a B) 12. den od vyklíčení; N=27-29; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

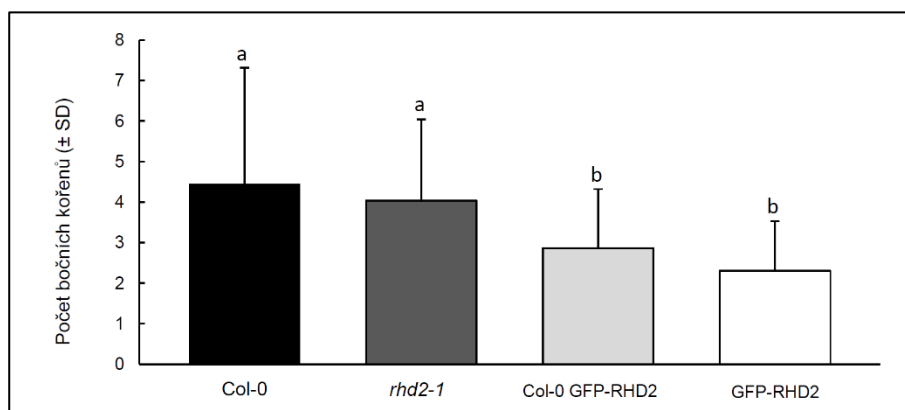
### 4.3. Počet bočních kořenů, jejich délka a průměrný počet bočních kořenů na 1 mm délky primárního kořene

Semena *A. thaliana* linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 byla po povrchové sterilizaci vysázena na ½ MS médium bez vitamínů a následně 2 dny stratifikována při 4 °C. Poté byla kultivována v *in vitro* kontrolních podmínkách. Celkem bylo kultivováno 30 semen od každé linie. Rostliny byly skenovány pomocí skeneru přímo na Petriho miskách osmý den od vyklíčení.

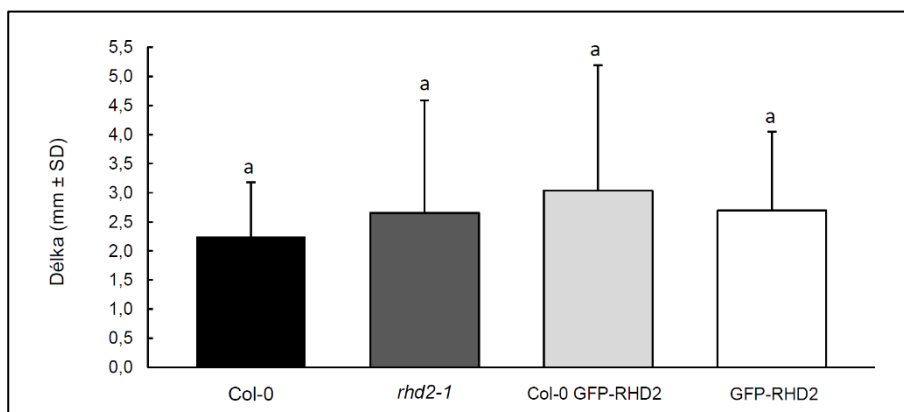
Průměrný počet bočních kořenů linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 osmý den od vyklíčení je na obrázku 19. Lze vidět, že linie Col-0 a *rhd2-1* měly vyšší počet bočních kořenů než linie Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2. Průměrné délky těchto bočních kořenů jsou ukázány na obrázku 20. I přesto, že se délky díky velké variabilitě statisticky významně neliší, můžeme pozorovat, že linie Col-0 GFP-RHD2 je má oproti ostatním liniím trochu delší a linie Col-0 zase kratší. Z grafů na obrázcích 19 a 20 lze vypožorovat, že linie Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 vyrovnávají nižší počet



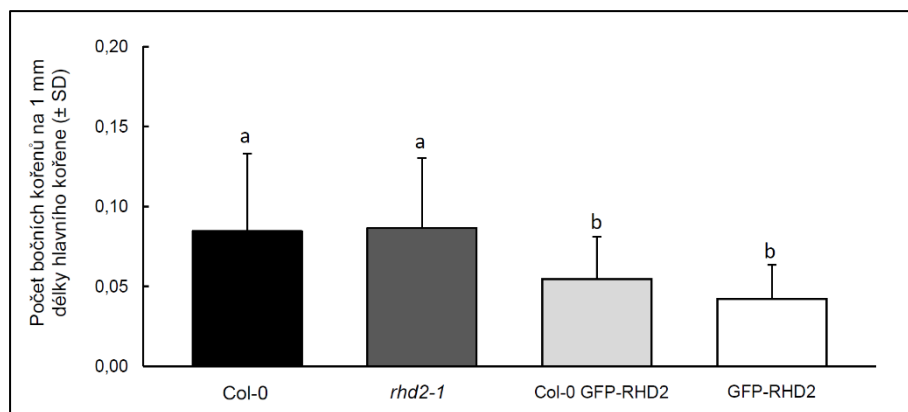
bočních kořenů jejich délkou. Linie *rh2-1* má vyšší počet bočních kořenů i jejich délku a jeví se jako nejstabilnější. To může značit, že absenci kořenových vlásků nahrazuje bočními kořeny. Na obrázku 21 je pak znázorněn průměrný počet těchto bočních kořenů na 1 mm délky primárního kořene, kde vidíme, že jsou tyto hodnoty vyšší u linií Col-0 a *rh2-1*. Ze statistiky byly vyřazeny rostliny, které nevyklíčily nebo neměly žádné boční kořeny.



**Obrázek 19:** Průměrný počet bočních kořenů u linií Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách 8. den od vyklíčení; N=22-29; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.



**Obrázek 20:** Průměrná délka bočních kořenů u linií Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách 8. den od vyklíčení; N=22-29; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

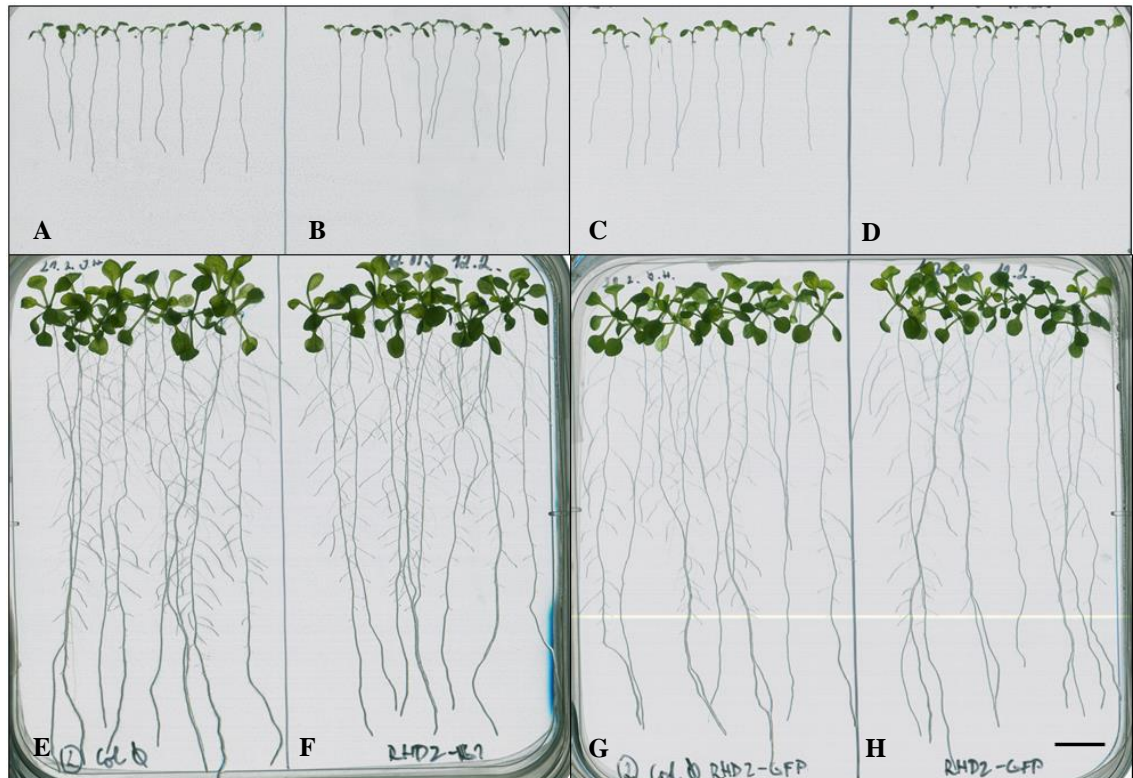


**Obrázek 21:** Průměrný počet bočních kořenů na 1 mm délky primárního kořene u linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 v *in vitro* kontrolních podmínkách 8. den od vyklíčení; N=22-29; odlišná písmena nad sloupci značí statisticky významný rozdíl při  $p < 0,05$  stanovený One-Way ANOVA testem a následným Fisher LSD testem.

#### 4.4. Fenotyp

Po povrchové sterilizaci byla semena *A. thaliana* linií Col-0, *rhd2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 vysázena na ½ MS médium bez vitamínů a následně 2 dny stratifikována při 4 °C. Poté byla kultivována v *in vitro* kontrolních podmínkách. Vyklíčené rostliny byly skenovány přímo na Petriho miskách pátý a dvanáctý den od vyklíčení.

Srovnání fenotypů všech čtyř linií je na obrázku 22. Na obrázku 22 A-D jsou 5-ti denní klíčence. Morfologie jednotlivých linií je zde srovnatelná, velikost nadzemní i kořenové části rostlin se neliší a kořeny mají stejný vzor. Na obrázku 22 E-H jsou 12-ti denní klíčence. Tady vypadají nadzemní části u všech linií opět srovnatelně. Kořeny jsou také velmi podobné, ale u linií Col-0 a *rhd2-1* můžeme už na první pohled vidět více bočních kořenů. V části B a F je vidět, že kořeny linie *rhd2-1* jsou oproti ostatním kratší.



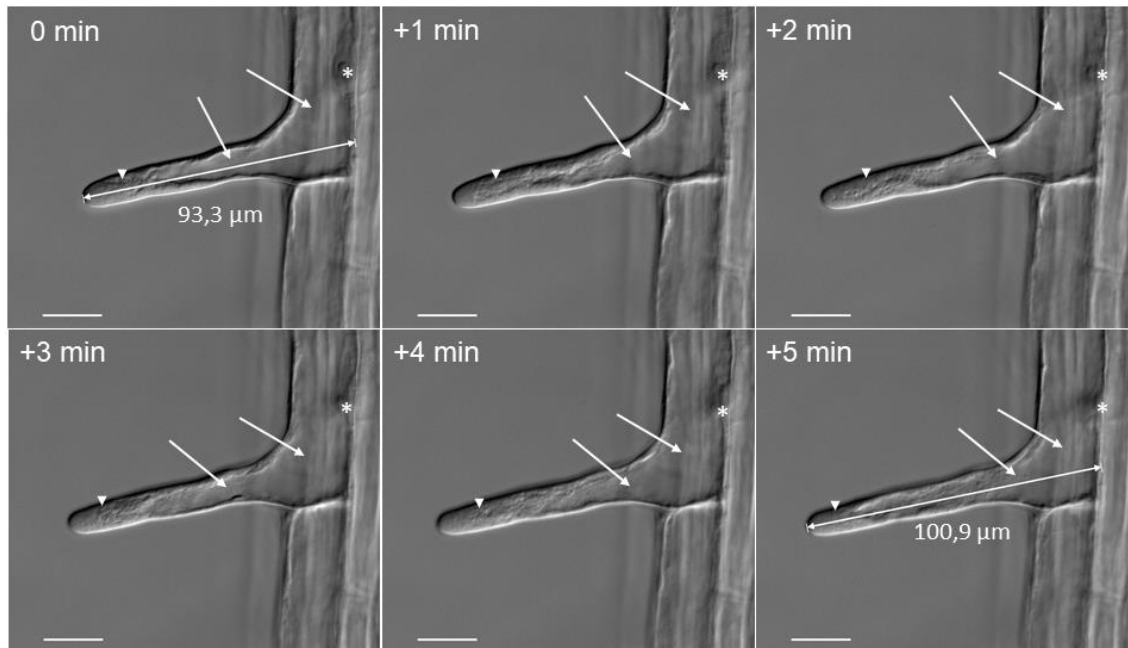
**Obrázek 22:** Pěti denní (A-D) a dvanácti denní (E-H) klíčence *A. thaliana* linie Col-0 (A, E), *rhd2-1* (B, F), Col-0 GFP-RHD2 (C, G) a GFP-RHD2 (D, H) kultivované v *in vitro* podmínkách; měřítko 1 cm.

#### 4.5. Růst kořenových vlásků

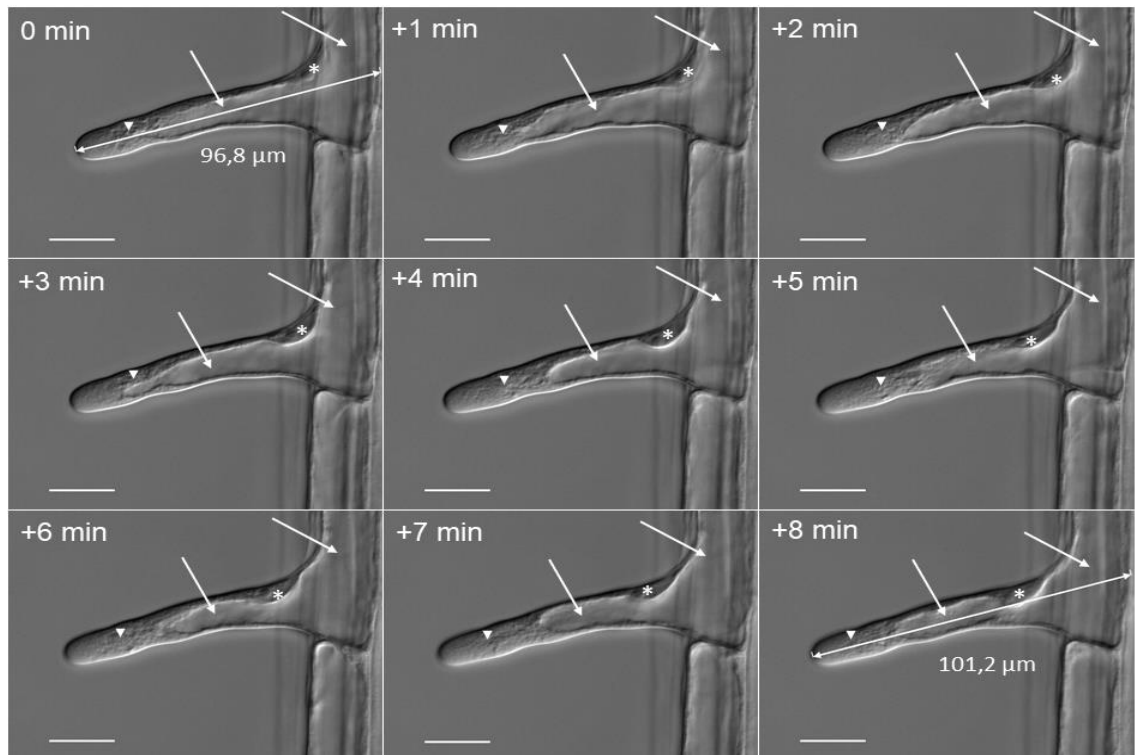
Semena *Arabidopsis thaliana* linie GFP-RHD2 byla povrchově sterilizována a vysázena na ½ MS médium bez vitamínů, 2 dny stratifikována při 4 °C a kultivována v kontrolních podmínkách po dobu tří dní. Poté byly třídenní klíčence přeneseny na podložní sklo do kapky tekutého ARA média, přikryty krycím sklem a kultivovány v tekutém ARA médiu ve skleněné kyvetě do druhého dne ve fytotronu. Třídenní klíčence byly přes noc kultivovány, aby se adaptovaly na nové prostředí a pokračovaly v růstu, což je nezbytné pro pozorování růstu kořenových vlásků, protože jsou velmi citlivé na namáhání během přípravy preparátu.

Růst kořenových vlásků u třídenních klíčenců linie GFP-RHD2 byl snímán pomocí epifluorescenčního mikroskopu ZEISS Axio Imager M2 a snímky byly upraveny v programu Zen 3.3 blue. Vlázky byly snímány s 60 s časovými intervaly. Hroty vždy ukazují na cytoplazmu s vezikulami. Jedná se o typické nahromadění vezikul ve vrcholu vlásku během jeho polárního růstu. Šipky ukazují vakuolu a hvězdička značí jádro. Na obrázku 23 byl vlásek snímán 5 min a za tuto dobu se prodloužil o 7,6 μm. Rostl tedy rychlostí 1,52 μm·min<sup>-1</sup>. Vlásek na obrázku 24 byl snímán 8 min a během této doby se

prodloužil pouze o 4,4  $\mu\text{m}$ . Jeho rychlost růstu byla  $0,55 \mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$ , což je skoro 3x méně než u prvního vlásku. Můžeme zde ale pozorovat migrující jádro, které putuje do rostoucího vlásku, což je také pro tuto fázi růstu kořenových vlásků typické. Tuto metodu lze zhodnotit jako úspěšnou, protože vlásky rostly správnou rychlostí. Obvykle kořenové vlásky po dosažení délky 20 až 40  $\mu\text{m}$  rostou rychlostí kolem 1 – 2  $\mu\text{m}\cdot\text{min}^{-1}$  (Dolan *et al.*, 1994).



**Obrázek 23:** Rostoucí vlásek *A. thaliana* linie GFP-RHD2, hvězdička značí jádro, šipky ukazují na vakuolu, hrot ukazuje na cytoplazmu s vezikulami; měřítko 20  $\mu\text{m}$ .



**Obrázek 24:** Rostoucí vlásek *A. thaliana* linie GFP-RHD2, hvězdička značí jádro, šipky ukazují na vakuolu, hrot ukazuje na cytoplazmu s vezikulami; měřítko 20 μm.

## 5. DISKUZE

Mutantní rostliny *rh2-1* mají fenotyp velmi krátkých kořenových vlásků, způsobený mutací genu pro RHD2. Ta produkuje ROS a stimuluje příjem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů, které jsou důležité pro správný polární růst kořenových vlásků. Ošetření kořenů *rh2-1* pomocí ROS pak částečně potlačuje tento fenotyp a indukuje příjem  $\text{Ca}^{2+}$  iontů (Foreman *et al.*, 2003). U linie GFP-RHD2 byl vložen konstrukt s GFP fúzovaným s RHD2 pod nativním promotorem v pozadí *rh2-1* (Takeda *et al.*, 2008). Jedná se tedy o „rescue“ linii, která má normální fenotyp kořenových vlásků. V případě Col-0 GFP-RHD2 byl konstrukt vložen v pozadí Col-0, RHD2 je zde tedy nadexprimována. Celkově mají tyto linie podle výsledků srovnatelné fenotypy, což naznačuje, že nadexprese RHD2 nemá na fenotyp žádný zásadní vliv.

Z výsledků vyplývá, že mutanti *rh2-1* mají celkově kratší primární kořeny, a tedy pomalejší růst. Je to dáno fenotypem *rh2-1* a obecně sníženou abundancí transkriptu RHD2 v pletivech kořene, kde je jeho abundance v divokém typu vysoká. Kromě správného růstu vlásků se totiž ROS, vytvářené RHD2, také podílejí na vývoji kořene a odpovědích na okolní prostředí (Chapman *et al.*, 2019). Na druhou stranu mají v porovnání s ostatními liniemi dlouhé boční kořeny a zároveň větší množství bočních kořenů na 1 mm délky jejich primárního kořene. Rostliny si takto pravděpodobně absenci kořenových vlásků nahrazují bočními kořeny. Souvisí to také s tím, že RHD2 negativně reguluje hydrotropismus (růst směrem k většímu vodnímu potenciálu). Mutanti pak mohou mít zlepšený hydrotropismus (Krieger *et al.*, 2016) a kořeny následně modifikují svoji architekturu, aby mohly přijímat co nejvíce živin a vody ze substrátu (Chapman *et al.*, 2019). Linie Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 měly naopak menší množství bočních kořenů na 1 mm délky. Délky jejich bočních kořenů jsou ale větší, to může znamenat, že si rostliny nahrazují nižší počet bočních kořenů jejich délkou. Na menší počty bočních kořenů mohlo mít vliv i to, že na kultivačním médiu měly některé rostliny své primární kořeny těsně vedle sebe. Takové rostliny pak měly oproti ostatním velmi malé počty bočních kořenů. Zároveň jsou menší počty bočních kořenů u obou linií, kde je RHD2 značená GFP. Na nižší počet bočních kořenů tedy může teoreticky mít nějaký vliv fúze GFP s RHD2. Bylo zjištěno, že například exprese GFP-mTalinu v *A. thaliana* postihuje růst buněk, organizaci aktinu a interakci proteinů vázajících aktin (Ketelaar *et al.*, 2004). GFP-mTalin byl využíván k vizualizaci aktinového cytoskeletu, protože s ním kolokalizuje, patří k proteinům vázajících se na aktin (např. ve studiích Kost *et al.*, 1998;

Fu *et al.*, 2001). Inhibuje ale depolymerizaci aktinu a způsobuje defekty v růstu kořenových vlásků (Ketelaar *et al.*, 2004). V případě fúze GFP s RHD2 a dokázání vlivu na odlišnou morfologii a fenotyp by bylo zapotřebí provedení více analýz.

Růst kořenových vlásků byl snímán u linie GFP-RHD2. Kořenové vlásky při dosáhnutí délky 20 až 40  $\mu\text{m}$  rostou většinou rychlostí pohybující se kolem  $1 - 2 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$  (Dolan *et al.*, 1994). U nasnímaných vlásků byla zjištěna rychlost jejich růstu  $1,52 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$  a  $0,55 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ . Růst kořenových vlásků osciluje v závislosti na změnách povrchového pH a extracelulárních ROS. Tyto změny oscilují se stejnou periodicitou jako růst vlásku (Monshausen *et al.*, 2007). To znamená, že vlásky chvíli rostou rychle a chvíli pomalu. Naměřená rychlost je tedy adekvátní. Kromě toho bylo také na snímcích pozorováno nahromadění vezikul ve vrcholu rostoucích vlásků. Jedná se hlavně o sekreční vezikuly vzniklé exocytózou (Ovečka *et al.*, 2005), které jsou důležité pro stavbu nové buněčné stěny rostoucího vlásku. Dále byly pozorovány velké centrální vakuoly a v jednom případě také migrace jádra do rostoucího vlásku. To vše je typické pro charakteristické uspořádání rostoucího kořenového vlásku (Carol a Dolan, 2002). Celkově byla tedy metoda pozorování vlásků úspěšná.

## 6. ZÁVĚR

Teoretická část se zabývá hlavně kořenem a kořenovými vlásky modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, strukturou kořenových vlásků a jejich polárním růstem. Byla popsána role ROS a NOX během růstů kořenových vlásků, protože se v praktické části používá linie *rh2-1*, která má mutaci v NADPH oxidase RHD2. Dále role strukturních sterolů a také buněčného cytoskeletu, což jsou důležité faktory pro správnou diferenciaci a růst kořenových vlásků. Byly také zmíněny některé mutace ovlivňující fenotypy kořenových vlásků, detailněji pak mutantní linie *rh2-1* a *der1*. Nakonec se teoretická část věnuje vybraným mikroskopickým technikám, které jsou důležitým nástrojem k pozorování rostlinných buněk. V experimentální části byla u linií Col-0, *rh2-1*, Col-0 GFP-RHD2 a GFP-RHD2 sledována klíčivost semen, délka primárního kořene, jeho denní přírůstky, délka a počty bočních kořenů a fenotyp během 12-ti dní od vyklíčení. Ukázalo se, že linie *rh2-1* má oproti ostatním kratší kořeny. Linie, ve kterých je GFP fúzované s RHD2 měly zase menší počty bočních kořenů, ale zároveň byly jejich délky trochu delší. Byl také snímán růst kořenových vlásků u linie GFP-RHD2 pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Průměrná rychlost nasnímaných vlásků byla  $1,035 \mu\text{m} \cdot \text{min}^{-1}$ , což je standardní rychlost pro danou fázi růstu kořenových vlásků.



## 7. LITERATURA

- Appelt D., Heintzmann R. (2013): Structured Illumination Microscopy (SIM). In: *Roberts G.C.K. (eds) Encyclopedia of Biophysics*, Springer, Berlin, Heidelberg, 220.
- Arabidopsis Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Baluška F., Šalaj J., Mathur J., Braun M., Jasper F., Šamaj J., Chua N.-H., Barlow P.W. & 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.
- Bargmann B. O., Vanneste S., Krouk G., Nawy T., Efroni I., Shani E., Choe G., Friml J., Bergmann D.C., Estelle M., Birnbaum K.D. (2013): A map of cell type-specific auxin responses. *Molecular Systems Biology* **9**, 688.
- Batley N.H., James N.C., Greenland A.J., Brownlee C. (1999): Exocytosis and endocytosis. *The Plant Cell* **11**, 643-660.
- Bibikova T.N., Zhigilei A., Gilroy S. (1997): Root hair growth in *Arabidopsis thaliana* is directed by calcium and an endogenous polarity. *Planta* **2**, 495–505.
- Blom H. a Widengren J. (2014): STED microscopy - towards broadened use and scope of applications. *Current Opinion in Chemical Biology* **20**, 127-133
- Boerjan W., den Boer B., van Montagu M. (1992): Molecular genetic approaches to plant development. *The International Journal of Developmental Biology* **36**, 59-66.
- Carol R.J. a Dolan L. (2002): Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *The Royal Society* **357**, 815-821.
- Carroll A.D., Moyon C., Kesteren P.V., Tooke F., Batley N.H., Brownlee C. (1998): Ca<sup>2+</sup>, Annexins, and GTP Modulate Exocytosis from Maize Root Cap Protoplasts. *The Plant Cell*, **10**, 1267–1276.
- Cernac A., Lincoln C., Lammer D., Estelle M. (1997): The SAR1 gene of *Arabidopsis* acts downstream of the AXR1 gene in auxin response. *Development* **124**, 1583-1591.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G., Ward W.W., Prasher D.C. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science (New York, N. Y.)* **263**, 802-805.
- Chapman J.M., Muhlemann J.K., Gayomba S.R., Muday G.K. (2019): RBOH-Dependent ROS Synthesis and ROS Scavenging by Plant Specialized Metabolites To Modulate Plant Development and Stress Responses. *Chemical Research in Toxicology* **32**, 370-396.
- Choe S., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Tissier C.P., Gregory B.D., Ross A.S., Tanaka A., Yoshida S., Tax F.E., Feldmann K.A. (1999): The *Arabidopsis dwf7/ste1* mutant is defective in the delta7 sterol C-5 desaturation step leading to brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Cell* **11**, 207-221.
- Choe S., Tanaka A., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Ross A.S., Tax F.E., Yoshida S., Feldmann K.A. (2000): Lesions in the sterol delta reductase gene of *Arabidopsis* cause dwarfism due to a block in brassinosteroid biosynthesis. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **21**, 431-443.
- Chudakov D.M., Matz M.V., Lukyanov S., Lukyanov K.A. (2010): Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews* **90**, 1103-1163.
- Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. (1996): FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene* **173**, 33-38.
- Cubitt A.B., Woollenweber L.A., Heim R. (1999): Understanding structure-function relationships in the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Methods in Cell Biology* **58**, 19-30.

- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. (1993): Cellular organisation of the *Arabidopsis thaliana* root. *Development* **119**, 71-84.
- Drews G.N., Bowman J.L., Meyerowitz E.M. (1991): Negative regulation of the *Arabidopsis* homeotic gene AGAMOUS by the APETALA2 product. *Cell* **65**, 991-1002.
- Dumontet C. a Jordan M.A. (2010): Microtubule-binding agents: a dynamic field of cancer therapeutics. *Nature Reviews. Drug Discovery* **9**, 790-803.
- Era A., Tominaga M., Ebine K., Awai C., Saito C., Ishizaki K., Yamato K.T., Kohchi T., Nakano A., Ueda T. (2009): Application of Lifeact reveals F-actin dynamics in *Arabidopsis thaliana* and the liverwort, *Marchantia polymorpha*. *Plant & Cell Physiology* **50**, 1041-1048.
- Evert R.F., Eichhorn S.E., Esau K. (2006): Esau's plant anatomy: meristems, cells, and tissues of the plant body: their structure, function, and development. Hoboken, N.J: Wiley-Interscience. ISBN 0-471-73843-3.
- Falhof J., Pedersen J.T., Fuglsang A.T., Palmgren M. (2016): Plasma Membrane H(+)-ATPase Regulation in the Center of Plant Physiology. *Molecular Plant* **9**, 323-337.
- Foreman J. a Dolan L. (2001): Root hairs as a model system for studying plant cell growth. *Annals of Botany* **88**, 1-7.
- 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., Dolan L. (2003): Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**, 442-446.
- Fu Y., Wu G., Yang Z. (2001): Rop GTPase-dependent dynamics of tip-localized F-actin controls tip growth in pollen tubes. *The Journal of Cell Biology* **152**, 1019-1032.
- Gachotte D., Meens R., Benveniste P. (1995): An *Arabidopsis* mutant deficient in sterol biosynthesis: heterologous complementation by ERG 3 encoding a delta 7-sterol-C-5-desaturase from yeast. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **8**, 407-416.
- Galway M.E., Masucci J.D., Lloyd A.M., Walbot V., Davis R.W., Schiefelbein J.W. (1994): The TTG gene is required to specify epidermal cell fate and cell patterning in the *Arabidopsis* root. *Developmental Biology* **166**, 740-754.
- Galway M.E., Heckman Jr J.W. & Schiefelbein J.W. (1997): Growth and ultrastructure of *Arabidopsis* root hairs: the *rhd3* mutation alters vacuole enlargement and tip growth. *Planta* **201**, 209-218.
- Grierson C.S., Parker J.S., Kemp A.C. (2001): *Arabidopsis* genes with roles in root hair development. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**, 131-140.
- Grierson C.S. a Schiefelbein J. (2002): Root Hairs. *The Arabidopsis Book* **12**, e0172. doi: 10.1199/tab.0172.
- Griesbeck O., Baird G.S., Campbell R.E., Zacharias D.A., Tsien R.Y. (2001): Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein. Mechanism and applications. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 29188-29194.
- Haddock S.H., Mastroianni N., Christianson L.M. (2010): A photoactivatable green-fluorescent protein from the phylum *Ctenophora*. *Proceedings. Biological Sciences* **277**, 1155-1160.
- He H., Yan J., Yu X., Liang Y., Fang L., Scheller H.V., Zhang A. (2017): The NADPH-oxidase AtRbohI plays a positive role in drought-stress response in *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical research communications* **491**, 834-839.
- Heim R. a Tsien R.Y. (1996): Engineering green fluorescent protein for improved brightness, longer wavelengths and fluorescence resonance energy transfer. *Current Biology* **6**, 178-182.
- Heim R., Cubitt A.B., Tsien R.Y. (1995): Improved green fluorescence. *Nature* **373**, 663-664.

- Hepler P.K., Vidali L., Cheung A.Y. (2001): Polarized cell growth in higher plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **17**, 159-187.
- Jack T., Brockman L.L., 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.
- Jones M.A., Raymond M.J., Yang Z., Smirnov N. (2007): NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *Journal of Experimental Botany* **58**, 1261-1270.
- Ketelaar T., Anthony R.G., Hussey P.J. (2004): Green fluorescent protein-mTalin causes defects in actin organization and cell expansion in *Arabidopsis* and inhibits actin depolymerizing factor's actin depolymerizing activity in vitro. *Plant Physiology* **136**, 3990-3998.
- Klahre U., Noguchi T., Fujioka S., Takatsuto S., Yokota T., Nomura T., Yoshida S., Chua N.H. (1998): The *Arabidopsis* DIMINUTO/DWARF1 gene encodes a protein involved in steroid synthesis. *The Plant Cell* **10**, 1677-1690.
- Komis G., Mistrik M., Šamajová O., Doskočilová A., Ovečka M., Illés P., Bartek J., Šamaj J. (2014): Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiology* **165**, 129-148.
- Komis G., Novák D., Ovečka M., Šamajová O., Šamaj J. (2018): Advances in Imaging Plant Cell Dynamics. *Plant Physiology* **176**, 80-93.
- Koornneef M. a Meinke D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **61**, 909-921.
- Kost B., Spielhofer P., Chua N.H. (1998): A GFP-mouse talin fusion protein labels plant actin filaments in vivo and visualizes the actin cytoskeleton in growing pollen tubes. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **16**, 393-401.
- Krieger G., Shkolnik D., Miller G., Fromm H. (2016): Reactive Oxygen Species Tune Root Tropic Responses. *Plant Physiology* **172**, 1209-1220.
- Lassig R., Gutermuth T., Bey T.D., Konrad K.R., Romeis T. (2014): Pollen tube NAD(P)H oxidases act as a speed control to dampen growth rate oscillations during polarized cell growth. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **78**, 94-106.
- Lee M.M. a Schiefelbein J. (1999): WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell* **99**, 473-483.
- Lew R.R. (1991): Electrogenic transport properties of growing *Arabidopsis* root hairs: plasma membrane proton pump and potassium channels. *Plant Physiology* **97**, 1527-1534.
- Lindsey K., Pullen M.L., Topping J.F. (2003): Importance of plant sterols in pattern formation and hormone signalling. *Trends in Plant Science* **8**, 521-525.
- Liu Y. a He C. (2016): Regulation of plant reactive oxygen species (ROS) in stress responses: learning from AtRBOHD. *Plant Cell Reports* **35**, 995-1007.
- Ma D. a Han R. (2020): Microtubule organization defects in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biology (Stuttg)* **22**, 971-980.
- Mangano S., Juárez S.P.D., Estevez J.M. (2016): ROS Regulation of Polar Growth in Plant Cells. *Plant Physiology* **171**, 1593-1605.
- Masucci J.D. a Schiefelbein J.W. (1994): The *rhd6* Mutation of *Arabidopsis thaliana* Alters Root-Hair Initiation through an Auxin- and Ethylene-Associated Process. *Plant Physiology* **106**, 1335-1346.

- Masucci J.D. & Schiefelbein J.W. (1996): Hormones act downstream of TTG and GL2 to promote root hair outgrowth during epidermis development in the *Arabidopsis* root. *Plant Cell* **8**, 1505-1517.
- Matz M.V., Fradkov A.F., Labas Y.A., Savitsky A.P., Zaraisky A.G., Markelov M.L., Lukyanov S.A. (1999): Fluorescent proteins from nonbioluminescent *Anthozoa* species. *Nature Biotechnology* **17**, 969-973.
- Meagher R.B., McKinney E.C., Vitale A.V. (1999): The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends in Genetics* **15**, 278-284.
- Meinke D.W., Cherry J.M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A Model Plant for Genome Analysis. *Science* **282**, 662-682.
- Mena M.A., Treynor T.P., Mayo S.L., Daugherty P.S. (2006): Blue fluorescent proteins with enhanced brightness and photostability from a structurally targeted library. *Nature Biotechnology* **24**, 1569-1571.
- Merzlyak E.M., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M.E., Shcheglov A.S., Fradkov A.F., Gaintzeva A., Lukyanov K.A., Lukyanov S., Gadella T.W., Chudakov D.M. (2007): Bright monomeric red fluorescent protein with an extended fluorescence lifetime. *Nature Methods* **4**, 555-557.
- Meyerowitz E.M. (1987): *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics* **21**, 93-111.
- Meyerowitz E.M. (2001): Prehistory and history of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* **125**, 15-19.
- Molecular & Developmental Biology (BIOL3530): [http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB\\_06/DBNPlant.html](http://www.mun.ca/biology/desmid/brian/BIOL3530/DB_06/DBNPlant.html) (28. 3. 2021)
- Monshausen G.B., Bibikova T.N., Messerli M.A., Shi C., Gilroy S. (2007): Oscillations in extracellular pH and reactive oxygen species modulate tip growth of *Arabidopsis* root hairs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. **104**, 20996-21001.
- Müller K., Carstens A.C., Linkies A., Torres M.A., Leubner-Metzger G. (2009): The NADPH-oxidase AtrbohB plays a role in *Arabidopsis* seed after-ripening. *The New Phytologist* **184**, 885-897.
- Oda T., Iwasa M., Aihara T., Maéda Y., Narita A. (2009): The nature of the globular- to fibrous-actin transition. *Nature* **457**, 441-445.
- Olympus: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/anatomy/components/> (14. 3. 2021)
- Olympus: <https://www.olympus-lifescience.com/en/microscope-resource/primer/techniques/confocal/confocalintro/> (14. 3. 2021)
- Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illes P., Lichtscheidl I.K. (2005): Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* **226**, 39-54.
- Ovečka M., Berson T., Beck M., Derksen J., Šamaj J., Baluška F., Lichtscheidl I.K. (2010): Structural sterols are involved in both the initiation and tip growth of root hairs in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **22**, 2999-3019.
- Ovečka M., Vaškebová L., Komis G., Luptovčíak I., Smertenko A., Šamaj J. (2015): Preparation of plants for developmental and cellular imaging by light-sheet microscopy. *Nature Protocols* **10**, 1234-1247.
- Parker J.S., Cavell A.C., Dolan L., Roberts K., Grierson C.S. (2000): Genetic interactions during root hair morpho – genesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **12**, 1961–1974.

- Passardi F., Dobiáš J., Valério L., Guimil S., Penel C., Dunand C. (2007): Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology* **164**, 980-992.
- Penfield S., Li Y., Gilday A.D., Graham S., Graham I.A. (2006): *Arabidopsis* ABA INSENSITIVE4 regulates lipid mobilization in the embryo and reveals repression of seed germination by the endosperm. *The Plant Cell* **18**, 1887-1899.
- Pei W., Du F., Zhang Y., He T., Ren H. (2012): Control of the actin cytoskeleton in root hair development. *Plant Science: an international journal of experimental plant biology*. **187**, 10-18.
- Qi J., Wang J., Gong Z., Zhou J.M. (2017): Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* **38**, 92-100.
- Qiu D.L., Akemann W., Chu C.P., Araki R., Knöpfel T. (2008): Targeted optical probing of neuronal circuit dynamics using fluorescent protein sensors. *Neuro-Signals* **16**, 289-299.
- Ramachandran S., Christensen H.E.M., Ishimaru Y., Dong C.-H., Chao-Ming W., Cleary A.L., Chua N.-H. (2000): Profilin plays a role in cell elongation, cell shape maintenance, and flowering in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**, 1637-1647.
- Ridge R.W., Uozumi Y., Plazinski J., Hurley U.A., Willi – amson R.E. (1999): Developmental transitions and dynamics of the cortical ER of *Arabidopsis* cells with green fluorescent protein. *Plant Cell Physiology* **40**, 1253-1261.
- Rigas S., Debrosses G., Haralampidis K., Vicente-Agullo F., Feldmann K.A., Grabov A., Dolan L., Hatzopoulos P. (2001); TRH1 encodes a potassium transporter required for tip growth in *Arabidopsis* root hairs. *The Plant Cell* **13**, 139-151.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., 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 C., Baumberger N., 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.
- Rizzo M.A., Springer G.H., Granada B., Piston D.W. (2004): An improved cyan fluorescent protein variant useful for FRET. *Nature Biotechnology* **22**, 445-449.
- Rounds C.M. a Bezanilla M. (2013): Growth mechanisms in tip-growing plant cells. *Annual Review of Plant Biology* **64**, 243-265.
- Schaeffer A., Bronner R., Benveniste P., Schaller H. (2001): The ratio of campesterol to sitosterol that modulates growth in *Arabidopsis* is controlled by STEROL METHYLTRANSFERASE 2;1. *The Plant Journal: for cell and molecular biology* **25**, 605-615.
- Scheres B., Benfey P., Dolan L. (2002): Root development. *The Arabidopsis Book* **1**, e0101. doi: 10.1199/tab.0101.
- Schiefelbein J.W. a Somerville C. (1990): Genetic Control of Root Hair Development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **2**, 235-243.
- Schiefelbein J.W., Galway M., Masucci J., Ford S. (1993): Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **103**, 979-985.
- Schneider K., Wells B., Dolan L., Roberts K. (1997): Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development* **124**, 1789-1798.
- Schneider K., Mathur J., Boudonck K., Wells B., Dolan L., Roberts K. (1998): The ROOT HAIRLESS 1 gene encodes a nuclear protein required for root hair initiation in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **12**, 2013-2021.

- Schrack K., Mayer U., Horrichs A., Kuhnt C., Bellini C., Dangl J., Schmidt J., Jürgens G. (2000): FACKEL is a sterol C-14 reductase required for organized cell division and expansion in *Arabidopsis* embryogenesis. *Genes & Development* **14**, 1471-1484.
- Shaner N.C., Campbell R.E., Steinbach P.A., Giepmans B.N., Palmer A.E., Tsien R.Y. (2004): Improved monomeric red, orange and yellow fluorescent proteins derived from *Discosoma* sp. red fluorescent protein. *Nature Biotechnology* **22**, 1567-1572.
- Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. (1962): Extraction, Purification and Properties of Aequorin, a Bioluminescent Protein from the Luminous Hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* **59**, 223-239.
- Stangeland B., Rosenhave E.M., Winge P., Berg A., Amundsen S.S., Karabeg M., Mandal A., Bones A.M., Grini P.E., Aalen R.B. (2009): AtMBD8 is involved in control of flowering time in the C24 ecotype of *Arabidopsis thaliana*. *Physiologia Plantarum* **136**, 110-126.
- Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K., Dolan L. (2008): Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* **319**, 1241–1244.
- Tichá M., Illésová P., Hrbáčková M., Basheer J., Novák D., Hlaváčková K., Šamajová O., Niehaus K., Ovečka M., Šamaj J. (2020): Tissue culture, genetic transformation, interaction with beneficial microbes, and modern bio-imaging techniques in alfalfa research. *Critical Reviews in Biotechnology* **40**, 1265-1280.
- Tomosugi W., Matsuda T., Tani T., Nemoto T., Kotera I., Saito K., Horikawa K., Nagai T. (2009): An ultramarine fluorescent protein with increased photostability and pH insensitivity. *Natural Methods* **6**, 351-353.
- Torres M.A., Dangl J.L., Jones J.D. (2002): *Arabidopsis* gp91phox homologues AtrbohD and AtrbohF are required for accumulation of reactive oxygen intermediates in the plant defense response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**, 517-522.
- Tsien R.Y. (1998): The green fluorescent protein. *Annual Review of Biochemistry* **67**, 509-544.
- Valitova J.N, Sulkarnayeva A.G., Minibayeva F.V. (2016): Plant Sterols: Diversity, Biosynthesis, and Physiological Functions. *Biochemistry (Mosc)* **81**, 819-834.
- Vaškebová L., Šamaj J., Ovečka M. (2018): Single-point ACT2 gene mutation in the *Arabidopsis* root hair mutant *der1-3* affects overall actin organization, root growth and plant development. *Annals of Botany* **122**, 889-901.
- Willemsen V., Friml J., Grebe M., van den Toorn A., Palme K., Scheres B. (2003): Cell polarity and PIN protein positioning in *Arabidopsis* require STEROL METHYLTRANSFERASE1 function. *The Plant Cell* **15**, 612-625.
- Xia Y. a Fu B.M. (2018): Investigation of Endothelial Surface Glycocalyx Components and Ultrastructure by Single Molecule Localization Microscopy: Stochastic Optical Reconstruction Microscopy (STORM). *The Yale Journal of Biology and Medicine* **91**, 257-266.
- Xie H.T., Wan Z.Y., Li S., Zhang Y. (2014): Spatiotemporal Production of Reactive Oxygen Species by NADPH Oxidase Is Critical for Tapetal Programmed Cell Death and Pollen Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **26**, 2007-2023.
- Yang Z. (2008): Cell polarity signaling in *Arabidopsis*. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **24**, 551-575.
- Zheng H. a Chen J. (2011): Emerging aspects of ER organization in root hair tip growth: lessons from RHD3 and Atlastin. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 1710-1713.

## 8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

$\pm$ SD	směrodatná odchylka
$\cdot$ OH	hydroxylový radikál
$^1$ O <sub>2</sub>	singletový kyslík
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
ABA	kyselina abscisová
ABP	protein vázající se na aktin (z angl. actin binding protein)
ACT	aktinový gen (z angl. ACTIN)
ADF	aktinový depolymerizační faktor
AHA	H <sup>+</sup> -ATPasa
ANOVA	analýza rozptylu (z angl. Analysis of variance)
ATP	adenosintrifosfát
ATRBOH	<i>Arabidopsis thaliana</i> respirační oxidasové homology
ARA médium	modifikované médium pro <i>Arabidopsis</i>
AXR	„ <i>AUXIN RESISTANT</i> “
C24	ekotyp C24
Ca <sup>2+</sup>	vápenaté ionty
CaC	vápníkový kanál
CEN	„ <i>CENTIPEDE</i> “
CLSM	konfokální laserová skenovací mikroskopie
Col-0	ekotyp Columbia-0
DAMPs	endogenní molekuly, které jsou součástí vrozené imunity (z angl. Damage associated molecular patterns)
<i>der</i>	„ <i>deformed root hairs</i> “
<i>dwf</i>	„ <i>dwarf</i> “
<i>dim</i>	„ <i>diminuto</i> “
DsRed	základní červený fluorescenční protein
EBFP	základní modrý fluorescenční protein
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová (z angl. ethylenediaminetetraacetic acid)
EMS	ethylmethan sulfonát
ER	endoplazmatické retikulum
ERH	„ <i>ECTOPIC ROOT HAIR</i> “

<b>FACKEL</b>	sterol C-14 reduktasa
<b>FEP</b>	fluorace ethylenem a propylenem
<i>fk</i>	„ <i>fackel</i> “
<b>FP</b>	fluorescenční protein
<b>GA</b>	Golgiho aparát
<b>GFP</b>	zelený fluorescenční protein
<b>GFP-RHD2</b>	N-terminální fúze s GFP pod nativním RHD2 promotorem a terminátorem
<b>gp91<sup>phox</sup></b>	podjednotka savčí NOX2
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát
<b>H<sup>+</sup></b>	kationt vodíku (také proton)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxid vodíku
<b>Ler</b>	ekotyp Landsberg <i>erecta</i>
<b>LSD</b>	„least significant difference“
<b>LSFM</b>	light-sheet fluorescenční mikroskopie
<b>MES</b>	2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina
<b>MilliQ H<sub>2</sub>O</b>	deionizovaná sterilní voda
<b>MS médium</b>	Murashige a Skoog médium
<b>NADPH</b>	nikotinadenindinukleotidfosfát
<b>NOX</b>	NADPH oxidasa
<b>O<sub>2</sub><sup>·-</sup></b>	superoxidový anion
<b>PIPs</b>	aquaporiny
<b>pH</b>	záporný dekadický logaritmus koncentrace vodíkových kationtů
<b>RHD</b>	„ <i>ROOT HAIR DEFECTIVE</i> “
<b>RHL</b>	„ <i>ROOT HAIRLESS</i> “
<b>Rop</b>	Rho-příbuzné GTPasy
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen species)
<b>RTG</b>	rentgenografie
<b>SCN</b>	„ <i>SUPERCENTIPEDE</i> “
<i>shv</i>	„ <i>shaven</i> “
<b>SIM</b>	mikroskopie se strukturovaným osvětlením (z angl. Structured Illumination Microscopy)
<i>smt</i>	„ <i>sterolmethyltransferase</i> “
<i>ste</i>	„ <i>sterol</i> “



<b>STED</b>	mikroskopie snižující stimulaci emise (z angl. Stimulated emission depletion)
<b>STORM</b>	stochastická rekonstrukční mikroskopie
<b>TagRFP</b>	základní červený fluorescenční protein
<b>TagYFP</b>	základní žlutý fluorescenční protein
<b>TIP</b>	„ <i>TIP GROWTH DEFECTIVE</i> “
<b>TRH</b>	„ <i>TINY ROOT HAIR</i> “
<b>TTG</b>	„ <i>TRANSPARENT TESTA GLABRA</i> “
<b>WER</b>	„ <i>WEREWOLF</i> “
<b>Ws</b>	ekotyp Wassilewskija