

Růst a vývoj rostlin - praktikum

MB130C78

Blok 1

Hormonální regulace vývoje rostlin

Úlohy:

1. Role mezibuněčného transportu auxinu při pozitivní gravitropické odpovědi kořene semenáčku *Arabidopsis thaliana*
2. Auxinové přenašeče při vývoji hlavního a vedlejšího kořene *Arabidopsis thaliana*
3. Hormonální regulace transkripce v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*

Teoretický úvod

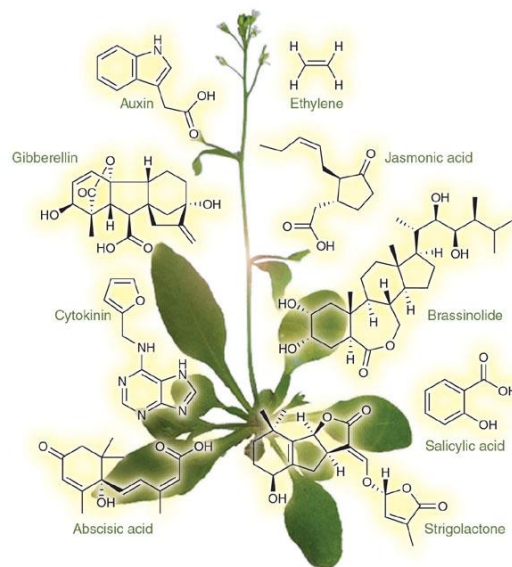
Vývoj rostlin je pod kontrolou mnoha vnějších a vnitřních faktorů. **Rostlinné hormony (fytohormony)** jsou většinou nízkomolekulární látky, které jsou využívány rostlinami při regulaci všech fází ontogenetického vývoje rostliny (pro přehled Santner et al., 2009). Fytohormonů je více skupin (auxiny, cytokininy, gibereliny, kyselina abscisová, etylén, brassinosteroidy, strigolaktony, jasmonáty, polyaminy, peptidové hormony), v tomto bloku se však budeme především zabývat **auxiny a cytokininy**. Auxiny a cytokininy spolupracují úzce při regulaci buněčného dělení a elongace v průběhu embryogeneze a též v jednotlivých fázích vegetativního a generativního vývoje rostliny.

V **úlohách 1 a 2** si budeme dokumentovat důležitost směrovaného toku auxinu v kořenové špičce semenáčků *Arabidopsis thaliana*. Auxin je transportován do špičky kořene v jeho vnitřní části a v buňkách kořenové čepičky se tento tok otáčí směrem vzhůru v buňkách kořenové pokožky. Pro zajištění tohoto toku jsou v plazmatických membránách buněk přítomny přenašeče auxinu.

V **úloze 1** budeme sledovat jak gravitropický stimul ovlivní lokalizaci auxinu v kořenové špičce semenáčků *Arabidopsis thaliana*

V **úloze 2** budeme specifikovat místa, kde je auxin přednostně koncentrován a lokalizaci jeho přenašečů.

V **úloze 3** si budeme názorně dokumentovat jak jsou rostlinné hormony schopné ve svém účinku regulovat **specifickou genovou expresi**. Ukážeme si jak specifické může být působení hormonu na příkladu spuštění transkripce syntetického genového konstruktu nesoucího část promotoru z genů citlivých na auxin a cytokinin.



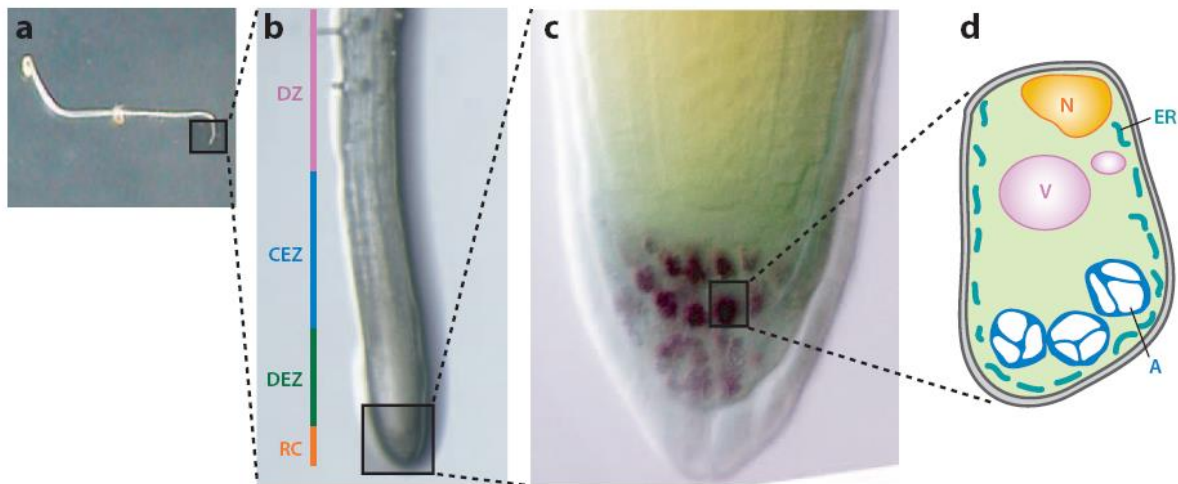
Obr. 1: Fytohormony ovlivňují veškeré procesy růstu a vývoje rostlin. Převzato ze Santner et. al. (2009).

Role auxinu v gravitropickém ohybu kořene rostlin

Gravitropismus kořenové špičky náleží mezi vitální ohybové pohyby rostlin. Řadí se mezi pohyby **paratonické** povahy, tj. takové, které jsou vyvolány vnějším podrážděním. Tak jako další tropismy (např. fototropismus, tigmotropismus, hydrotropismus) je i gravitropismus **orientován vůči stimulu**, v tomto případě vůči **zemské tíži**.

Pozitivní gravitropismus kořene zprostředkovaný ohybem kořenové špičky ve směru gravitačního vektoru byl pozorován již v experimentech Charlese Darwina a jeho syna Francise (1881). Tato schopnost je u rostlin důležitá pro jejich ukotvení v půdě, primárně souvisí se zprostředkováním

dostupnosti živin, které kořeny přijímají z půdy. V celém procesu ohybu kořenové špičky hrají důležitou roli **statocyty**, buňky nacházející se v centrální části kořenové čepičky. Tyto buňky obsahují **statolity** v podobě plastidů často obsahujících **přesýpavý škrob (Obr. 2)**. Jedním z objevitelů tohoto přesýpavého škrobu byl na konci 19. století **Prof. Bohumil Němec**, zakladatel ústavu na němž probíhají tato praktika.



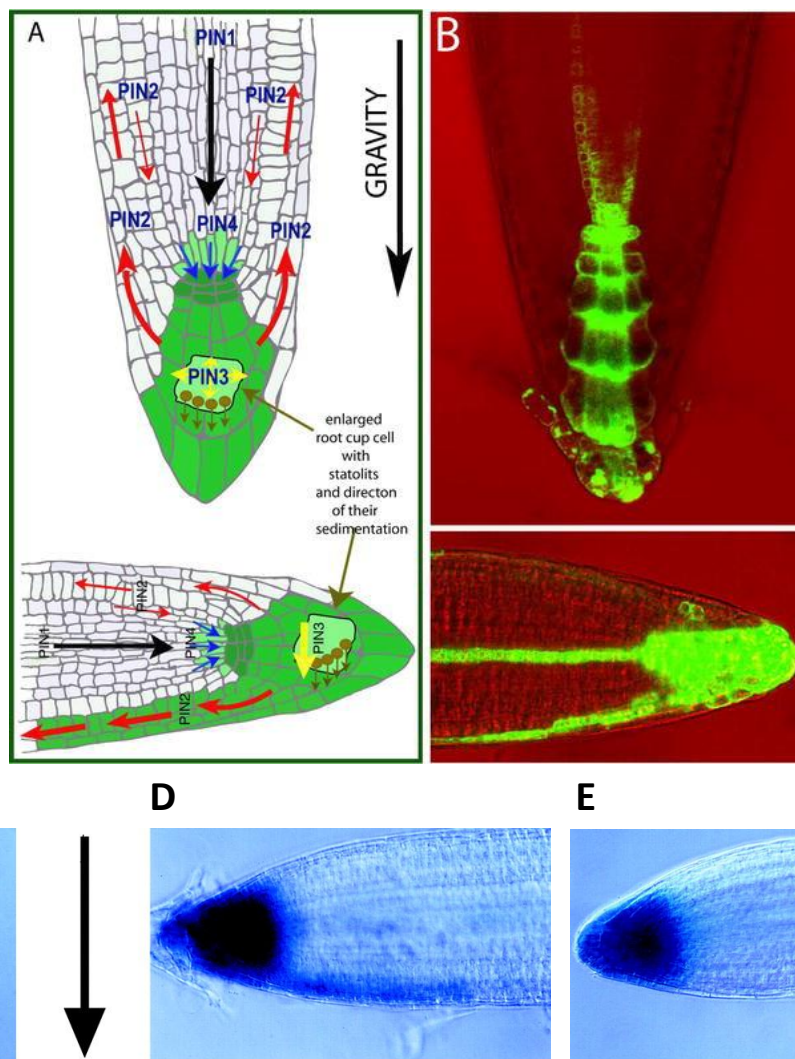
Obr. 2: Třídenní semenáček *Arabidopsis thaliana* rostoucí ve tmě umístěný na 24 h horizontálně ohýbá kořenovou špičku směrem dolů (a). Zvětšená část kořenové špičky (b, c) s kořenovou čepičkou. Fialově jsou Lugolovým roztokem (trijodid draselný) označeny buňky obsahující plastidy (amyloplasty) obsahující přesýpavý škrob, tzv. statocyty. Schematické zobrazení statocytu (d) s buněčným jádrem (N), vakuolou (V), statolitovým amyloplastem (A) a endoplazmatickým retikulem (ER). Převzato z Morita (2010).

Mechanismus, kterým dochází k předání informace od plastidů se škrobem (amyloplastů) přesouvajících se v kořenové špičce ve směru gravitačního vektoru, stále není přesně poznán. Zapojeny jsou v něm složky **aktinového cytoskeletu** a následná signální kaskáda vyvolávající přesun auxinového přenašeče **PIN3** v buňkách kolumely kořenové čepičky z původně spodní plazmatické membrány na původně laterální plazmatickou membránu. Tento přesun způsobí, že **auxin** je dopraven do povrchových pletiv na spodní straně kořene, je dopraven dále do elongační zóny, kde inhibuje prodlužování buněk. **Spodní strana se pak prodlužuje méně než horní strana a následkem je ohyb kořene směrem dolů (Obr. 3)**. Důležitou roli při zajištění gravitropické odpovědi kořene hraje i aktivní transport auxinu do a z kořenové špičky prostřednictvím přenašeče auxinu do buněk, proteinu **AUX1**. V případě jeho absence (např. v mutantu *aux1-7*) jsou rostliny **aggravitropní** tj. nemají schopnost správně odpovídat na gravitační stimul.

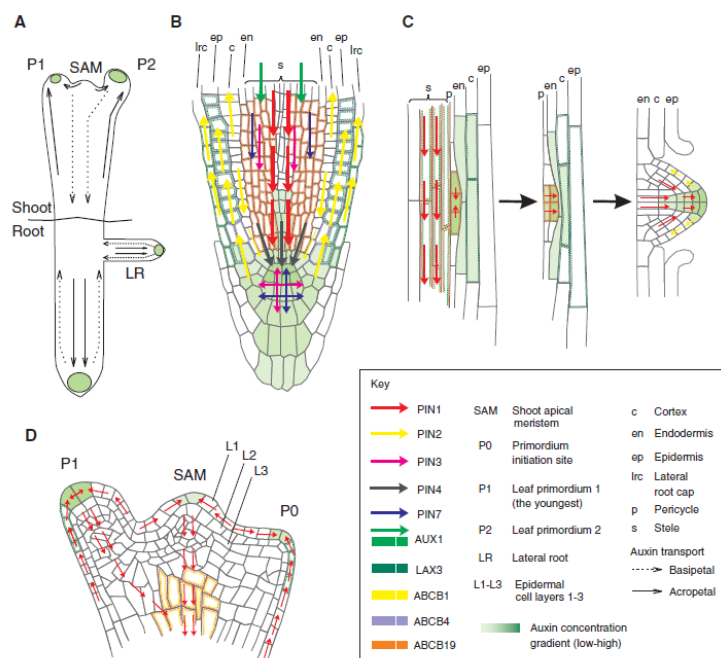
Role auxinu v organogenezi kořene rostlin

Molekuly auxinu (**indolyl-3-octová kyselina, IAA**) jsou v rostlinném těle dopravovány na delší vzdálenosti ve floému spolu s dalšími látkami. IAA je ale také přenášena přes plazmatickou membránu buněk některých pletiv prostřednictvím specifických přenašečů (Petrášek and Friml, 2009). Schopnost auxinu udávat ve specifické koncentraci specifickou informaci o buněčném osudu je důležitá pro formování hlavního kořene i postranních kořenů. V rostlině jsou auxinová maxima udržována pomocí neustálého toku auxinu směrem k vzrostnému vrcholu nadzemní část a zpětným tokem směrem k bázi stonku (**Obr. 4A**). Zatímco ve stonku je auxin transportován směrem k jeho špičce v povrchových vrstvách a zpět v centrální části stonku, u kořenů je tomu naopak (**Obr. 4A**). Přesměrování toku v kořenové špičce má pod kontrolou řada auxinových přenašečů (**Obr. 4B**). Šipky označují tok auxinu zprostředkovaný vyznačeným přenašečem, přerušované čárkování vyznačuje lokalizaci přenašeče v konkrétních buňkách bez zjevné apiko-bazální polarizace. Aby bylo možné vytvořit takovou představu o zapojení

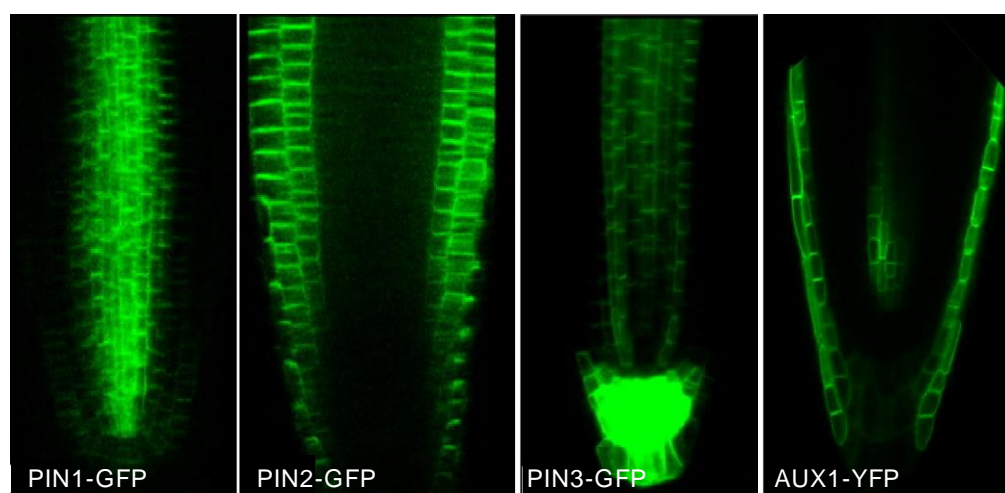
přenašečových molekul, bylo zapotřebí vytvořit rostliny nesoucích tyto molekuly pod přirozenými promotory v translačních fúzích s fluorescenčními proteiny (**Obr. 5**).



Obr. 3: Přesun auxinu během gravistimulace kořenové špičky semenáčku *Arabidopsis thaliana*. Auxinový přenašeč PIN3 původně transportuje auxin (zelená barva) přicházející do kořenové špičky seshora rovnoměrně do obou laterálních směrů. Amyloplasty se škrobem jsou též orientovány na spodní straně statocytů. Po položení kořene horizontálně se přesunou amyloplasty i PIN3 na spodní stranu a auxin (zelená barva) je pumpován směrem dolů (**A**). Po čase se kořen ohýbá směrem dolů. Koncentrace auxinu lze nepřímo sledovat pomocí zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) připojeného za promotorem, který je citlivý na auxin (DR5::GFP). Fluorescence GFP se po gravistimulaci jasně přesouvá na spodní stranu kořene, což naznačuje přesun auxinu (**B**). Převzato z Michniewicz a kol. (2007). **Expres DR5::GUS před (C) a po 6 hodinách gravistimulace (D, E) u týdenního semenáčku *Arabidopsis thaliana*.** Šipka udává směr gravitačního vektoru, modré zbarvení je patrné na spodní straně kontrolního kořene (**D**), ale k tomuto nedochází u rostlin pěstovaných na 1 μM NPA (**E**). Tento inhibitor znemožní transport auxinu z buněk. Převzato z Rashotte a kol (2007).



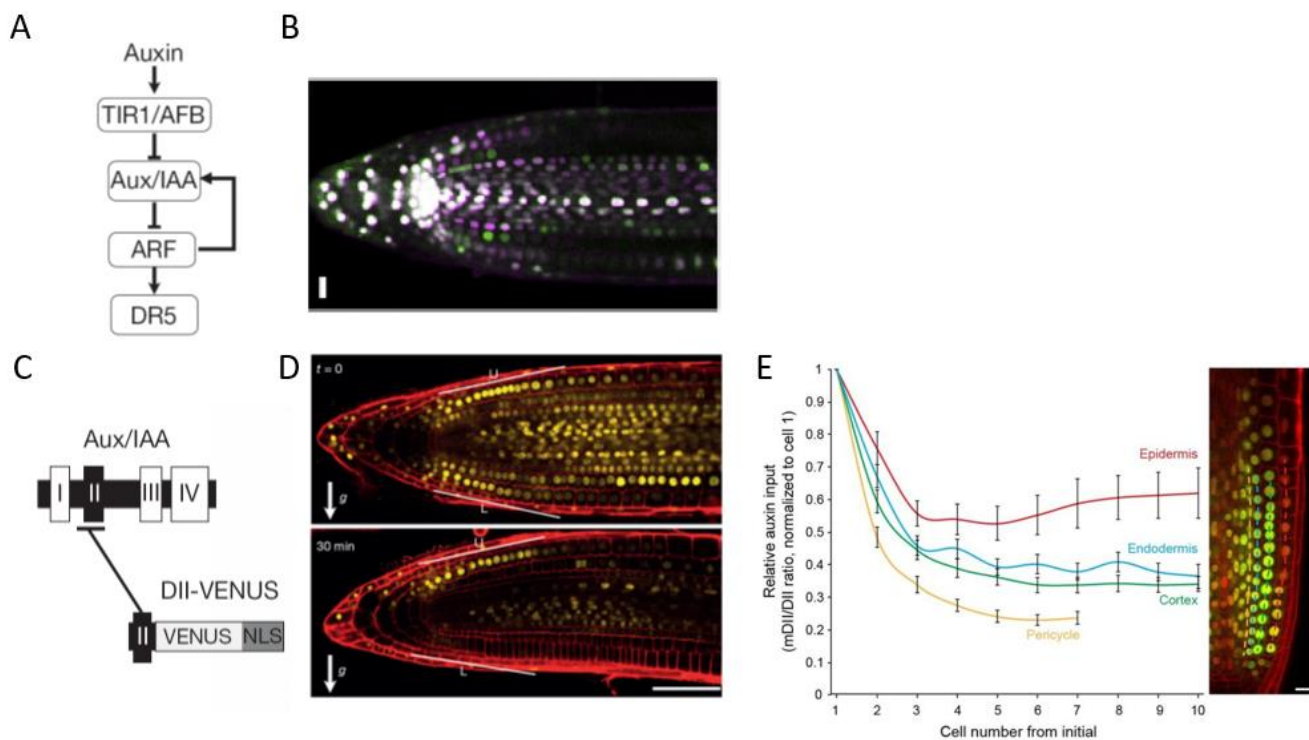
Obr. 4: Směry transportu auxinu s vyznačením jednotlivých přenašečů v hlavním kořeni (B), laterálním kořeni (C) a vzrostném vrcholu (D). Převzato z Petrášek and Friml, 2009.



Obr. 5: Distribuce PIN1, PIN2, PIN3, PIN4, PIN7 a AUX1 v kořeni semenáčků *Arabidopsis thaliana*. Veškeré lokalizace prezentované na tomto obrázku jsou *in vivo*. Převzato z Růžička et al, 2007 a 2009.

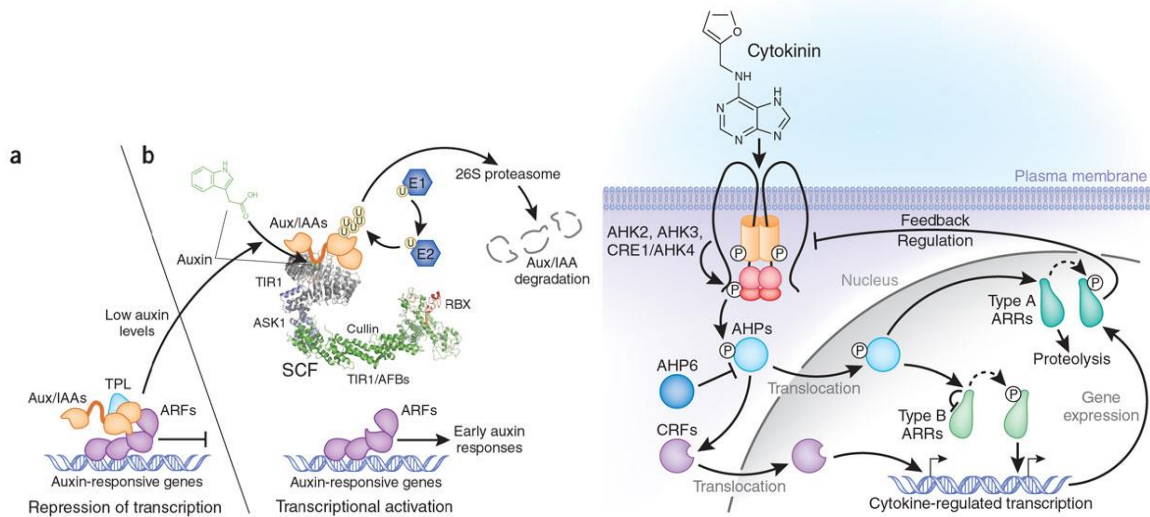
Mechanismus ovlivnění genové exprese prostřednictvím fytohormonů na příkladu auxinů a cytokininů

Auxin stimuluje **specifickou degradaci transkripčních represorů** Aux/IAA blokujících transkripci přes proteiny ARF (auxin response factors). ARFs jsou v interakci s úseky DNA, tzv. AuxRE (auxin responsive elements). Jsou to právě tyto sekvence, jejichž přítomnost rozhoduje o citlivosti buňky na auxin a jejich části jsou základem syntetických genových konstruktů jako je **DR5::GUS** či **DR5-n3-GFP/DR5v2-ntdTomato** (Liao a kol., 2015) (**obr. 6A-B**). Degradace Aux/IAA je řízena ubiquitinací prostřednictvím komplexu ubiquitin ligázy E3 obsahující receptor pro auxin, protein TIR1, a směřována do proteasomu. Při nízkých hladinách auxinu (**Obr. 7 vlevo, a**) jsou geny odpovídající na auxin reprimovány pomocí Aux/IAA represorů, auxin spustí degradaci Aux/IAA a expresi auxinem-indukovaných genů (**Obr. 7 vlevo, b**). Tuto specifickou degradaci lze vizualizovat pomocí genového konstruktů obsahujícího fluorescenčně označenou část degradačního boxu Aux/IAA represoru, tzv. **DII-VENUS (Obr. 6C-D)**.

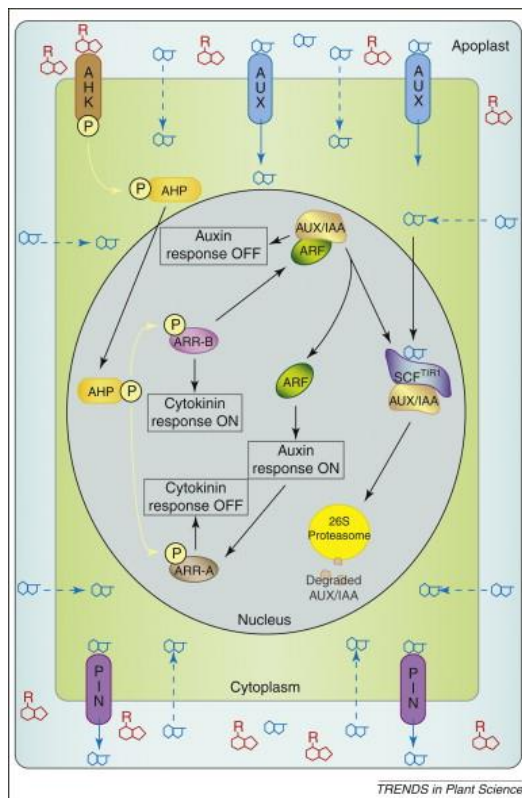


Obr. 6: Porovnání mechanismu fungování elementu DR5 (A, B) a DII (C, D, E). DR5 je přirozenou součástí promotorů genů odpovídajících na auxin. V případě, že je tímto syntetický promotorem řízena exprese fluorescenčních proteinů, je tato detekovatelná všude, kde je dostatek auxinu. Vlastní reakce na změnu v koncentraci hormonu není tak pohotová (je potřeba aby proběhla transkripce, translace i post-tranlasční úpravy). Existují různě citlivé verze DR5 elementů, jak patrně z jaderně lokalizovaného DR5-n3-GFP/DR5v2-ntdTomato (B). Rychlejší zobrazení transkripční odezvy na auxin představuje DII (C), který je částí sekvence degradačního boxu Aux/IAA represoru (Brunoud a kol., 2012). (D) Expese DII-VENUS zobrazující rychlou degradaci Aux/IAA represorů na spodní straně kořene po 30 minutách gravistimulace. (E) Rostlina nesoucí element DII-VENUS (zelená fluorescence) a jeho na auxin necitlivou verzi mDII-VENUS (červená fluorescence) současně (R2D2). Taková kombinace umožňuje kvantifikovat příspěvek auxinu k řízení exprese v každé jednotlivé buňce. Převzato z Liao a kol. (2015) (B, E) a Brunoud a kol. (2012) (A, C, D).

Zcela jiný je mechanismus působení cytokininů (Obr. 7 vpravo). Po vazbě cytokininu na receptor v podobě dvousložkové histidinové kinázy lokalizované v plazmatické membráně (CRE1, AHK2, AHK3) je spuštěn sled **fosforylačních reakcí** přes proteiny AHP (Arabidopsis histidin phosphotransfer protein). Výsledkem je aktivace transkripčních faktorů (ARR typu A a B; Arabidopsis response regulators). ARR typu A jsou negativními regulátory odpovědi na cytokininy, ARR typu B jsou pozitivními stimulanty genové exprese. Právě elementy z promotorů ARR typu B jsou podkladem syntetického konstruktů TCS-GFP či TCS-GUS (Muller and Sheen, 2008). V současné době je předmětem intenzivního výzkumu mechanismus kooperace mezi jednotlivými fytohormony, zejména mezi auxiny a cytokininy. Zdá se, že vedle regulací post-transkripční povahy je spolupráce mezi auxinem a cytokininem řízena na úrovni kontroly exprese pozitivních (ARR-B) a negativních regulátorů (ARR-A) odezvy na cytokininy. Tento mechanismus je provázán s kontrolou exprese jednotlivých ARFs cytokininu (Obr. 8).



Obr. 7: Schematické zobrazení mechanismu účinku auxinu (vlevo) a cytokininu (vpravo). Převzato ze Santner et al., 2009.



Obr. 8: Schematické zobrazení mechanismu spolupráce auxinu a cytokininu spočívající ve vzájemném ovlivnění transkripčních regulátorů. Převzato z Moubayidin et al., 2009.

Úlohy

1. Role mezibuněčného transportu auxinu při pozitivní gravitropické odpovědi kořene semenáčku *Arabidopsis thaliana*

Cíl úlohy:

Prokažte, že se během reakce kořenů semenáčků *Arabidopsis thaliana* na gravitropní stimul přesouvá rostlinný hormon auxin na spodní stranu kořene. Dokumentujte, co se děje v rostlinách nesoucích mutaci v proteinu AUX1, proteinu transportujícím auxin do buněk.

Princip úlohy:

Otočením rostlin kolmo na původní směr růstu dosáhneme stimulace mechanismů, které rostlinám umožňují udržovat růst orientovaný vůči gravitačnímu poli země či obnovit původní směr růstu např. po setkání s překážkou bránící rostlině v růstu. V úloze budeme sledovat genovou expresi řízenou auxinem v buňkách kořenové špičky mladých rostlin *Arabidopsis thaliana* před gravistimulací a po ní. Využívat budeme rostliny transformované fúzními genovými konstrukty, tzv. markerové linie.

První markerové linie obsahují syntetický promotor (tzv. DR5), který je citlivý na auxin (Ulmasov a kol., 1997). Tento promotor řídí expresi genu kódujícího enzym β -glukuronidázu (GUS) (Obr. 3C-E). Pouze tam, kde je dostatek auxinu, se tak spustí exprese enzymu GUS. Aktivitu GUS lze pozorovat jako modré zabarvení, které vzniká pokud se přidá k rostlinám chromogenní substrát X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide). V rostlinách se normálně fluorescenční proteiny či GUS nevyskytují a proto se úspěšně využívají pro sledování lokalizací aktivit promotorů či přímo lokalizaci proteinů.

Druhým systémem, který zde využijeme jsou markerové linie nesoucí element DII (Obr. 6C-D), který je částí sekvence degradačního boxu Aux/IAA represoru (Brunoud et al., 2012). DII-VENUS zobrazuje degradaci Aux/IAA represorů negativně. Čím větší je vyhasínání fluorescence proteinu VENUS (Obr. 6C-D), tím více dané buňky obsahují auxinu a odpovídají na něj. Jde tedy o auxinem stimulovanou degradaci markerového fluorescenčního proteinu. Fluorescenční proteiny VENUS se dají pozorovat přímo fluorescenčním mikroskopem, není potřeba je nijak barvit.

Zadání:

Porovnáním distribuce DR5::GUS dokažte přesun auxinu na spodní stranu kořene po jeho po gravistimulaci. Dokumentujte, co se stane, pokud je rostlina mutována v proteinu AUX1, který je zodpovědný za transport auxinu do buněk. Přesun auxinu také dokumentujte pomocí vyhasínání signálu DII-VENUS či zesílení červené fluorescence ratiometrické verze DII (R2D2) na spodní straně kořene, stačí úspěch v jednom z těchto dvou způsobů.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

1) Semenáčky *Arabidopsis thaliana* pět dnů po vyklíčení, pěstované *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS salts Sigma M5524, pH 5.7.

Na misce 1 jsou tyto varianty:

1. DR5::GUS	2. DR5::GUS <i>aux1</i>	
3. DII- VENUS	4. mDII- VENUS	5. R2D2

1. DR5::GUS
2. DR5::GUS v mutantu *aux1-7*
3. DII-VENUS - svítí všude, kde je méně auxinu, tj. po gravistimulaci by měla zhasnout na spodní straně.
5. mDII-VENUS - kontrolní verze, nereaguje na auxin, svítí stále stejně, nezhasíná po gravistimulaci.
6. R2D2 - DII a mDII v jedné rostlině, tzv. **Ratiometric version of 2 DIIs**, čím více červené, tím více auxinu. V našem případě na spodní straně kořene po gravistimulaci.

2) 1 M Fosfátový pufr, pH=7.2

3) 0,1 M Hexakynoželesitan draselný (červená krevní sůl) $K_3[Fe(CN)_6]$ a 0,1 M Hexakynoželesitan draselný (žlutá krevní sůl) $K_4[Fe(CN)_6]$.

4) 0,2 M zásobní roztok 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc).

5) 10% Triton X-100.

6) 70% etanol.

7) Deionizovaná voda.

8) Plastové zkumavky, plastová kapátka, parafilm, stojánek na falkonky, plastová inkubační destička, jemná pinzeta, pipety, špičky, fixy, fluorescenční mikroskop s dokumentačním zařízením, invertovaný mikroskop a lupa pro průběžnou kontrolu barvení GUS, třepačka, vyhřívaný inkubátor.

Postup:

1) Připravte **6 ml** barvicího roztoku obsahujícího 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide (X-Gluc) pro barvení GUS.

Složení na **6 ml** (míchejte v uvedeném pořadí do **15 ml falkonky**):

600 μ l 1 M fosfátového pufru (výsledná koncentrace 0,1 M)

120 μ l 0,1 M Hexakynoželesitanu draselného (červená krevní sůl) $K_3[Fe(CN)_6]$ (výsledná koncentrace 2 mM)

120 μ l 0,1 M Hexakynoželesitanu draselného (žlutá krevní sůl) $K_4[Fe(CN)_6]$ (výsledná koncentrace 2 mM),

60 μ l 10% Tritonu X-100 (výsledná koncentrace 0,1%)

60 μ l zásobního roztoku 0,2 M X-Gluc

Doplnit do **6 ml deionizovanou vodou**.

2) Do dvou jamek plastové destičky přidejte po 1 ml barvicího roztoku X-Gluc. Potom **pinzetou** odeberte **5-10** semenáčků od variant **1 a 2** (polovinu všech semenáčků co máte od dané varianty k dispozici) a přeneste je do barvicího roztoku v jamkách. **Označte fixem** jednotlivé varianty přímo na víčko destičky. Toto jsou **kontrolní rostliny pro stav před gravistimulací**. Přeneste celou destičku **alespoň na 30 minut do 37°C (inkubační pírka)**. Co nejrychleji též přeneste kontrolní rostliny variant 3-5 (DII-VENUS, mDII VENUS a R2D2) do kapky vody na mikroskopické sklíčko, nebo do jamky s vodou v plastové destičce. Pokračujte **ihned bodem 3**.

3) Misku s rostlinami **uzavřete**, přetáhněte **parafilmem**, pečlivě uzavřete alobalem a **označte na něm původní gravitační vektor**. Misky udržované během předchozí kultivace ve vertikální poloze **otočte o 90°** k udělení **gravistimulačního impulsu** a ponechte takto 2-2,5 h.

Pomocí fluorescenčního mikroskopu a připojené kamery nasnímejte fluorescenci v kořenové špičce před gravistimulací pro varianty 3-5 (rostlinky čekající v kapce na mikroskopickém skle či v destičce). Uložte si obrázky pro účely protokolu.

4) Po **30 minutách** barvení rostlin variant **1-2** zkontrolujte přítomnost modrého zbarvení na binokulární lupě a v případě, že je již dostatečně vidět, odsajte barvicí roztok pomocí plastového kapátka a **zachovejte ho ve falkonce, budete ho ještě potřebovat**. Přidejte k rostlinám **70% etanol**. Nasnímejte modré zbarvení na mikroskopu s připojenou kamerou. Modré barvení je stabilní, pokud jsou vzorky v 70% etanolu, proto není nutné pospíchat se snímáním. **Lze tak dát na mikroskopech prostor kolegům, kteří mikroskopují živé semenáčky s GFP.**

5) Po **2-2,5 hodinách** gravistimulace přeneste rostliny ze vzorků **1-2** do barvicího roztoku v plastové destičce. Opakujte postup barvení a snímání jako pro rostliny před gravistimulací. Rostliny variant 3-5 (DII-VENUS, mDII-VENUS a R2D2) snímejte podobně jako před gravistimulací pomocí fluorescenčního mikroskopu.

6) Podle zbarvení GUS posuďte jak se liší rostlina divokého typu a rostlina nesoucí mutaci v genu AUX1. Dále popište, zda-li se Vám podařilo úspěšně prokázat přesun auxinu na spodní stranu kořene po gravistimulaci pomocí DII-VENUS či R2D2.

Popište experiment svými slovy, doplňte obrazovou dokumentaci. Kdo bude zvládat, může doplnit kvantifikaci přesunu signálu pomocí analýzy obrazu ImageJ.

2. Auxinové přenašeče při vývoji hlavního a vedlejšího kořene *Arabidopsis thaliana*

Cíl úlohy:

Určete povahu distribuce a identitu předložených fluorescenčně označených přenašečů auxinu v hlavním a postranním kořenu týden starých transgenních semenáčků *Arabidopsis thaliana*.

Princip úlohy:

Rostliny transformované genovými konstrukty nesoucími geny pro jednotlivé auxinové přenašeče pod jejich přirozenými promotory představují ideální nástroj pro sledování distribuce těchto přenašečů v rostlině. Na obr. 4 a 5 jsou schematicky a mikroskopicky zobrazeny distribuce všech přenašečů auxinu, které se účastní při morforegulační distribuci auxinu v kořeni. V této úloze jde o **mikroskopické sledování lokalizace** proteinů **PIN1-GFP, PIN2-GFP, PIN3-GFP, a AUX1-YFP** v buňkách hlavního a postranního kořene u týdenních rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Rostliny jsou pro účely tohoto pozorování transformovány fúzními genovými konstrukty obsahujícími **kódující sekvence pro jednotlivé auxinové přenašeče spojené translačně s fluorescenčním proteinem, které jsou pod kontrolu svých vlastních přirozených promotorů**. Lokalizace GFP se dá pozorovat přímo **fluorescenčním mikroskopem**. V rostlinách se normálně proteiny GFP a YFP nevyskytují a proto se úspěšně využívají pro sledování lokalizací aktivit promotorů či přímo lokalizaci proteinů s nimi spojených.

Zadání:

Porovnáním distribuce GFP přiřadte ke vzorkům 1-4 správný název. Vodítkem při analýze kromě mikroskopického obrazu jsou i obr. 4 a 5. Pokuste se určit, který z předložených přenašečů se účastní zakládání a vývoje postranního kořene. Popište svými slovy lokalizaci.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

1) Semenáčky *Arabidopsis thaliana* sedm dnů po vyklíčení, pěstované *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS salts Sigma M5524, pH 5.7.

Na misce jsou tyto varianty:

1.	2.	3.	4.
5. DR5::GFP	6. DR5::GUS	7. DII-VENUS	
8. TCS::GFP		9. TCS::GUS	

1-4. PIN1::PIN1:GFP, PIN2::PIN2:GFP, PIN3::PIN3:GFP, AUX1::AUX1:YFP.

Pořadí neznáte, cílem je ho určit.

2) Deionizovaná voda.

3) Plastové zkumavky, plastová kapátka, parafilm, stojánek na falkonky, plastová inkubační destička, jemná pinzeta, pipety, špičky, fixy, fluorescenční mikroskop s dokumentačním zařízením.

Postup:

1) Přeneste rostliny variant **1-4** na mikroskopické sklíčko a pomocí fluorescenčního mikroskopu a připojené kamery nasnímejte fluorescenci v kořenové špičce, v primordiích laterálních kořenů a ve špičkách laterálních kořenů. Uložte si obrázky pro účely protokolu. Během snímání si pečlivě zaznamenejte charakter distribuce jednotlivých proteinů. Nemusíte připravovat všechny varianty najednou, je lépe rostliny ponechat na misce či v kapce vody v jamce plastové destičky. Vyvarujte se hlavně toho, aby kořen byl na suchu.

3) Porovnáním distribuce GFP přiřadte ke vzorkům **1-4 správný název**. Určete, které z předložených přenašečů se účastní zakládání a vývoje postranního kořene. **Popište experiment svými slovy, doplňte obrazovou dokumentaci.**

3. Hormonální regulace transkripce v semenáčcích *Arabidopsis thaliana*

Cíl úlohy:

Určete povahu předložené látky (buď auxin či cytokinin) podle její schopnosti iniciovat genovou expresi u transgenních semenáčků *Arabidopsis thaliana*.

Princip úlohy:

Principem je sledování zesílení exprese syntetických genových konstruktů v rostlinách *Arabidopsis thaliana* nesoucích markerové proteiny pod promotory citlivými na auxin, DR5::GFP a DR5::GUS (Obr. 3, Ulmasov et al., 1997), či vyhasnutí fluorescence DII-VENUS. Pro cytokinin máte k dispozici markery TCS::GFP a TCS::GUS (Muller a Sheen, 2008). Zesílení signálu musí být dobře patrné po celé délce kořene, případně ve stonku a listech.

Zadání:

Podle intenzity zabarvení GUS či intenzity fluorescence GFP se pokuste určit, zda předložená látka je auxinem či cytokininem. Značení by mělo být patrné nejen v obvyklých místech, ale podél celého kořene.

Materiál a postup:

Rostlinný materiál, chemikálie a potřebné vybavení:

1) Semenáčky *Arabidopsis thaliana* sedm dnů po vyklíčení, pěstované *in vitro* na pevném médiu. Složení kultivačního média: 1% sacharóza, 1% agar, 2,15g/l MS salts Sigma M5524, pH 5.7.

Na misce 2 jsou tyto varianty:

1.	2.	3.	4.
5. DR5::GFP	6. DR5::GUS	7. DII-VENUS	
8. TCS::GFP		9. TCS::GUS	

- 5. DR5::GFP
- 6. DR5::GUS
- 7. DII-VENUS
- 8. TCS::GFP
- 9. TCS::GUS

2) GUS barvicí roztok připravený v první úloze.

3) 70% ethanol.

4) Deionizovaná voda.

5) Plastové zkumavky, plastová kapátka, parafilm, stojánek na falkonky, plastová inkubační destička, jemná pinzeta, pipety, špičky, fixy, fluorescenční mikroskop s dokumentačním zařízením, invertovaný mikroskop a lupa pro průběžnou kontrolu barvení GUS, třepačka, vyhřívaný inkubátor.

Postup:

1) Pinzetou odeberte vždy 2x **4-5** semenáčků od variant 5-9 (DR5::GFP, DR5::GUS, TCS::GFP a TCS::GUS) a přeneste je do 1 ml destilované vody v plastové destičce. **Označte fixem** jednotlivé varianty přímo na víčko destičky. K pěti variantám dostanete přidánu testovanou látku (bude Vám poskytnuta) v koncentraci 10 μ M (1 μ l/1 ml vody). Druhá pětice bude kontrolní, zde nepřidáváte žádnou látku. Inkubujte alespoň 2,5 h hodiny na třepače v pokojové teplotě.

2) Po uplynutí 2,5 h hodin pozorujte fluorescenční varianty DR5::GFP a TCS::GFP (vz. 5, 7, 8) přímo na fluorescenčním mikroskopu. U DR5-GUS a TCS-GUS (vz. 6 a 9) proveďte barvení alespoň 30 minut při 37°C a **průběžně kontrolujte modré zbarvení na invertovaném mikroskopu či lupách**, stejně jako v úloze 1. V případě, že je barvení již dobře patrné, odsajte barvicí roztok pomocí plastového kapátka. **Zachovejte použitý barvicí roztok ve falkonce**. Přidejte k rostlinám **70% etanol**. Nasnímejte modré zbarvení na mikroskopu s připojenou kamerou. V případě nedostatku času stačí pouze slovní hodnocení a **rozhodnutí jaký fytohormon byl předložen**. **Popište experiment svými slovy, doplňte obrazovou dokumentaci**.

Citovaná literatura:

- Bishopp, A., Mähönen, A.P., Helariutta, Y. (2006) Signs of change: hormone receptors that regulate plant development. *Development* 133(10):1857-69.
- Brunoud, G., Wells, D.M., Oliva, M., Larrieu, A., Mirabet, V., Burrow, A.H., Beckman, T., Kepinski, S., Traas, J., Bennett, M.J., Vernoux, T. (2012) A novel sensor to map auxin response and distribution at high spatio-temporal resolution. *Nature* 482, 103-106.
- Darwin, C. and Darwin, F. (1881). The power of movement in plants. New York: D. Appleton and Company, 1, 3, and 5 Bond Street.
- Feraru, E., and Friml, J. (2008). PIN polar targeting. *Plant Physiology* **147**, 1553-1559.
- Liao C.-Y., Smet W., Brunoud G., Yoshida S., Vernoux T., Weijers D. (2015) Reporters for sensitive and quantitative measurement of auxin response. *Nature Methods* **12**, 207-210.
- Michniewicz, M., Brewer, P.B., Friml, J. (2007). Polar Auxin Transport and Asymmetric Auxin Distribution Source: The Arabidopsis Book, Number 5. Published By: The American Society of Plant Biologists URL: <http://www.bioone.org/doi/full/10.1199/tab.0108>
- Morita, M.T. (2010). Directional Gravity Sensing in Gravitropism. In *Annual Review of Plant Biology* **61**, S. Merchant, W.R. Briggs, and D. Ort, eds, pp. 705-720.
- Moubayidin, L., Di Mambro, R., and Sabatini, S. (2009). Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**, 557-562.
- Muller, B., and Sheen, J. (2008). Cytokinin and auxin interaction in root stem-cell specification during early embryogenesis. *Nature* **453**, 1094-U1097.
- Petrášek, J., and Friml, J. (2009). Auxin transport routes in plant development. *DEVELOPMENT* **136**, 2675-2688.
- Růžicka, K., Ljung, K., Vanneste, S., Podhorská, R., Beckman, T., Friml, J., and Benková, E. (2007). Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution. *Plant Cell* **19**: 2197–212.
- Růžicka, K., Simásková, M., Duclercq, J., Petrášek, J., Zazímalová, E., Simon, S., Friml, J., Van Montagu, M.C.E., and Benková, E. (2009). Cytokinin regulates root meristem activity via modulation of the polar auxin transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**: 4284–9.
- Rashotte, A.M., DeLong, A., and Muday, G.K. (2001). Genetic and chemical reductions in protein phosphatase activity alter auxin transport, gravity response, and lateral root growth. *Plant Cell* **13**, 1683-1697.
- Santner, A., Calderon-Villalobos, L.I.A, Estelle, M. (2009). Plant hormones are versatile chemical regulators of plant growth. *Nature Chemical Biology* **5 (5)**, 301-307.
- Ulmasov, T., Murfett, J., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J. (1997). Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements. *Plant Cell* **9**, 1963-1971.