

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2016

Markéta Kovalová

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Embryogeneze rostlin v podmínkách mikrogravitace

Bakalářská práce

Markéta Kovalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2016

Vedoucí práce: doc. RNDr. Vladan Ondřej, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením doc. RNDr. Vladana Ondřeje, Ph.D. za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne

.....

Souhrn

Každá rostlina během svého života prochází procesem embryogeneze, během kterého dochází k tvorbě základního stavebního plánu. Tento proces ovlivňuje řada vnějších i vnitřních faktorů. Jedním z vnějších faktorů ovlivňující embryogenezi je i gravitace. V rámci této bakalářské práce byl pozorován vliv mikrogravitace na expresi genů, které jsou zapojené do procesu embryogeneze. Pomocí real-time PCR byla srovnávána exprese genů *SIN1*, *KAN1*, *PCNA1* a *LEA4-5* u šesulí s nezralými semeny inkubovaných za normálních gravitačních podmínek a šesulí s nezralými semeny, které byly vystaveny simulované mikrogravitaci.

Vlivem mikrogravitace došlo ke změnám v expresi u genů *KAN1*, *PCNA1* a *LEA4-5*. U genu *SIN1* nebyla pozorována změna v expresi oproti šesulím, které byly inkubovány za normálních gravitačních podmínek.

Summary

Every plant passes the process of embryogenesis in its life, during which is established basic plant body organization. This process is influenced by many external and internal factors. One of the external factors is also microgravity. In this work I studied the influence of microgravity on expression of genes which are involved in embryogenesis. Real-time PCR was used for comparison of expression of genes *SIN1*, *KAN1*, *PCNA1* and *LEA4-5* in siliques with immature seeds, which were incubated under normal gravity conditions and in siliques with immature seeds, which were exposed to the simulated microgravity.

Microgravity has affected expression of genes *KAN1*, *PCNA1* and *LEA4-5*. There was not observed any change in expression of gene *SIN1* compared to siliques, which were incubated under normal conditions.

Poděkování

Chtěla bych poděkovat panu doc. RNDr. Vladanu Ondřejovi, Ph.D. za odborné vedení mé bakalářské práce. Za jeho cenné rady, připomínky a čas, který mi věnoval. Také bych ráda poděkovala paní Mgr. Michaela Švécarové, Ph.D. za veškerou pomoc při práci v laboratoři i psaní této práce.

Obsah

1	Cíle práce.....	8
2	Úvod	9
3	Současný stav řešené problematiky	10
3.1	Rostlinná embryogeneze	10
3.1.1	Samčí a samičí gametofyt, dvojité oplození.....	10
3.1.2	Stádia embryogeneze	11
3.1.3	Změny v polaritě v průběhu embryogeneze	13
3.2	Mikrogravitace	14
3.2.1	Vliv mikrogravitace na rostliny	15
3.2.2	Vliv mikrogravitace na živočichy a člověka	17
3.3	Genetické pozadí embryogeneze	19
3.3.1	SHORT INTEGUMENT	19
3.3.2	KANADI	20
3.3.3	PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN	21
3.3.4	LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEINS	22
4	Materiál a metody	24
4.1	Biologický materiál.....	24
4.2	Vybavení laboratoře.....	24
4.3	Seznam použitých chemikálií	24
4.4	Seznam použitých roztoků a růstových médií	25
4.5	Seznam použitých komerčních kitů	26
4.6	Pěstování pokusných rostlin	27
4.7	Příprava mikroskopických preparátů	28
4.8	Izolace DNA	28
4.9	Izolace RNA	28

4.10	Ošetření RNA DNázou.....	29
4.11	Přepis RNA do cDNA	29
4.12	PCR reakce	29
4.13	Real-time PCR.....	30
4.14	Elektroforetická separace	31
5	Výsledky.....	32
5.1	Výsledky studií embryonálního vývoje	32
5.2	Analýza exprese genů	33
6	Diskuze	39
7	Závěr.....	41
8	Seznam použité literatury	42
9	Seznam použitých zkratk	47

1 Cíle práce

Cílem této bakalářské práce je vypracovat literární rešerši o embryogenezi rostlin, mikrogravitaci a jejím známém vlivu na rostliny, živočichy a člověka a o vybraných genech, které byly použity na další analýzu. Dále zvládnout metody izolace RNA i DNA, reverzní transkripce a PCR. Pomocí kvantitativní real-time PCR popsat změny v expresi vybraných genů způsobené působením simulované mikrogravitace.

2 Úvod

Embryogenze je prvotní fáze rostlinného vývoje. Začíná splynutím samčího a samičího gametofytu za vzniku jednobuněčné zygoty. Tato zygota následně podléhá sérií dělení a růstu, čímž vznikne zralé mnohobuněčné embryo. Embryo v průběhu embryogeneze plynule prochází několika fázemi vývoje. Nejprve lze pozorovat globulární embryo s buňkami suspenzoru. Následně dochází k zakládání děloh a embryo přechází do stádia srdčitého. Vývinem děložních listů a prodlužováním se z embrya srdčitého stává embryo torpédovité. V poslední fázi embryogeneze lze pozorovat embryo se zcela vyvinutými děložními listy a kořínkem. Po embryogenezi následuje stádium dormance neboli období klidu. Při přípravě na toto období dochází k ukládání zásobních látek a snížení obsahu vody. V průběhu rostlinné embryogeneze nedochází k vývoji všech orgánů, tak jako je tomu u živočichů. K vývoji orgánů dochází až v průběhu života a to z meristémů, které byly založeny v průběhu embryogeneze.

Na správném vývoji embrya, a tím i celé rostliny, se podílí celá řada vlivů, ať už vnitřních, jako je souhra genů, nebo vnějších, jako je například dostatek slunečního záření nebo živin. Gravitační síla patří mezi vnější vlivy. Její vliv, lze mimo jiné pozorovat při orientaci rostlinného kořene.

V současnosti se pohybujeme v době, kdy dlouhotrvající vesmírné lety nejsou jen myšlenkou, ale již dostávají podobu plánů a postupných realizací. Ztráta gravitační síly je pro rostlinu stresovým faktorem, se kterým by se musela ve vesmíru vyrovnat. Proto se v poslední době studuje schopnost rostlin vyrovnávat se s tímto stresovým faktorem. Pozoruje se vliv na jejich morfologii či schopnost rozmnožování. Současné studie již přináší odpovědi na některé otázky, jako například jaký vliv má ztráta gravitace na kořeny nebo zdali jsou rostliny schopné přežít ve vesmíru celý svůj životní cyklus. Všechny tyto poznatky jsou nezbytné pro plánované dlouhotrvající vesmírné lety, jelikož rostliny mohou být nejen potravou pro astronauty, ale také jistou psychickou podporou.

3 Současný stav řešení problematiky

3.1 Rostlinná embryogeneze

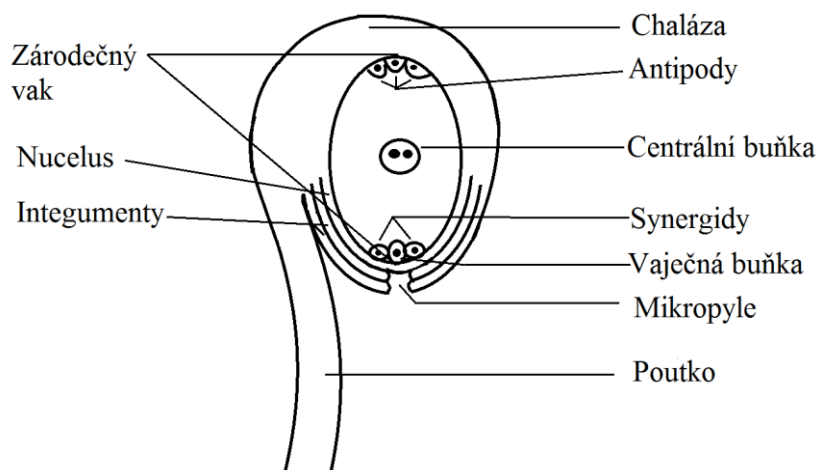
Embryogeneze je proces, během kterého se jednobuněčná zygota vyvíjí v mnohobuněčné embryo. Zygota prochází sérií událostí, během kterých se vytváří základní stavební plán rostliny a osy těla. Nejprve dojde k vytvoření apikálně-bazální osy, což je následované tvorbou osy radiální a nakonec se vytvoří bilaterální symetrie (De Smet *et al.*, 2010).

Obecně můžeme embryogenezi rozdělit do tří fází. V první fázi dochází k vytvoření polární osy, zakládání kořenového a stonkového vrcholu a formování embryonálních tkání a orgánů. Druhá fáze je charakteristická zráním embrya a akumulací zásobních látek. V poslední fázi je embryo vysušeno a vstupuje do dormance (West *et al.*, 1993).

3.1.1 Samčí a samičí gametofyt, dvojité oplození

Pro vznik zygoty je nejprve nutné splynutí samčí a samičí gamety, které jsou uloženy v samčím a samičím gametofytu. Samčí gametofyt neboli pylové zrno, je složené ze dvou buněk, generativní a vegetativní, uložených v pevném obalu. Generativní buňka se mitotickým dělením rozdělí na dvě spermatické buňky a z buňky vegetativní vzniká pylová láčka. Samičí gametofyt, označován také jako zárodečný vak, je uložený uvnitř vajíčka. U chalazálního pólu jsou v zárodečném vaku uloženy tři antipody, na opačném mikropylárním konci jsou uloženy dvě synergidy a vaječná buňka. Dále se v zárodečném vaku nachází centrální buňka (Cambell *et al.*, 2008; Berleth *et al.*, 2002).

Dvojité oplození je jev typický pro krytosemenné rostliny a dochází při něm ke splynutí gamet. Na začátku dvojitého oplození prorůstá pylová láčka přes mikropyle do vajíčka, čímž do něj proniknou spermatické buňky. První haploidní spermatická buňka splývá s haploidní buňkou vaječnou za vzniku diploidní zygoty. Ta se dále vyvíjí v procesu embryogeneze. Druhá haploidní spermatická buňka splývá s diploidní centrální buňkou za vzniku triploidního endospermu. Endosperm v průběhu embryogeneze poskytuje výživu pro vyvíjející se embryo (Berleth *et al.*, 2002; West *et al.*, 1993).



Obrázek číslo 1: Schéma vajíčka

Překresleno podle: Pavlová *et Fischer*, 2011; Cambell *et Reece*, 2008

3.1.2 Stádia embryogeneze

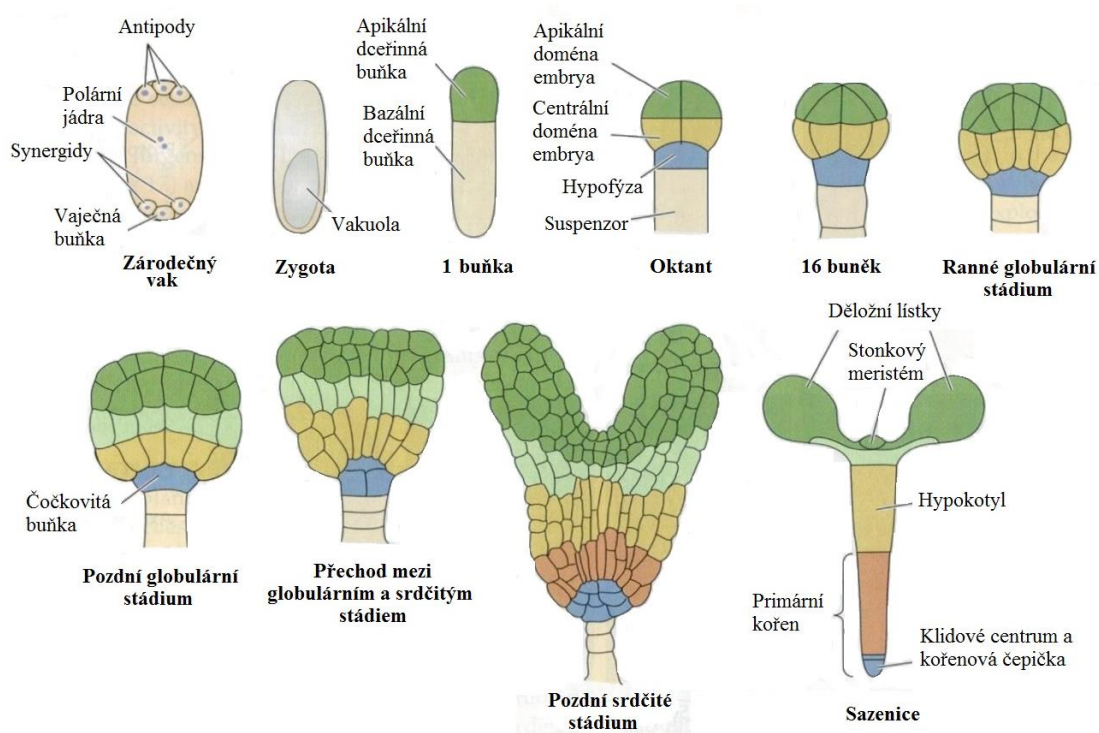
Vývoj embrya

Splynutím spermatické a vaječné buňky vznikne zygota. Na začátku embryogeneze dochází k asymetrickému dělení zygoty, čímž vznikne menší apikální buňka a větší buňka bazální. Z apikální buňky se poté vyvíjí embryo a z buňky bazální suspensor (De Smet *et al.*, 2010).

Suspensor se dělí transversálně do konečného počtu osmi buněk. Z první buňky suspensoru, která přiléhá k embryu, vznikne v průběhu vývoje hypofýza. Zbytek suspensoru zanikne po dokončení globulární fáze embrya (Pavlová *et Fischer*, 2011).

První dělení apikální buňky je dělení podélné. Přepážky se tvoří paralelně s osou mikropyle – chaláza a vznikne stádium zvané tetráda. Ta se následně dělí transversálně, čímž vznikne oktant, u něhož leží ve dvou vrstvách dvě tetrády. Z horní tetrády v budoucnu vznikne apikální část embrya - základ stonkového meristému a vnitřní (adaxiální) části děloh. Ze spodní tetrády naopak vznikne vnější (abaxiální) část děloh, hypokotyl, proximální vrstvy apikálního kořenového meristému a kořen. Následujícím radiálním dělením vznikne embryo se šestnácti buňkami. V této době se také začnou diferenciovat buňky protodermu, ze kterých následně vznikne ektodermis. Vnitřní část embrya je tvořena centrálním meristémem, který se v průběhu globulárního stádia dělí asymetricky. V pozdním globulárním stádiu se ustanoví epifýza (stonkový pól) a z buňky suspensoru vznikne hypofýza (kořenový pól), která podléhá asymetrickému dělení za vzniku apikální čočkovité

a větší bazální buňky. Tyto buňky dají základ kořenovému meristému a kořenové čepičce. Následujícím stádiem embryogeneze je stádium srdčité, které je charakteristické vývojem děloh. Dále také oddalováním stonkového a kořenového pólu, což vede ke vzniku hypokotylu, a v centrální oblasti embrya se tvoří prokambium. Mezi prokambiem a protodermem se nacházejí buňky základního meristému. Po dokončení vývoje děloh a prodloužení hypokotylu vstupuje embryo do torpédovitého stádia. Poslední fáze embryogeneze je maturace, při které dochází ke zvětšování embrya, syntéze a ukládání zásobních látek, snížení obsahu vody a následně i metabolické aktivity (Pavlová *et Fischer*, 2011; Goldberg *et al.*, 1994).



Obrázek číslo 2: Stádia embryogeneze

Převzato a upraveno dle: Taiz L., Zeiger E. (2010) *Plant physiology, Fifth Edition*, Sinauer Associated, Inc., USA

Vývoj endospermu

Po splynutí spermatické buňky s centrální buňkou vzniká endosperm neboli zásobní pletivo. U rostlin se lze setkat s několika typy endospermu – buněčným (celulárním), jaderným (nukleárním) a helobiálním. U *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje jaderný endosperm. Tento typ endospermu se začíná vyvíjet v raných fázích embryogeneze, přičemž

první dělení bývá ještě před dělením zygoty. V pozdějších fázích embryogeneze je endosperm spotřebováván embryem a na konci embryogeneze je redukován pouze na jednu vrstvu buněk. Při dělení jaderného endospermu nedochází k tvorbě buněčných přepážek po každém dělení jádra, což vede ke vzniku syncytia neboli mnohojaderného coenocytu. Endosperm není po celé délce homogenní a lze ho rozdělit na tři části – endosperm přiléhající k embryu, endosperm vznikající ve střední části a endosperm v chalazální části. Na začátku je vývoj endospermu u všech částí stejný, ale po prvních třech mitotických dělení se již jednotlivé části vyvíjejí zvlášť. Endosperm přiléhající k embryu se obvykle vyvíjí nejrychleji a je také nejdříve spotřebován, naopak vývoj endospermu u chalazálního pólu trvá nejdéle. Endosperm ve střední části bývá zpravidla největší s nejvyšším obsahem zásobních látek (Pavlová *et Fischer*, 2011).

3.1.3 Změny v polaritě v průběhu embryogeneze

Významnou roli v embryogenezi hraje polarita. Polaritu je možné sledovat ještě před oplozením u zárodečného vaku, kde na jednom pólu buňky leží vaječné buňka se synergidami a na pólu opačném se nachází antipody. Polaritu vykazuje také samotná vaječná buňka, u které se na mikropylárním pólu nachází vakuola, kdežto chalazální pól obsahuje cytoplazmu (Souter *et Lindsey*, 2000).

Vzápětí po oplození zygota svou polaritu ztrácí, jelikož signály způsobující polaritu zárodečného vaku po oplození vymizí. Ztráta polarity se projeví umístěním jádra ve středu a rovnoměrným rozdělením vakuol. Pro re-polarizaci jsou nezbytné zinc-finger *WRKY2* transkripční faktory. U *wrky2* mutantů dojde po oplození k depolarizaci, jako u wild-type (WT) rostliny, nicméně polarita není znovu stanovena a následující dělení je symetrické, místo asymetrického. *WRKY2* má také vliv na expresi *WUSCHEL RELATED HOMEODOMAIN* (*WOX*) genů. Po re-polarizaci dochází ke spuštění exprese *WOX8* a *WOX9* genů a tyto geny autonomně spouští expresi genu *WOX2*. Expresí těchto tří genů je po prvním asymetrickém dělení nerovnoměrná - *WOX2* je exprimován v apikální buňce, zatímco *WOX8* a *WOX9* v buňce bazální. Expresí genu *WOX2* v apikální buňce následně spouští expresi *PINFORMED1* (*PIN1*) proteinu, který podporuje polární transport auxinů (Wendrich *et Weijers*, 2013; Breuninger *et al.*, 2008).

Polární transport auxinů má významný vliv na polaritu a vývoj embrya, přičemž je závislý na příslušných transportních proteinech a také na pH prostředí. Transport bude vysvětlen na jednom z přirozeně vyskytujících se auxinů a to kyselině indol-3-octové (IAA).

V neutrálním prostředí cytosolu dochází k částečné disociaci IAA. V nedisociovaném stavu může IAA pronikat do cytosolu pasivně pomocí difúze. Pokud však dojde k disociaci, je aniont IAA⁻ transportován pomocí aktivního transportu. Jedná se o symport se dvěma H⁺ a to pomocí přenašeče *AUXIN-RESISTANT1* (*AUX1*) případně pomocí jeho homologů *LIKE-AUXIN RESISTANT* (*LAX1*). Přenos z cytosolu do apoplastu zajišťují *PIN* proteiny, které jsou kódovány osmi geny. *PIN* proteiny jsou neustále recyklovány pomocí endosomálních kompartmentů buňky a jejich rozmístění určuje směr transportu auxinů. Na začátku embryogeneze dochází k transportu auxinů ze suspensoru do apikální buňky pomocí komplexů *PIN7*, které jsou lokalizovány v apikální části membrány, čili směrem k embryu. V membráně apikální buňky se nacházejí proteiny *PIN1*. Transport auxinů do embrya probíhá až do doby, kdy je embryo složeno z 32 buněk. Poté dochází ke změně transportu, kdy transportní proteiny *PIN7* změni lokalizaci v buňkách suspensoru z apikální na bazální. Bazálně jsou lokalizovány také *PIN1*, jež se nacházejí v centrální oblasti embrya. Tato změna způsobí, že auxiny syntetizující se v embryu jsou transportovány do hypofýzy a suspensoru. Další změna transportu se odehrává při zakládání děloh. V centrální zóně dojde k přesunu *PIN1* proteinů a jejich umístění kolmo k hranici mezi periferní a centrální částí embrya, což vede k tomu, že auxiny jsou transportovány směrem k vrcholům zakládajících se děloh. Auxiny mají vliv také na bazální buňku. V této části rostliny je signál přenášén řadou dalších efektorů, které jsou kódovány například geny *MONOPTEROS* (*MP*), *BODENLOS* (*BD*) a *IAA13*. Mutanti v těchto genech mají téměř stejné projevy. Dochází k poruchám tvorby hypokotylu, základu kořenového meristému a také je narušena diferenciací prokambia, a následně tak i vodivých pletiv. Tito mutanti jsou však schopni v podmínkách *in vitro* přežít (Pavlová et Fischer, 2011).

3.2 Mikrogravitace

Gravitační síla je jednou ze základních sil, která působí na Zemi a v celém Vesmíru. Působí na všechny objekty a svým působením vytváří sférický tvar planet. Univerzální gravitační zákon popsal v roce 1684 Isaac Newton takto: „*Libovolná dvě tělesa se přitahují silou, která je přímo úměrná součinu jejich hmotností a nepřímo úměrná čtverci jejich vzdálenosti.*“ (Bajer, 2008). Tento zákon platí v celém vesmíru. Hodnota gravitační síly je pro každé vesmírné těleso jiná. Pro planetu Zemi se její hodnota rovná 9,81 m·s⁻², což lze také vyjádřit jako 1g. Od této hodnoty se následně odvozují gravitační síly ostatních těles.

Jak již bylo zmíněno, gravitační síla působí všude ve vesmíru, proto představa, že stav beztlíže na vesmírných stanicích je způsoben tím, že se nacházejí daleko od Země, je

mylná. Vesmírné stanice se totiž nacházejí relativně blízko Země, jsou vzdálené pouze 300 – 500 km. Na vesmírnou stanici, která by byla od Země vzdálená okolo 350 km, by působila gravitační síla o hodnotě $9,04 \text{ m}\cdot\text{s}^{-2}$, čili síla, která je oproti gravitační síle Země menší asi o 8 %. Tato skutečnost však není reálná, jelikož vesmírné stanice nejsou statické, ale pohybují se po oběžné dráze. Vesmírná stanice kolem Země padá rychlostí přibližně $28\,000 \text{ km}\cdot\text{h}^{-1}$ a tento pád generuje tak zvaný stav beztlíže. Aby byla hodnota síly, která působí na astronauty uvnitř vesmírné lodi rovna nule, muselo by být gravitační pole Země homogenní. To není, a z toho důvodu i uvnitř vesmírné lodi působí gravitační síla, která je však velmi malá, a proto mluvíme o mikrogravitaci (Van Loon, 2007; Bajer, 2008).

3.2.1 Vliv mikrogravitace na rostliny

Rostliny jsou podstatnou součástí bioregenerativního život-podporujícího systému a z tohoto důvodu jsou důležitou součástí vesmírného biologického výzkumu. Rostliny by mohly sloužit jako producenti kyslíku, ale i jako zdroj potravy pro astronauty při dlouhodobě trvajících vesmírných pobytech (Millar *et al.*, 2011). Nejprve je však nutné porozumět vlivu vesmírných podmínek na růst a vývoj rostlin. Pro pochopení vlivu mikrogravitace na rostliny je ale potřeba nejprve vysvětlit, jak na rostlinu působí gravitace vyskytující se na Zemi.

Gravitace významně ovlivňuje růst a vývoj rostlin, jelikož zůstala v průběhu evoluce konstantní. U rostlin se vyvinul gravitropismus jako odpověď na gravitaci. Gravitropismus lze obecně rozdělit do tří fází: příjem signálu, převod signálu a odpověď na signál. Za příjem signálu jsou odpovědné statocyty, což jsou specializované buňky stonku a kořene u všech kvetoucích rostlin. Statocyty obsahují amyloplasty se škrobem, které plní funkci senzoru (Millar *et al.*, 2011). Další fází je transdukce signálu, která není ještě dokonale pochopena. Předpokládá se, že transdukce se účastní aktinový cytoskelet a mechanosenzitivní iontové kanály, které jsou obsažené v plazmatické membráně endoplazmatického retikula (Herranz *et Medina*, 2013). Finální fází gravitropismu je odpověď na počáteční signál. Touto odpovědí je růst ovlivněný působením gravitace (Millar *et al.*, 2011). Při odpovědi na působení gravitace dochází k nerovnoměrnému růstu. U kořene se buňky, které jsou na straně bližší signálu, prodlužují pomaleji, kdežto buňky, na straně odvrácené, rychleji. To způsobuje, že kořen vykazuje pozitivní gravitropismus. U stonku, který je negativně gravitropický, je situace opačná. Nerovnoměrný růst je ovlivněn transportem auxinů. Příkladem může být kořen, který je orientován horizontálně, ne tedy ve směru působení gravitace. U něj se *PIN3* proteiny, zodpovědné za transport auxinů, nacházejí na spodní straně statocytů, čímž dojde k akumulaci auxinů na spodní straně růstové zóny kořene.

Zvýšená koncentrace vede k pomalejšímu prodlužování buněk na dolní straně, oproti buňkám na straně horní, což vede k ohnutí kořene ve směru působení gravitace (Pavlová *et Fischer*, 2011). Gravitropismus je nezbytný pro růst a vývoj rostlin. U kořenů je využíván pro usnadnění přístupu k živinám uloženým v půdě, naopak u stonků slouží k nejvýhodnějšímu uložení listů pro příjem světla a tedy efektivní fotosyntéze (Herranz *et Medina*, 2013).

Od začátku letů do vesmíru již byly provedeny četné studie zkoumající vliv mikrogravitace na růst a vývoj rostlin (Kiss J. Z., 2013). Obecně je ztráta gravitace považována za stresující událost a za dobu letů do vesmíru byly prokázány mnohé abnormality způsobené vlivem mikrogravitace. Příkladem mohou být chromozomální zlomy, morfologické abnormality nebo neschopnost produkce semen (Link *et al.*, 2014).

Millar *et al.* (2011) pozorovali vliv mikrogravitace na vývoj kořene u rostliny *Arabidopsis thaliana*. Experiment byl proveden v rámci mise STS-131 na oběžné dráze. Rostliny byly pěstovány ve tmě na Petriho miskách s živným médiem a byly vystaveny 309 hodinám mikrogravitace při okolní teplotě 22 °C. Pozemské kontroly byly pěstovány za stejných podmínek. Petriho misky se vzorky i kontrolami byly uloženy vertikálně. Rostliny pěstované v podmínkách mikrogravitace nevykazovaly významný rozdíl v délce oproti kontrolním vzorkům a všechny vzorky vykazovaly etiolizovaný vzhled typický pro pěstování ve tmě. Byly zde však významné morfologické rozdíly v růstu kořene. U vzorků vystavených mikrogravitaci bylo pozorováno extrémní zakřivení kořenů jedním směrem. Takovéto zakřivení bylo pozorováno i u kontrolních rostlin, avšak zakřivení u vzorků bylo mnohem větší. Směr zakřivení je u různých ekotypů rozdílný. V tomto experimentu byl použit ekotyp Landsberg a zakřivení bylo směrem vlevo. Experimentální data ukazují, že u rostlin se vyskytují endogenní reakce, které způsobují zakřivení kořenů. Stejně výsledky pozorovali také Nakashima *et al.* (2013). Tyto reakce jsou však v gravitačních podmínkách Země do značné míry maskovány. V rámci experimentu v průběhu mise STS-131 bylo také pozorováno zvýšené množství adventivních kořenů u vzorků oproti kontrolním rostlinám. Adventivní kořeny vyrůstají z pericyklu, což je místo s vysokou mitotickou aktivitou. Je tedy možné, že mikrogravitace zvyšuje mitotickou aktivitu v pericyklu, což vede ke zvýšené tvorbě adventivních kořenů. Další experimenty na vliv mikrogravitace na kořeny provedli Nakashima *et al.* (2013), kteří kromě vlivu mikrogravitace na růst kořenů také pozorovali její vliv na aktinový cytoskelet. Aktinový cytoskelet je pravděpodobně zapojen v odpovědi kořene na gravitaci. Mutanti *act 2-5* vykazují silnější odpověď na gravitaci oproti WT

roślinám. Tyto výsledky tedy naznačují, že by aktinový cytoskelet mohl být negativním regulátorem gravitropismu. Nakashima *et al.* (2013) ve svém experimentu použili WT rostliny a *act 2-3* mutanty. Tyto rostliny byly pěstovány jak v pozemních podmínkách, tak v podmínkách mikrogravitace na raketoplánu Discovery. Všechny rostliny byly pěstovány ve tmě na Petriho miskách s 1,2% phyta-agarem. U rostlin pěstovaných v podmínkách mikrogravitace bylo pozorováno zakřivení vlevo, které bylo mnohem výraznější u *act 2-3* mutantů oproti WT rostlinám. U rostlin pěstovaných v 1g podmínkách nebyl pozorován výrazný rozdíl v zakřivení mezi WT a *act 2-3*. V rámci experimentu byly pozorovány další rozdíly mezi WT a *act 2-3*. Společným znakem pro WT a *act 2-3* pěstovaných v podmínkách mikrogravitace bylo zvýšené množství vakuol oproti rostlinám pěstovaných při 1g. U *act 2-3* pěstovaných v mikrogravitaci byl také pozorován slabý vývoj kořenové čepičky a docházelo u nich k narušení nově vzniklých buněčných stěn.

Další experimenty se zaměřily na vliv mikrogravitace na buňky specializované na vnímání gravitace, čili statocyty. Experimenty naznačují, že u embryí, které se vyvíjí v podmínkách mikrogravitace, jsou statocyty přítomné, avšak nefunkční. Amyloplasty se v těchto statocytech koncentrují ve středu buňky a nesedimentují jako u amyloplastů u rostlin rostoucích v podmínkách 1g. Amyloplasty se také tvarem i velikostí liší od amyloplastů vyskytujících se při 1g (Kordyum E. L., 2014).

V neposlední řadě byly prováděny experimenty sledující vliv mikrogravitace na fototropismus. Na sledování odpovědi *Arabidopsis thaliana* na červené a modré světlo v podmínkách mikrogravitace a podmínkách 1g byl zaměřen projekt TROPI-2, který prováděli Kiss *et al.* (2012). V rámci tohoto projektu sledovali silné pozitivní zakřivení hypokotylů a kořenů jako odpověď na jednosměrné červené záření u rostlin pěstovaných v mikrogravitaci. Zakřivení se také vyskytovalo u rostlin pěstovaných v podmínkách 1g, bylo však výrazně menší. Modré světlo způsobuje silné pozitivní zakřivení hypokotylů u rostlin na Zemi, avšak v podmínkách mikrogravitace rostliny vykazují velkou variabilitu v odpovědi na modré světlo. U kořenů, které vykazují pouze slabou fototropickou reakci na modré světlo v pozemských podmínkách, byl pozorován silně negativní fototropismus v případě, že rostly v podmínkách mikrogravitace (Kiss, 2013).

3.2.2 Vliv mikrogravitace na živočichy a člověka

Rostliny nejsou jediné organismy, které mikrogravitace ovlivňuje. Mikrogravitace má vliv na všechny organismy, které jsou jí vystaveny, čili na zvířata i na člověka. U testů

na zvířatech a lidech je problém s omezeným počtem subjektů, které testy na vliv mikrogravitace podstoupí. I přesto byly pozorovány jisté abnormality, například změny v zastoupení imunitních buněk (Crucian *et al.*, 2015), změny na kostře (Vico *et al.*, 2000) i kůži (Neutelings *et al.*, 2015).

Změny v imunitním systému pozorovali Crucian *et al.* (2015). Jejich studie zahrnovala pozorování 23 astronautů, 18 mužů a 5 žen s průměrným věkem 53 let. Šestnáct subjektů bylo mikrogravitaci vystaveno po dobu šesti měsíců, pět méně než 100 dní a zbylé dva subjekty méně než 60 dní. Ve studii pozorovali změny v imunitě ve třech časových intervalech a veškerá získaná data byla porovnávána s daty, které byly získány 180 dní před startem. V případě krátkodobých letů do vesmíru (7 – 14 dní) nelze získaná data použít pro průkaz vlivu mikrogravitace na imunitní systém, a to zejména z toho důvodu, že krátké lety jsou mnohem náročnější a tedy i více stresující, což se odráží ve změnách v imunitním systému. V průběhu dlouhotrvajících letů do vesmíru se u astronautů vyskytovalo zvýšené množství červených krvinek a to jak v raných, tak i pozdních časových intervalech. Po delší době byl také pozorován nárůst v počtu NK buněk, avšak v množství T-lymfocytů nebyly zaznamenány změny v průběhu celé doby studie.

Další pozorované změny vlivem mikrogravitace byly změny na kostře a to v úbytku kostní tkáně u několika kostí měřené pomocí změn v hustotě kostního minerálu. Do studie bylo zahrnuto 22 astronautů, kteří strávili ve vesmíru od jednoho do šesti měsíců. Patnáct astronautů letělo do vesmíru poprvé, zbylých sedm již absolvovali jeden až čtyři lety do vesmíru. U holenní kosti byly pozorovány změny už po prvním měsíci ve vesmíru. Rozdíl byl v úbytku kostní tkáně. U vnitřní houbovitě kostní tkáně byl úbytek větší, oproti úbytku v povrchové kompaktní kostní tkáni. U kosti vřetenní nebyla pozorována žádná obecná tendence ke změnám v průběhu celé studie. Na ztráty kostní hmoty byly citlivé zejména kosti, které jsou na Zemi zapojené do lokomoce. V průběhu studie bylo pozorováno mnoho individuálních variant, což ale mohla ovlivnit dieta, genetické predispozice nebo jiné koaktivátory. Po návratu na Zem byla zaznamenána obnova kostní tkáně, tento proces však byl velmi pomalý (Vico *et al.*, 2000).

Vlivu mikrogravitace bylo vystaveno již velké množství buněk různého typu a to například lidské osteoblasty (Sakar *et al.*, 1999), myší kmenové buňky kostní dřeně (Colvin *et al.*, 2002), buňky rakoviny prsu (Vassy *et al.*, 2003) a další. U většiny pozorovaných buněk dochází ke změnám v cytoskeletu, které spočívají v narušení jeho organizace. Po odstranění vlivu mikrogravitace se cytoskelet znovu reorganizuje, avšak většinou již v jiné konfiguraci

než byla původní, což vede ke změnám v jádře a tvaru buňky. Buňky také často podléhaly apoptóze (Crawford-Young, 2006). U buněk rakoviny prsu byly také pozorovány změny v buněčném cyklu a to navýšením v počtu mitóz, což mohlo být následkem změn v mikrotubulech (Vassy *et al.*, 2003).

3.3 Genetické pozadí embryogeneze

Pro správné fungování všech procesů v rostlinném těle, od vývoje embrya ze zygoty až po tvorbu květů a pohlavních buněk, je nutná dokonalá souhra genů. V následujícím textu budou zmíněné významy genů, které byly součástí praktické části bakalářské práce.

3.3.1 *SHORT INTEGUMENT*

SHORT INTEGUMENT (SIN) geny se zapojují do mnoha procesů při rostlinném vývoji. Ovlivňují například vývoj integumentů, květu, megasporogenezi a megagametogenezi. (Reiser *et Fischer*, 1993).

Při vývoji integumentů jsou zapojeny geny *SIN1* a *SIN2*, jejichž vlivy jsou v tomto procesu propojené i přesto, že se ve své funkci liší. *SIN1* je zodpovědný za prodlužování buněk, kdežto *SIN2* kontroluje buněčné dělení. U mutantů v obou těchto genech jsou integumenty redukovány, což způsobí odkrytí nucelu (O'Neill *et Roberts*, 2002). V případě mutantu *sin2* dojde k vývoji integumentů, nicméně obsahují méně buněk než WT. U rostlin WT jsou integumenty tvořeny přibližně 200 buňkami, kdežto u *sin2* jsou tvořeny 10 – 30 buňkami. Defekty ve vývoji vajíčka vedou k samičí specifické sterilitě. Jedno z vysvětlení vzniku této sterility je, že dojde k zastavení megasporogeneze a to jako sekundární efekt odhaleného nucelu (Broadhvest *et al.*, 2000).

SIN geny také ovlivňují tvorbu a stavbu květů. Květy se vytváří v přechodném období rostlin, které spojuje fázi juvenilní a generativní. V přechodné fázi dochází ke změně vegetativních meristémů v meristémy intermediární, neboli přechodné, ze kterých poté vzniká květenství (Pavlová *et Fischer*, 2011). U mutantů *sin1* je narušena přeměna vegetativních meristémů. Geny *SIN1* jsou také nezbytné pro expresi dalších genů, které mají přímý vliv na přeměny mezi jednotlivými typy meristémů. Příkladem těchto genů jsou *LEAFY* (*LFY*), *APETALA1* (*AP1*) a *TERMINAL FLOWER* (*TFL1*) geny (Ray *et al.*, 1996). Geny *SIN2* jsou nezbytné pro správnou stavbu pestíků a u *sin2* mutantů dochází k morfologickým změnám. U WT rostlin je pestík složen z apikální blizny, čnělky a dvou bazálních semeníků, které jsou oddělené septem. U mutantů *sin2* se nachází rozštěpy blizny nebo čnělky, případně obou těchto částí (Broadhvest *et al.*, 2000).

3.3.2 KANADI

KANADI (*KAN*) je skupina čtyř genů, která se podílí na zakládání abaxiálně-adaxiální osy. Jejich exprese ovlivňuje řadu procesů a to například vymezení centrální a periferní zóny při vývoji embrya, vývoji listů, květů a diferenciaci vodivých pletiv. Všechny tyto procesy ovlivňují také geny s homeodoménou a leucinovým zipem (*HD-ZIP III*), které jsou exprimovány v adaxiální části a mají antagonistickou funkci oproti *KAN* genům exprimovaným v abaxiální části (Merelo *et al.*, 2013).

Exprese genů *KAN* začíná již v průběhu embryogeneze a to v globulárním stádiu. Zde slouží společně s geny *HD-ZIP III* k vymezení centrální a periferní zóny. *KAN* geny vymezují periferní zónu a jsou exprimovány v periferní oblasti derivátů spodní tetrády a abaxiální oblasti základů děloh (Pavlová *et Fischer*, 2011). Vliv *KAN* genů na embryogenezi testovali Izhaki *et Bowman* (2007), kdy použili triple mutanty *kan1 kan2 kan4*. Embrya triple mutantů byla od WT rozeznatelná již v srdčitém stádiu. U triple mutantů je širší část embrya, ze které vznikne stonkový meristém a děložní lístky. Za větší šířku embrya v srdčitém stádiu může periklinální (rovnoběžně s povrchem) dělení buněk. Toto a další periklinální dělení způsobuje vznik výrůstků na abaxiální straně děložních listů.

Další vliv *KAN* genů lze pozorovat u listů. U listů WT rostlin rozlišujeme adaxiální (svrchní) a abaxiální (spodní) stranu, které se od sebe morfologicky i funkčně liší. Na adaxiální straně pozorujeme hustý palisádový parenchym, kdežto na straně abaxiální se nachází houbový parenchym s velkými mezibuněčnými prostory. Funkční odlišnost stran spočívá v tom, že adaxiální strana je specializována na pohlcení světla, kdežto abaxiální slouží k respiraci. U double mutantů *kan1 kan2* jsou listová primordia téměř radiální a anatomickou polaritu vykazují až později. Mají zachovanou hustou cytoplazmu a běžné je periklinální dělení. Jako následek vzniká vrstva 10 – 20 buněk oproti vrstvě šesti buněk u WT rostlin. Distribuce buněčného dělení však není rovnoměrná, což vede ke vzniku výrůstků na abaxiální straně. U triple mutantů *kan1 kan2 kan3* mají listy radiální tvar mnohem déle a nedochází k periklinálnímu dělení, tak jako u double mutantů (Eshed *et al.*, 2004).

Adaxiálně – abaxiální polaritu můžeme také pozorovat u cévních svazků, kde je xylém lokalizován adaxiálně a floém abaxiálně. U *kan1 kan2* double mutantů pozorujeme více možností vzájemného uspořádání xylému a floému. U většiny mutantů je však xylém posunut blíže adaxiální straně než je tomu u WT. V listech double mutantů se také vytváří

četné množství cévních svazků, které spojují výrůstky s hlavním cévním svazkem listu (Eshed *et al.*, 2004).

Obecně lze říci, že vyřazení tří ze čtyř *KAN* genů vede k přeměně abaxiálních částí listů na adaxiální. Adaxializaci podléhají cévní svazky i mezofyl a dochází k tvorbě výrůstků (Eshed *et al.*, 2004).

3.3.3 *PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN*

PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN (*PCNA*) je konzervovaný protein nacházející se u archebakterií a eukaryot. Genom každého eukaryotického organismu obsahuje alespoň jednu kopii *PCNA* genu. U *Arabidopsis thaliana* se v genomu vyskytují dva *PCNA* geny kódující proteiny *PCNA1* a *PCNA2*. Tyto proteiny vykazují 96,6% homologii v sekvenci aminokyselin, nicméně jejich funkce jsou odlišné (Strzalka *et Aggarwal*, 2013). *PCNA* poprvé popsal Miyachi *et al.* (1978) a to jako faktor vyskytující se v séru pacientů se systémovým lupus erythematoses. Jedná se o DNA klouzavou svorku, která je zapojena v řadě buněčných pochodů a to například do replikace DNA, kontroly buněčného cyklu, opravy DNA nebo koheze sesterských chromatid (Maga *et Hübscher*, 2003). Jeho důležitost také naznačují letální *pcna* mutantů. Exprese *PCNA* je spojená s buněčným dělením, čili i s replikací DNA v průběhu S fáze buněčného cyklu (Strzalka *et Aggarwal*, 2013).

PCNA je strukturně i funkčně velmi konzervovaný. Například lze stimulovat aktivitu lidské DNA polymerázy δ pomocí rostlinných *PCNA* proteinů. Polymerázy savců je možné také použít pro stimulaci dvou δ -like polymeráz vyizolovaných z embrya pšenice (Strzalka *et Ziemienowict*, 2011). Strukturně se jedná o homotrimer v případě eukaryot a heterotrimer v případě archeí (Manohar *et Acharya*, 2015).

Při replikaci s *PCNA* interaguje polymeráza δ/ϵ a další replikační proteiny. *PCNA* tak slouží jako platforma. Při replikaci se *PCNA* naváže na 3' konec primeru a pouze v jeho přítomnosti dojde k záměně polymerázy α za další polymerázy, které dokončí syntézu DNA. Komplex DNA pol δ/ϵ – *PCNA* se následně pohybuje po templátovém vlákně a dochází k syntéze vedoucího a opoždujícího se vlákna (Strzalka *et Ziemienowict*, 2011). *PCNA* se také účastní spojení Okazakiho fragmentů, kde stimuluje aktivitu proteinu *Fen1*. Tento protein společně s *Lig1* se účastní vystřížení RNA části, dosyntetizování chybějící části a následné spojení dvou úseků. (Maga *et Hübscher*, 2003).

PCNA hraje také důležitou roli při opravách DNA. V případě rostlin však tato role není dostatečně prozkoumána a jeho role se tedy spíše usuzuje podle rolí jeho homologů vyskytující se u kvasinek a zvířat. Studie těchto homologů ukazují, že klíčová funkce *PCNA* při reparacích DNA nespočívá pouze v interakci s pol δ/ϵ , ale také v interakci s dalšími reparačními proteiny. *PCNA* se uplatňuje například při báze excizní opravě, nukleotidové excizní opravě a při opravě chybného párování bází řízené metylací (Strzalka et Ziemienowict, 2011).

PCNA se také účastní kontroly buněčného cyklu, kdy dochází k jeho vazbě na komplex cyklin – cyklin-dependentní kináza (CDK). V S fázi buněčného cyklu interaguje *PCNA* s komplexem cyklin A – CDK2 a spojuje tak CDK2 s jejími substráty, které jsou následně fosforylovány. Za normálních podmínek není buněčný cyklus přerušen, avšak v případě poškození DNA nebo při stárnutí buňky dochází k produkci proteinu *p21*, který zabraňuje přechodu buňky z G1 do S fáze. Tento *p21* protein vytváří komplex s *PCNA*, cykliny a cyklin-dependentními kinázami. Rostlinný homolog proteinu *p21* zatím nebyl objeven, nicméně rostlinné *PCNA* proteiny jsou schopné interagovat s lidskými proteiny *p21* (Strzalka et Ziemienowict, 2011).

3.3.4 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT PROTEINS

LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT (LEA) proteiny jsou skupinou proteinů, které byly poprvé objeveny v semenech bavlíku *Gossypium hirsutum* (Dure et al., 1981). Následně byly tyto proteiny objeveny nejen v semenech dalších rostlin, ale i v dalších částech rostliny. Několik *LEA* proteinů bylo také nalezeno u eubakterií, jako například *Haemophilus influenzae* a *Bacillus subtilis*, dále pak u pakomárů, žábřonožek, několika druhů hlístic a vířníků. Přítomnost *LEA* proteinů je u všech druhů spojena s buněčnou tolerancí k dehydrataci. (Hundertmark et Hinch, 2008).

LEA proteiny jsou vysoce hydrofilní a v roztoku tepelně stabilní, čímž se řadí mezi hydrofiliny (Hundertmark et Hinch, 2008). Podle jejich podobnosti s typickými *LEA* proteiny bavlíku jsou rozděleny do několika skupin (Wise, 2003). Příkladem mohou být *LEA* proteiny skupiny 1 a 4, které jsou schopné interagovat s mnoha buněčnými komponentami včetně dalších proteinů a přispívat tak k jejich stabilitě. Také jsou schopné využít vlastní hydroxylované aminokyseliny jako náhradu za vodu, která z buňky uniká (Manfre et al. 2006).

Olvera-Carrillo *et al.* (2011) provedli *in vitro* testy a sestavili hypotetický model popisující funkci *LEA* proteinů a i dalších hydrofilinů. Podmínkám dehydratace vystavili řadu enzymů (kataláza, fumaráza, rhodanáza, malátdehydrogenáza, laktátdehydrogenáza) a to buď v přítomnosti, nebo nepřítomnosti *LEA* proteinů skupiny 2, 3, 4, 6 a 7 z různých rostlinných druhů. V případě nepřítomnosti *LEA* proteinů dojde vlivem dehydratace ke konformačním změnám enzymů, což vede ke snížení jejich aktivity. Pokud snižování množství vody pokračuje, může dojít k denaturaci těchto enzymů. V případě, že jsou přítomné *LEA* proteiny, fungují jako chaperony a zabráňují konformačním změnám a následné denaturaci. Na rozdíl od typických chaperonů, jako jsou například heat-shock proteiny, nepotřebují *LEA* proteiny ke své aktivitě dodat ATP. Pokud jsou *LEA* proteiny dodány až po dehydrataci, nejsou schopné obnovit nativní konformaci enzymů.

V genomu *Arabidopsis thaliana* se vyskytuje 64 genů, které kódují *LEA* proteiny (Hundertmark *et Hinch*, 2008). Příkladem těchto genů mohou být geny *ATEM1* a *ATEM6*. Tyto geny patří do první skupiny *LEA* genů, které se nazývají také *Em*. *Em* geny kódují proteiny, které vykazují vysokou homologii jak na úrovni nukleotidů, tak na úrovni aminokyselin. U všech proteinů skupiny jedna se vyskytuje konzervativní úsek 20 aminokyselin, který se může až 4x repetitivně opakovat. U proteinu *ATEM1* jsou čtyři kopie tohoto konzervativního úseku, u *ATEM6* je kopie pouze jedna. Geny *ATEM1* a *ATEM6* jsou exprimovány hlavně v průběhu zrání embrya. Nejprve dochází k expresi *ATEM1* a to zhruba 14 dní po opylení v provaskulárních pletivech s nejsilnější expresí v kořenové špičce. Po následujících 2 – 3 dnech se začne exprimovat také *ATEM6* a to po celém embryu, nejvíce však v apikálním stonkovém meristému a provaskulárních pletivech. (Manfre *et al.*, 2006; Delseny *et al.*, 2001).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

Semena *Arabidopsis thaliana* (var. Columbia) dodané Katedrou botaniky Univerzity Palackého v Olomouci.

4.2 Vybavení laboratoře

Aparatura na elektroforézu (Major Science, USA), automatické pipety (Eppendorf, Německo), centrifuga 5415R (Eppendorf, Německo), digitální kamera Olympus DP72 (Olympus, Japonsko), digitální předvážky (KERN, Německo), digestoř (Merci ®, Česká Republika), Eppendorf™ Mastercycler™ pro PCR Systém (Eppendorf, Německo), elektromagnetická míchačka (IKA, Německo), flowbox (Heal Force, Čína), homogenizátor FastPrep 24 (MP Biomedicals, USA), lupa (Olympus, Japonsko), Ligh Cycler Nano (Rosche, Německo), mikroskop Olympus BX60 (Olympus Japonsko), mikrovlnná trouba MS023 (Hitachi, Japonsko), minicentrifuga MCF 2360 (LMS, Japonsko), nanodrop (ThermoScientific), stolní pH metr FE-20 KIT (Mettler Toledo), světelný mikroskop Olympus CK40 (Olympus, Japonsko), Random Positioning Maschine (RPM, Dutch Space Company, Nizozemsko), termoblok Mixing BlockMB-102 (Bioer, Čína), UV Transluminátor (UVITEC Cambridge, UK)

4.3 Seznam použitých chemikálií

Agarose Molecular Grade (Bioline, UK), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA, Sigma Aldrich, USA), etanol, GelRed™ Nucleic Acid Stain (Biotium, USA), hexadecyltrimethylamoniumbromid (CTAB, Sigma Aldrich, USA), hydroxid draselný (Chemapol, Česká Republika), HypperLadder™ 100bp (Bioline, UK), chloramin B (Bochemie, Česká Republika), chloralhydrát (Sigma-Aldrich, USA), chlorid sodný (Lach-Ner, Česká Republika), chloroform (Lach-Ner, Česká Republika), isoamylalkohol, isopropanol, kyselina boritá (Lach-Ner, Česká Republika) ledová kyselina octová, 5x loading buffer blue (Bioline, UK), 2-merkapttoetanol (Sigma-Aldrich, USA), MES (Serva, Německo), Murashige a Skoog médium včetně vitamínů (MS médium včetně vitamínů, Duchefa, Nizozemsko), octan sodný (Lachema, Česká Republika), phytigel (Sigma-Aldrich, USA), primery (Generi Biotech, Česká Republika), sacharóza (Duchefa, Nizozemsko), tris(hydroxymethyl)aminometan (Tris, Sigma-Aldrich, USA)

4.4 Seznam použitých roztoků a růstových médií

Roztok	Složení	Množství na 1l
CTAB pufr	CTAB NaCl 1M Tris, pH 8 0,5M EDTA, pH 8 2-merkaptoetanol filtrováno	20 g 81,8 g 100 ml 40 ml 2 ml
0.5M EDTA	EDTA pH 8 autoklávováno	186,1 g
Růstové médium	1x MS médium včetně vitamínů (Murashige & Skoog) MES (0,05%) Sacharóza (1%) Phytigel pH 5,7 autoklávováno	4,3 g 0,5 g 10 g 10 g
5x TBE	H ₃ BO ₃ Tris-HCl 0,5M EDTA, pH 8 filtrováno	27,5 g 54 g 20 ml
1M Tris	Tris pH 8 autoklávováno	121,1 g

Roztok	Složení	Množství na 1l
MS médium včetně vitamínů Složení dle Murashige & Skoog 1962, výrobce Duchefa, Nizozemsko	Makroprvky	
	CaCl ₂	332,02 mg
	KH ₂ PO ₄	170 mg
	KNO ₃	1900 mg
	MgSO ₄	180,54 mg
	NH ₄ NO ₃	1650 mg
	Mikroprvky	
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025 mg
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025 mg
	FeNaEDTA	36,70 mg
	H ₃ BO ₃	6,20 mg
	KI	0,83 mg
	MnSO ₄ · H ₂ O	16,90 mg
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25 mg
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,60 mg
	Vitamíny	
	Glycin	2 mg
	Myo-inositol	100 mg
	Kyselina nikotinová	0,5 mg
	Pyridoxin HCl	0,5 mg
	Thiamin HCl	0,1 mg

4.5 Seznam použitých komerčních kitů

Fast start PCR Master (Roche, Německo)

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

RQ1 RNase – Free DNase (Promega, USA)

Spektrum Plant Total RNA kit (Sigma-Aldrich, USA)

Transcriptor Hight Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche, Německo)

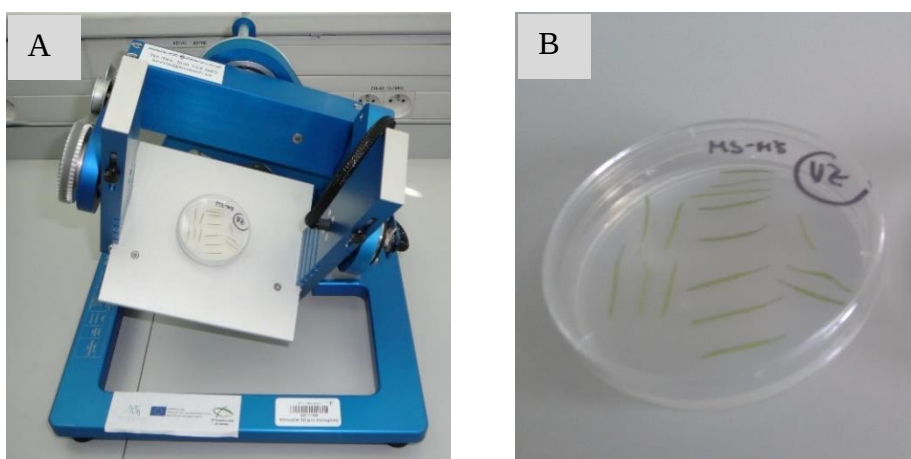
4.6 Pěstování pokusných rostlin

Semena *Arabidopsis thaliana* byla vysázena do květináčů se směsí rašelina:perlit v poměru 1:1 a byla pěstována ve skleníku. Po 3 – 5 týdnech od vysazení rostlin byly sesbírány přibližně 1 cm velké nezralé šešule.



Obrázek číslo 3: Pěstování *Arabidopsis thaliana*.

Sesbírané šešule byly sterilizovány 2 minuty v 70% etanolu a poté 8 minut ve 2,5% chloraminu a po deseti kusech byly umístěny na dvě Petriho misky s MS médiem. Petriho miska s analyzovanými vzorky byla umístěna na RPM (Random Positioning Maschine, viz obrázek číslo 4) na 48 hodin při laboratorní teplotě 22 °C. Maximální úhlová rychlost RPM byla 50 stupňů/s a minimální úhlová rychlost RPM byla 40 stupňů/s. Průměrná gravitační síla působící na vzorky byla 0,1g. Kontrolní vzorky byly inkubované bez RPM za stejných podmínek.



Obrázek číslo 4: A - inkubace analyzovaných vzorků na RPM; B – sesbírané šešule na MS médiu

Převzato od: Mgr. Michaela Švécarová, Ph.D.

4.7 Příprava mikroskopických preparátů

Výchozím materiálem pro mikroskopické pozorování vajíček s embryi byly čerstvě sesbírané šesule. Šesule byly nejprve fixovány v roztoku 96% etanol:ledová kyselina octová v poměru 3:1 po dobu 15 minut. Následně byly přeneseny do 70% etanolu, poté do 35% etanolu a nakonec do destilované vody. V každém roztoku byly šesule po dobu 5 minut. Nakonec byly přeneseny na 5 minut do nasyceného roztoku chloralhydrátu. Před samotným pozorováním byl na krycí sklíčko nakápnut nasycený roztok chloralhydrátu a do něj byly vloženy šesule, z nichž byly pod binokulární lupou vypreparovány vajíčka s embryi. Vajíčka pak již byla pozorována pod mikroskopem Olympus BX60 a pomocí programu Quick Camera byla vyfocena jednotlivá embryonální stádia.

4.8 Izolace DNA

Pro izolaci genomické DNA sloužily jako výchozí materiál čerstvě sesbírané šesule *Arabidopsis thaliana*. Zhruba 10 šesulí bylo vloženo do mikrozkušavky s 900 µl 2% CTAB s 2-merkaptóetanolem (2 µl 2-merkaptóetanolu na 1 ml CTAB) a homogenizováno v homogenizátoru za použití programu 1 (60 sekund, 6,5 m/s). Poté byla směs inkubována při 68 °C a 500 rpm po dobu 1,5 hodiny. Po inkubaci bylo ke směsi přidáno 600 µl roztoku chloroform:isoamylalkohol (24:1), směs byla řádně protřepána, nechána stát 5 minut a centrifugována 15 minut při 11 000 rpm a 4 °C. Do čisté zkumavky byl přepipetován supernatant k němuž bylo přidáno 60 µl 3M octanu sodného a 500 µl vychlazeného isopropanolu. Směs byla ponechána v (-20 °C) do druhého dne kdy byla centrifugována při 11 000 rpm a teplotě 4 °C po dobu 15 minut. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 µl 70% etanolu. Po 5 minutách odstátí byla směs centrifugována 3 minuty při 11 000 rpm a 4 °C. Supernatant byl opět odstraněn a krok s etanolem byl zopakován. Po odstranění supernatantu byl pelet vysušen po dobu 60 minut při 40 °C. Nakonec byl pelet rozpuštěn v 50 µl ddH₂O a pomocí Nanodropu byla změřena koncentrace vyizolované gDNA.

4.9 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit Spectrum™ Plant Total RNA Kit a izolace byla provedena podle návodu přiloženého výrobcem. Byl použit protokol A. Pro izolaci RNA byly použity šesule inkubované při laboratorních podmínkách a inkubované na RPM přístroji. Pro homogenizaci byl použit homogenizátor FastPrep 24 a program 1. K šesulím v mikrozkušavce bylo přidáno 500 µl lyzačního roztoku s 2-merkaptóetanolem, který byl dopředu přidán

(10 µl 2-merkaptoetanolu na 1 ml lyzačního roztoku). Po homogenizaci byla provedena inkubace při 56 °C po dobu 3-5 minut. Následující kroky byly provedeny dle návodu přiloženého výrobce. Při izolaci pomocí tohoto kitu nejprve došlo k přefiltrování homogenátu. Následně byla navázána RNA na *binding* kolonku a poté byla celá kolonka promyta. Nakonec byla vyizolovaná RNA eluována. Veškeré centrifugace byly provedeny při 13 000 rpm a 4 °C. Po izolaci byla proměřena koncentrace vyizolované RNA na NanoDropu a RNA byla uložena při (-20 °C).

4.10 Ošetření RNA DNázou

Po izolaci RNA bylo provedeno odstranění DNA ze vzorků a to pomocí kitu RNase free-DNase (Promega) a postupováno bylo podle návodu výrobce. K 8 µl vyizolované RNA byl přidán 1 µl RQ1 10x reakčního pufru a 1 µl RQ1 DNázy. Směs byla inkubována po dobu 30 minut při 37 °C. Poté došlo k inaktivaci DNázy a to přidáním 1 µl RQ1 STOP Solution a následnou 10 minutovou inkubací při 65 °C.

4.11 Přepis RNA do cDNA

Pro přepis RNA do cDNA byl použit Transcriptor Hight Fidelity cDNA Synthesis Kit a přepis byl proveden dle návodu přiloženého výrobcem. Do reakce bylo dodáno 10 µl přečištěné DNA a pro reakci byly použity anchored-oligo (dT)₁₈ primery. Před přidáním reverzní transkriptázy byla provedena inkubace směsi při 65 °C po dobu 10 minut. Kompletní reakční směs o objemu 20 µl byla inkubována 45 minut při 45 °C s následnou inaktivací reverzní transkriptázy při 85 °C po dobu 5 minut. Na závěr byla změřena koncentrace cDNA na NanoDropu a cDNA byla uložena při (-20 °C).

4.12 PCR reakce

Pro PCR reakci byla použita cDNA a genomická DNA a byla provedena s kitem FastStart PCR Master podle návodu výrobce, avšak konečný objem byl 20 µl. Do reakce bylo dodáno 50 ng respektive 25 ng gDNA nebo 200 ng cDNA. Reakční podmínky jsou shrnuty v tabulce číslo 1.

Tabulka číslo 1: Reakční podmínky pro PCR amplifikaci cDNA a genomické DNA

Krok	Teplota [°C]	Čas [min]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	2	1
Denaturace	95	0,5	45
Annealing	53	0,5	
Elongace	72	0,5	
Finální extenze	72	5	1
Chlazení	4	-	1

Tabulka číslo 2: Sekvence primerů použitých pro PCR reakci

Sledovaný gen	Primer	Sekvence	Velikost produktu (bp)
<i>SIN1</i>	F	5'- TCTAGGCTCATCCTCCATTA -3'	231
	R	5'- CTGCAAACAACAACCTCAAAA-3'	
<i>KAN1</i>	F	5'- TTAAAGGTGTTTCCTTTGCAT-3'	180
	R	5'-GAGACATTTTCAGGCGGTAAGC-3'	
<i>PCNA1</i>	F	5'-AGTGCTGGAGCAGTCGAAAT-3'	159
	R	5'-TTTCCAAAATAGCCGCAAAC-3'	
<i>LEA 4-5</i>	F	5'-AGGCGGAGAAGATGAAGACA-3'	218
	R	5'-CATCTGATGTGTCCCAGTGC-3'	
<i>AT2G28390</i>	F	5'-AACTCTATGCAGCATTTGATCCAT-3'	164
	R	5'-TGATTGCATATCTTTATCGCCATC-3'	

4.13 Real-time PCR

Real-time PCR byla provedena pomocí kitu LightCycler® Fast Start DNA Master^{PLUS} SYBR Green I a to podle návodu výrobce. Do reakce bylo dodáno 200 ng cDNA. Reakce proběhla za podmínek uvedených v tabulky číslo 3.

Tabulka číslo 3: Reakční podmínky real-time PCR

Krok	Teplota [°C]	Čas [sec]	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	600	1
Denaturace	95	10	45
Annealing	53	30	
Elongace	72	20	
Finální extenze	72	300	1
Analýza teploty tání	65 → 95 °C (0,1 °C/s)	60	1
Chlazení	40	30	1

Získaná data byla vyhodnocena programem Light Cyclers Nano Software 1.1, který stanovil C_T hodnoty jednotlivých vzorků. K dalšímu hodnocení byla použita metoda $\Delta\Delta C_T$. Jako referenční gen sloužil gen *AT2G28390* a kontrolami byly hodnoty C_T vzorků (šešule) inkubovaných bez RPM.

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

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

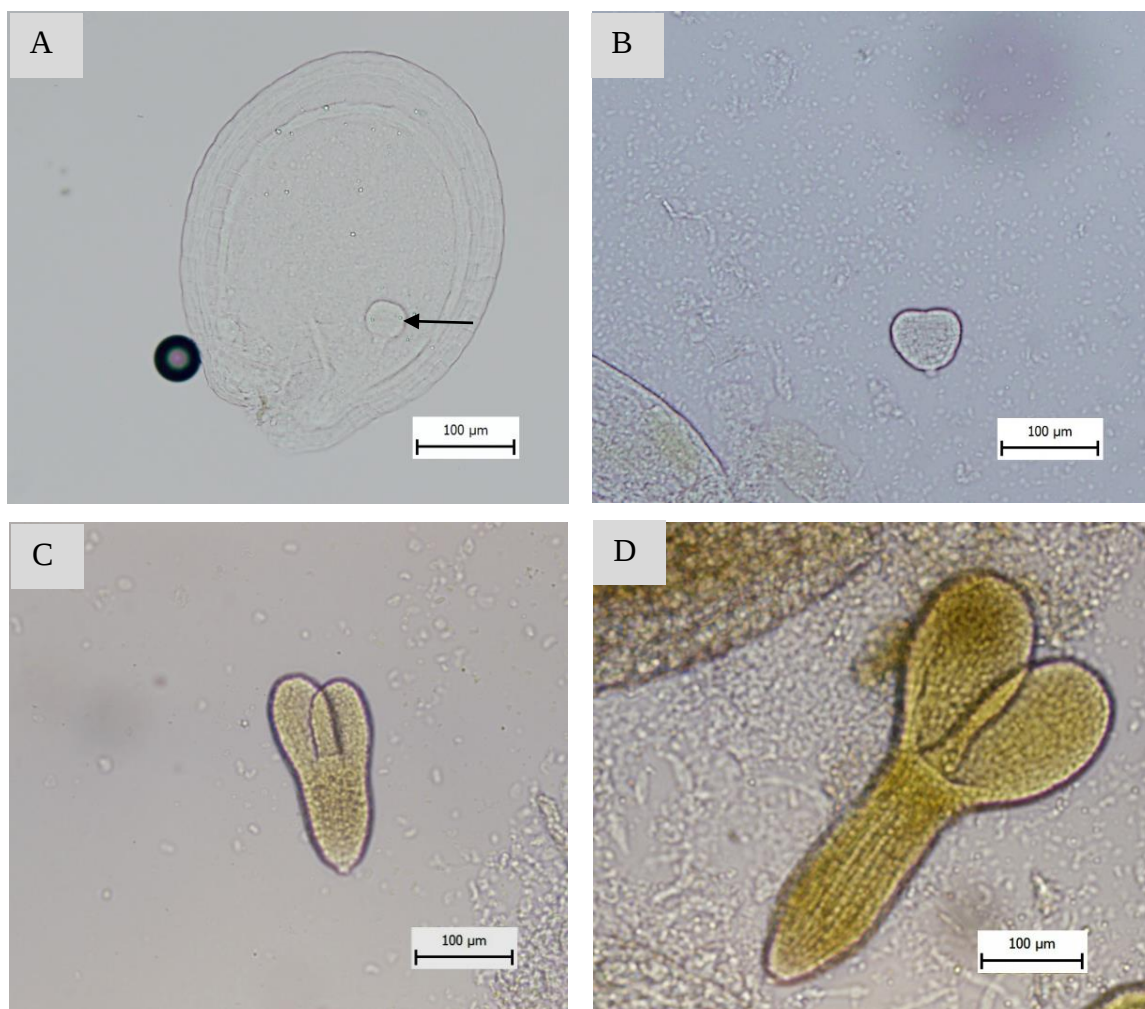
4.14 Elektroforetická separace

Pro hodnocení produktů PCR reakcí byla použita elektroforetická separace na 1,5% agarózovém gelu v 0,5x TBE pufru. Separace probíhala po dobu 45 minut při napětí 100 V. Pro vizualizaci DNA bylo do gelu přidáno barvivo GelRed a jako marker molekulové hmotnosti sloužil HyperLadder™ 100 bp s rozsahem 100 – 1013 bp.

5 Výsledky

5.1 Výsledky studií embryonálního vývoje

Pro přípravu preparátů byl použit chloralhydrát, který zapříčinil zprůsvitnění tkání (viz kapitola 3.7). V této části práce byla pozorována embryonální stádia *Arabidopsis thaliana* a byla detekována všechna embryonální stádia, tedy stádium globulární, srdčité, torpédovité a embryo v závěrečné fázi vývoje (viz obrázek číslo 5). Pro další práci, čili analýzu exprese genů, byly použity šešule veliké přibližně 1 cm. Takto velké šešule již obsahovaly embryo v závěrečné fázi vývoje, kdy semena ještě nejsou zralá (viz obrázek číslo 5E - F).

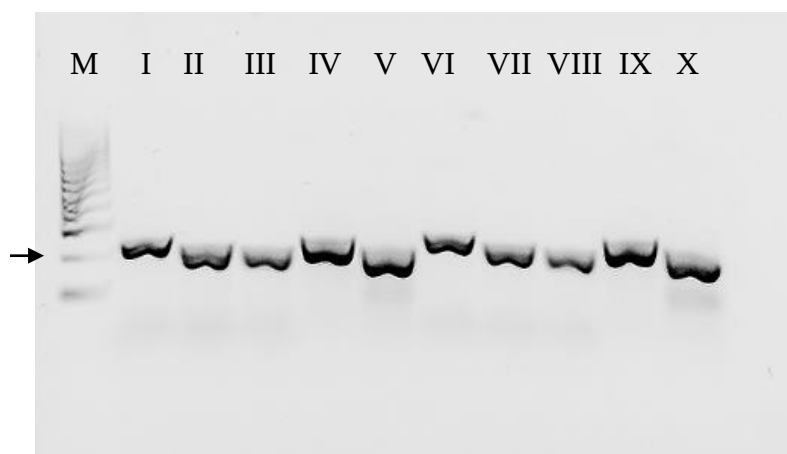




Obrázek číslo 5: Jednotlivá embryonální stádia; A – globulární stádium (šipka označuje embryo); B – srdčité stádium; C – rané torpédovité stádium; D – pozdní torpédovité stádium, E – embryo v závěrečné fázi vývoje ve vajíčku, F – embryo v závěrečné fázi vývoje se dvěma děložními listy a kořínkem

5.2 Analýza exprese genů

V rámci práce byla pozorována změna v expresi jednotlivých genů vlivem simulované mikrogravitace u čtyř genů – *SIN1*, *KAN1*, *PCNA1* a *LEA4-5*. Před vlastní analýzou exprese byla provedena PCR reakce na genomické DNA pro ověření specifity primerů (viz obrázek číslo 6). PCR reakce byla provedena ve dvou opakováních s rozdílným množstvím gDNA. U vzorků I – V reakce probíhala s 50 ng gDNA a u vzorků VI – X probíhala reakce s polovičním množstvím gDNA. Z následné elektroforetické separace bylo zjištěno, že všechny použité primery nasedají na DNA specificky.

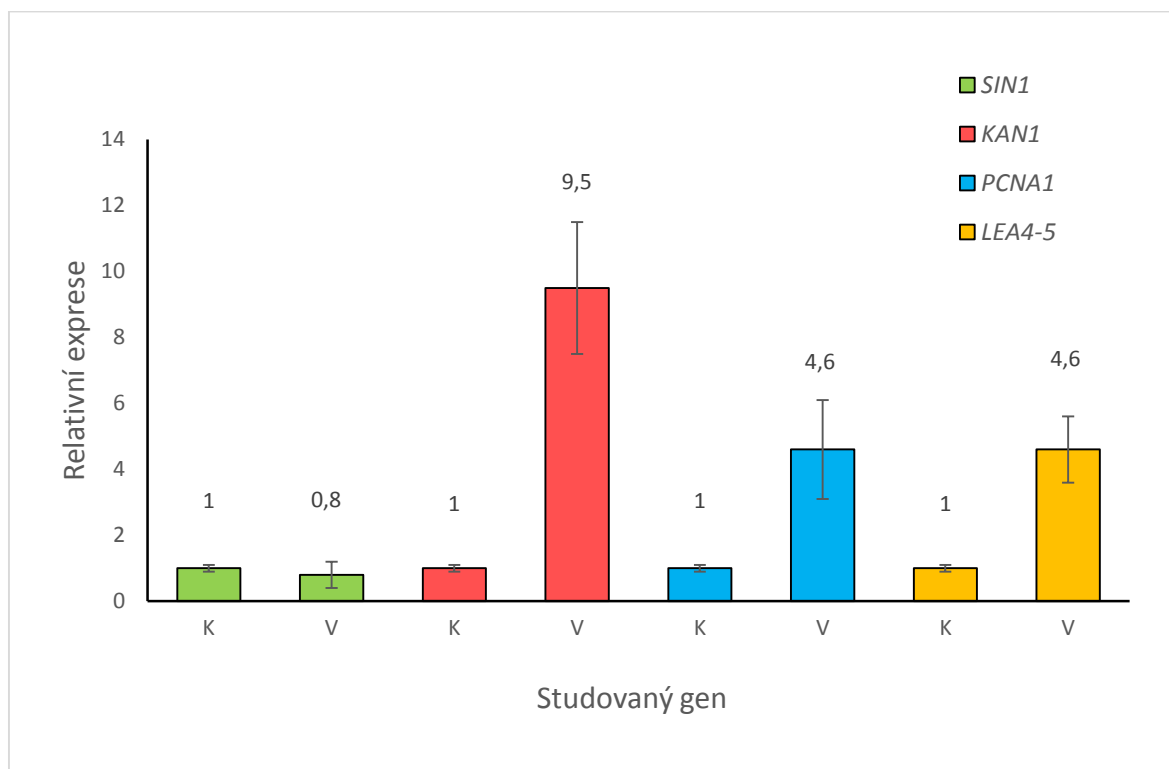


Obrázek číslo 6: PCR amplifikace genomické DNA pro ověření specifity primerů. Jako marker molekulové hmotnosti (M) byl použit HyperLadder™ 100 bp. Šipka označuje band

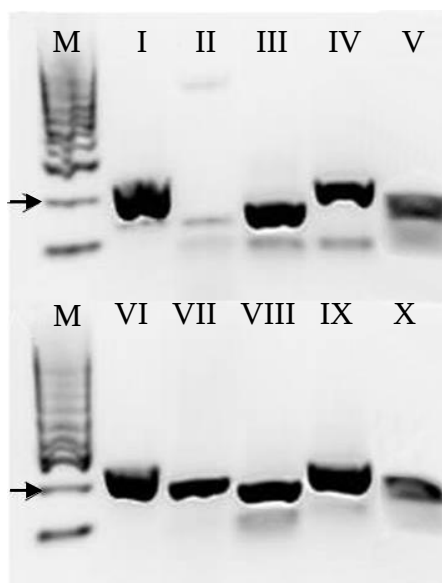
o velikosti 200 bp. I – *SIN1*; II – *KAN1*; III – *PCNA1*; IV – *LEA4-5*; V – *AT2G28390*;
VI – *SIN1*; VII – *KAN1*; VIII – *PCNA1*; IX – *LEA4-5*; X – *AT2G28390*

Stanovení relativní exprese bylo provedeno pomocí real-time PCR na přístroji Ligh Cyclor Nano. Byly změřeny celkem čtyři série vzorků, které vždy obsahovaly kontrolní a analyzovaný vzorek a to ve dvou kopiích. Získaná data byla zprůměrována. Průběh exprese všech genů je zobrazen na obrázku číslo 7. Specifita produktu byla ověřena pomocí analýzy křivek teploty tání (viz obrázek číslo 9). Na závěr byla provedena elektroforetická separace produktů real-time PCR (viz obrázek číslo 8). Změny v expresi jednotlivých genů vlivem simulované mikrogravitace byly různé a nebyly pozorovány u všech genů. U genu *SIN1* nebyla pozorována žádná změna v expresi oproti kontrolním embryím pěstovaným při 1g. U zbylých genů došlo k nárůstu exprese. Nejvýraznější změna byla u genu *KAN1*, kdy exprese genu narostla na 9,5 násobek exprese kontrolních embryí. U zbývajících dvou genů, *PCNA1* a *LEA4-5*, byl nárůst exprese stejný. U obou genů exprese vzrostla 4,6 krát vzhledem ke kontrolním embryím.

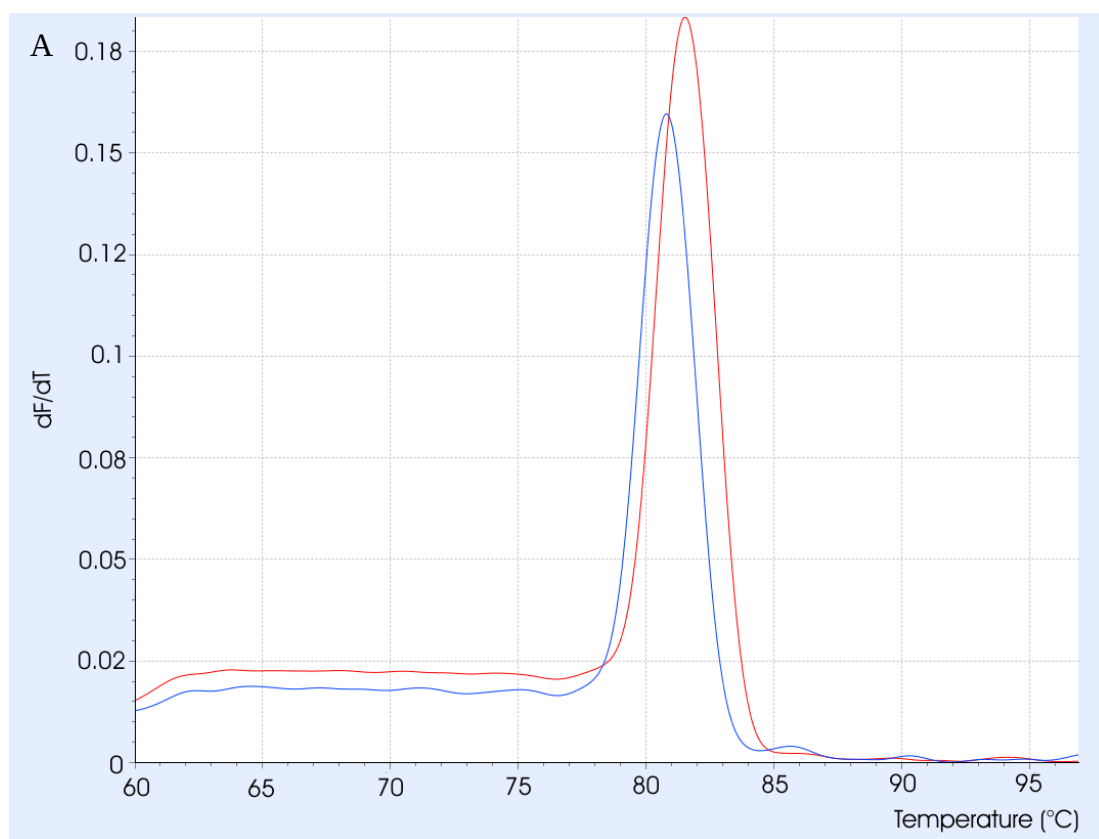
Z výsledků lze usuzovat, že mikrogravitace má vliv na expresi většiny vybraných genů, a to již při krátkodobém působení (48 hodin).

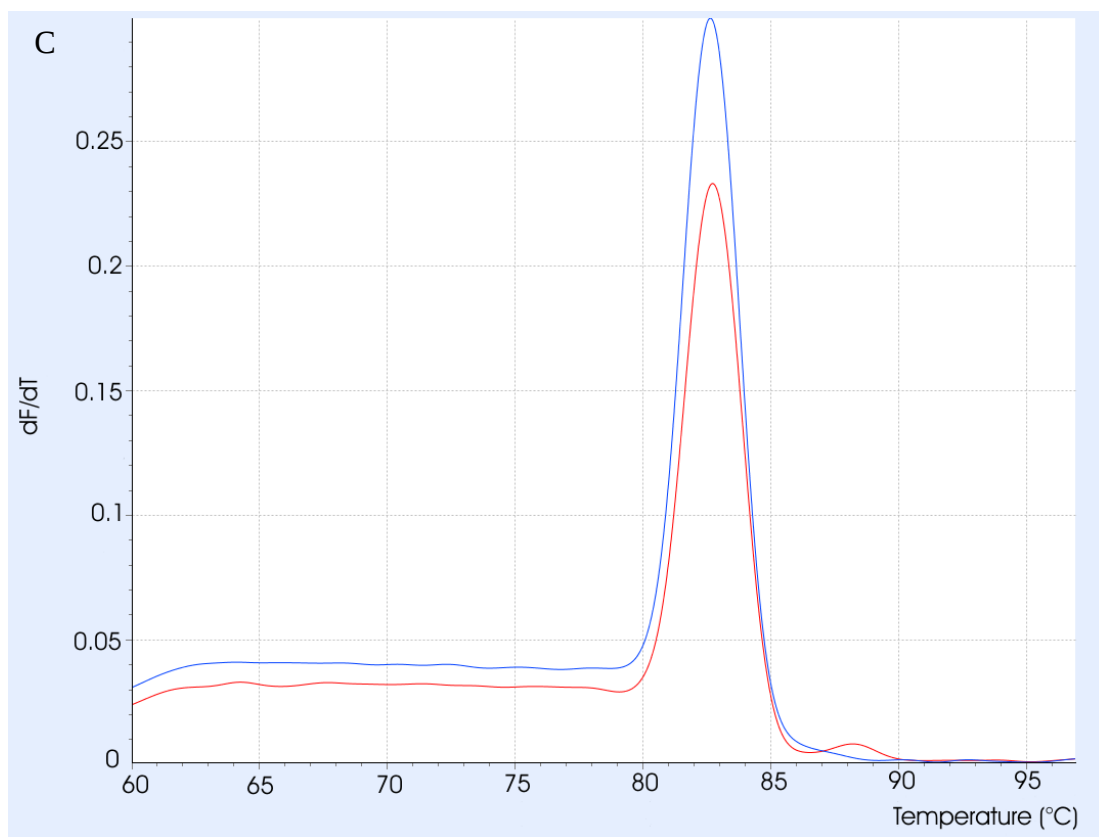
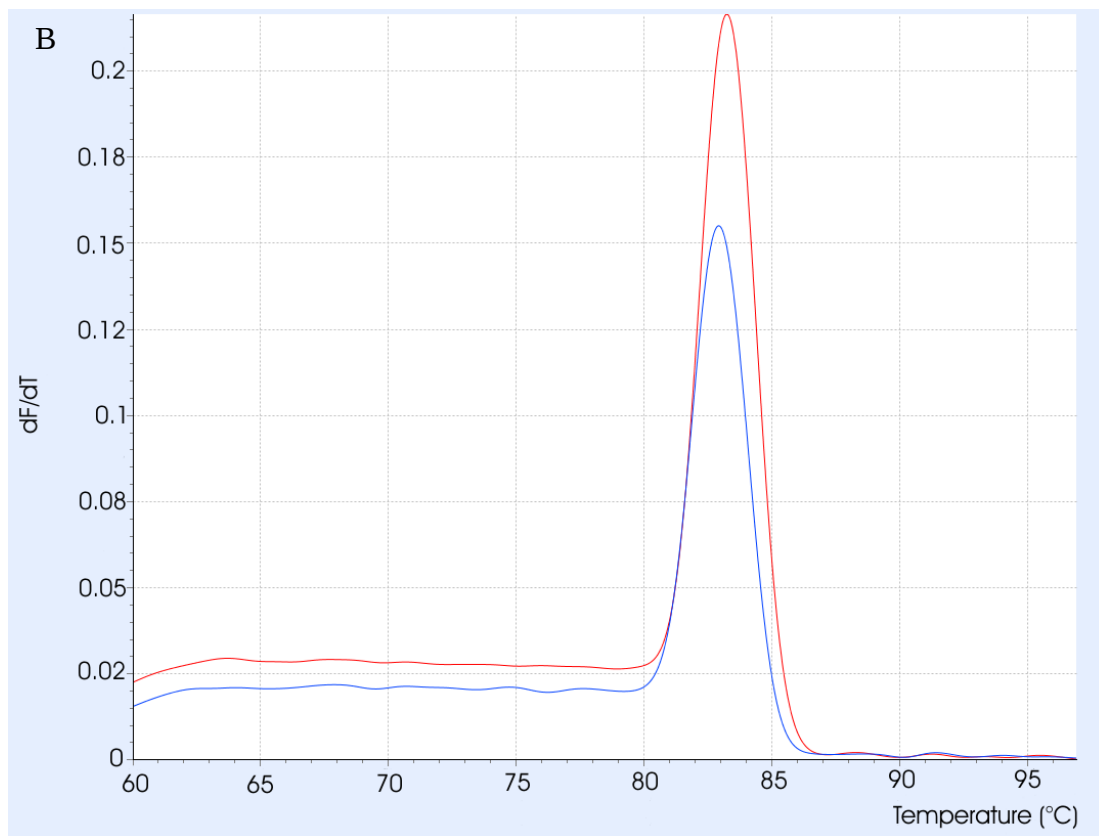


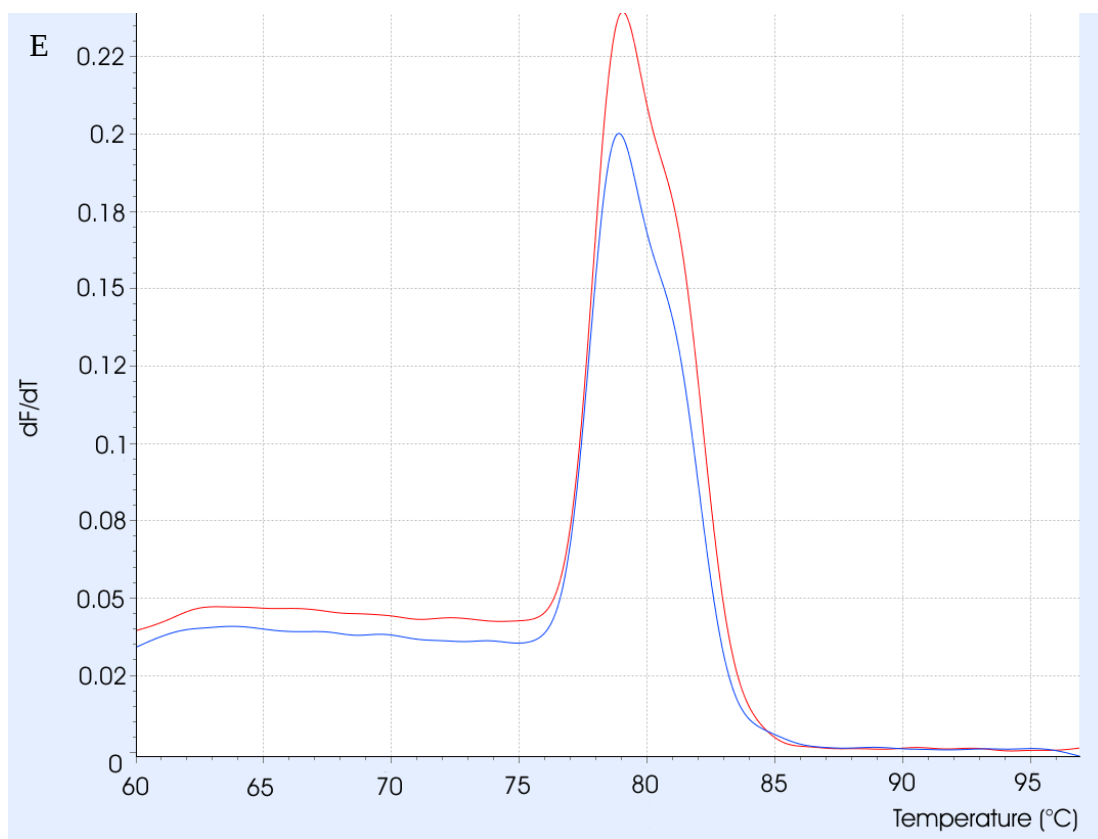
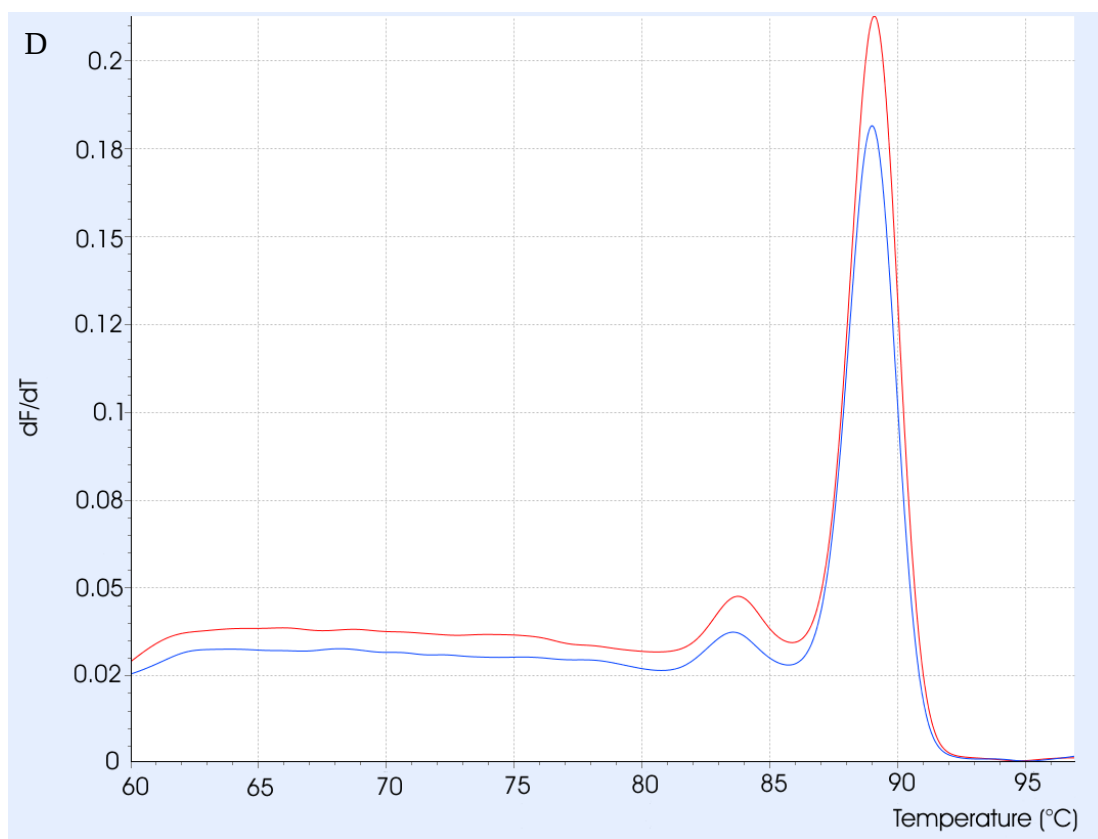
Obrázek číslo 7: Graf znázorňující změny v expresi studovaných genů vlivem simulované gravitace. K – kontrolní vzorky, V – analyzované vzorky



Obrázek číslo 8: Elektroforetická separace produktů real-time PCR. Jako marker molekulové hmotnosti (M) byl použit HyperLadder™ 100 bp. Šipky označují bandy o velikosti 200 bp. V horní části obrázku lze pozorovat analyzované vzorky, ve spodní části vzorky kontrolní. I – *SIN1*; II – *KAN1*; III – *PCNA1*; IV – *LEA4-5*; V – *AT2G28390*; VI – *SIN1*; VII – *KAN1*; VIII – *PCNA1*; IX – *LEA4-5*; X – *AT2G28390*.







Obrázek číslo 9: Analýza křivek teplot tání produktů real-time PCR. Červená křivka je křivka teploty tání kontroly, modrá křivka je křivka teploty tání vzorku. A – křivky teploty

tání genu *SIN1* s teplotním píkem 78,97 °C; B - křivky teploty tání genu *KAN1* s teplotním píkem 89,01 °C; C - křivky teploty tání genu *PCNA1* s teplotním píkem 82,68 °C; D - křivky teploty tání *LEA4-5* s teplotním píkem 83,08 °C, pík s nižší teplotou pravděpodobně představuje dimerizované primery; E - křivky teploty tání genu *AT2G28390* s teplotním píkem 81,16 °C

6 Diskuze

V první části bakalářské práce byla studována embryonální stádia *Arabidopsis thaliana*. Byla pozorována všechny čtyři embryonální stádia, tedy stádium globulární, srdčité, torpédovité a embrya v závěrečné fázi vývoje, kdy semena ještě nejsou zralá. Dále bylo zjištěno, že šesule velké okolo 1 cm vždy obsahují již embrya v poslední fázi vývoje. Další analýzy byly již prováděny pouze s embryi v poslední fázi vývoje.

V druhé části práce byly pozorovány změny v expresi genů u rostlin, které byly vystaveny po dobu 48 hodin vlivu mikrogravitace. Pro analýzu byly zvoleny geny, které jsou zapojené do procesu embryogeneze a to geny *SIN1*, *KAN1*, *PCNA1* a *LEA4-5*.

SIN1 patří mezi geny, které jsou nezbytné pro vývoj integumentů, ale také správného načasování kvetení a samotný vývoj květů. (Ray *et al.*, 1996; Reiser *et Fischer*, 1993). Práce Bednářové (2012) také naznačila zapojení genu *SIN1* při přeměně integumentů v osemeni v pozdní fázi embryonálního vývoje. V této práci nebyla pozorována změna vlivem mikrogravitace v expresi genu *SIN1* u embryí v poslední fázi vývoje. Tento výsledek naznačuje, že by nemělo dojít k narušení přeměny integumentů v osemeni.

Gen *KAN1* je zapojen při ustanovení adaxiálně-abaxiální osy. Geny *KAN* jsou antagonisté genů *HD-ZIPIII* a společně vymezují centrální a periferní zónu v raných fázích embryogeneze. V pozdějších fázích jejich antagonistický vztah ovlivňuje vývoj adaxiálně-abaxiální osy, přičemž geny *KAN* jsou zodpovědné za vývoj abaxiální části. Funkce obou skupin genů je nezbytná pro správný vývoj děložních lístků, listů, ale i květů a vodivých pletiv (Izhaki *et Bowman*, 2007; Eshed *et al.*, 2004, Merelo *et al.*, 2013). Změny v expresi genů *KAN* v průběhu embryogeneze studovali Kerttö *et al.* (2001), kteří pozorovali nárůst exprese od globulárního stádia ke stádiu srdčitému. Další změny v expresi v průběhu embryogeneze nebyla u těchto genů dosud studována. V této práci byl pozorován nárůst exprese genu *KAN1* u embryí vystavených mikrogravitaci. Zvýšení bylo 9,5 krát oproti kontrole. Tento výsledek by mohl naznačovat případné narušení antagonistického vztahu mezi geny *KAN1* a *HD-ZIPIII*, což by mohlo způsobit změny v ustanovení adaxiálně-abaxiální osy. Pokud by došlo k rozšíření studie a zaměřilo by se i na raná stádia embryogeneze, mohl by takovýto nárůst znamenat změny již v ustanovení centrální i periferní zóny, což by mohlo ovlivnit další vývoj embrya. Pokud by také byly pozorovány změny v expresi tohoto genu i při dalším růstu rostliny, mohlo by to způsobit změny ve vývoji a stavbě listů i květů.

Další nárůst exprese byl pozorován u genu *PCNA1*, což je gen důležitý pro správné buněčné dělení a je zapojen do S fáze buněčného cyklu (Strzalka *et* Ziemienowict, 2011). Exprese genu *PCNA1* narostla 4,6 krát oproti kontrolním embryím, které nebyly vystaveny mikrogravitaci. Tyto výsledky korelují s hypotézou, že mikrogravitace pravděpodobně zvyšuje mitotickou aktivitu, kterou zveřejnili Millar *et al.* (2011). Nicméně takovéto zvýšení mitotické aktivity v pozdní fázi vývoje embrya je značně kontraproduktivní. V této fázi vývoje by se již embryo mělo zaměřit na ukládání zásobních látek a celkovou přípravou na dormanci, tedy období klidu. Avšak tomuto předpokladu zvýšená mitotická aktivita neodpovídá.

U genu *LEA4-5* byl také pozorován nárůst exprese u analyzovaných embryí oproti kontrolním embryím. Exprese genu narostla 4,6 krát. Geny *LEA* jsou exprimovány v průběhu zrání embrya a hrají významnou roli při snižování obsahu vody v embryu (Manfre *et al.*, 2006; Pavlová *et* Fischer, 2011). Jejich role byla také prokázána při zvládání stresových podmínek. Obecně došlo ke zvýšení exprese genů kódujících proteiny *LEA* při působení abiotických stresů a over-exprese těchto genů zvýšila toleranci ke stresu u transgenních rostlin (Hundertmark *et* Hinch, 2008). Obecně lze tedy předpokládat nárůst exprese genů *LEA* v posledních fázích embryonálního vývoje, jelikož zde dochází k vysoušení embrya při přípravě na dormanci. Výsledky této práce by také mohly naznačovat, že snížení hladiny vody v embryu není jediný abiotický stresový faktor stimulující expresi genů *LEA*. Dalším abiotickým stresovým faktorem, který ovlivňuje expresi těchto genů, by mohla být i mikrogravitace.

7 Závěr

Pro správný průběh embryogeneze je nezbytná naprostá souhra genů. V této práci byl pozorován vliv mikrogravitace na expresi vybraných genů, které jsou zapojené při rostlinné embryogenezi. Byly pozorovány změny v expresi u genů *SIN1*, *KAN1*, *PCNA1* a *LEA4-5* u embryí *Arabidopsis thaliana* v poslední fázi vývoje. Byly zaznamenány změny v expresi u všech vybraných genů s výjimkou genu *SIN1*. U tohoto genu nebyla zaznamenána žádná změna vlivem mikrogravitace. Největší nárůst byl zaznamenán u genu *KAN1*, který je nezbytný pro vývoj adaxiálně-abaxiální osy. Tyto výsledky mohou naznačovat pravděpodobné morfologické změny u rostlin vystavených podmínkám mikrogravitace. Další nárůst v expresi byl zaznamenán u genu *PCNA1*, který je nezbytný pro správný průběh buněčného cyklu. Tyto výsledky pravděpodobně souvisí s indukcí mitotické aktivity vlivem mikrogravitace. Poslední pozorovaný gen byl *LEA4-5*, u něhož byl taktéž pozorován nárůst v expresi při působení mikrogravitace. Toto zjištění potvrzuje úlohu *LEA* genů při reakci na stresové podmínky, protože ztráta gravitace je pro rostlinu stresovým faktorem.

8 Seznam použité literatury

Bajer J. (2008) Mechanika 2. Vladimír Chlup, Olomouc. 383 - 493

Bednářová M. (2012) Změny v epigenetickém a expresním profilu v průběhu embryogeneze rostlin. Diplomová práce. Depon in: Knihovna biologických oborů PřF UPOL Olomouc.

Berleth T. a Chatfield S., (2002) Embryogenesis: pattern formation from a single cell. *The Arabidopsis Book*, The American Society of Plant Biologist

Breuninger H., Rikirsch E., Hermann M., Ueda M., Laux T., (2008) Differential expression of *WOX* gene mediates apical-basal axis formation in the *Arabidopsis* embryo. *Developmental Cell* 14: 867 - 876

Broadhvest J., Bakec S. C., Gasser Ch. S., (2000) *SHORT INTEGUMENTS 2* Promotes Growth During Arabidopsis Reproductive Development. *Genetics* 155: 899 - 907

Campbell N. A., Reece J. B., (2008) Biologie. Computer Press a.s, Brno. 783 - 801

Colvin G. A., Lambert J. F., Carlson J. E., McAuliffe C. I., Abedi M., Quesenberry P. J., (2002) Rhythmicity of engraftment and altered cell cycle kinetics of cytokine-cultured murine marrow in simulated microgravity compared with static cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Animal* 38: 343 - 351

Crawford-Young S. J., (2006) Effects of microgravity on cell cytoskeleton and embryogenesis. *The International Journal of Developmental Biology* 50: 183 - 191

Crucian ., Stowe R. P., Mehta S., Quiriarte H., Pierson D., Sams C., (2015): Alteration in adaptive immunity persist during long-duration spaceflight, *Npj Microgravity* 1: 15003

De Smet I., Lau S., Mayer U., Jürgens G., (2010) Embryogenesis – the humble beginnings of plant life. *The Plant Journal* 61: 959 - 970

Delseny M., Bies-Etheve N., Carles Ch., Hull G., Vincent C., Raynal M., Grellet F., Aspart L., (2001) Late Embryogenesis Abundant (LEA) protein gene regulation during Arabidopsis seed maturation. *Journal of Plant Physiology* 158: 419 - 427

Dure L. III, Greenway S. C., Galau G. A., (1981) Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid population as shown by in vitro and in vivo protein synthesis. *Biochemistry* 20: 4162 - 4168

- Eshed Y., Izhaki A., Baum S. F., Floyd S. K., Bowman J. L., (2004) Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by KANADI and YABBI activities. *Development* 131: 2997 - 3006
- Goldberg R. B., De Paiva G., Yadegari R., (1994) Plant embryogenesis: Zygote to seed. *Science* 266: 605 - 614
- Herranz R., Medina F.J., (2013) Cell proliferation and plant development under novel altered gravity environments. *Plant biology* 16: (1): 23 - 30
- Hundertmark M., Hinch D. K., (2008) LEA (Late Embryogenesis Abundant) Proteins and their encoding genes in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Genomics* 9: 118
- Izhaki A., Bowman J. L., (2007) KANADI and Class III HD-Zip Gene Families Regulate Embryo Patterning and Modulate Auxin Flow during Embryogenesis in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 19: 495 – 508
- Kerstetter R. A., Bollman K., Taylor R. A., Bomblies K., Poething R. S., (2001) KANADI regulates organ polarity in *Arabidopsis*. *Nature* 411: 706 - 709
- Kiss J. Z., Millar K. D. L., Edelmann R. E., (2012) Phototropism of *Arabidopsis thaliana* in microgravity and fractional gravity on the International Space Station. *Planta* 236: 635 - 645
- Kiss J. Z., (2013) Plant biology in reduced gravity on the Moon and Mars. *Plant Biology* 16: (1): 12 - 17
- Kordyum E. L. (2014) Plant cell gravisensitivity and adaptation to microgravity. *Plant Biology* 16: (1): 79 – 90
- Link B. M., Busse J. S., Stankovic B., (2014) Seed-to-Seed-to-Seed Growth and Development of *Arabidopsis* in Microgravity. *ASTROBIOLOGY* 14: (10): 866 - 875
- Maga G., Hübscher U., (2003) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a dancer with many partners. *Journal of Cell Science* 116: 3051 - 3060
- Manfre A. J., Lanni L. M., Marcotte W. R. Jr., (2006) The Arabidopsis Group 1 LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT Protein ATEM6 Is Required for Normal Seed Development. *Plant Physiology* 140: 140 - 149

- Manohar K., Acharya N., (2015) Characterization of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) from pathogenic yeast *Candida albicans* and its functional analyses in *S. Cerevisiae*. *BMC Microbiology* 15: 257
- Mereño P., Xie Y., Brand L., Ott F., Wiegel D., Bowman J. L., Heisler M. G., Wenkel S., (2013) Genome-Wide Identification of KANADI1 Target Genes. *PLOS ONE* 8: (10): e77341
- Millar K. D. L., Johnson Ch. M., Edelmann R. E., Kiss J. Z., (2011) An Endogenous Growth Pattern of Roots Is Revealed in Seedlings Grown in Microgravity, *ASTROBIOLOGY* 11: (8): 787 - 797
- Miyachi K., Fritzler M. J., Tan E. M., (1978) Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *Journal of Immunology* 121: 2228 – 2234
- Murashige T., Skoog F., (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473 - 479
- Nakashima J., Liao F., Sparks J. A., Tang Y., Blancaflor E. B., (2013) The actin cytoskeleton is a suppressor of the endogenous skewing behavior of *Arabidopsis* primary roots in microgravity. *Plant Biology* 16: (1): 142 - 150
- Neutelings T., Nusgens B. V., Tavella S., Ruggiu A., Cancedda R., Gabriel M., Colige A., Lambert Ch., (2015) Skin physiology in microgravity: a 3-month stay aboard ISS induces dermal atrophy and affects cutaneous muscle and hair follicles cycling in mice. *Npj Microgravity* 1: 15002
- Olvera-Carrillo Y., Reyes J. L., Covarrubias A. A., (2011) Late embryogenesis abundant proteins: Versatile players in the plant adaptation to water limiting environments. *Plant Signaling & Behavior* 6: (4): 586 - 589
- O'Neill S. D., Roberts J. A., (2002) Plant Reproduction, Shetfield Academic Press Ltd, UK
- Pavlová L., Fischer L., (2011) Růst a vývoj rostlin. Karolinum, Praha. 1 - 325
- Ray A., Lang J. D., Golden T., Ray S., (1996) *SHORT INTEGUMENT (SIN1)*, a gene required for ovule development in *Arabidopsis*, also controls flowering time. *Development* 122: 2631 – 2638

- Ray S., Golden T., Ray A., (1996) RAPID COMUNICATION Maternal Effects of the *short integument* Mutation on Embryo Development in *Arabidopsis*. *Developmental biology* 180: 365 - 369
- Reiser L., Fischer R. L., (1993) The Ovule and the Embryo Sac. *The Plant Cell* 5: 1291 - 1301
- Sakar D., Nagaya T., Koga K., Seo H., (1999) Culture in vector-averaged gravity environment in a clinostat results in detachment of osteoblastic ROS 17/2.8 cells. *Environmental Medicine* 43: (1): 22 - 24
- Souter M., Lindsey K., (2000) Polarity and signaling in plant embryogenesis. *Journal of experimental botany* 51: (347): 971 - 983
- Strzalka W., Aggarwal Ch., (2013) *Arabidopsis thaliana*: Proliferating cell nuclear antigen 1 and 2 possibly form home- and heterodimeric complexes in the plant cell. *Plant signaling & Behavior* 8: (7): e24837
- Strzalka W., Ziemienowict A., (2011) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. *Annals of Botany* 107: 1127 - 1140
- Taiz L., Zeiger E., (2010) Plant physiology, Fifth Edition. Sinauer Associates, Inc., USA. 94 - 123
- Van Loon J. J. W. A. (2007) The Gravity Environment in Space Experiments in Biology in Space and Life on Earth. Enno Brinckmann (ed.). WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. 17 - 32
- Vassy J. Porter S., Beil M., Millot G., Fauvel-Lafève F., Gasset G., Schoevaert D. (2003) Weightlessness acts on human breast cancer cell line MCF-7. *Advances in Space Research* 32: (8): 1595 - 1603
- Vico L., Collet P., Guanandon A., Lafage-Proust M. H., Thomas T., Rehailia M., (2000) Effects of long-term microgravity exposure on cancellous and cortical weight-bearing bones of cosmonauts. *THE LANCET* 355: 1607 - 1611
- Wendrich J. R., Weijers D., (2013) The Arabidopsis embryo as a minature morphogenesis model. *New Phytologist* 199: 14 - 25

West M. A. L., Harada J. J., (1993) Embryogenesis in higher plants: an overwrite. *The Plant Cell* 5: 1361 - 1369

Wise M. J., (2003) LEAping to conclusion: A computational reanalysis of late embryogenesis abundant proteins and their possible roles. *BMC Bioinformatics* 4: 52

9 Seznam použitých zkratek

AP1 - APETALA1

ATP - adenosintrifosfát

AUX1 - AUXIN-RESISTANT1

BD – BODENLOS

CDK – cyklin-dependentní kináza

CTAB – hexadecyltrimethylamoniumbromid

DNA – deoxyribonukleová kyselina

EDTA - Ethylendiamintetraoctová kyselina

Fen1 – „flap endonuclease 1“

HD-ZIP III - geny s homeodoménou a leucinovým zipem

IAA - kyselina indol-3-octová

KAN - KANADI

LAX1 - LIKE-AUXIN RESISTAN

LEA - LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT

LFY - LEAFY

Lig1 – ligáza 1

MP – MONOPTEROS

MS medium – Murashige & Skoog medium

PCNA - PROLIFERATING CELL NUCLEAR ANTIGEN

PCR – polymerázová řetězová reakce

PIN1 - PINFORMED1

pol δ/ϵ – polymeráza δ/ϵ

RNA – ribonukleová kyselina

RPM – Random Positioning Maschine

SIN - *SHORT INTEGUMENT*

TFL1 - *TERMINAL FLOWER*

Tris - tris(hydroxymethyl)aminometan

WOX - *WUSCHEL RELATED HOMEBOX*

WT - wild-type