

**Univerzita Palackého v Olomouci**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Sensitivita vybraných mutantů kořenového vlášení  
Arabidopsis na abiotický stres**

**Bakalářská práce**

**Lenka Vaškebová**

Studijní program:  
Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia:  
Prezenční

**Olomouc 2014**

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

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

V Olomouci dne:

.....

## SOUHRN

Rostliny jsou nepohyblivé organismy, které jsou vystaveny všem změnám prostředí, včetně biotických a abiotických stresů. Systém obranných reakcí v rostlinách je musí efektivně chránit a pomáhat jim se s těmito nepříznivými vlivy vypořádat. Zasolení půdy, sucho a s ním související osmotické změny, chlad a oxidativní poškození jsou v dnešní době hlavním problémem při růstu, vývoji a produktivitě rostlin. Proto se výzkumu těchto procesů věnuje intenzivní pozornost. Cílem bakalářské práce bylo sledovat změny v klíčení rostlin, v růstu kořenů a hlavně ve vývoji kořenových vlásků u divokého typu Col-0 a u mutantů *rhd2-1*, *der1-3* a *tip1-1* po působení abiotických stresů. Byl testován efekt solného, osmotického, oxidativního a chladového stresu, kterým byly rostliny vystavené už při klíčení, nebo když byly rostliny 2-3 dny staré na stresové faktory přeložené. Ukázalo se, že nejvíce rezistentní vůči všem stresům, kromě chladového, byl mutant *der1-3*.

## SUMMARY

Plants are immobile organisms that are exposed to all changes in the environment, including biotic and abiotic stresses. The system of plant defensive reactions must effectively protect them and assist with avoidance of these adverse effects. Salinity, drought and related osmotic changes, cold and oxidative damage are nowadays a major problems reducing the growth, development and productivity of plants. Therefore, the research on these processes devotes intensive attention. The aim of this thesis was to monitor changes in plant germination, root growth and especially in the development of root hairs in wild type Col-0 plants and *rhd2-1*, *der1-3* and *tip1-1* mutants after exposure to abiotic stresses. We tested the effect of salt, osmotic, oxidative and cold stress, which the plants were exposed to during germination, or when the plants 2-3 days old were exposed to stress factors. It was shown that the most resistant to all the stresses, except of cold stress, was *der1-3* mutant.

## Poděkování

„Ráda bych poděkovala hlavně svému vedoucímu bakalářské práce doc. Mgr. Miroslavovi Ovečkovi, Ph.D., a to především za odborné vedení, ochotu, připomínky a čas, který věnoval při zpracování této práce. Dále bych chtěla poděkovat celému kolektivu Oddělení buněčné biologie za to, že mi poskytly přátelskou atmosféru, a ochotu vždy poradit a techničkám, které mi pomohly, když bylo potřeba. A v neposlední řadě Prof. RNDr. Jozefu Šamajovi, DrSc. za poskytnutí prostorů a možnosti pracovat v laboratoři.

## OBSAH

<b>1. ÚVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2. Modelový druh <i>Arabidopsis thaliana</i> .....</b>	<b>4</b>
2. 1. Funkce kořene a kořenových vlásků.....	4
2. 2. Struktura kořene a kořenových vlásků.....	5
2. 3. Důležité faktory pro růst kořenových vlásků.....	8
2. 3. 1. Morfologie polárně rostoucích vlásků.....	8
2. 3. 2. Vodíkový gradient, H <sup>+</sup> -ATPasa .....	9
2. 3. 4. Nejdůležitější ionty pro polární růst.....	10
2. 3. 4. 1. Draslík .....	10
2. 3. 4. 2. Vápník .....	11
2. 3. 5. Cytoskelet.....	12
2. 3. 6. Vezikulární transport a důležité proteiny, které ho regulují.....	13
2. 3. 6. 1. Exocytóza .....	13
2. 3. 6. 2. Endocytóza .....	13
2. 4. Geny důležité pro vývoj a růst kořenových vlásků.....	14
2. 5. Vybraní mutanti a jejich charakteristika .....	17
2. 5. 1. <i>rhd2</i> mutant .....	17
2. 5. 2. <i>tip1</i> mutant.....	19
2. 5. 3. <i>der1-3</i> mutant .....	20
2. 6. Abiotické stresové faktory působící na rostliny.....	21
2. 6. 1. Osmotický a solný stres.....	22
2. 6. 2. Chladový stres .....	22
2. 6. 3. Oxidativní stres .....	23
<b>3. CÍL PRÁCE .....</b>	<b>24</b>

<b>4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST .....</b>	<b>25</b>
4. 1. MATERIÁL .....	25
4. 1. 1. Použité chemikálie .....	25
4. 1. 2. Použité přístroje.....	25
4. 1. 3. Použité roztoky a média .....	26
4. 1. 4. Rostlinný materiál .....	27
4. 2. METODY .....	28
4. 2. 1. Příprava médií pro kultivaci <i>Arabidopsis</i> v <i>in vitro</i> podmínkách .....	28
4. 2. 2. Povrchová sterilizace semen .....	29
4. 2. 3. Stanovení klíčivosti semen a překlad rostlin na média pro indukci stresů .....	30
4. 2. 4. Dokumentace a vyhodnocování morfologie rostlin, růstových parametrů a fenotypu kořenových vlásků.....	30
4. 2. 5. Příprava celých rostlin pro vitální mikroskopické pozorování .....	31
4. 2. 6. Značení membrán a endocytózy v buňkách kořene rostlin v mikroskopických sklech.....	32
4. 2. 7. Vyhodnocení výsledků .....	32
<b>5. VÝSLEDKY .....</b>	<b>33</b>
5. 1. Klíčivost linií Col-0, <i>der1-3</i> , <i>rhd2-1</i> a <i>tip1-1</i> v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu .....	33
5. 2. Růst kořene ve stresových podmínkách.....	40
5. 2. 1. Růst kořene rostlin, které klíčily pod vlivem solného, osmotického a oxidativního stresu .....	40
5. 2. 1. 1. Solný a osmotický stres .....	40
5. 2. 1. 2. Oxidativní stres.....	44
5. 2. 2. Růst kořene rostlin, které byly na média s indukcí solného, osmotického, oxidativního a chladového stresu přeloženy .....	50
5. 2. 2. 1. Solný a osmotický stres .....	50
5. 2. 2. 2. Oxidativní stres.....	54

5. 2. 2. 3. Chladový stres .....	59
5. 3. Změny fenotypu kořene a kořenových vlásků indukované solným, osmotickým, oxidativním a chladovým stresem .....	62
5. 3. 1. Kořenové vlásky při klíčení testovaných linií pod vlivem solného, osmotického a oxidativního stresu.....	63
5. 3. 1. 1. Solný a osmotický stres .....	63
5. 3. 1. 2. Oxidativní stres.....	68
5. 3. 2. Kořenové vlásky po přeložení testovaných linií do podmínek solného, osmotického, oxidativního a chladového stresu.....	73
5. 3. 2. 1. Solný a osmotický stres .....	73
5. 3. 2. 2. Oxidativní stres.....	77
5. 3. 2. 3. Chladový stres .....	82
5. 4 Dynamika růstu kořenových vlásků a porovnání jednotlivých linií.....	84
<b>6. DISKUZE .....</b>	<b>88</b>
<b>7. ZÁVĚR .....</b>	<b>93</b>
<b>8. SEZNAM LITERATURY .....</b>	<b>95</b>
<b>9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ.....</b>	<b>101</b>



## 1. ÚVOD

První zmínka o *Arabidopsis* byla v odborné botanické literatuře uveřejněná roku 1873, jejichž autorem byl Alexandr Braun. Již v roce 1907 Friedrich Laibach, student na univerzitě v Bonnu, určil počet jejích chromosomů, podobně jako i u dalších rostlin (Meyerowitz, 2001). Dnes už je známo, že *Arabidopsis* má 5 chromosomů a její genom je více než o polovinu menší než má *Drosophila* (Pruitt a kol., 1986). Chromosomy má přitom velice malé, což je u rostlin neobvyklé. Friedrich Laibach až v roce 1943 začal dělat první experimenty s *Arabidopsis* a publikoval studie o jejím krátkém životním cyklu (Meyerowitz, 2001), který je jen 4 týdny dlouhý (Pruitt a kol., 1986), o plodnosti, o snadnosti křížení a tedy i o možnostech mutagenese, což nakonec vedlo k navržení druhu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh jako modelového organismu. V dnešní době je to hlavní modelový organismus pro dvouděložní kvetoucí rostliny v laboratorní praxi, i když její oficiální přijetí jako modelového druhu proběhlo až v roce 1980. Bezesporu to vedlo k masivnímu rozvoji rostlinné vývojové a molekulární biologie, genetiky a fyziologie (Meyerowitz, 2001). Tento druh je vhodný pro studie v rámci molekulární a buněčné biologie (Pruitt a kol., 1986), protože orgány této rostliny mají díky omezenému počtu buněčných vrstev jednoduchou strukturu, její části včetně kořene mohou být analyzovány i bez destrukční přípravy vzorků, jako jsou řezy. Její buňky jsou relativně malé, a proto lze jednotlivé vrstvy dobře mikroskopicky vizualizovat i za fyziologických podmínek (Boerjan a kol., 1992). Je to velice důležitý druh při identifikaci genů a determinaci jejich funkcí (Kaul a kol., 2000), protože má jednoduše organizované genové rodiny, její geny mají tendenci obsahovat malé množství menších intronů a jsou spíše zabalené v genomu (Simoens a kol., 1988). Začátek sekvenování genomu *Arabidopsis* se datuje do roku 1986 (Meyerowitz, 2001). Tento obsáhlý projekt byl dokončen roku 2000 a celá tehdy známá sekvence byla publikována konsorciem The Arabidopsis Genome Initiative v prestižním časopise *Nature* téhož roku (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Tato organizace se skládá ze třech skupin vědců, kteří se zabývají sekvenováním (Kaul a kol., 2000; Federspiel, 2000). *Arabidopsis thaliana* má nejmenší známý haploidní genom ( $7 \times 10^7$  bp) mezi vyššími rostlinami (Simoens a kol., 1988), obsahuje 25, 498 genů kódujících proteiny z 11,000 rodin, které mají podobnou rozmanitost funkcí jako u *Drosophila* nebo u *Caenorhabditis elegans*. Jednalo se o první kompletní sekvenci rostlinného genomu, což neustále poskytuje základ ke srovnávacím studiím konzervovaných úseků kódujících sekvencí genů eukaryotických organismů. Tento přístup vedl k identifikaci celé řady

funkcí genů specifických pro rostliny. Mimo jiné se to efektivně využívá k rychlé a přesné identifikaci různých genů využitelných při šlechtění (Kaul a kol., 2000). To v konečném důsledku může mít praktický význam i v budoucí snaze zabezpečit dostatek potravin pro lidstvo. Ve snaze identifikovat genom tohoto rostlinného druhu se angažovalo více jako 40 laboratoří s využitím bohatého spektra různých laboratorních technik (Federspiel, 2000). Většina genomu *A. thaliana* se skládá z jedinečných sekvencí (Pruitt a kol., 1986), přičemž repetitivních sekvencí je v genomu *A. thaliana* celkově málo. Jedním z možných důvodů může být strategie umožňující krátký životní cyklus. Druh *A. thaliana* je proto i využíván ke studiu struktury a funkcí těchto sekvencí (Simoens a kol., 1988). Jednou z praktických aplikací druhu *A. thaliana* ve výzkumu základních vývojových procesů je studium polárního růstu, který se u rostlin vyskytuje u pylových láček a u kořenových vlásků. Kořenové vlásky jsou nezbytnou součástí struktury kořenového systému rostliny, jak pro zvětšení povrchové plochy kořene pro příjem živin a vody, tak i při symbiotických interakcích, hlavně s dusík-fixujícími bakteriemi. Kořenové vlásky mají tubulární tvar o délce dosahující až 1 mm. Vyrůstají ze specializovaných buněk epidermis kořene, z trichoblastů (Foreman a Dolan, 2001; Grierson a kol., 2001). Kořenové vlásky jsou také často sledovány při studiu vlivů biotických a abiotických stresů na rostliny, protože změny jejich morfologie a růstu jsou první známkou citlivosti rostlin na tyto faktory (Grierson a Schiefelbein, 2002). Biotické stresy jsou u rostlin indukovány velkou škálou patogenů, jako jsou viry, bakterie, houby a mnoho dalších (Atkinson a Erwin, 2012). Tato práce se však bude zabývat abiotickými stresy, z kterých nejdůležitější jsou chlad, vysoká teplota, sucho, zasolení půdy a nadbytek či nedostatek živin. Tyto stresové faktory mají značný dopad na světové zemědělství, přičemž mohou vést až k 50 % snížení výnosu u hlavních zemědělských plodin (Wang a kol., 2003). Předpokládá se, že teplota na Zemi se zvýší během 50 až 100 let o 3 - 5 °C (Atkinson a Erwin, 2012). To nevyhnutně povede k častějšímu střídání extrémních veder a prudkých povodní (Mittler a Blumwald, 2010). Častější výskyt sušších a teplejších let bude znamenat redukci délky vegetační sezóny, v důsledku kyselých dešťů a možné zvednutí hladin moří se zvýší zasolení půdy (Easterling a kol., 2000). Tyto globální změny ovlivní výnosy a nutriční kvalitu plodin (Porter a Semenov, 2005). Zároveň se zvýší infekčnost patogenů (Atkinson a Erwin, 2012). Se změnami klimatických podmínek a při neustálém růstu populace (tedy rostoucího tlaku na zvýšení výnosů plodin) budeme čelit stále větší poptávce po rostlinách tolerantních vůči stresovým faktorům (Takeda a Matsuoka, 2008). Každý stres vyvolává u rostlin komplexní systém buněčných

a molekulárních reakcí, které mají zabránit poškození a mají umožnit přežití rostliny. Je to většinou však na úkor růstu a produktivity (Atkinson a Erwin, 2012). Neustálé prohlubování poznání procesů, které vedou k zvýšené rezistenci rostlin je nevyhnutné, a vede k identifikaci molekul, jako jsou osmoprotektanty, heat shock proteiny, stresové proteiny, různé transportéry, růstové regulátory, signální molekuly, a mechanismů, jako je změna fluidity membrány, kontrola transkripce či regulace koncentrace vody v rostlině, které jsou pro úspěšnou ochranu a adaptaci rostlin důležité (Cushman a Bohnert, 2000). Mechanismy ochrany vyvolané abiotickými stresy jsou mezi sebou propojené, tudíž by se měly zohlednit nové přístupy ve vývoji transgenních rostlin, které budou schopny čelit nejen jednomu, ale kombinaci vícero stresů, což je v životním prostředí za normálních podmínek typická situace (Mittler, 2006).

## 2. Modelový druh *Arabidopsis thaliana*

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*, (L.) Heynh., čeled' *Brassicaceae* patří mezi krytosemenné dvouděložné rostliny, pro zemědělství nemá prakticky žádný význam a je to spíše plevel. V biologickém výzkumu rostlin je využíván v mnoha směrech jako modelový organismus (Smith a De Smet, 2012). Díky tomu, že *A. thaliana* je diploidní, a má jeden z nejmenších genomů mezi rostlinami, je ideálním objektem pro genetické studie, jako je mapování a sekvenování. Protože genom této rostliny byl kompletně osekvenován (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000), známe všechny její geny, a existuje proto celá databáze pozičně inzerčních mutantů. Nespornou výhodou pro laboratorní výzkum je i fakt, že tento druh má krátkou generační dobu, protože zhruba za 6 týdnů od vysetí rostlina donese zralá semena. Navíc, rostliny *A. thaliana* se vyznačují jednoduchou a poměrně stálou buněčnou organizací pletiv a orgánů, což je efektivně využíváno při veškerých anatomických a morfologických studiích, ale i v oblasti buněčné, molekulární a vývojové biologie. (Foreman a Dolan, 2001). Rostliny a jejich části se vyznačují relativně vysokou mírou transparentnosti (například kořen), což při relativně nevelkém vzrůstu dovoluje snadnou přípravu pro mikroskopické pozorování. Díky tomu můžeme získávat mnoho dat o strukturní a funkční organizaci rostliny na buněčné úrovni, což je nevyhnutelnou součástí studia vývinu rostlin, jejich reprodukce, jako i reakcí na vnitřní a vnější signály.

### 2. 1. Funkce kořene a kořenových vlásků

Rostlina se všeobecně skládá z nadzemní a podzemní části. Stonek, listy, květy a plod patří do nadzemní části, podzemní část představuje kořen. Kořen neobsahuje chlorofyl, tudíž nemá možnost vyrábět energii fotosyntetickou asimilací CO<sub>2</sub> za pomoci slunečního světla, ke kterému nemá přístup (Scheres a kol., 2002). Hlavní jeho funkcí je proto udržovat rostliny stabilně v půdě, přijímat vodu a živiny v půdním roztoku rozpuštěné a transportovat je do nadzemní části rostliny. Z kořene vyrůstají kořenové vlásky, které zvětšují plochu pro přijímání živin a tím tento proces zefektivňují a zrychlují. Zvětšuje se tím kořenový rádius a pevnost ukotvení v půdě. Kořenové vlásky jsou důležité i v interakcích rostliny s půdní mikroflórou (Smith a Smet, 2012).

Kořenové vlásky druhu *A. thaliana* vyrůstají ze specializovaných epidermálních buněk, trichoblastů (Obr. 1), které se při vývinu epidermy kořene velice brzo diferencují od buněk atrichoblastů, které vlásky tvořit nebudou (Gierson a Schiefelbein, 2002).

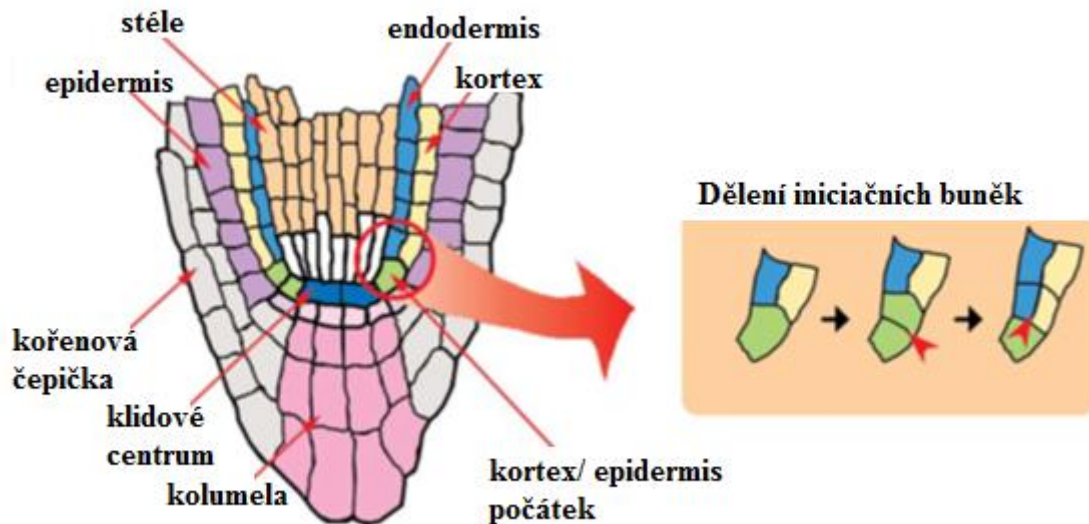


Obr. 1: Kořenový vlásek druhu *Arabidopsis thaliana* zobrazen skenovacím elektronovým mikroskopem, který je v růstovém stádiu dosažení přibližně 1/3 celkové délky (Gierson a Schiefelbein, 2002).

Kořenové vlásky se často využívají jako modelový objekt ke studiu polárního růstu u rostlin, protože rostou relativně rychle (až 1  $\mu\text{m}/\text{min}$ ), jsou dostupné na povrchu kořene, což usnadňuje jejich vizualizaci. Reakce kořenových vlásků na různé aplikované podněty lze studovat přímo v mikroskopu při optimálním zvětšení bez nutnosti speciálního barvení a složité přípravy (Foreman a Dolan, 2001).

## 2. 2. Struktura kořene a kořenových vlásků

Meristém je dělivé pletivo, které dává základ všem buňkám, pletivům a orgánům rostliny. Apikální meristém kořene se nachází v růstovém vrcholu, v kořenové špičce. Samotný meristém se obnovuje z iniciačních buněk, které se nacházejí v klidovém centru. Apikální meristém vytváří všechny typy buněk buněčným dělením, pak následuje regulovaná expanse buněk a postupnou diferenciací se posléze vyvíjí a formují jednotlivé pletiva a orgány rostliny (Scheres a kol., 2002; Evert, 2006). Anatomicky se apex kořene skládá ze základních pletiv, které jsou velice brzy, po založení, jasně definovány. Jsou to epidermis, kortex, endodermis a pletiva centrálního válce, stély. V apikální části se nachází kolumela a celou špičku kryje kořenová čepička (Obr. 2).



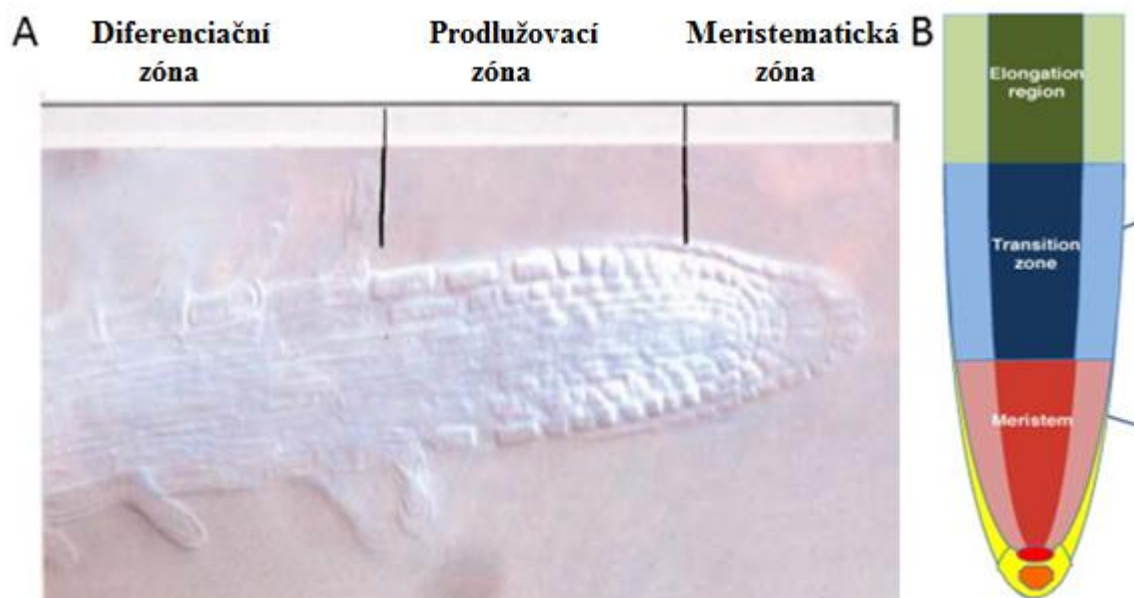
Obr. 2: Schématické zobrazení jednotlivých specializovaných buněk a pletiv v kořenové špičce *A. thaliana* (podle Scheres a kol., 2002).

Tento model apikálního meristému je udržován aktivitou 4 typů kmenových buněk (iniciál), které dávají základ jednotlivým vrstvám kořene. První z nich jsou iniciály epidermy a laterální kořenové čepičky. Jsou umístěny na vnější straně klidového centra. Kolumela, centrální část kořenové čepičky, má svou vlastní sadu iniciál. Další je sada iniciál, které zakládají kortex a endodermis, a poslední sada iniciál dává základ cévním pletivům a pericyklu. Avšak všechny tyto zóny jsou generovány z jednoho centra, které generuje i iniciály, a to je klidové centrum. Nazývá se tak proto, že je mitoticky málo aktivní a tvoří ho několik málo buněk v centrální části kořenové špičky (Scheres a kol., 2002). Že je klidové ale neznamená jeho permanentní nefunkčnost. Buňky v klidovém centru se sporadicky rozdělí, a slouží k obnově hojně se dělících okolních regionů (Evert, 2006).

Kořenový vrchol je zodpovědný i za gravitropismus kořene, tedy za směr růstu podle směru gravitace. V centrální části kořenové čepičky se nacházejí specializované buňky, statocyty, obsahující amyloplasty s vysokým obsahem škrobových zrn, statolitů (perceptory gravitace). Tyto orgány zajišťují vnímání vektoru gravitace a při jakékoli změně polohy rostliny nebo kořene spouští mechanismus gravitropické reakce kořene. (Beck, 2010). Periferní buňky kořenové čepičky vykazují vysokou biosyntetickou a sekreční aktivitu. Produkovaný a sekretovaný sliz polysacharidové povahy ulehčuje pronikání kořene v půdě, chrání kořenovou špičku před mechanickým poškozením a má

vysokou schopnost vázat některé toxické látky (Pilet, 1972; Tsugeki a Fedoroff, 1999; Rost, 2011).

V jednotlivých zónách kořenové špičky probíhá regulovaná proliferace buněk. V meristemické zóně se buňky aktivně dělí. Pak následuje přechodná zóna, ve které se buňky po skončení buněčného dělení fyziologicky a morfologicky připravují na rychlé prodlužování, které probíhá v následující elongační zóně. Po skončení prodlužování podléhají buňky diferenciaci, aby mohli plnit své funkce v zralé části kořene (Scheres a kol., 2002). Jednotlivé zóny vidíme na obrázku 3.

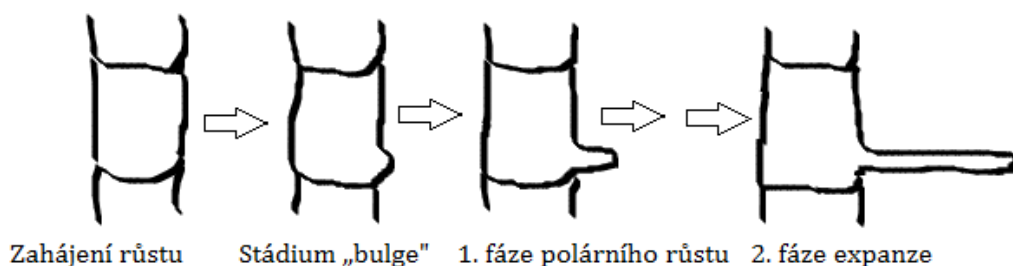


Obr. 3: Vymezení jednotlivých vývojových zón v kořenové špičce *Arabidopsis thaliana*. Často se uvádí, že za meristemickou zónou ihned následuje zóna elongační (podle Scheres a kol., 2002), ve skutečnosti ale po skončení buněčného dělení se buňky nejprve na rychlou elongaci připravují v přechodné zóně (Baluška a kol., 2010).

V epidermální vrstvě kořene *Arabidopsis* se po skončení prodlužování buněk diferencují kořenové vlásky (Foreman a Dolan, 2001). Epidermální vrstva je složena ze dvou typů buněk. Buňky, které se nacházejí v pozici oproti antiklinálním (kolmým) buněčným stěnám kortexových buněk se diferencují na trichoblasty (buňky produkující kořenové vlásky). Buňky, které leží v pozici oproti periklinálním (rovnoběžným) buněčným stěnám kortexových buněk, se diferencují na atrichoblasty, tedy buňky, ze

kterých se kořenové vlásky netvoří (Dolan a kol., 1994). Kořenové vlásky se začínají diferencovat přibližně 1 mm od kořenové špičky a rostou kontinuálně apikálním růstem až do dosažení své konečné délky (Schiefelbein a Somerville, 1990).

Růst kořenových vlásků u *Arabidopsis* se stal modelem pro studium polárního růstu u rostlin. Je regulován mnohými faktory. Různými metodami studia, včetně indukce mutantů s poškozením apikálního růstu kořenových vlásků a charakterizace genů za tyto poruchy zodpovědné, byl objasněn zásadní podíl vytváření iontových gradientů, cíleného transportu vezikul, syntézy buněčné stěny, cytoskeletu a signálních molekul na jeho udržování. Vrcholový růst kořenových vlásků probíhá ve 4 fázích. První fází je iniciace s vytvořením tzv. bulge („výduť“), která vyrůstá na bazálním konci trichoblastu. Posléze začíná samotný polární růst, který nejprve probíhá pomalým růstem a po dosažení délky vlásku přibližně 20-40  $\mu\text{m}$  začíná druhá rychlejší fáze. Pro tyto dvě fáze je charakteristická akumulace vezikul v rostoucím vrcholu, které obsahují komponenty pro stavbu membrány a buněčné stěny (Marthur a Hülskamp, 2001). Tyto fáze můžete vidět na obrázku č. 4.



Obr. 4: Grafické znázornění jednotlivých fází polárního růstu kořenových vlásků. (podle Marthur a Hülskamp, 2001)

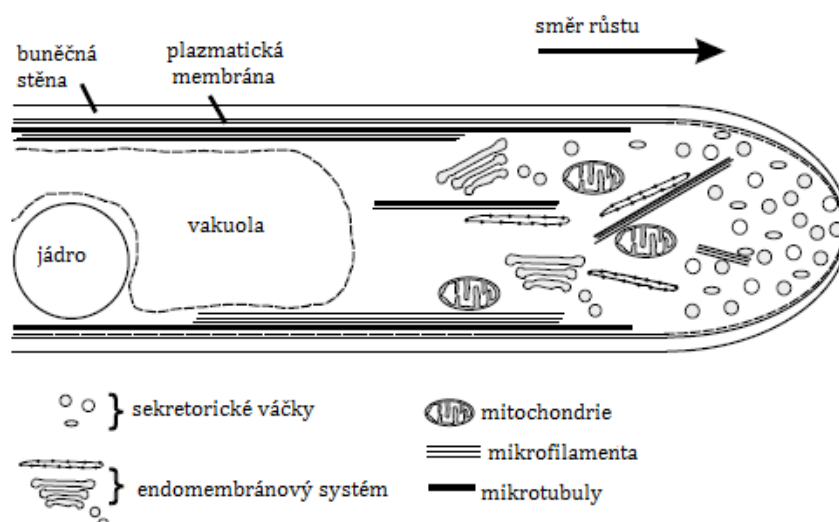
## 2. 3. Důležité faktory pro růst kořenových vlásků

### 2. 3. 1. Morfologie polárně rostoucích vlásků

Buněčná stěna na vrcholu kořenových vlásků je tvořena především z primárních vrstev celulózy. Celulóza se sice syntetizuje v plazmatické membráně, ale další komponenty syntetizované buněčné stěny, jako pektiny a xyloglykany, které se tvoří v endomembránovém systému, se do rostoucího vrcholu dopravují vezikulárním transportem. Z toho důvodu jsou vezikuly v rostoucím vrcholu kořenových vlásků



přítomné v hojném počtu (Foream a Dolan, 2001). Jsou nezbytné i pro tvorbu nové plasmatické membrány. Tyto vezikuly jsou většinou potažené clathrinem a pocházejí z Golgiho aparátu, trans-Golgi sítě (TGN), anebo z plasmatické membrány. Vezikuly jsou pomocí aktinových filamentů dopravovány na určené místo. Většina ostatních organel kořenového vlásku se do vrcholu nedostává, kromě mitochondrií, Golgiho cisteren, TGN, hladkého a drsného endoplazmatického retikula a endozomů (Carol a Dolan, 2002). Jádro se v rostoucím vlásku nachází v relativně stabilní vzdálenosti od jeho vrcholu a to díky subapikálním jemným vláknům F-aktinu, který tvoří jemnou síť mezi jádrem a vrcholem vlásku. Jakmile je vrcholový růst dokončen, jádro začíná migrovat a můžeme ho najít v jakékoliv pozici (Ketalaar a kol., 2002). Po dosažení konečné délky vrchol vlásku vakuolizuje a stabilně se tvoří sekundární vrstva celulózy v buněčné stěně (Carol a Dolan, 2002). Jednotlivé uspořádání organel, cytoskeletu (aktinové filamenta, mikrotubuly) a vezikulů znázorňuje obrázek č. 5.



Obr. 5: Jednotlivé organely a strukturní komponenty v rostoucím kořenovém vlásku (podle Carol a Dolan, 2001)

### 2. 3. 2. Vodíkový gradient, $H^+$ -ATPasa

Před formováním vlásku z trichoblastu dochází k migraci jádra směrem k selektovanému místu a k reorganizaci cytoskeletu (Carol a Dolan, 2002). V tomto místě proběhne iniciace a zformuje se zde „bulge“. K tomu je důležitá přestavba buněčné stěny, čemuž předchází lokální acidifikace v buněčné stěně. Aby tento krok mohl nastat,  $H^+$ -ATPasa lokalizována v plasmatické membráně, udržuje turgor buňky (vnitřní tlak), který

následně generuje vodíkový gradient, což také podporuje příjem dalších nezbytných iontů (Foreman a Dolan, 2001).

### **2. 3. 3. NADPH oxidasa a reaktivní formy kyslíku (ROS)**

NADPH oxidasa se nachází v apikální části plazmatické membrány ve vrcholu vlásku. Katalyzuje extracelulární produkci superoxidů, čímž zabezpečuje důležitou roli v regulaci tvorby a lokální akumulace ROS. Aktivita tohoto enzymu je tedy důležitá v polárním růstu, protože udržuje normální extracelulární pH, odvod elektronů z buňky (každá jedna reakce uvolňuje dva  $H^+$  ionty do cytosolu). Udržuje tím i normální osmoregulaci v buňkách. Aktivita a lokalizace NADPH oxidasy v apexu kořenových vlásků je regulována vzhledem na vývojová stadia vrcholového růstu, je ale i náchylná na nedostatek  $O_2$  a živin a může tak vysílat signály, že buňka musí čelit stresovým podmínkám (Mortimera kol., 2008).

ROS (reaktivní formy kyslíku) byly donedávna považovány jenom za stresové molekuly a byly spojovány s odpovědí rostlin na fyziologický stres, způsobený biotickými a abiotickými faktory. Detailní studium prokázalo, že ROS jsou integrální součástí mechanismu apikálního růstu a determinace tvaru kořenových vlásků a jiných specializovaných buněk rostoucích apikálním růstem, pylových láček. V rostoucích kořenových vláscích kontrolují vápníkové kanály, což stimuluje vstup  $Ca^{2+}$  iontů do buněk. Jejich produkce je naopak ionty  $Ca^{2+}$  kontrolována. V rostoucích vláscích jsou tedy základní komponenty mechanismu růstu zpětnovazebně regulovány (Carol a Dolan, 2006).

### **2. 3. 4. Nejdůležitější ionty pro polární růst**

#### *2. 3. 4. 1. Draslík*

Draslík je hlavní osmoticky aktivní kationt v rostlinných buňkách. Jeho přítomnost a důležité fyziologické funkce v rostoucích kořenových vláscích byly dokumentovány. Kromě toho, že napomáhá k vývoji kořenových vlásků, kořenové vlásky jsou i důležitým místem příjmu draslíku do kořene rostlin. Ve vláscích byly dokázány dva základní mechanismy příjmu  $K^+$  iontů, které fungují souběžně (paralelně). První z nich je zprostředkován kanálovým přenosem. Druhý způsob zabezpečuje přenos  $K^+$  iontů do cytosolu proti elektrochemickému gradientu, je nezávislý na ATP a zprostředkovává ho transportér zodpovědný za  $H^+-K^+$  symport. Transport  $K^+$  prostřednictvím symportu má vyšší afinitu než kanálový přenos (Foreman a Dolan, 2001). Mutace genu některého

z mnoha  $K^+$  transportérů, např. *AtKT1*, *SKOR1*, *AtKUP1*, *AtKT2*, *AtHKT1*, způsobují problém v růstu vlásků, které jsou často rozvětvené (Desbrosses a kol., 2003). To naznačuje důležitou roli draslíku v mechanismu apikálního růstu (Foream a Dolan, 2001).

#### 2. 3. 4. 2. *Vápník*

Příjem vápníku do cytoplasmy rostoucích kořenových vlásků zabezpečují  $Ca^{2+}$  kanály, které jsou umístěny v apikální membráně na špičce vlásku. Tyto kanály dopravují  $Ca^{2+}$  do cytoplasmy z apoplastu. Vnitrobuněčná koncentrace  $Ca^{2+}$  se lokálně zvyšuje hlavně ve stádiu „bulge“ a v apexu rostoucího vlásku. Tyto zjištění naznačují, že příjem  $Ca^{2+}$  a jeho gradient v apexu nejsou nevyhnutelné k iniciaci, jsou ale potřebné při dalších fázích růstu vlásků (Bibikova a kol., 1997). Existují 3 různé typy vápníkových kanálů v rostlinách: HAAC, které jsou aktivovány při hyperpolarizaci membrány, jsou přítomny ve vláscích, dále DAAC, aktivovány při depolarizaci a též přítomny ve vláscích, a poslední NSCC, které jsou neselektivní a na špičce kořenových vlásků se nenacházejí (Miedema a kol., 2008). HAAC a DAAC kanály se střídají v otevírání a zavírání, protože hyperpolarizace a depolarizace plasmatické membrány je důležitá při kontrole růstu. HAAC je aktivován ROS, je to hlavní řídicí kanál pro příjem  $Ca^{2+}$  iontů do buňky a hraje tedy hlavní úlohu i při prodlužování vlásku. DAAC je aktivován vysokou hladinou  $H^+$  iontů a hraje taky významnou roli v regulaci růstu (Mortimer a kol., 2008). Vápníkový gradient podporuje exocytózu sekretorických váček a ovlivňuje pevnost buněčné stěny. Jeho důležitost byla dokázána u mutantu *rhd2* (podrobněji se o něm zmíníme v další kapitole). Tento mutant nemá dostatečný příjem vápníku při iniciaci apikálního růstu, vývoj vlásků se tudíž zastaví ve stádiu „bulge“. Takže je zřejmé, že protein RHD2 je určitě potřebný k aktivaci těchto kanálů. Bylo dokázáno, že RHD2 kóduje NADPH oxidasy, která přenáší elektron z NADPH na elektronový akceptor, co vede k tvorbě ROS (Carol a Dolan, 2002; Foream a Dolan, 2001; Foreman a kol., 2003). Arteficiální zvyšování příjmu vápníku pomocí ionoforů vedlo k expanzi nejen na vrcholu vlásků. Tento efekt se zvýšil po depolymerizaci mikrotubulů, což vedlo k větvení vlásků a k iniciaci růstu v různých regionech vlásku, nejen v apexu (Bibikova a kol., 1999). Dokumentuje to úzkou kooperaci udržování  $Ca^{2+}$  gradientu ve vrcholu s funkcí cytoskeletu, který je další nedílnou součástí polárního růstu (Marthur a Hülskamp, 2001). Vápník hraje důležitou roli i v signálních drahách, prostřednictvím kterých se aktivují „calcium-dependentní protein kinázy“. Tyto dráhy mohou ovlivňovat exocytózu, která je ionty vápníku zprostředkováná,

a regulují i od vápníku-závislé změny ve struktuře a aktivitě cytoskeletu (Bibikova a kol., 1999).

### **2. 3. 5. Cytoskelet**

Cytoskelet je integrální součástí všech buněk jak v rostlinné, tak v živočišné říši. U rostlin ho tvoří dvě základní složky, mikrotubulární cytoskelet a aktinový cytoskelet, které společně tvoří dynamickou cytoplazmatickou síť. Role cytoskeletu při vývoji kořenových vlásků je určitě nenahraditelná jak v usměrňování organizace růstu vlásků, udržování jejich tvaru, tak v transportu důležitého materiálu v rostoucím vlásku (např. materiál pro nově se tvořící buněčnou stěnu). Celý proces usměrňování vezikulárního transportu je taky pod precizní kontrolou cytoskeletu (Sieberer a kol., 2005). Aktinový cytoskelet nejen v kořenových vláscích, ale v rostlinných buňkách obecně, udržuje cytoplazmatické proudění a hraje primární roli v transportu organel a vezikulů. Důležitost aktinového cytoskeletu pro vývoj kořenových vlásků byla jednoznačně potvrzena aplikací látek (latrinculin B), které způsobují depolymerizaci aktinových mikrofilament. Po jejich depolymerizaci se růst vlásků zastavuje (Ketelaar a kol., 2003; Baluška a kol., 2000). K růstu vlásků je nejdůležitější F-aktin. V nerostoucí části vlásku jsou přítomny především aktinové mikrofilamenty a jejich svazky, v rostoucím vrcholu pak především dynamická síť F-aktinu (Baluška a kol., 2000).

Mikrotubuly pro změnu hrají důležitou roli při kontrole směru růstu kořenových vlásků a jejich morfologii (Foream a Dolan, 2001). Inhibicí správné činnosti mikrotubulů nedochází k zastavení růstu, jako u aktinu, ale vlásky vykazují změny tvaru (rozdvíjení vlásků, vývoj více vlásků z jednoho trichoblastu, zvlněný tvar vlásků). Mikrotubuly jsou tedy nezbytné ke stabilizaci apikálního růstu kořenových vlásků (Bibikova a kol., 1999). Ve vláscích se nacházejí dvě formy mikrotubulární sítě. Na periferii buňky pod plazmatickou membránou se nachází kortikální mikrotubulární síť, kterou můžeme pozorovat podél celé délky vlásku od špičky až k jeho bázi. Druhá síť je tvořená vnitřními svazky mikrotubulů, které jsou přítomné v cytoplazmatických svazcích, mezi jádrem a vrcholem vlásku. Jsou to endoplazmatické mikrotubuly (Foreman a Dolan, 2001). Před vytvořením vlásku dochází v místě jeho vzniku k reorganizaci podélně rovnoběžného uspořádání kortikálních mikrotubulů trichoblastu. Kortikální mikrotubuly jsou zde chaoticky uspořádané. Po založení vlásku je potom ve vrcholu možné pozorovat endoplazmatické mikrotubuly (Van Bruaem a kol., 2004).

### 2. 3. 6. Vezikulární transport a důležité proteiny, které ho regulují

Generace, cílený transport a fúze vezikul jsou esenciální procesy pro založení a udržení polaritu polárního růstu, jako i při progresi polárního růstu samotného. Populace vezikul v rostoucích kořenových vláscích je tvořena hlavně sekretorickými a endocytotickými vezikuly. Ve vrcholu rostoucích kořenových vlásků se nachází tzv. čirá zóna, která je vyplněna převážně jenom vezikuly. Ty pocházejí z *trans*-Golgiho sítě (TGN), ale jsou generovány i z plasmatické membrány procesem endocytózy. Tyto vezikuly mohou recyklovat ve vrcholu vlásků mezi různými kompartmenty, a proto se nazývají i recyklační vezikuly. Množství vezikul ve vrcholu vlásků jenom dokumentuje, jak důležitou roli hraje sekrece, exocytóza a endocytóza v progresi a regulaci polárního růstu kořenových vlásků (Šamaj a kol., 2006).

#### 2. 3. 6. 1. Exocytóza

Exocytotické vezikuly jsou velké asi 100-150 nm v průměru a tvoří se v Golgiho aparátu rychlostí asi 2-4 vezikuly za minutu na jednu Golgiho-cisternu. V některých hypersekrečních buňkách to může být i několik tisíc vezikul za minutu. Průběh exocytózy je řízen a kontrolován řadou důležitých proteinů. Patří mezi ně Rop-GTPasy, které regulují aktinový cytoskelet, dále pak ARFs (ADP-ribosylační faktory), které jsou esenciální pro formování vezikulů na donorové membráně a Rab-GTPasy, které jsou zodpovědné za správnou fúzi vezikulů s cílovou membránou. Ve špičce kořenových vlásků byly lokalizovány během apikálního růstu například proteiny RabA4b a Rop2, které jsou pozitivními regulátory růstu. K důležitým regulátorům exocytózy patří i SNARE proteiny, které zprostředkovávají závěrečné fáze fúze vezikulů s plasmatickou membránou nebo s cílovými membránami v rámci endomembránového systému (Campanoni a Blatt, 2006).

#### 2. 3. 6. 2. Endocytóza

Endocytóza je proces internalizace plasmatické membrány, přičemž může docházet i k internalizaci extracelulárních molekul, tekutin, mechanických částic, virů či bakterií. Uplatňuje se při renovaci komponent plasmatické membrány a receptorů, při zprostředkování signálů, při eliminaci patogenů, při iniciaci symbiózy s mikroorganismy a také při příjmu esenciálních stavebních a nutričních látek. U rostlin můžeme pozorovat 4 základní formy endocytózy: na klatrinu závislá, na klatrinu nezávislá, fluidní endocytóza

a fagocytóza. V kořenových vláscích je důležitá jak na klatrinu závislá, tak na klatrinu nezávislá dráha. Obě jsou lokalizovány ve vrcholu rostoucích kořenových vlásků, přičemž na klatrinu nezávislá dráha může být aktivní především v apikální části vrcholu a na klatrinu závislá dráha v subapikální části vrcholu. Při klatrinem-zprostředkované endocytóze jsou vezikuly potažené tímto proteinem a pomocí adaptorových proteinů (AP180,  $\alpha$ C-adaptin) dochází k formování klatrinového skeletu.  $\alpha$ C-adaptin se váže na AP180 a ten následně interaguje s klatrinem. Váčky tohoto typu mají velikost 70-80 nm a jsou tedy menšího průměru než u savců, protože u rostlin hraje významnou roli turgorový tlak (Šamaj a kol., 2004). Endocytóza nezávislá od klatrinu je zprostředkovaná specifickou koncentrací lipidických komponentů plasmatické membrány (sterolů) a i proto se nazývá endocytóza závislá od lipidických raftů. Endocytotické váčky mohou být ve špičce rostoucího vlásku recyklovány, nebo fúzí s ranými endozomy, které následně mohou nesený materiál posílat do pozdních endozomů. Tato dráha, pokud jde o degradaci, končí fúzí s vakuolou. Při této dopravě vezikul významnou roli hraje aktinový cytoskelet, a je nezávislá na endoplazmatickém retikulu (Campanoni a Blatt, 2006). Důležitými regulátory endocytózy jsou Rab-GTPázy, kterých je v *Arabidopsis* genomu kódovaných více než 30. Zástupcem velkých GTPáz, které hrají důležitou roli při odštěpování vezikul z plasmatické membrány při endocytóze, je dynamin. Asociuje s řadou proteinů včetně klatrinového obalu vezikul, a také s aktinovým cytoskeletem. V tomto procesu je nejdůležitější F-aktin, který se podílí na vápníkem-stimulovaném a Rho proteiny-regulovaném transportu vezikul (Šamaj a kol., 2004).

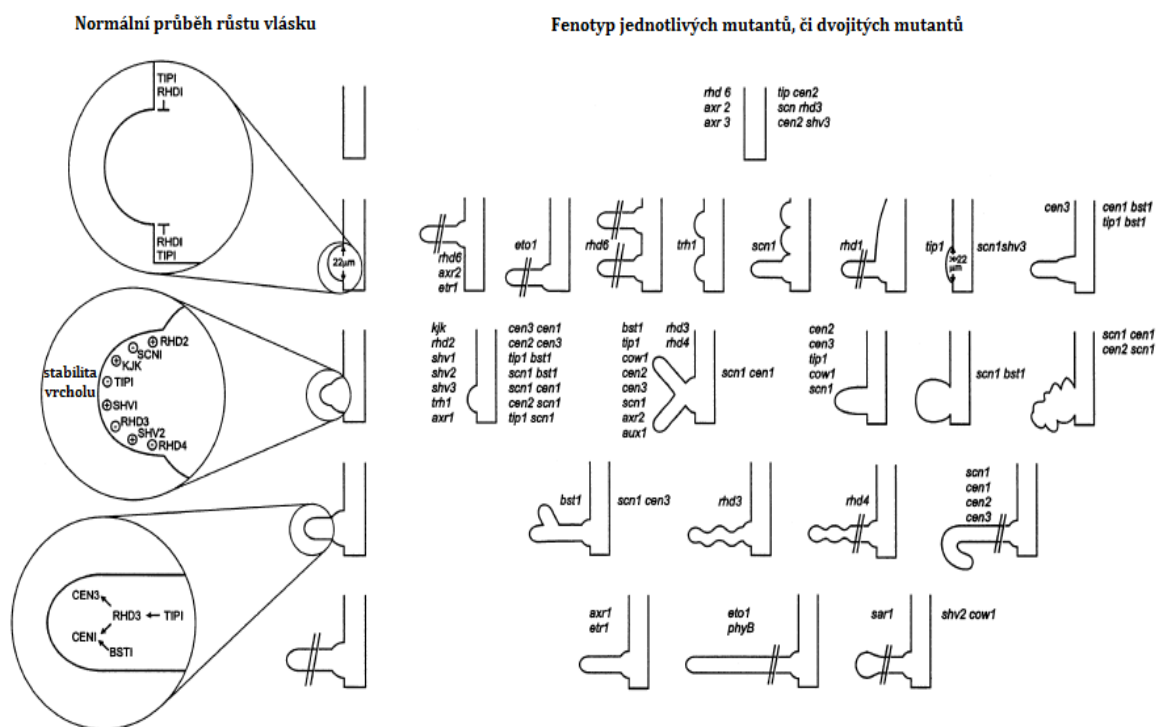
Proto je zřejmé, že v kořenových vláscích musí být regulována rovnováha mezi mírou sekrece vezikulů a endocytózou, aby se zajistil odpovídající tok materiálu a iontů pro polární růst (Campanoni a Blatt, 2006).

#### **2. 4. Geny důležité pro vývoj a růst kořenových vlásků**

Abychom mohli zjistit, které geny řídí proces vývoje a růstu kořenových vlásků, byla provedena náhodná nebo cílená mutageneze, s cílem izolovat mutanty vykazující abnormality kořenových vlásků. Po identifikaci mutovaných jedinců se podle změn fenotypu kořenových vlásků zjišťovalo, do jaké míry a v jakém procesu je daný gen pro správný vývoj kořenových vlásků důležitý. Je už známo hodně genů, které proces vývoje a růstu kořenových vlásků ovlivňují (Schiefelbein a Somerville, 1990). Základní studium probíhalo na mutantech, které mají pozměněný jen jeden gen, následovali pak studie

i u dvojitých mutantů. To bylo přínosné pro odhalení nových rolí genů, které se nemohli projevit už u jednotlivých mutantů, a ukázali se nové regulační vztahy mezi různými geny (Parker a kol., 2000).

Na obrázku č. 6 je shrnut seznam mutantů, jak jednoduchých tak dvojitých, u kterých byly definovány konkrétní změny v morfologii kořenových vlásků. Proces tvorby vlásku je srovnán s normálním průběhem zakládání a růstu vlásků, především pro založení správného průměru „bulge“, pro udržení stability zakládaného vrcholu vlásku (s vyznačeným pozitivním a negativním vlivem) pro udržení správné elongace. Jsou tu znázorněny i vztahy mezi jednotlivými proteiny, při kterých CEN1 a CEN3 jsou závislé na aktivitě RHD3, BST1 a TIP1. Mutanti jsou seskupeny podle jednotlivých vývojových fází (Grierson a kol., 2001).

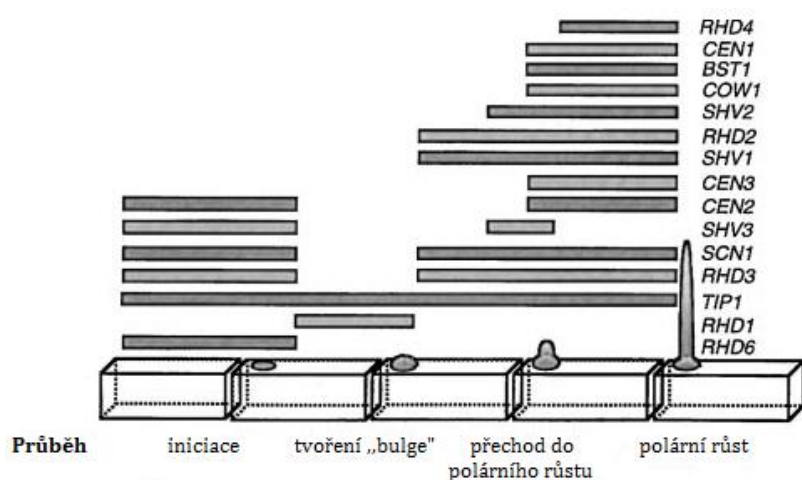


Obr. 6: Schématické znázornění jednotlivých morfologických typů mutantů kořenových vlásků, jejich fenotypů a přiřazení k jednotlivým stadiím normálního průběhu polárního růstu (Grierson a kol., 2001).

Studiem různých mutantů se zjistilo hodně aspektů, které geny se na vývoji kořenových vlásků podílí, jakou hrají roli a jak spolu interagují během polárního růstu. I u definovaných mutantů se ale vyskytují rozdíly, protože gen se projevuje dvěma rozdílnými alelami, kdy jedna se může projevovat více (fenotyp je více ovlivněn) a druhá

méně. Jako ukázka, v kterých fázích polárního růstu se jednotlivé geny exprimují, je prezentována vývojová mapa exprese na obrázku č. 7. Je to příklad jen pro několik genů, které se na celém procesu podílejí. Podle fáze růstu vlásků, ve které se exprimují se předpokládá, jaký fenotyp bude mutovaná rostlina mít, a asi jakou funkci může daný gen plnit (Parker a kol., 2000).

Několik genů, které byly charakterizovány podrobněji, můžeme více přiblížit. První je skupina genů, které jsou důležité pro správnou iniciaci kořenových vlásků. Jsou to geny *RHD1*, *RHL* a *RHD6*. Mutace *rhdl* (*root hair defective1*) vede k fenotypu, u kterého vlásky dorůstají přibližně stejné délky jako u kontroly, ale tvoří se na bázi i po délce vlásku abnormálně rozšířené úseky (Schiefelbein a Somerville, 1990). *RHL* (*root hairless*) gen kóduje malý jaderný protein, který je důležitý pro normální iniciaci vlásku z trichoblastu (Carol a Dolan, 2002). Produkt *RHD6* genu je důležitý pro korektní selekci místa na trichoblastu, kde bude růst kořenového vlásku zahájen. U mutantů *rhdl6* se vytváří vlásky na jiném místě trichoblastu, než na jeho basálním konci. Tento výběr lokalizace budoucího vlásku je také pod vlivem růstových regulátorů auxinu a etylenu (Parker a kol., 2000).



Obr. 7: Aktivace genů v jednotlivých fázích polárního růstu (podle Parker a kol., 2000).

Auxin a etylen hrají roli i v regulaci polárního růstu. Důkazem je fenotyp *axr2* mutantu (resistentní k auxinu i etylenu) či *etr1* (resistentní vůči etylenu), které mají stejný fenotyp jako *rhdl6* mutant. Navíc bylo dokázáno, že etylen dokáže zvrátit fenotyp *rhdl6* mutantu (Carol a Dolan, 2002). Další skupina genů (*RHD2*, *SHV1*, *SHV2*, *SHV3*) je důležitá při přechodu z iniciační fáze, kdy se vytvoří „bulge“, do fáze elongace. Jsou to tedy regulační geny správného prodlužování kořenového vlásku. Mutace těchto genů vedou



k tomu, že kořenové vlásky zůstávají krátké (20-40  $\mu\text{m}$ ). Většinou se jejich vývoj zastaví ve fázi těsně po „bulge“. Jako první ovlivňuje růst gen *RHD2*, následně pak *SHV1* a po něm nakonec *SHV2* a *SHV3*. Třetí skupina genů (*BST1*, *CEN1*, *CEN2*, *CEN3*, *RHD3*, *SCN1*) je potřebná pro správnou kontrolu tvaru vlásků během jejich růstu. Fenotyp mutantů je charakteristický pozměněným tvarem vlásků, které jsou delší než 40  $\mu\text{m}$ . Při mutaci některých genů (*BST1*, *CEN2*, *CEN3*, *SCN1*) se vlásky větví, tudíž tyto geny jsou důležité při regulaci mechanismu, který omezuje počet vlásku rostoucích z jednoho místa na trichoblastu. Některé geny mohou hrát roli v růstu a diferenciaci i jiných typů buněk (*RHD3*, *TIP1*). Gen *TIP1* je důležitý i pro růst pylových láček a oba geny *RHD3* a *TIP1* jsou důležité i pro vzrůst a architekturu celé rostliny. Naopak geny jako *COW1* jsou specifické jen pro vývoj a růst kořenových vlásků (Parker a kol., 2000).

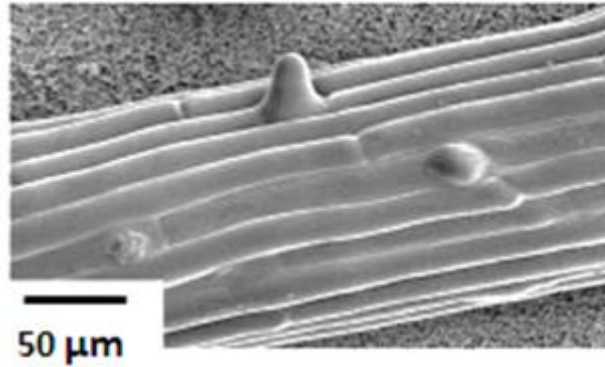
Geny *TRH1* a *KJK* regulují specifické děje během apikálního růstu kořenových vlásků. Gen *TRH1* kóduje  $\text{K}^+$ -transportér a při mutaci vláska nemohou přejít do fáze intenzivního růstu. Vytvářejí se jen malé výrůstky, kterých může být na jednom trichoblastu i více. Gen *KJK* zase kóduje protein příbuzný syntase celulózy a jeho funkce je proto důležitá při syntéze polymerů nově se tvořící buněčné stěny rostoucích kořenových vlásků. Mutant *kjk* (*kojak*) se proto vyvíjí bez kořenových vlásků, protože jakmile se vláska po založení dostanou k fázi apikálního růstu, praskají (Carol a Dolan, 2002).

## 2. 5. Vybraní mutanti a jejich charakteristika

### 2. 5. 1. *rh2* mutant

Fenotyp tohoto mutantu je charakteristický krátkými nebo zakrňelými vláska (Obr. 8). Je to způsobeno tím, že tato mutace způsobuje defekt v příjmu  $\text{Ca}^{2+}$ , který je pro elongaci vlásků esenciální. Gen *RHD2* (*ROOT HAIR DEFECTIVE2*) kóduje NADPH oxidasu, předávající elektrony z NADPH na akceptor, což vede k tvorbě ROS. ROS se normálně generují a akumulují ve vrcholu kořenových vlásků u divokého typu, ale u *rh2* mutantu je množství ROS podstatně snižené. To je důkaz toho, že NADPH oxidasa generuje ROS, které následně aktivují vápníkové kanály (Foreman a kol., 2003). Protein kódován *RHD2* genem je během růstu vlásků lokalizován v rostoucím vrcholu, odtud po ukončení růstu vymizí. Znamená to, že lokalizován *RHD2* protein omezuje produkci ROS jenom do těch míst, kde je to nevyhnutelné k pokračování apikálního růstu, tedy do vrcholu vlásku (Takeda a kol., 2008). Se změnami koncentrace ROS korelují i změny v pH, což se též

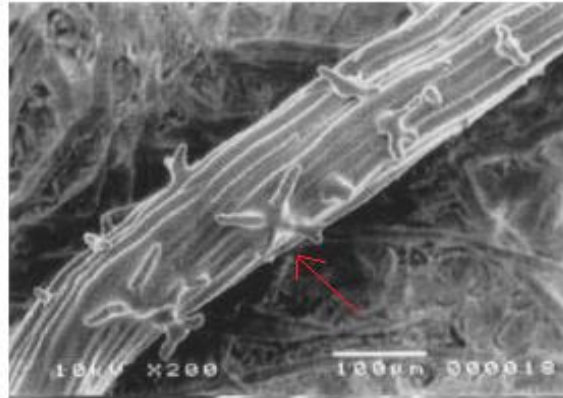
podílí na koordinaci apikálního růstu. Hodnota pH ve vrcholu vlásku během růstu osciluje, podél vlásku a na jeho bázi je pH většinou stabilní. Když se pH zvýší na hodnotu 8, vlásek okamžitě přestává růst. Při snížení pH na hodnotu 4,5 všechny rostoucí vlásky praskají, zatím co nerostoucí vlásky zůstávají nepoškozeny. Podobné reakce kořenových vlásků vyvolává i umělé zvýšení, či snížení koncentrace ROS. Proto důležitá je hlavně hodnota extracelulárního pH a produkce ROS, protože oba tyto předpoklady mají pozitivní vliv na vlastnosti membrán spojené s polární expanzí buněk a mají i přímý vliv na strukturu a roztažnost buněčné stěny. Mutant *rhd2* postrádá funkční NADPH oxidasu (ATRBOH C) a tudíž dochází k zastavení růstu až prasknutí vlásků před jejich přechodem do polárního růstu. Zjistilo se, že fenotyp může být zvrácen zvýšením pH růstového média nad hodnotu 6, vlásky ale stále vykazovali sníženou cytoplazmatickou hladinu ROS a nedostatečnou produkci ROS ve vrcholu. Ale i tak vlásky po zvýšení pH rostly normálně, a docházelo i k vytváření gradientu  $Ca^{2+}$  ve vrcholu, co naznačuje, že enzym ATRBOH C nebude pravděpodobně nezbytně nutný pro udržování polárního růstu kořenových vlásků (Monshausen a kol., 2007). Studie ukázali i důležitou roli fosfatidylinositol-3-fosfátu (PtdIns(3)P), který je pro elongaci kořenových vlásků esenciální. Tento fosfolipid je generován enzymem fosfatidylinositol-3-kinázou. Její nadprodukce v transgenních rostlinách, jako i blokování její funkce, způsobují fenotypové změny kořenových vlásků. Nefunkčnost této kinázy vedla k tomu, že vlásky byly krátké, a jelikož byla blokována jejich elongace, ale ne iniciace, připomínalo to postižení *rhd2* mutanta. Tato kináza hraje důležitou roli i v efektivitě endocytózy v kořenových vláscích (Lee a kol., 2008). Protein RHD2 je lokalizován na plazmatické membráně a pomocí specifických markerů se zjistilo, že i on má vliv na vezikulární transport a endocytózu. Při dalších experimentech se ukázalo, že pro udržování pozice RHD2 ve špičce rostoucích kořenových vlásků je zapotřebí aktinový cytoskelet, ne však mikrotubuly. Příklad *rhd2* mutanta názorně dokumentuje složitost mechanismů a komplexnost regulací polárního růstu kořenových vlásků (Takeda a kol., 2008).



Obr. 8: Fenotyp *rhd2* mutanta (Foreman a kol., 2003).

### 2. 5. 2. *tip1* mutant

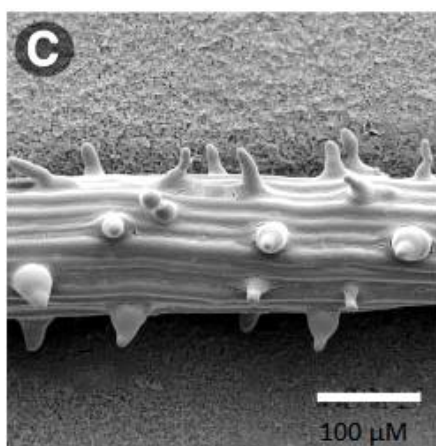
Tento mutant má typický fenotyp s vlásky kratšími, než jsou u divokého typu, které na bázi navíc rozvětvují (2 a více vlásků z jedné báze). Iniclace vlásků probíhá normálně na bazální straně trichoblasu (Schiefelbein a kol., 1993), tedy iniciační fáze je v pořádku. Vlázky ale vyrůstají z rozšířené základny, která je větší než u divokého typu (Obr. 9). Gen *TIP1* (*TIP GROWTH DEFECTIVE1*) se nachází na chromozomu č. 5. Kódovaný protein je zapojen ve vývoji kořenových vlásků až po stádium iniciace, při které není zachován princip formování a růstu jen jednoho vlásku z „bulge“ (Ryan a kol., 1998). Tento protein je důležitý v mnoha aspektech polárního růstu, jak u kořenových vlásků, tak i u pylových láček. Je ovlivňován koncentrací  $Ca^{2+}$  uvnitř buňky a má vliv na koordinaci aktinových filament, nebo na syntézu buněčné stěny. Mutant *tip1* byl vygenerován chemickou mutagenezí pomocí ethyl metansulfonátu a když ho zkřížíme s divokým typem,  $F_1$  generace projevuje normální fenotyp. To naznačuje, že tato mutace je recesivní (Schiefelbein a kol., 1993). Existují nezávislé mutace na jiných alelách jednoho genu, např. *tip1-1* a *tip1-2*, které spolu neinteragují (Ryan a kol., 1998). Mutace *tip1-2* má silnější fenotyp, je to tedy alela s větším efektem (Hemsley a kol., 2005). Rostliny mají mírně trpasličí vzrůst, kratší internodia, kvetou později a jejich senescence přichází rychleji. Epidermální buňky rostliny jsou kratší, což ukazuje, že *TIP1* je důležitý pro růst a tvar buněk všeobecně a ne jen pro polární růst (Ryan a kol., 1998). Následně se zjistilo, že *TIP1* přispívá k formování vlásků mnohem dříve, než se myslelo a jako jediný ze čtrnácti studovaných genů má vliv na proces růstu celé rostliny. Tento gen kóduje S-acyl transferasu (palmitoyl transferasu), což je enzym důležitý pro interakci proteinů s plazmatickou membránou (Hemsley a kol., 2005).



Obr. 9: Fenotyp *tip1* mutanta. Šipka ukazuje kořenový vlásek s vyrůstáním 4 vrcholů z jednoho základu (Ryan a kol., 1998).

### 2. 5. 3. *der1-3* mutant

Gen *DER1* (*DEFORMED ROOT HAIR1*) kóduje ACTIN2 (*ACT2*), což je hlavní aktin v rostlinných pletivech. Jeho funkce není důležitá jenom pro efektivní polární růst kořenových vlásků, ale i pro správnou selekci místa kde se „bulge“ vytvoří. Existuje celkem 8 ACT proteinů. ACT2, ACT7 a ACT8 jsou exprimovány v kořenových vláscích, ACT8 je velice podobný ACT2, liší se jen v jedné aminokyselině. ACT proteiny jsou důležité při definování buněčné architektury a polarizace, ale i ve flexibilitě a dynamické odpovědi rostlin na měnící se podmínky (Ringli a kol., 2002). Mutant *der1*, který byl získán mutací ethylmetansulfonátem (Ringli a kol., 2005), představuje vynikající model pro lepší pochopení důležitosti aktinového cytoskeletu ve formování a růstu kořenových vlásků. Díky němu se zjistilo, že ACT2 je potřebný v celém procesu růstu vlásků. Fenotyp (viz obrázek č. 10) je charakteristický kratšími vlásky než u divokého typu, se širší „bulge“ a variabilním průměrem. To je způsobeno tím, že tento mutant má problém v ukládání materiálu do buněčné stěny. Toto ukládání je asymetrické, což může mít nepatrný vliv na směr růstu, protože aktin má nezastupitelné funkce ve vezikulárním transportu. Vlázky se častěji iniciují na jiném místě trichoblastu než na bazálním konci. Existují 3 alely, ze kterých každá ovlivňuje fenotyp v jiné míře. Mutace *der1-2* a *der1-3* mají silnější fenotyp než *der1-1*, kdy jsou báze vlásků hodně zvětšené a vlázky samotné jsou mnohem kratší než u divokého typu. Mutant *der1-2* má častěji zvětšené báze vlásků než mutant *der1-3*. Mutace *der1* jsou recesivní, protože po zkřížení s divokým typem se fenotyp zvrátí. Celý kořen má vlnitý tvar, jako důsledek defektů, které má tato mutace na mikrotubulární skelet. Jak bylo dokázáno, tato mutace ovlivňuje oba typy cytoskeletu (Ringli a kol., 2002).



Obr. 10: Fenotyp *der1-3* mutanta (Ringli a kol., 2002).

## 2. 6. Abiotické stresové faktory působící na rostliny

Rostliny jsou nepohyblivé organismy, tudíž nemohou uniknout před environmentálními stresy a proto si vyvinuly sofistikované procesy k obraně a adaptaci (Smékalová a kol., 2013). Na základě těchto obranných mechanismů se umí vypořádat s celou škálou stresů, ať jde o chlad, teplo, sucho či o zasolenou půdu. To je v dnešní době čím dál častější problém, protože až 20 % orné půdy trpí suchem a přesolením. Rostliny jsou pak menšího vzrůstu a redukuje se i jejich produktivita. Pochopení mechanismů jak rostliny udržují iontovou homeostázi a dokážou tolerovat sucho a přesolení je v dnešních výzkumných záměrech jeden z hlavních problémů. Za udržování membránového potenciálu a aktivity mnoha enzymů je zodpovědná vnitrobuněčná homeostáza  $\text{Na}^+$  a  $\text{K}^+$  iontů. Regulace příjmu iontů je důležitá, aby byla udržována nízká koncentrace toxických iontů, a aby se v dostatečné míře přijímali ionty esenciální (Conde a kol., 2011). V signalizaci na abiotické stresy hrají důležitou roli mitogen-aktivované protein kinasy (MAPK). Při přenosu signálů dochází k postupné fosforylaci MAPKKK (MAP kinasy kinasy kinasy), MAPKK (MAP kinasy kinasy) a jako poslední MAPK (Sihna a kol., 2011; Capone a kol., 2004). MAPK modul je multienzymový komplex, jehož aktivace hraje roli jak ve stresových reakcích, v adaptačních procesech, tak i v regulaci buněčného dělení, diferenciaci, programované buněčné smrti, ale i v symbióze a patogenezí (Smékalová a kol., 2013). Signalizace prostřednictvím MAPK modulů se uplatňuje při vnímání různých stresů, přičemž u každého se mohou aktivovat jiné MAPK moduly (Sihna a kol., 2011). Regulace hormonů a dynamiky cytoskeletu reprezentující další primární reakce na signalizaci extracelulárních signálů, a zpětná modulace hormonální aktivity a cytoskeletární dynamiky se podílí na zvyšování tolerance rostlin vůči abiotickým stresům (Conde a kol., 2011; Liuet a kol., 2012).

### 2. 6. 1. Osmotický a solný stres

Solný stres (zasolení půdy) vzniká při odpařování, srážení a zvětrávání hornin. Má nepříznivé účinky na růst a vývoj rostlin a zvláště má obrovské důsledky na výnosy plodin. Je způsoben hlavně vysokou koncentrací  $\text{Na}^+$  iontů (Smékalová a kol., 2013). Tento stres způsobuje také radiální zvětšení buněk vnějších vrstev tkání a inhibuje celkovou elongaci (Dinnery a kol., 2008). Vysoká koncentrace solí zásadním způsobem ovlivňuje důležité děje v rostlinách. Je to snížená dostupnost vody a  $\text{K}^+$  iontů z půdy pro kořeny, díky vysokému půdnímu osmotickému tlaku. Vzniká i iontové napětí díky nerovnováze rozpuštěných látek, což zvyšuje hladinu  $\text{Na}^+$  a  $\text{Cl}^-$  v cytosolu a mění se poměr  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  iontů (Conde a kol., 2011). Rostliny se před tím chrání tak, že odstraňují  $\text{Na}^+$  z buněk přes  $\text{SOS1 Na}^+/\text{H}^+$  antiporter, který udržuje intracelulární poměr  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  iontů (Smékalová a kol., 2013). Tyto ionty se také transportují do vakuol, kde se akumulují. Solný stres má dále toxický vliv na hlavní enzymy, integritu buněčných membrán, získávání živin, ale i na fotosyntetické mechanismy. Generují se vysoké hladiny ROS, které jsou samy o sobě příčinou různých poškození rostlin při solném a osmotickém stresu, i když v přiměřeném množství ovlivňují řadu mechanismů pozitivně (zmíněno výše; Conde a kol., 2011). ROS jsou během stresu syntetizovány v chloroplastech, peroxisomech, mitochondriích a v apoplastu (Liuet a kol., 2012).

Hyperosmotický stres může zhoršit toxicitu sodíkových iontů, protože se díky němu opět zvyšuje množství solí (Smékalová a kol., 2013). V peroxisomech se při osmotickém stresu akumuluje oxid dusnatý, který by mohl být vhodným kandidátem na prostředek tolerance vůči tomuto stresu (Wimalasekera a kol., 2011). Při signalizaci osmotického stresu se jako první uplatňuje osmotický senzor  $\text{ATHK1}$ , který pak dále posílá signál na  $\text{MAPK}$  kaskádu (Conde a kol., 2011). Osmotický a solný stres aktivují  $\text{MPK3}$ ,  $\text{MPK4}$  a  $\text{MPK6}$ . Právě  $\text{MPK6}$  hraje centrální roli v raných stádiích detoxifikace sodíkového stresu, protože rychle fosforyluje  $\text{SOS1 Na}^+/\text{H}^+$  antiporter a indukuje vylučování  $\text{Na}^+$  iontů ven z buněk na úkor cytosolové acidifikace (Smékalová a kol., 2013).

### 2. 6. 2. Chladový stres

Chladový stres způsobuje, že plazmatická membrána je méně fluidní (Smékalová a kol., 2013), dochází k depolymerizaci aktinu a stimuluje se příliv  $\text{Ca}^{2+}$  iontů do buněk (Liuet a kol., 2012).  $\text{Ca}^{2+}$  hraje důležitou roli v signalizaci tohoto stresu (Conde a kol.,

2011). Chladový stres vyvolává fyziologické odpovědi, které v konečném důsledku, přes druhé posly, způsobují změny v genové expresi. To je zprostředkováno aktivací MAPK a od vápníku závislých protein kinas (CDK). Chladový stres může mít ale efekt i na různé post-transkripční procesy. Hlavní MAPK, které v signalizaci chladového stresu hrají roli, jsou MPK4 a MPK6. Mohou se aktivovat už během 2 minut po vystavení stresovým podmínkám (Smékalová a kol., 2013).

### **2. 6. 3. Oxidativní stres**

Tento stres je spojen s intoxikací těžkými kovy, otravou ozónem, osmotickým stresem a dalšími abiotickými stresy (Smékalová a kol., 2013). Důležitou roli zde hrají ROS, které jsou podobně jako u solného a osmotického stresu indukovány i u stresu oxidativního. Jsou rozkládány antioxidantními enzymy (kataláza, superperoxid dismutáza), které chrání buňky před akumulací peroxidu vodíku ( $H_2O_2$ ). Avšak než k tomu dojde, ovlivňují aktivaci MAPK kaskád (Capone a kol., 2004). Je známo, že ROS aktivují MPK3 a MPK6, které mají vliv na expresu genu *OXII* (*OXIDATIVE SIGNAL – INDUCIBLE*). Tedy při vysoké koncentraci ROS se indukuje transkripce *OXII* genu. Ukázalo se, že korespondující protein OXI1 má velký rozsah funkcí, včetně udržování normálního růstu kořenových vlásků při stresových podmínkách (Smékalová a kol., 2013).

### **3. CÍL PRÁCE**

#### **Teoretická část**

1. Zpracování literární rešerže se zaměřením na problematiku a) struktury, morfologie, vývinu a genetiky kořene rostlin, b) biologie kořenových vlásků a fenotypové projevy mutací genů zahrnutých ve vývinu kořenových vlásků, c) reakce kořene na abiotický stres z prostředí na molekulární a buněčné úrovni, se zřetelem na obranné reakce a vývojové adaptace rostlin.

#### **Praktická část**

1. Otestování a nastavení optimálních kultivačních podmínek *in vitro* na neinvazivní pozorování vývinu a růstu kořenových vlásků, k řízené aplikaci stresových faktorů a k následnému vyhodnocování reakcí rostlin na orgánové, pletivové a buněčné úrovni.
2. Charakteristika fenotypových změn kontrolních rostlin kultivovaných ve stresových podmínkách, kvalitativní a kvantitativní vyhodnocování růstových parametrů kořene a kořenových vlásků.
3. Mikroskopická dokumentace dynamických procesů v rostoucích kořenových vláscích vybraných mutantů po působení teplotního, solného a osmotického stresu.
4. Stanovení míry rezistence k vybraným abiotickým stresům u mutantů s kořenovými vlásky neschopných růstu.



## **4. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST**

### **4. 1. MATERIÁL**

#### **4. 1. 1. Použité chemikálie**

- Médium (Murashige and Skoog medium, DUCHEFA)
- Sacharóza (SIGMA-ALDRICH)
- Phytigel (SIGMA-ALDRICH)
- Destilovaná voda
- NaCl (SIGMA-ALDRICH)
- KCl (SIGMA-ALDRICH)
- Paraquat (SIGMA-ALDRICH)
- Sorbitol (DUCHEFA-Biochemie)
- 70 % a 96 % etanol (PENTA)
- Hypochlorid sodný (SIGMA-ALDRICH)
- Tween 20 (SIGMA-ALDRICH)
- FM 4-64, N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(8-(4-(diethylamino)fenyl)hexytrienyl)pyridinium dibromid (Life Technologies)

#### **4. 1. 2. Použité přístroje**

- Analytické váhy (XA 110/2X, RADWAG, Waga Elektroniczen)
- Laboratorní předvážky (S1502, BEL-Engineering)
- Elektromagnetická míchačka (MSH-420, BOECO, Germany)
- pH metr stolní (TEMP RS232, PL-600 pH/mV/Temp Meter, EZODO)
- Parní sterilizátor (Sterivap, BMT MMM Group Medical Technology)
- Laminární box biohazard (Faster, FERRARA Italy)
- Skener (Image Scanner III)
- Mikrovlnná trouba (MGE21, HITACHI)
- Stereomikroskop (binokulární mikroskop, Leica M165FC, operační program LAS V 4.0, Leica)
- Epifluorescenční mikroskop (Axio Imager M2, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)

- Konfokální mikroskop (LSM 710, Axio Imager Z2, ZEISS, operační program ZEN Black 2012)
- Laserový mikroskop pro live cell imaging (Spinning disk, Axio Observer Z1, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Lightsheet mikroskop (Lightsheet Z. 1, ZEISS, operační program ZEN Blue 2012)
- Kultivační komora (AR-41L2I, Percival)
- Fytotron (WEISS Gallenkamp)
- Chladnička laboratorní (Electrolux, Space Plus, ERB 34633W)

#### 4. 1. 3. Použité roztoky a média

##### **Sterilizační roztok na povrchovou sterilizaci semen**

1% hypochlorid sodný, 0,05% Tween 20

10 ml            10 % hypochlorid sodný

90 ml            dH<sub>2</sub>O

Doplněno do 100 ml s přidavkem pár kapek Tween 20

##### **Pevné kultivační ½ MS médium**

2,2 g.l<sup>-1</sup>        Murashige and Skoog médium (M0221)

10 g.l<sup>-1</sup>        sacharóza

6 g.l<sup>-1</sup>        phytigel

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

##### **Tekuté kultivační ½ MS médium**

2,2 g.l<sup>-1</sup>        Murashige and Skoog médium (M0221)

10 g.l<sup>-1</sup>        sacharóza

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

##### **Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl**

2,2 g.l<sup>-1</sup>        Murashige and Skoog médium (M0221)

10 g.l<sup>-1</sup>        sacharóza

6 g.l<sup>-1</sup>        phytigel

5,844 g.l<sup>-1</sup>    NaCl

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

**Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu**

2,2 g.l <sup>-1</sup>	Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
6 g.l <sup>-1</sup>	phytagel
36,44 g.l <sup>-1</sup>	sorbitol

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

**Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,1 µmol.l<sup>-1</sup> PQ**

2,2 g.l <sup>-1</sup>	Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
6 g.l <sup>-1</sup>	phytagel

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

100 µl	paraquat
--------	----------

**Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,2 µmol.l<sup>-1</sup> PQ**

2,2 g.l <sup>-1</sup>	Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
6 g.l <sup>-1</sup>	phytagel

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

200 µl	paraquat
--------	----------

**Pevné kultivační ½ MS médium s obsahem 0,5 µmol.l<sup>-1</sup> PQ**

2,2 g.l <sup>-1</sup>	Murashige and Skoog médium (M0221)
10 g.l <sup>-1</sup>	sacharóza
6 g.l <sup>-1</sup>	phytagel

dH<sub>2</sub>O, pH 5,8, sterilizováno autoklávováním

500 µl	paraquat
--------	----------

**4. 1. 4. Rostlinný materiál**

*Arabidopsis thaliana* divoký typ, ekotyp Columbia (Col-0).

*Arabidopsis thaliana* mutant *rhd2* (*root hair defective 2*), u kterého kořenové vlásky nejsou schopny vrcholového růstu. Mutant je deficientní v aktivitě NADPH oxidasy AtRBOH C (Takeda a kol., 2008).

*Arabidopsis thaliana* mutant *tip1-1* (*tip growth defective 1*), u kterého se ze široké báze vytvářejí dva, tři nebo čtyři kořenové vlásky. Mutant má neaktivní S-acyl transferasy (Hemsley a kol., 2005).

*Arabidopsis thaliana* mutant *der1-3* (*deformed root hairs1*), u kterého se růst kořenových vlásků zastavuje krátce po jejich založení. Mutace inaktivuje gen kódující ACTIN2, hlavní aktin v rostlinných pletivech (Ringli a kol., 2002).

## 4. 2. METODY

### 4. 2. 1. Příprava médií pro kultivaci *Arabidopsis* v *in vitro* podmínkách

- Pro kultivaci rostlin *in vitro* se v laboratorních podmínkách využívá jako zdroj makro a mikro elementů komerčně dostupné kompletní médium. V případě *Arabidopsis* se ovšem jeho koncentrace přizpůsobuje nárokům tohoto druhu, a proto se používá v poloviční koncentraci. Další složkou média je sacharóza jako zdroj uhlíku, běžně užívaná v koncentraci 1 % (10 g/l). Médium je zpevněno Phytagelem, což je syntetická látka, která se používá jako náhrada agaru. Použili jsme koncentraci 0,6 % (6 g/l). Médium je ředěno destilovanou vodou. V našich experimentech toto kultivační médium neobsahovalo vitamíny.
- Média byla běžně připravována v objemu 250 ml (0,55 g MS médium, 2,5 g sacharózy, 1,5 g Phytagelu). Tato směs byla v připravené kádince s magnetickým míchadlem doplněna destilovanou vodou do objemu 200 ml. Po úpravě pH na hodnotu 5,8 pomocí 0,1 mol.l<sup>-1</sup> KCl byl roztok kvantitativně přemístěn do autoklávovatelné skleněné nádoby a doplněn destilovanou vodou na objem 250 ml. Takto připravené médium bylo sterilizováno v autoklávu.
- Vliv abiotických stresových faktorů na rostliny byl testován kultivací rostlin na pevných médiích s obsahem určité koncentrace účinné látky. Solný a osmotický stres byl indukován přidavkem KCl a NaCl do kultivačního média, osmotický stres byl indukován přidavkem sorbitolu a oxidativní stres přidavkem paraquat (PQ) do kultivačního média. Detaily přípravy médií jsou uvedeny v Tab. 1.

<b>Typ stresu</b>	<b>Koncentrace použité látky</b>	<b>Hmotnost či objem na 250 ml média</b>
solný a osmotický	75 mmol.l <sup>-1</sup> KCl	1,3978 g
	100 mmol.l <sup>-1</sup> KCl	1,86375g
solný a osmotický	75 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl	1,09575 g
	100 mmol.l <sup>-1</sup> NaCl	1,461 g
osmotický	200 mmol.l <sup>-1</sup> sorbitol	9,11 g
oxidativní	0,1 μmol.l <sup>-1</sup> PQ	25 μl
	0,2 μmol.l <sup>-1</sup> PQ	50 μl
	0,5 μmol.l <sup>-1</sup> PQ	125 μl

Tab. 1 Hmotnost a objemy jednotlivých stresových komponentů v kultivačním médiu pro ovlivnění rostlin abiotickými stresy

KCl, NaCl a sorbitol byly do média přidány před autoklávováním, PQ byl do média přidán až po autoklávování. Po snížení teploty média pod 65°C byl přidán stanovený objem PQ pro dosažení dané koncentrace.

- Aplikace chladového stresu: semena testovaných linií Arabidopsis byly po povrchové sterilizaci stabilizovány na Petriho miskách 48 h ve tmě při 4°C. Posléze byly Petriho misky se semeny přeloženy do kultivační komory s nastavenými podmínkami 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70 % relativní vzdušná vlhkost a 4 °C. Alternativně chladový stres byl aplikován na tří denní rostliny, které byly kultivovány ve fytotronu při standartních podmínkách, a následně přeloženy do kultivační komory s nastavenými podmínkami 16 hodin světlo, 8 hodin tma, 70 % relativní vzdušná vlhkost a 4 °C.

#### **4. 2. 2. Povrchová sterilizace semen**

- Semena divého typu a mutantních linií Arabidopsis byly připraveny v mikrozkuvkách Eppendorf.

- V laminárním boxu byl k semínkám přidán 1 ml 70 % etanolu a za občasného protřepávání se nechal působit 2 min.
- Následně byla polovina objemu etanolu odebrána a byla přidána směs 1 ml 1 % hypochloridu sodného a 0,05 % Tween 20. Semena byla v tomto roztoku sterilizována 8 min za neustálého protřepávání.
- Po sterilizaci byla semínka postupně promyta 3 x 2 min sterilní vodou. Po posledním promytí byla semínka ponechána v mikrozkuřkách s polovičním objemem vody k přenosu na Petriho misky.
- Vrchol plastové špičky pro automatické pipety (objem 2-20  $\mu$ l) byl seříznut, aby velikost otvoru odpovídala velikosti semen.
- Pomocí mikropipety byly semínka nasáty do špičky a jednotlivě uloženy na kultivační médium v Petriho miskách.
- Petriho misky se semeny byly uzavřeny Parafilmem a uloženy na 1-2 dny v ledničce při 4 °C. Imbibice při 4 °C je důležitá, aby se všechny semínka dostala do přibližně stejné fáze před klíčením, které je následně po přenosu do laboratorní teploty synchronizováno.

#### **4. 2. 3. Stanovení klíčivosti semen a překlad rostlin na média pro indukci stresů**

- Po chladové synchronizaci klíčí semínka ve fytotronu v průběhu 24-48 h. Klíčivost semen byla stanovena vyhodnocením poměru vyklíčených semen k celkovému počtu semen. Výsledek klíčivosti semen byl pak vyjádřen v procentech.
- Po vyklíčení byly 3 denní rostliny přeloženy ve sterilním boxu na média s určitou koncentrací chemických látek, vyvolávajících abiotický stres.
- Přenos rostlin byl proveden sterilní jemnou pinzetou opatrnou manipulací. Rostliny byly na testovaných médiích stabilně umístěny a stabilizovány pomocí adheze.
- Petriho misky s přeloženými rostlinami byly uzavřeny Parafilmem a opět uloženy ve fytotronu. Růst rostlin a jejich fenotyp byl pak pravidelně sledován.

#### **4. 2. 4. Dokumentace a vyhodnocování morfologie rostlin, růstových parametrů a fenotypu kořenových vlásků**

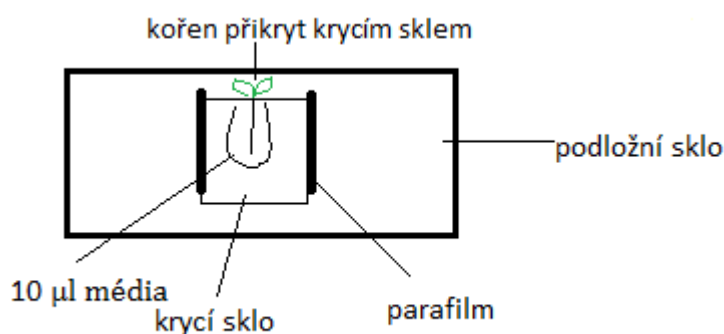
- Ihned po překlade rostlin na testovací média a pak každý následující den, byly rostliny přímo na Petriho miskách skenovány skenerem. Elektronické snímky

s interním měřítkem byly použity na měření kvantitativních parametrů rostlin (délky kořenů) v programu ImageJ.

- Vývojové změny testovaných rostlin a změny ve fenotypu mezi kontrolou a mutanty po vlivu abiotických stresů byly dokumentovány na stereomikroskopu. Fotografie rostlin a jejich částí byly pořizovány přímo v Petriho miskách. Zdokumentován byl fenotyp celých rostlin v raném stádiu vývoje, kořenů a detailně i fenotyp kořenových vlásků.

#### 4. 2. 5. Příprava celých rostlin pro vitální mikroskopické pozorování

- Rostliny byly stabilizovány a následně studovány v mikroskopických komůrkách (Ovečka a kol., 2005). Komůrky byly vytvořeny z mikroskopických podložních a krycích skel, které musely být dokonale čisté, odmaštěné a sterilní. Nejprve byla podložní mikroskopická skla umyta vodou a saponátem. Po opláchnutí byla čištěna 96 % etanolem a nakonec opláchnuta destilovanou vodou. Nedostatečné odmaštění by mohlo způsobovat problémy při použití lipofilních barev.
- Vyčištěná podložní a krycí mikroskopická skla byla následně v kyvetě sterilizována 96 % etanolem ve sterilním boxu 20 minut.
- Na vysušená sterilní podložní mikroskopická skla byly připevněny tenké pásky Parafilmu v délce úměrné krycím sklům. Prostor od spodní hrany skla k páskám Parafilmu by měl být asi 2-3 mm. Do prostoru mezi pásky Parafilmu bylo napipetováno 10  $\mu$ l tekutého kultivačního média (Obr. 11).



Obr. 11 Návod na přípravu rostlin pro vitální mikroskopické pozorování

- Do média byla šetrným způsobem přeložena rostlina z Petriho misky (jedna rostlina na preparát). Věk rostlin byl 2-3 dny po vyklíčení.

- Pod úhlem asi 45° bylo v oblasti hypokotylu rostliny přiloženo krycí sklo, které bylo po doteku s médiem opatrně přiloženo k páskám Parafilmu.
- Takto připravený preparát byl vložen do připravené kyvety s tekutým kultivačním médiem (přibližně 25 ml na jednu kyvetu). Kyveta přikryta víčkem byla dána do fytotronu.
- Po 24 h stabilizaci byly preparáty ovlivněny různými stresy, barveny a pozorovány v mikroskopu.

#### **4. 2. 6. Značení membrán a endocytózy v buňkách kořene rostlin v mikroskopických sklech**

- Pracovní roztok FM4-64 v koncentraci 4  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  byl připraven ze zásobního roztoku FM4-64 1,6  $\text{mmol.l}^{-1}$  (ředění 1:400). Pracovní roztok byl připraven v ½ MS médiu, ve kterém byly rostliny stabilizovány po dobu 24 h. Zásobní roztok FM4-64 musí být uchovávan při -20°C, pracovní roztok pak v alobalu, protože je citlivý na světlo.
- Do mikroskopické komůrky, přímo k rostlině, byl perfúzním způsobem aplikován pracovní roztok FM4-64. Celkový objem 100  $\mu\text{l}$  byl aplikován postupně pomalou aplikací po 10  $\mu\text{l}$  na okraj krycího skla (bez doteku špičky pipety o sklo). Jedna 10  $\mu\text{l}$  aplikace by měla trvat přibližně 1 min a měla by být plynulá, aby nedocházelo ke stresování rostliny.
- Po první aplikaci (10  $\mu\text{l}$ ) byl přiložen na protější stranu krycího skla malý a tenký pásek filtračního papíru o velikosti zvolené tak, aby rychlost odsávání média z prostoru komůrky korespondovala s rychlostí aplikace. Filtrační papír byl měněn přibližně po každé druhé aplikaci.
- Po aplikaci působil roztok FM4-64 na kořen rostliny 15 min. Preparáty byly následně umístěné do mikroskopu, kde byla intenzita značení membrán a časový průběh endocytózy zaznamenáván.

#### **4. 2. 7. Vyhodnocení výsledků**

- Parametry prodlužování kořene rostlin byly vyhodnocovány z obrázků skenovaných rostlin pomocí programu EpsonScan a měření délky kořenů bylo prováděno v programu Image J (<http://imagej.nih.gov/ij/>).
- Statistické vyhodnocení výsledků bylo zpracováno v programu Stastica a Excel (Microsoft).



## 5. VÝSLEDKY

Výsledky dosažené v této bakalářské práci jsou prezentovány ve čtyřech samostatných částech. První část se zabývá efektivitou klíčení vybraných linií *Arabidopsis Col-0*, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* v kontrolních podmínkách a při solném, osmotickém a oxidativním stresu. Dokumentovány jsou změny v délce kořene a v přírůstku kořene za 24 h. Další část se věnuje sledování citlivosti linií po přeložení kontrolních 2-3 denních rostlin na média s obsahem zmíněných stresových faktorů. Třetí část se zabývá detailněji změnami fenotypu kořenových vlásků a poslední dynamikou kořenových vlásků.

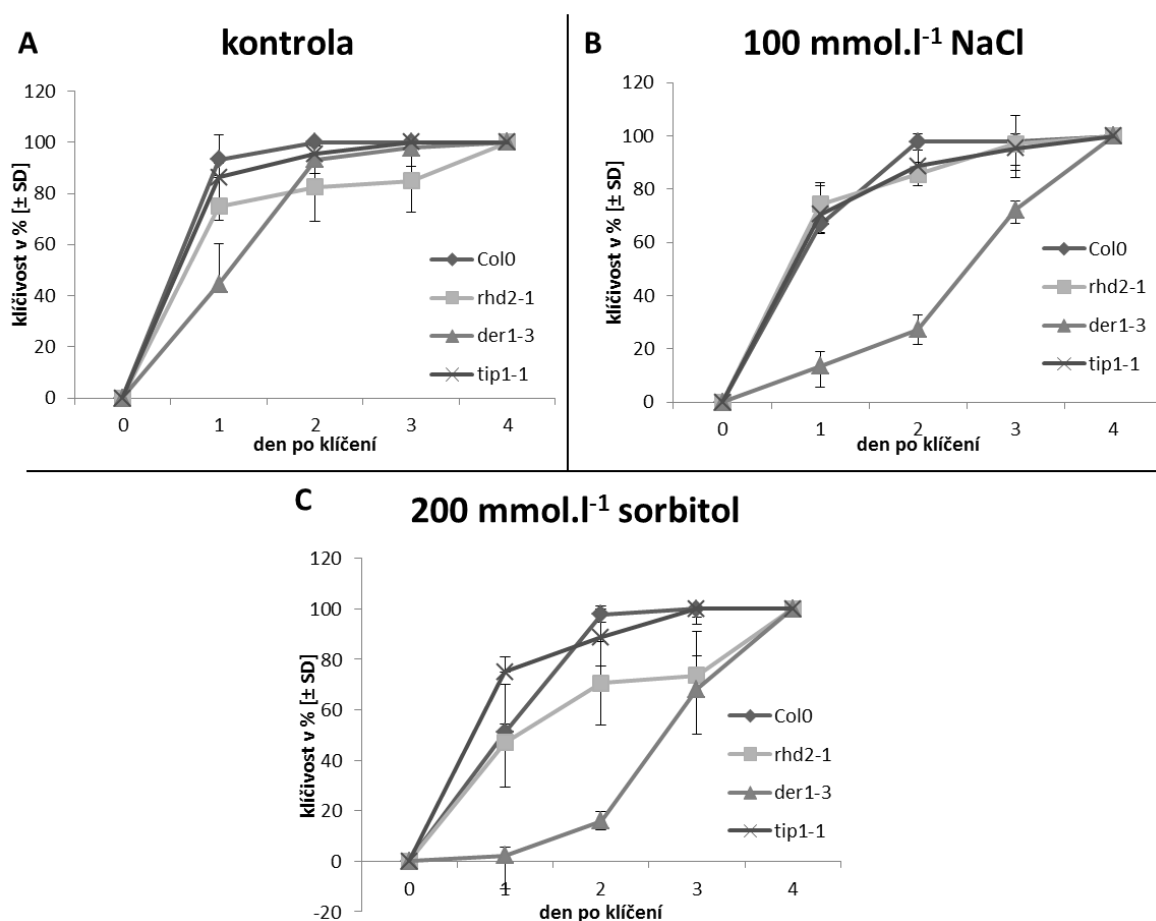
### 5. 1. Klíčivost linií *Col-0*, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* v podmínkách solného, osmotického a oxidativního stresu

Test klíčivosti, který byl proveden ve třech biologických replikách, spočíval ve vysazení semen testovaných linií na ½ MS médium bez vitamínů, které obsahovalo chemické látky, vyvolávající solný, osmotický a oxidativní stres. Efektivita klíčení byla zaznamenána v pravidelných 24 h intervalech po vyložení semen na Petriho miskách do fytostronu. Experiment probíhal až do té doby, než všechny semena v kultuře vyklíčily.

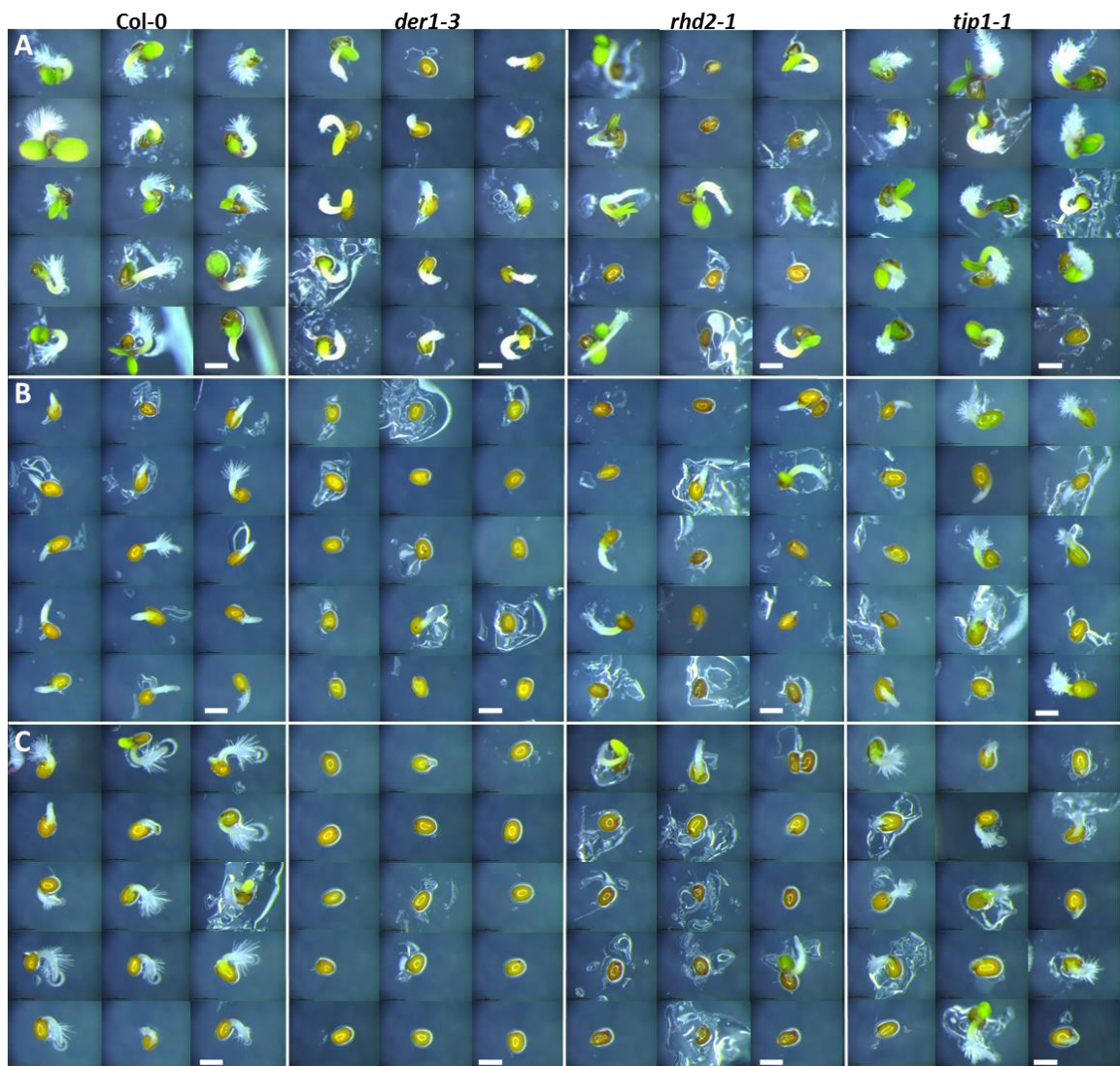
V kontrolních podmínkách nebyla efektivita klíčení mutantních linií uniformní. Především linie *rhd2-1* a *der1-3* klíčily o poznání pomaleji. Klíčení linie *der1-3* bylo na kontrolním médiu v průběhu prvních 24 h výrazně pomalejší (Obr. 12A). Solný a osmotický stres vyvolaný přítomností NaCl mírně snížil efektivitu klíčení *Col-0*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přičemž mezi těmito liniemi žádný rozdíl zaznamenán nebyl. Klíčení linie *der1-3* bylo ale v těchto podmínkách výrazně zpomaleno (Obr. 12B). Osmotický stres za přítomnosti sorbitolu též snížil efektivitu klíčení všech linií, tu však už byly rozdíly mezi liniemi *Col-0*, *rhd2-1* a *tip1-1* větší. Klíčení linie *der1-3* bylo opět výrazně zpomaleno (Obr. 12C). Detaily klíčících rostlin dokumentované 48 h po začátku experimentu jasně dokumentují, do jaké míry byla efektivita klíčení mutantní linie *der1-3* solným a osmotickým stresem snížena (Obr. 13). Viditelné rozdíly ve vývoji a v morfologii rostlin se v jednotlivých stresových situacích projeví i po vyklíčení. V porovnání s kontrolou (Obr. 3A), rostliny ovlivněné solným stresem byly menší, vývoj nadzemní část rostlin byl u některých linií zastaven a došlo k redukci chlorofylu. Kořenový systém byl také redukován (Obr. 14B). Linie *Col-0* a *tip1-1* měli nejnižší počet zežloutlých listů (Obr. 14B). V podmínkách osmotického stresu testované linie prospívají lépe, listy rostlin

nevykazovali zežloutnutí, měli spíše fialové zbarvení a linie byly mezi sebou více porovnatelné (Obr. 14C).

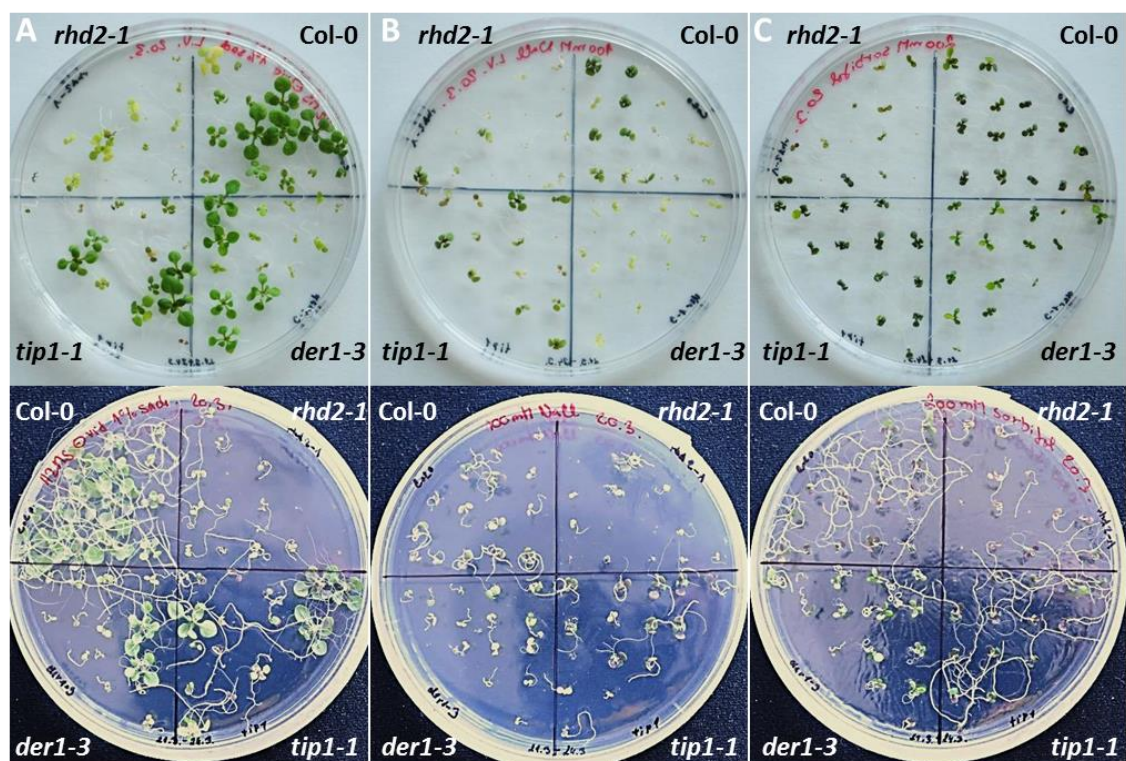
Po aplikaci oxidativního stresu nebyly zaznamenány výraznější rozdíly mezi jednotlivými koncentracemi PQ a kontrolou. Typickým znakem bylo to, že klíčení linie *der1-3* bylo opět výrazně zpomalené (Obr. 15). Semena všeobecně vyklíčily mnohem rychleji v porovnání se solným a osmotickým stresem. Celý experiment do kompletního vyklíčení všech semen tak trval u oxidativního stresu o jeden den méně. Detailní pohled na klíčící rostliny, zdokumentován 48 h po začátku experimentu, ukazuje menší míru ovlivnění procesu klíčení, jak tomu bylo u solného a osmotického stresu (Obr. 16).



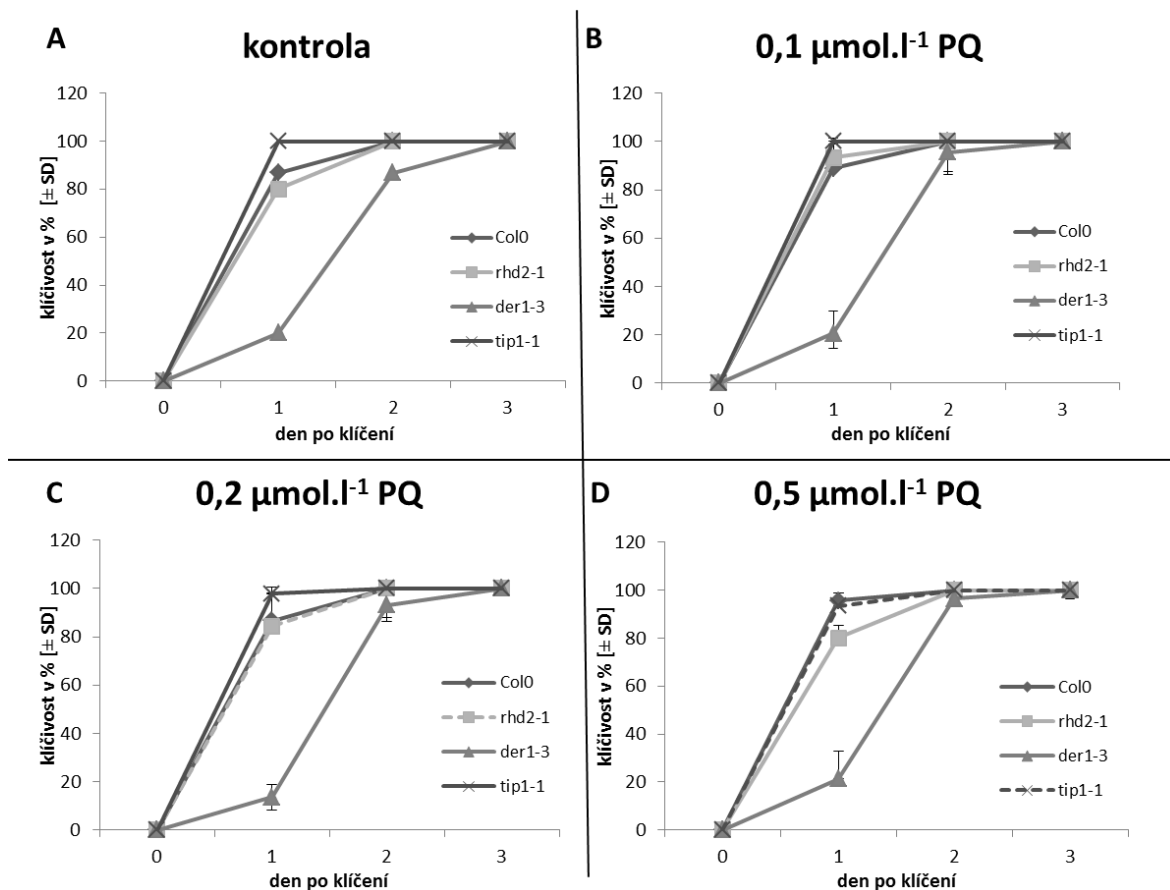
Obr. 12 Porovnání klíčivosti semen linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* v podmínkách solného a osmotického stresu. Počet vyklíčených semen byl stanovován v průběhu 4 dní od začátku experimentu na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C). Data reprezentují průměr ± SD ze 3 biologických replik po dobu 4 dnů.



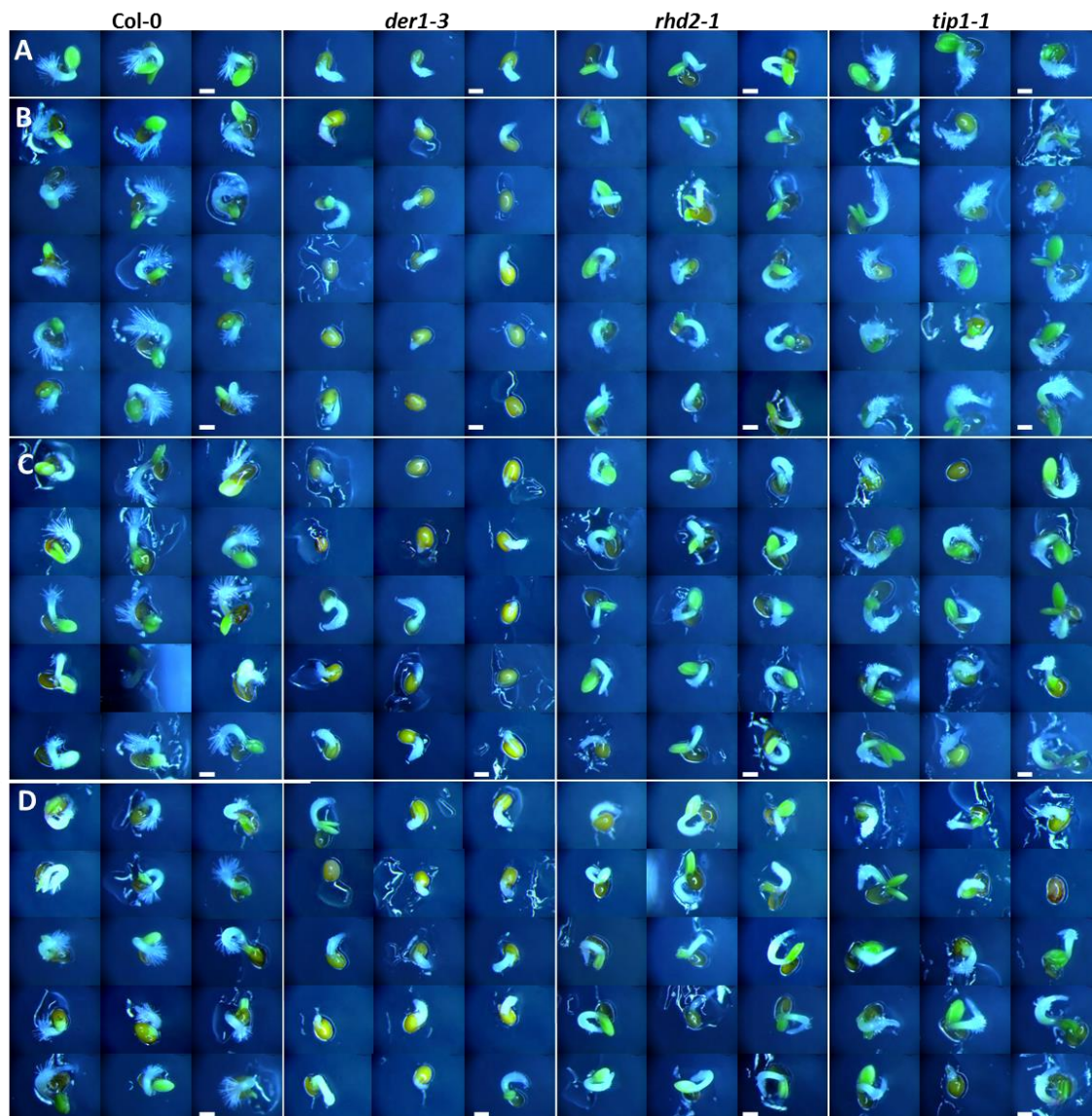
Obr. 13 Detaily klíčících rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl (B) a  $200 \text{ mmol.l}^{-1}$  sorbitolu (C). Semínka byly fotografovány 48 h po začátku experimentu. Měřítko  $500 \mu\text{m}$ .



Obr. 14 Rostliny 11 dní po klíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl (B) a  $200 \text{ mmol.l}^{-1}$  sorbitolu (C).



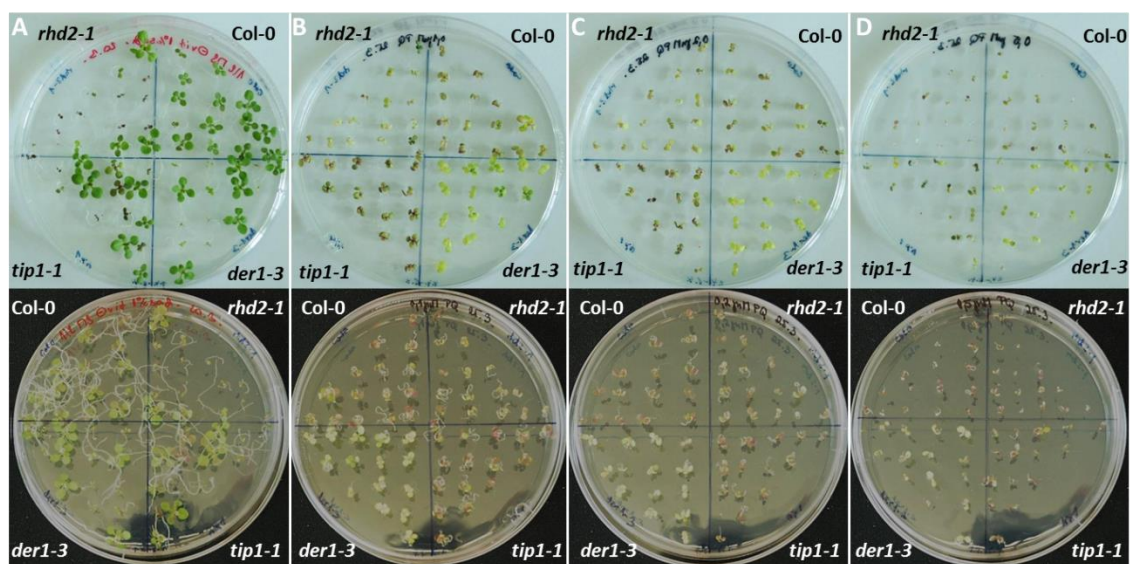
Obr. 15 Porovnání kličivosti semen linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* v podmínkách oxidativního stresu. Počet vyklíčených semen byl stanovován v průběhu 3 dní od začátku experimentu na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 0,1 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (B), 0,2 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (C) a 0,5 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (D). Data reprezentují průměr ± SD ze 3 biologických replik po dobu 3 dnů.



Obr. 16 Detaily klíčících rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B),  $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C) a  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (D). Semínka byly fotografovány 48 h po začátku experimentu. Měřítka  $200 \mu\text{m}$ .

Vývoj rostlin po vyklíčení v podmínkách oxidativního stresu byl ale zřetelně ovlivněn. Projevíly se viditelné rozdíly v morfologii rostlin i při porovnání jednotlivých koncentrací PQ. V porovnání s kontrolou (Obr. 17A), oxidativní stres u všech koncentrací PQ silně redukoval vývoj jak nadzemní části, tak i kořenového systému. Vyšší koncentrace PQ měli silnější efekt. Rostliny linie *der1-3* vykazovaly jiný typ zbarvení listů v porovnání s ostatními liniemi (Obr. 17B, C, D).

Při testu klíčivosti v podmínkách chladu bylo zjištěno, že semena testovaných linií vystavené chladovému stresu při 4°C nevyklíčili ani po uplynutí 4 dnů. Výsledky z tohoto stresu tudíž nejsou prezentovány.



Obr. 17 Rostliny 11 dní po klíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B), 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (D).

## 5. 2. Růst kořene ve stresových podmínkách

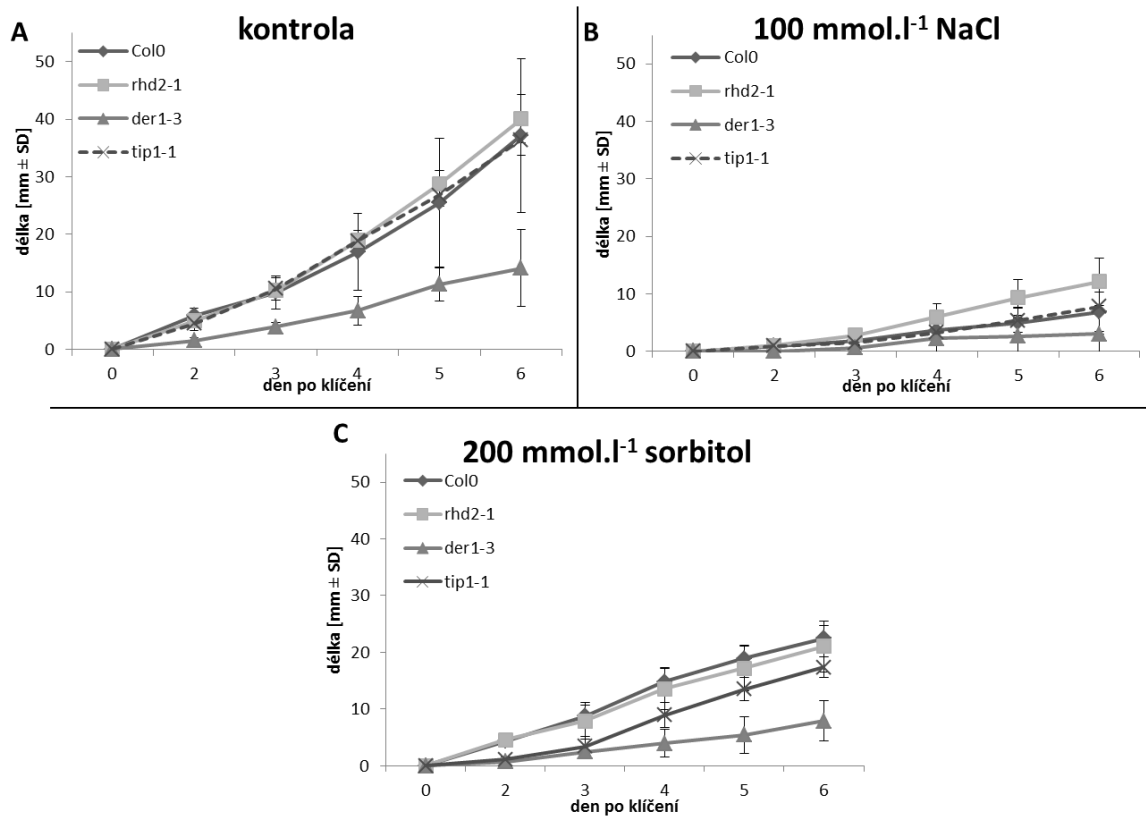
### 5. 2. 1. Růst kořene rostlin, které klíčily pod vlivem solného, osmotického a oxidativního stresu

#### 5. 2. 1. 1. Solný a osmotický stres

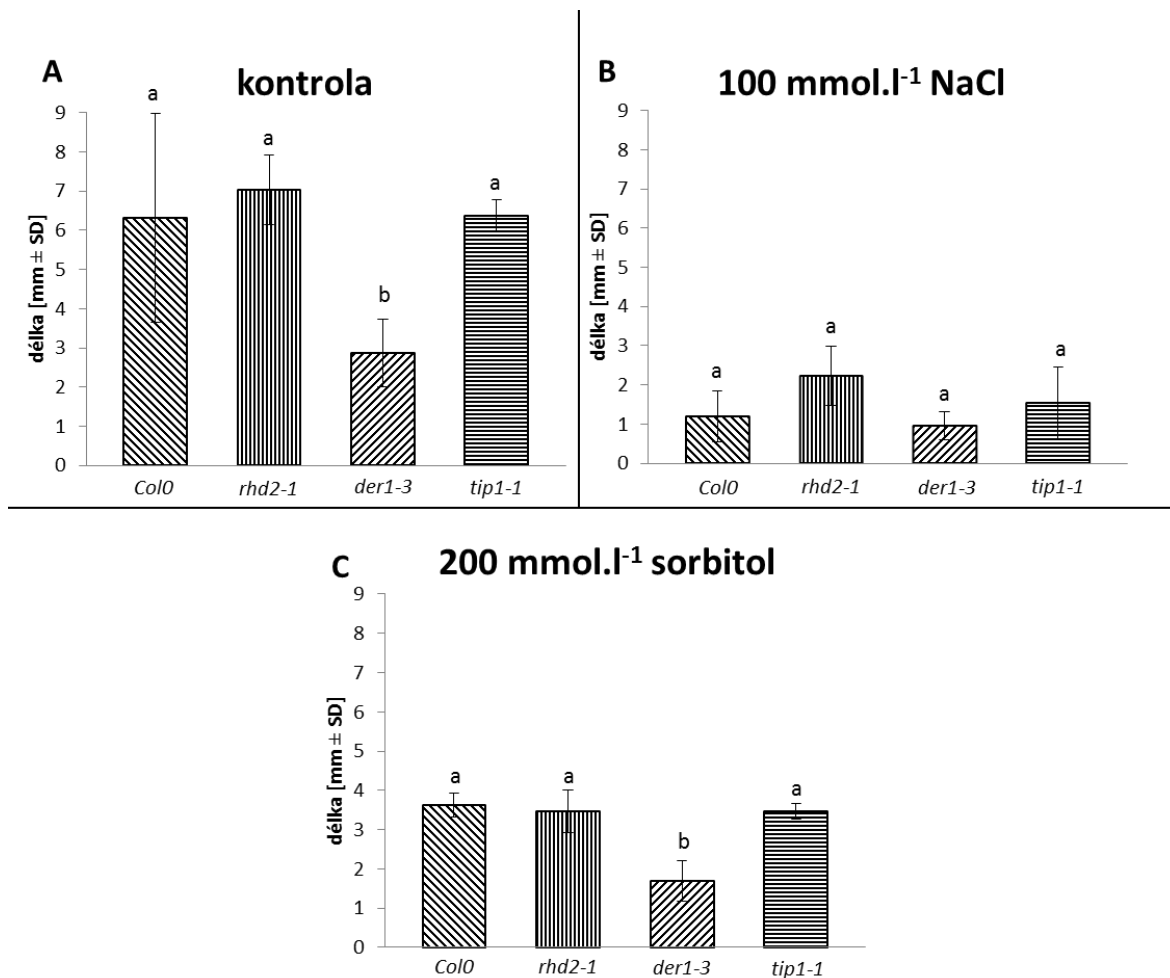
Semínka linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* byla vysazena na kontrolní ½ médium bez vitamínů a na ½ média bez vitamínů s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu. Rostliny byly pozorovány a skenovány každý den po vyklíčení po dobu 5-6 dnů a byla vyhodnocena délka primárního kořene a přírůstek kořene za 24 h. V kontrolních podmínkách nebyly mezi liniemi Col-0, *rhd2-1* a *tip1-1* zásadní rozdíly v délce kořene, linie *der1-3* však měla kořen v kontrolních podmínkách kratší (Obr. 18A). Z porovnávaných linií nejlépe rostla při solném a osmotickém stresu linie *rhd2-1*, která měla při solném stresu nejdelší kořeny (Obr. 18B). Při osmotickém stresu byla linie *rhd2-1* porovnatelná s Col-0. Růst kořenů linií *rhd2-1* a *tip1-1* byl porovnatelný při solném a osmotickém stresu, nejkratší kořeny měla linie *der1-3* (Obr. 18B, C).

Hodnoty přírůstků primárního kořene za 24 h ukázaly, že linie *der1-3* rostla v kontrolních podmínkách nejpomaleji (Obr. 19A). I když linie *rhd2-1* vykazovala na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl nejlepší růst, měla nejdelší kořeny (Obr. 19B), statistické vyhodnocení hodnot pomocí ANOVA a následných LSD testů potvrdilo, že přírůstek byl u všech linií porovnatelný bez statisticky významných rozdílů (Obr. 19B). Statistické vyhodnocení přírůstků kořene za 24 h při osmotickém stresu ukázalo, že kromě linií *der1-3* jsou přírůstky ostatních linií porovnatelné bez statisticky významných rozdílů (Obr. 19C). V tabulce 2 jsou zaznamenány hodnoty redukce délky kořenů porovnávaných linií ve stresových podmínkách. Ukázalo se, že linie *der1-3* vykazuje na solném a osmotickém stresu nejmenší koeficient redukce. Dokazuje to, že rychlost růstu kořene, která je typická pro určitou linii, pravděpodobně ovlivňuje i její citlivost na testované stesy. Morfologie rostlin 19 dní po začátku experimentu dokumentuje, že NaCl nejvíce redukuje vývoj linií *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 20A, B). Sorbitol nezpůsobil výraznější rozdíly v morfologii a růstu linií Col-0, *rhd2-1* a *tip1-1*, linie *der1-3* měla ale při tomto osmotickém stresu nejdelší kořeny (Obr. 20C). Při solném stresu docházelo ke žloutnutí listů a při osmotickém stresu listy získávali fialovou barvu (Obr. 20).





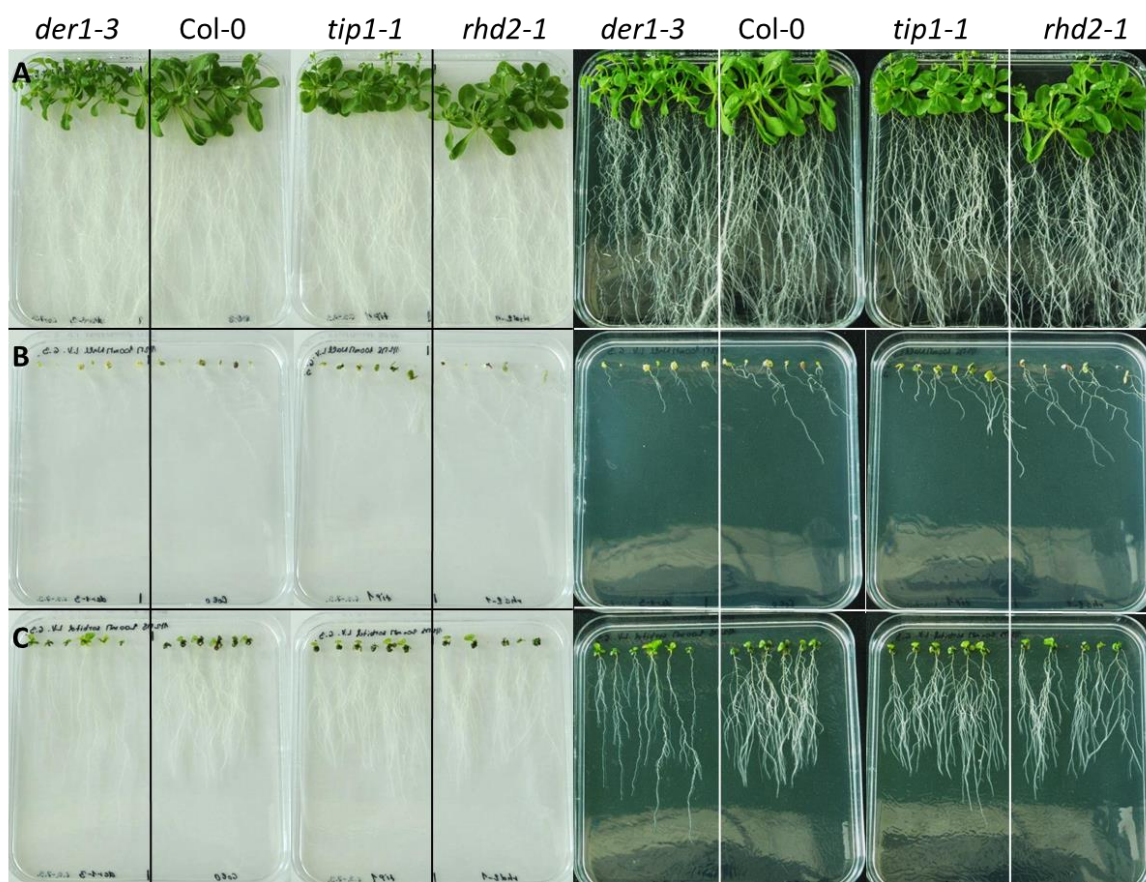
Obr. 18 Průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách solného a osmotického stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 6 dnů po vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C). Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik.



Obr. 19 Příklad růstu kořenů za 24 h linií *Col-0*, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách solného a osmotického stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 6 dnů po vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> (C). Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresy a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.

.Linie	Solný stres	Osmotický stres
Col-0	5,25	1,75
<i>rhd2-1</i>	3,18	2
<i>der1-3</i>	2,9	1,7
<i>tip1-1</i>	4,3	1,8

Tab. 2 Hodnoty redukcí délek kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* ve stresových podmínkách v porovnání s kontrolními podmínkami. Hodnoty byly získány poměrem délek kořenů na kontrolních podmínkách vůči délkám kořenů na stresových podmínkách.

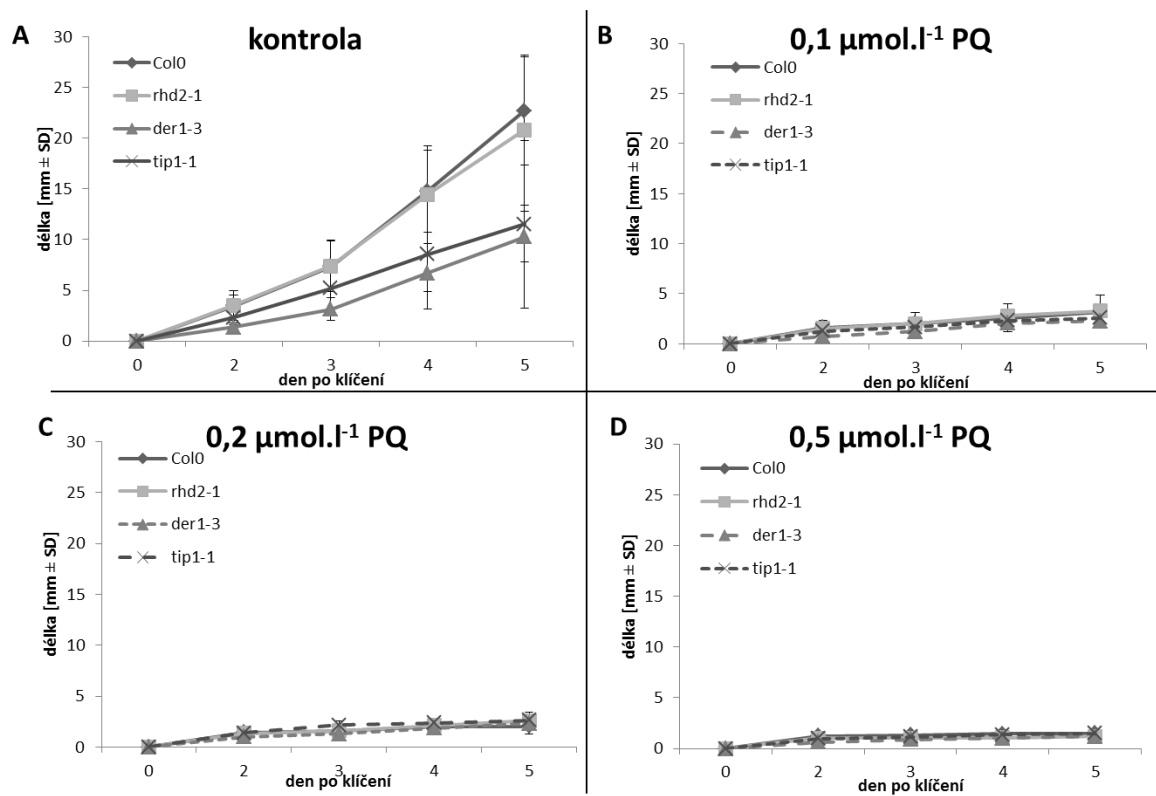


Obr. 20 Morfologie rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* 19 dní po vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C).

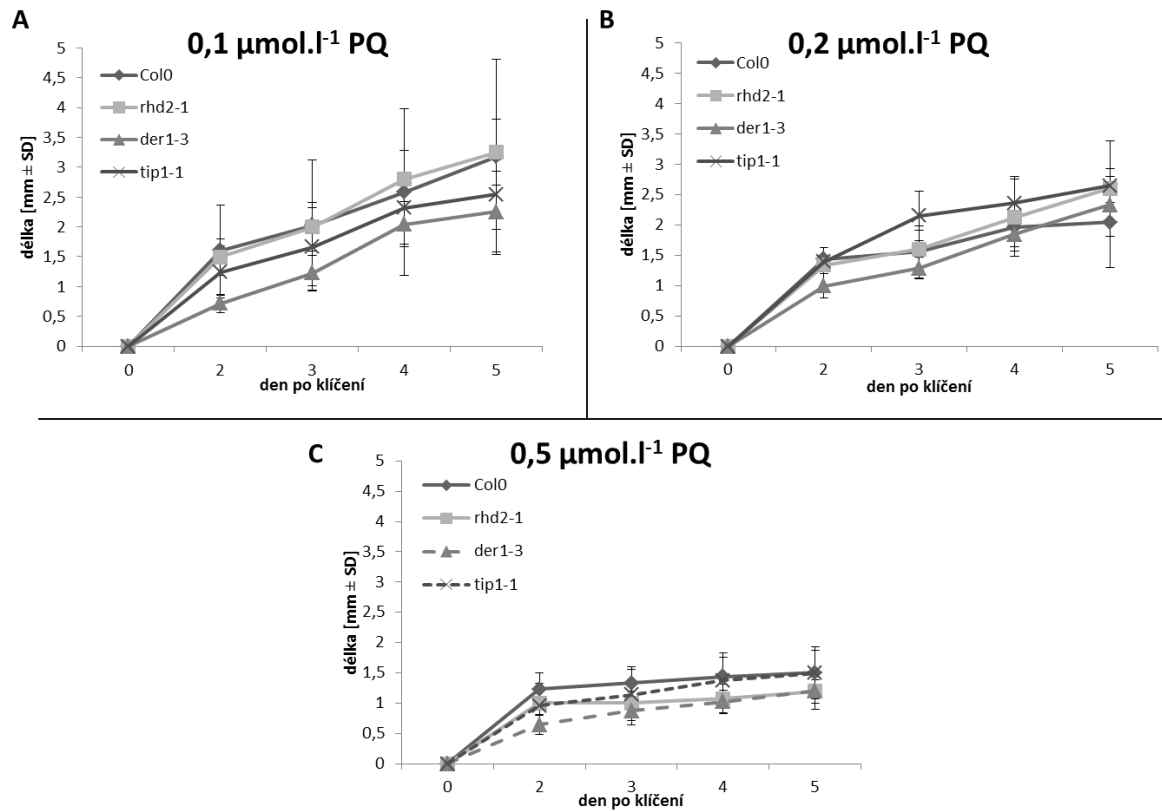
### 5. 2. 1. 2. Oxidativní stres

Porovnání délky kořenů testovaných linií Col-0, *rhd2-1*, *der1-3* a *tip1-1*, sledovaných po dobu 5 dnů po vyklíčení prokázalo, že v kontrolních podmínkách rostly kořeny linií Col-0 a *rhd2-1* lépe v porovnání s liniemi *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 10A). Rostliny ovlivněné PQ u všech použitých koncentrací nevykazovaly výrazný rozdíl v růstu kořene (Obr. 21B, C, D). Tendence, že linie Col-0 a *rhd2-1* mají kořeny delší než linie *der1-3* a *tip1-1* naznačovala kultivace na 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (Obr. 22A). U rostlin kultivovaných na 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ byla délka kořenů jednotlivých linií srovnatelná (Obr. 22B, C).

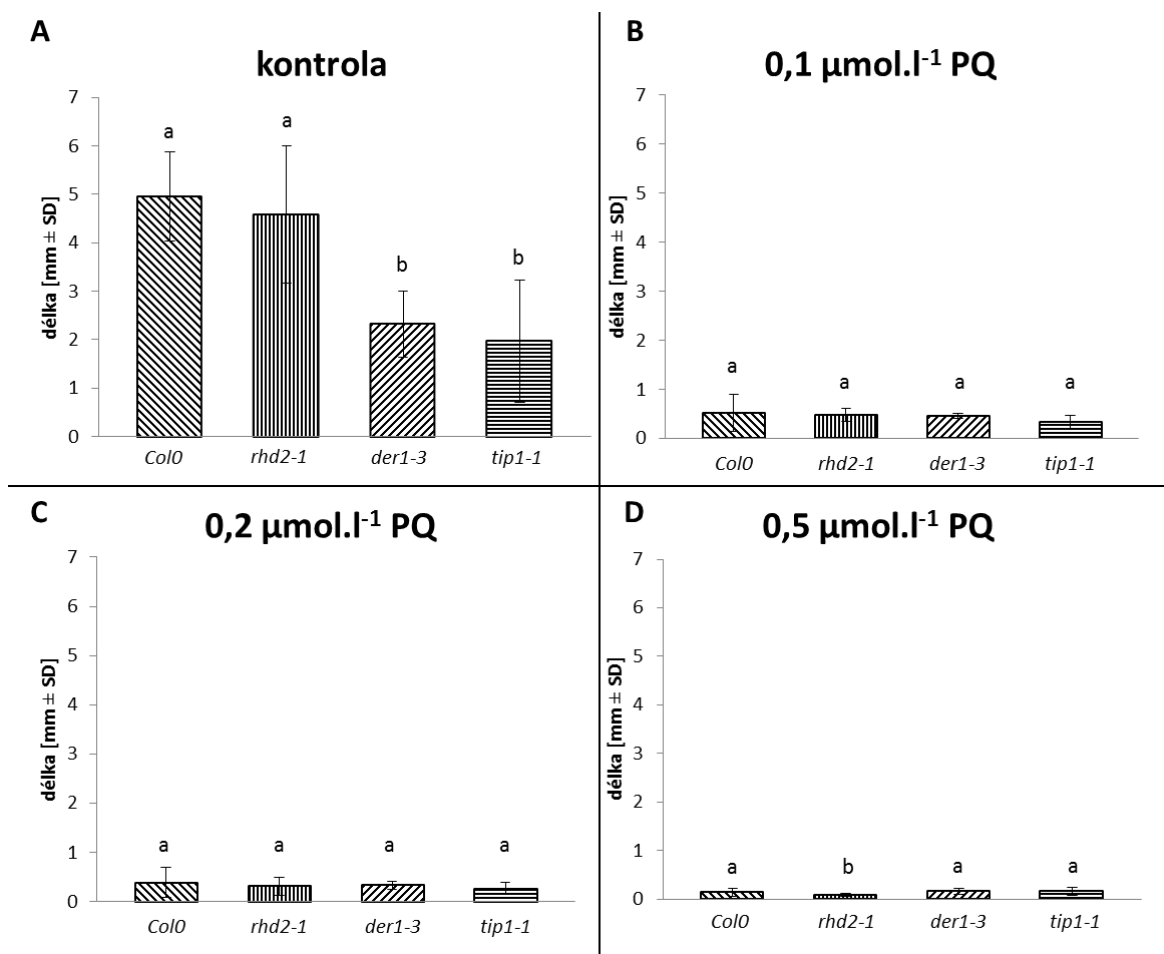
Lepší růst kořene linií Col-0 a *rhd2-1* v kontrolních podmínkách byl v porovnání s liniemi *der1-3* a *tip1-1* prokázán v přírůstku kořenů za 24 h. Rozdíly byly statisticky významné (Obr. 23A). U rostlin kultivovaných na 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ nebyly přírůstky kořene za 24 h statisticky rozdílné (Obr. 23B, C, 24A, B). Při kultivaci rostlin na médiu s obsahem 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ byl přírůstek kořenů linie *rhd2-1* statisticky průkazně menší, než u ostatních testovaných linií (Obr. 23D, 24C). V tabulce 2 je prezentována redukce délek kořenů u použitých koncentrací PQ. Výsledky ukazují, že nejmenší redukce v délce kořenů u všech koncentrací byla u linií *der1-3* a *tip1-1* (Tab. 3). Rostliny vystaveny oxidativnímu stresu po dobu 9 dní od vyklíčení měly výrazně redukovaný kořenový systém, výrazně redukovaný byl ale i celkový vývoj rostlin (Obr. 25).



Obr. 21 Průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dní po vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B), 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (D). Data reprezentují průměr  $\pm$  SD z 10 biologických replik.



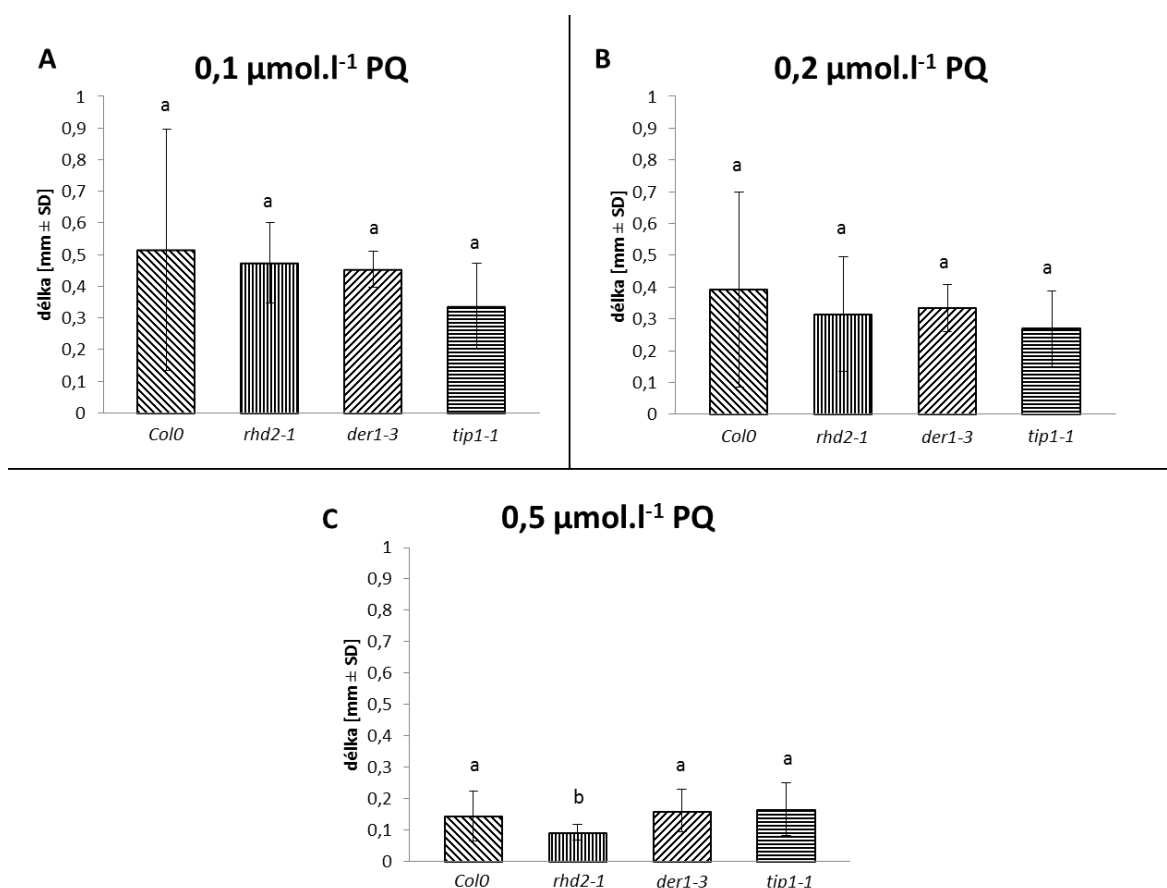
Obr. 22 Detailnější pohled na průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dní po vyklíčení na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (A), 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C). Data reprezentují průměr  $\pm$  SD z 10 biologických replik.



Obr. 23 Přírůstek kořenů za 24 h u linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dní po vyklíčení na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 0,1 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (B), 0,2 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (C) a 0,5 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (D). Data reprezentují průměr ± SD z 10 biologických replik. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresi a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.

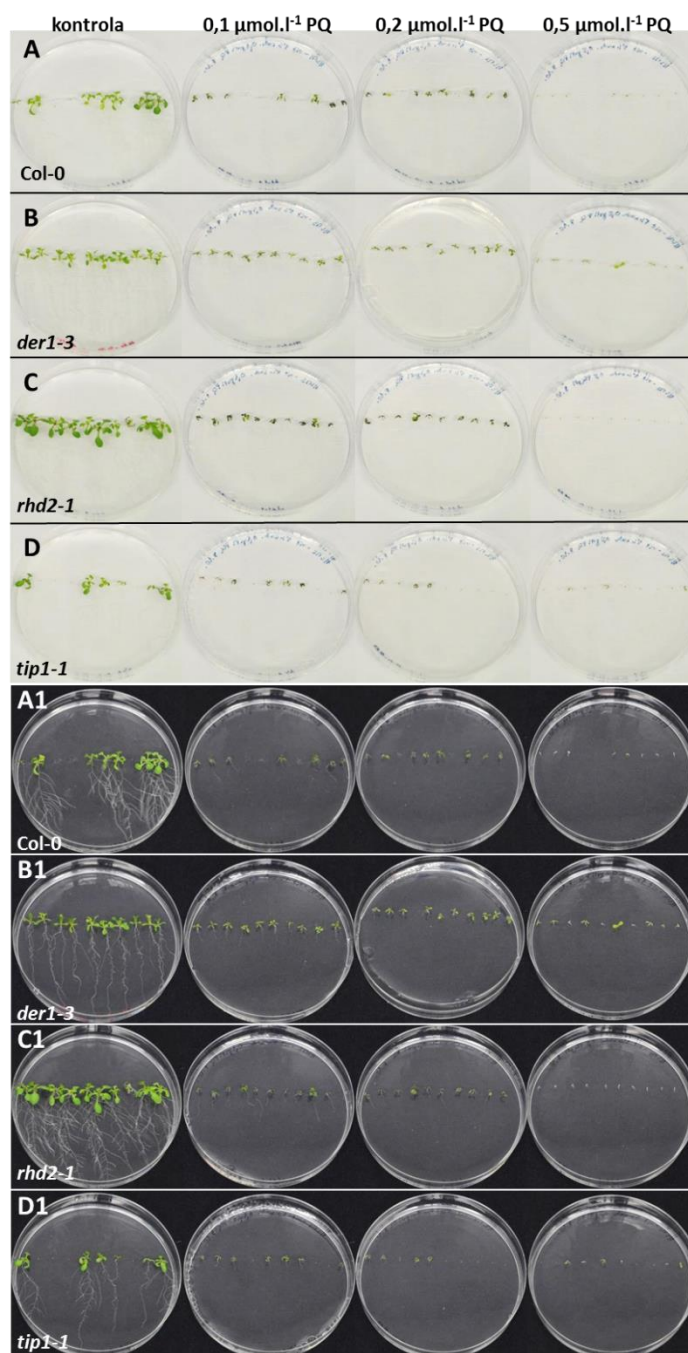
Linie	0,1 $\mu\text{M}$ PQ	0,2 $\mu\text{M}$ PQ	0,5 $\mu\text{M}$ PQ
Col-0	10	12,5	50
<i>rhd2-1</i>	9,2	15,3	51,1
<i>der1-3</i>	4,6	7,7	11,5
<i>tip1-1</i>	6,7	7,4	10

Tab. 3 Hodnoty redukce délek kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* ve stresových podmínkách v porovnání s kontrolními podmínkami. Hodnoty byly získány poměrem délek kořenů na kontrolních podmínkách vůči délkám kořenů na stresových podmínkách.



Obr. 24 Detailnější pohled na přírůstek kořenů za 24 h u linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které klíčily v podmínkách oxidativního stresu. Rostliny byly sledovány po dobu 5 dní po vyklíčení na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (A), 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C). Data reprezentují průměr  $\pm$  SD z 10 biologických replik. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresy a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.





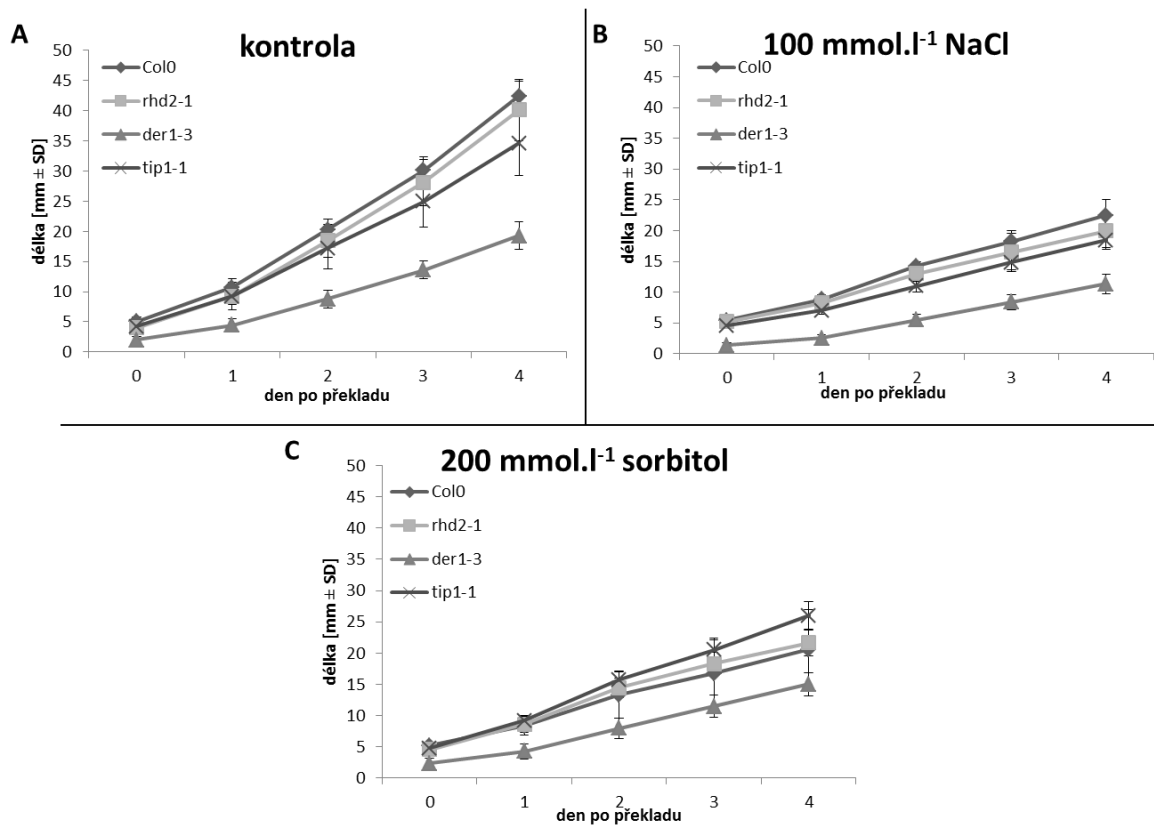
Obr. 25 Morfologie rostlin linií Col-0 (A, A1), *der1-3* (B, B1), *rhd2-1* (C, C1) a *tip1-1* (D, D1) 9 dní po vyklíčení na kontrolním médiu, na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ.

## 5. 2. 2. Růst kořene rostlin, které byly na média s indukcí solného, osmotického, oxidativního a chladového stresu přeloženy

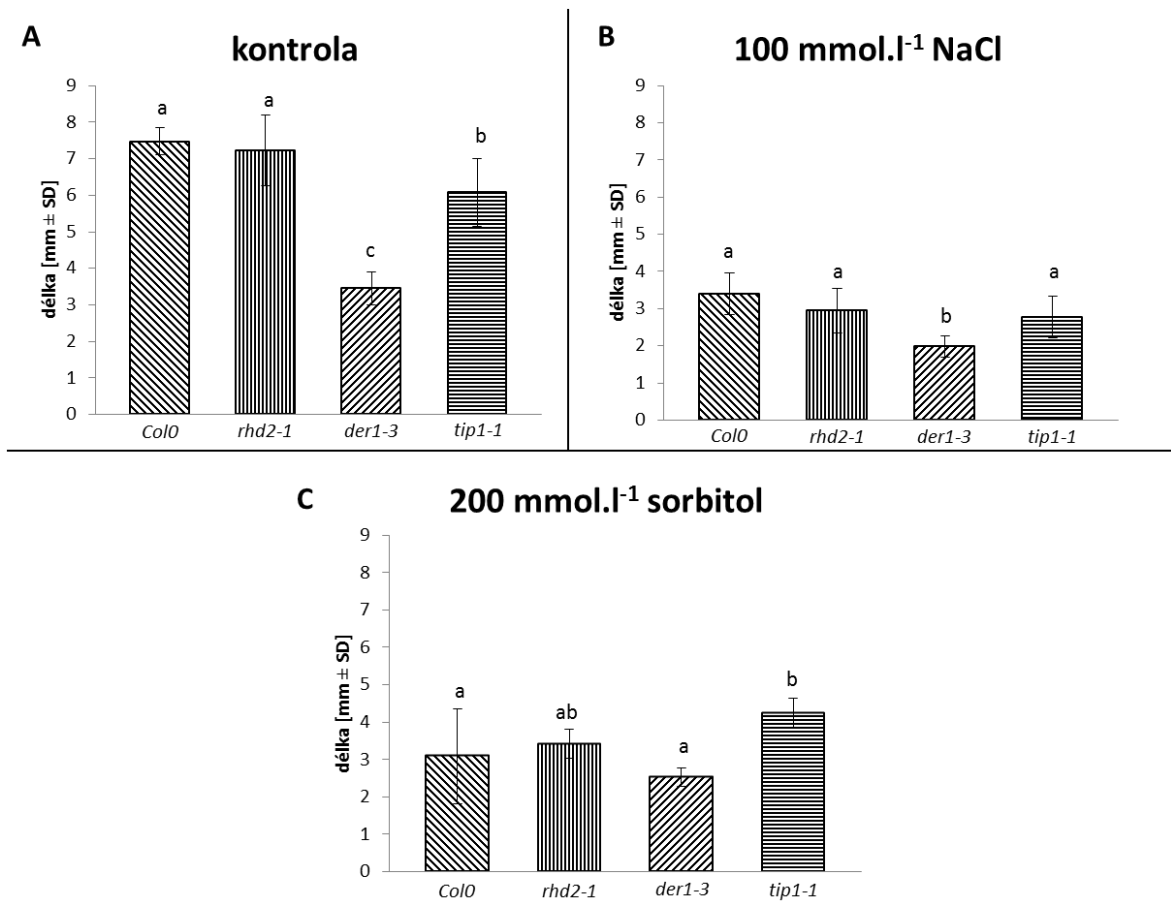
### 5. 2. 2. 1. Solný a osmotický stres

Semínka linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* byla vysazena na kontrolní ½ MS médium bez vitamínů a klíčení bylo synchronizováno 1 den při 4°C. Vyklíčené rostliny 3 dny staré byly přeloženy na ½ média bez vitamínů s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu. Kultury byly následně dokumentovány každý den po dobu 4 dnů. Délky kořenů testovaných linií v kontrolních podmínkách vykazovaly tendenci nejlepšího růstu linií Col-0 a *rhd2-1* a nejpomalejšího růstu linie *der1-3* (Obr. 26A). V podmínkách solného (Obr. 26B) a osmotického (Obr. 26C) stresu byl tento trend podobný, jenom rozdíly mezi liniemi byly menší (Obr. 26B, C).

Přírůstek kořene za 24 h na kontrolním médiu byl u linií Col-0 a *rhd2-1* porovnatelný, linie *der1-3* a *tip1-1* měly přírůstek kořene průkazně nižší, přičemž i rozdíly mezi těmito liniemi byly statisticky průkazné (Obr. 27A). Při solném stresu se projevil průkazně nižší přírůstek kořene u linie *der1-3* (Obr. 27B). Při osmotickém stresu byl nejvyšší přírůstek kořene u linie *tip1-1*, čemu se vyrovnal jen přírůstek kořene u linie *rhd2-1*. U ostatních linií byl přírůstek kořene statisticky nižší (Obr. 27C). Vyhodnocení redukce délky kořenů po aplikovaných stresech vůči kontrole naznačuje, že tato redukce byla nejmenší u linie *der1-3* (Tab. 4), i když absolutní délka kořene při solném a osmotickém stresu ukazuje produkci nejkratších kořenů u této linie (Obr. 26, 27). Morfologické rozdíly u rostlin 19 dní starých, které se vyvíjeli v podmínkách solného a osmotického stresu 16 dní, byly zřetelné. Solný stres redukoval vývoj kořenového systému především u linie *der1-3* (Obr. 28A, B). Naopak, při osmotickém stresu měla linie *der1-3* společně s linií *tip1-1* nejdelší kořenový systém (Obr. 28C). V porovnání s kořenovým systémem je ovšem vývoj nadzemní části silně redukován v porovnání s kontrolou, a to u všech testovaných linií (Obr. 28).



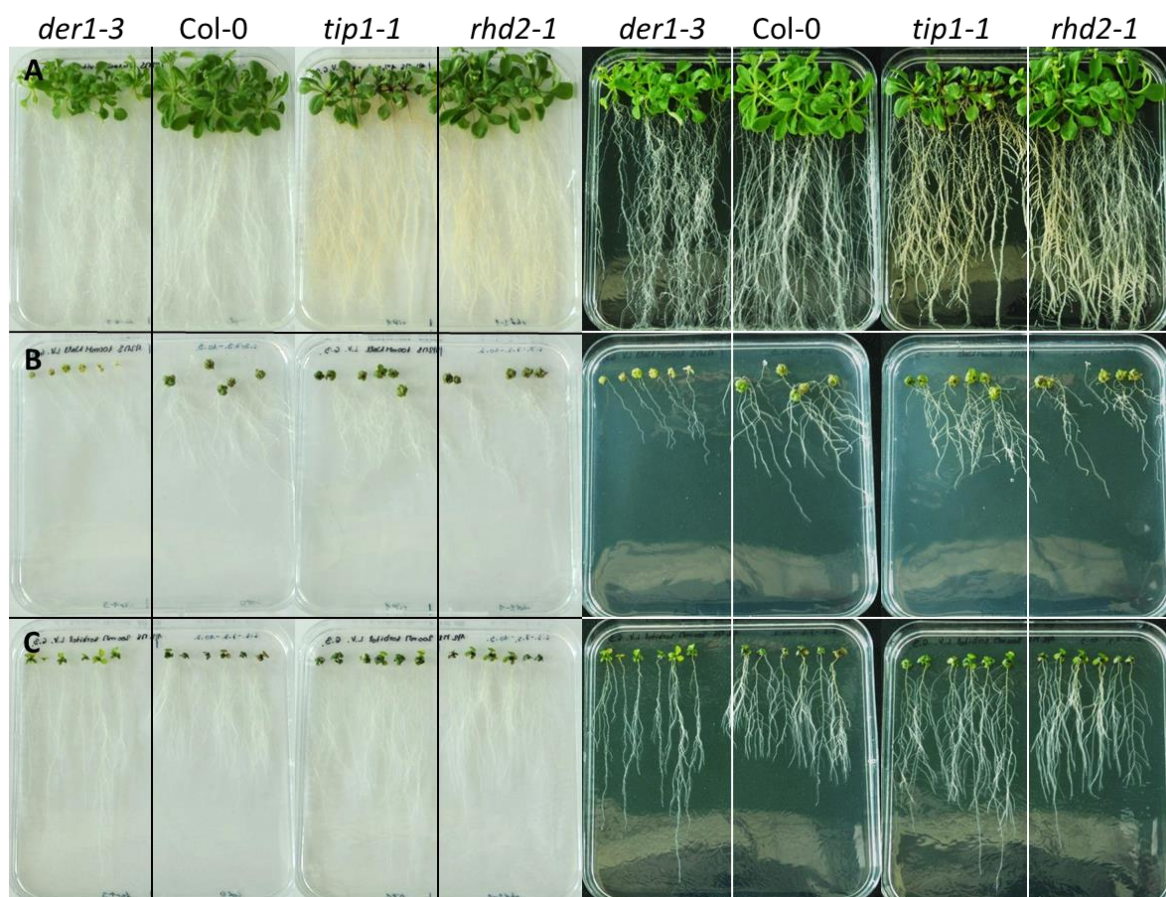
Obr. 26 Průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přenesených na kontrolní médium (A), a na média s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C). Rostliny byly sledovány po dobu 4 dní od přenosu. Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik.



Obr. 27 Přírůstek kořenů za 24 h u linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přenesených na kontrolní médium (A), a na média s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C). Rostliny byly sledovány po dobu 4 dní od přenosu. Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresi a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.

Linie	Solný stres	Osmotický stres
Col-0	2,2	2,4
<i>rhd2-1</i>	2,5	2,1
<i>der1-3</i>	1,75	1,4
<i>tip1-1</i>	2,2	1,5

Tab. 4 Hodnoty redukcí délek kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* ve stresových podmínkách v porovnání s kontrolními podmínkami. Hodnoty byly získány poměrem délek kořenů na kontrolních podmínkách vůči délkám kořenů na stresových podmínkách.



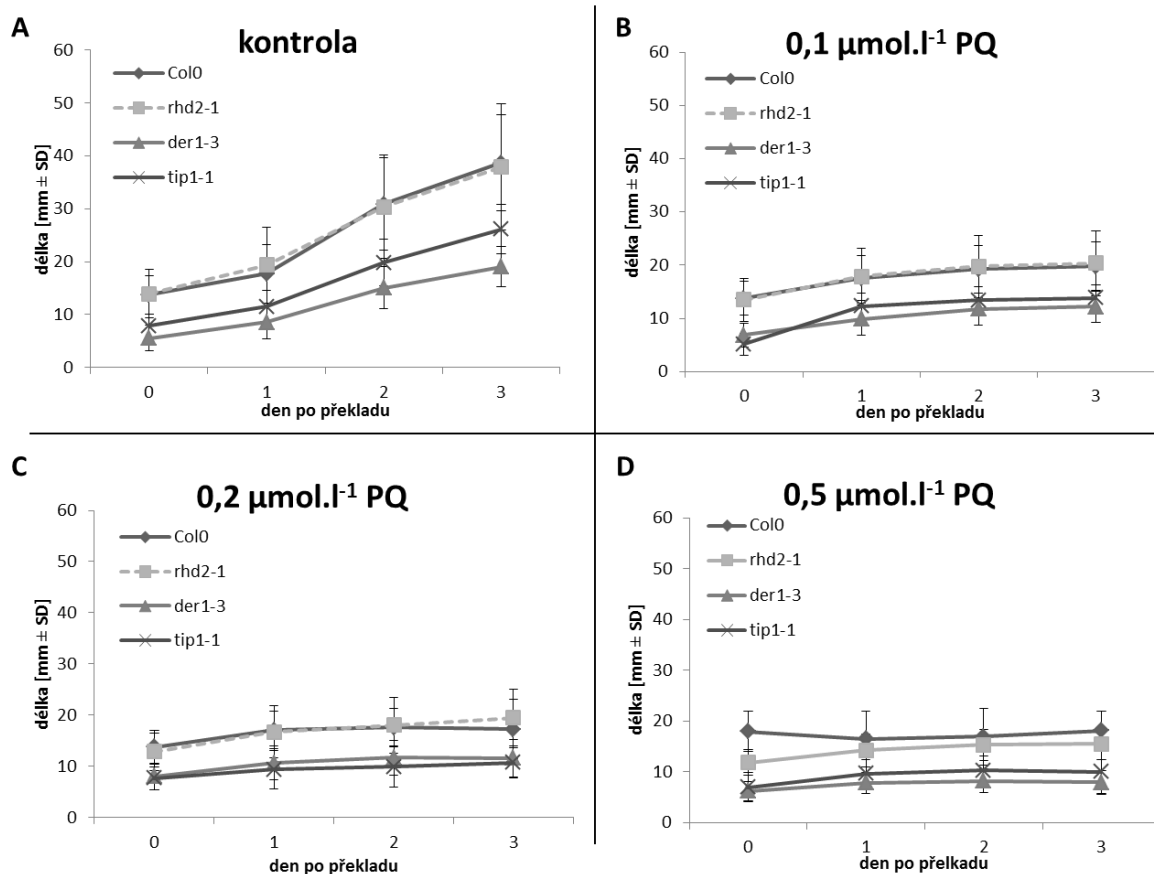
Obr. 28 Morfologie rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* 19 dní po vyklíčení, které rostly 16 dní na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C).

#### 5. 2. 2. 2. Oxidativní stres

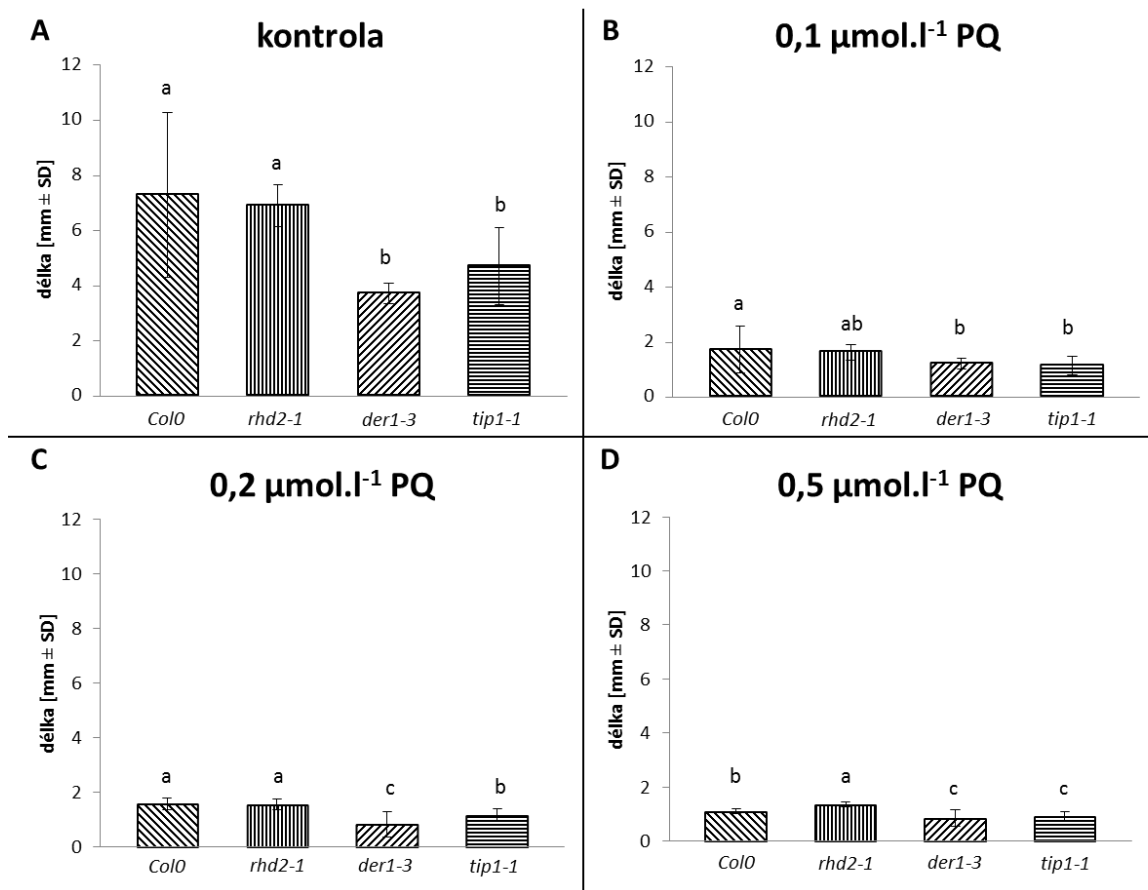
Semínka linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* byla nasazena na kontrolní ½ MS médium bez vitamínů a synchronizována 1 den při 4°C. Vyklíčené rostliny 3 dny staré byly přeloženy na ½ média bez vitamínů s obsahem s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a rostliny byly následně dokumentovány každý den po dobu 3 dnů.

Délka kořenů v kontrolních podmínkách jasně naznačila, že linie Col-0 a *rhd2-1* rostly viditelně lépe v porovnání s liniemi *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 29A). Tato tendence byla patrná i na všech třech koncentracích PQ při indukci oxidativního stresu (Obr. 29B, C, D). Měření přírůstků kořene za 24 h tento trend potvrdilo. V kontrolních podmínkách byl přírůstek kořenů za 24 h pro linie Col-0 a *rhd2-1* průkazně větší, než tomu bylo u linií *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 30A). V podmínkách oxidativního stresu byly přírůstky kořene u linií *der1-3* a *tip1-1* vždy statisticky průkazně menší než u Col-0 (Obr. 30B) a u koncentrace 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (Obr. 30C) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (Obr. 30D) byly přírůstky u těchto linií menší i v porovnání s linií *rhd2-1*. Na médiu s obsahem 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ měla linie *rhd2-1* největší přírůstek (Obr. 30D).

Výpočet redukce délky kořenů po aplikaci abiotického stresu ukázal, že u linie *der1-3* je redukce nejmenší na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, vyšší je u linie *tip1-1* a nejvyšší u linií Col-0 a *rhd2-1*. Na médiu s obsahem 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ rozdíly mezi jednotlivými liniemi pozorovány nebyly (Tab. 5). Rostliny ovlivněny oxidativním stresem byly morfologicky porovnány ve věku 12 dní, tedy když rostly při stresových podmínkách 9 dní. Velikost nadzemních částí rostlin i kořenových systémů byla u pozorovaných linií redukována v porovnatelné míře. Nejlepší vývoj byl zaznamenán u linií Col-0 a *rhd2-1* (Obr. 31).



Obr. 29 Průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přenesených na kontrolní médium (A), a na média s obsahem 0,1 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (B), 0,2 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (C) a 0,5 μmol.l<sup>-1</sup> PQ (D). Rostliny byly sledovány po dobu 3 dnů od přenosu. Data reprezentují průměr ± SD z 10 biologických replik.

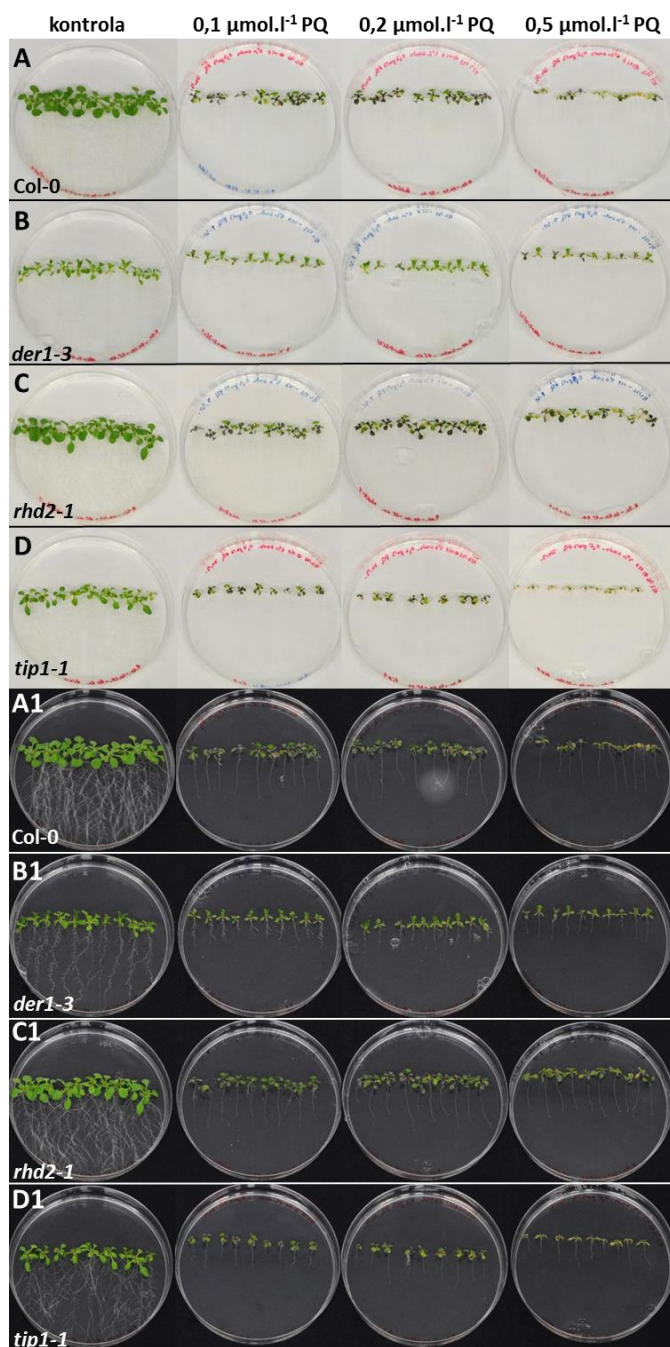


Obr. 30 Přírůstek kořenů za 24 h u linií *Col-0*, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přenesených na kontrolní médium (A), a na média s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (B), 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (C) a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ (D). Rostliny byly sledovány po dobu 3 dnů od přenosu. Data reprezentují průměr  $\pm$  SD z 10 biologických replik. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresy a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.



<b>Linie</b>	<b>0,1 <math>\mu</math>M PQ</b>	<b>0,2 <math>\mu</math>M PQ</b>	<b>0,5 <math>\mu</math>M PQ</b>
Col-0	4,3	4,6	6,6
<i>rhd2-1</i>	4,3	4,6	5,3
<i>der1-3</i>	3,1	4,6	4,6
<i>tip1-1</i>	3,9	4,3	5,2

Tab. 5 Hodnoty redukce délek kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* ve stresových podmínkách v porovnání s kontrolními podmínkami. Hodnoty byly získány poměrem délek kořenů na kontrolních podmínkách vůči délkám kořenů na stresových podmínkách.



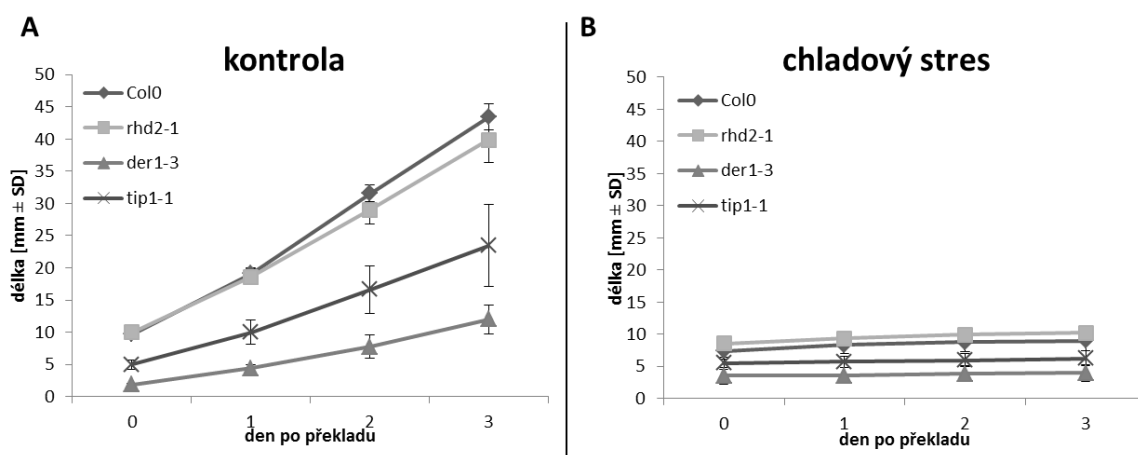
Obr. 31 Morfologie rostlin linií Col-0 (A, A1), *der1-3* (B, B1), *rhd2-1* (C, C1) a *tip1-1* (D, D1) 12 dní po vyklíčení, které rostly 9 dní na kontrolním médiu, na médiu s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ.

### 5. 2. 2. 3. Chladový stres

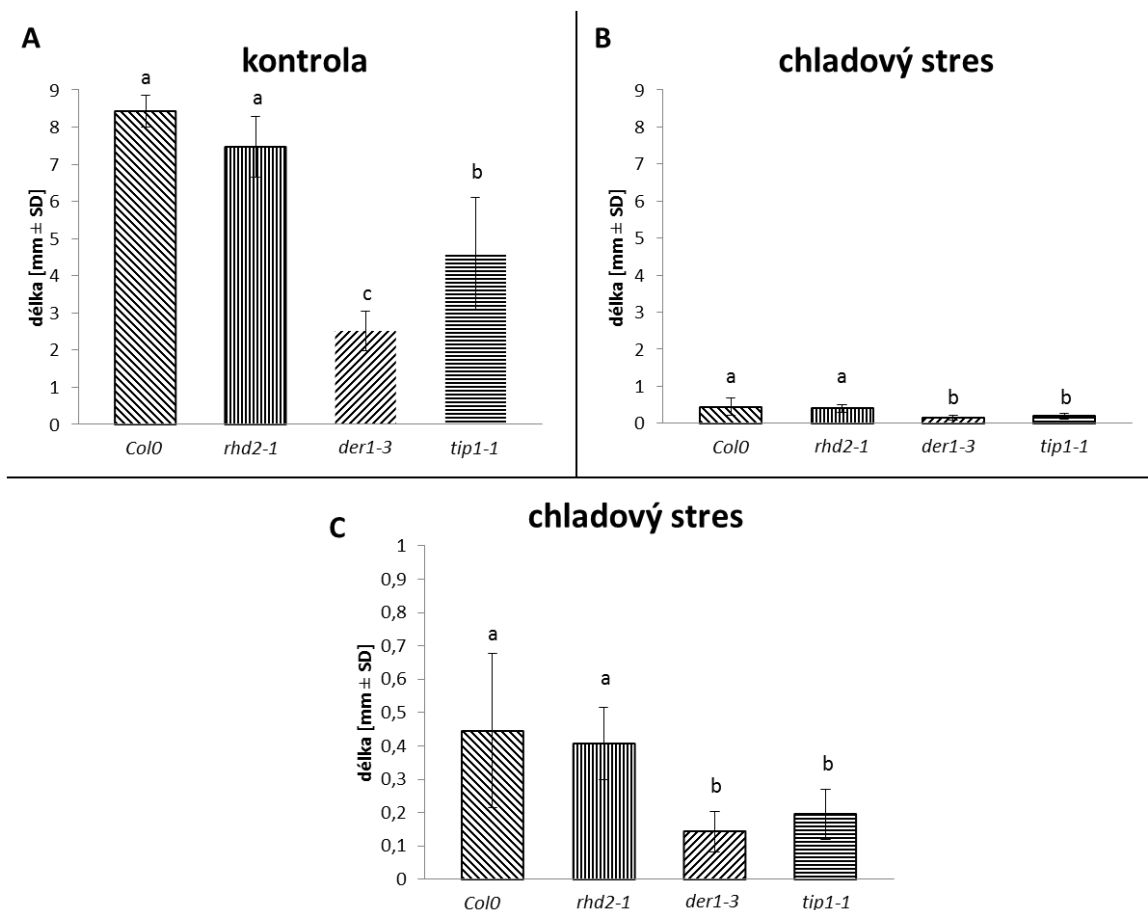
Semínka linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* byla nasazena na kontrolní ½ MS médium bez vitamínů a synchronizována 1 den při 4°C. Rostliny 3 dny staré byly přeneseny na nové ½ MS médium a kultura byla kultivována při 4 °C v kultivační komoře. Rostliny byly dokumentovány každý den po dobu 3 dnů.

V kontrolních podmínkách byl nejlepší růst zaznamenán u linií Col-0 a *rhd2-1*. Zřetelně pomaleji pak rostly linie *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 32A). Při chladovém stresu byl růst kořenů výrazně zpomalený u všech linií (Obr. 32B). Přírůstek kořenů za 24 h v kontrolních podmínkách byl největší u linií Col-0 a *rhd2-1*, Průkazně zpomalen přírůstek byl zaznamenán u linie *tip1-1* a též u linie *der1-3*. I mezi těmito liniemi byly hodnoty přírůstku statisticky odlišné (Obr. 33A). Při chladovém stresu byl růst kořenů výrazně a porovnatelně postižen (Obr. 32B), ale i tak byly rozdíly v přírůstku kořenů linií Col-0 a *rhd2-1* při porovnání s liniemi *der1-3* a *tip1-1* statisticky odlišné (Obr. 33B, C).

Výpočet redukce délky kořenů při chladovém stresu vůči kontrole odhalil, že nejmenší redukce byla zaznamenána u linie *der1-3*, vyšší byla u linií *rhd2-1* a Col-0 a největší redukce délky kořene měla linie *tip1-1* (Tab. 6). Morfologie byla zdokumentována u 9 dní starých rostlin, které rostly v chladových podmínkách po dobu 6 dní. Redukce velikosti a růstu nadzemních částí jako i kořenů byla u pozorovaných linií značná a srovnatelná (Obr. 34).



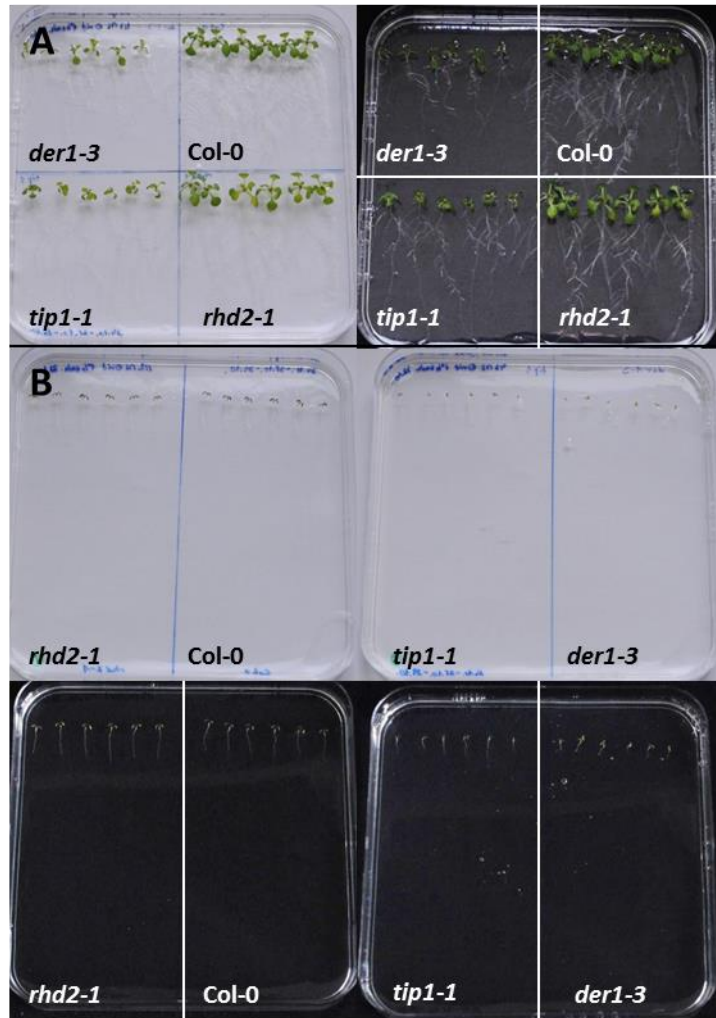
Obr. 32 Průměrný růst kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, přenesených na nová média, které byly následně kultivovány v kontrolních podmínkách (A), a při 4°C (B). Rostliny byly sledovány po dobu 3 dnů od přenosu. Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik u kontroly a z 12 biologických replik u chladu.



Obr. 33 Přírůstek kořenů za 24 h u linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* přenesených na nová média, které byly následně kultivovány v kontrolních podmínkách (A), a při 4°C (B, C). Rostliny byly sledovány po dobu 3 dnů od přenosu. Data reprezentují průměr ± SD z 6 biologických replik u kontroly a z 12 biologických replik u chladu. Indexy nad sloupci vyjadřují statisticky signifikantní rozdíly ( $p < 0,05$ ) mezi aplikovanými stresy a kontrolou, určené pomocí ANOVA a následného LSD testu.

<i>Col0</i>	<i>rhd2-1</i>	<i>der1-3</i>	<i>tip1</i>
21	18,75	17,9	23

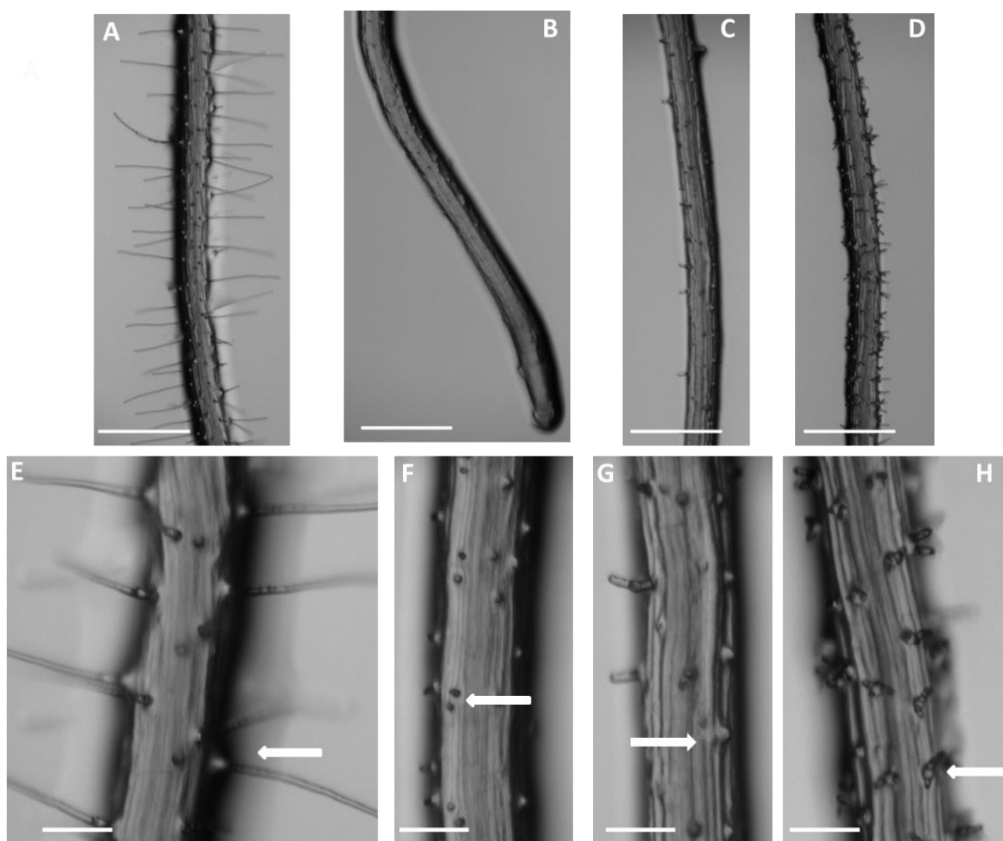
Tab. 6 Hodnoty redukcí délek kořenů linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* ve stresových podmínkách v porovnání s kontrolními podmínkami. Hodnoty byly získány poměrem délek kořenů na kontrolních podmínkách vůči délkám kořenů na stresových podmínkách.



Obr. 34 Morfologie rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* 9 dní po vyklíčení, které rostly 6 dní v kontrolních podmínkách (A) a při 4°C (B).

### 5. 3. Změny fenotypu kořene a kořenových vlásků indukované solným, osmotickým, oxidativním a chladovým stresem

V této části práce bude podrobněji charakterizován fenotyp kořenových vlásků jednotlivých linií a jeho změny vyvolané stresovými podmínkami. Nejdříve budou sumarizovány experimenty z klíčení rostlin přímo pod vlivem stresů a následně experimenty po překladu 3 denních kontrolních rostlin do stresových podmínek. V kontrolních podmínkách vytváří linie Col-0 dlouhé vlásky bez větvení (Obr. 24A, E). Linie *der1-3* má krátké kořenové vlásky, které zastavují svůj růst ve stádiu „bulge“. Růst kořene u této linie není striktně pozitivně gravitropický (Obr. 24B, F). Linie *rh2-1* tvoří krátké kořenové vlásky, neschopné rychlého apikálního růstu, které jsou ale poněkud delší než u linií *der1-3* a *tip1-1* (Obr. 24C, G). Linie *tip1-1* tvoří sice kratší kořenové vlásky, typickým znakem je ovšem jejich větvení (Obr. 24D, H).



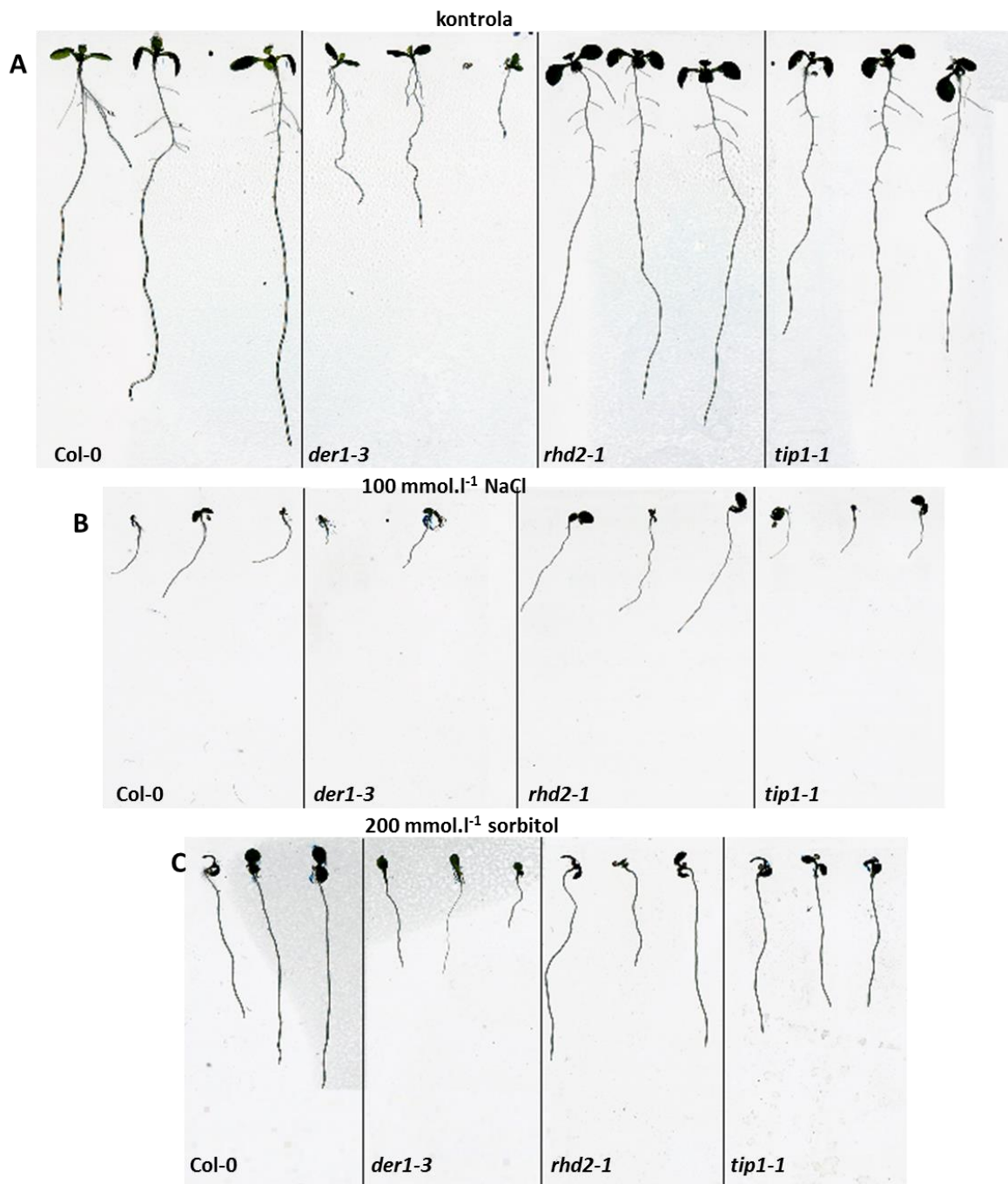
Obr. 35 Fenotyp kořene a kořenových vlásků linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rh2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H). Šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka 500  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D) a 100  $\mu\text{m}$  (E, F, G, H).

### 5. 3. 1. Kořenové vlásky při klíčení testovaných linií pod vlivem solného, osmotického a oxidativního stresu

#### 5. 3. 1. 1. Solný a osmotický stres

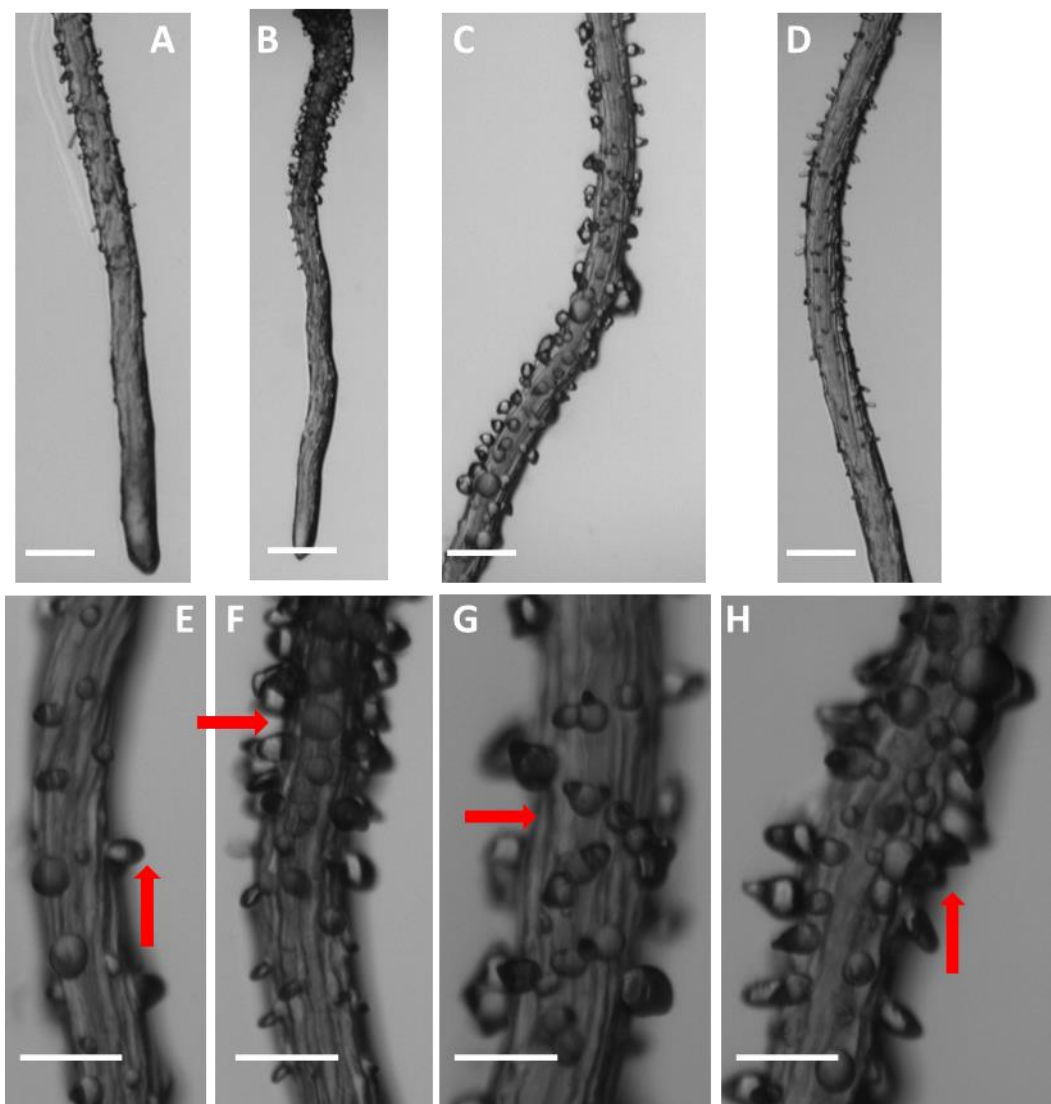
Kořenový systém rostlin, 6 dní starých, byl tvořen primárním kořenem a několika bočními kořeny. Platí to i u linie *der1-3*, i když byla celková délka primárního kořene podstatně kratší (Obr. 36A). Solný stres kořenový systém všech linií silně redukoval, nedocházelo ani k tvorbě bočních kořenů (Obr. 36B). Při osmotickém stresu byl růst primárního kořene opět redukován, včetně tvorby bočních kořenů. Celková délka primárního kořene byla ale větší než v případě solného stresu (Obr. 36C).

Odpověď ve vývoji kořenových vlásků na solný stres u všech linií byla mírně rozdílná ve zralé části kořene a v zóně jejich diferenciaci blízko kořenové špičky. Ve zralé části kořene, která byla solným stresem zasažena spíše, byly kořenové vlásky linie Col-0 krátké a abnormálně rozšířené (Obr. 37A, E). Podobně krátké a rozšířené vlásky byly i u linie *der1-3* (Obr. 37B, F). U linie *rhd2-1* došlo kromě rozšiřování i k rozvětvení kořenových vlásků (Obr. 37C, G). Kořenové vlásky linie *tip1-1* byly rozšířené především na bázi, větvyly se ovšem jenom zřídka (Obr. 37D, H). U mladších kořenových vlásků a v zóně jejich diferenciaci bylo u všech linií rozšiřování po solném stresu už méně časté. Kořenové vlásky linie Col-0 byly ale velmi krátké, nahromaděné a deformované (Obr. 38A, E). U linie *der1-3* byly pozorovány kořenové vlásky s jejich charakteristickým fenotypem (Obr. 38B, F). U linie *rhd2-1* byly kořenové vlásky v porovnání se svým typickým kontrolním fenotypem prodloužené (Obr. 38C, G). U linie *tip1-1* měli kořenové vlásky standardní délku, ale nerozvětvovali se (Obr. 38D, H). Osmotický stres vyvolával u linie Col-0 větvení kořenových vlásků (Obr. 39A, E). U linie *der1-3* nedošlo k zásadní změně fenotypu (Obr. 39B, F). U linie *rhd2-1* byly kořenové vlásky delší a často se větvyly (Obr. 39C, G). Linie *tip1-1* měla kořenové vlásky kratší než na kontrolním médium, ale typický fenotyp byl zachován (Obr. 39D, H).

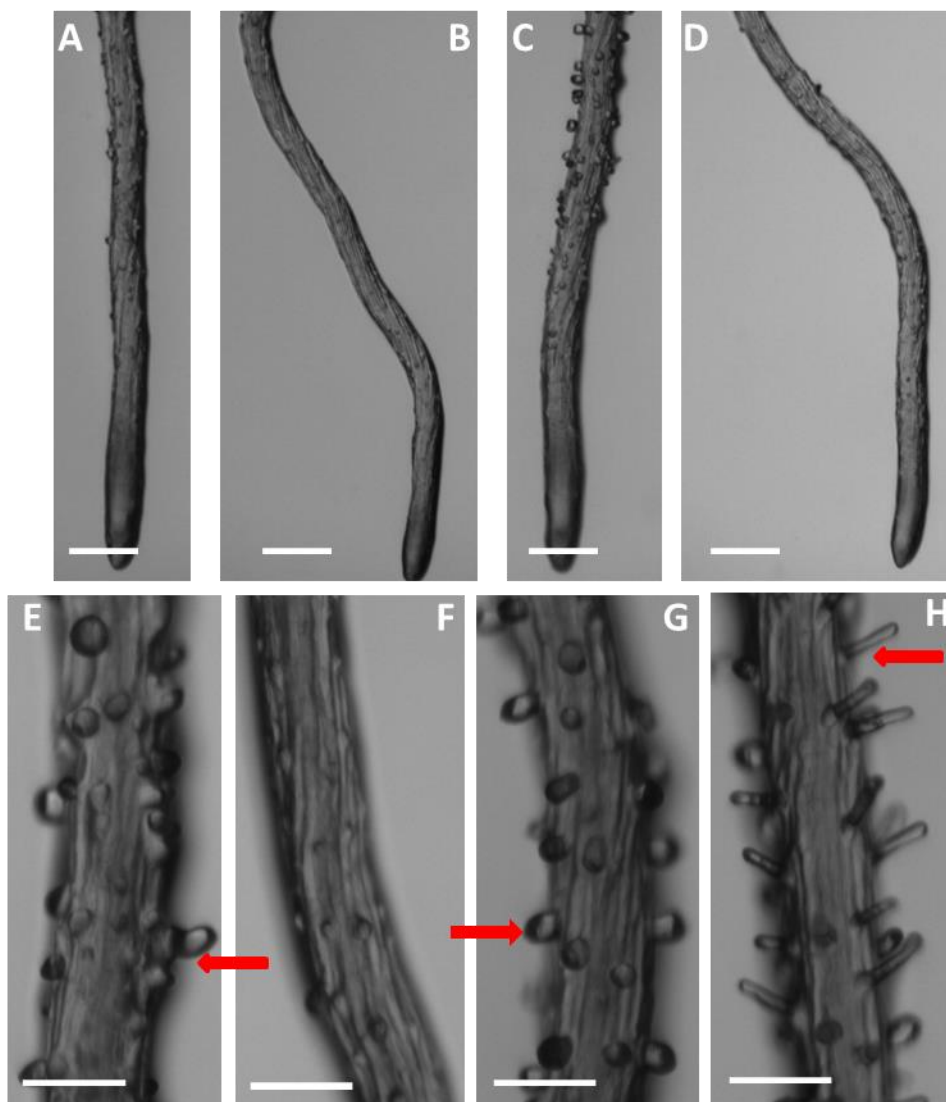


Obr. 36 Morfologie rostlin 6 denních rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, klíčících přímo na kontrolním médiu (A), na médiu s obsahem 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C).

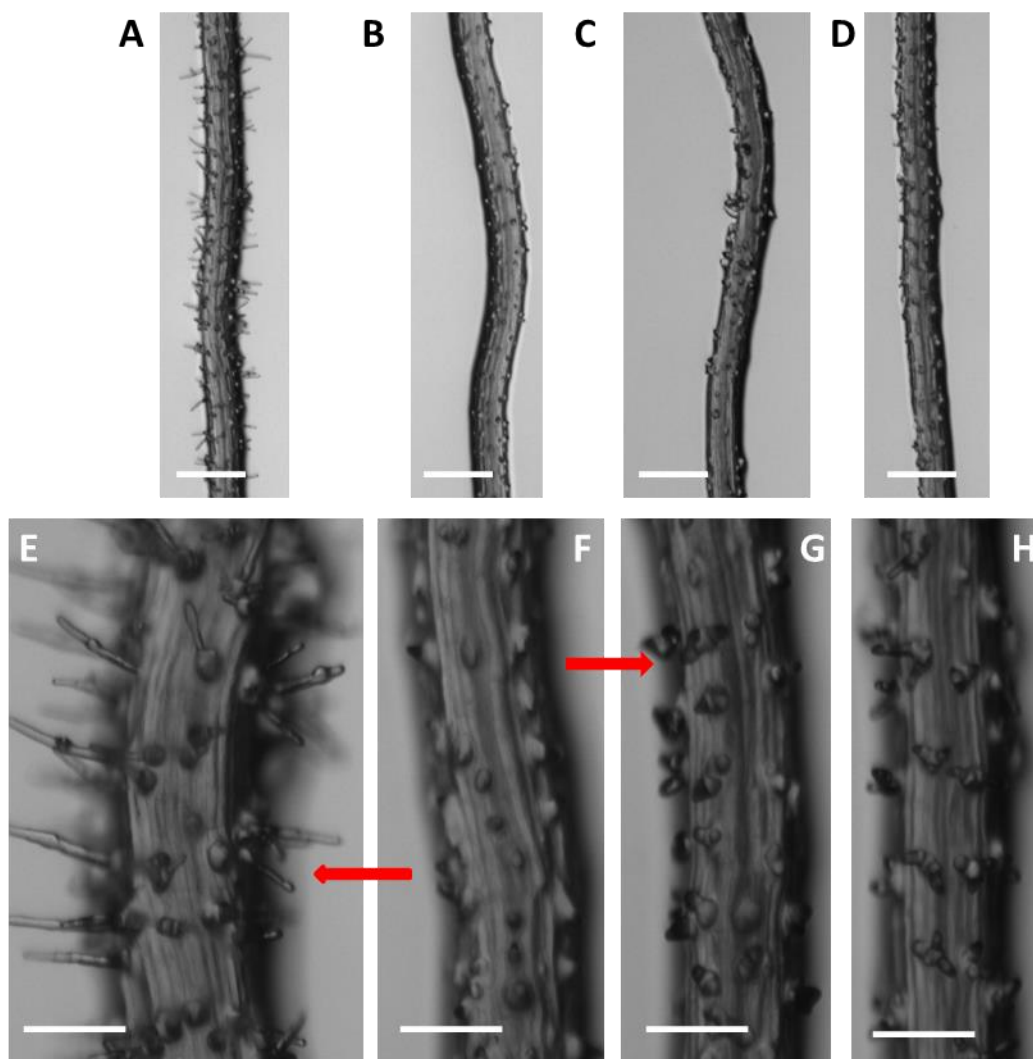




Obr. 37 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 6 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiích s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl. Šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka  $250 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).



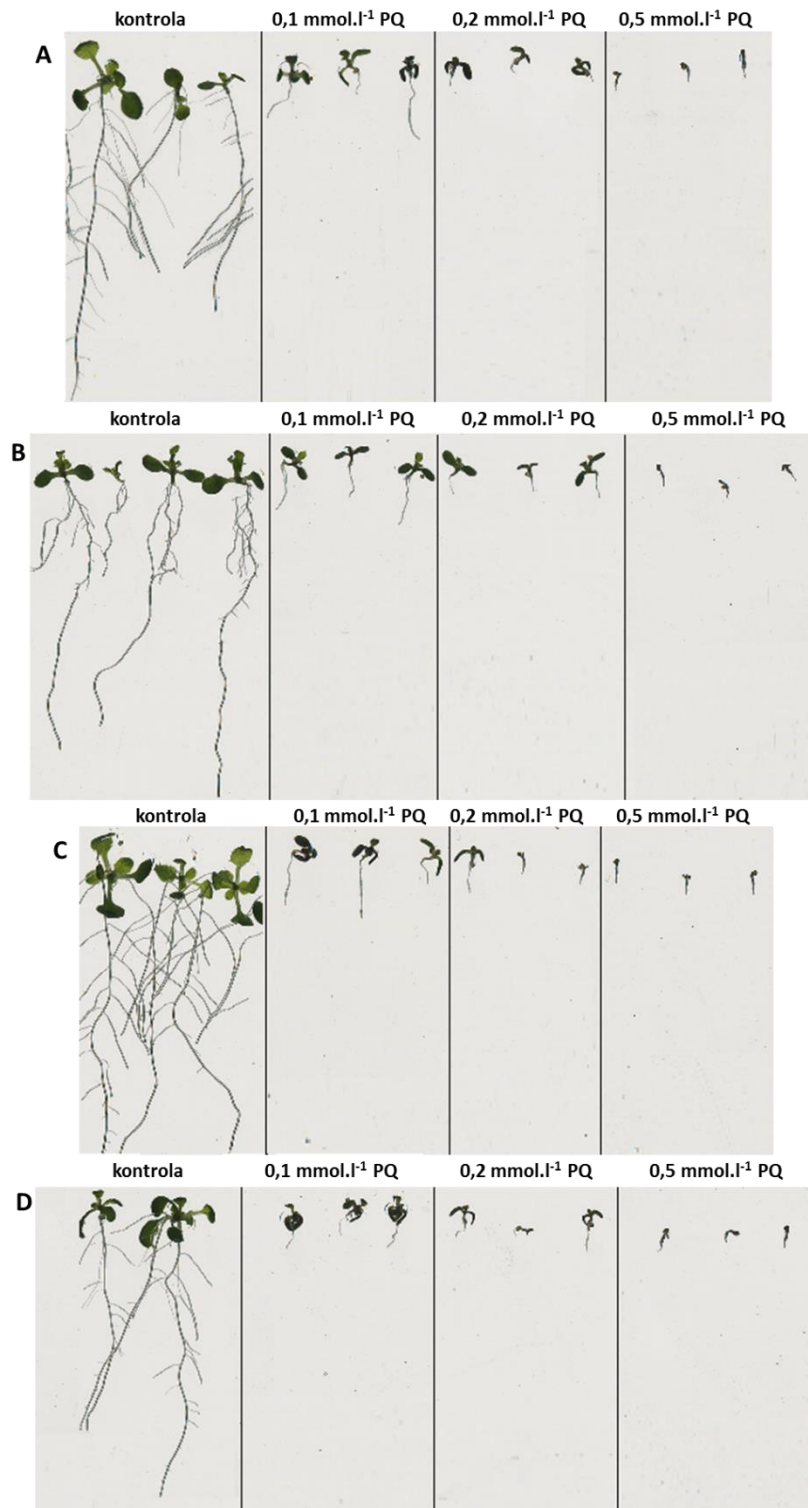
Obr. 38 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 6 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiích s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl. Šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka  $250 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).



Obr. 39 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 6 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiích s obsahem 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu. Šipky ukazují typický fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka 250 μm (A, B, C, D) a 100 μm (E, F, G, H).

### 5. 3. 1. 2. Oxidativní stres

Morfologie rostlin a kořenového systému u 9 denních rostlin, které přímo klíčili na médiích s různými koncentracemi PQ, byla výrazně ovlivněna. Kořenový systém u všech linií byl silně redukován, a to i v počtu bočních kořenů. Se zvyšující se koncentrací jsou rostliny menší a tento trend se opakuje u všech linií (Obr. 40). Koncentrace  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ indukovala u všech linií kroucení primárního kořene s redukcí vývoje kořenových vlásků. U linie *der1-3* bylo formování kořenových vlásků na této koncentraci PQ výrazně zredukováno (Obr. 41). Redukce tvorby kořenových vlásků byla na médiu s obsahem  $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ ještě výraznější (Obr. 42). Při koncentraci  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ byla u všech linií diferenciací kořenových vlásků blízko rostoucího vrcholu zastavena. Vlázky byly vytvořeny jenom na bázi kořene. Tyto kořenné vlázky si svůj fenotyp, typický pro každou linii, zachovávaly (Obr. 43).



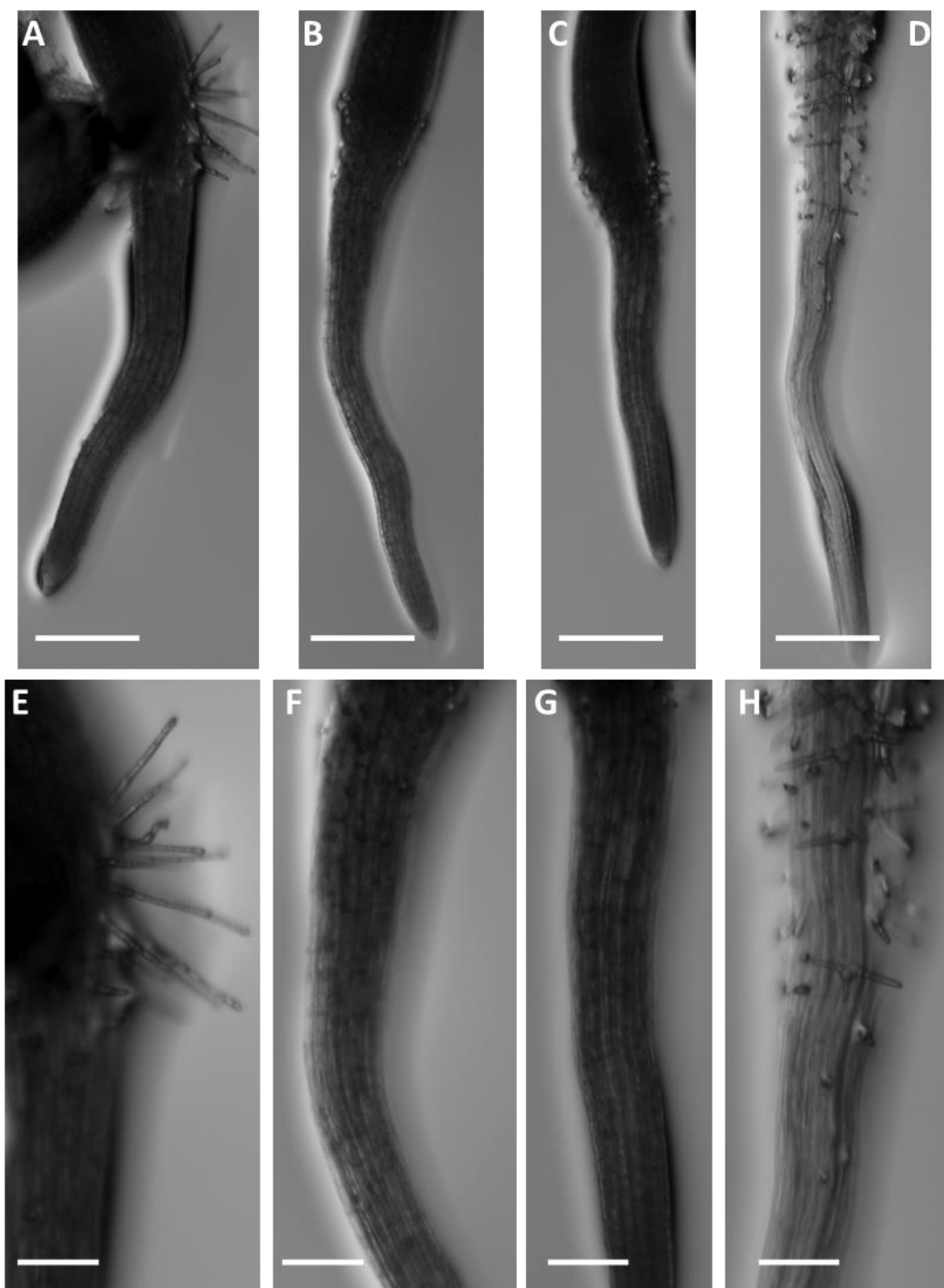
Obr. 40 Morfologie 9 denních rostlin linií Col-0 (A), *der1-3* (B), *rhd2-1* (C) a *tip1-1* (D), klíčících přímo na kontrolním médiu, a na médiích s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ.



Obr. 41 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 9 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiu s obsahem  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Šipka ukazuje zónu kořene bez kořenových vlásků u linie *der1-3*. Měřítko 250  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D) a 100  $\mu\text{m}$  (E, F, G, H).



Obr. 42 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 9 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiu s obsahem  $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Šipky ukazují zónu s diferenciací kořenových vlásků. Měřítko  $250 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).



Obr. 43 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 9 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), klíčících přímo na médiu s obsahem  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Měřítka  $250 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).

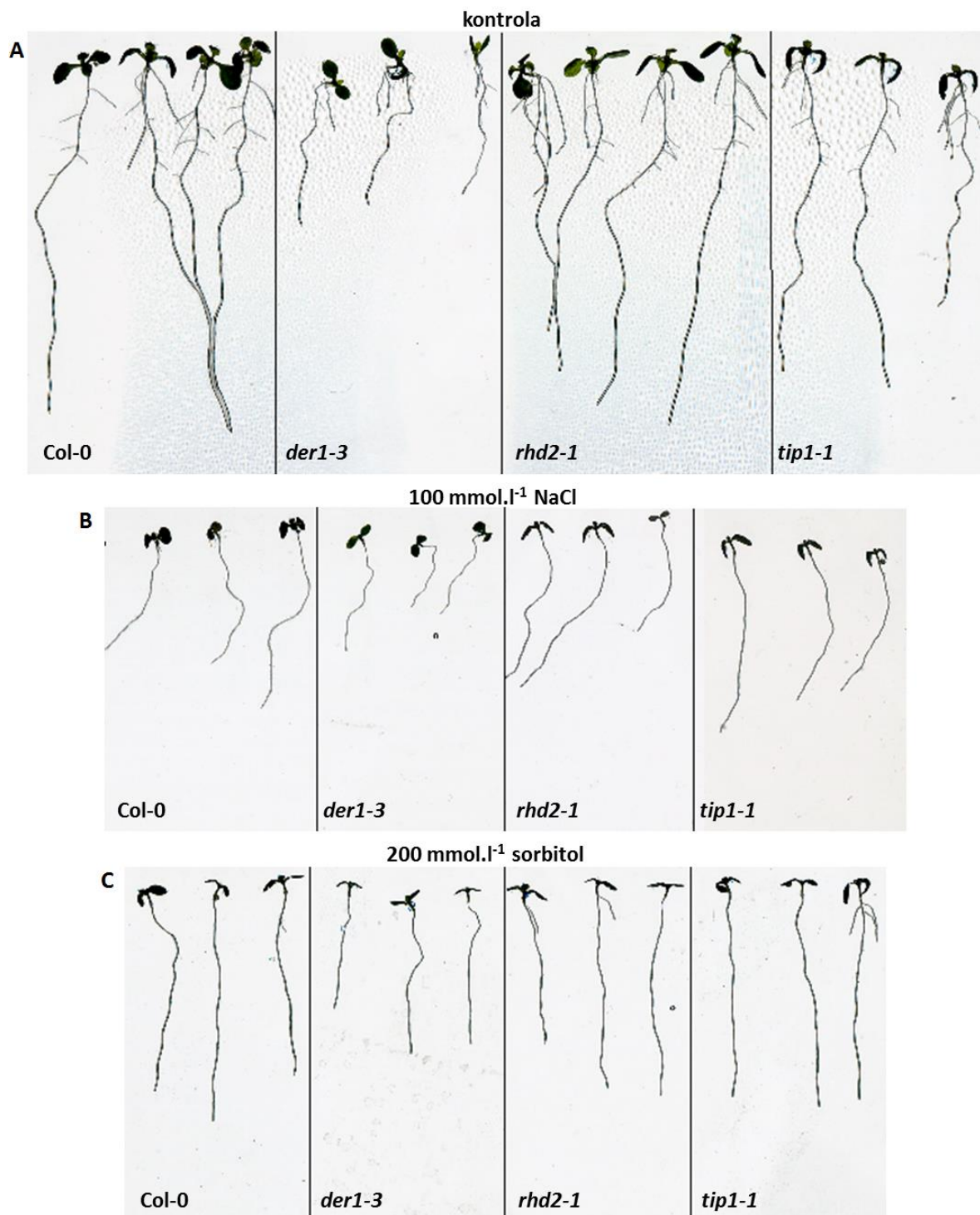


### 5. 3. 2. Kořenové vlásky po přeložení testovaných linií do podmínek solného, osmotického, oxidativního a chladového stresu

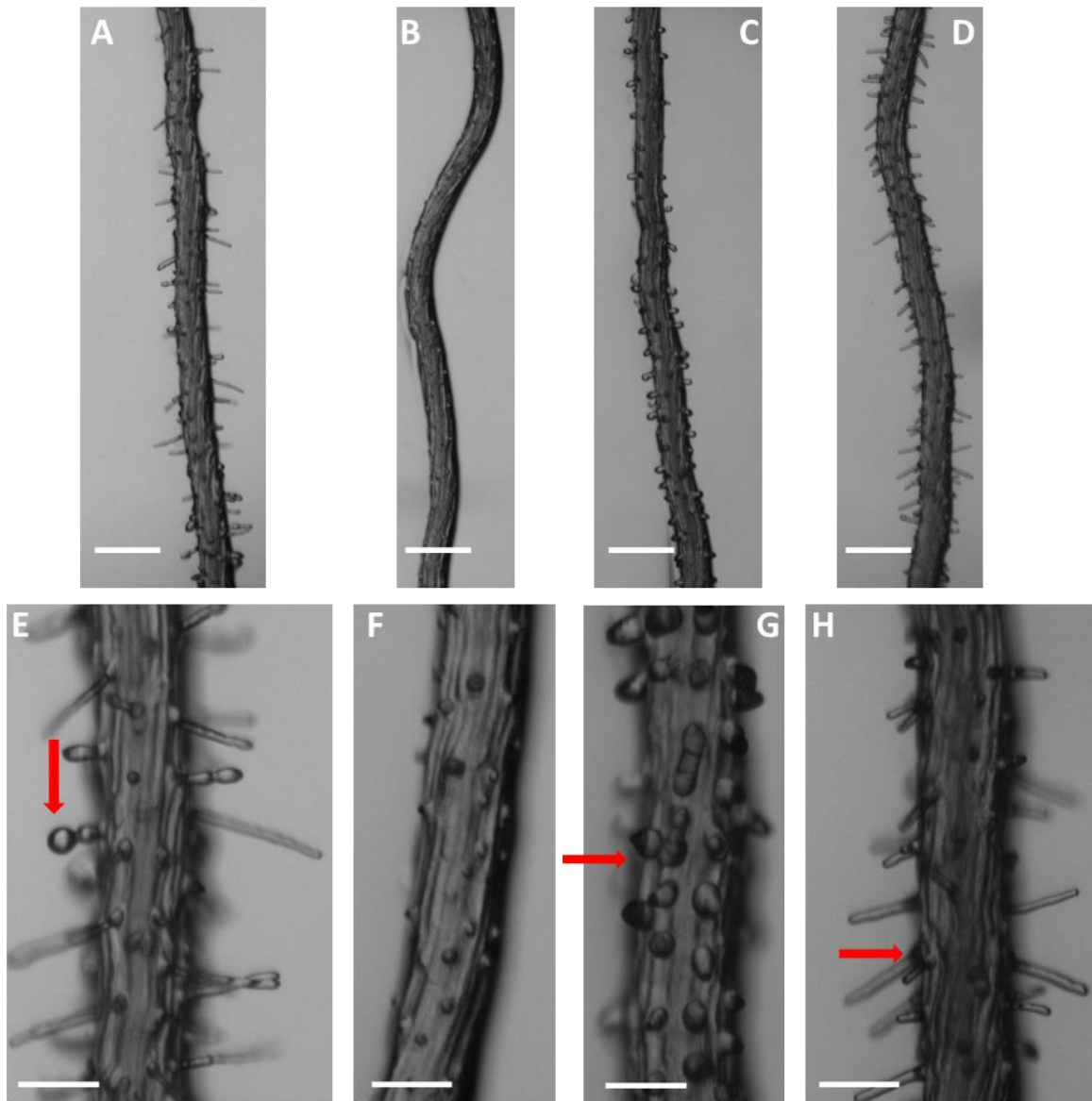
#### 5. 3. 2. 1. Solný a osmotický stres

Morfologie rostlin a kořenového systému, u rostlin 6 dní starých, je porovnatelná u linií Col-0, *rhd2-1* a *tip1-1*. Linie *der1-3* má kořenový systém podstatně kratší a méně vyvinutý (Obr. 44A). U rostlin 6 dní starých, které rostly 3 dny ve stresových podmínkách, je kořenový systém silně redukovaný a tvorba bočních kořenů silně potlačena v podmínkách solného stresu (Obr. 44B). Podobná situace byla zaznamenána i v podmínkách osmotického stresu, kde byla ale délka kořenů větší než v případě solného stresu (Obr. 44C).

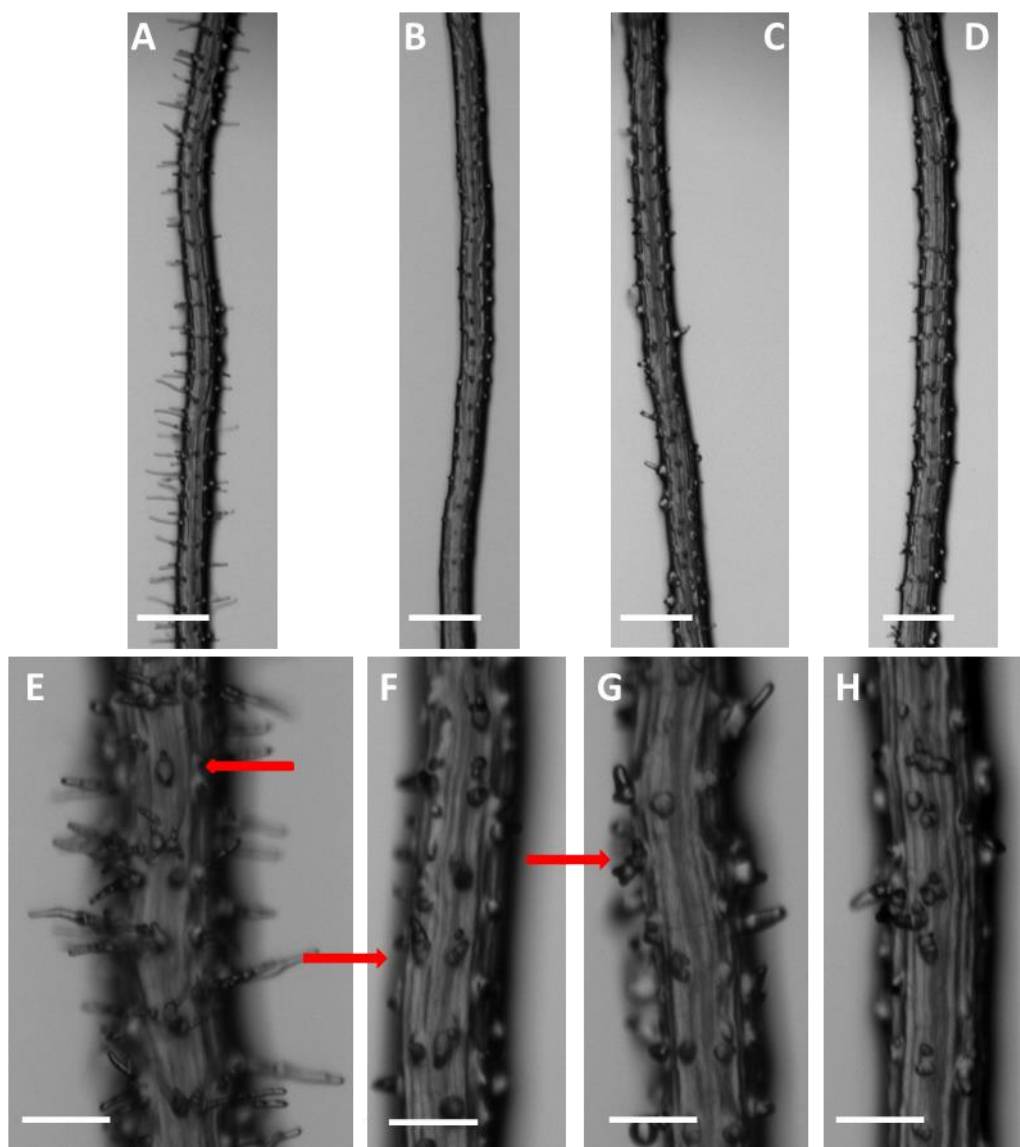
Solný stres vedl u kontrolní linie Col-0 k redukci růstu kořenových vlásků, které byly kratší a částečně deformované (Obr. 45A, E). Linie *der1-3* si v podmínkách solného stresu normální fenotyp kořenových vlásků zachovávala (Obr. 45B, F). U linie *rhd2-1* docházelo k tomu, že se kořenové vlásky rozšiřovaly a bylo zaznamenáno i jejich větvení (Obr. 45C, G). Kořenové vlásky linie *tip1-1* dorůstali do normální délky, ale jenom zřídka se větvali (Obr. 45D, H). Změny morfologie kořenových vlásků v podmínkách osmotického stresu měli částečně jiný charakter. U kontrolní linie Col-0 byly kořenové vlásky krátké a často docházelo k jejich větvení (Obr. 46A, E). U linie *der1-3* nebyl typický fenotyp kořenových vlásků změněn (Obr. 46B, F). U linie *rhd2-1* byly kořenové vlásky delší a větvali se (Obr. 46C, G). Linie *tip1-1* měla kořenové vlásky kratší než na kontrolním médiu, ale jejich fenotyp byl zachován (Obr. 46D, H).



Obr. 44 Morfologie 6 denných rastlín liníí Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, ktoré rostly 3 dny na kontrolnom médiu (A), na médiu s obsahom 100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl (B) a 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu (C).



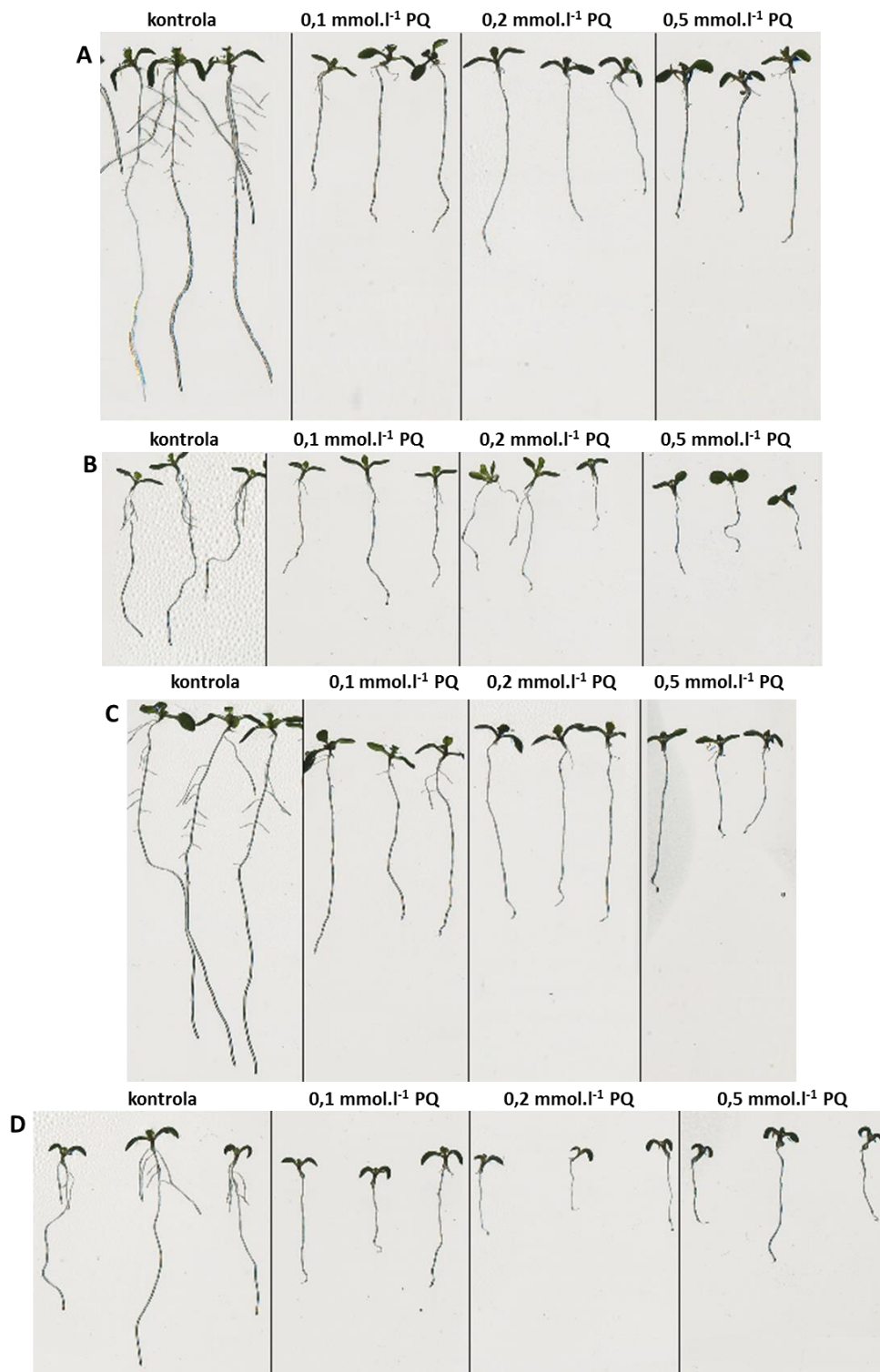
Obr. 45 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 6 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostli 3 d na médiu s obsahem  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl. Šipky ukazují fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka  $250 \text{ }\mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \text{ }\mu\text{m}$  (E, F, G, H).



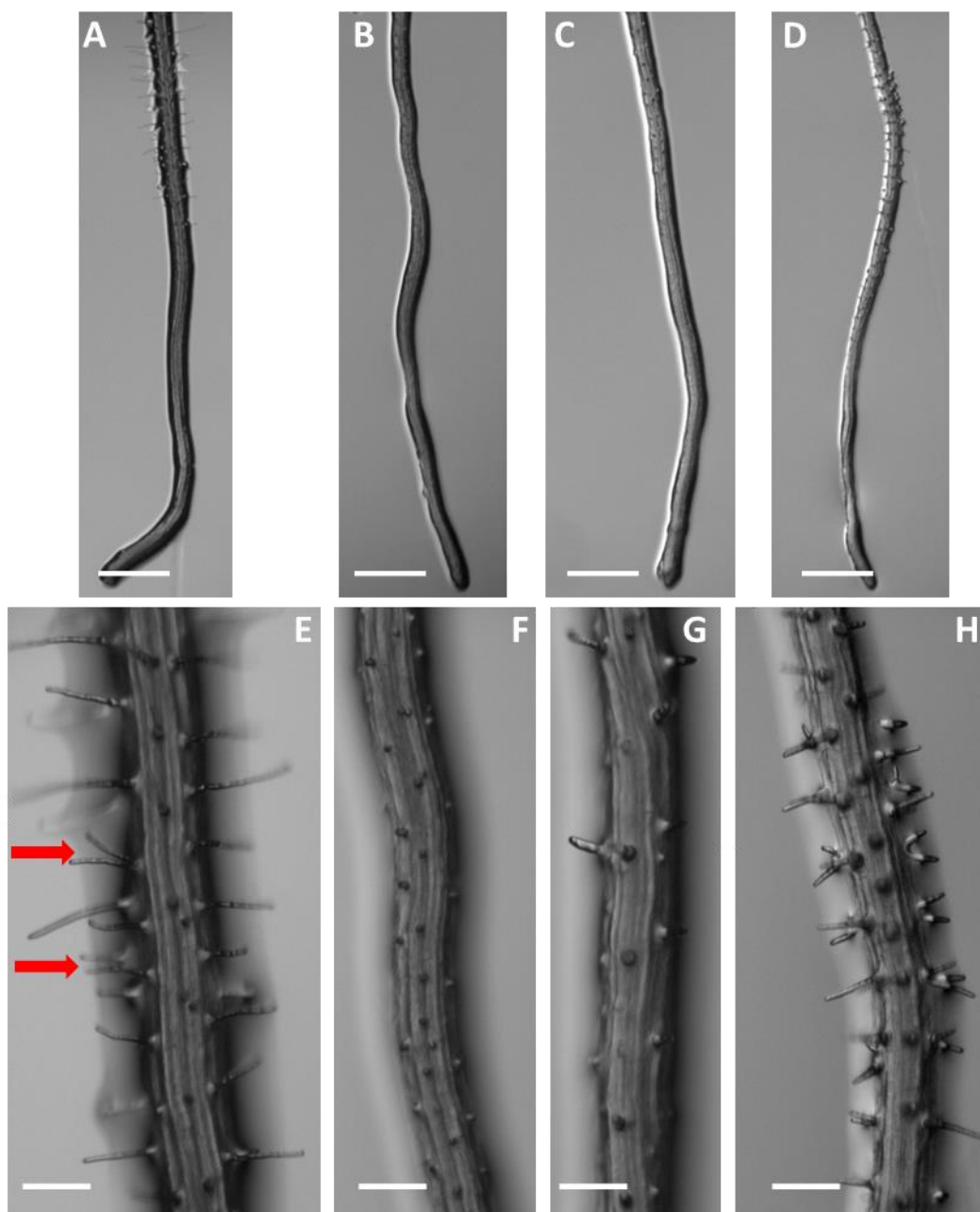
Obr. 46 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 6 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostli 3 d na médiu s obsahem 200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitolu. Šipky ukazují fenotyp kořenových vlásků u jednotlivých linií. Měřítka 250 μm (A, B, C, D) a 100 μm (E, F, G, H).

### 5. 3. 2. 2. Oxidativní stres

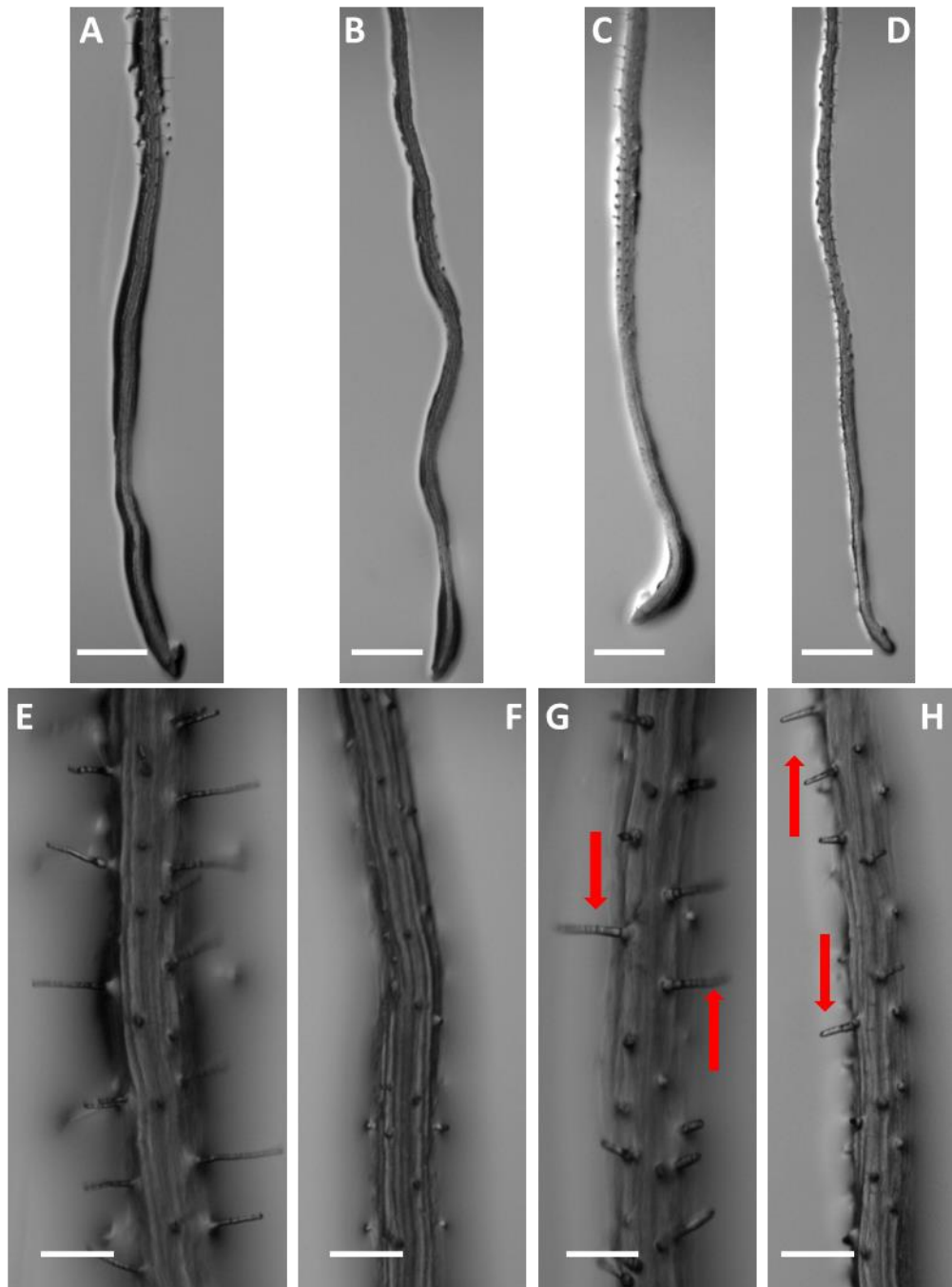
Morfologie rostlin a kořenového systému 7 denních rostlin, které byly přeložené na média s obsahem PQ, na kterých rostly další 4 dny, byla oxidativním stresem postižena, i když ne do také míry, jako v případě klíčení v podmínkách tohoto stresu. V případě všech použitých koncentrací PQ byl kořenový systém u všech linií redukován, včetně schopnosti tvořit boční kořeny. Se zvyšující se koncentrací PQ byly rostliny menší a tento trend se opakoval u všech testovaných linií (Obr. 47). Oxidativní stres vyvolával u všech testovaných linií mírné zakroucení růstu primárního kořene. Při koncentraci  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ u linie Col-0 docházelo k občasnému větvení kořenových vlásků, jinak byl typický fenotyp kořenových vlásků u mutantních linií zachován (Obr. 48). Koncentrace  $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ opět vyvolávala u Col-0 větvení některých kořenových vlásků. U linie *rhd2-1* vykazovali kořenové vlásky zlepšený růst v porovnání s kontrolním fenotypem této linie. U linie *tip1-1* byly kořenové vlásky kratší a nedocházelo k jejich větvení (Obr. 49). Koncentrace  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ nevedla k prohloubení změn ve fenotypu kořenových vlásků. Ten byl porovnatelný s efektem  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Rozdíl byl pozorován jenom u linie *rhd2-1*, u které byly kořenové vlásky pod vlivem  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ trochu delší (Obr. 50).



Obr. 47 Morfologie 7 denních rostlin linií Col-0 (A), *der1-3* (B), *rhd2-1* (C) a *tip1-1* (D), které rostly 3 dny na kontrolním médiu, a na médiích s obsahem 0,1  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ, 0,2  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ a 0,5  $\mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ.

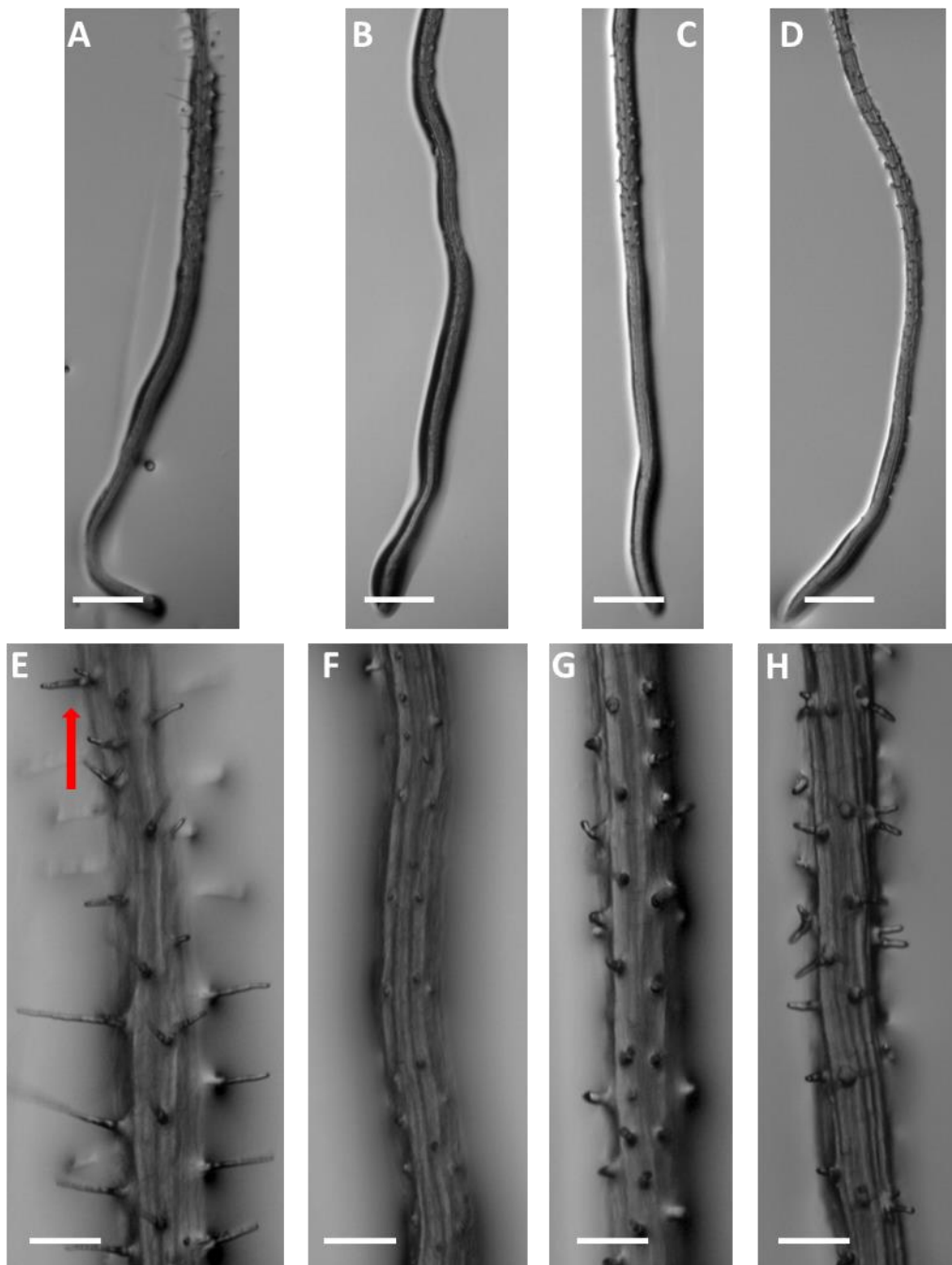


Obr. 48 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 7 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostly 3 dny na médiu s obsahem  $0,1 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Šipky ukazují změny fenotypu kořenových vlásků. Měřítka  $500 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).



Obr. 49 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 7 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostly 3 dny na médiu s obsahem  $0,2 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Šipky ukazují změny fenotypu kořenových vlásků. Měřítka  $500 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).





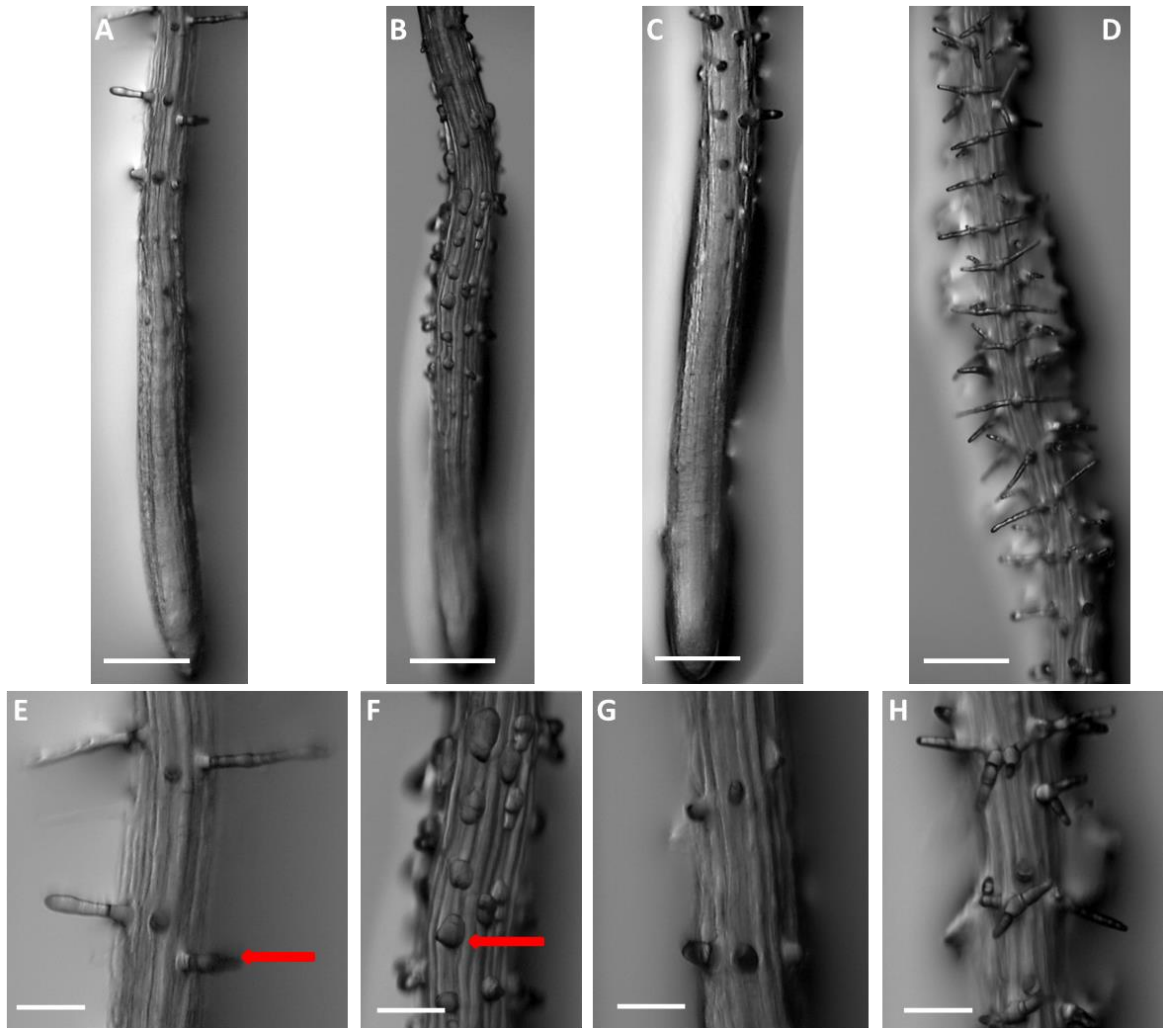
Obr. 50 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 7 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostly 3 dny na médiu s obsahem  $0,5 \mu\text{mol.l}^{-1}$  PQ. Šipky ukazují změny fenotypu kořenových vlásků. Měřítka  $500 \mu\text{m}$  (A, B, C, D) a  $100 \mu\text{m}$  (E, F, G, H).

### 5. 3. 2. 3. Chladový stres

Vývoj kořenového systému 5 denních rostlin, které byly přeložené do teploty 4°C na 2 dny byl silně redukován, primární kořen byl krátký a nedocházelo k tvorbě bočních kořenů (Obr. 51). Jednotlivé linie reagovaly při vývoji kořenových vlásků na chladový stres různě. Linie Col-0 vytvářela kořenové vlásky kratší než v kontrolních podmínkách (Obr. 52A, E), u linie *der1-3* docházelo k rozšiřování krátkých kořenových vlásků, které se i větvíly (Obr. 52B, F). U linií *rhd2-1* a *tip1-1* nebyla změna ve fenotypu kořenových vlásků zaznamenána (Obr. 52C, D, G, H).



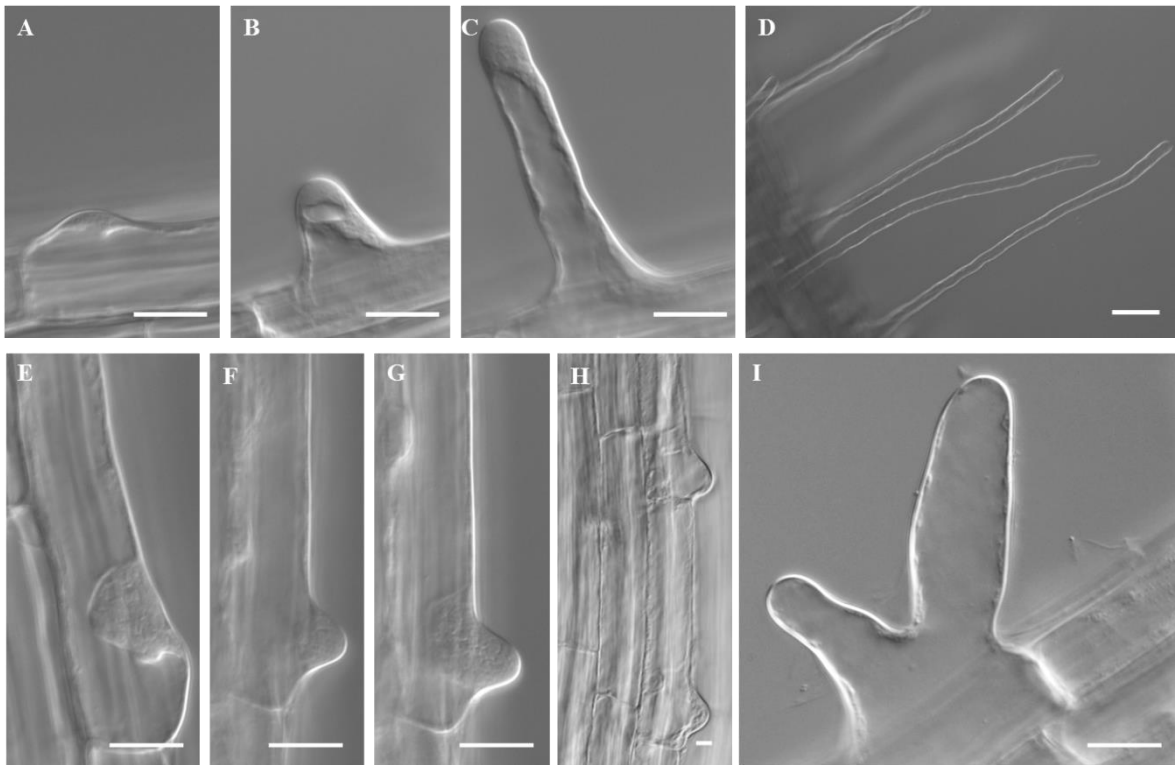
Obr. 51 Morfologie 5 denních rostlin linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1*, které rostly 2 dny na kontrolním médiu (A), a na kontrolním médiu při 4°C (B).



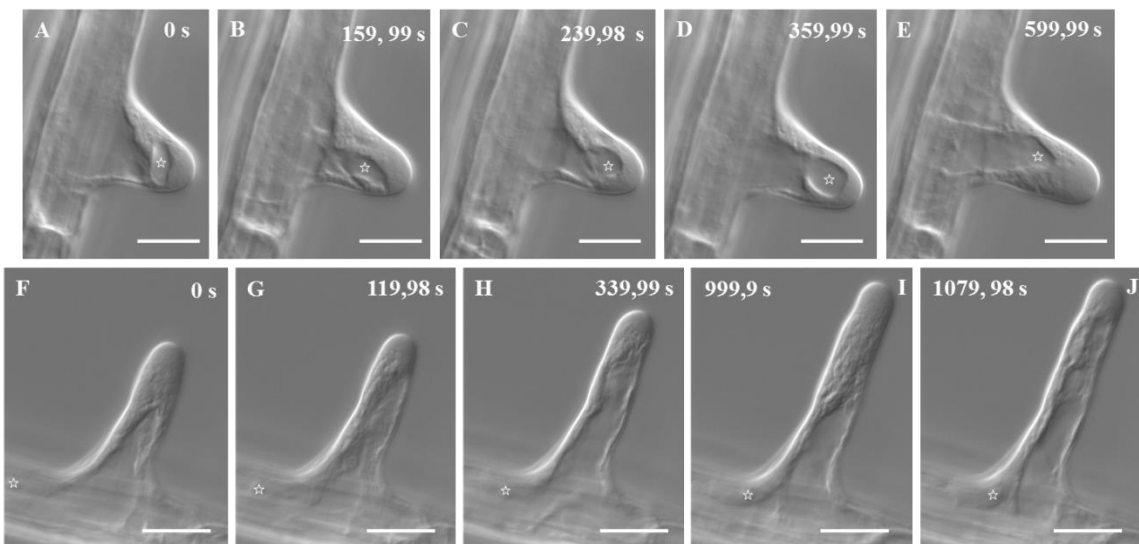
Obr. 52 Fenotyp kořene a kořenových vlásků 5 denních rostlin linií Col-0 (A, E), *der1-3* (B, F), *rhd2-1* (C, G) a *tip1-1* (D, H), které rostly 2 dny v podmínkách chladového stresu při 4°C. Šipky ukazují změny fenotypu kořenových vlásků. Měřítka 250  $\mu\text{m}$  (A, B, C, D) a 150  $\mu\text{m}$  (E, F, G, H).

#### 5. 4 Dynamika růstu kořenových vlásků a porovnání jednotlivých linií

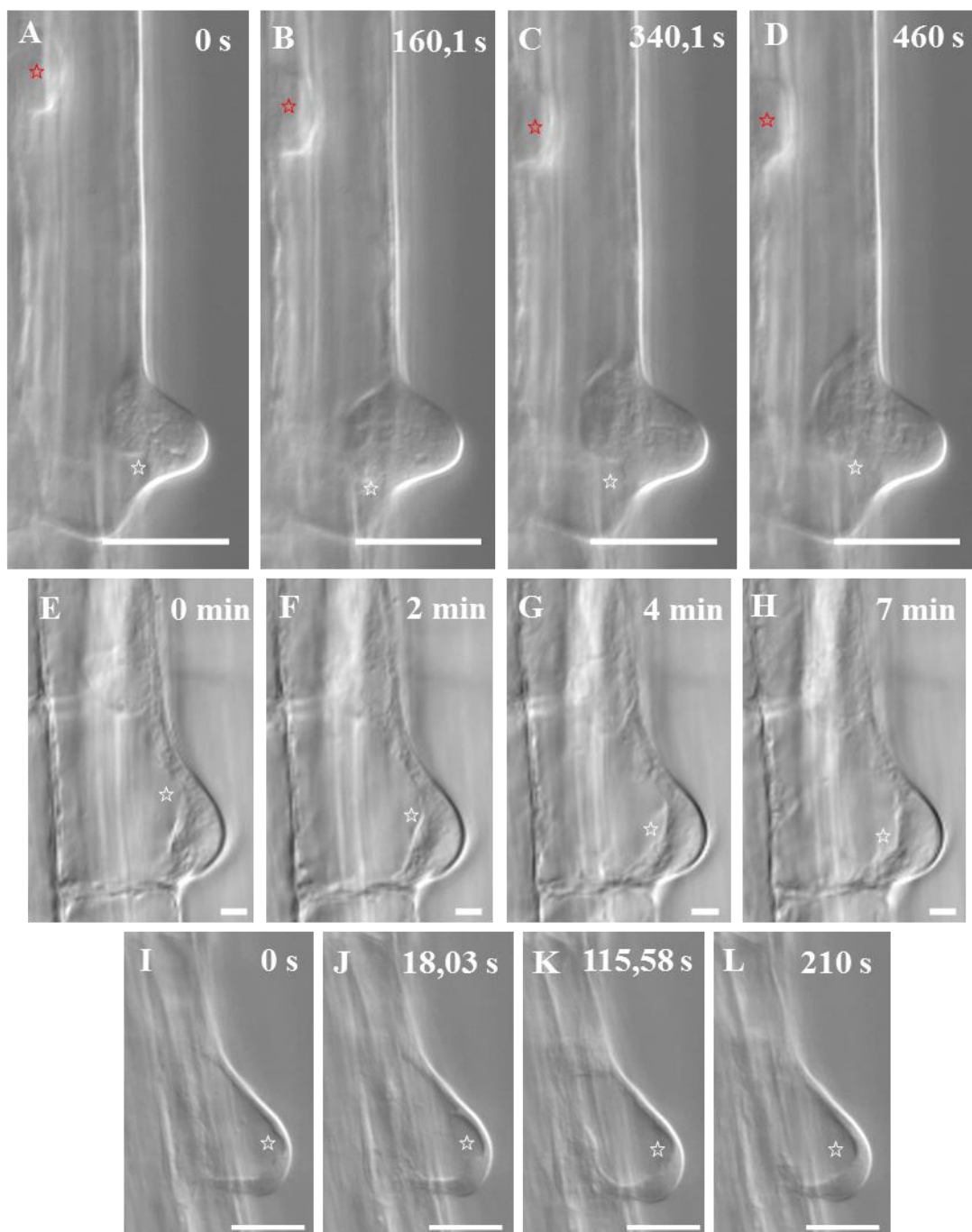
Tato část znázorňuje dynamiku kořenových vlásků všech použitých linií Col-0, *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* a to při kontrolních podmínkách a po aplikaci solného stresu. Rostliny, které měly 3 dny, byly šetrně přeneseny na podložní skla s přidáním tekutého kultivačního média, přikryté krycím sklem a stabilizovány 24 hodin v kyvetě ve fytotronu. Druhý den byly pozorovány v epifluorescenčním mikroskopu. Na obr. 53 vidíme kontrolní fenotypy všech zmíněných linií, kdy u Col-0 a *der1-3* jsou zachyceny i jednotlivá vývojová stádia kořenových vlásků. Obr. 54 ukazuje dynamiku vakuoly a pohyby jádra během růstu kořenových vlásků u linie Col-0 při kontrolních podmínkách. Vidíme, že vakuola ve špičce se velice dynamicky mění a jádro se během růstu pohybuje směrem do vlásku. Dynamika vakuoly ve špičkách vlásků linií *der1-3*, *rhd2-1* a *tip1-1* je zachycena na obr. 55, kdy u linie *der1-3* je zachyceno i jádro (Obr. 55A, B, C, D). U Col-0 byly změny o mnoho výraznější, protože linie *der1-3* a *rhd2-1* mají krátké vlásky a na obrázcích už jde vidět, že dále nerostou. Linie *tip1-1* bohužel při těchto experimentech nevykazovala svůj kontrolní fenotyp. Dynamika růstu kořenových vlásku byla zaznamenána i při solném stresu, kde vidíme, že se u *rhd2-1* se značně změnila a vlásky dorůstaly větších délek (Obr. 56G, H, I, J).



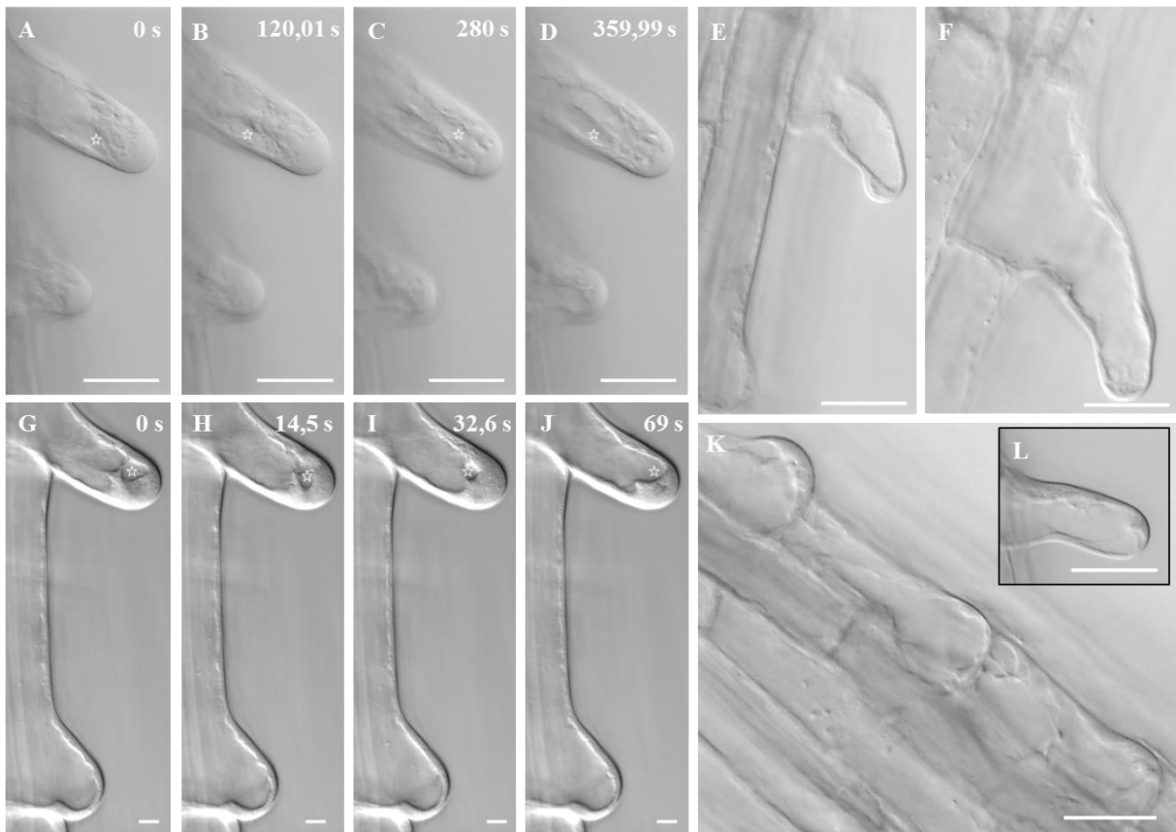
Obr. 53 Fenotypy kořenových vlásků při kontrolních podmínkách linií Col-0 (A, B, C, D), *der1-3* (E, F, G), *rhd2-1* (H) a *tip1-1* (I). Měřítka 50  $\mu\text{m}$  (D), 20  $\mu\text{m}$  (A, B, C, E, F, G, I) a 5  $\mu\text{m}$  (H).



Obr. 54 Dynamika růstu kořenových vlásků linie Col-0, pohyb vakuoly (A, B, C, D, E) a pohyb jádra (F, G, H, I, J). Hvězdičky znázorňují polohu vakuoly a jádra. Časový průběh pozorování je znázorněn v s. Měřítka 20  $\mu\text{m}$ .



Obr. 55 Dynamika vakuoly a jádra během růstu kořenových vlásků linií *der1-3* (A, B, C, D), *rhd2-1* (E, F, G, H) a *tip1-1* (I, J, K, L). Bílé hvězdičky znázorňují polohu vakuoly, červené hvězdičky polohu jádra. Časový průběh pozorování je znázorněn v s. Měřítka 20 μm (A, B, C, D, I, J, K, L) a 5 μm (E, F, G, H).



Obr. 56 Dynamika růstu kořenových vlásků po aplikaci  $100 \text{ mmol.l}^{-1}$  NaCl linií Col-0 (A, B, C, D), *der1-3* (E, F), *rhd2-1* (G, H, I, J) a *tip1-1* (K, L). Hvězdičky znázorňují změny v poloze vakuoly. Časový průběh pozorování je znázorněn v s. Měřítko  $20 \mu\text{m}$  (A, B, C, D, E, F, K, L) a  $5 \mu\text{m}$  (G, H, I, J).

## 6. DISKUZE

V této práci byla stanovena senzitivita vybraných mutantů kořenového vlášení *Arabidopsis* na abiotické stresy. K testům byly vybrány mutantní linie, u kterých bylo v dosavadní literatuře dostupných dostatek informací. Fenotyp mutantu *der1-3* (*deformed root hair1*) byl v našich experimentech potvrzen za kontrolních podmínek tak, jak byl v literatuře charakterizován. *DER1* lokus tvoří sekvenci v genu kódujícím *ACTIN2* (*ACT2*), což je nejdůležitější aktin ve vegetativních orgánech (Ringli a kol., 2002). Mutace *der1-3*, spolu s *der1-2*, představují silnější alelické mutace *ACTIN2* genu v porovnání s mutací *der1-1*. Kořenové vlásky jsou proto krátké a zastavují se v přechodu do fáze rychlého růstu a nemůžou se plně rozvinout (Ringli a kol., 2005). Délka kořenového systému mutantu *der1-3* je celkově redukována vůči Col-0 (divoký typ) a kořen roste mírně agravitropicky. Po aplikaci jednotlivých stresových faktorů se ukázalo, že při solném a osmotickém stresu mají semena *der1-3* problém v klíčení, ale při oxidativním stresu se vůči kontrolním podmínkám tento rozdíl neprojevil. Můžeme to vysvětlit tak, že u oxidativního stresu se produkuje více ROS, které všeobecně zaujímají důležitou roli při růstu buněk. Mimo jiné stimuluje transportní kanály v plazmatické membráně, které zabezpečují příjem  $Ca^{2+}$  do buněk (Takeda a kol., 2008), což je další nezbytný faktor v růstu buněk. Ale nadměrná koncentrace ROS je už pro buňky toxická a tím pádem po delším působení se rostliny nemohou normálně vyvíjet a zůstávají zakrnělé. Výsledky s aplikací tří různých koncentrací PQ při klíčení rostlin tuto tendenci potvrdily. U solného a osmotického stresu, které navzájem spolu souvisí, dochází k ovlivnění iontových transportérů a ATPasy, která pumpuje  $H^+$  ionty ven z buňky a udržuje tak elektrochemický potenciál buňky, aby se usnadnil příjem nutrientů (Serrano a kol., 1999; Xiong a Zhu, 2002). To vysvětluje, proč mají rostliny v těchto podmínkách problém s klíčením. Po delší době působení se pomocí speciální ATP-asy uložené v membráně vakuoly akumulují ionty, které jsou díky solnému stresu v buňce v nadměrném množství a vyrovnává se tak elektrochemický potenciál uvnitř buňky. Rostliny mají tudíž v omezené míře možnost dále růst, ale i tak jsou stále o mnoho menší než při kontrolních podmínkách (Gaxiola a kol., 2001). Prospívají ale lépe než po působení oxidativního stresu. U *der1-3* mutantů se fenotyp kořenových vlásek po aplikaci stresových faktorů skoro vůbec nezměnil, což může být vysvětlováno defekty v aktinovém cytoskeletu, který zabezpečuje mnoho dějů, jako je transport důležitých komponent a molekul pro specifické odpovědi na stresové podmínky. Docházelo jen k tomu, že vzdálenosti mezi kořenovými vlásky se zkrátily, což bylo způsobeno redukcí elongace



buněk, a při klíčení na solném stresu se v přechodu mezi hypokotylem a kořenem kořenové vlásky mírně rozšiřovali, což poukazuje na vyšší citlivost k nerovnováze iontů. Nebyly to ale rapidní změny. Změna ale nastala při vystavení mutanta chladovému stresu, kdy vlásky sice nerostly do delších rozměrů (což by naznačovalo možné zvrácení fenotypu), ale docházelo k jejich rozdvajování. Může to souviset s tím, že chladový stres snižuje fluiditu membrány a rostlina se proti tomu brání pomocí syntézy více nenasycených mastných kyselin, které jsou součástí membránových lipidů a zvyšují tak její fluiditu. Tyto mastné kyseliny se syntetizují v plastidech a následně se prodlužují v endoplazmatickém retikulu (Chen a Thelen, 2013). Mutant *der1-3* má problémy s organizací aktinového cytoskeletu, existuje tudíž možnost, že se nemůžou tyto produkty korektně transportovat do membrány a *der1-3* tím může být na tento stresový faktor citlivější. Ringli a kol. (2005) ovlivnili *der* mutanty hormony etylenem a auxinem a zjistili, že většina z nich nevykazovala žádnou specifickou odpověď při růstu kořenových vlásků (tedy i náš používaný *der1-3* mutant) a pouze dva z nich, *der8* a *der9* měli větší množství kořenových vlásků, které byly delší. Došlo tak k potlačení původního fenotypu.

Mutant *rhd2-1* má problém v  $\text{Ca}^{2+}$  gradientu, tudíž kořenové vlásky mutanta *rhd2-1* jsou krátké a zakrslé. U tohoto mutanta byl charakterizován problém s vytvářením gradientu  $\text{Ca}^{2+}$  ve vrcholu kořenových vlásků. Protože  $\text{Ca}^{2+}$  ionty jsou nezbytné pro vrcholový růst kořenových vlásků, u tohoto mutanta nejsou proto schopny prodlužování (Wymer a kol., 1997). *RHD2* (*root hair defective2*) kóduje protein z rodiny NADPH-oxidasy, přesně AtRBOH C (*Arabidopsis thaliana* respiratory burst oxidase homolog C), která přenáší elektrony z NADPH na akceptory, které jsou zodpovědné za tvorbu ROS. ROS regulují buněčné prodlužování, protože aktivují transportní kanály pro  $\text{Ca}^{2+}$  ionty, které ovlivňují aktinový cytoskelet, jeho dynamiku a další děje důležité pro růst buněk (Foreman a kol., 2003). NADPH-oxidasa je dále regulována malými Rop (Rho of plants) GTPasami (small guanosine triphosphatase) (Jones a kol., 2007). V růstu kořenových vlásků jsou důležité ROP2 GTPasy, které dále ovlivňují dynamiku aktinových mikrofilamentů (Jones a kol. 2002). Fenotyp kořenových vlásků tohoto mutanta, jak byl v literatuře charakterizován, se při kontrolních podmínkách v našich experimentech potvrdil (Schifelbein a Somerville, 1990). Rostliny *rhd2-1* mutanta, klíčící na oxidativním stresu, neměli problém a dokonce klíčily o něco rychleji než při kontrolních podmínkách, protože při oxidativním stresu se produkují ROS, kterých má tento mutant málo. Může se tak kompenzovat jejich nedostatek, tudíž může být růst tohoto mutanta při mírném

oxidativním stresu podporován. Fenotyp vlásků se při těchto podmínkách zásadně nezměnil. V určitých případech byly ale kořenové vlásky delší než v kontrolních podmínkách, což by podobně jako při klíčení pod vlivem oxidativního stresu, mohlo být vysvětlováno zvýšenou produkcí ROS (Carol a Dolan, 2006). Oxidativní stres může kompenzovat nízký obsah ROS u *rh2-1* mutanta a vlásky tak mohou v omezené míře růst, protože ROS jsou regulátory buněčného růstu. Při extrémní aplikaci H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> byly u rostlin generovány hydroxylové radikály (OH<sup>•</sup>) a ukázalo se, že se v „bulges“ kořenových vlásků *rh2-1* mutanta rychle zvýšila koncentrace Ca<sup>2+</sup> iontů (Foreman a kol., 2003). To může sloužit jako další důkaz pro lepší klíčení *rh2-1* mutanta na oxidativním stresu než při kontrolních podmínkách. Avšak delší působení hydroxylových radikálů je toxické, tudíž rostliny se nemohly dále vyvíjet a byly zakrslé, což naše výsledky u různých koncentrací PQ ukázaly. Klíčení na osmotickém a solném stresu bylo o hodně pomalejší než při kontrolních podmínkách, což nasvědčuje tomu, že při těchto podmínkách dochází ke změnám elektrochemického gradientu, který je udržován ATP-asou. To zásadním způsobem ovlivňuje transportéry iontů a příjem nutrientů (Serrano a kol., 1999; Xiong a Zhu, 2002). U *rh2-1* mutanta byla zaznamenána stejná sensitivita v klíčení při těchto dvou stresových podmínkách jako u Col-0 (divoký typ), což potvrdilo, že regulace příjmu a koncentrace hlavních iontů je důležitá. Fenotyp kořenových vlásků *rh2-1* mutanta na osmotickém a solném stresu se radikálně změnil. Kořenové vlásky byly delší a rozvětvené. Je známo, že vláskový fenotyp mutanta *rh2-1* je možné zvrátit zvýšením pH v médiu nad hodnotu 6 (Monshausen a kol., (2007). U osmotického a solného stresu dochází k nerovnováze H<sup>+</sup> iontů, což může vést ke zvýšení extracelulárního pH a vlásky mohou růst. Po delší době akumulace a ovlivnění iontových transportérů ale vlásky přestávají růst a větví se, protože dochází k větším výkyvům pH, ovlivňující následně i další procesy v buňce. Extracelulární pH a ROS a jejich oscilace během růstu kořenových vlásků spolu úzce souvisejí (Monshausen a kol., 2007). Při chladovém stresu byl fenotyp vlásků zachován, protože u tohoto mutanta nebyly zaznamenány defekty v aktinovém cytoskeletu, který zabezpečuje transport nově syntetizovaných nenasycených mastných kyselin pro zvýšení fluidity membrány, což je ochrana při chladových podmínkách (Chen a Thelen, 2013). Bates a Lynch (2000) aplikovali různé koncentrace fosforu a zjistili, že *rh2* se od Col-0 v délce kořene ani v množství fosforu, obsaženého v kořeni, neliší. Délka kořene i množství fosforu v kořenech se ze zvyšující koncentrací aplikovaného fosforu taktéž zvyšovala, a to jak u *rh2*, tak i u Col-0.

Mutant *tip1* (*tip growth defective1*) má defekt v aktivitě S-acyl transferasy, která je známá i jako palmitoyl transeferasa. S-acylace je reversibilní hydrofóbní modifikace proteinů, která ovlivňuje vztah proteinů s membránami, transdukci signálů a vezikulární transport uvnitř buňky (Hemsley a kol., 2005). Vlázky jsou kratší než u kontrolní rostliny (Col-0) a v oblasti báze se rozvětvují (Schieffelbein a kol., 1993). Tento fenotyp byl v našich experimentech potvrzen. Při oxidativním stresu linie *tip1* klíčila o něco rychleji než na kontrolních podmínkách, což ukazuje, že krátkodobé zvýšení ROS je pro rostliny neškodné, případně i prospěšné, protože jsou důležité pro růst buněk (Takeda a kol., 2008). Avšak delší působení ROS je pro buňky toxické, tudíž rostliny přestávaly růst, byly zakrslé. Naše výsledky to potvrdily u všech aplikovaných koncentrací PQ. Se zvyšující se koncentrací byly rostliny vždy menší. Fenotyp vlásků na oxidativním stresu nebyl změněn, jen při překlade kontrolních rostlin do stresových podmínek se kořenové vlázky občas nevětvily. To se ale objevovalo jen zřídka. Na osmotickém a solném stresu rostliny *tip1-1* klíčily pomaleji než při kontrolních podmínkách, ale rozdíl nebyl tak výrazný, jako při obdobné situaci u kontrolní linie Col-0. Aktivita S-acyl transferasy, která u mutantu chybí, ovlivňuje i přenos signálů (Hemsley a kol., 2005), tudíž při solném stresu může docházet u mutantu k pomalejší signalizaci při zvýšeném množství solných iontů nebo při nerovnováze  $H^+$  iontů. Působením solného stresu docházelo na bázi kořene k rozšiřování kořenových vlásků, které byly ale stále rozvětvené. V mladších částech kořene byly kořenové vlázky bez typického fenotypu, tedy nerozvětvené. To naznačuje, že v raných fázích růstu došlo k indukci změny ve fenotypu, jeho trvalá změna nastala až v pozdějších fázích. Mohlo to být způsobeno tím, že zvýšené množství solných iontů indukuje zvýšenou koncentraci  $Ca^{2+}$  iontů, které fungují také jako signální molekula (Miedema a kol., 2008). U osmotického stresu zůstaly kořenové vlázky rozvětvené, ale byly kratší než při kontrolních podmínkách, což naznačuje, že nerovnováha v  $H^+$  gradientu může efekt deficiencie TIP1 proteinu podporovat. Chladový stres neměl vliv na fenotyp kořenových vlásků linie *tip1*. Nedošlo tak pravděpodobně k žádnému poškození transportních procesů, které zajišťují dopravu nově syntetizovaných nenasycených mastných kyselin z endoplazmatického retikula a Golgiho aparátu do plasmatické membrány. Tyto mastné kyseliny se mohou podílet na ochraně před chladem a zvyšují tekutost membrány (Chen a Thelen, 2013). Hemsley a kol. (2005) aplikovali na kontrolní rostliny Col-0 a na mutanty *tip1-2* látku 2-bromopalmitát (analog palmitátu), což je inhibitor aktivity S-acyl transferasy. Ukázalo se, že u rostlin *tip1-2* nedošlo k žádným změnám, ale u Col-0 byl

indukován stejný fenotyp, jaký má linie *tip1-2*. Potvrdili tím, že TIP1 protein je S-acyl transferasa.

Výsledky předložené práce ukázaly, že linie *der1-3* byla nejvíce rezistentní u solného, osmotického a oxidativního stresu, protože se její fenotyp skoro nezměnil. Vykázala i nejmenší redukci v délce kořenů a v přírůstku délky kořenů za 24 hodin. U chladového stresu se *der1-3* ukázala jako nejcitlivější, protože jako u jediné linie z testovaných došlo ke změně fenotypu. Z důvodu změn ve funkčnosti aktinového cytoskeletu mohlo dojít k problémům v transportu nově syntetizovaných nenasycených mastných kyselin, které zvyšují fluiditu membrány a díky nim se rostlina přizpůsobuje chladovým podmínkám. Největší změny ve fenotypu byly zaznamenány u linie *rh2-1*, a to na solném a osmotickém stresu, kdy vlásky dorůstaly větších délek než při kontrolních podmínkách a často se i větvily. Délka kořenů této linie na solném stresu byla ze všech linií největší. Linie *tip1-1* na oxidativním stresu prospívala podobně jako linie *der1-3*, kde redukce délky kořenů byly porovnatelné s *der1-3*. Jako nejvíce rezistentní na solný a osmotický stres, a porovnatelná s kontrolní Col-0 linií, byla vyhodnocena linie *rh2-1*.

## 7. ZÁVĚR

V literárním přehledu byly shrnuty poznatky o modelovém druhu *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh a o jejím využití ve vědeckém výzkumu. Detailně byla popsána anatomie kořenu a kořenových vlásků, princip a dynamika během vrcholového růstu kořenových vlásků a byly charakterizovány geny, které se regulace tohoto procesu účastní. Následně se teoretická část zabývala vybranými mutanty *rhd2-1*, *der1-3* a *tip1-1*, kteří mají různým způsobem růst kořenových vlásků pozměněný. Detailně byl popsán i vliv vybraných abiotických faktorů a stresů na rostliny, se zřetelem na ty stresy, se kterými se pracovalo i v praktické části práce.

V experimentální části byla provedena fenotypová analýza mutantů *rhd2-1*, *der1-3* a *tip1-1* za kontrolních podmínek a při působení solného (100 mmol.l<sup>-1</sup> NaCl), osmotického (200 mmol.l<sup>-1</sup> sorbitol), chladového (4 °C) a oxidativního (0,1 μmol.l<sup>-1</sup>, 0,2 μmol.l<sup>-1</sup> a 0,5 μmol.l<sup>-1</sup> PQ) stresu. Bylo pozorováno a popsáno mnoho změn při aplikaci těchto abiotických stresů, a to klíčivost, délka kořene, přírůstek kořene, fenotyp vlásků, a následně i dynamika růstu kořenových vlásků. Tyto efekty byly porovnány s reakcí divokého typu, Col-0.

U solného a osmotického stresu nejlépe prospíval mutant *der1-3*, protože měl nejmenší změny ve fenotypu a měl nejmenší redukci délek kořenů vůči kontrolním podmínkám. Mutant *rhd2-1* projevoval nejvýraznější fenotypové změny kořenových vlásků, při kterých kořenové vlásky dorůstaly delších délek než při kontrolních podmínkách a větvlily se, což je charakteristické spíše pro mutanta *tip1-1*. Mutant *tip1-1* při solném stresu ztratil svůj fenotyp kořenových vlásků, které nebyly rozvětvené. Na osmotickém stresu docházelo k rozvětvení kořenových vlásků, jen dorůstali do kratších rozměrů. Nejrapidnější změny v délkách kořenů nastaly u všech mutantů i u kontrolní linie Col-0 při chladovém stresu. Fenotyp vlásků byl ale zachován, kromě linie *der1-3*, u které se kořenové vlásky abnormálně rozšiřovali. To ukazuje na možný defekt na aktinový cytoskelet, který je potřebný pro transport nově syntetizovaných nenasycených mastných kyselin, které jsou důležité pro adaptaci na tento stres. U oxidativního stresu byly délky kořenů všech testovaných linií taky hodně redukovány, ale fenotyp kořenových vlásků byl u všech linií většinou zachován. Abnormality se sporadicky vyskytovaly, ale nebyly časté. U rostlin, které při těchto stresových podmínkách klíčily, se vlásky většinou ani nevyvinuly, protože rostliny byly hodně zakrslé a se zvyšující se koncentrací stresových faktorů se rozměr rostlin zmenšoval.

Sledování dynamiky rostoucích kořenových vlásků dovoluje monitorovat, jak se v rostoucím vrcholu kořenových vlásků rychle mění množství a pozice endozomů a poloha vakuoly. V rostoucích kořenových vláscích linie Col-0 byla zachycena i poloha jádra, které se během růstu vlásků pohybuje a s rostoucím vrcholem vlásku udržuje určitou vzdálenost. V stresových podmínkách se ukázalo, že dynamika endozomů a vakuoly se rapidně nezměnila. Změny byly dokumentovány hlavně u mutanta *rhd2-1*, u kterého kořenové vlásky při solném stresu rostou, a dynamika procesů v kořenovém vlásku je tudíž dobře pozorovatelná.

## 8. SEZNAM LITERATURY

Atkinson N. J. a Urwin P. E. (2012), The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from gene to the field, *Journal of Experimental botany. Darwin review* **63**: 3521-3544

Baluška F., Mancuso S., Volkmann D. a Barlow P. W. (2010) Root apex transition zone: a signalling–response nexus in the root. *Trends in Plant Science* **15**: 402-408

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

Bates T. R. a Lynch J. P. (2000), Plant growth and phosphorus accumulation of wild type and two root hair mutant of *Arabidopsis thaliana* (Brassicaceae). *American Journal of Botany* **87**: 958-963

Beck Ch. B. (2010), An Introduction to Plant Structure and Development (Plant Anatomy for Twenty-First Century), Second Edition. *Cambridge University Press*, United Kingdom, 307-309

Bibikova T. N., Blancaflor E. B. a Gilroy S. (1999), Microtubules regulate tip growth and orientation in root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **17**: 657-665

Boerjan W., Den Boer B., a Van Montagu M. (1992), Molecular genetic approaches to plant development. *The International Journal of Developmental Biology* **36**: 59-66

Campanoni P. a Blatt M. R. (2007), Membrane trafficking and polar growth in root hairs and pollen tubes. *Journal of Experimental Botany* **58**: 65-74

Capone R., Tiwari B. S. a Levine A. (2004), Rapid transmission of oxidative and nitrosative stress signals from root to shoot in *Arabidopsis*. *Plant Physiology and Biochemistry* **4**: 425-428

Carol R. J. a Dolan L. (2002), Building a hair: tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs. *The Royal Society* **357**: 815-821

Carol R. J. a Dolan L. (2006), The role of reactive oxygen species in cell growth: lessons from root hairs. *Journal of Experimental Botany* **57**: 1829-1834

- Conde A., Chaves M. M. a Gerós H. (2011), Membrane transport, sensing and signaling in plant adaption to environmental stress. *Plant and Cell Physiology* **59**: 1583-1602
- Cushman J. C. a Bohnert H. J. (2000), Genomic approaches to plant stress tolerance. *Current Opinion in Plant Biology* **3**: 117-124
- Desbrosses G., Josefsson C., Rigas S., Hatzopoulos P. a Dolan L. (2003), *AKT1* and *TRH1* are required during root hair alengation in *Arabidopsis*. *Journal of Experimental Botany* **54**: 781-788
- Dinneny J. R., Long T. A., Wang J. Y., Jung J. W., Mace D., Pointer S., Barron Ch., Brady S. M., Schiefelbein J. a Benfey P. N. (2008), Cell identity mediates response of *Arabidopsis* root to abiotic stress. *Science* **230**: 942-945
- Dolan L., Duckett C. M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S. a Roberts K. (1994), Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of *Arabidopsis*. *Development* **120**: 2465-2474
- Easterling D. R., Meehl G. A., Parmesan C., Changnon S. A., Karl T. R. a Mearns L. O. (2000), Climate Extremes: Observations, Modeling, and Impacts. *Science* **28**: 2068-2074
- Evert Ray E. (2006), Esau's Plant Anatomy, Meristems, Cells and Tissues of the Plant Body: Their Structure, Function and Development – Third Edition. *John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey* 161-164
- Federspiel N. (2000), Desipherring a Weed. Genomic Sequencing of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **124**: 1456-1459
- Foreman J. a Dolan L. (2001), Root hairs as a model system of studying plant cell growth. *Annals of Botany* **88**: 1-7
- Foreman J., Demidchik V., Bothwell John H. F., Mylona P., Miedema H., Torres M. A., Linstead P., Costa S., Brownlee C., Jones Jonathan D. G., Davies J. M. a Dolan L. (2003), Reactive oxygen species produced by NADPH oxidase regulate plant cell growth. *Nature* **422**: 442-446



- Gaxiola R. A., Li J., Undurraga S., Dang L. M., Allen G. J., Alper S. L. a Fink G. R. (2001), Drought- and salt-tolerant plants results from overexpression of the AVP1 H<sup>+</sup>-pump. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **98**: 11444-11449
- Grierson C. a Schiefelbein J. (2002), Root hairs, *The Arabidopsis book*, **1**: e0060. doi: 10.1199/tab. 0060
- Grierson C. S., Parker J. S. a Kemp A. C. (2001), *Arabidopsis* genes with roles in root hair developmen. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science* **164**: 131-140
- Hemsley P. A., Kemp A. C. a Grierson C. S. (2005), The TIP GROWTH DEFECTIVE1 S-acyl transferase regulates plant cell growth in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **17**: 2554-2563
- Chen M. a Thelen J. J. (2013), *ACYL-LIPID DESATURASE2* Is Required for Chilling and Freezing Tolerance in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **25**: 1430-1444
- Jones M. A., Raymong M. J., Yang Z. a Nicholas S. (2007), NADPH oxidase-dependent reactive oxygen species formation required for root hair growth depends on ROP GTPase. *Journal of Experimental Botany* **58**: 1261-1270
- Jones M. A., Shen Jun-Jiang, Fu Y., Yang Z. a Grierson C. S. (2002), The Arabidopsis Rop2 GTPase Is a Positive Regulator of Both Root Hair Initiation and Tip Growth. *The Plant Cell* **14**: 763-776
- Ketelaar T., de Ruijter Norbert C. A. a Emons Anne Mie C. (2003), Unstable F-actin specifies the area and mikrotubule direction of cell expansion in *Arabidopsis* root hai. *The Plant Cell* **15**: 285-292
- Ketelaar T., Faivre-Moskalenko C., Esseling J. J., de Ruijter N. C. A., Grierson C. S., Dogterom M. a Emons M. C. (2002), Positioning of nuclei in *Arabidopsis* root hairs: An actin-regulated process of tip growth. *The Plant Cell* **14**: 2941-2955
- Lee Y., Bak G., Choi Y., Chuang Wen-I, Cho Hyung-Taeg a Lee Y. (2008), Roles of phosphatidylinositol-3-kinase in root hair growth. *Plant Physiology* **147**: 624-635
- Liu S. G., Zhu D. Z., Chen G. H., Gao Xin-Qi a Zhang X. S. (2012), Disrupted actin dynamics trigger an inkrement in the reactive oxygen species levels in the *Arabidopsis* root under salt stress. *Plant Cell Reports* **31**: 1219-1226

- Marthur J. a Hülskamp M. (2001), Cell growth: How to grow and where to grow. *Current Biology* **11**: R402-404
- Meyerowitz E. M. (2001), Prehistory of *Arabidopsis* research. *Plant Physiology* **125**: 15-19
- Miedema H., Demidchik V., Véry Anne-Aliénor, Bothwell J. H. F., Brownlee C. a Davies J. M. (2008), Two voltage-dependent calcium channels co-exist in the apical plasma membrane of *Arabidopsis thaliana* root hairs. *New Phytologist* **179**: 378-385
- Mittler R. a Blumwald E. (2010), Genetic engineering for modern agriculture: changes perspective. *Annual review of Plant Biology* **61**: 443-462
- Mittler R. (2006), Abiotic stress, the fieldenvironment and stress combination. *Trends in Plant Science* **11**: 15-19
- Monshausen G. B., Bibikova T. N., Messerli M. A., Shi C. a 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 U.S.A.* **104**: 20996-21001
- Montimer J. C., Laohavisit A., Miedema H. a Davies J. M. (2008), Voltage, reactive oxygen species and the influx of calcium. *Plant Signaling & Behavior* **3**: 698-699
- Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illeš P. a Lichtscheidl I. K. (2005), Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma* **226**: 39-54
- Parker J. S., Cavell A. C., Dolan L., Roberts K. a Grierson C. S. (2000), Genetic Interactions during root hair morfogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **12**: 1961-1974
- Pilet P. E. (1972), Root cap and root growth. *Planta* **106**: 169-171
- Porter J. R. a Semenov M. A. (2005), Crop responses to climatic variation. *Philosophical Transaction of the Royal Society B: Biological Sciences* **360**: 2021-2035
- Pruitt R. E. a Meyerowitz E. M. (1986), Characterization of genome of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Molecular Botany* **182**: 169-183
- Ringli Ch., Baumberger N., Diet A., Frey B. a Keller B. (2002), ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development of *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **129**: 1464-1472

- Ringli Ch., Baumverger N. a Keller B.(2005), The *Arabidopsis* root hair mutants *der2-der9* are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiology* **46**: 1046-1053
- Rost T. L. (2011), The organization of roots of dicotyledonous plants and the positions of control points. *Annals of Botany* **107**: 1213-1222
- Ryan E., Grierson C.S., Cavell A., Steer M. a Dolan L. (1998), *TIP1* is required for both tip growth and non-tip growth in *Arabidopsis*. *New Phytologist* **138**: 49-58
- Serrano R., Mulet, J. M., Rios G., Marguez J. A., De Larrinoa I. F., Leube M. P., Mendizabal I. M., Pascual-Ahuir A., Proft M., Ros. R. a Montesinos C. (1999), A glimpse of the mechanisms of ion homeostasis during salt stress. *Journal of Experimental Botany* **50**: 1023-1036.
- Scheres B., Benfey P. a Dolan L. (2002), Root development, *The Arabidopsis book* **1**: e0101. doi: 10.1199/tab.0101
- Schiefelbein J. W. a Somerville Ch. (1990), Genetic control of root hair development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **2**: 235-243
- Schiefelbein J., Galway M., Masucci J. a Ford S. (1993), Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology* **103**: 979-985
- Sieberer B. J., Ketelaar T., Esseling J. J. a Emons A. M. C. (2005), Microtubules guide root hair tip growth. *New Phytologist* **167**: 711-719
- Simoens C. R., Gielen J., Van Montagu M. a Inzé D. (1988), Characterization of highly repetitive sequences of *Arabidopsis thaliana*. *Nucleic Acid Research*, **16**: 6753-6766
- Sinha A. K., Jaggi M., Raghuram B. a Tuteja N. (2011), Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**: 196-203
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G. a Šamaj J. (2014), Crosstalk between secondary messengers, hormone and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **31**: (1), 2-11

- Smith S. a De Smet I. (2012), Root systém architecture: insights from *Arabidopsis* and central crops. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*. **367**: 1441-1452
- Šamaj J., Baluška F., Voigt B., Schlicht M., Volkmann D. a Menzel D. (2004), Endocytosis, Actin cytoskeleton, and signaling. *Plant Physiology* **135**: 1150-1161
- Šamaj J., Müller J., Beck M., Böhm N. a Menzel D. (2006), Vesicular trafficking, cytoskeleton and signalling in root hairs and pollen tubes. *Trends in Plant Science* **11**: 1360-1385
- Takeda S., Gapper C., Kaya H., Bell E., Kuchitsu K. a Dolan L. (2008), Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells. *Science* **319**: 1241-1244
- Takeda S. a Matsuoka M. (2008), Genetic approaches to crop improvement responding to enviromental and population chenges. *Nature review Genetics* **9**: 444-457
- The Arabidopsis Genome Initiative (2000), Analysis of the genome sequence of the flowering plant Arabidopsis thaliana. *Nature* **408**: 796-815
- Tsugeki R., Fedoroff N. V. (1999), Genetic ablation of root cap cells in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* **96**: 12941-12946
- Van Bruaene N., Joss G.a Van Oostveldt P. (2004), Reorganization and *in vivo* dynamics of microtubules during *Arabidopsis* root hair development. *Plant Physiology* **136**: 3905-3919
- Wang W. X., Vincur B. a Altman A. (2003), Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta* **218**: 1-14
- Wimalasekera R., Tebartz F. a Scherer G. F. E. (2011), Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant science* **181**: 593-603
- Wymer C. L., Bibikova T. N. a Gilroy S. (1997), Cytoplasmic free calcium distributions during the development of root hairs of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **12**: 427-439
- Xiong L. a Zhu Jian-Kang (2002), Salt stress. *The Arabidopsis book* **1**: e0048. doi:10.1199/tab.0048

## 9. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

<i>A. thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<b>ACT2,7,8</b>	aktin 2,7,8
<b>ADP</b>	adenindifosfát
<b>AP180</b>	adaptorový protein
<b>ARFs</b>	ADP-ribosylační faktory
<b>ATHK1</b>	ATH histidinkinasa
<b>ATP</b>	adenosintrifosfát
<b>ATRBOH C</b>	druh NADPH oxidasy
<b>AXR2</b>	„auxin resistant 2“
<b>BST1</b>	„bristled 1“
<b>Ca<sup>2+</sup></b>	vápenatý iont
<b>CDK</b>	„calcium dependent kinase“
<b>CEN1,3</b>	„centipede 1,3“
<b>CO<sub>2</sub></b>	oxid uhličitý
<b>Col-0</b>	Columbia-0
<b>COW1</b>	„can of worms 1“
<b>DAAC</b>	„depolarization-activated Ca <sup>2+</sup> channel“
<b>ETR1</b>	„ethylen receptor 1“
<b>GTP</b>	guanosintrifosfát
<b>H<sup>+</sup></b>	vodíkový iont
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	peroxid vodíku
<b>HAAC</b>	„hyperpolarization-activated Ca <sup>2+</sup> channel“
<b>K<sup>+</sup></b>	draslíkový iont
<b>KJK</b>	„kojak“
<b>MAPK</b>	mitogen-aktivované protein kinasy
<b>MAPKK</b>	MAP kinasy kinasy
<b>MAPKKK</b>	MAP kinasy kinasy kinasy
<b>MS-médium</b>	Murashige and Skoog médium
<b>Na<sup>2+</sup></b>	sodný iont
<b>NaCl</b>	chlorid sodný
<b>NADPH</b>	nikotinamidadenindinukleoridfosfát
<b>NSSC</b>	„nonselective cation channels“

<b>O<sub>2</sub></b>	kyslík
<b>Obr.</b>	obrázek
<b>OXI1</b>	„oxidative signal-inducible 1“
<b>PQ</b>	paraquat
<b>PtdIns(3)P</b>	fosfatidylinositol-3-fosfát
<b>RabA4b</b>	malá GTPasa
<b>RHD1,2,3,6</b>	„root hair defective 1,2,3,6“
<b>RHL</b>	„root hair less“
<b>Rop2</b>	malá GTPasa
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>SCN1</b>	„supercentipede 1“
<b>SHV1,2,3</b>	„shaven 1,2,3“
<b>SOS1</b>	„salinity overly sensitive 1“
<b>Tab.</b>	tabulka
<b>TGN</b>	trans-Golgiho sít'
<b>TIP1</b>	„tip growth defektive 1“
<b>TRH1</b>	„tiny root hair 1“