

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Vliv mikrogravitace na vývoj embryí rostlin

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Anita Zemanová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Rok:	2017

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

V Olomouci dne

.....

podpis bakaláře

Poděkování

Ráda bych poděkovala panu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za jeho odborné rady, cenné připomínky a pomoc při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat paní Mgr. Michaele Švécarové, Ph.D. za pomoc při práci v laboratoři.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Anita Zemanová
Název práce	Vliv mikrogravitace na vývoj embryí rostlin
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá vývojem embryí rostlin v podmínkách mikrogravitace. V teoretické části popisuje rostlinnou embryogenezi, její jednotlivá stádia, ukládání zásobních látek v semenech a také popis vybraných genů, které hrají roli v embryogenezi u rostlin. V další části je vysvětlen pojem mikrogravitace, jakým způsobem rostliny jsou schopny mikrogravitaci vnímat a jak může působit na jejich vývoj. Součástí této kapitoly je i popis možností, jak můžeme mikrogravitaci simulovat v laboratorních podmínkách. Úkolem experimentální části bylo studium morfologie a ukládání zásobních látek u šesulí *Arabidopsis thaliana* obsahujících nezralá semena s embryi. Tyto šesule byly inkubovány v podmínkách mikrogravitace na RPM přístroji a jejich morfologie byla porovnána se vzorky inkubovanými za normálních gravitačních podmínek. Mezi těmito dvěma vzorky nebyl pozorován žádný morfologický rozdíl. Dalším úkolem byla analýza genové exprese u genů *LEC1*, *LEC2* a *FUS3*. Exprese byla měřena u nezralých semen obsahujících embrya v poslední fázi embryogeneze a byla porovnána u semen inkubovaných v podmínkách mikrogravitace se semeny inkubovanými za normálních gravitačních podmínek. U všech tří genů došlo ke snížení relativní exprese v porovnání s kontrolními vzorky v závislosti na době inkubace v podmínkách mikrogravitace. Dle výsledků se dá usuzovat, že mikrogravitace má vliv na všechny vybrané geny.

Klíčová slova	Embryogeneze, stádia embryogeneze, zásobní látky v semenech, mikrogravitace, genová exprese
Počet stran	44
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Anita Zemanová
Title	Effect of microgravity on the development of plant embryos
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.
The year of presentation	2017

Abstract

The subject of this bachelor thesis is plant embryogenesis in microgravity. The theoretical part contains a description of plant embryogenesis, its stages, the process of storing energy in seeds and gives an overview different genes that affect plant embryogenesis. Additionally, it provides descriptions of microgravity, simulating microgravity in laboratory conditions and the way it is perceived by plants and the effect it has on their development. The experimental part consists of a study of energy deposit mechanisms in the siliques of *Arabidopsis thaliana*, which contain unripe seeds with embryos. These siliques were incubated in the conditions of microgravity, simulated in a RPM machine. Their morphology was compared to a control group of siliques at standard gravitational levels. There was no observable difference in the morphology of the two samples. The second test was an analysis of gene expression of the *LEC1*, *LEC2* and *FUS3* genes. Expression was measured in unripe seeds containing embryos in the last phase of embryogenesis and was compared between the experimental and the control group. The results showed that incubation in microgravity had an inhibitory effect on the expression of all three observed genes.

Keywords	Embryogenesis, stage of embryogenesis, seed storage, microgravity, expression of genes
Number of pages	44
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	8
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1	Rostlinná embryogeneze	9
2.1.1	Opylení a dvojitá oplození	9
2.1.2	Stádia embryogeneze	11
2.1.3	Zásobní látky v semenech	12
2.1.4	Genová regulace embryogeneze	13
2.2	Mikrogravitace	15
2.2.1	Simulace podmínek mikrogravitace	16
2.2.2	Vliv mikrogravitace na živočichy	18
2.2.3	Vliv mikrogravitace na rostliny	19
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Materiál a metody	23
3.1.1	Použité chemikálie	23
3.1.2	Použité roztoky a média	24
3.1.3	Použité kity	25
3.1.4	Použité přístroje a pomůcky	25
3.1.5	Rostlinný materiál	26
3.1.6	Metody	27
3.1.6.1	Příprava mikroskopických preparátů	27
3.1.6.2	Izolace DNA	28
3.1.6.3	Izolace RNA	28
3.1.6.4	Ošetření RNA DNAsou	29
3.1.6.5	Reverzní transkripce	29
3.1.6.6	PCR reakce	29
3.1.6.7	Real-time PCR	31
3.1.6.8	Gelová elektroforéza	31
4	VÝSLEDKY	32
4.1	Studium morfologie a ukládání zásobních látek	32
4.2	Analýza genové exprese	34
5	DISKUZE	37
6	ZÁVĚR	39
7	LITERATURA	40
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	44

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

1. Vypracování rešerše na téma bakalářské práce
2. Shromáždění dostupných literárních zdrojů

Praktická část:

1. Kultivace rostlinných embryí in vitro a v podmínkách mikrogravitace (RPM přístroj)
2. Morfologická pozorování vývojových stadií během embryogeneze
3. Izolace RNA, přepis do cDNA, analýza exprese vybraných genů

1 ÚVOD

Rostlinná embryogeneze popisuje počáteční fáze vývoje všech rostlin. Na začátku dochází po splnutí samčí a samičí gamety k vytvoření jednobuněčné zygoty, ze které se následně vyvíjí mnohobuněčné embryo. Embryo během embryogeneze prochází určitými stádii vývoje. V první fázi embryogeneze dochází k dělení zygoty a vytvoření základní osy těla. První dělení zygoty u většiny krytosemenných rostlin je asymetrické. Vzniká tak jedna buňka apikální, ze které dalším dělením vzniká embryo, a jedna buňka bazální, která dalším dělením dává vznik suspenzoru, který přivádí živiny k vyvíjejícímu se embryu. Embryo se postupným dělením dostává do srdčitého stádia, na které navazuje stádium torpédovité. Následně dochází k jeho zrání, které je provázeno akumulací zásobních látek, které se u embryí ukládají převážně v děložních listech. Akumulace zásobních látek je důležitá k přežití semen a jejich toleranci k dehydrataci. V poslední fázi dochází k zakončení vývoje dehydratací semene a ukončení jeho metabolické aktivity. Embryogeneze končí obdobím dormance.

V důsledku trvalé přítomnosti hraje gravitace na Zemi důležitou roli v rozvoji života. Během evoluce byly u organismů vyvinuty mechanismy, které přenáší gravitační síly do biochemických signálů. Život se vyvinul z vody, kde je vnímání gravitace odlišné, proto došlo při přechodu na souš k vývoji adaptativních buněk a orgánů. Rostliny jsou schopny reagovat na změnu gravitační síly pomocí specializovaných buněk nacházejících se v kořenové čepičce. Tyto buňky obsahují škrobová zrna, jejichž sedimentací dochází k vnímání směru gravitace. Díky tomu kořeny rostlin jsou schopny růst směrem k vektoru gravitace a využívat tak vodu a živiny v půdě. Tomuto jevu se říká gravitropismus. Změna nebo ztráta působení gravitační síly je považována u rostlin za stresový faktor. Studium působení mikrogravitace na rostliny se zabývají kosmické agentury za účelem porozumění vlivu mikrogravitace na jejich vývoj. Díky tomu by mohly být rostliny využity během dlouhodobých letů do vesmíru jako zdroj kyslíku a potravy pro astronauty. Vliv mikrogravitace lze studovat i na Zemi pomocí speciálních přístrojů, které neutralizují účinky gravitace a simulují tak skutečnou mikrogravitaci ve vesmíru.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Rostlinná embryogeneze

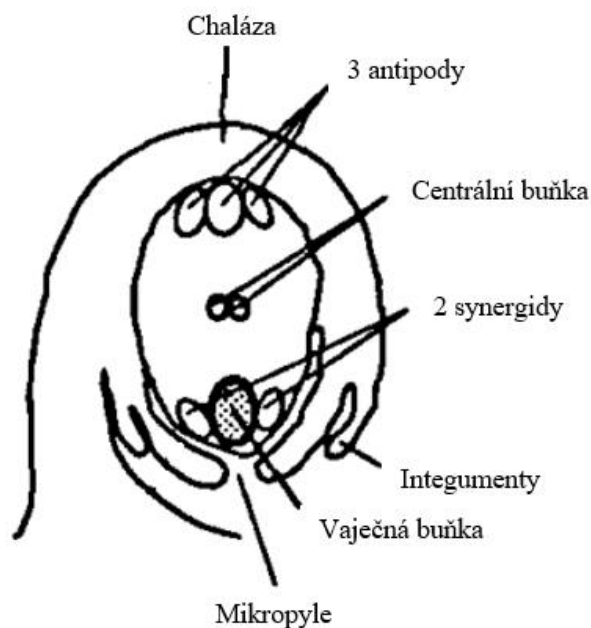
Kvetoucí rostliny jako všechny ostatní mnohobuněčné organismy začínají svůj vývoj z jedné oplodněné buňky – zygoty, která vzniká splynutím samčí a samičí gamety, které jsou uloženy v samčím a samičím gametofytu. Zygotou začíná embryogeneze a po jejím rozdělení se začíná vyvíjet mnohobuněčné embryo. Během vývoje embrya je vytvořen plán rostlinného těla a jeho osy. Nejprve je vytvořena apikální-bazální osa, následuje vytvoření osy radiální a nakonec je vytvořena bilaterální symetrie (De Smet *et al.*, 2010).

U nahosemenných rostlin embryo vzniká z jednoho oplození, vzniká tak diploidní embryo, které se následně vyvíjí v haploidním samičím gametofytu. Naproti tomu embrya krytosemenných rostlin vznikají během procesu dvojího oplození (Cairney a Pullman, 2007).

Embryo se skládá z apikálního kořenového meristému (radikuly), apikálního stonkového meristému (plumuly) a z jedné nebo více děloh, které jsou připojeny k hypokotylu (Bewley a Black, 1994).

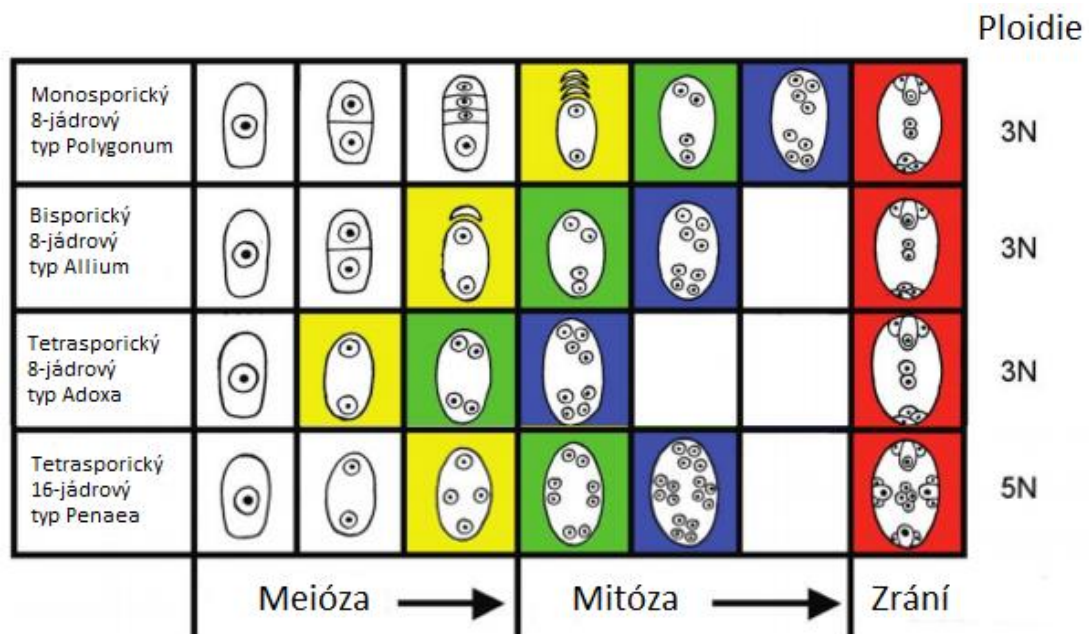
2.1.1 Opylení a dvojí oplození

K oplození dochází při splynutí samčího a samičího gametofytu. Samčí gametofyt se skládá ze tří buněk dvojího typu, jedné vegetativní a dvou malých spermatických, které vznikají mitotickým rozdělením generativní buňky (Borg *et al.*, 2009). Samičí gametofyt



Obr. 1 Struktura vajíčka (převzato a upraveno dle West a Harada, 1993)

(typ *Polygonum*) je naproti tomu tvořen sedmi buňkami (Obr. 1) – jednou vaječnou buňkou a dvěma synergidami na mikropylárním pólu, jednou diploidní centrální buňkou a třemi antipody na chalazálním pólu (Sprunck a Groß-Hardt, 2011). U krytosemenných rostlin se nejprve z buňky nazývané nucellus stane megasporocyt, který meiotickým dělením dává vznik čtyřem haploidním megasporám. U většiny rostlin přežívá jedna megaspora, zatímco ostatní podléhají programované buněčné smrti. Přeživající megaspora následně dává vznik zárodečnému vaku mitotickými děleními (Ma a Sundaresan, 2010). Existuje více variant zárodečného vaku podle počtu buněk a jejich organizace. U krytosemenných rostlin mohou být zárodečné vaky monosporického, bisporického nebo tetrasporického původu. Počet synergid v dospělém gametofytu se pohybuje od nuly do tří. Naproti tomu počet antipod je vysoce variabilní a jejich počet může být nula nebo více. Fylogeneticky nejrozšířenějším typem monosporického zárodečného vaku je *Polygonum*. U tohoto typu monosporního triploidního endospermy vznikají po oplodnění centrální buňky obsahující dvě polární jádra, která jsou geneticky identická mezi sebou a jádrem vajíčka. U bisporického zárodečného vaku jsou dvě haploidní jádra centrální buňky odvozena od dvou megaspor z meiózy II. Tetrasporický typ může tvořit endosperm s různou polypoidií. Tetrasporický triploidní endosperm obsahuje centrální buňku se dvěma polárními jádry, které jsou liniovými potomky každé dyády z meiózy I. Tetrasporický pentaploidní endosperm pochází ze čtyř megaspor



Obr. 2 Vznik jednotlivých typů samičích gametofytů. Žlutá barva označuje jednobuněčný stav, zelená barva dvoubuněčný stav, modrá barva čtyřbuněčný stav, červená barva zralý zárodečný vak. Mikropylární pól je zobrazen nahoře (převzato a upraveno dle Friedman *et al.*, 2008)

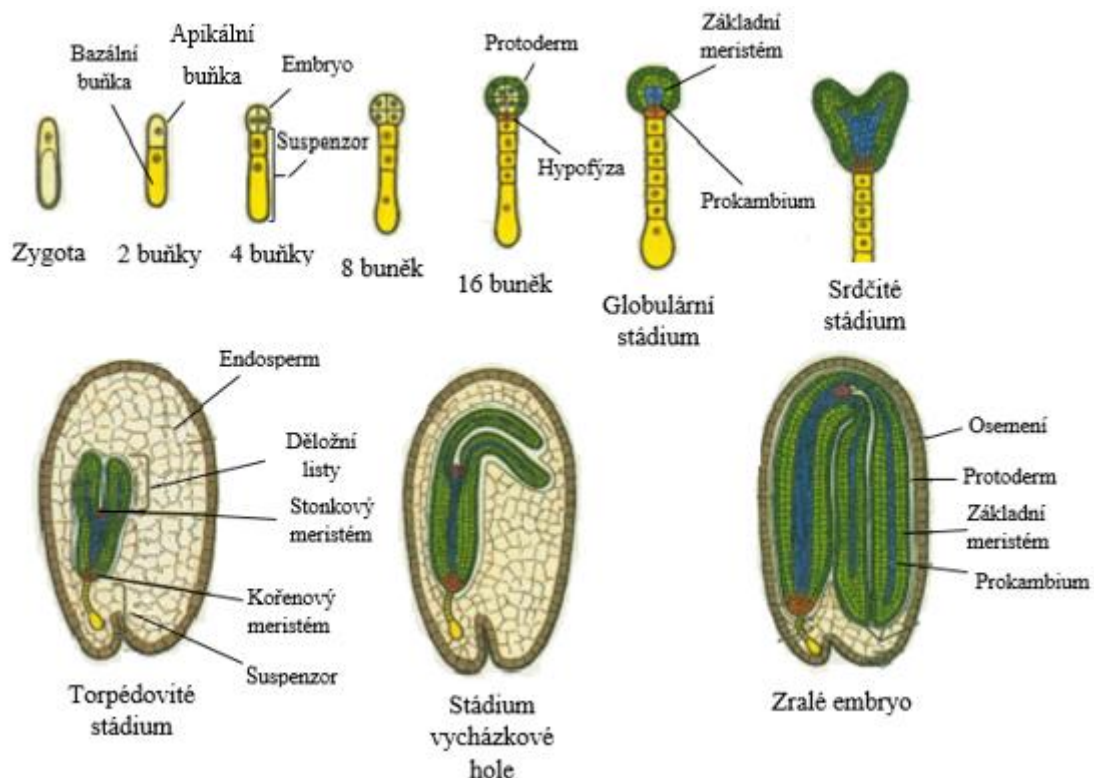
(Friedman *et al.*, 2008). Na Obr. 2 jsou uvedeny příklady vzniku jednotlivých typů samičích gametofytů u krytosemenných rostlin.

Dvojitá oplození u krytosemenných rostlin je unikátní a složitý proces zahrnující několik kroků. Prvním krokem je opylení, které zahrnuje přenesení samčího gametofytu neboli pylového zrna z prašníku na povrch pestíku. Pylové zrno začne klíčit, tvoří se pylová láčka, ve které obvykle probíhá dělení za tvorby dvou spermatických buněk. Pylová láčka potom prorůstá do vajíčka, které obsahuje zárodečný vak, v místě zvaném mikropyle. První spermatická buňka splývá s vaječnou buňkou za tvorby zygoty a tím začíná embryogeneze, zatímco druhá spermatická buňka splývá s centrální buňkou za vzniku triploidního endospermu, který má za úkol vyživovat embryo. Později je většinou endosperm absorbován rostoucím embryem, kromě vnější vrstvy, která se zachovává i v průběhu dehydratace (Berleth, 1998; Dumas a Rogowsky, 2008).

2.1.2 Stádia embryogeneze

Rostlinnou embryogenezi lze rozdělit do tří fází. V první fázi se vytváří polární osa, základy stonkového a kořenového vrcholu a embryonální tkáň. Ve druhé fázi dochází ke zrání embrya a akumulaci zásobních látek. V poslední fázi dochází k dehydrataci semene a zakončení vývoje (West a Harada, 1993). Důležitou roli zde hraje kyselina abscisová, která reguluje mnoho fází vývoje rostlin včetně zrání embryí a dormance semen (Finkelstein, 2013).

U většiny krytosemenných rostlin je první dělení zygoty asymetrické. Vzniká menší apikální a větší bazální buňka. Z apikální buňky se dalším dělením vytváří embryo a z bazální buňky transversálním dělením suspensor. Suspensor je tvořen sedmi až deseti buňkami, slouží k ukotvení embrya a také přivádí živiny k vyvíjejícímu se embryu. Apikální buňka se nejdříve dvakrát podélně rozdělí, vzniká tak embryo tvořené čtyřmi buňkami. Dalším transversálním dělením vzniká stádium zvané oktant, jeho dalším dělením vzniká embryo, které je tvořené šestnácti buňkami. V této fázi se začíná diferencovat protoderm a z horních buněk suspensoru se formuje hypofýza, která později dává vznik klidovému centru a kořenové čepičce. Dalším stádiem je globulární stádium. Během této fáze dochází k radiálnímu uspořádání protodermu, základního meristému a prokambia. Dále embryo postupně získává trojúhelníkový tvar v důsledku zvýšené proliferace dvou protilehlých konců na apikální straně. Následuje srdčité stádium, které se vyznačuje tím, že na apikálním konci se specifikuji dělohy, prodlužuje se hypokotyl a embryo je bilaterálně symetrické. Ve stádiu torpéda dochází k ukládání lipidů



Obr. 3 Stádia vývoje embrya (převzato a upraveno dle Goldberg *et al.*, 1994)

a proteinů. Embryo se postupně zvětšuje a endosperm je absorbován až na vnější vrstvu. Embryogeneze končí obdobím dormance, kdy zralé embryo dosáhne maximální velikosti, buňky embrya se vysušují a je ukončena metabolická aktivita. (Goldberg *et al.*, 1994; Berleth, 1998; Jeong *et al.*, 2016). Jednotlivá stádia jsou zobrazena na Obr. 3.

2.1.3 Zásobní látky v semenech

Závěrečná fáze embryogeneze je spojena s tvorbou semen, která umožňují rostlinám překonat podmínky jako vysoké a nízké teploty, zmrazení nebo dehydratace. Životnost semen je ovlivněna mnoha aspekty včetně obsahu zásobních látek (Sano *et al.*, 2015). Zásobní materiál v semenech je uložen hlavně v děložních listech embrya a v endospermu, ale jeho obsah se liší u jednotlivých rostlinných druhů. Například u obilovin jsou škrob a proteiny akumulovány převážně v endospermu a lipidy jsou ukládány v embryu. Endosperm u rostlin z čeledi bobovitých je zase zdrojem sacharidů a děložní listy obsahují lipidy a proteiny (Bewley *et al.*, 2013).

Hlavním zásobním polysacharidem je škrob, který je uložen v amyloplastech, je tvořen přímými řetězci amylosy s větveným amylopektinem (Bewley *et al.*, 2013). Slouží jako zdroj uhlíku, energie k růstu a podněcuje klíčení po období dormance. Je

syntetizován ze sacharosy v cytosolu. (Smith, 2012). Dále se v endospermu semen mohou vyskytovat i další polysacharidy jako glukán, arabinoxylan, celulóza a hemicelulózy. Lipidy jsou v semenech akumulovány ve formě triacylglycerolů, což jsou estery glycerolu a mastných kyselin. Pro jejich syntézu je využívána sacharosa jako zdroj uhlíku (Bewley *et al.*, 2013). Proteiny obsažené v semenech plní kromě funkce zásobní i další funkce. Účastní se různých buněčných procesů, jako je replikace DNA, transkripce, translace a jiných buněčných mechanismů (Rajjou *et al.*, 2004). Zásobní proteiny v semenech jsou oligomerní, skládají se tedy z více polypeptidových řetězců. Celkové množství proteinů obsažených v semenech se odvíjí od rostlinného druhu. Syntéza proteinů zahrnuje transkripci příslušného genu, jeho následnou translaci, posttranslační modifikaci v lumen endoplasmatického retikula a ve vakuole se zásobními proteiny (PSV – protein storage vacuole) je následně uskladněn (Bewley a Black, 1994; Bewley *et al.*, 2013).

Na začátku embryonálního vývoje je hmotnost semen malá, taková semena obsahují nízké procento obsahu lipidů, ale dochází u nich k akumulaci škrobu. Jeho obsah klesá během zrání semene. Později během zrání dochází k nárůstu hmotnosti, také proteiny a lipidy jsou skladovány ve větším množství. Na konci zrání a během dehydratace zůstává suchá hmotnost semen konstantní, dochází pouze ke ztrátě vody (Baud *et al.*, 2002). Akumulace zásobních látek je důležitá pro přežití semen, přispívá ke správnému rozvoji a toleranci k dehydrataci. Také obsažené zásobní látky v semenech jsou důležité pro zemědělské účely a mohou být využitelné jako potraviny nebo biopaliva (Angeles-Núñez a Tiessen, 2011).

2.1.4 Genová regulace embryogeneze

Rostlinná embryogeneze je regulována mnoha geny. Mezi ně patří i geny skupiny *LEAFY COTYLEDON* – *LEC1*, *LEC2* a *FUS3*, které jsou součástí praktické části bakalářské práce a budou v této kapitole blíže popsány. Tyto geny jsou hlavními regulátory rostlinné embryogeneze koordinující fázi morfogeneze a fázi zrání. Během fáze morfogeneze ovlivňují vývoj suspenzoru a děložních listů, během fáze zrání regulují dehydrataci semene a skladování zásobních látek. Fenotypové analýzy ukazují, že hrají významnou roli v kontrole embryogeneze a jejich mutanti vykazují podobný mutantní fenotyp. I přes velkou podobnost těchto genů existují rozdíly, které ukazují jejich odlišné role během embryonálního vývoje. Původně tyto geny byly identifikované jako mutace se ztrátou

funkce, které měly za následek defekty morfologie embrya a ovlivnily zrání semen (Harada, 2001).

LEAFY COTYLEDON 1 (LEC1) je důležitým regulátorem rostlinné embryogeneze. Je schopný ektopické exprese a indukovat tak somatickou embryogenezi u vegetativních buněk. V počátečních fázích embryogeneze ovlivňuje vývoj suspensoru a děložních listů. Později se zapojuje do fáze zrání při dehydrataci semene a akumulaci zásobních látek. Také zabraňuje u nezralých semen předčasnému klíčení. *LEC1* kóduje podjednotku HAP3 transkripčního faktoru, která se váže na CCAAT vazebný faktor (Kwong *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2003). Mutanti *lec1* mají vady morfologie suspensoru a dochází u nich ke sníženému ukládání lipidů a proteinů. Také tvoří trichomy na adaxiální straně děložních listů. Mutace jsou více závažné než u *LEC2* (Angeles-Núñez a Tiessen, 2011).

LEAFY COTYLEDON 2 (LEC2) hraje důležitou roli v zygotické a somatické embryogenezi. Je schopný přímo spouštět expresi jiných genů specifických pro zrání semen a také kontroluje metabolismus proteinů a lipidů během zrání embrya. Kóduje protein zahrnující B3 doménu, která je charakteristická pro transkripční faktory rostlin. Ztráta funkce *LEC2* vede ke tvorbě děložních listů s trichomy na adaxiální straně, dochází k defektům v morfologii suspensoru během raného embryonálního vývoje a ke tvorbě semen intolerantních k dehydrataci. Je exprimován mezi 4. a 14. dnem po opylení. Jeho nadměrná exprese vyvolává spontánní tvorbu somatických embryí (Wójcikowska *et al.*, 2013).

FUSCA 3 (FUS3) je dalším významným regulátorem rostlinné embryogeneze. Je nejvíce exprimován během střední části embryogeneze převážně v protodermu (Tsuchiya *et al.*, 2004). Stejně jako *LEC2* kóduje proteiny s B3 doménou. Váže se přímo na RY motiv v DNA a aktivuje tak transkripci specifických genů zrání, které obsahují RY motiv. Mutanti *fus3* mají semena netolerantní k dehydrataci a se sníženou akumulací zásobních látek, hlavně proteinů a lipidů. Na druhou stranu nadměrně produkují antokyany a tvoří trichomy na děložních listech. Mutanti *fus3* také způsobují defekty v expresi mnoha jiných genů, které jsou normálně exprimovány během fáze zrání (Reidt *et al.*, 2000; Harada, 2001).

LEC1 a *LEC2* geny jsou tedy schopné indukovat při ektopické expresi somatickou embryogenezi, která je velmi podobná zygotické embryogenezi a může tak poskytovat modelový systém pro studium mechanismů vývoje vedoucího od zygoty ke zralému embryu. Somatickou embryogenezi lze spustit *in vitro* pomocí různých chemických a fyzikálních stimulů, které vyvolají přechod ze somatických do embryogenních buněk.

Je to složitý proces, při kterém dochází k dediferenciaci buněk a ke změnám v expresi specifických genů (Gaj *et al.*, 2005). Rostliny *Arabidopsis thaliana* - wild type, mutanti (*lec1-1*, *lec2-1*, *fus3-3*), dvojité mutanti (*lec1-1 lec2-1*; *lec1-1 fus3-3*; *lec2-1 fus3-3*) a trojitý mutant (*fus3-3 lec1-2 lec2-1*) byli použiti ke studiu somatické embryogeneze, kterou se zabývali Gaj *et al.* (2005). Jako zdroj explantátů k vyvolání somatické embryogeneze sloužila nezralá a zralá zygotická embrya. U embryí wild type rostlin byla schopnost tvořit somatická embrya z kalusu 65-94 %. Mutanti *lec1-1*, *lec2-1* a *fus3-3* vytvořili somatická embrya pouze v 0,9-3,9 % případů a u dvojitých a trojitých mutantů byla pozorována pouze tvorba kalusu.

Expresí genů *LEAFY COTYLEDON* se také zabývali Kraut *et al.* (2011). Nezralá embrya *Arabidopsis thaliana* byla izolována ze šesulí a umístěna do tekutého média, které indukuje kalus (callus-inducing medium, CIM). Po sedmi dnech byla embrya umístěna na médium indukující růst stonkových výhonků (shoot-inducing medium, SIM). U genů *LEC1* a *FUS3* docházelo k postupnému snížení exprese při kultivaci v CIM, exprese *LEC2* se zvýšila den po umístění do CIM a zůstala vysoká během celé kultivace. Expese všech genů výrazně klesla při přesunu na SIM. *LEC* geny jsou tedy exprimovány během embryogeneze a při organogenezi jejich exprese rychle klesá.

2.2 Mikrogravitace

Gravitace je jednou ze čtyř základních fundamentálních sil spolu se silou elektromagnetickou, silnou a slabou. Je to vektor, to znamená síla, která má směr i velikost a její směr směřuje do středu Země, kde je její velikost rovna 1 G, což odpovídá zrychlení $9,8 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$. Gravitace je konstantní během celé historie Země, z tohoto důvodu zde hraje důležitou roli v rozvoji života a její změny by mohly změnit život tak, jak ho známe. Gravitační zákon říká, že gravitační síla je přítomná mezi každými dvěma tělesy a přímo úměrná součinu jejich hmotností a nepřímo úměrná druhé mocnině vzdálenosti mezi nimi. Klíčovou událostí evoluce byl vývoj mechanismů, které přenáší gravitační síly do biologických signálů. Život se vyvinul z moře, kde je jiné vnímání gravitace, a proto se při přechodu na souš vyvinuly adaptivní buňky a orgány, které přímo reagují na gravitační sílu. Patří sem například otolity ve vnitřním uchu člověka nebo statocyty u rostlin. Změnou gravitace například pomocí letů do vesmíru je možné tyto biologické systémy prozkoumat a lépe tak pochopit jak gravitace na organismy působí (Morey-Holton, 2003; Najrana a Sanchez-Esteban, 2016).

Termínem mikrogravitace se označuje gravitační síla, která se blíží nulové gravitaci a vyžaduje značnou vzdálenost těles. Pojmenování „stav beztlíže“ nebo „nulová gravitace“ se často používají jako synonyma ke slovu mikrogravitace, ale tyto termíny nejsou vždy použity správně, protože takové úrovně gravitace nelze dosáhnout na více než pár sekund u vesmírných dopravních prostředků (Morey-Holton, 2003; Herranz et al., 2013).

Opakem mikrogravitace je hypergravitace (gravitační síla vyšší než 1 G), které jsou astronauti vystaveni během startu raketoplánu a jeho návratu na Zem, nebo piloti různých automobilových a motocyklových závodů. Hypergravitaci lze simulovat pomocí centrifug. Hypergravitace může u astronautů způsobovat různé kardiovaskulární poruchy, jako je třeba změna funkce buněk cévního endotelu. V buňkách dochází ke změně genové exprese a ke změnám v morfologii cytoskeletu (Monici *et al.*, 2006; Maier *et al.*, 2015). Schopnost organismu vyvíjet se za podmínek zvýšené gravitace se vztahuje k jeho velikosti. Jednotlivé buňky a hlístice jsou schopny přežít krátké působení gravitační síly o velikosti 105 G, mladé rostliny dokáží přežít 30-40 G po dobu 10 minut bez znatelných strukturálních změn, ale krysy jsou schopny vydržet 15 G po dobu 10 minut, přičemž 20 G je už pro ně smrtelné (Morey-Holton, 2003).

2.2.1 Simulace podmínek mikrogravitace

Aby bylo možné studovat gravitační vliv, musí být neutralizovány účinky gravitace. Skutečných podmínek mikrogravitace lze dosáhnout pouze ve vesmíru, ale na Zemi tyto podmínky mohou být simulovány pomocí klinostatu nebo přístroje RPM (Random Positioning Machine). Klinostaty pro simulaci mikrogravitace otáčejí biologické vzorky kolem jedné osy, kdežto RPM přístroje kolem dvou os, a proto se též někdy nazývají 3D klinostaty (Kraft *et al.*, 2000). RPM přístroj (Obr. 4) se skládá ze dvou rámu, které neustále rotují biologické vzorky kolem dvou na sebe kolmých os. Simulace pomocí RPM dosahuje srovnatelných výsledků s experimenty kosmických letů (Wuest *et al.*, 2017).

Porovnáním podmínek simulované mikrogravitace se zabývali Kraft *et al.* (2000). Ve své práci zkoumali postavení amyloplastů v kořenové čepičce u *Arabidopsis thaliana*. Sazenice byly pěstovány ve čtyřech podmínkách: na Zemi, na klinostatu, na RPM přístroji a ve vesmíru (na raketoplánu v květnu 1997 na misi STS-84). Zjistili, že postavení amyloplastů nebylo významně odlišné mezi vzorky z raketoplánu a vzorky z RPM přístroje, ale bylo různé od postavení amyloplastů sazenic z klinostatu. Tato studie tedy



Obr. 4 RPM přístroj se vzorky z praktické části bakalářské práce

potvrdila, že RPM přístroj poskytuje dobrou simulaci skutečných podmínek mikrogravitace.

Simulací mikrogravitace pomocí klinostatu se zabývali ve své práci také Kern *et al.* (2005). Pro studium použili prvoklíčky mechu *Ceratodon purpureus* pěstované ve tmě. Prvoklíčky byly vystaveny podmínkám mikrogravitace na Zemi pomocí klinostatu a ve vesmíru na raketoplánech v rámci misí STS-87 a STS-107 v letech 1997 a 2003. Mechové kultury pěstované na raketoplánu při misi STS-87 tvořily po 7 a 14 dnech vlákna orientované po směru hodinových ručiček, došlo tedy k nenáhodnému směru růstu. Tomu odpovídaly i výsledky získané pomocí klinostatu. Výsledky z následující mise STS-107 potvrdily výsledek přechozího experimentu z mise STS-87.

Porovnáním skutečných podmínek mikrogravitace se simulovanou mikrogravitací pomocí RPM přístroje se také zabývali Meloni *et al.* (2011). Pracovali s lidskými imunitními buňkami, o kterých je známo, že vlivem mikrogravitace u nich dochází ke změnám. Konkrétně se jednalo o monocytův buněčnou linii J-111 odvozenou z lidské akutní monocytární leukémie. V rámci výzkumu studovali pohyblivost monocytů a jejich změny v cytoskeletu, konkrétně F-aktinu, beta-tubulinu a vinkulinu. Vinkulin je protein, který je zodpovědný za ukotvení aktinových filamentů k plazmatické membráně. Monocyty byly vystaveny podmínkám mikrogravitace na Mezinárodní vesmírné stanici (ISS), další skupinu vzorků tvořila pozemní kontrola. Jejich výsledky porovnali

s předchozím výzkumem provedeným Melonim *et al.* (2006), ve kterém stejná buněčná linie monocytů byla vystavena podmínkám mikrogravitace pomocí RPM přístroje. U vzorků vystavených podmínkám mikrogravitace byla pozorována u F-aktinu jeho výrazná ztráta hustoty vláknitých biopolymerů. U beta-tubulinu došlo k narušení jeho uspořádání, mikrotubuly byly neorganizované a došlo k jejich nahuštění v okolí jádra. Vinkulin vlivem mikrogravitace tvořil shluky v blízkosti plazmatické membrány a ztrácel radiální orientaci. Všechny tyto změny způsobené vlivem skutečné mikrogravitace odpovídaly výsledkům z přístroje RPM z předchozího experimentu.

2.2.2 Vliv mikrogravitace na živočichy

Mikrogravitace a radiace ve vesmíru představuje velké zdravotní riziko pro astronauty během vesmírných misí. Z důvodu velkého zájmu o zkoumání vesmíru je nutné pochopit patofyziologické jevy způsobené v podmínkách mikrogravitace, aby se tak mohly snížit negativní dopady na astronauty. Bylo prokázáno, že mikrogravitace způsobuje např. snížení kostní hmoty, svalovou atrofii, změny kardiovaskulárního systému nebo imunitní dysfunkci (Pardo *et al.*, 2005). Také některé tkáně, které pohlcují otřesy jako meziobratlové ploténky páteře, reagují na podmínky mikrogravitace zvýšenou spotřebou vody a otokem. To může mít za následek bolesti zad, které často astronauti zažívají během letů do vesmíru (Wuest *et al.*, 2017).

U lidí se nachází ve vnitřním uchu vestibulární aparát, který snímá pohyby hlavy a poskytuje mozku informace o prostorové orientaci. Skládá se ze dvou hlavních částí – polokruhových kanálků, které registrují rotační pohyby, a otolitových orgánů, které reagují na lineární zrychlení působící na hlavu. Při vystavení astronautů dlouhodobému působení mikrogravitace po dobu šesti měsíců došlo ke změnám na vestibulárním aparátu, ale tyto změny se vrátily na původní předletové hodnoty 9 dnů po přistání na Zem (Hallgren *et al.*, 2016).

Ztráta kostní hmoty nemusí být dostatečná, aby způsobila nárůst rizika fraktury po návratu, ale může vést ke zvýšení rizika zlomenin ve stáří v kombinaci s osteoporózou. Tímto se zabývali Keyak *et al.* (2009) a cílem studie bylo kvantifikovat změny proximálního femuru (horního konce kosti stehenní) u 13 astronautů (12 mužů a 1 žena), kteří strávili 4 až 6 měsíců na ISS. Byla pozorována výrazná ztráta v pevnosti stehenní kosti, která v některých případech byla srovnatelná s celoživotní ztrátou způsobenou stárnutím. To může způsobit zvýšené riziko zlomeniny krčku členů posádky v následujících letech. Tento experiment má ale určitá omezení, jako je malý počet

zkoumaných jedinců a poměr mužů a žen. Také skenování kostní tkáně probíhalo 7 až 14 dnů po skončení letu a mohlo tedy potenciálně dojít k jejímu mírnému zotavení.

Gambara *et al.* (2017) použili myš pro studium účinků mikrogravitace na kosterní svalstvo. Zaměřili se na změny genové exprese u *musculus soleus* (šikmý sval lýtkový) a *musculus extensor digitorum longus* (dlouhý natahovač prstů) u samců myší, které byly rozděleny do tří skupin. První skupina myší podstoupila let na palubě biosatelitu na oběžné dráze po dobu 30 dní v podmínkách mikrogravitace. Druhá skupina sloužila jako kontrola a byla chována na Zemi za stejných podmínek na stejném biosatelitu a třetí skupina zůstala po dobu letu na Moskevské státní univerzitě, aby se vyloučila změna genové exprese v důsledku rozdílného místa chovu. U *musculus soleus* zjistili rozdíl v genové expresi 680 genů u myší vystavených podmínkám mikrogravitace v porovnání s pozemní kontrolou. U *musculus extensor digitorum longus* došlo ke změně genové exprese pouze u 72 genů. Jejich výsledky ukazují, že mikrogravitace má větší negativní dopad na *musculus soleus*.

Mikrogravitace také ovlivňuje kardiovaskulární systém. Katsuda *et al.* (2014) provedli výzkum o vlivu mikrogravitace během vesmírného letu na postnatální vývoj aorty u krys. Krysy byly rozděleny do tří skupin sedm dnů po narození. První skupina strávila 16 dnů na raketoplánu Columbia ve vesmíru. Další dvě skupiny tvořily pozemní kontrolu. Po 16 dnech experimentu byla tělesná hmotnost krys vystavených působení mikrogravitace asi o polovinu menší než u dvou skupin krys, které nebyly vystaveny podmínkám mikrogravitace. Také hmotnost aorty, vnitřní průměr aorty, tloušťka stěny a počet svalových vláken byly u nich výrazně menší než u pozemní kontroly. Mikrogravitace tedy může ovlivnit postnatální vývoj aorty mládřat krys. Dále mezi třemi skupinami nebyl významný rozdíl v množství elastinu, který udržuje elastické vlastnosti aorty, a kolagenových vláken, která chrání stěny před protržením. Proto je tedy nepravděpodobné, že by snížená hmotnost aorty ovlivňovala její vlastnosti.

2.2.3 Vliv mikrogravitace na rostliny

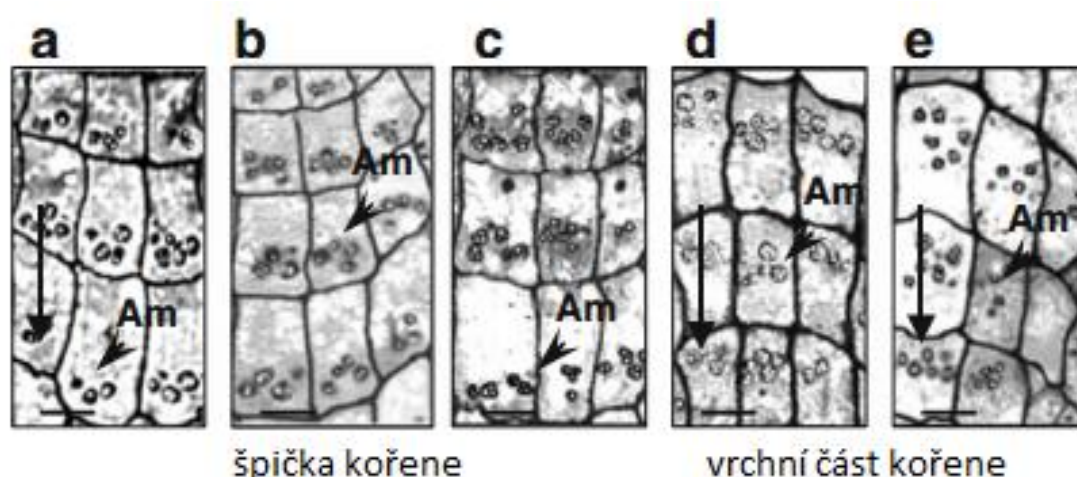
V důsledku trvalé přítomnosti gravitace na Zemi se všechny biologické funkce a mechanismy organismů vyvinuly v reakci na tuto sílu. Gravitace má vliv na růst a proliferaci buněk kořenového meristému, což je regulováno pomocí auxinu. Změna nebo ztráta působení gravitační síly je považována za stresový faktor. Mnoho kosmických agentur studuje růst a vývoj rostlin v nepřítomnosti gravitace, a to zejména ze dvou důvodů. Prvním důvodem je výzkum působení gravitace na růst rostlin a druhým

důvodem je cíl pěstovat rostliny v podmínkách mikrogravitace. Díky tomu by rostliny mohly být pěstovány během dlouhodobých průzkumných misí ve vesmíru za účelem poskytnutí kyslíku a potravy pro astronauty (Ruyters a Braun, 2014).

Při klíčení roste kořen rostliny dolů ve směru vektoru gravitace, tento jev se nazývá gravitropismus a vede k vývoji kořenového systému, aby rostlina mohla efektivně využívat zdroje vody a živin z půdy. V reakci na gravitaci rostliny vyvinuly specializované buňky statocyty ve střední části kořenové čepičky - v kolumele. Statocyty obsahují amyloplasty se škrobovými statolity, jejichž sedimentací se převádí gravitační potenciální energie do biochemického signálu (Leitz *et al.*, 2009; Nakashima *et al.*, 2013).

V práci Švegždienė *et al.* (2010) byl pozorován posun statolitů v hypokotylech a kořenových čepičkách řeřichy seté (*Lepidium sativum* L.). Měření bylo prováděno při podmínkách 1 G, při inkubaci na klinostatu a při otočení vzorků o 180°. Posun statolitů je zobrazen na snímcích ze světelného mikroskopu na Obr. 5.

Sedimentací statolitů v buňkách kolumely v kořenové čepičce *Arabidopsis thaliana* se zabývali také Leitz *et al.* (2009). Studium statolitů bylo provedeno přeorientováním kořene o 90° a 135° vzhledem k vektoru gravitace a byla zkoumána jejich interakce s kortikálním endoplasmatickým retikulem (ER), které se nachází pod plasmatickou membránou. Přeorientováním kořene dochází k sedimentaci statolitů v důsledku působení gravitace a jejich hmotnost je dostatečná k tomu, aby mohlo dojít k deformaci kortikálního ER. Mohou se tak aktivovat mechanosenzitivní iontové kanály, čímž se vyvolá odpověď na změnu směru gravitace (Sparkes *et al.*, 2009).



Obr. 5 Snímky ze světelného mikroskopu znázorňující sedimentaci statolitů. (a) růst při 1 G, (b) klinostat po dobu 2 minut, (c) klinostat po dobu 6 minut, (d) otočení o 180° po dobu 2 minut, (e) otočení o 180° po dobu 6 minut, Am – amyloplast, šipka znázorňuje směr gravitace (převzato a upraveno dle Švegždienė *et al.*, 2010)

Předpokládá se, že koncentrace cytoplasmatického Ca^{2+} se účastní také reakce na gravitaci. Plieth a Trewavas (2002) použili k měření koncentrace Ca^{2+} transgenní sazenice *Arabidopsis thaliana*, které exprimovaly aequorin. Aequorin je fluoresceční protein z medúzy *Aequorea victoria*, který se používá ke stanovení hladiny Ca^{2+} (Bakayan *et al.*, 2017). Sazenice se otáčely do různých úhlů k vektoru gravitace pomocí klinostatu a síla luminiscence pro stanovení koncentrace Ca^{2+} byla měřena pomocí chemiluminometru. Změna hodnoty Ca^{2+} v odezvě na různé směry gravitace byla odlišná od koncentrace Ca^{2+} vyvolané jinými mechanickými podněty, jako je pohyb nebo vítr. Tyto změny vyvolané působením směru gravitace byly přechodné a jejich trvání záviselo na úhlu posunutí, největší míra odezvy byla při úhlu 135° . Předpokládá se, že tento úhel je optimální pro posun statocytů k buněčné stěně, čímž poskytuje maximální odpověď na změnu vektoru gravitace.

Pěstováním *Arabidopsis thaliana* na Mezinárodní vesmírné stanici (ISS) se zabývali Link *et al.* (2014). Rostliny byly pěstované ve speciálních komorách, ve kterých byla regulovaná teplota, vlhkost, světlo a dodávání vody a živin. Rostlinám tak bylo poskytnuto uzavřené prostředí řízeného růstu. První experiment zahrnoval celý cyklus rostlin od klíčení semen až po tvorbu semen a po celou dobu probíhal na ISS, druhá část experimentu zahrnovala semena, která byla vypěstována v prvním experimentu v podmínkách mikrogravitace. Tato semena také rostla na ISS až do tvorby nových semen. Souběžně za stejných podmínek byly na Zemi pěstovány rostliny sloužící jako pozemní kontrola. Morfologická organizace semen byla stejná jak u semen pěstovaných v mikrogravitaci, tak u pozemní kontroly, ale semena na ISS obsahovala méně proteinů. Také postavení květenství vůči hlavnímu stonku těchto rostlin bylo neobvyklé. Hodnota klíčivosti semen rostlin vypěstovaných ve vesmíru byla 92 %, což naznačuje, že osivo vypěstované v podmínkách mikrogravitace je životaschopné.

Studiem působení mikrogravitace na rostliny se zabývali také Johnson *et al.* (2015). Sazenice *Arabidopsis thaliana* byly pěstované za tmy v podmínkách mikrogravitace na raketoplánu během mise STS-131. Semena *A. thaliana* byla vyseta na Petriho misky, které byly rozděleny na 3 skupiny. Pro výzkum použili Biological Research in Canisters (BRIC), což je speciální hardware, který byl vyvinutý v Kennedyho vesmírném středisku a slouží k fixaci Petriho misek se vzorky během vesmírného letu (Schultz *et al.*, 2012). Dvě skupiny Petriho misek byly vloženy do BRIC, přičemž jedna z nich se účastnila vesmírných letů a druhá sloužila jako pozemní kontrola. Třetí skupina Petriho misek sloužila také jako pozemní kontrola, ale semena v ní byla pěstována za standardních

laboratorních podmínek mimo BRIC. U této skupiny vzorků byla největší klíčivost semen v porovnání se semeny pěstovanými v BRIC. Dále byla testována morfologie endodermálních buněk řapíku děložních listů, největší buňky byly u rostlin pěstovaných mimo BRIC, ale i u zbylých skupin byly významné rozdíly ve tvaru buňky, což značí, že na buněčné stěny rostlinných buněk působí mikrogravitace.

Systém BRIC použili také Nakashima *et al.* (2013) pro studium vlivu mikrogravitace na kořen *Arabidopsis thaliana*. Použili wild type rostliny a mutanty *act2-3* pro vegetativní izoformu aktinu, oba typy byly pěstovány dva týdny ve tmě, buď na raketoplánu Discovery v rámci mise STS-131, nebo na Zemi, kde představovaly pozemní kontrolu. Kořeny wild type rostlin i mutantů vykazovaly v podmínkách mikrogravitace výrazné levotočivé naklonění, přičemž u mutantů bylo naklonění výraznější. Kořeny rostlin byly také pozorovány pod světelným a transmisním elektronovým mikroskopem, kde bylo vidět, že rostliny rostoucí ve vesmíru mají větší počet vakuol. Dále pozorovali, že mutanti *act2-3* nemají dostatečně vyvinutou kořenovou čepičku a mají špatně vyvinutou nově vznikající buněčnou stěnu. Tyto data ukazují, že aktin ovlivňuje růst primárního kořene a má vliv na jeho orientaci.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a metody

3.1.1 Použité chemikálie

Agarosa Molecular Grade (Bioline, UK)
Disiřičitan draselný (Lach-Ner, Česká republika)
Ethanol (VWR Chemicals, USA)
Ethylendiamintetraoctová kyselina – EDTA (Sigma-Aldrich, USA)
GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, USA)
Bazický fuchsin (Sigma Aldrich, USA)
Glycerol (Sigma Aldrich, USA)
Hexadecyltrimethylamoniumbromid - CTAB (Sigma Aldrich, USA)
HypperLadder™ 100 bp (Bioline, UK)
Chloramin B (Bochemie, Česká republika)
Chloroform (Lach-Ner, Česká republika)
Isoamylalkohol (Lach-Ner, Česká republika)
Isopropanol (Lach-Ner, Česká republika)
Jodistan sodný (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina boritá (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Česká republika)
Kyselina octová (Lach-Ner, Česká republika)
Murashige a Skoog médium včetně vitamínů (Duchefa, Nizozemí)
Octan sodný (Lachema, Česká republika)
Paraformaldehyd (Lach-Ner, Česká republika)
Phytigel (Sigma-Aldrich, USA)
Polyethylenglykol (Sigma-Aldrich, USA)
Primery (GENERI BIOTECH, Česká republika)
Sacharosa (Duchefa, Nizozemí)
Toluidinová modř (Serva, Německo)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan - Tris (Sigma-Aldrich, USA)
1-hexadekanol (Sigma-Aldrich, USA)
2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)
2-(N-morpholino)ethansulfonová kyselina - MES (Serva, Německo)

5x loading buffer blue (Bioline, UK)

3.1.2 Použité roztoky a média

Složení použitých roztoků a médií:

CTAB pufr, pH 8,0 (1 l): 20 g CTAB, 81,8 g chloridu sodného, 100 ml 1 M Tris (pH 8), 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 2 ml 2-merkptoethanolu; sterilizováno přes filtr o velikosti pórů 0,2 μ .

0,5 M EDTA, pH 8,0 (1 l): 186,1 g EDTA; sterilizováno autoklávováním.

MS médium (Murashige a Skoog), pH 5,7 (1 l): 4,3 g MS média včetně vitamínů (jednotlivé složky jsou uvedeny v Tab. 1), 0,5 g 0,05% MES, 10 g 1% sacharosy, 10 g phytagelu; sterilizováno autoklávováním.

10x PBS, pH 7,5 (1 l): 80 g chloridu sodného, 2 g chloridu draselného, 7,6 g hydrogenfosforečnanu sodného dihydrátu, 2 g dihydrogenfosforečnanu draselného; sterilizováno autoklávováním.

TBE pufr, pH 8 (1 l): 108 g Tris, 55 g kyseliny borité, 40 ml 0,5 M EDTA; sterilizováno filtrováním.

1 M Tris, pH 8 (1 l): 121,1 g Tris; sterilizováno autoklávováním.

Příprava Steedmanova vosku:

Steedmanův vosk byl připraven podle Vitha *et al.* (2000). V kádince bylo smícháno 900 g polyethylenglykolu a 100 g 1-hexadekanolu. Směs byla rozpuštěna při 65 °C ve vodní lázni a v uzavíratelných zkumavkách uskladněna při pokojové teplotě. Pro zalévání vzorků byl vosk opětovně rozpuštěn ve vodní lázni při 37 °C.

Příprava Schiffova činidla:

V uzavíratelné nádobě bylo smícháno 85 ml destilované vody, 15 ml 1 M HCl, 1 g fuchsinu a 1,9 g disiřičitanu draselného. Nádoba byla uzavřena, obalena alobalem a roztok se nechal míchat po dobu 2 hodin. Následně se roztok nechal stát do následujícího dne při pokojové teplotě. Další den se k roztoku přidal 1 g aktivního uhlí, po míchání byl roztok přefiltrován a uskladněn při teplotě 4 °C.

Tab. 1 Složení MS média podle Murashige a Skoog (1962), MS médium včetně vitamínů bylo dodané výrobcem Duchefa (Nizozemí)

Složky		Množství (mg/l)
Makroprvky	CaCl ₂	332,02
	KH ₂ PO ₄	170,00
	KNO ₃	1900,00
	MgSO ₄	180,54
	NH ₄ NO ₃	1650,00
Mikroprvky	CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025
	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025
	FeNaEDTA	36,70
	H ₃ BO ₃	6,20
	KI	0,83
	MnSO ₄ ·H ₂ O	16,90
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60
Vitamíny	Glycin	2,00
	Myo-inositol	100,00
	Kyselina nikotinová	0,50
	Pyridoxin HCl	0,50
	Thiamin HCl	0,10

3.1.3 Použité kity

FastStart PCR Master (Roche, Německo)

LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche, Německo)

RQ1 RNase-Free DNase (Promega, USA)

SpectrumTM Plant Total RNA Kit (Sigma-Aldrich, USA)

Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo)

3.1.4 Použité přístroje a pomůcky

Analytické váhy AE 240 (Mettler Toledo, Švýcarsko)

Automatické pipety (Eppendorf, Německo)

Centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo)

Digitální předvážky (KERN, Německo)

Digitální kamera Olympus DP72 (Olympus, Japonsko)

Elektroforetická aparatura se zdrojem napětí (Bio-Rad, USA)
Digestoř (Merci, Česká republika)
Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
Homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals, USA)
Inkubátor (Heraeus, Německo)
Laminární box (Heal Force, Čína)
Light Cyclor Nano (Roshe, Německo)
Mikroskop Olympus BX60 (Olympus, Japonsko)
Mikrotom Microm HM 200 ErgoStar (Carl Zeiss AG, Německo)
Mikrovlnná trouba MS023 (Hitachi, Japonsko)
Minicentrifuga MCF 2360 (LMS, Japonsko)
NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, USA)
Random Positioning Machine (Dutch Space, Nizozemí)
Stolní pH metr FE-20 KIT (Mettler Toledo, Švýcarsko)
Termoblok Mixing BlockMB-102 (Bioer, Čína)
Termocykler Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR System (Eppendorf, Německo)
Vodní lázeň GFL 1003 (HELAGO, Česká republika)
Vortex (IKA, Německo)
UV Transluminátor (UVITEC Cambridge, UK)

3.1.5 Rostlinný materiál

Byla použita semena rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia (Col-0) dodané Katedrou botaniky Univerzity Palackého v Olomouci. Semena byla vyseta do květináčů do směsi rašeliny a perlitu ve skleníku. Přibližně po 6 týdnech od vysetí byly sesbírány šesule v různých fázích zralosti (Obr. 6). Následně šesule byly sterilizované 5 minut v 70% ethanolu a 10 minut v 2,5% chloraminu a umístěny na Petriho misky s MS médiem. Polovina Petriho misek se vzorky byla umístěna na přístroj RPM (Random Positioning Machine) a druhá polovina sloužila jako kontrola. Vzorky na RPM přístroji i kontrola byly inkubované při laboratorní teplotě (22 °C) po dobu 48, 96 nebo 168 hodin pro analýzu genové exprese a 10 dní pro studium morfologie. Průměrná gravitační síla, která na vzorky působila, byla 0,1 G, přičemž maximální úhlová rychlost přístroje byla nastavená na 50°/s a minimální úhlová rychlost byla 40°/s.



Obr. 6 *Arabidopsis thaliana* ve fázi sbírání šešulí

3.1.6 Metody

3.1.6.1 Příprava mikroskopických preparátů

Pro studium morfologických stádií byly připraveny mikroskopické preparáty. Kontrolní šešule a šešule inkubované na RPM přístroji byly po inkubaci přemístěny do mikrozkuvek a na 24 hodin k nim byl přidán 4% paraformaldehyd pro fixaci. Následně byly šešule odvodněny v ethanolové řadě (10 %, 20 %, 30 %, 50 %, 70 %, 80 %, 90 % a 96 %), přičemž v 70% ethanolu byly ponechány 24 hodin, v ostatních koncentracích dvakrát po dobu 15 minut. Ethanolové koncentrace byly připraveny z 96% ethanolu a ředěny odpovídajícím množstvím fosfátového pufru (PBS). Poté byly šešule postupně zalévány do Steedmanova vosku (Steedman's wax) v postupných poměrech ethanol a Steedmanův vosk – 4:1, 3:1, 1:1, 1:3, 1:4 a nakonec Steedmanův vosk bez přídavku ethanolu. V těchto poměrech byly šešule vždy inkubované 24 hodin při 37 °C. Následně byly šešule po jedné zalévány do Steedmanova vosku. Po ztuhnutí vosku při pokojové teplotě byly šešule nařezány na mikrotomu na řezy o tloušťce 10-12 μm a byly umístěny na podložní sklíčko do kapky vody. Podložní sklíčko byla předem potřena směsí vaječného bílku a glycerolu v poměru 1:1, aby došlo k upevnění vzorků. Poté se sklíčko nechala zaschnout. Pro odstranění vosku z řezů byla podložní sklíčka ponořena do sestupné ethanolové řady (96 %, 90 %, 70 %, 50 % a 20 %), kdy jednotlivé koncentrace byly připraveny z 96% ethanolu a PBS pufru. V každé koncentraci byla

podložní skříčka se vzorky ponechána dvakrát po 15 minutách a následně přesunuta do samotného PBS pufru. Pro studium morfologie se vzorky barvily toluidinovou modří, do které byly ponořeny na 30 sekund a poté byly opláchnuty vodou. K obarvení zásobních látek bylo použito Schiffovo činidlo. Podložní skříčka byla nejdříve na 30 minut ve tmě ponořena do 1% roztoku jodistanu sodného a poté přesunuta na 2 minuty do Schiffova činidla a opláchnuta vodou. Obarvené vzorky byly zakápnuty glycerolem a přikryty krycím skříčkem. Nakonec byly vzorky pozorovány pod mikroskopem a byla pořízena fotodokumentace.

3.1.6.2 Izolace DNA

DNA byla izolována z listů *Arabidopsis thaliana*. Rostlinný materiál byl vložen do mikrozkuvek a bylo k němu přidáno 1000 μl CTAB a 4 μl 2-merkapt ethanolu. Následně byl rostlinný materiál homogenizován v homogenizátoru po dobu 60 sekund při $6,5 \text{ m}\cdot\text{s}^{-1}$. Zhomogenizovaná směs byla inkubována při $66 \text{ }^\circ\text{C}$ a centrifugována při 450 RPM po dobu 90 minut. Poté ke směsi bylo přidáno 500 μl roztoku chloroform a isoamylalkohol v poměru 24:1. Směs byla řádně protřepána a následně se nechala stát 5 minut. Po 15 minutové centrifugaci při 11 000 RPM při $4 \text{ }^\circ\text{C}$ byl odpipetován supernatant do čisté mikrozkuvky a bylo k němu přidáno 60 μl 3 M octanu sodného a 500 μl chlazeného isopropanolu. Poté byla směs ponechána při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ do následujícího dne. Další den byla směs nejdříve centrifugována při 11 000 RPM při $4 \text{ }^\circ\text{C}$, supernatant byl slit a k peletu bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu. Poté se směs nechala stát 5 minut, byla centrifugována po dobu 3 minut při 11 000 RPM a $4 \text{ }^\circ\text{C}$ a supernatant byl znovu odstraněn. Opět bylo přidáno 500 μl 70% ethanolu, směs byla centrifugována při stejných podmínkách a supernatant odstraněn. Následně byl pelet vysušen na termobloku za 60 minut při $40 \text{ }^\circ\text{C}$. Pelet byl poté resuspendován v 50 μl ddH₂O, směs byla ošetřena 1,5 μl RNasy a inkubována při $37 \text{ }^\circ\text{C}$ po dobu 30 minut. Nakonec byla koncentrace a čistota izolované DNA změřena na přístroji NanoDrop a DNA byla uložena při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.

3.1.6.3 Izolace RNA

Na izolaci RNA byl použit Spectrum™ Plant Total RNA Kit podle návodu výrobce. RNA byla izolována z nezralých semen vystavených vlivu mikrogravitace na RPM přístroji a z nezralých semen sloužících jako kontrola. Nezralá semena obsahující embrya v závěrečné fázi zralosti byla přenesena do mikrozkuvek spolu s 500 μl lyzačního roztoku, ke kterému byl předem přidán 2-merkapt ethanol (10 μl na 1 ml lyzačního

roztoku). Následně byla nezralá semena homogenizována na homogenizátoru po dobu 60 sekund při 6,5 m·s⁻¹. Homogenizovaná směs byla inkubována při 56 °C po dobu 5 minut a poté centrifugována 3 minuty. Supernatant byl přesunut na filtrační kolonku v mikrozkuhavce, a ta byla centrifugována po dobu 1 minuty. Pro navázání RNA na kolonku byl použit protokol A, 500 µl RNA-vázacího roztoku bylo přidáno k filtrátu a směs byla promíchána na vortexu. Následně tato směs byla napipetována do kolonky, která váže RNA, přičemž tato kolonka byla umístěna v mikrozkuhavce. Po centrifugaci po dobu 1 minuty bylo do kolonky napipetováno 500 µl promývacího roztoku 1 a opět proběhla centrifugace. Poté bylo dvakrát po sobě napipetováno 500 µl promývacího roztoku 2 a následně centrifugováno po dobu 1 minuty. Kolonky v mikrozkuhavce byly vysušeny 5 minutovou centrifugací a poté byla RNA eluována 50 µl elučního roztoku. Koncentrace a čistota RNA byla změřena na přístroji NanoDrop a uložena při -20 °C.

3.1.6.4 Ošetření RNA DNasou

Pro odstranění DNA v izolované RNA byl použit RQ1 RNase-Free DNase. Kit byl použit podle návodu výrobce. K 8 µl izolované RNA byl přidán 1 µl RQ1 RNase-Free DNase 10x reakčního pufru a 1 µl RQ1 RNase-Free DNasy. Poté byla směs inkubována při 37 °C po dobu 30 minut. Pro zastavení reakce a inaktivaci DNasy byl ke směsi přidán 1 µl RQ1 DNase Stop roztok a směs byla inkubována při 65 °C po dobu 10 minut.

3.1.6.5 Reverzní transkripce

Pro přepis RNA do cDNA byl použit Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit, který byl použit podle návodu výrobce. Do reakce bylo použito 10,4 µl izolované RNA ošetřené DNasou, ke které se přidal 1 µl anchored-oligo(dT)₁₈ primerů. Směs byla inkubovaná při 65 °C po dobu 10 minut za účelem denaturace a poté ochlazena na ledu. Následně kompletní reakční směs s reverzní transkriptasou o celkovém objemu 20 µl byla inkubována při 45 °C po dobu 60 minut a reakce byla ukončena inaktivací reverzní transkriptasy 5 minutovou inkubací při 85 °C. Koncentrace a čistota cDNA byla změřena na přístroji NanoDrop a cDNA byla uložena při -20 °C.

3.1.6.6 PCR reakce

Pro PCR reakci byl použit kit FastStart PCR Master. Do reakce byla použita genomická DNA nebo cDNA, a to v objemu 1 µl. Genomické DNA bylo do reakce dodáno 20 ng, cDNA bylo dodáno 200 ng. Kit byl použit podle návodu výrobce, ale celkový objem

Tab. 2 Sekvence primerů použitých k amplifikaci sledovaného genu při PCR reakci

Sledovaný gen	Primer	Sekvence
<i>LEC 1</i>	F	5'-GTGGAGCTCCCTTCTCTCACT-3'
	R	5'-CTGGACCACGATAACCATTGTT-3'
<i>LEC 2</i>	F	5'-AGGGAAAGGAACCACTACGAA-3'
	R	5-CAGTGGTGAGGTCCATGAGAT-3'
<i>FUS 3</i>	F	5'-GTCAGCTCTCTCCGACGTATG-3'
	R	5'-TGAAGGTCCAAACGTGAAAAC-3'
<i>AT2G28390</i>	F	5'-AACTCTATGCAGCATTTGATCCAT-3'
	R	5'-TGATTGCATATCTTTATCGCCATC-3'

Tab. 3 Reakční podmínky PCR pro stanovení optimální teploty pro annealing

Krok	Teplota (°C)	Čas (min)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3	1
Denaturace	95	0,5	45
Annealing	45→65	0,5	
Elongace	72	0,5	
Finální extenze	72	5	1
Chlazení	8	-	1

reakční směsi činil 20 µl. Použité primery pro PCR reakci byly 10x koncentrované. V Tab. 2 je sekvence primerů, které byly pro PCR reakci použity a podmínky reakce jsou popsány Tab. 2 Sekvence primerů použitých k amplifikaci sledovaného genu při PCR reakci. PCR reakce probíhala za teplotního gradientu pro stanovení optimální teploty annealingu. Teplotní gradient probíhal při 12 teplotách v rozmezí 45 a 65 °C, hodnoty teplot jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4 Jednotlivé teploty teplotního gradientu PCR reakce pro stanovení optimální teploty pro annealing

Vzorek	Teplota (°C)	Vzorek	Teplota (°C)
1	44,9	7	56,1
2	45,3	8	58,7
3	46,6	9	61,1
4	48,5	10	63,1
5	50,8	11	64,5
6	53,4	12	65,1

3.1.6.7 Real-time PCR

Pro kvantitativní RT-PCR byl použit kit LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I. Reakce probíhala podle návodu výrobce a bylo do ní dodáno 200 ng cDNA. Jako negativní kontrola byla použita negativní PCR grade voda. Reakční podmínky jsou uvedeny v Tab. 5.

Data pro stanovení relativní exprese genu byla vyhodnocena v programu Light Cycler Nano Software 1.1. Tento software určil k jednotlivým vzorkům C_T hodnoty, které byly následně zpracovány pomocí metody $\Delta\Delta C_T$:

$$\Delta C_T = C_{T \text{ studovaný gen}} - C_{T \text{ referenční gen}}$$

$$\Delta\Delta C_T = \Delta C_{T \text{ vzorek}} - \Delta C_{T \text{ kontrola}}$$

$$\text{Relativní exprese: } 2^{-\Delta\Delta C_T}$$

3.1.6.8 Gelová elektroforéza

Pro zhodnocení produktů PCR byla provedena gelová elektroforéza, která probíhala na 1,5 % agarosovém gelu v 0,5x TBE pufru při napětí 100 V po dobu 40 minut. Agarosový gel byl připraven rozvařením 0,9 g agarosy v 60 ml 0,5x TBE pufru v mikrovlnné troubě a byly k němu přidány 3 μ l činidla GelRed pro vizualizaci DNA. Směs byla následně nalita do připravené elektroforetické formy, do které byl předem umístěn hřebínek. Po ztuhnutí (30 minut) byl gel přesunut do elektroforetické vany s 0,5x TBE puftrem a hřebínek byl odstraněn. Do první jamky byly napipetovány 2 μ l velikostního markeru HypperLadderTM 100 bp. Poté 6 μ l testované DNA bylo smícháno s 2 μ l 5x loading buffer blue a také napipetováno do jamek. Výsledky elektroforézy byly vyhodnoceny v UV světle pomocí přístroje UV Transluminátor a byla udělána fotodokumentace.

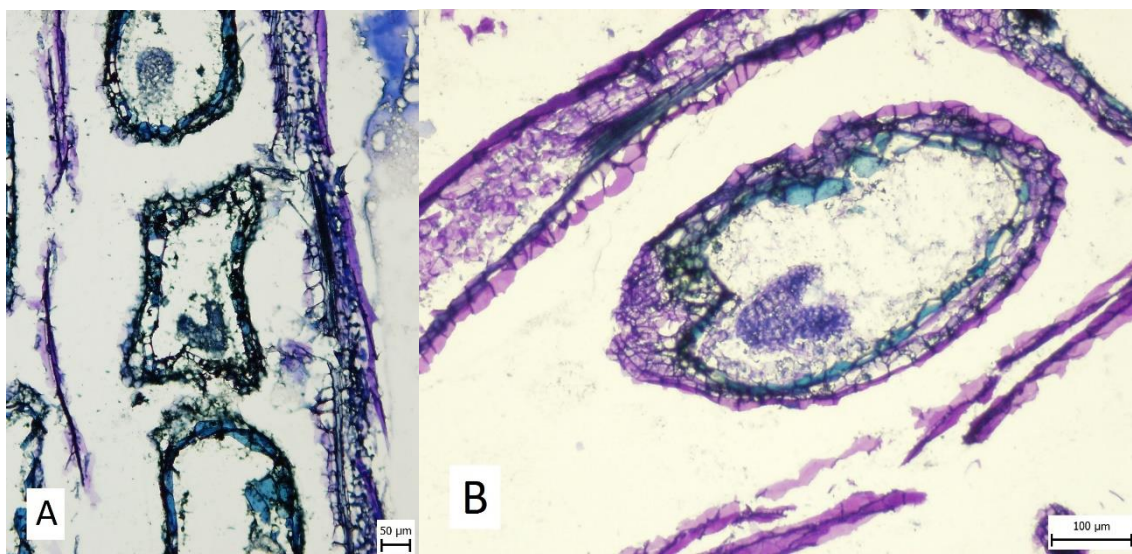
Tab. 5 Reakční podmínky RT-PCR

Krok	Teplota (°C)	Čas (sec)	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	10	45
Annealing	56	30	
Elongace	72	20	
Finální extenze	72	300	1
Chlazení	40	-	1

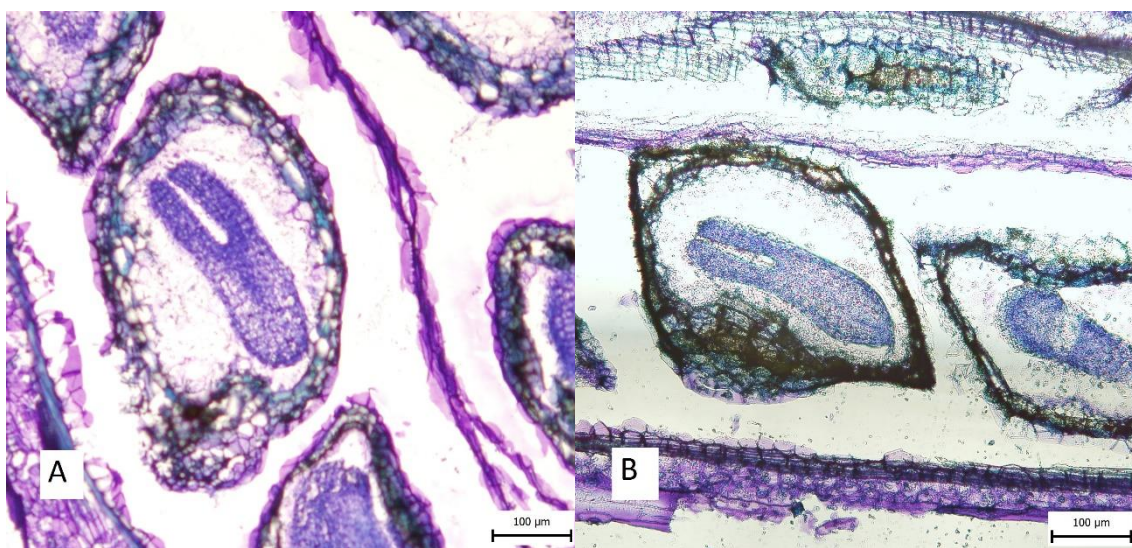
4 VÝSLEDKY

4.1 Studium morfologie a ukládání zásobních látek

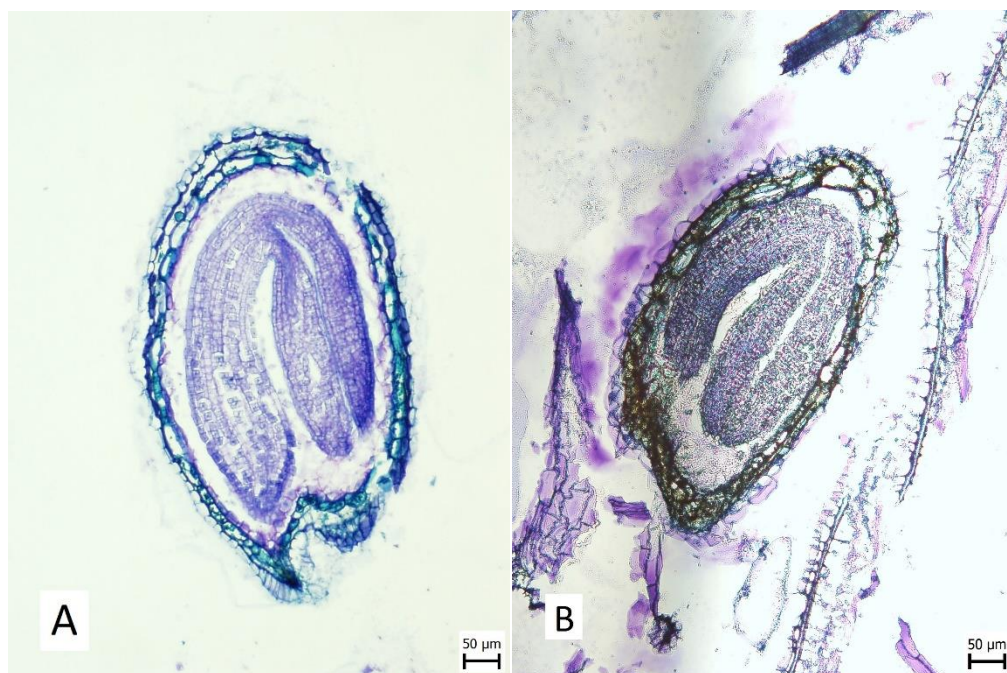
Pro studium morfologie a ukládání zásobních látek jednotlivých stádií embryonálního vývoje *Arabidopsis thaliana* byly použity kontrolní a analyzované šesule kultivované na RPM přístroji po dobu 10 dnů. Řezy šesulí byly obarveny toluidinovou modří pro studium morfologie a Schiffovým činidlem pro studium ukládání zásobních látek. Bylo detekováno stádium srdčité (Obr. 7), stádium torpédovité (Obr. 8) a embryo ve fázi zralosti (Obr. 9). Schiffovým činidlem obarvené zásobní látky byly pozorovány u stádia srdčitého (Obr. 10) a u embrya ve fázi zralosti (Obr. 11).



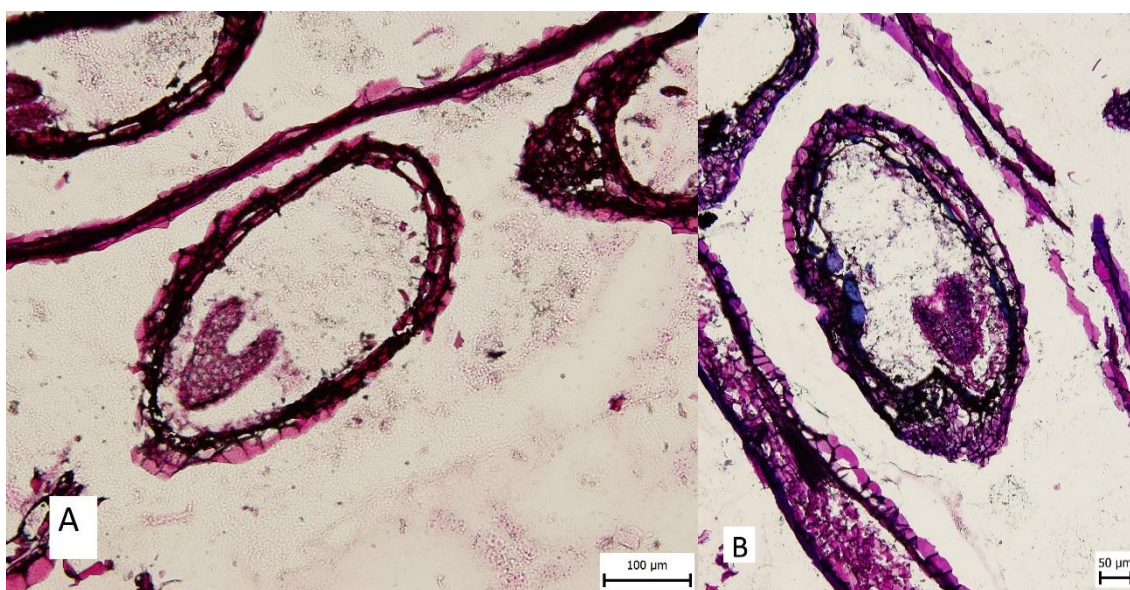
Obr. 7 Srdčité stádium *A. thaliana* barvené toluidinovou modří; A) kontrolní vzorek; B) analyzovaný vzorek



Obr. 8 Torpédovité stádium *A. thaliana* barvené toluidinovou modří; A) kontrolní vzorek; B) analyzovaný vzorek



Obr. 9 Embrya *A. thaliana* ve fázi zralosti barvené toluidinovou modří; A) kontrolní vzorek; B) analyzovaný vzorek



Obr. 10 Srdčité stádium *A. thaliana* barvené Schiffovým činidlem; A) kontrolní vzorek; B) analyzovaný vzorek

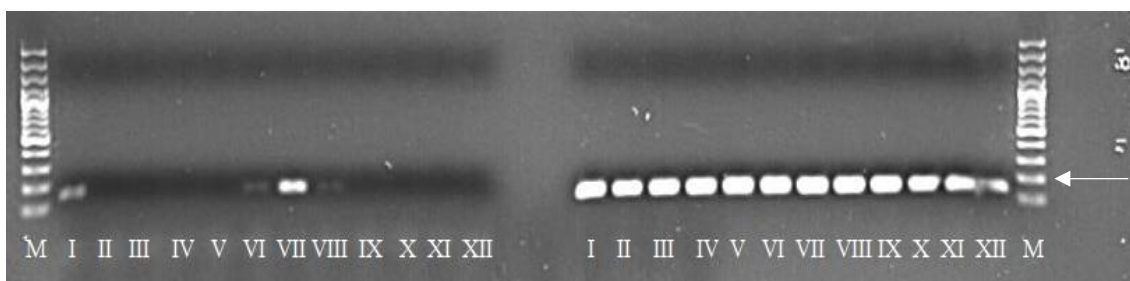
Mezi embryi kultivovanými v podmínkách mikrogravitace a kontrolními vzorky obarvenými toluidinovou modří nebyl pozorován žádný morfologický rozdíl. Také zásobní látky obarvené Schiffovým činidlem se u obou typů šešulí akumulovaly převážně v děložních listech.



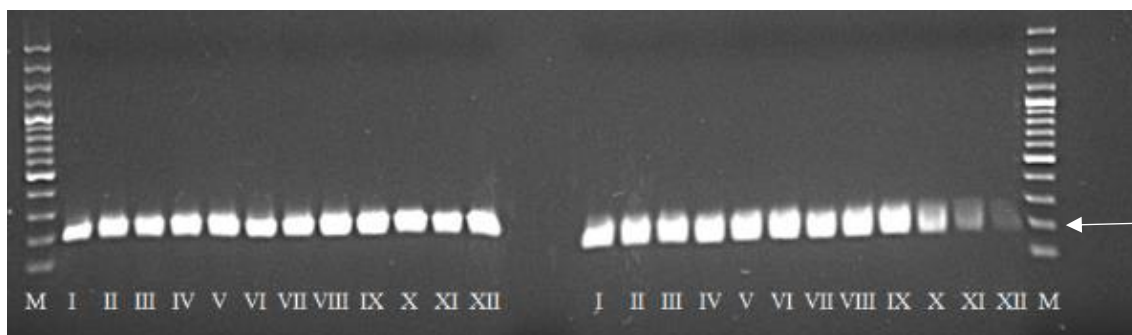
Obr. 11 Embrya *A. thaliana* ve fázi zralosti barvené Schiffovým činidlem; A) kontrolní vzorek; B) analyzovaný vzorek

4.2 Analýza genové exprese

Pro analýzu genové exprese byla použita RNA z nezralých semen s embryi v závěrečné fázi vývoje. Dle předchozích morfologických pozorování byly k tomuto účelu vybrány šešule o stejném stupni zralosti (velikost, barva), jakou měly šešule s embryi ve fázi zralosti v předchozím experimentu. Analýza relativní genové exprese byla zjišťována u genů *LEC1*, *LEC2* a *FUS3*. Nejprve byla provedena PCR reakce pro ověření specifity primerů a stanovení optimální teploty pro annealing primerů. Pro PCR reakci byla použita genomická DNA o koncentraci 20 ng/µl. Produkty PCR reakce byly separovány pomocí gelové elektroforézy (Obr. 12 pro gen *LEC1* a *LEC2*, Obr. 13 pro gen *FUS3* a referenční gen *AT2G28390*). Teplotní gradient PCR reakce probíhal v rozmezí teplot 45 a 65 °C. U genu *LEC1* byla pozorována výrazná závislost annealingu primerů na teplotě, kdy neoptimálnější annealing byl při teplotě 56,1 °C (hodnota VII na Obr. 12). Na základě těchto výsledků probíhal annealing primerů při následné Real-time PCR při 56 °C.

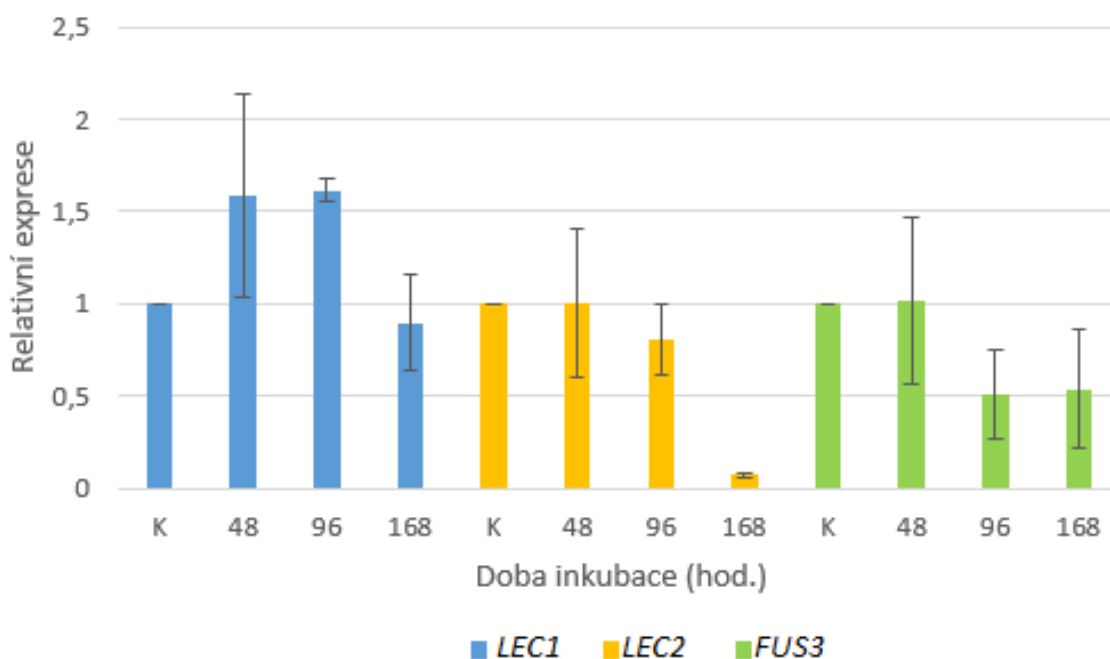


Obr. 12 Separace produktů PCR pomocí gelové elektroforézy. Šipkou je označený produkt o velikosti 200 bp, jako marker molekulové hmotnosti (M) byl použit HyperLadder™ 100 bp. Jednotlivé teploty teplotního gradientu (I-XII) jsou uvedeny v Tab 4. Gen *LEC1* je zobrazen nalevo, gen *LEC2* napravo.



Obr. 13 Separace produktů PCR pomocí gelové elektroforézy. Šipkou je označený produkt o velikosti 200 bp, jako marker molekulové hmotnosti (M) byl použit HypperLadder™ 100 bp. Jednotlivé teploty teplotního gradientu (I-XII) jsou uvedeny v Tab 4. Gen *FUS3* je zobrazen nalevo, referenční gen *AT2G28390* napravo.

Pro stanovení relativní exprese genů *LEC1*, *LEC2* a *FUS3* pomocí real-time PCR byla použita nezralá semena inkubovaná 48, 96 a 168 hodin v podmínkách mikrogravitace a kontrolní semena inkubovaná po stejnou dobu. Relativní exprese všech genů je zobrazena na Obr. 14 a je vypočtena proti kontrolním vzorkům, které mají hodnotu exprese rovnu 1. Měření bylo provedeno ve dvou opakováních. Z výsledků vyplývá, že exprese všech genů měla spíše klesající tendenci v závislosti na délce inkubace. Nejvýraznější pokles exprese byl pro gen *LEC2*, kdy po 168 hodinách inkubace byla



Obr. 14 Graf relativní exprese genů *LEC1*, *LEC2* a *FUS3* vzorků inkubovaných v podmínkách mikrogravitace. Míra exprese je stanovena proti kontrolním vzorkům neinkubovaných v podmínkách mikrogravitace a její hodnota je 1. Expresa byla stanovena u nezralých semen po 48, 96 a 168 hodinách. K – kontrolní vzorky

relativní exprese 14,2krát menší oproti kontrole. Naopak nejvyšší míru exprese měl gen *LECI*, a to ve všech časových odstupech. Jeho relativní exprese byla po 96 hodinách inkubace mírně vyšší než po 48 hodinách a byla 1,6krát vyšší v porovnání s kontrolou. *LECI* jako jediný gen měl hodnotu exprese vyšší než kontrola, ale jenom pouze při inkubaci v podmínkách mikrogravitace po dobu 48 a 96 hodin. U genu *FUS3* došlo také ke snížení exprese, po 48 hodinách exprese odpovídala kontrolním vzorkům, ale po 96 a 168 hodinách hodnota klesla na polovinu. Z výsledku se proto dá usuzovat, že mikrogravitace má vliv na všechny vybrané geny.

5 DISKUZE

První částí práce bylo studium morfologie u řezů embryí *Arabidopsis thaliana* inkubovaných v podmínkách mikrogravitace a jejich porovnání s kontrolními vzorky. Šešule pro přípravu mikroskopických preparátů byly zalévány do Steedmanova vosku. Výhodou Steedmanova vosku je, že pro jeho odstranění z řezů lze použít ethanol a ne xylen jako v případě parafínu. Mezi úspěšné aplikace Steedmanova vosku patří například práce Balušky *et al.* (1992), Balušky *et al.* (1997) a Catterou *et al.* (2001). Ve všech těchto pracích byl Steedmanův vosk použit pro imunofluorescenční značení.

Při porovnání morfologie embryí z analyzovaných a kontrolních vzorků nebyl pozorován žádný rozdíl. Rozdíl mezi řezy nebyl pozorován ani po barvení zásobních látek Schiffovým činidlem. Rozdíl v morfologii embryí inkubovaných v podmínkách mikrogravitace nepozorovali ani Kuang *et al.* (1996). K podobnému výsledku došli také Link *et al.* (2014), kteří pracovali s *Arabidopsis thaliana* a u semen vypěstovaných na ISS nebyl žádný rozdíl v morfologii v porovnání s kontrolou. Všechna semena obsahovala zralá embrya se správně vytvořenými kořenovými a stonkovými meristémy a kotyledony. Jenom obsah proteinů byl nižší u semen pěstovaných na ISS. V dalších studiích semena *Brassica rapa* pěstovaná v podmínkách mikrogravitace byla označena jako zdravá a životaschopná, ale obsah proteinů u těchto semen byl nižší a kotyledony byly tvořeny méně buňkami v porovnání s kontrolou (Kuang *et al.*, 2000; Musgrave *et al.*, 2000). V pozdějších studiích s *B. rapa* se Kuang *et al.* (2005) zaměřili převážně na ukládání zásobních látek. Ačkoliv semena *B. rapa* morfologií i velikostí odpovídala kontrolním vzorkům, cytochemické reakce ukázaly, že vývoj ukládání zásobních látek je zpomalený v porovnání s kontrolními vzorky pěstovanými při normálních gravitačních podmínkách.

I přes to, že nebyly pozorovány žádné změny v morfologii, nelze konstatovat, že působením mikrogravitace nedochází ke změnám na cytologické úrovni, jelikož v rámci tohoto experimentu nebyly pozorovány jednotlivé buněčné struktury (např. buněčná stěna, cytoskelet). K tomu by bylo potřeba dalších pozorování, při kterých by mohly být zkoumány i vnitřní struktury buněk.

To, že rostliny jsou schopny za snížené gravitace projít celým svým vegetačním cyklem, dokazují práce Musgrave *et al.* (2000) Levinskikh *et al.* (2000) nebo Link *et al.* (2014). Součástí jejich experimentů bylo vypěstování rostlin ze semen až do tvorby nových semen ve vesmíru. Takto vypěstovaná semena i přesto, že byla životaschopná,

tak u nich byla snížena kvalita. To naznačuje, že snížená gravitace má vliv na vývoj semen.

Druhou částí práce byla analýza genové exprese nezralých semen v závěrečné fázi embryogeneze. Byla pozorována změna v expresi genů skupiny *LEAFY COTYLEDON* (geny *LEC1*, *LEC2* a *FUS3*) při vystavení podmínkám snížené gravitace po dobu 48, 96 nebo 168 hodin. U všech těchto genů měla relativní exprese klesající tendenci v závislosti na čase. Tyto geny ovlivňují fázi morfogeneze a pozdní fáze embryogeneze, kdy regulují ukládání zásobních látek (Keith *et al.*, 1994; Meinke *et al.*, 1994), což odpovídá výsledkům, kdy došlo ke sníženému ukládání zásobních látek v podmínkách mikrogravitace (Kuang *et al.*, 2000; Musgrave *et al.*, 2000; Briarty a Maher 2004; Kuang *et al.*, 2005; Link *et al.*, 2014). Mutace u těchto genů způsobují jedny z nejzávažnějších změn při dozrávání semen. Mutanti *lec1* mají průhledné hypokotyle s buňkami obsahujícími hodně vakuol a před dehydratací u nich často dochází k zvýšené akumulaci antokyanu, a to převážně na krajích děložních listů. Jejich rostliny tvoří trichomy na adaxiální straně listu a jejich embrya obsahují méně proteinových a lipidových tělísek. Mutanti *fus3* mají podobný fenotyp jako mutanti *lec1*, ale jejich děložní listy nejsou tolik pozměněné. Semena jsou bledší a antokyan akumulují převážně mezi hypokotylem a děložními listy. Změny u *lec2* mutanta jsou méně závažné než změny u mutantů *lec1* a *fus3* (Meinke, 1992; Meinke *et al.*, 1994; Parcy *et al.*, 1997; Vicent *et al.*, 2000).

Působení mikrogravitace na tyto geny a změny genové exprese v odpovědi na snížené podmínky gravitace zatím nebyly popsány.

Tato práce navazuje na studium změn v expresi genů zapojených do procesu embryogeneze, konkrétně genů *SINI*, *KANI*, *PCNA1* a *LEA4-5* (Kovalová, 2016). V této práci bylo zjištěno, že vlivem mikrogravitace došlo ke změnám v jejich expresi u všech genů kromě genu *SINI*. Nejvýraznější změna byla u genu *KANI*, kdy exprese byla zvýšena 9,5krát v porovnání s kontrolou. Vzorky byly vystaveny podmínkám mikrogravitace po dobu 48 hodin, lze tedy usuzovat, že mikrogravitace má vliv na geny *KANI*, *PCNA1* a *LEA4-5* i při krátkém působení.

6 ZÁVĚR

V rámci této práce byl studován vliv mikrogravitace na vývoj embryí rostlin. Byla vypracována literární rešerše popisující zejména rostlinnou embryogenezi a mikrogravitaci včetně možností její možné simulace na Zemi a jejího vlivu na rostliny.

V praktické části byly provedeny experimenty, které zahrnovaly studium morfologie a ukládání zásobních látek u embryí *Arabidopsis thaliana* pěstovaných v podmínkách mikrogravitace. Byla pozorována určitá stádia embryogeneze, konkrétně srdčité, torpédovité a embryo ve fázi zralosti. V rámci tohoto experimentu nebyly pozorovány morfologické rozdíly mezi embryi kultivovanými v podmínkách mikrogravitace a kontrolními vzorky.

Dalším provedeným experimentem byla analýza genové exprese, pro kterou byly vybrány geny *LEC1*, *LEC2* a *FUS3*, které hrají roli v rostlinné embryogenezi. Pro porovnání relativní genové exprese byla použita nezralá semena, která obsahovala embrya v závěrečné fázi embryogeneze. U všech vybraných genů byla zjištěna klesající tendence relativní exprese v závislosti na čase inkubace (48, 96 a 168 hodin) v podmínkách mikrogravitace v porovnání s kontrolními vzorky. Nejvýraznější snížení relativní exprese bylo pozorováno u genu *LEC2*, kdy relativní exprese byla po 168 hodinách inkubace 14krát nižší oproti kontrole. U genu *FUS3* také došlo ke snížení exprese, po 48 hodinách jeho exprese odpovídala kontrolním vzorkům, ale následně míra jeho exprese klesla na polovinu. Jediný gen *LEC1* měl relativní míru exprese vyšší než kontrola, ale i zde došlo ke snížení relativní exprese v závislosti na čase inkubace v podmínkách mikrogravitace. Lze tedy usuzovat, že mikrogravitace má vliv na geny skupiny *LEAFY COTYLEDON*.

7 LITERATURA

- Angeles-Núñez J. G., Tiessen A. (2011): Mutation of the transcription factor LEAFY COTYLEDON 2 alters the chemical composition of *Arabidopsis* seeds, decreasing oil and protein content, while maintaining high levels of starch and sucrose in mature seeds. *Journal of Plant Physiology* **168**, 1891-1900.
- Bakayan A., Domingo B., Vaquero C. F., Peyriéras N., Llopis J. (2017): Fluorescent Protein-photoprotein Fusions and Their Applications in Calcium Imaging. *Photochemistry and Photobiology* **20**. <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/php.12682/full>
- Baluška F., Parker J. S., Barlow P. W. (1992): Specific patterns of cortical and endoplasmic microtubules associated with cell growth and tissue differentiation in roots of maize (*Zea mays* L.). *Journal of Cell Science* **103**, 191-200.
- Baluška F., Kreibbaum A., Vitha S., Parker J. S., Barlow P. W., Sievers A. (1997): Central root cap cells are depleted of endoplasmic microtubules and actin microfilament bundles: implications for their role as gravity-sensing statocytes. *Protoplasma* **196**, 212-223.
- Baud S., Boutin J. P., Miquel M., Lepiniec L., Rochat Ch. (2002): An integrated overview of seed development in *Arabidopsis thaliana* ecotype WS. *Plant Physiology and Biochemistry* **40**, 151-160.
- Berleth T. (1998): Experimental approaches to *Arabidopsis* embryogenesis. *Plant Physiology and Biochemistry* **36**, 69-82.
- Bewley, J. D., Black M. (1994): *Seeds: physiology of development and germination*. 2nd ed., Springer, New York, 445 stran.
- Bewley J. D., Bradford K. J., Hilhorst H. W. M., Nonogaki H. (2013): *Seeds: Physiology of Development, Germination and Dormancy*. 3rd ed., Springer, New York, 392 stran.
- Borg M., Brownfield L., Twell D. (2009): Male gametophyte development: a molecular perspective. *Journal of Experimental Botany* **60**, 1465-1478.
- Briarty L. G., Maher E. P. (2004): Reserve utilization in seeds of *Arabidopsis thaliana* germinating in microgravity. *International Journal of Plant Sciences* **165**, 545-551.
- Cairney J., Pullman G. S. (2007): The cellular and molecular biology of conifer embryogenesis. *New Phytologist* **176**, 511-536.
- Catterou M., Dubois F., Schaller H., Aubanelle L., Vilcot B., Sangwan-Norreel B. S., Sangwan R. S. (2001): Brassinosteroids, microtubules and cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. II. Effects of brassinosteroids on microtubules and cell elongation in the *bull* mutant. *Planta* **212**, 673-683.
- De Smet I., Lau S., Mayer U., Jürgens G. (2010): Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* **61**, 959-970.
- Dumas C., Rogowsky, P. (2008): Fertilization and early seed formation. *Comptes Rendus Biologies* **331**, 715-725.
- Finkelstein R. (2013): Abscisic Acid Synthesis and Response. *The Arabidopsis Book* **11**:e0166. <http://www.bioone.org/doi/abs/10.1199/tab.0166>.
- Friedman W. E., Madrid E. N., Williams J. H. (2008): Origin of the fittest and survival of the fittest: relating female gametophyte development to endosperm genetics. *International Journal of Plant Sciences* **169**, 79-92.
- Gaj M. D., Zhang S., Harada J. J., Lemaux P. G. (2005): Leafy cotyledon genes are essential for induction of somatic embryogenesis of *Arabidopsis*. *Planta* **222**, 977-988.
- Gambara G., Salanova M., Ciciliot S., Furlan S., Gutschmann M., Schiffli G., Ungethüm U., Volpe P., Gunga H. Ch., Blottner D. (2017): Gene Expression Profiling in Slow-Type Calf Soleus Muscle of 30 Days Space-Flown Mice. *Plos One* **12**, e0169314. <http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0169314>.
- Goldberg R. B., Paiva G. D., Yadegari R. (1994): Plant Embryogenesis: Zygote to Seed. *Science* **266**, 605-614.
- Hallgren E., Kornilova L., Fransen E., Glukhikh D., Moore S. T., Clément G., Van Ombergen A., MacDougall H., Naumov I., Wuyts, F. L. (2016): Decreased otolith-mediated vestibular

- response in 25 astronauts induced by long-duration spaceflight. *Journal of Neurophysiology* **115**, 3045-3051.
- Harada J. J. (2001): Role of *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON* genes in seed development. *Journal of Plant Physiology* **158**, 405-409.
- Herranz R., Anken R., Boonstra J., Braun M., Christianen P. C. M., de Geest M., Hauslage J., Hilbig R., Hill R. J. A., Lebert M., Medina F. J., Vagt N., Ullrich O., van Loon J. J. W. A., Hemmersbach R. (2013): Ground-Based Facilities for Simulation of Microgravity: Organism-Specific Recommendations for Their Use, and Recommended Terminology. *Astrobiology* **13**, 1-17.
- Jeong S., Eilbert E., Bolbol A., Lukowitz, W. (2016): Going mainstream: How is the body axis of plants first initiated in the embryo? *Developmental Biology* **419**, 78-84.
- Johnson C. M., Subramanian A., Edelmann R. E., Kiss J. Z. (2015): Morphometric analyses of petioles of seedlings grown in a spaceflight experiment. *Journal of Plant Research* **128**, 1007-1016.
- Katsuda S., Yamasaki M., Waki H., Miyake M., O-Ishi H., Katahira K., Nagayama T., Miyamoto Y., Hasegawa M., Wago H., Okouchi T., Shimizu T. (2014): Spaceflight Affects Postnatal Development of the Aortic Wall in Rats. *BioMed Research International* **184**, 17-26.
- Kraft T., van Loon J., Kiss J. (2000): Plastid position in *Arabidopsis* columella cells is similar in microgravity and on a random-positioning machine. *Planta* **211**, 415-422.
- Kraut M., Wójcikowska B., Ledwoń A., Gaj M. (2011): Immature zygotic embryo cultures of *Arabidopsis*. A model system for molecular studies on morphogenic pathways induced in vitro. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica* **53**, 59-59.
- Keith K., Kraml M., Dengler N. G., McCourt P. (1994): *Fusca3*: A Heterochronic Mutation Affecting Late Embryo Development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 589-600.
- Kern V. D., Schwuchow J. M., Reed D. W., Nadeau J. A., Lucas J., Skripnikov A., Sack F. D. (2005): Gravitropic moss cells default to spiral growth on the clinostat and in microgravity during spaceflight. *Planta* **221**, 149-157.
- Keyak J., Koyama A., Leblanc A., Lu Y., Lang T. (2009): Reduction in proximal femoral strength due to long-duration spaceflight. *Bone* **44**, 449-453.
- Kovalová M. (2016): *Embryogeneze rostlin v podmínkách mikrogravitace*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Kuang A., Musgrave M.E., Matthews S.W. (1996): Modification of reproductive development in *Arabidopsis thaliana* under spaceflight conditions. *Planta* **198**, 588-594.
- Kuang A., Xiao Y., McClure G., Musgrave M. E. (2000): Influence of microgravity on ultrastructure and storage reserves in seeds of *Brassica rapa* L. *Annals of Botany* **85**, 851-859.
- Kuang A., Popova A., McClure G., Musgrave M. E. (2005): Dynamics of storage reserve deposition during *Brassica rapa* L. pollen and seed development in microgravity. *International journal of plant sciences* **166**, 85-96.
- Kwong R. W., Bui A. Q., Lee H., Kwong L. W., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J. (2003): *LEAFY COTYLEDON1*-LIKE Defines a Class of Regulators Essential for Embryo Development. *The Plant Cell* **15**, 5-18.
- Lee H., Fischer R. L., Goldberg R. B., Harada J. J. (2003): *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* represents a functionally specialized subunit of the CCAAT binding transcription factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 2152-2156.
- Leitz G., Kang B. H., Schoenwaelder M. E. A., Staehelin L. A. (2009): Statolith Sedimentation Kinetics and Force Transduction to the Cortical Endoplasmic Reticulum in Gravity-Sensing *Arabidopsis* Columella Cells. *The Plant Cell* **21**: 843-860.
- Levinskikh M., Sychev V., Derendyaeva T., Signalova O., Salisbury F., Campbell W., Bingham G. E., Bubenheim G, Jahns G. (2000): Analysis of the Spaceflight Effects on Growth and Development of Super Dwarf Wheat Grown on the Space Station Mir. *Journal of Plant Physiology* **156**, 522-529.
- Link B. M., Busse J. S., Stankovic B. (2014): Seed-to-Seed-to-Seed Growth and Development of *Arabidopsis* in Microgravity. *Astrobiology* **14**, 866-875.

- Luerßen H., Kirik V., Herrmann P., Miséra S. (1998): FUSCA3 encodes a protein with a conserved VP1/ABI3-like B3 domain which is of functional importance for the regulation of seed maturation in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **15**, 755–764.
- Ma H., Sundaresan V. (2010): Chapter Thirteen-Development of Flowering Plant Gametophytes. *Current topics in developmental biology* **91**, 379-412.
- Maier J. A., Cialdai F., Monici M., Morbidelli L. (2015): The Impact of Microgravity and Hypergravity on Endothelial Cells. *BioMed Research International* **2015**, 434803. <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/434803/>.
- Meinke D. W. (1992): A homoeotic mutant of *Arabidopsis thaliana* with leafy cotyledons. *Science* **258**, 1647-1651.
- Meinke D. W., Franzmann L. H., Nickle T. C., Yeung E. C. (1994): Leafy Cotyledon Mutants of *Arabidopsis*. *The Plant Cell* **6**, 1049-1064.
- Meloni M. A., Galleri G., Pippia P., Cogoli-Greuter M. (2006): Cytoskeleton changes and impaired motility of monocytes at modelled low gravity. *Protoplasma* **229**, 243.
- Meloni M. A., Galleri G., Pani G., Saba A., Pippia P., Cogoli-Greuter M. (2011): Space flight affects motility and cytoskeletal structures in human monocyte cell line J-111. *Cytoskeleton* **68**, 125-137.
- Monici M., Marziliano N., Basile V., Romano G., Conti A., Pezzatini S., Morbidelli, L. (2006): Hypergravity affects morphology and function in microvascular endothelial cells. *Microgravity - Science and Technology* **18**, 234-238.
- Morey-Holton E. R. (2003): The impact of gravity on life. In: *Evolution on planet earth: the impact of the physical environment*. (Rothschild L. J., Lister A. M. eds.), Elsevier Academic Press, London, 143-159.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Musgrave M. E., Kuang A., Xia Y., Staut S. C., Bingham G. E., Briarty G., Levinskikh M. A., Sychev V. N., Podolski I. G. (2000): Gravity independence of seed-to-seed cycling in *Brassica rapa*. *Planta* **210**, 400–406.
- Najrana T., Sanchez-Esteban J. (2016): Mechanotransduction as an Adaptation to Gravity. *Frontiers in Pediatrics* **4**, 140.
- Nakashima J., Liao F., Sparks J. A., Tang Y., Blancaflor E. B. (2013): The actin cytoskeleton is a suppressor of the endogenous skewing behaviour of *Arabidopsis* primary roots in microgravity. *Plant Biology* **16**, 142-150.
- Parcy F., Valon C., Kohara A., Miséra S., Giraudat J. (1997): The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development. *The Plant Cell* **9**, 1265-1277.
- Pardo S. J., Patel M. J., Sykes M. C., Platt M. O., Boyd N. L., Sorescu G. P., Xu M., van Loon J. J. W. A., Wang M. D., Jo H. (2005): Simulated microgravity using the Random Positioning Machine inhibits differentiation and alters gene expression profiles of 2T3 preosteoblasts. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* **228**, C1211-C1221.
- Plieth C., Trewavas A. J. (2002): Reorientation of Seedlings in the Earth's Gravitational Field Induces Cytosolic Calcium Transients. *Plant Physiology* **129**, 786–796.
- Rajjou L., Gallardo K., Debeaujon I., Vandekerckhove J., Job C., Job D. (2004): The Effect of α -Amanitin on the *Arabidopsis* Seed Proteome Highlights the Distinct Roles of Stored and Neosynthesized mRNAs during Germination. *Plant Physiology* **134**, 1598–1613.
- Reidt W., Wohlfarth T., Ellerström M., Czihal A., Tewes A., Ezcurra I., Rask L., Bäumlein H. (2000): Gene regulation during late embryogenesis: the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the FUS3 gene product. *The Plant Journal* **21**, 401–408.
- Ruyters G., Braun M. (2014): Plant biology in space: recent accomplishments and recommendations for future research. *Plant Biology* **16**, 4–11.
- Sano N., Rajjou L., North H. M., Debeaujon I., Marion-Poll A., Seo M. (2015): Staying Alive: Molecular Aspects of Seed Longevity. *Plant and Cell Physiology* **57**, 660-674.
- Schultz E. R., Zupanska A. K., Manning-Roach S., Camacho J., Levine H. G., Paul A., Ferl R. J. (2012): Testing the Bio-compatibility of Aluminum PDFU BRIC Hardware. *Gravitational and Space Biology* **26**, 48-63.

- Smith, A. M. (2012): Starch in the Arabidopsis plant. *Starch/Stärke* **64**, 421–434.
- Sparkes I. A., Frigerio L., Tolley N., Hawes C. (2009): The plant endoplasmic reticulum: a cell-wide web. *Biochemical Journal* **423**, 145-155.
- Sprunck S., Groß-Hardt R. (2011): Nuclear behavior, cell polarity, and cell specification in the female gametophyte. *Sexual Plant Reproduction* **24**, 123-136.
- Švegždienė D., Koryznienė, D., Raklevičienė D. (2010): Comparison Study of Gravity-Dependent Displacement of Amyloplasts in Statocytes of Cress Roots and Hypocotyls. *Microgravity Science and Technology* **23**, 235-241.
- Tsuchiya Y., Nambara E., Naito S., McCourt P. (2004): The FUS3 transcription factor functions through the epidermal regulator TTG1 during embryogenesis in Arabidopsis. *The Plant Journal* **37**, 73-81.
- Vicient C. M., Bies-Etheve N., Delseny M. (2000): Changes in gene expression in the *leafy cotyledon1 (lec1)* and *fusca3 (fus3)* mutants of *Arabidopsis thaliana* L. *Journal of Experimental Botany* **51**, 995-1003.
- Vitha S., Baluška F., Jasik J., Volkmann D., Barlow P. W. (2000): Steedman's Wax for F-Actin Visualization. *Actin: A Dynamic Framework for Multiple Plant Cell Functions* **89**, 619-636.
- Wójcikowska B., Jaskóła K., Gąsiorek P., Meus M., Nowak K., Gaj M. D. (2013): *LEAFY COTYLEDON2 (LEC2)* promotes embryogenic induction in somatic tissues of Arabidopsis, via YUCCA-mediated auxin biosynthesis. *Planta* **238**, 425-440.
- Wuest S. L., Stern P., Casartelli E., Egli M. (2017): Fluid Dynamics Appearing during Simulated Microgravity Using Random Positioning Machines. *PLoS ONE* **12**, e0170826. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0170826>.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BRIC	Biological Research in Canisters
CIM	kalus indukující médium (callus-inducing medium)
CTAB	hexadecyltrimethylamoniumbromid
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina
ISS	Mezinárodní vesmírná stanice
<i>LEC</i>	<i>LEAFY COTYLEDON</i>
MS	Murashige a Skoog
PBS	fosfátový pufr (Phosphate Buffered Saline)
PCR	polymerázová řetězová reakce
PSV	vakuola se zásobními proteiny (protein storage vacuole)
RNA	ribonukleová kyselina
RPM	Random Positioning Machine
SIM	stonkové výhony indukující médium (shoot-inducing medium)
Tris	tris(hydroxymethyl)aminomethan