

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Katedra experimentální biologie rostlin**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



**Bc. Anna Kampová**

Vliv atmosférických srážek na otevírání prašníků  
The role of atmospheric precipitation in anther dehiscence

Diplomová práce

Vedoucí práce: Mgr. Stanislav Vosolsobě, Ph.D.

Praha, 2020

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 3. 8. 2020

Podpis

## Poděkování

Ráda bych na tomto místě vyjádřila vděčnost svému školiteli, Mgr. Stanislavu Vosolsobě, Ph.D. Děkuji mu za laskavý přístup, trpělivé zodpovídání mých četných dotazů, bezproblémovou komunikaci a za skutečnost, že nebylo třeba bát se přiznat neúspěch či chybu. Děkuji za neotřelý nápad na téma této diplomové práce, jejíž realizace byla výzvou, ale zároveň byla kreativní, obohacující a velmi zajímavá.

Děkuji vedení, RNDr. Kateřině Schwarzerové, PhD., a RNDr. Janu Petráškovi, PhD., a celému osazenstvu domovské laboratoře za vytvořené vlídné a stimulující pracovní prostředí. Dr. Petráškovi zároveň děkuji za diskuze nad tématem mé práce a konzultace. Díky dále patří Mgr. Petře Cifrové za seznámení s provozem v laboratoři a Ing. Mgr. Janě Pilátové za dobré nápady a rady, které posouvaly práci kupředu. Mgr. Janu Martinkovi děkuji za možnost využití jeho konstruktů pro transformaci a čas, který mi věnoval na počátku mé práce s konfokálním mikroskopem.

Stěžejní pokusy této práce by nebylo možné realizovat bez Mgr. Josefa Šonky, kterému tímto děkuji za pomoc se zavedením a optimalizací experimentálních systémů ve skleníku naší katedry. Mgr. Elišce Kobercové děkuji za podnětné připomínky a rady. Paní Eleně Kozlové děkuji za pomoc se správou grantu.

Poděkování náleží i RNDr. Miroslavu Hylišovi, PhD., za přípravu vzorků a zasvěcení do práce se skenovacím elektronovým mikroskopem. Semena několika různých druhů z rodu *Arabidopsis* k uskutečnění transformačních experimentů poskytli Clément Lafon Placette, Dr., a RNDr. Filip Kolář, PhD., kterým tímto děkuji.

Nic z toho, co je náplní následujících stránek, by ale především nebylo možné uskutečnit bez mé rodiny. Vedle materiální podpory jsem neskonale vděčná za zázemí plné radosti, kterou mi má rodina dodávala ve chvílích, kdy ji bádání nepřinášelo.

Tato diplomová práce byla vypracována na základě finanční podpory poskytnuté Grantovou agenturou Univerzity Karlovy, číslo projektu 352119.

## Abstrakt

Dehiscence prašníků je důležitý děj, který se odehrává v závěru životního cyklu rostliny. Jedná se o soubor postupně na sebe navazujících kroků, jejichž výsledkem je otevření prašníků. Tím jsou pylová zrna dána k dispozici do prostoru. Proces dehiscence je nutné správně načasovat a synchronizovat s dalšími procesy, které se v rámci rostliny odehrávají – pylová zrna musí být v momentu dehiscence zralá a je rovněž potřeba, aby se otevřel květ. Riziko však představují atmosférické srážky. Ty mohou snížit samčí fitness v případě, že dojde k dehiscenci prašníků tehdy, když jsou vnější podmínky nepříznivé. Cílem této práce bylo podrobné prozkoumání vlivu atmosférických srážek, deště a rosy, na dehiscenci prašníků *Arabidopsis arenosa*. Bylo zjištěno, že déšť a rosa vedou k odložení finální fáze dehiscence, a pylová zrna tak zůstávají uzavřena v prašníku. Mimo samotných srážek došlo k testování působení vodného a nevodného prostředí na dehiscenci prašníků a k pokusům o transformaci *A. arenosa* za využití *Agrobacterium tumefaciens*.

**Klíčová slova:** dehiscence prašníku, otevírání květu, déšť, rosa, *Arabidopsis arenosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformace

## **Abstract**

Anther dehiscence is an important process taking place at the end of the plant life cycle. This process consists of various follow-up steps which result in anther opening and pollen grains exposure. Good timing of the anther dehiscence must be synchronized with pollen grains maturation and flower opening. Atmospheric precipitation is a high-risk factor for the anther dehiscence. Male fitness of plants can be reduced when anthers open during poor weather conditions. The aim of this study was to investigate the effect of atmospheric precipitation, rain and dew, on *Arabidopsis arenosa* anther dehiscence. We observed that rain and dew led to a postponed final stage of the anther dehiscence. This caused delayed pollen release. The effect of aqueous and nonaqueous environment on the anther dehiscence was also tested. Experiments with transformation of *A. arenosa* using *Agrobacterium tumefaciens* were performed.

**Key words:** anther dehiscence, flower opening, rain, dew, *Arabidopsis arenosa*, *Agrobacterium tumefaciens*, transformation

# Obsah

<b>Seznam zkratk</b> .....	8
<b>1. Teoretický úvod</b> .....	10
1.1 Proč je důležité zkoumat otevírání prašníků ve vztahu k atmosférickým srážkám? .....	10
1.2 Modelové rostliny .....	11
1.3 Morfologická a anatomická stavba prašníku .....	11
1.4 Co vše obnáší dehiscence prašníků? Jaké procesy musí proběhnout, aby došlo k uvolnění pylových zrn? .....	14
1.4.1 Regulace vodního režimu prašníků.....	19
1.4.2 Typy samčí sterility: co se může během dehiscence pokazit?.....	21
1.5 Růstové regulátory .....	24
1.5.1 Jasmonáty .....	24
1.5.2 Auxin.....	26
1.5.3 Ethylen .....	28
1.6 Transformace rostlin rodu <i>Arabidopsis</i> .....	29
1.7 Cíle a konkrétní náplň práce, plány.....	29
1.8 Hypotézy testované v rámci této diplomové práce .....	30
<b>2. Materiál a metody</b> .....	31
2.1 Rostliny a jejich kultivace .....	31
2.2 Simulace deště a rosy .....	31
2.2.1 Konstrukce experimentálního systému pro simulaci atmosférických srážek.....	31
2.2.2 Sledování průběhu procesu dehiscence prašníků.....	32
2.2.3 Statistické zpracování dat .....	32
2.2.4 Měření teploty a vzdušné vlhkosti.....	33
2.2.5 Studium anatomie prašníků <i>A. arenosa</i> .....	33
2.2.6 Skenovací elektronová mikroskopie.....	33
2.3 Stabilní transformace rostlin rodu <i>Arabidopsis</i> skrze kořenové segmenty.....	34
2.3.1 Příprava kořenů na transformaci.....	34
2.3.2 Příprava kultury <i>A. tumefaciens</i> .....	34
2.3.3 Transformace kořenových segmentů rostlin z rodu <i>Arabidopsis</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i> .....	35
2.3.4 Selektce a regenerace kořenových segmentů kokultivovaných s <i>A. tumefaciens</i> .....	35
2.3.5 Kontrola úspěšnosti transgenozy.....	36
2.3.6 Regenerace celé rostliny.....	36
2.3.7 Floral dip .....	37
2.4 Sledování vlivu kapalin na dehiscenci prašníků .....	37

2.5 Využití PFD v mikroskopii.....	38
2.6 Zkoumání vlivu cordycepinu na dehiscenci prašníků <i>A. arenosa</i> .....	38
2.7 Analýza obrazu .....	38
<b>3. Výsledky</b> .....	<b>39</b>
3.1 <i>Arabidopsis arenosa</i> jako modelový organismus pro studium dehiscence prašníků .....	39
3.2 Simulace deště a rosy blokuje finální fázi dehiscence prašníků <i>A. arenosa</i> .....	40
3.2.1 Byl zkonstruován experimentální systém simulující déšť a rosu .....	40
3.2.2 Hodnocení vlivu simulovaného deště a rosy na otevírání květů a dehiscenci prašníků a probíhalo na základě jasně určených stádií.....	40
3.2.3 Rosa způsobuje opoždění finální fáze dehiscence prašníků <i>A. arenosa</i> , na otevírání květů však vliv nemá.....	45
3.2.4 Simulace deště rovněž vede k odložení závěrečné fáze dehiscence prašníků <i>A. arenosa</i> , otevření květů taktéž není ovlivněno.....	48
3.2.5 Vliv rosení na finální fázi dehiscence je možné pozorovat i na anatomické úrovni prašníků <i>A. arenosa</i> .....	49
3.3 Role vodného a nevodného prostředí na dehiscenci prašníků <i>A. arenosa</i> .....	51
3.3.1 Vodné prostředí a PFD vedou k pozastavení procesu dehiscence .....	51
3.4 Transformace <i>A. arenosa</i> pomocí <i>A. tumefaciens</i> prozatím bez výsledku .....	53
3.4.1 <i>A. arenosa</i> má velmi nízký regenerační potenciál.....	53
3.4.2 Vytvoření stabilního transformanta <i>A. arenosa</i> nebylo – na rozdíl od <i>A. lyrata</i> – úspěšné..	56
3.4.3 Floral dip <i>A. arenosa</i> prozatím bez výsledků.....	66
3.5 Využití PFD v mikroskopii prašníků <i>A. arenosa</i> .....	67
3.6 Nejednoznačný efekt cordycepinu na finální fázi dehiscence prašníků <i>A. arenosa</i> .....	68
<b>5. Diskuze</b> .....	<b>70</b>
<b>6. Závěry</b> .....	<b>73</b>
<b>7. Literatura</b> .....	<b>74</b>

## Seznam zkratek

2iP	cytokinin 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallylamino)purine
<i>AFB</i>	gen <i>AUXIN RECEPTOR F-BOX</i>
<i>Ara</i> MIN	médium <i>Arabidopsis</i> minimální
<i>ARF</i>	gen pro transkripční faktor z rodiny <i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i>
Carb	carbenicilin
CFDA	5(6)-Carboxyfluorescein diacetate
CIM	Callus Induction Medium
<i>COII</i>	gen <i>CORONATINE INSENSITIVE1</i>
CW	Calcofluor White
<i>DAD1</i>	gen <i>DEFECTIVE IN ANther DEHISCENCE1</i>
<i>DDE1</i>	gen <i>DELAYED DEHISCENCE1</i>
<i>DR5:GUS</i>	reportérový gen pro $\beta$ -glukuronidázu s promotorem <i>DR5</i> reagujícím na auxin
<i>ETR1</i>	gen <i>ETHYLENE RECEPTOR1</i>
Hyg	hygromycin
IAA	kyselina indolyl-3-octová
Isl.	<i>Arabidopsis lyrata</i> , islandský ekotyp
JA-Ile	konjugát kyseliny jasmonové a aminokyseliny isoleucinu
Kan	kanamycin
<i>MYB24</i>	gen transkripčního faktoru z rodiny <i>MYB</i>
<i>MYB26</i>	gen transkripčního faktoru z rodiny <i>MYB</i>
<i>NEC</i>	genová rodina <i>NECTARY1</i>
<i>NST1</i> a 2	geny <i>NAC SECONDARY WALL THICKERING PROMOTING FACTOR1</i> a 2
OD	optická denzita
<i>OPR3</i>	gen <i>OXOPHYTODIENOATE-REDUCTASE 3</i>
PFD	Perfluoro(decahydronaphthalene)
PI	Propidium Iodide
<i>PIP1</i> a 2	gen <i>PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN1</i> a 2
PP	<i>Arabidopsis lyrata</i> , ekotyp Point Pelée, Kanada
RIM	Root Induction Medium
SEM	skenovací elektronový mikroskop
SIM	Shoot Induction Medium



<i>SUC1</i>	gen pro transportér sacharózy ( <u>suc</u> rose)
TEM	transmisní elektronový mikroskop
Tim	timentin
<i>TIR</i>	gen <i>TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE1</i>
YEB	médium Yeast Extract Beef
<i>YUC</i>	rodina genů flavin-monooxygenázy <i>YUCCA</i>

# 1. Teoretický úvod

## 1.1 Proč je důležité zkoumat otevírání prašníků ve vztahu k atmosférickým srážkám?

Dehiscence prašníků je proces, při kterém dochází k jejich otevření a k expozici pylových zrn vnějšímu prostředí. Pylovým zrnům, která se do momentu otevření prašníků nacházejí uvnitř, je tímto umožněno být aktéry opylení a oplození, a předat tak část genomu mateřské rostliny do další generace. Jedná se o klíčovou událost v životním cyklu rostliny, která rozhoduje o tom, zda existence rostliny bude z evolučního hlediska nezpochybnitelná.

Tento sofistikovaný proces vyžaduje synchronizaci vlastního otevření prašníků s produkcí zralých pylových zrn a otevřením květu (Cecchetti *et al.*, 2008). Je mnoho studií, které se věnují molekulární podstatě dehiscence prašníků a načasování uvedených dějů (Ishiguro *et al.*, 2001; Sanders *et al.*, 2005; Cecchetti *et al.*, 2013; Salinas-Grenet *et al.*, 2018). Pouze minoritní část prací se zabývá otázkou, jaký mají na dehiscenci prašníků a související děje vliv vnější podmínky (např. Yates & Sparks, 1993; Keijzer, 1987; Hase, Cowling & Ellis, 2006). Přitom právě dešť či příliš vysoká vzdušná vlhkost mohou negativně ovlivnit samčí fitness – a to poškozením (Hase, Cowling & Ellis, 2006) či ztrátou pylových zrn (Wang *et al.*, 2009). Vhodnost doby, kdy dojde k otevření prašníků a uvolnění pylových zrn, je tedy vzhledem k okolním podmínkám naprosto zásadní. Při dešťových přeháňkách rovněž může dojít k omezení aktivity opylovačů, což je důležitý faktor pro cizosprašné rostliny.

Během evoluce vzniklo mnoho adaptací, kterými se některé rostliny s problémem nebezpečí atmosférických srážek vypořádávají. Podrobně dokumentovány jsou případy některých rostlin z čeledi *Aizoaceae*, kvetoucí v zimních měsících v pobřežní oblasti Jihoafrické republiky, které své květy zavírají každý večer. Během noci je v lokalitě vysoká relativní vzdušná vlhkost. Rostliny tak uzavřením květů reagují na pokles teploty, a tím snižují riziko poškození svých na vlhko citlivých pylových zrn. Naproti tomu rostliny z jiné čeledi – *Asteraceae* – z téže lokality mají pylová zrna, která jsou k poškození vlivem vysoké relativní vzdušné vlhkosti méně náchylná. Tyto květy se na noc neuzavírají tak dokonale jako u *Aizoaceae*. Stavba jejich květu je ale odlišná, a tak květ sám o sobě může sloužit jako mechanická ochrana pro pylová zrna (Hase, Cowling & Ellis, 2006).

Dokladem o skutečnosti, jak významná je ochrana pylových zrn před atmosférickými srážkami, je dále například adaptace vráního oka *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis* na dešť. Jeho květ je v přirozených podmínkách plně funkční přes 20 dní, stejně tak jeho pyl. Po celou dobu se prašníky ráno otevírají a večer zavírají. Toto opakované otevírání a zavírání závisí především na fotoperiodě, může ale být vyvoláno také dopadajícími dešťovými kapkami. V případě deště se mohou prašníky do patnácti minut uzavřít a po skončení dešťové přeháňky se opět otevřou. Tento mechanismus vede k minimalizaci ztrát pylových zrn, a ty tak zůstávají k dispozici pro opylovače. Dle autorů studie zde není vzdušná vlhkost tím faktorem, který vede k otevření či zavření prašníků, ale je to právě dešť (Wang *et al.*, 2009). Tato adaptace je pro květ *Paris* důležitá. Rostlina totiž neposkytuje prašníků s pylovými zrny žádnou jinou mechanickou ochranu před nepříznivými vnějšími podmínkami, jako tomu je například u rostlin z čeledi *Lamiaceae* nebo *Fabaceae*. Jejich květy slouží vedle lákání opylovačů i k jinému účelu. Tyto rostliny svým charakteristickým vytvarováním korunních lístků (tzv. horní pysk u *Lamiaceae* a pavéza, křídla a člunek u *Fabaceae*) zabezpečují ochranu samčích pohlavních orgánů – tyčinek.

Moment, kdy dehiscence prašníků proběhne, je potřeba načasovat tak, aby došlo k nejvyššímu možnému využití potenciálu pylových zrn – totiž aby jich co nejvíce bylo k dispozici pro opylení a oplození (rev. Wilson *et al.*, 2011).

## 1.2 Modelové rostliny

Struktura prašníku a fascinující procesy, které se v rámci tohoto orgánu odehrávají, poutají pozornost vědců již dlouhou dobu (Chatin, 1870a, 1870b; Du Sablon, 1885 podle Keijzer, 1987). Dehiscenci prašníků jako první popsal již Jan Evangelista Purkyně, který působil i na naší univerzitě (Purkyně, 1830). Skutečnost, že se jedná o dlouhou dobu studovaný děj, může být příčinou bohaté škály rostlin, které v průběhu let při výzkumu dehiscence prašníků vědcům sloužily či stále slouží jako modelové organismy.

Mezi modelové organismy tak patřila například *Gasteria verrucosa*, *Ipomea purpurea*, *Fuchsia coccinea* či *Eucharis grandiflora* (Keijzer, 1987).

V posledních několika desetiletích se dehiscence prašníků zkoumá na rýži *Oryza sativa* (např. Matsui *et al.*, 1999a; Matsui, Omasa & Horie, 1999; Xiao *et al.*, 2014; Song *et al.*, 2018), tabáku *Nicotiana tabacum* (např. Keijzer, 1987; Béais & Goldberg, 1997; Rieu *et al.*, 2003), rajčeti *Solanum lycopersicum* (Bonner & Dickinson, 1989; Dobritzsch *et al.*, 2015), na huseníčku *Arabidopsis thaliana* (např. Cecchetti *et al.*, 2013; Salinas-Grenet *et al.*, 2018; Dai, Hsu & Yang, 2019; Xu *et al.*, 2019), ale i na petunii *Petunia hybrida* (Wang & Kumar, 2007).

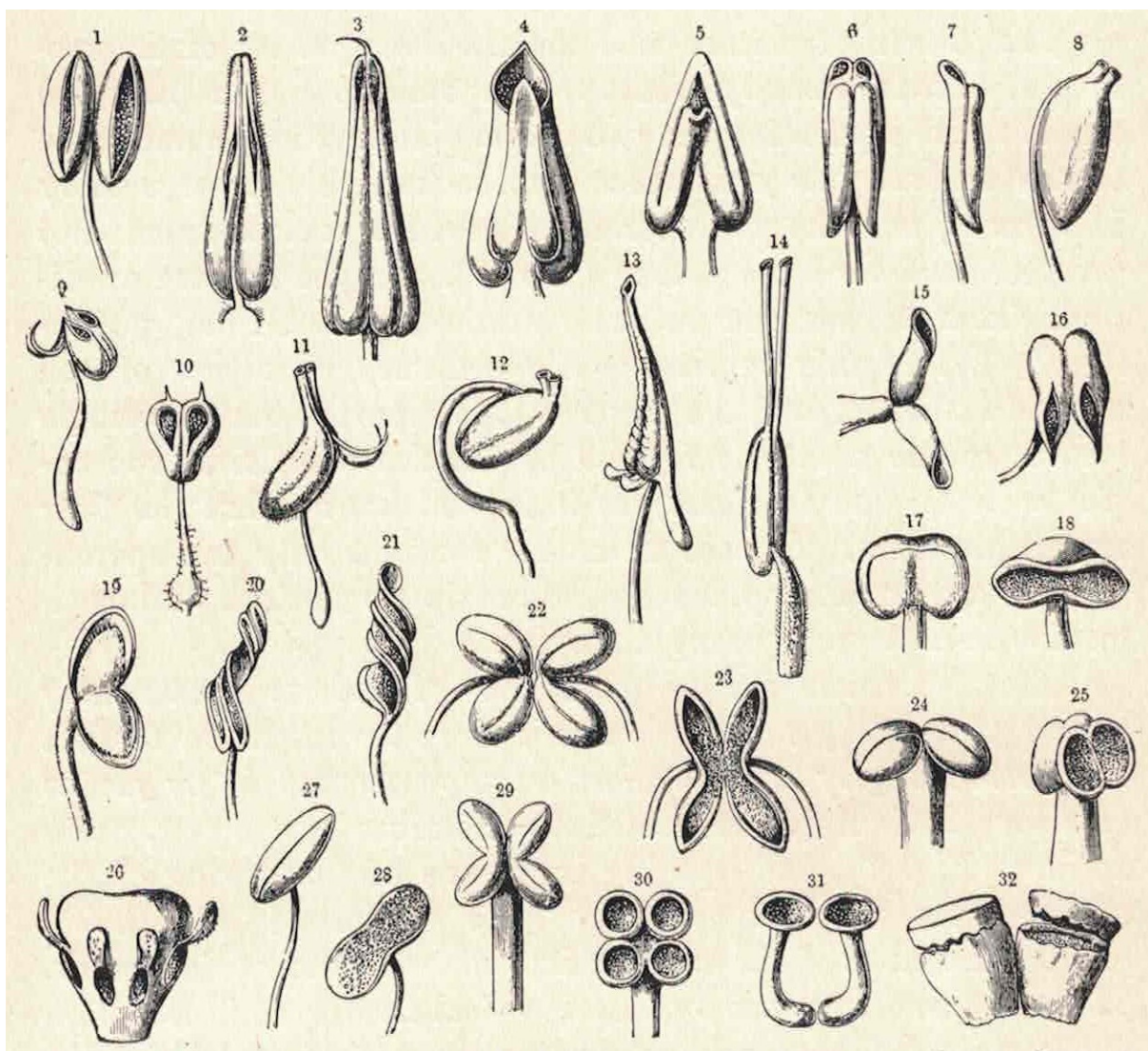
## 1.3 Morfologická a anatomická stavba prašníku

Tyčinka, samčí pohlavní orgán kvetoucích rostlin, je struktura, jejíž morfologická a anatomická stavba je v principu konzervovaná napříč semennými rostlinami (Keijzer, 1987). Avšak skutečnost, že se jedná o konzervovaný znak, není v rozporu s pestrými tvary, kterých tyčinky mohou nabývat (obrázek 1.1).

Tyčinka se skládá ze dvou částí – nitky a prašníku. Prašník je tvořen dvěma prašnými váčky. Prašný váček se sestává ze dvou prašných pouzder, mezi kterými během dehiscence dochází k vytvoření otvoru. Tento otvor bývá typicky orientován longitudinálně vzhledem k ose nitky (*A. thaliana* – Sanders *et al.*, 1999, *N. tabacum* – Bonner & Dickinson, 1989, *O. sativa* – Matsui, Omasa & Horie, 1999). Zpravidla jsou prašné váčky stejně velké, ale například u rýže jedno prašné pouzdro přesahuje svou délkou druhé, tzn. prašný váček je asymetrický (Matsui, Omasa & Horie, 1999).

Vnější vrstva prašníku, která je v kontaktu s okolím, je tvořena buňkami epidermis. Pod touto buněčnou vrstvou se nachází buňky endothecia. V buněčných stěnách endothecia dochází v průběhu vývoje prašníku ke specifickému zpevnování, jedná se o typ druhotného tloustnutí buněčné stěny – lignifikaci (Mitsuda *et al.*, 2005; Yang *et al.*, 2007). Tyto ztlustliny mají tvar písmene U (Matsui, Omasa & Horie, 1999) a vyztužují ty buněčné stěny, které jsou orientované do středu prašníku, a stěny na ně navazující, nikoli však vnější. Jedná se o způsob tloustnutí, který je znám u cévních elementů xylému (Mitsuda *et al.*, 2005). Jakmile dojde k druhotnému ztloustnutí oblastí stěn, je expanze buněk endothecia omezena (Yang *et al.*, 2007). Druhotné tloustnutí ale nemusí podstoupit všechny buňky endothecia, u *S. lycopersicum* se tak děje pouze v horní třetině prašníku (Bonner & Dickinson, 1989).

Pod endotheciem je střední vrstva buněk (middle layer, Coulter & Chamberlain, 1903), na kterou navazuje tapetum. Střední vrstva buněk hraje roli v distribuci auxinu v pletivech prašníku (Cecchetti *et al.*, 2017), jedná se však o relativně málo prozkoumanou strukturu. Tapetum je struktura, kterou lze lokalizovat v každém prašném pouzdře a vymezuje tak jeho prostor. Buňky tapeta jsou nezbytné pro správný vývoj pylových zrn (Koltunow *et al.*, 1990; Goldberg, Beals & Sanders, 1993; Feng & Dickinson, 2010; Zhang & Yang, 2014). Pylová zrna se vyvíjí dělením z mateřských buněk vznikajících ze sporogenních buněk, které jsou obklopeny právě tapetem. Tapetum ale není nezbytné pro diferenciaci a správný vývoj okolních pletiv prašníku (Koltunow *et al.*, 1990).

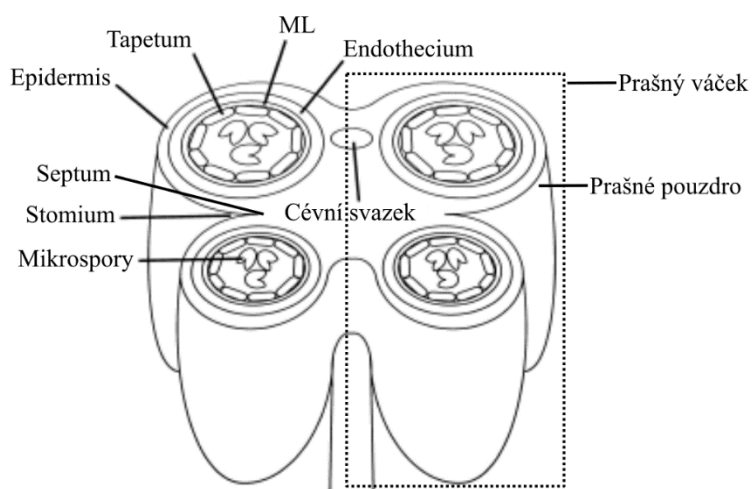


Obrázek 1.1: Různé formy tyčinek. 1 – *Calandrinia compressa*; 2 – *Solanum lycopersicum*; 3 – *Galanthus nivalis*; 4 – *Cyclamen europaeum*; 5 – *Ranonda pyrenaica*; 6, 7 – *Cassia lenitiva*; 8 – *Pyrola rotundifolia*; 9 – *Arctostaphylos uva-ursi*; 10 – *Arctostaphylos alpina*; 11 – *Vaccinium uliginosum*; 12 – *Pyrola uniflora*; 13 – *Medinilla*; 14 – *Vaccinium oxycoccos*; 15 – *Calceolaria pavonii*; 16 – *Tozzia alpina*; 17, 18 – *Sibbaldia procumbens*; 19 – *Galeopsis angustifolia*; 20, 21 – *Centaurium erythraea*; 22, 23 – *Melissa officinalis*; 24, 25 – *Calla palustris*; 26 – *Nectandra*; 27, 28 – *Globularia cordifolia*; 29, 30 – *Theobroma cacao*; 31 – *Pinguicula vulgaris*; 32 – *Garcinia*. Kerner von Marilaun, 1887, převzato z Coulter & Chamberlain, 1903, upraveno.

Během diferenciaci výše uvedených buněčných typů – epidermis, endothecia, střední vrstvy buněk, tapeta a sporogenních buněk – musí ale zcela nezbytně dojít k odlišení dalších dvou oblastí. Jedná se o stomium (Coulter & Chamberlain, 1903) a septum (Venkatesh, 1957 podle Keijzer, 1987), které jsou pro vlastní dehiscenci prašníků klíčové a nepostradatelné

(stomium, Béais & Goldberg, 1997). Stomium je oblastí epidermis s jiným buněčným osudem, definuje místo, kde dojde k otevření prašného váčku (rev. Wilson *et al.*, 2011). Buňky postrádají kutikulu (Bonner & Dickinson, 1989). Naproti tomu septum tvoří buňky endothecia, u kterých ale nedochází k druhotnému tloušťnutí jejich buněčných stěn (Keijzer, 1987). Septum odděluje dvě prašná pouzdra v rámci jednoho prašného váčku, stomium se nachází nad těmito hraničními buňkami na vnější straně prašníku (Sanders *et al.*, 1999). Lze uvést příklad výše zmiňovaných rozdílů – u *A. thaliana* má septum i stomium poměrně jednoduchou strukturu co do počtu buněk, u *N. tabacum* se jedná o složitější strukturu. Ve vakuolách septa navíc dochází k hromadění šťavelanu vápenatého (Sanders *et al.*, 2005), což je typické i pro další rostlinu z čeledi *Solanaceae*, a to *S. lycopersicum* (Bonner & Dickinson, 1989).

V prašníku lze rovněž lokalizovat i místo konektivu, tedy oblast, kde jsou soustředěny cévní svazky a kde se prašík napojuje na nitku. Výše popsané sktruktury jsou znázorněny na obrázku 1.2.



Obrázek 1.2: Kresba znázorňující příčný řez prašníkem v pozdějším vývojovém stádiu, a to před začátkem dehiscence. Zobrazeny jsou tyto struktury – epidermis, endothecium, buňky střední vrstvy (ML), tapetum, mikrospory, stomium, septum, cévní svazek. Vyznačen je prašný váček a prašné pouzdro. Převzato z Cecchetti *et al.*, 2017, upraveno.

## 1.4 Co vše obnáší dehiscence prašníků? Jaké procesy musí proběhnout, aby došlo k uvolnění pylových zrn?

Dehiscence prašníků je proces, který se skládá z několika po sobě jdoucích dějů, které jsou vzájemně úzce spjaté (Keijzer, 1987; Wilson *et al.*, 2011). Základní princip dehiscence je napříč semennými rostlinami stejný (přehled hlavních fází vývoje prašníku a dehiscence na příkladu *A. thaliana* – viz tabulka 1.1; Keijzer, 1987; Bonner & Dickinson, 1989; Sanders *et al.*, 2005). Existují ale i různé druhově specifické rysy tohoto procesu (např. Matsui *et al.*, 1999a, které budou v následující kapitole zmíněny.

Anther stage	Major events and morphological markers	Tissues present
1	Rounded stamen primordia emerge.	L1, L2, L3
2	Archeporial cells arise in four "corners" of L2 layer. Change in shape of primordia to more oval.	E, Ar
3	Four regions of mitotic activity. 1° parietal and 1° sporogenous layers derived from archeporial cells. Further divisions of each layer generate the 2° parietal layers and sporogenous cells, respectively.	E, 2°P, Sp
4	Four-lobed anther pattern with two developing stomium regions ("notch") generated. Vascular region initiated.	E, En, ML, T, Sp, C, V
5	Four clearly defined locules established. All anther cell types present and patterns of anther defined. Microspore mother cells appear.	E, En, ML, T, MMC, C, V
6	Microspore mother cells enter meiosis. Middle layer is crushed and degenerates. Tapetum becomes vacuolated and the anther undergoes a general increase in size.	E, En, ML, T, MC, C, V
7	Meiosis completed. Tetrads of microspore free within each locule. Remnants of middle layer present.	E, En, ML, T, Tds, C, V
8	Callose wall surrounding tetrads degenerates and individual microspores released.	E, En, T, MSp, C, V
9	Growth and expansion of anther continue. Microspores generate an exine wall and become vacuolated. Septum cells can be distinguished at the level of the TEM.	E, En, T, MSp, C, V, Sm
10	Tapetum degeneration initiated.	E, En, T, MSp, C, V, Sm
11	Pollen mitotic divisions occur. Tapetum degenerates. Expansion of endothelial layer. Secondary thickenings of "fibrous bands" appear in endothecium and connective cells. Septum cell degeneration initiated. Stomium differentiation begins.	E, En, T, PG, C, V, Sm, St
12	Anther contains tricellular pollen grains. Anther becomes bilocular after degeneration and breakage of septum below stomium. Differentiated stomium seen in TEM.	E, En, PG, C, V, St
13	Dehiscence. Breakage along stomium and pollen release.	E, En, PG, C, V
14	Senescence of stamen. Shrinkage of cells and anther structure.	E, En, C, V
15	Stamen falls off senescing flower.	

Tabulka 1.1: Hlavní události ve vývoji prašníku *A. thaliana*. Legenda: Ar – archesporium; C – konektiv; E – epidermis; En – endothecium; L1, L2 a L3 – tři vrstvy buněk primordia prašníku; MC – meicyt; ML – střední vrstva buněk; MMC – mateřská buňka mikrospory; MSp – mikrospora; 2°P – sekundární svrchní vrstva; PG – pylová zrna; Sm – septum; Sp – sporogenní buňky; St – stomium; T – tapetum; Tds – tetrády pylových zrn; V – cévní svazky. TEM – transmisní elektronový mikroskop. Upraveno podle Sanders *et al.*, 1999.

Otevření prašníku je podmíněno diferenciací buněk prašníku a následnou degradací některých z nich. Pro konečné vystavení pylových zrn do prostoru je nezbytné, aby došlo ke dvěma změnám – ve struktuře prašníku a v jeho vodním režimu (Keijzer, 1987; Wilson *et al.*, 2011).

Dehiscence prašníků může předcházet otevření květu (*Ipomea purpurea*, *Eucharis grandiflora* – Keijzer, 1987), je s otevřením synchronizovaná (*N. tabacum* – Koltunow *et al.*, 1990) či ho naopak následuje (řeřišničník písečný *Arabidopsis arenosa* nebo čertkus *Sucissa pratensis*). Diferenciace pylových zrn, degradace buněk a vlastní otevření prašníků jsou spolu provázané. Otázkou ale i nyní zůstává, jakým způsobem jsou tyto události kooperované, aby výsledkem byla funkční pylová zrna uvolněná z prašníku ve správný okamžik (Sanders *et al.*, 1999).

V prašníku s diferencovanými typy pletiv dochází k jejich postupné degradaci. Nejprve dochází k likvidaci buněk střední vrstvy, které jsou lokalizovány mezi endotheciem a tapetem, které rovněž degraduje. Při zrání prašníků dochází k růstu buněk epidermis a tvorbě ztlustlin ve stěnách endothecia. Tvorba těchto ztlustlin je pro dokončení procesu dehiscence naprosto nezbytná (Dawson *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2007). Dalším krokem je likvidace septa. Mezi buňkami septa, podstupujícími programovanou buněčnou smrt (Sanders *et al.*, 2005), se vlivem působení enzymů naruší střední lamela a spojení se uvolňuje (rev. Wilson *et al.*, 2011). Princip je podobný jako u abscise zralých šešulí *A. thaliana* od mateřské rostliny (Ogawa *et al.*, 2009). Po degradaci septa se z dvou původně oddělených prašných pouzder stává jeden společný prostor. Časová souslednost těchto dvou kroků se může lišit u různých rostlin: například u *A. thaliana* nejprve degraduje tapetum, a teprve poté septum (Sanders *et al.*, 1999), ale u *Gasteria verrucosa* je tomu naopak (Keijzer, 1987). Pylová zrna, která v průběhu vývoje prašníku a s přibližujícím se okamžikem otevření květu nabývají na velikosti, mohou rovněž přispívat k prasknutí septa. Toto bylo doloženo u *O. sativa*, z jejíchž prašníků byla odstraněna pylová zrna. U těch dle všeho pak neproběhne likvidace septa (Matsui *et al.*, 1999a). Naproti tomu prašníky geneticky modifikovaného *N. tabacum*, ve kterých nedochází následkem degradace tapeta k produkci pylových zrn, se i přes jejich absenci otevírají (Mariani *et al.*, 1990). To je v souladu s tvrzením, že pylová zrna nehrají roli v otevření prašníku (Woycicki, 1924 podle Keijzer, 1987; Goldberg, Beals & Sanders, 1993) – tedy signál pro zahájení dehiscence nejspíše nepochází z pylových zrn a tapeta (Mariani *et al.*, 1990; Goldberg, Beals & Sanders, 1993).

Dále následuje degradace stomia, jehož buňky rovněž podstupují programovanou buněčnou smrt (Sanders *et al.*, 2005). Buňky epidermis se zvětšují, a kvůli bariéře na vnitřní straně v podobě endothecia s druhotně ztlustlými oblastmi v buněčných stěnách, především směrem ven. To vede ke zvětšení obvodu prašníku (Bonner & Dickinson, 1989). Stěny prašných váčků, tvořené v tuto chvíli epidermis a endotheciem, mechanicky působí směrem dovnitř, tedy do středu, kde se nachází slabé buňky stomia (Keijzer, 1987). Dochází tak k vytvoření otvoru v prašníku právě v oblasti slabých buněk stomia. K tvorbě otvorů v prašném váčku dochází zpravidla na jeho apexu – například u *A. thaliana*, ale není to absolutním pravidlem. V případě *O. sativa* dochází k otevření v oblasti stomia jak na apexu, tak na bázi prašného váčku (Matsui, Omasa & Horie, 1999). Tato část dehiscence je, dle všeho, na vzdušné vlhkosti zcela nezávislá (Bonner & Dickinson, 1989; Matsui, Omasa & Horie, 1999).

Funkční stomium je pro dokončení celého procesu dehiscence nepostradatelné. Dokladem této skutečnosti jsou ablační experimenty s transgenními liniemi *N. tabacum*

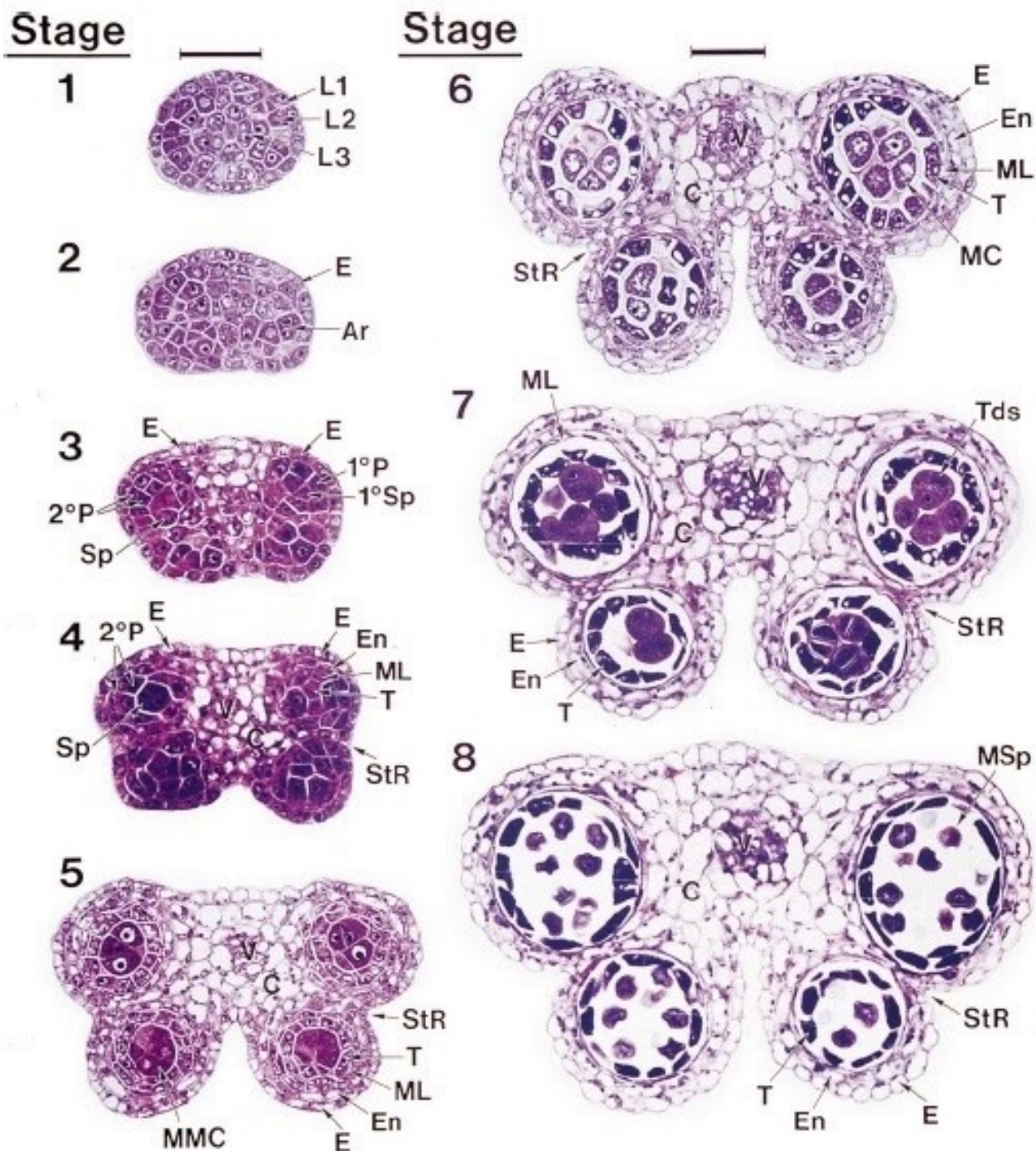
obsahující geny *TA56/barnase* a *TA20/barstar*, jejichž prašníky nemohou kvůli ablaci stomia dehiscenci dokončit (Béais & Goldberg, 1997).

V této fázi je tedy na apexu prašníku v prašném váčku otvor. Pylová zrna však stále nejsou dobře přístupná, jsou totiž stále obklopena stěnami prašného váčku. V samém závěru procesu dehiscence prašníků je zcela nezbytné, aby došlo k dehydrataci buněk. Buňky epidermis a endothecia stále pylová zrna chrání a v tento moment představují poslední bariéru před vnějším prostředím. Buňky epidermis a endothecia tedy ztrácí vodu, čímž dojde k jejich smrštění (tato skutečnost není v tabulce 1.1 vůbec zmíněna). Následkem toho se stěny prašného váčku ohnou směrem ven (Keijzer, 1987). Tím dojde k plnému vystavení pylových zrn do prostoru. Jedná se – až na výjimky, jakou je například již zmiňovaný *P. polyphylla* var. *Yunnanensis* – o proces nevratný, protože během dehiscence dochází k degradaci konkrétních buněčných oblastí a rovněž se změní struktura pletiv prašníku (Sanders *et al.*, 2005). Dehydratace pletiv prašníku nemá podíl na degradaci tapeta, septa ani stomia (Matsui, Omasa & Horie, 1999), dochází k ní totiž až tehdy, kdy jsou uvedené struktury degradovány. Endothecium má proto v dehiscenci prašníků dvě úlohy. Nejprve se podílí na otevření prašníku v oblasti stomia a posléze svaštění těchto lokálně druhotně ztlustlých buněk vede k ohybu stěn prašných váčků. V tento moment je již, podle studie na uskutečněné na *S. lycopersicum*, protoplast endothecia degenerován (Bonner & Dickinson, 1989; Scott, Spielman & Dickinson, 2004).

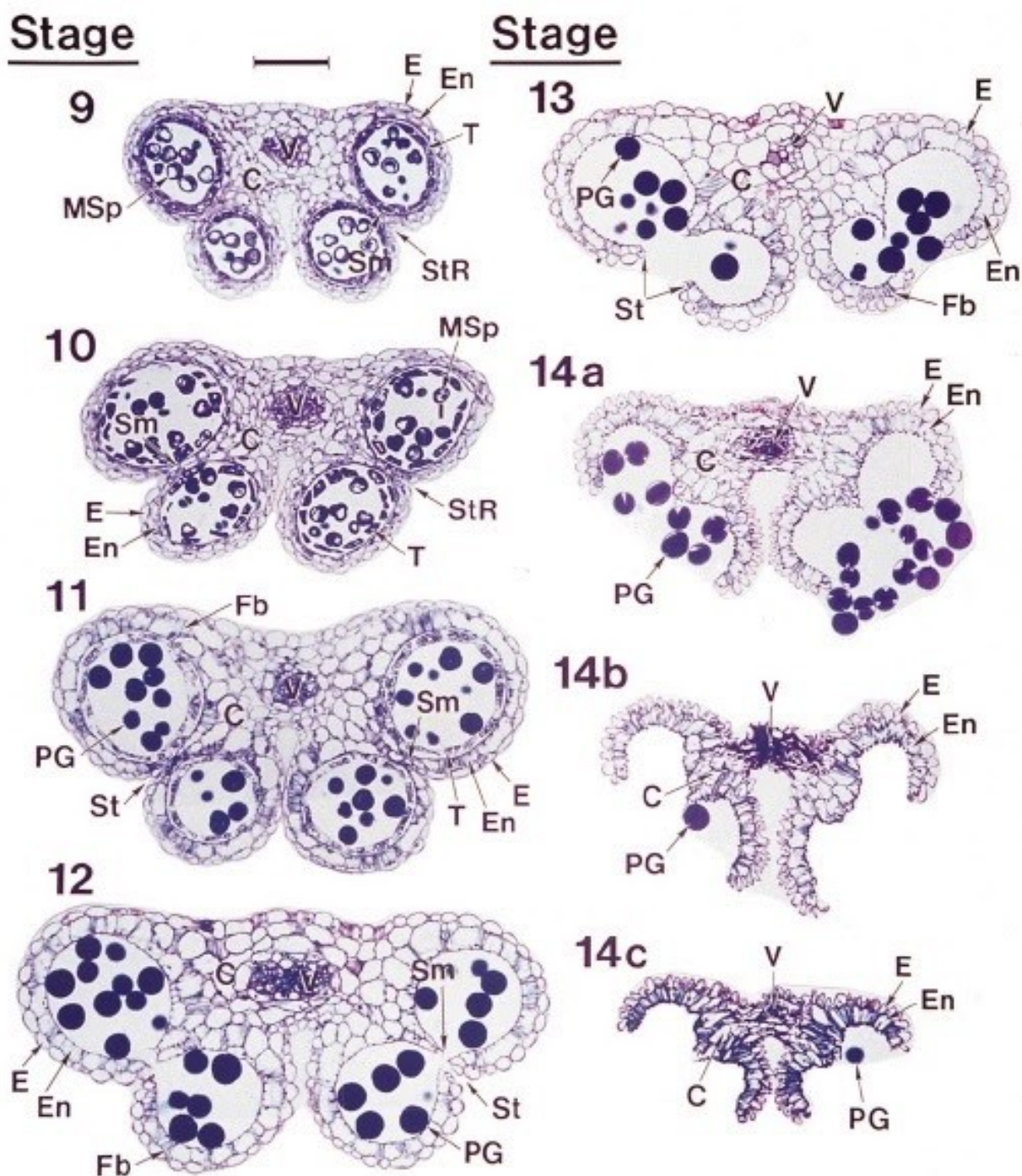
V literatuře lze najít více či méně detailní dělení vývoje a dehiscence prašníků do různých fází. U *N. tabacum* lze hlavní vývojové fáze rozdělit na dvě části, přičemž první zahrnuje samotnou diferenciaci pletiva a meiózu, kterou podstupuje mateřská buňka pylových zrn. Do druhé části již vstupuje prašník plně diferencovaný, dochází k jeho růstu, zrání pylových zrn a následné degradaci pletiv prašníku vedoucí k vlastní dehiscenci. V první části je možné rozlišit sedm stádií, v druhé dvanáct stádií vývoje (Koltunow *et al.*, 1990). V případě *A. thaliana* je první část zahrnující vznik a vývoj prašníku dělena na osm, druhá na šest stádií. První rovněž zahrnuje vznik a vývoj prašníku, druhá fáze pak opět degradaci pletiv a dehiscenci prašníků (obrázky 1.3 a 1.4, Sanders *et al.*, 1999).

Dehiscenci prašníků lze urychlit proudícím vzduchem, zvýšenou teplotou či odstraněním květních obalů (*Gasteria verrucosa* nebo *Lilium hybrida*, Keijzer, 1987). Otevření prašníku v oblasti septa a stomia není výrazně negativně ovlivněno vzdušnou vlhkostí (Matsui, Omasa & Horie, 1999). Finální fáze dehiscence však na vzdušné vlhkosti závisí. Nelze ale prohlásit, že se jedná o ryze fyzikální záležitost, neboť pouze některá pletiva prašníku ztrácí vodu. Konektiv (Bonner & Dickinson, 1989) a druhá část tyčinky – nitka zůstávají turgescenční a vitální (Keijzer, 1987; Bonner & Dickinson, 1989). Jak je změna vodního režimu prašníku realizována? Jakým způsobem působí vnější podmínky na vodní režim prašníku a jeho regulaci?





Obrázek 1.3: První část vývoje prašníku: stádia 1–4 zobrazují buněčné dělení v rámci primordia prašníku; ve stádiu 5 má již prašník typický půdorys podobající se motýlím křídélům a je již jasně patrná diferenciace několika buněčných typů – endothecium, tapetum, mateřská buňka pylových zrn, střední vrstva buněk; mezi stádiem 5 a 7 podstupuje mateřská buňka meiózu, čímž dává vznik tetradám haploidních spor, ve stádiu 8 je vidět již rozvolněné tetrády. Legenda: Ar – archesporium; C – konektiv; E – epidermis; En – endothecium; L1, L2 a L3 – tři vrstvy buněk primordia prašníku; MC – meiotická buňka; ML – střední vrstva buněk; MMC – mateřská buňka mikrospory; MSp – mikrospora; 1°P – primární svrchní vrstva; 2°P – sekundární svrchní vrstva 1°Sp – primární sporogenní vrstva; Sp – sporogenní buňky; StR – oblast stomia; T – tapetum; Tds – tetrády pylových zrn; V – cévní svazky. Měřítka pro stádium 1 – 4: 25  $\mu$ m; měřítka pro stádium 5 – 8: 25  $\mu$ m. Převzato ze Sanders *et al.*, 1999.



Obrázek 1.4: Druhá část vývoje prašníku: během stádií 9–12 dochází k vývoji spor ve zralá pylová zrna, prašník zároveň nabývá na velikosti a podstupuje první degradační procesy (střední vrstva buněk, tapetum). Ve stádiu dvanáct se následkem degradace septa z prašníku se čtyřmi prašnými pouzdry stává prašník pouze se dvěma oddělenými oblastmi obsahující pylová zrna. Ve stádiu 13 dochází k otevření prašníku v oblasti stomia. Od stádia 13 a dále je pak možné pozorovat uvolnění pylových zrn do prostoru a postupné svašťování pletiva prašníku následkem ztráty vody z buněk pletiva prašníku. Legenda: C – konektiv; E – epidermis; En – endothecium; Fb – pruhy vláken (v endotheciu); MSp – mikrospora; PG – pylová zrna; Sm – septum; St – stomium; StR – oblast stomia; T – tapetum; TDs – tetrády pylových zrn; V – cévní svazky. Měřítko pro všechna stádia: 50  $\mu$ m. Převzato ze Sanders *et al.*, 1999.

#### 1.4.1 Regulace vodního režimu prašníků

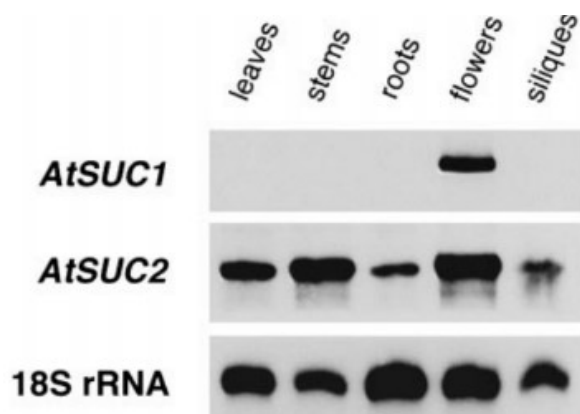
Poslední, avšak neméně důležitou fází dehiscence prašníků, je jejich dehydratace. Konkrétně se jedná o dehydrataci epidermis a endothecia (Wilson *et al.*, 2011). Tento proces je nezbytný, stěny prašníků se totiž musí vyvrátit směrem ven, aby se prašík doširoka otevřel, a pylová zrna tak byla dána k dispozici do prostoru. Mimo prašníky ale také v různé míře, která závisí na daném druhu, rovněž dochází k odstraňování vody z pylových zrn (Johnson & McCormick, 2001).

Podle Keijzera, 1987, se jedná o děj zajišťovaný především výparem stomaty, jelikož dehiscenci lze podle informací v literatuře opravdu vlhkostí ovlivnit (Matsui, Omasa & Horie, 1999). Různé studie se však ke skutečnosti, že dehiscence prašníků je ryze fyzikální proces, staví spíše odmítavě (např. Schmid & Alpert, 1977; Bonner & Dickinson, 1990).

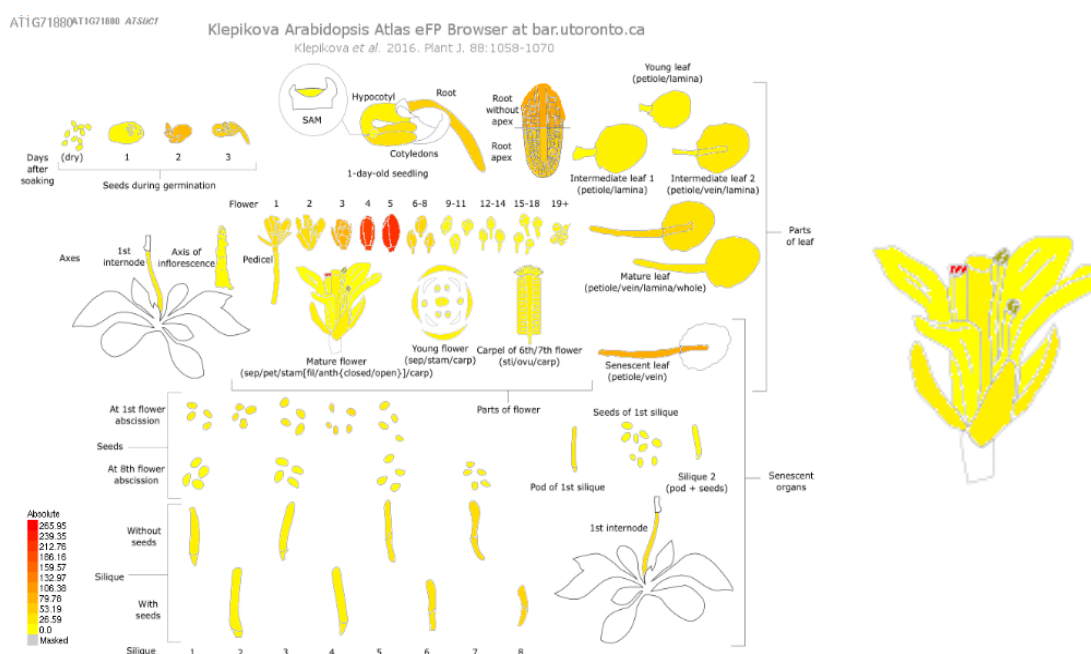
Je však několik hypotéz, které se spíše než k prostému výparu stomaty, přiklání k translokaci vody z pletiv prašníku do nitky, případně dále. Například pro rostlinu *Petunia hybrida* byla formulována (pouze) teorie, že geny z rodiny *NECTARY1 (NECI)* se podílí na hydrolyze škrobu, a tím na snížení vodního potenciálu, který by směřoval vodu z prašníků, v tomto případě, do nektarií (Ge *et al.*, 2000 v kontrastu ke Schmid & Alpert, 1977). O tom, že dochází k transportu vody v rámci prašníků, může svědčit i možné zapojení proteinů z velké rodiny aquaporinů. Ty usnadňují především transport vody přes plazmatickou membránu. *PLASMA MEMBRANE INTRINSIC PROTEIN1 (PIP1)* a *PIP2* jsou v případě *N. tabacum* exprimovány v prašnicích a blizně. Především pak *PIP2* se vyskytuje v prašnicích v pozdějších fázích jejich vývoje. Mohly by se proto podílet na dehydrataci pletiva. S ohledem na to, že se jedná o velké proteinové rodiny, nelze vyloučit, že se na celém procesu podílejí i další jejich členové (Bots, Feron, *et al.*, 2005; rev. Wilson *et al.*, 2011). Experiment využívající RNA interferenci doložil důležitost tohoto proteinu – v prašnicích takových rostlin byla dehydratace pletiva pomalejší. U rostlin bez RNA interference navíc k dehiscenci prašníků docházelo dříve (Bots, Vergeldt, *et al.*, 2005).

Na změně vodního režimu v prašníku se podle hypotézy z přelomu století podílí protein plazmatické membrány zajišťující symport sacharózy a  $H^+$  iontů. Tento protein, *SUCROSE PROTON SYMPORTER1 (SUC1)*, byl podle prvních zjištění na rozdíl od jiných sacharózových transportérů specifický pouze pro květ (Stadler *et al.*, 1999, obrázek 1.5; Klepikova atlas obrázek 1.6). Je silně exprimován v pylových zrnech, podle novějších studií však k jeho expresi dochází například i ve vyvíjejících se trichomech a kořenech (Sivitz *et al.*, 2007, v kontrastu s obrázky 1.5 a 1.6). Příčinou, proč při použití stejné metody (*SUC1* promotor a GUS) nebylo dosaženo stejných výsledků je, že v případě studie Stadler *et al.*, 1999 byla využita linie C24, která na listech nedisponuje trichomy. Rozdílnou lokalizaci exprese *SUC1* je dále možná zaznamenat při sledování exprese konstruktů celého genu s GUS (kořeny) či pouze promotoru *SUC1* s GUS (pyl a trichomy, Sivitz *et al.*, 2007). Pro expresi v kořenech jsou důležité a nepostradatelné introny genu *SUC1* (Lasin *et al.*, 2020).

Lokalizace *SUC1* podle Stadler *et al.*, 1999 se v různých pletivech květu mírně lišila v závislosti na užitých metodách (GUS analýza, RNase protection – obrázek 1.7, *in situ* hybridizace). V pylových zrnech se během zrání hromadí *SUC1* mRNA, jejíž translace při klíčení může zajišťovat rychlé klíčení pylové láčky (ve shodě s novější studií Sivitz, Reinders & Ward, 2008), a to dopravou sacharózy sloužící jako osmoticky aktivní látka snižující vodní potenciál. To může být příčinou příjmu vody láčkou. *SUC1* protein je dále lokalizován i v pestíku, kde je mu přisuzována role ve vedení rostoucí pylové láčky. Výsledky lokalizace



Obrázek 1.5: Výsledek RNase protection analýzy hladiny mRNA AtSUC1 v různých pletivech *Arabidopsis thaliana* (listy, stonky, kořeny, květy, plody). Vedle určení hladiny mRNA AtSUC1 byla pro porovnání provedena i analýza mRNA AtSUC2 (specifická exprese v průvodních buňkách) a kontrola v podobě 18S rRNA. Upraveno podle Stadler *et al.*, 1999.

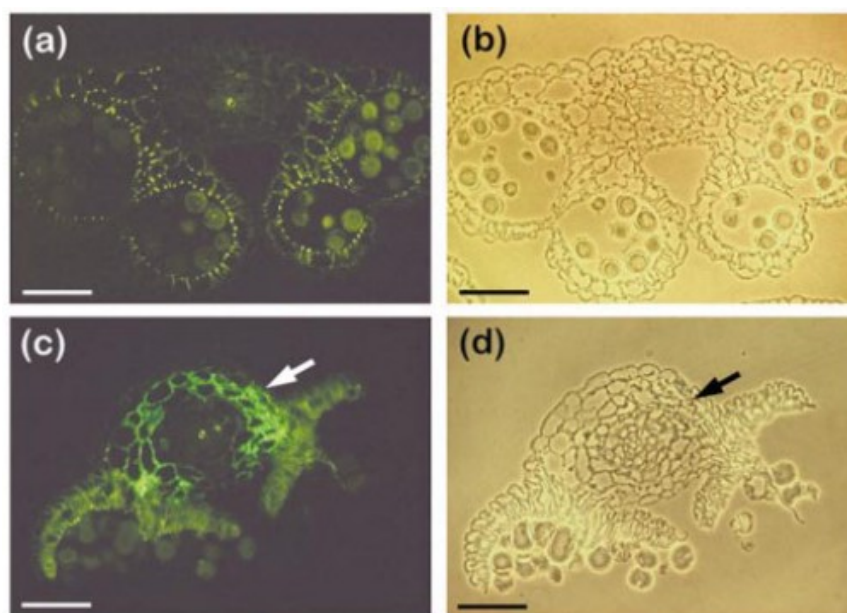


Obrázek 1.6: Snímek lokalizace AtSUC1 (AT1G71880) podle Klepikova Arabidopsis Atlas s detailem na květ. Převzato z <https://www.arabidopsis.org/>.

exprese SUC1 (za použití různých metod) se ale shodovaly, a to v oblasti buněk kolem cévního svazku, v konektivu. Protein SUC1 se zde ale nevyskytuje v raných stádiích vývoje prašníku, ale až ve chvíli, kdy jsou pylová zrna plně vyvinuta. To znamená, že SUC1 lze v okolí cévních svazků v konektivu najít až v okamžiku, kdy může začít proces dehiscence prašníku. Vzhledem k tomu, že k lokalizaci SUC1 proteinu docházelo až ve chvíli, kdy byla pylová zrna i prašník plně vyvinuty, není dle autorů primární rolí SUC1 transportérů zajištění dostatku sacharózy jako zdroje uhlíku (Stadler *et al.*, 1999).

V parenchymatických buňkách, které obklopují cévní svazky v oblasti konektivu, je nejpravděpodobnější funkcí SUC1 transportérů kumulace sacharózy. Toto hromadění osmoticky aktivní látky vede ke snížení vodního potenciálu v buňkách kolem cévních svazků, následkem čehož dochází k čerpání vody ze sousedních buněk, tj. z buněk konektivu, prašných pouzder, endothecia (Stadler *et al.*, 1999). Dehiscence prašníků tedy zřejmě není pouze

fyzikální proces, který by závisel na vnějších podmínkách, ale je zároveň kontrolovaný samotnou rostlinou (Keijzer, 1987). Jako podpora této hypotézy slouží i již zmíněná skutečnost, že prašníky musí nejprve dehydratovat, aby mohlo dojít k jejich dehiscenci. Mutace v genu *DADI* (*DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1*), který kóduje klíčový enzym syntézy jasmonátů, chloroplastovou fosfolipázu A1, znemožňuje transport vody z prašných pouzder, endothecia a konektivu pomocí cévních svazků dále do nitky. To vede k tomu, že k dehiscenci nedochází včas, protože prašníky jsou plné vody. Tato situace má rovněž vliv na kvalitu pylových zrn (Ishiguro *et al.*, 2001). Na tomto příkladu je patrné, že dehydratace prašníků nezávisí pouze na vnějších podmínkách. Otázkou však zůstává, do jaké míry dehiscenci kontroluje rostlina a jakou roli hrají podmínky panující v okolí rostliny ovlivňují.



Obrázek 1.7: Lokalizace proteinu AtSUC1 v prašnicích a pylových zrnech *A. thaliana* (wild type) za použití nepřímé imunofluorescence. (a) Příčný řez prašníkem přibližně v takovém vývojovém stádiu, kdy již proběhla degradace tapeta. Prašné váčky jsou již otevřeny, proces otevírání v oblasti septa a stomia již započal. Tento řez byl nabarven s anti-AtSUC1 antisérem/FITC (Fluorescein isothiocyanate). Protein AtSUC1 není lokalizován ani v pylových zrnech, ani v oblasti konektivu. (b) Tentýž příčný řez jako na obrázku (a) vyfotografován pod bílým světlem. (c) Příčný řez prašníkem v pozdním vývojovém stádiu. Tento řez byl nabarven s anti-AtSUC1 antisérem/FITC. Septum mezi prašnými pouzdry bylo rozděleno a po dehiscenci došlo ke svaštění stěn prašníku. Protein AtSUC1 je detekován v kruhu buněk, které obklopují pletivo konektivu, respektive vrstvu buněk, kde je signál detekován (místo označeno šipkou – a to i v případě obrázku (d)). Protein však není detekován v pylových zrnech. (d) Tentýž příčný řez jako na obrázku (c) vyfotografován pod bílým světlem. Měřitko ve všech případech 50  $\mu\text{m}$ . Upraveno podle Stadler *et al.*, 1999.

#### 1.4.2 Typy samčí sterility: co se může během dehiscence pokazit?

Proces dehiscence prašníků se sestává z několika na sebe navazujících kroků. Z předchozích kapitol vyplývá, že jejich sled a správný průběh každého z nich je důležitý pro ty kroky, které je následují. Je tedy mnoho úrovní, na kterých může dojít k chybě, která vede k samčí sterilitě rostliny (tabulka 1.2).

Příčinou samčí sterility může být úplná absence pylových zrn (Mariani *et al.*, 1990) či produkce pylových zrn se sníženou životaschopností (zde je porucha funkce výsledkem narušení normálního průběhu dehiscence, Ishiguro *et al.*, 2001).

Pokud prašík obsahuje plně funkční pylová zrna, je klíčové, aby došlo k jejich uvolnění a rozšíření se do prostoru (rev. Wilson *et al.*, 2011). Tady mohou problémy, které již byly

zmíněny v úvodní části kapitoly 1.4, nastat právě v různých momentech vývoje prašníku. Zralé prašníky s funkčními pylovými zrny, u kterých proběhne dokonce i odvod vody z daných pletiv, ale následkem chybějících ztlustlin v buněčných stěnách endothecia, zůstávají indehiscentní (Mitsuda *et al.*, 2005). Pokud však dojde k tvorbě ztlustlin, může se dehiscence zastavit o kus dále – například u stomia, které v případě, že je nefunkční, zabrání uvolnění pylových zrn (Béais & Goldberg, 1997).

Class	Mutant phenotypes
	Description
Early defects	Undeveloped anther
Pollenless	Anthers devoid of pollen grains
Defective pollen	Abnormal pollen in dehisced anthers
Pollen function/Female sterile	Visually wild type pollen grains
Stamen length	Reduced filament extension
Dehiscence	Anthers defective in pollen release
Pattern	Alternation in anther morphology and/or locule number
Floral	Altered floral organ development
Reduced fertility	Consistently short siliques

Tabulka 1.2: typy mutantů *A. thaliana* s narušenou schopností rozmnožovat se. Upraveno podle Sanders *et al.*, 1999.

Nevhodné načasování dehiscence prašníků pak může být další důvodem, který má za následek neplodnost rostliny. U takových mutantů může k dehiscenci dojít dříve, než se nitka prodlouží a doroste požadované délky (dvojitý mutant *transport inhibitor response 1* a *auxin receptor F-box* – Cecchetti *et al.*, 2008); mutant může mít funkční pylová zrna. Další variantou je, že k dehiscenci prašníků dochází později, než je běžné. Dehiscence nastane až ve chvíli, kdy již papily blizny nejsou schopné opylení (př. mutant *A. thaliana delayed-dehiscence1* – Sanders *et al.*, 1999, *late dehiscence* – Goldberg *et al.*, 1993). K dehiscenci dále nemusí dojít vůbec a prašníky zůstávají uzavřeny (př. mutant *A. thaliana non-dehiscence1* – Sanders *et al.*, 1999). Je narušena synchronizace mezi otevřením květu a prašníků, pylová zrna – v tomto případě životaschopná – tak zůstávají uzavřena v prašníku (Sanders *et al.*, 1999). Porovnání průběhu dehiscence u zmíněných mutantů *delayed-dehiscence1* a *non-dehiscence1* s kontrolní rostlinou *A. thaliana* nabízí tabulka 1.3.

Anther stage	Wild type	<i>non-dehiscecel</i>	<i>delayed-dehiscecel</i>
11	Expansion of endothelial cell layer and appearance of fibrous bands in endothecium and connective.	Expansion of endothelial cell layer. Distortion of endothecium and connective cells. No fibrous band are observed.	Expansion of endothelial cell layer and appearance of fibrous bands in endothecium and connective
12	Break in septum below stomium creates a bilocular anther.	Endothecium begins to degenerate, including septum.	Break in septum below stomium.
13	Break at stomium in anther wall. Anther wall "flips" back and pollen released during dehiscence.	Anthers do not dehisce. Endothecium degenerated. Pollen appears wild type.	Anthers do not dehisce. Pollen storage bodies visible.
Late 13	Pollen grains come in contact with stigmatic papillae. Pollen germination and pollen tube growth in pistil.	In older flowers anthers do not dehisce, pollen appears wild type, and connective degenerates.	In older flowers anthers have not dehisced. Pollen appears to degenerate.
14	Floral organs begin to senesce, the anther shrinks, and cells distort.	Senescence initiated; degeneration of connective and endothecium leaves only vascular bundle and an epidermis surrounding pollen grains. Anthers do not dehisce.	Senescence initiated. Anthers dehisce and pollen degenerates.

Tabulka 1.3: Srovnání průběhu závěrečných fází dehiscence prašníku wild type *A. thaliana* s mutantními rostlinami *non-dehiscence1* a *delayed-dehiscence1*. Stádia prašníků odpovídají stádiím uvedených v tabulce 1.1. Upraveno podle Sanders *et al.*, 1999.

## 1.5 Růstové regulátory

Dehiscence prašníků nezbytně, stejně jako jiné růstové a vývojové procesy rostliny, podléhá regulaci růstovými regulátory, tzv. fytohormony.

### 1.5.1 Jasmonáty

Jasmonáty jsou růstové regulátory, mezi které patří kyselina jasmonová, methyljasmonát a konjugát kyseliny jasmonové a isoleucinu JA-Ile. Poslední jmenovaný se váže na proteiny regulující expresi genů, které jsou pod vlivem jasmonátů. Tato vazba je klíčová pro degradační krok, který umožňuje spuštění jasmonátové signalizace (více viz dále, Thines *et al.*, 2007). Jasmonáty mají pleiotropní efekt, hrají například roli v růstu kořenů či v procesech spojených se zráním plodů či se senescencí. V neposlední řadě jsou zapojeny do mobilizace obrany v rostlině po napadení patogeny a herbivory či po poranění. Zároveň jsou velmi důležité pro samčí fertilitu (Feys *et al.*, 1994; Stintzi & Browse, 2000; Scott, Spielman & Dickinson, 2004). Podílejí se totiž na vzniku životaschopných pylových zrn (Creelman & Mullet, 1997) a dehiscenci prašníku tím způsobem, že regulují transport vody v prašníku (Ishiguro *et al.*, 2001).

Důležitost jasmonátů pro zdárný průběh dehiscence prašníků lze u *A. thaliana* nejlépe demonstrovat na již zmíněné mutaci *defective in anther dehiscence1 (dad1)*, která narušuje biosyntetickou dráhu kyseliny jasmonové hned v jejím počátku. Fosfolipáza DAD1 je enzym, který svou činností dává vzniku kyselině linoleové, prekurzoru kyseliny jasmonové. K expresi genu *DAD1* dochází, dle závěrů studie, v horní části nitky těsně před otevřením květu (Ishiguro *et al.*, 2001).

U mutantních rostlin je znemožněn transport vody z buněk endothecia, prašných pouzder a konektivu do nitky (Ishiguro *et al.*, 2001). Prašník tedy zůstává vyplněn vodou a nedojde k jeho dehydrataci, která je pro dehiscenci prašníku nezbytná (Keijzer, 1987). To působí v první řadě problémem pylovým zrnům. Ty totiž následkem stále přítomné tekutiny, která vyplňuje prostor prašného pouzdra, nemohou dozrát a podstoupit dehydrataci. Tekutina je za normálních okolností absorbována okolním pletivem. Pouze 2 % pylových zrn mutantní rostliny *dad1* jsou životaschopná v porovnání s kontrolou, kde pylových zrn klíčí 70 % (Ishiguro *et al.*, 2001).

Vzhled prašníku až do finální fáze nevykazuje viditelné odchylky, a to včetně anatomické stavby, ač celkový vývoj všech částí květu trvá v porovnání s kontrolní rostlinou déle. S blížícím se okamžikem, kdy se má prašník otevřít, degraduje tapetum, septum praská. Druhým problémem, který tato mutace působí, je skutečnost, že nedochází k dehiscenci prašníků, jejichž buňky zůstávají plné vody. V oblasti stomia totiž zůstávají prašné váčky prašníku uzavřeny. Tato finální fáze vývoje se v porovnání s kontrolními rostlinami abnormálně prodlužuje a během 24 hodin po dehiscenci kontrolních rostlin u mutantních rostlin zůstávají prašníky stále zavřeny (Ishiguro *et al.*, 2001).

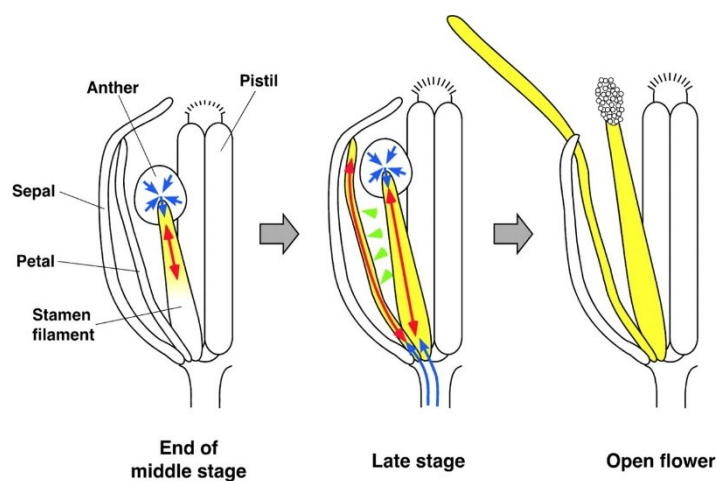
Fenotyp obdobný právě popsanému lze pozorovat i u mutantu *coronatine insensitive1 (coil)*, Feys *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 2002), který je k JA-Ile necitlivý. Protein COI1 je součástí komplexu SCF<sup>COI1</sup>, který se podílí na degradaci JAZ1 proteinů, což jsou negativní regulátory jasmonátové signalizace. Ty, pokud není JA-Ile přítomný, či jej rostliny nevnímají, brání spuštění jasmonátové signalizace (Thines *et al.*, 2007).

Již bylo zmíněno, že je klíčové, aby zrání pylových zrn, dehiscence prašníků a otevření květů bylo synchronizované. Na této synchronizaci mají podle všeho podíl právě také



jasmonáty. Ty přes řízený transport vody z prašníku do nitky, případně petal, mohou tyto děje koordinovat (obrázek 1.8). Analýza pupat mutantní *A. thaliana dad1* potvrdila nižší obsah jasmonátů oproti kontrolním pupatům. Včasnou exogenní aplikací methyljasmonátu či kyseliny linoleové lze projev mutace zvrátit a zajistit tak synchronizaci zmíněných procesů (Ishiguro *et al.*, 2001).

Podobně jako v případě mutantu *dad1* je možné dodáním kyseliny jasmonové obnovit rozmnožovací schopnosti u mutantu *A. thaliana delayed dehiscence1 (dde1, Sanders et al., 2000)*. Kromě aplikace kyseliny jasmonové lze téhož dosáhnout overexpresí genu transkripčního faktoru *MYB24* (Huang *et al.*, 2017). Tento mutant disponuje prašníky, u kterých nedochází k dehiscenci v okamžiku otevření květu, ale až tehdy, kdy je zahájena senescence květu. V případě této mutace se jedná o opoždění otevření prašníku v oblasti stomia (Sanders *et al.*, 2000). Prašníky mají, podle dalších zjištění, navíc krátké nitky (Huang *et al.*, 2017). Gen *DDE1* je zapojený v biosyntéze kyseliny jasmonové. Kóduje enzym z rodiny *12-OXOPHYTODIENOATE REDUCTASE* (Sanders *et al.*, 2000). Konkrétně se jedná o *OXOPHYTODIENOATE-REDUCTASE 3 (OPR3 = syn. DDE1, (Stintzi & Browse, 2000; Cecchetti et al., 2013)*. U mutantu *dde1* (resp. *opr3*) není narušena tvorba ztlustlin v buňkách endothecia, jejich případná absence by mohla být příčinou neotevření stomia. Jasmonáty tento děj nekontrolují (Cecchetti *et al.*, 2013). Studie věnující se *dde1* mutaci však nepřihlíží k možnému vlivu jasmonátů na vodní režim prašníků a jeho změně v závěru procesu otevírání prašníku, pouze konstatuje úlohu jasmonátů jako kontrolního mechanismu pro dobu otevření prašníků (Sanders *et al.*, 2000).



Obrázek 1.8: Schéma možné jasmonátové regulace tří dějů – zrání pylových zrn, dehiscence prašníků a otevření květu. Žlutou barvou jsou znázorněny ty orgány květu, které vodu v odpovědi na jasmonáty nejspíše přijímají, transport vody zobrazen pomocí modrých, prodlužování orgánů pomocí červených a přesun jasmonátů pomocí zelených šipek. Převzato z Ishiguro *et al.*, 2001.

Jasmonáty jsou nezpochybnitelně zapojeny do regulace dehiscence prašníků. Podle dosavadních zjištění hrají roli v regulaci obsahu vody v prašníku, stejně tak jako výše zmiňované *SUC1* transportéry (viz kap. 1.4.1). Je pravděpodobné, že kyselina jasmonová je nutná pro expresi *SUC1* proteinů. Stále však chybí experimentální prověření této hypotézy (Ishiguro *et al.*, 2001). Zapojení jasmonátů v kontrole dehiscence a samčí fertility vůbec dokládá i zmíněná skutečnost, že mutace *dad1* a *dde1 (opr3)* bylo možné zvrátit včasnou aplikací methyljasmonátu, kyseliny linoleové (Ishiguro *et al.*, 2001) a kyseliny jasmonové (Sanders *et al.*, 2000).

### 1.5.2 Auxin

Tento nejdéle zkoumaný rostlinný růstový regulátor je s růstem a vývojem rostliny neodmyslitelně spjat. Působí v různorodých procesech jako jsou tropismy, tvorba kořenového systému či formace cévních svazků (Leyser, 2018). Auxin rovněž ovlivňuje apikální dominanci rostliny nebo tvorbu jejích postranních orgánů (např. Woodward & Bartel, 2005). Auxin je rovněž nepostradatelný při vývoji květního orgánu a má vliv na samčí fertilitu ve smyslu vývoje pylových zrn, růstu nitky před otevřením květu a vlastní dehiscenci prašníků (Cecchetti *et al.*, 2008).

Důležitost auxinu na vývoji prašníků dokládá například mutace *yuc2yuc6* u *A. thaliana*. Jedná se o geny z rodiny *YUC* (Cheng, Dai & Zhao, 2006). Tato rodina kóduje YUC flavin monooxygenázy, nepostradatelné komponenty tryptofan-dependentní biosyntetické dráhy indolyl-3-octové kyseliny (IAA, Zhao *et al.*, 2001). Uvedený dvojitý mutant *A. thaliana* má v porovnání s kontrolní rostlinou krátké tyčinky, prašníky dozrávají později a téměř netvoří pylová zrna (Cheng, Dai & Zhao, 2006).

Pravý opak, tedy dehiscence, která nastává dříve, může být projevem několikanásobné mutace *transport inhibitor response1* a *auxin receptor F-box (tir1afb1, 2 a 3 nebo tir1afb2 a 3)*, u které je narušen příjem auxinového signálu. Geny *TIR1 AFB* jsou, dle výsledků experimentů s GUS analýzou, exprimovány v pozdní fázi vývoje prašníku (tzn. tehdy, kdy jsou již diferenciována všechna pletiva prašníku). Při zmíněné předčasné dehiscenci, ve vztahu k době otevření květu, se uvolňují zcela zralá zrna. Jejich vývoj je tak v porovnání s pylem kontrolní rostliny rovněž předčasný. Stomium se v tomto případě otevírá ve stejnou chvíli jako septum, a to následkem předčasné lignifikace endothecia. K této změně ve struktuře buněčných stěn endothecia dochází ještě před degradací tapeta (Cecchetti *et al.*, 2008). Zde je vhodné připomenout mutaci *A. thaliana*, při které stomium naopak zůstává – stejně jako prašník – uzavřeno. Ke tvorbě ztlustlin zde, na rozdíl od *tir1afb*, nedochází vůbec. Tento fenotyp je projevem mutace genu pro transkripční faktor *MYB26* (Yang *et al.*, 2007), který je přímo regulován *AUXIN RESPONSE FACTOR8* (konkrétně varianta *ARF8.4*, Ghelli *et al.*, 2018). *MYB26* kontroluje lignifikaci endothecia (Dawson *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 2007) a to regulací exprese *NST1* a *NST2 (NAC SECONDARY WALL THICKENING PROMOTING FACTOR1 a 2)*. *NST1* a *NST2* patří mezi regulátory genů zajišťujících lignifikaci endothecia (Yang *et al.*, 2017; Xu *et al.*, 2019). Nelignifikující endothecium, tedy stejný fenotyp, se objevuje i u mutantu *arf17 (auxin response factor17)*, kde lignifikace endothecia vůbec nastává. *ARF17* tedy reguluje expresi genu *MYB108*, zároveň se podílí na regulaci zmíněných genů *NST1* a 2. Ty tak jsou pod kontrolou genů *MYB26* i *ARF17*. Auxin znemožňuje otevření prašníku, protože narušuje jeho správný vývoj. Auxin je pro vývoj prašníku nepostradatelný (Xu *et al.*, 2019).

Auxin je zároveň negativním regulátorem biosyntézy kyseliny jasmonové (Nagpal *et al.*, 2005; Cecchetti *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2019).

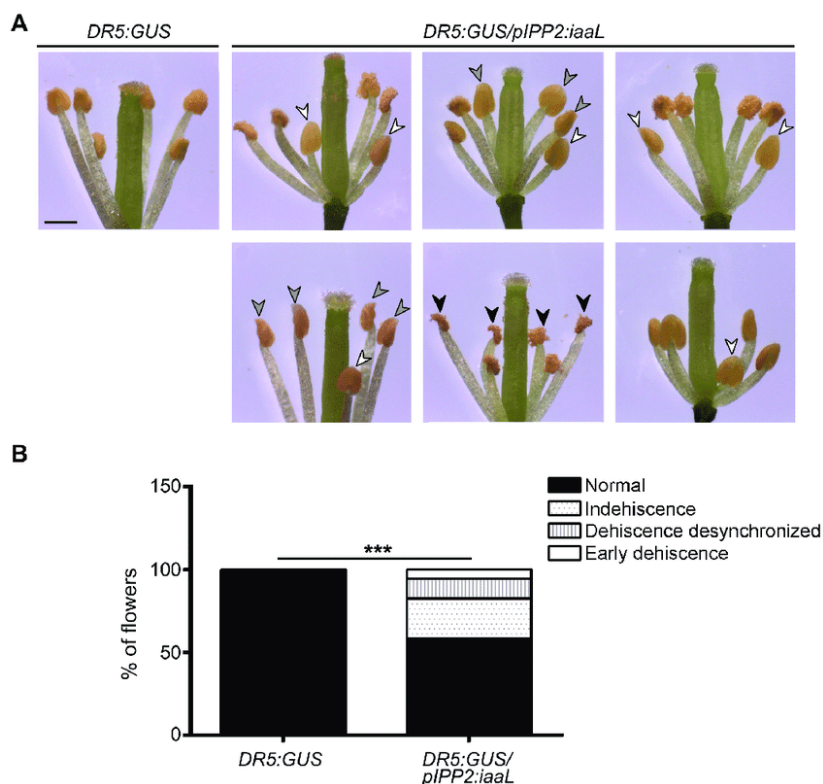
Prašníky jsou místem, kde je velmi vysoká koncentrace IAA, která dle všeho blokuje růst korunních lístků *A. thaliana* téměř až do chvíle, než se květ otevře. Tehdy koncentrace auxinu v prašnicích klesá (Aloni *et al.*, 2006).

IAA dále ovlivňuje vývoj pylových zrn (Cecchetti *et al.*, 2008), v pylových zrnech se hromadí a hraje roli při klíčení pylové láčky (Aloni *et al.*, 2006). Podle dosavadních zjištění je možné auxin detekovat v pylových zrnech po celou dobu jejich zrání (Salinas-Grenet *et al.*, 2018), auxin se podílí na regulaci vstupu mateřské buňky pylového zrna do meiózy a následné mitózy. Auxin je důležitý především pro synchronizaci otevření prašníků až ve chvíli, kdy jsou

nejen pylová zrna připravena, ale i tyčinka je dostatečně dlouhá a květ je hotov k tomu se otevřít (Cecchetti *et al.*, 2008).

Důležitost auxinu pro vývoj pylových zrn a dehiscenci prašníků testovala studie, při níž byla upravována dostupnost auxinu, resp. volné IAA. Byla využita bakteriální lysin indolyl-3-octová syntetáza (*iaaL*), která vytváří konjugát z volné IAA a lysinu, čímž se IAA stává neaktivní. Exprese genu pro IAAL byla uskutečněna pod promotory vázaných v různých fázích vývoje pylového zrna, a to na genetickém pozadí rostlin s na auxin reagujícím reportérovým genem *DR5:GUS* (Salinas-Grenet *et al.*, 2018).

Bylo zjištěno, že v případě exprese IAAL pod promotorem vázaným do poloviny vývoje pylového zrna (*DR5:GUS/pIPP2:iaaL*) snížené množství volné IAA narušilo vývojové procesy, které souvisí se samčí fitness. Fenotypovým projevem ovlivněných rostlin byla chybějící krátká tyčinka a nižší počet semen v šesuli v porovnání s kontrolními rostlinami *DR5:GUS*. Snížené množství IAA vedlo ke zhoršenému vývoji pylového zrna, ale mohlo i negativně poznamenat následný růst pylové láčky. Nižší množství IAA způsobovalo narušení synchronizaci dehiscence prašníku v rámci vývoje celého květního orgánu (obrázek 1.9). U rostlin, kde bylo manipulováno s množstvím volné IAA, byly zaznamenány různé fenotypy. Rostliny měly prašníky, kde proces dehiscence ani nezačal, nebo naopak k dehiscenci došlo příliš brzy. Další variantou byly rostliny, u kterých k dehiscenci v rámci prašníků jednoho květu docházelo postupně (tzv. desynchronizace dehiscence). Nakonec byly však i rostliny s prašníky, kde výše zmíněné procesy probíhaly správně (obrázek 1.9).



Obrázek 1.9: **A.** Obrázky zachycují různé fenotypové projevy u rostlin exprimujících *DR5:GUS/pIPP2:iaaL* *DR5:GUS* - kontrola, bílé šipky poukazují na narušenou synchronizaci dehiscence, šedé šipky na nedehiscentní prašníky a černé šipky na předčasně otevřené prašníky. **B.** Grafické shrnutí poměru normálního fenotypu dehiscence prašníků a fenotypu s narušeným průběhem dehiscence u rostlin *DR5:GUS* (kontrola) a *DR5:GUS/pIPP2:iaaL*. Podle Salinas-Grenet *et al.*, 2018.

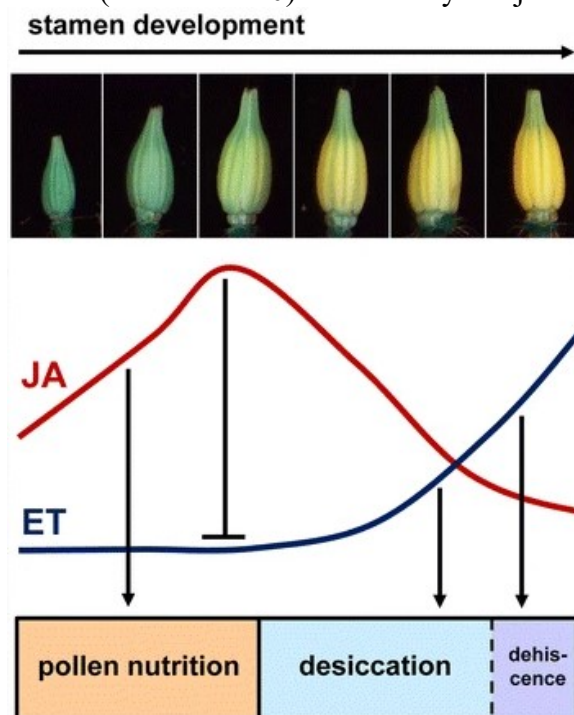
### 1.5.3 Ethylen

Posledním růstovým regulátorem, kterému bude věnována pozornost, je ethylen. Podobně jako výše uvedené růstové regulátory, i ethylen má mnoho různých funkcí – tradičně se zmiňují hlavně jeho role v dozrávání plodů a v senescenci (např. Bleecker & Kende, 2000). Stejně jako auxin a jasmonáty je i ethylen rovněž spjat také s dehiscencí prašníků (Rieu *et al.*, 2003; Dobritsch *et al.*, 2015).

Efekt necitlivosti k ethylenu byl zkoumán na *N. tabacum*. Tato necitlivost byla způsobena mutací *etr1-1* (v genu *ETR1* homologickém u *A. thaliana*). Alternativou bylo ošetření wild type rostlin 1-methylcyklopropenem, který inhibuje schopnost rostliny vnímat ethylen. V obou případech nebyl postižen vývoj prašníku, ale pouze jeho dehiscence, která byla opožděná o jeden až několik dní vzhledem k době otevření květu. Došlo tedy k desynchronizaci těchto dvou dějů. Prodlěva v procesu nastala v oblasti stomia, k jehož degradaci a následným procesům dehiscence docházelo později než u rostlin na ethylen reagujících. Pylová zrna rostlin k ethylenu necitlivých však byla životaschopná. U květů (s téměř zralými prašníky), které byly odděleny od rostliny, měla aplikace ethyleny za následek uspíšení procesu dehiscence (Rieu *et al.*, 2003).

Modelovým organismem pro dehiscenci prašníků byla v případě další studie zabývající se ethylenem rostlina *S. lycopersicum* (Dobritsch *et al.*, 2015), jejíž mutant *jail-1* (*jasmonic acid-insensitive1-1*) má narušenou standardní regulaci ethyleny (*JAIL* u *S. lycopersicum* je homologem *COI1* u *A. thaliana*, Li *et al.*, 2004). Následkem mutace, která způsobuje necitlivost k jasmonátům, dochází u *S. lycopersicum* k předčasné biosyntéze ethyleny. Ta je důsledkem exprese genů řídících ethylenovou signalizaci. Projevem mutace jsou mimo jiné předčasně dehiscenční a do senescence vstupující tyčinky.

V případě *S. lycopersicum* obsah jasmonátů v tyčince začíná klesat ještě před započítím dehydratace pletiva prašníku (obrázek 1.10). Jasmonáty mají roli v regulaci ethylenové



Obrázek 1.10: Schéma zobrazující roli jasmonátů ve vývoji tyčinky *S. lycopersicum*. Množství jasmonátů během vývoje tyčinky narůstá, podporují totiž výživu a vývoj pylových zrn. V druhé fázi vývoje však množství jasmonátů postupně klesá. Jasmonáty blokují předčasný nárůst množství ethyleny, který jinak pozitivně reguluje dehiscenci prašníků a uvolnění pylových zrn. Upraveno podle Dobritsch *et al.*, 2015.

signalizace, brání jejímu spuštění. Ethylen dehiscenci prašníků *S. lycopersicum* pozitivně reguluje (Dobritsch *et al.*, 2015).

Existuje rozdíl mezi nedostatkem či necitlivostí k jasmonátům u *S. lycopersicum* a *A. thaliana*. V případě narušení jasmonátové signalizace u *A. thaliana* k dehiscenci nedochází vůbec či mnohem později (Sanders *et al.*, 2000; Ishiguro *et al.*, 2001), u *S. lycopersicum* je tomu naopak (Dobritsch *et al.*, 2015).

## 1.6 Transformace rostlin rodu *Arabidopsis*

Při transformaci *A. thaliana*, nejčastěji používaného druhu z rodu *Arabidopsis*, se běžně využívá metoda zvaná floral dip (Clough & Bent, 1998; Bent, 2006). V případě druhu *Arabidopsis arenosa*, který byl vybrán jakožto modelový organismus pro studium dehiscence prašníků (kapitola 1.7.1), však není zaveden žádný transformační protokol. Jelikož se jedná o obligátně cizosprašný druh, byla na místo zmíněné metody floral dip zvolena metoda transformace kořenových segmentů jejich kokultivací s *Agrobacterium tumefaciens* (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007). Tato časově náročnější metoda byla původně určena pro *Arabidopsis lyrata* a nezahrnovala krok křížení, jak by tomu bylo v případě metody floral dip. Nakonec však bylo k této metodě rovněž přistoupeno: byl zvolen protokol pro sice samosprašný, avšak stejně jako *A. arenosa*, polyploidní druh *A. kamchatica* (Yew, Kakui & Shimizu, 2018).

## 1.7 Cíle a konkrétní náplň práce, plány

### 1. Zavedení *A. arenosa* jako modelu pro studium dehiscence prašníků

Jedním z dlouhodobě nejvíce používaných a nejlépe prostudovaných rostlinných modelových organismů je *A. thaliana* (Meyerowitz Elliot M., 1987; Van Norman & Benfey, 2009). Vedle praktické velikosti genomu *A. thaliana* (The *Arabidopsis* Genom Initiative, 2000) je pro experimentální práci výhodný i rychlý životní cyklus. *A. thaliana* je ovšem rostlina samosprašná. Je proto možné, že evoluční tlak na správné načasování uvolnění pylových zrn ve vztahu k počasí zde není příliš velký. Dehiscence prašníků *A. thaliana* navíc nastává (při standardních kultivačních podmínkách) ještě před samotným otevřením květu. Druh *A. thaliana* proto na začátku nebyl vyhodnocen jako vhodnější modelový organismus pro studium vlivu atmosférických srážek na dehiscenci prašníků. K experimentální práci byl proto vybrán příbuzný, cizosprašný druh *A. arenosa*.

### 2. Vytvoření experimentálního systému simulující dešť a rosu

Klíčovým krokem pro realizaci experimentů zkoumající vliv atmosférických srážek na dehiscenci prašníků byla konstrukce zařízení, které by umožňovalo vystavit rostliny, respektive pouze květy, uměle vytvářenému dešti či rose. Tento systém zároveň musel dovolovat regulaci intenzity umělých srážek a průběžnou kontrolu míry otevření květu a průběhu procesu dehiscence prašníků.

### 3. Popsání vlivu simulovaného deště a mlhy na dehiscenci prašníků.

Za využití výše zmíněného experimentálního systému bylo cílem zjistit a zmapovat, jaký efekt mají atmosférické srážky na dehiscenci prašníků *A. arenosa*. Úkolem bylo objasnit, zda je možné ovlivnit dobu, kdy se prašníky otevírají.

#### 4. Sledování působení rosy na dehiscenci prašníků na anatomické úrovni

Dalším cílem bylo demonstrovat rozdíl v dehiscenci prašníků *A. arenosa*, které byly a nebyly vystaveny působení rosy, a to na anatomické úrovni. Pro dosažení tohoto cíle bylo nutné najít a optimalizovat metodu, která by umožnila pozorovat stav prašníků na konfokálním mikroskopu za využití fluorescenčních barev bez zdlouhavé a invazivní fixace.

#### 5. Zodpovězení otázky, jaký vliv má na dehiscenci prašníků nevodné prostředí

Za využití vodného i nevodného prostředí bylo dalším úkolem prozkoumat, jakým způsobem probíhá dehiscence prašníků *A. arenosa* v těchto podmínkách.

#### 6. Objasnění role transkripce v iniciaci dehiscence prašníků

Pomocí inhibitoru transkripce bylo cílem zjistit, zda je proces dehiscence prašníků na transkripci závislý. Respektive zda je skutečnost, že po dešti či rose dojde k dokončení dehiscence, závislá na transkripci. V případě, že by dehiscence byla na transkripci závislá, mělo následovat sekvenování transkriptomu prašníku.

Pro inhibici transkripce byl zvolen cordycepin (3'-deoxyadenosine), který se během transkripce inkorporuje do tvořícího se vlákna RNA, a tímto způsobem tak transkripci terminuje (např. Cline, Rehm & Wilson, 1974; Seeley, Byrne & Colbert, 1992).

#### 7. Zavedení metody transformace *A. arenosa*

Posledním cílem bylo vytvořit stabilního transformanta *A. arenosa*, a to podle protokolu využívající kokultivaci kořenových segmentů s *A. tumefaciens* (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007). Výhledově je plánovaná například lokalizace exprese sacharózového transportéru SUC1 (kapitola 1.4.1) v průběhu dehiscence prašníků vystavených vlivu atmosférických srážek.

### 1.8 Hypotézy testované v rámci této diplomové práce

1. Dehiscence není ryze fyzikální proces, ale je i pod kontrolou rostliny.
2. Umělým kropením/rosením je možné manipulovat průběhem dehiscence.
3. Kropením/rosením rostlin je možné ovlivňovat expresi či aktivitu sacharózových transportérů

## 2. Materiál a metody

### 2.1 Rostliny a jejich kultivace

Důvody zmíněné v kapitole 1.7 vedly k tomu, že jako hlavní modelový organismus pro studium dehiscence prašníků byla zvolena rostlina *A. arenosa*. Experimenty byly prováděny s rostlinami z druhé generace rostlin původem z podhůří Jizerských hor, konkrétně Pulečný, okres Jablonec nad Nisou (semena sklizena v roce 2018). Je možné konstatovat, že se s největší pravděpodobností s ohledem na jejich ekologii jedná o tetraploidy (osobní sdělení Mgr. Magdaleny Bohutínské, Katedra botaniky PřF UK, 2019). Po výsevu a sedmidenní stratifikaci při 4 °C byly rostliny kultivovány zpravidla 6–8 týdnů, než začaly kvést.

Dalšími modelovými organismy byly druh *A. lyrata* původem z Islandu, rok sběru semen 2017, a druh *A. thaliana*, ekotyp Columbia.

Pro potřeby transformačních experimentů byly využity další ekotypy zmíněných druhů, a to *A. lyrata* původem z kanadského Point Pelée (Clément Lafon Placette, Dr.) a alpský ekotyp *A. arenosa* i ekotyp z úpatí Tater a Faragasu (RNDr. Filip Kolář, PhD.) a dále i druh *Arabidopsis croatica* původem z Velebitu (RNDr. Filip Kolář, PhD.).

Osekvenovaná linie *A. lyrata* MN47 (Hu *et al.*, 2011, zdroj NASC, NASC ID: N9608) byla pořízena pro paralelní provedení pokusů k experimentům s *A. arenosa*.

Sterilizace semen pro *in vitro* kultivaci byla prováděna pomocí 50% roztoku SAVO (0,5 ml SAVO, 0,5 ml destilované vody – roztok tak obsahoval přibližně 2,5 % chlornanu sodného) ve sterilní mikrozkuhavce po dobu deseti minut. Semena byla následně 3x promyta destilovanou vodou a pomocí pipety vyseta na Petriho misku 12x12 cm, a to na médium *Arabidopsis* minimální (*Ara* MIN).

- Složení *Ara* MIN na 1 l: 2,2 g MS Sigma M5519; 10 g sacharózy (Penta); 8 g Plant Agar (Duchefa Biochemie); pH 5,7.

Stratifikace probíhala při 4 °C ve tmě po dobu 7–21 dnů (*A. arenosa* a *thaliana* 7 dní, *A. lyrata* zpočátku 21 dní). Po uplynutí doby potřebné pro stratifikaci byla vyšetá semena přesunuta do kultivační místnosti s teplotou 19–23 °C a režimem osvětlení 16 hod světlo a 8 hod tma, a to do až chvíle, dokud semenáčky nebyly dostatečně velké.

Při běžné kultivaci byla semena vysévána přímo na rašelinové jiffy, délka stratifikace pak byla totožná se stratifikací semen kultivovaných *in vitro*. Zatímco *A. thaliana* byla pěstována pouze za na jiffech, druhy *A. arenosa* a *A. lyrata* byly posléze přesazovány do květináčů odpovídající velikosti za využití běžného zahradnického substrátu.

### 2.2 Simulace deště a rosy

#### 2.2.1 Konstrukce experimentálního systému pro simulaci atmosférických srážek

Byla zakoupena dvě zařízení značky Lucky Reptile, původně určená k využití v teraristice. Konkrétně se jednalo o kropicí zařízení Super Rain a mlhovač SuperFog II. Režim kropění byl pomocí spínacích hodin a cyklovače od 5:00 do 10:00. Přístroj v tomto časovém úseku vždy 15 s kropil květy a 60 s byl vypnutý (byla využita kombinace spínacích hodin a cyklovače typu CRM-H2, 230V, zkonstruováno Mgr. Milošem Duchoslavem). Oproti tomu

přístroj navozující vysokou vzdušnou vlhkost, která vedla ke kondenzaci vody v podobně drobných kapek (rosení) pracoval kontinuálně, a to také od 5:00. Konec aplikace vody se však v případě rosení lišil (doba působení vody byla postupně prodlužována). Jak při kropení, tak při rosení byla používána destilovaná voda.

Dále byly zakoupeny plastové boxy z průhledného materiálu o rozměrech 38x28x28 cm. Do bočních stran těchto boxů byly nahřátým korkovrtem vytvořeny kulaté otvory o průměru 1,5 cm, na jejichž spodní část přímo navazovaly menší otvory o průměru 0,5 cm, tzn. malý a velký otvor byly propojené. Před začátkem experimentu byly květináče s rostlinami umístěny vedle boxu. Stonky s poupaty byly vloženy větším otvorem dovnitř boxu, a pak posunuty do otvoru menšího. Větší otvor byl následně zajištěn zátkou z polyethylenové pěny o tloušce 20 mm tak, aby nedošlo k pohybu stonku a zároveň aby nedocházelo ke ztrátám vody během kropení či rosení. V případě rosícího zařízení byly čtyři trysky umístěny na stěny boxu, který byl ponechán bez víka, u mlhovače byla trubice s vývodem mlhy pevně zajištěna ve víku daného boxu. Víko bylo k boxu navíc připevněno páskou, aby se minimalizoval únik mlhy. Po ukončení rosení byl box otevřen a vysušen. Stonky byly ale ponechány uvnitř boxu a dále probíhalo sledování vývoje otevírání květů a dehiscence prašníků.

Experimenty zkoumající vliv kropení a rosení na prašníky *A. arenosa* byly prováděny ve skleníku KEBR PřF UK. V zimních měsících bylo kvůli krátkému dni a nedostatku světla využíváno umělého osvětlení, a to ráno od 5:00 do 9:00 (od dubna pak od 5:00 do 7:00) a večer od 18:00 do 21:00. Kropení bylo realizováno od ledna do března 2019, rosení od dubna do června 2020.

### 2.2.2 Sledování průběhu procesu dehiscence prašníků

Každou celou hodinu byl pomocí lupy Balloon (zvětšení 14x) zkontrolován a zaznamenán stupeň otevření květu a stejně tak i jeho prašníků, a to od rána až do úplného otevření prašníků. Stonek se sledovaným květem byl vždy po odstranění těsnící hmoty vyjmut z boxu a zkontrolován. Následně byl vložen zpět, a to pokud možno tak, aby byly – především v případě rosení – minimalizovány ztráty vody. Hodnocení probíhalo na základě předem stanovených kategorií: v případě květů bylo určeno pět (od nuly do čtyř), v případě prašníků čtyři stupně otevření (od nuly do tří, obrázky 3.3 a 3.4 v kapitole Výsledky). Fotografie byly pořízeny pomocí stereomikroskopu Nikon s rozsahem zvětšení 10x6 a fotoaparátu Nikon D3200.

### 2.2.3 Statistické zpracování dat

Data získaná z výše popsaného pozorování byla zpracována v open-source statistickém prostředí **R** (R Core Team, 2020). Pomocí lokální polynomicke regrese (`loess`; Cleveland, Grosse & Shyu, 1992) byla data proložena hladkou křivkou a spolehlivost regrese byla stanovena bootstrapováním – z původního souboru měření byl tisíckrát vybrán náhodný soubor dat stejné velikosti s možností opakování a taktéž proložen lokální polynomickou regresí. Křivky získané bootstrapováním byly přidány k původnímu grafu a míra jejich překryvu u kontrolní a ošetřené varianty vypovídá o statistické významnosti rozdílu v průběhu obou grafů. Byla použita metoda dle Schönbrodta (Schönbrodt, 2012). Výběr metody pro zpracování dat a příprava skriptu pro prostředí **R** byly v kompetenci školitele, grafy pak vypracovala řešitelka.



Mimo grafy 3.2 a 3.3, které byly zpracovány výše uvedeným způsobem, byly všechny ostatní vytvořeny za využití programu Excel MS Office 2019.

#### 2.2.4 Měření teploty a vzdušné vlhkosti

Teplota vnějšího prostředí byla kontrolována v průběhu sledování otevírání prašníků rtuťovým teploměrem. Pro kontinuální detekci stavu prostředí byl dále sestaven automatický programovatelný systém na bázi vývojové platformy Raspberry Pi Zero W. K té byl připojen modul čidla osvětlení s vysokým dynamickým rozsahem Adafruit TSL2591 a dva moduly kombinovaného čidla teploty, vlhkosti a tlaku Adafruit BME280. Jedno z nich sledovalo teplotu a vlhkost okolí, druhé pak bylo umístěno přímo v mlžícím boxu. Všechny tři moduly byly připojeny na I2C komunikační linku GPIO rozhraní Raspberry. U jednoho modulu BME280 byla provedena změna I2C adresy pomocí přerušování výchozího spojení a spájení nového mezi k tomu určenými kontakty. Snímání bylo prováděno v minutovém intervalu pomocí skriptu vytvořeného v prostředí Python 3 za pomoci modulů poskytnutých výrobcem čidel.

#### 2.2.5 Studium anatomie prašníků *A. arenosa*

Pro porovnání stádií dehiscence prašníků *A. arenosa*, vystavených či nevystavených působení rosy, byly provedeny jejich příčné řezy. Prašníky byly odebrány ve dvouhodinových intervalech a ihned zality do 2,5% agarózy (low gelling, Simga). Po zatuhnutí byly bločky nařezány na vibratomu (WPI Motorized Advance Vibroslice, model NVSLM1), a to na 30  $\mu\text{m}$  řezy. K barvení byla použita fluorescenční barva Calcofluor White (CW, zásobní roztok 1 mg/ml vody, Sigma). Na 1 ml vody bylo použito 10  $\mu\text{l}$  barvy (finální obsah CW 0,01 mg). Barvení probíhalo půl hodiny. Poté byl řez – stále upevněný v plátku agarózy – umístěn na podložní sklíčko a zajištěn kapkou agarózy. Pro snímání, ke kterému byl využit konfokální mikroskop Leica TCS SP2, byly vždy vybírány řezy z horní třetiny prašníku.

#### 2.2.6 Skenovací elektronová mikroskopie

Prašníky *A. arenosa* byly za účelem zřetelného zobrazení různých stádií otevírání odebrány z květů a umístěny do fixáže. Dále byly předány k servisnímu zpracování v Laboratoři elektronové mikroskopie PřF UK (protokol <https://web.natur.cuni.cz/~lem/index.php?p=metody>).

- Na 10 ml fixáže bylo použito 5 ml fosfátového pufru a 3,13 ml 8% GA. Vše bylo destilovanou vodou doplněno na finální objem 10 ml.
- 0,2M fosfátový pufr o pH 7,2:  
Roztok A: 7,15 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$  (Lachema Brno) bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na finální objem 100 ml. Roztok B: 2,76 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (Carl Roth) bylo rozpuštěno v destilované vodě a doplněno na finální objem 100 ml. 36 ml roztoku A a 14 ml roztoku B bylo smícháno a opět doplněno na finální objem 100 ml.

Připravené prašníky byly přilepeny na oboustrannou měděnou lepicí pásku, připevněnou na terče, a pozlaceny. Mikroskopické pozorování prašníků probíhalo za využití skenovacího elektronového mikroskopu (SEM JEOL 6380 LV).

## 2.3 Stabilní transformace rostlin rodu *Arabidopsis* skrze kořenové segmenty

Protokol pro transformaci několika druhů rostliny *Arabidopsis* byl založen a upraven dle postupu uvedeného v práci Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007. Metoda byla založena na kokultivaci kořenových segmentů rostlin s *Agrobacterium tumefaciens* a využití kultivačních médií s různým obsahem růstových regulátorů.

### 2.3.1 Příprava kořenů na transformaci

Vlastní transformaci pomocí *A. tumefaciens* předcházela kultivace celých kořenů oddělených od semenáčků. Kultivace kořenů probíhala po dobu čtyř dnů (kultivační podmínky 19–23 °C a režim osvitů 16 hod světlo a 8 hod tma) na Callus Induction Medium (CIM).

- Složení CIM na 1 l: 4,4 g MS Sigma M5519; 20 g glukózy (anhydrid, MP Biomedicals); 0,5 g MES (Sigma). Gamborg vitamíny: thiamin 1 ml (zásobní roztok 10 mg/ml, finální obsah v médiu 10 mg, Sigma); pyridoxin 200 µl (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); nikotinová kyselina 200 µl (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); glycin 200 µl (10 mg/ml, finální obsah v médiu 2 mg, General Biochemicals). Růstové regulátory: 0,5 ml 2,4-D (zásobní roztok 1mg/ml v 50% ethanolu, finální obsah v médiu 0,5 mg) a 0,5 ml kinetinu (zásobní roztok 1mg/ml v 1N NaOH, finální obsah v médiu 0,5 mg). 8 g Plant Agar (Duchefa Biochemie), pH 5,7 (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007).

Za účelem zvýšení pravděpodobnosti transformace byly posléze místo celých kořenových systémů, jak uvádí vzorový protokol, na CIM umístovány 0,5–1 cm dlouhé segmenty. Cílem bylo zvýšit počet míst pro kalogenezi.

### 2.3.2 Příprava kultury *A. tumefaciens*

*A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::PRX-mCherry (Mgr. Jan Martinek), 35S::DREPP2-GFP (Mgr. Stanislav Vosolsobě, PhD.; Vosolsobě, Petrášek & Schwarzerová, 2017) nebo VGE-iGFP (pDB301:KanR-VGE-5xM-GFP-RB7, Mgr. Tomáš Moravec, PhD.) byly rozčárkovány na Petriho misku s pevným Yeast Extract Beef médiem (YEB) a příslušným antibiotikem (20 ml YEB, 20 µl kanamycin) a kultivovány při teplotě 28 °C po dobu 2–3 dní podle potřeby.

- YEB médium pro *A. tumefaciens*: složení na 1 l: 5 g meat extract (Fluka Analytical), 1 g yeast extract (Sigma-Aldrich), 5 g peptone (from casein, SERVA), 5 g sacharózy (PENTA), 0,5 g MgSO<sub>4</sub>·7 H<sub>2</sub>O (LACHEMA). Pro přípravu pevného média potřeba přidat 17,5 g Plant Agar (Duchefa Biochemie)
- Kanamycin (Kan): zásobní roztok 50 mg/ml, na 10 ml média 10 µl antibiotika, finální obsah v médiu 0,5 mg
- Spectinomycin (Spec): zásobní roztok 50 mg/ml, na 10 ml média 10 µl antibiotika, finální obsah v médiu 0,5 mg

Následně byla vždy pouze jedna kolonie zaočkována do sterilní Erlenmayerovy baňky s tekutým YEB médiem (20 ml YEB, 20  $\mu$ l Kan nebo Spec). Kultivace probíhala po dobu 24 hodin při 28 °C a na třepačce při 180 otočkách za minutu.

### 2.3.3 Transformace kořenových segmentů rostlin z rodu *Arabidopsis* pomocí *A. tumefaciens*

Kultura bakterií byla po 24 hodinách kultivace přelita do sterilní falkony a umístěna do centrifugy. Centrifugace probíhala 15 minut při 20 °C a 5000  $\times$ g. Po centrifugaci byl odlit supernatant a sediment byl znovu resuspendován, a to v infiltračním roztoku. Množství infiltračního roztoku se odvíjelo od hustoty bakteriální kultury, pro jejíž stanovení byl využit spektrofotometr; ideální OD<sub>600</sub> = 0,18–0,2.

- Složení infiltračního roztoku na 1 l: 1,95 MES (Sigma); 2,03 MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O (Sigma); pH 5,6; filtrace přes sterilní filtr.

Kořeny, kultivované čtyři dny na CIM, byly nastříhány na segmenty o velikosti 0,5–1 cm a po dobu pěti minut ponechány v Petriho misce obsahující bakterie a infiltrační roztok. Poté byly vyjmuty a umístěny na nové plotny s CIM, kde kokultivace kořenových segmentů s *A. tumefaciens* probíhala další tři dny (kultivační podmínky 19–23 °C s režimem osvětlení 16 hod světlo a 8 hod tma). V rámci optimalizace protokolu bylo upuštěno od máčení kořenových segmentů a bakteriální kultura s infiltračním roztokem byla aplikována přímo na jednotlivé segmenty (3  $\mu$ l na jeden segment). Kontrolou byly kořenové segmenty, které nepřišly do kontaktu s bakteriální suspenzí.

### 2.3.4 Selektce a regenerace kořenových segmentů kokultivovaných s *A. tumefaciens*

Po třídní kokultivaci byly kořenové segmenty 3x promyty tekutým médiem Shoot Induction Medium (SIM) a antibiotikem potlačujícím růst bakterií. Cílem promývání bylo zbavit kořenové segmenty nánosů bakterií. K promývání byla nejprve používána síťka připevněná ke skleněným trubičkám. Dále bylo vyzkoušeno i prosté propláchnutí v Petriho misce s tekutým médiem, nakonec však bylo využito zařízení Nalgene filter holders plus receiver.

- Složení SIM na 1 l: 4,4 g MS Sigma M5519 20 g glukózy (anhydrid, MP Biomedicals); 0,5 g MES (Sigma). Gamborg vitamíny: thiamin 1 ml (zásobní roztok 10 mg/ml, finální obsah v médiu 10 mg, Sigma); pyridoxin 200  $\mu$ l (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); nikotinová kyselina 200  $\mu$ l (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); glycin 200  $\mu$ l (10 mg/ml, finální obsah v médiu 2 mg, General Biochemicals). 5 ml 6-( $\gamma,\gamma$ -Dimethylallylamino)purine (2iP, zásobní roztok 1 mg/ml roztoku NaOH; finální obsah v médiu 5 mg, Sigma). Pro přípravu pevného média nutné přidat 8 g Plant Agar (Duchefa Biochemie), pH 5,7 (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007).
- Byla vyzkoušena i 2x a 5x vyšší koncentrace 2iP – na 1 l média 5 ml (zásobní roztok 2 mg/ml a 5 mg/ml v roztoku NaOH, finální obsah v médiu 10 mg a 25 mg).

Po promytí byly transformované kořenové segmenty umístěny na plotny s pevným SIM médiem a antibiotikem selektujícím transformované rostlinné buňky (na 10 ml média 10  $\mu$ l antibiotika, typ antibiotika závisel na použitém konstruktu):

- Kan (pro konstrukt 35S::PRX-mCherry a VGE-iGFP: zásobní roztok 50 mg/ml, finální obsah v 10 ml média 0,5 mg;
- Hygromycin (Hyg, pro konstrukt 35S::DREPP2-GFP): zásobní roztok 20 mg/ml, finální obsah v 10 ml média 0,2 mg;

v kombinaci s druhým příslušným antibiotikem potlačujícím růst bakterií:

- prvotně používán carbenicilin (Carb): zásobní roztok 50 mg/ml, na 10 ml média 100  $\mu$ l carbenicilinu, finální obsah v médiu 5 mg
- Carb nahrazen timentinem (Tim, (Cheng, Schnurr & Kapaun, 1998): na 10 ml média 10  $\mu$ l Tim, zásobní roztok 100 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg.

Při několika experimentech s konstruktem 35S::DREPP2-GFP byla chybně používaná kombinace antibiotik Hyg+Kan nikoli Hyg+Tim.

Kromě již zmíněné kontroly ve formě kořenových segmentů bez jakékoli kultivace s *A. tumefaciens* byla vyzkoušena ještě další kontrola, a to pomocí transformovaných kořenových segmentů umístěných na kultivační médium pouze s antibiotikem zabraňujícím růstu bakteriím, nikoli růstu netransformovaného rostlinného materiálu (tj. SIM + Tim/Car bez Kan či Hyg). Dále byl jeden týden po promytí kořenů testován přesun kořenových segmentů na SIM médium s Tim a vyšší koncentrací Kan (5x, 10x a 50x, tj. finální obsah v médiu 5 mg, 10 mg a 50 mg).

Při dlouhodobé kultivaci byly kořenové segmenty vždy po sedmi dnech přesunuty na nové médium. V případě potřeby, kdy povlak bakterií pokryl celé kořenové segmenty, byl celý proces s promýváním segmentů 1–2x zopakován, a to vždy s odstupem sedmi dní.

Kultivace opět probíhala při 19–23 °C s režimem osvětlení 16 hod světlo a 8 hod tma.

### 2.3.5 Kontrola úspěšnosti transgenózy

Průběžná kontrola stavu kořenových segmentů po transformaci probíhala pomocí fluorescenčního stereomikroskopu (Olympus SZX7 s fotoaparátem Canon EOS 760D). Průběžná kontrola pomocí fluorescenčního a konfokálního mikroskopu (Olympus Provis AX 70 s fotoaparátem Nikon D3200 a Leica TCS SP2) probíhala minimálně, protože se celý experiment uskutečňoval sterilním prostředím. Vyjmutí kořenového segmentu z plotny, příprava mikroskopického preparátu, kontrola pomocí mikroskopu a následné vrácení zpět do plotny znamenalo ztrátu materiálu z důvodu následné kontaminace.

### 2.3.6 Regenerace celé rostliny

V případě, že kontrolní či transformované kořenové segmenty v průběhu kultivace na SIM začaly vytvářet listy, byly přemístěny z plotny do Erlenmayerovy baňky na Root Induction Medium (RIM) nebo na *Ara* MIN.

- Složení média RIM na 1 litr: 4,4 g MS Sigma M5519; 20 g glukózy; 0,5 g MES Sigma. Gamborg vitamíny: thiamin 1 ml (zásobní roztok 10 mg/ml, finální obsah v médiu 10 mg, Sigma); pyridoxin 200 µl (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); nikotinová kyselina 200 µl (zásobní roztok 5 mg/ml, finální obsah v médiu 1 mg, Sigma); glycin 200 µl (10 mg/ml, finální obsah v médiu 2 mg, General Biochemicals). Pro přípravu pevného média je nutné přidat 3 g Plant Agar (Duchefa Biochemie), pH 5,7 (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007).

Pokud po změně kultivačního média ze SIM na RIM (respektive na *Ara* MIN) došlo k vývoji kořenového systému, následoval přesun z *in vitro* do *ex vitro* podmínek. Taková rostlina byla umístěna na rašelinový pelet a dopěstována v kultivační místnosti nebo ve skleníku (tato situace nastala pouze u kontrolních kořenových segmentů/rostlin).

### 2.3.7 Floral dip

Vzhledem k nepříliš uspokojivým výsledkům transformace *A. arenosa* přes kořenové segmenty bylo následně přistoupeno k metodě standardně používané u *A. thaliana* (Bent, 2006) nebo například *A. kamchatica* (Yew, Kakui & Shimizu, 2018), která se nazývá floral dip. Následující postup vychází z protokolu Yew, Kakui & Shimizu, 2018.

Pro přípravu bakteriální suspenze *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::DREPP2-GFP byla jedna kolonie, rostoucí na pevném YEB médiu s Kan (kapitola 2.3.2), zaočkována do 5 ml tekutého YEB média s 5 µl Kan. Kultivace probíhala při 28 °C na třepačce při 220 otáčkách za minutu. Po 24 hodinách bylo 50 µl bakteriální suspenze odebráno do 25 ml tekutého YEB s 25 µl Kan a opět umístěno na třepačku na stejně dlouhou dobu a za stejných podmínek. Po jednom dni kultivace pak byla bakteriální suspenze centrifugována po dobu 10 minut při 20 °C a 4000 ×g. Po skončení centrifugace byl supernatant odlit. Sediment byl resuspendován v 50 ml 5% sacharózy (PENTA) a 25 µl 0,05% Silwet L-77 (AgroBio Opava). Stonky s poupaty vybraných rostlin, které před tím byly mezi sebou zkušebně nakříženy, byly na dobu přibližně deseti sekund ponořeny do bakteriální suspenze. Stonky s takto ošetřenými poupaty byly zabaleny do potravinářské fólie a umístěny mezi dvěma tácy opět na 24 hodin. Po jednom dni byly umístěny na světlo, po dalších 24 hodinách byla odstraněna i fólie. Poté byly rostliny mezi sebou nakříženy.

## 2.4 Sledování vlivu kapalin na dehiscenci prašníků

Zkoumání vhodnosti vody jako prostředí pro dehiscenci prašníků bylo realizováno namáčením poupat či otevírajících se květů do různých prostředí. Z květenství byly odstraněny všechny již otevřené a odkvetlé květy a byl ponechán pouze ještě neotevřený. Stonek (cca 2 cm) s květem byl vždy umístěn do 2ml plastové mikrozkušavky a parafilmem zajištěn proti pohybu a to na 3 až 3,5 hodiny. Parafilm rovněž bránil ztrátám par z kapalin. Mikrozkušavky byly do poloviny vyplněny kapalinou Perfluoro(decahydronaphthalen) (PFD, Alfa Aesar, cis + trans, 95%). Ta představuje nevodné a netoxické prostředí. Další mikrozkušavky byly naplněny destilovanou vodou a destilovanou vodou s 0,05 %, respektive 0,025 % smáčedla Silwet L-77 (AgroBio Opava; aplikace smáčedla dle Clough & Bent, 1998). Kontrolou k mikrozkušavkám naplněných výše uvedenými kapalinami byly prázdná mikrozkušavka a mikrozkušavka s dvanácti otvory o průměru 1,5–2 mm. I v těchto kontrolních mikrozkušavkách byly stonky

zajištěny parafilmem. Zároveň byly pozorovány i prašníky květů, které byly ponechány volně na vzduchu.

Stav květů a prašníků byl zkontrolován a zaznamenán ráno buď v 8:30, nebo v 9:00, tj. před umístěním stonků s květy do mikrozkušavek, ve 12:00 a 14:00, tj. poté, co byly stonky z mikrozkušavek vyjmuty. Kategorie pro míru otevření květů a prašníků se shodují s výše uvedenými (kapitola 2.2.2).

Rostliny *A. arenosa* byly během tohoto experimentu umístěny ve skleníku. V zimních měsících zde byly rostliny dodatečně přisvěcovány (kapitola 2.2.1). Tento experiment byl realizován v době od února do května 2020.

Získaná data byla analyzována za pomoci programu Excel MS Office 2019.

## 2.5 Využití PFD v mikroskopii

Jedním z cílů práce bylo najít vhodný způsob pro mikroskopické pozorování prašníků *A. arenosa*. Pro tento účel byla, především při konfokálním mikroskopování, používána výše zmíněná kapalina PFD (Perfluoro(decahydronaphthalen), Alfa Aesar, cis + trans, 95%, např. Littlejohn *et al.*, 2010). Prašníky byly v PFD jednak projasňovány (zpravidla 30 minut), ale rovněž byly do PFD umísťovány při vlastním pozorování.

## 2.6 Zkoumání vlivu cordycepinu na dehiscenci prašníků *A. arenosa*

Pozorování efektu inhibitoru transkripce cordycepinu byl sledován na květech neoddělených od rostliny a na zvláště odebraných prašnicích *A. arenosa*. Květy i prašníky byly po dobu čtyř hodin (od 9:00 do 13:00) umístěny do 2ml plastových mikrozkušavek, které byly naplněny 500  $\mu$ l destilované vody a 15  $\mu$ l zásobního roztoku cordycepinu (Chiba *et al.*, 2013). Zásobní roztok obsahoval 1 mg cordycepinu (Sigma) na 100  $\mu$ l DMSO (MP Biomedicals), finální obsah cordycepinu na 1 ml destilované vody byl 0,3 mg. Kontrolou byly květy a prašníky ponořené pouze do vody. Stejný postup byl zopakován i pro květy a prašníky za využití kombinace 0,05% Silwetu L-77 (AgroBio Opava), na 500  $\mu$ l roztoku smáčedla bylo použito stejné množství inhibitoru jako v kombinaci s vodou, tj. 15  $\mu$ l.

Po čtyřech hodinách byly květy i prašníky vyjmuty z kapaliny. Květy byly jednoduše ponechány na stoncích, prašníky byly z kapaliny pomocí pinzety nitkou umístěny na Petriho misku s navlhčenou buničinou tak, aby prašníky nebyly v kontaktu s buničinou. V průběhu experimentů byla vlhká buničina nahrazena 1% agarózou (low gelling, Simga), do které byly po jejím ztuhnutí umístěny nitky tak, aby prašníky nebyly v kontaktu s agarózou. Stav dehiscence prašníků byl sledován a hodnocen stejným způsobem uvedeným výše (kapitola 2.2.2).

## 2.7 Analýza obrazu

Pro kvalitativní úpravu snímků byl využit grafický editor Zoner (*Zoner Photo Studio X*, <https://www.zoner.cz/>). Při dalším zpracování obrazové dokumentace bylo využito především možností, které poskytuje několik různých freeware programů. Program Fiji (Schindelin *et al.*, 2012) posloužil pro nastavení měřitek a pro složení a úpravu snímků z konfokálního mikroskopu. Sekvence snímků ze světelného mikroskopu byly složeny pomocí programu PICOLAY (*PICOLAY*, [www.picolay.de](http://www.picolay.de)). Grafický editor Inkscape byl využit při tvorbě obrazových tabulí (Harrington, *Inkscape*, <http://www.inkscape.org/>).

### 3. Výsledky

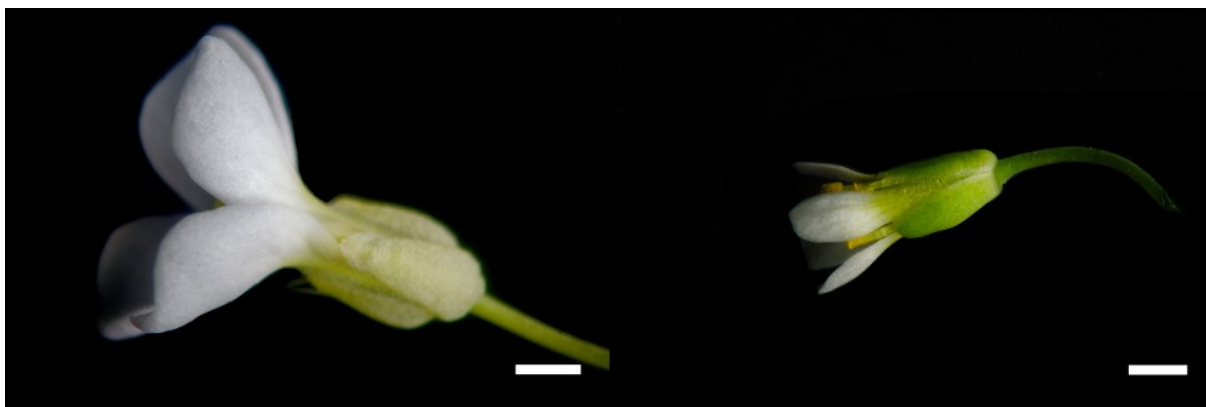
#### 3.1 *Arabidopsis arenosa* jako modelový organismus pro studium dehiscence prašníků

Pro zkoumání vlivu atmosférických srážek na dehiscenci prašníků byl zvolen cizosprašný druh *A. arenosa*. Vzhledem k příbuznosti s *A. thaliana* je zde i předpoklad využití postupů a metod standardně využívaných při práci s *A. thaliana*. Rovněž lze předpokládat takřka identickou funkci genů.

Kultivace *A. arenosa* se ukázala jako zcela neproblematická. Sterilizace, *in vitro* výsev a kultivace (kapitola 2.1) probíhala stejně jako u standardně používané rostliny *A. thaliana*. Ta je charakteristická svým rychlým životním cyklem, kdy se lze v řádu několika málo týdnů dobrat od semena k semenu. Délka vegetačního období *A. arenosa* je oproti tomu delší, rostliny začínaly kvést přibližně dva měsíce od výsevu. Při sterilním i nesterilním výsevu byla semena vždy týden stratifikována při 4 °C. Nejlepší podmínky pro pěstování *A. arenosa* poskytla nikoli kultivační místnost, ale experimentální skleník naší katedry. Rostliny byly schopné kvést s frekvencí jeden až dva květy na jednom stonku za den, a to po dobu i pěti měsíců (za kontinuální tvorby nových stonků), což představuje oproti *A. thaliana* značnou výhodu. *A. arenosa* oproti *A. thaliana* dorůstá větších rozměrů (obrázek 3.1), rovněž květy jsou výrazně větší (obrázek 3.2).



Obrázek 3.1: Porovnání velikosti rostlin *A. arenosa* (vlevo) a *A. thaliana* (vpravo). Měřítko 3 cm.



Obrázek 3.2: Srovnání velikosti květů *A. arenosa* (vlevo) a *A. thaliana* (vpravo). Měřítka 1 mm.

### 3.2 Simulace deště a rosy blokuje finální fázi dehiscence prašníků *A. arenosa*

#### 3.2.1 Byl zkonstruován experimentální systém simulující dešť a rosu

V rámci snahy zjistit, jakým způsobem, pokud vůbec, je ovlivněna dehiscence prašníků *A. arenosa* atmosférickými srážkami, byl vytvořen experimentální systém. Ten umožňoval navození podmínek panujících v přírodě při dešti či rose. Konstrukce boxů, ve kterých byla navozena simulace atmosférických srážek, umožnila, že umělý déšť či rosa působily pouze na samotné květy, zbylé části rostliny tak byly před vodou chráněny. Při simulaci deště (dále kropení, dle použitého zařízení) byly květy plné vody, naopak při simulaci vysoké vzdušené vlhkosti byly květy pokryty drobnými kapkami vody (dále jako rosení). V případě rosení byl box uzavřen víkem, uvnitř proto zpravidla panovala vyšší teplota než mimo něj (o 4–10 °C). Díky využití časovacího zařízení bylo možné začátek simulace atmosférických srážek nastavit již na časnou ranní hodinu, 5:00, tj. ještě před začátkem otevírání prašníků.

#### 3.2.2 Hodnocení vlivu simulovaného deště a rosy na otevírání květů a dehiscenci prašníků a probíhalo na základě jasně určených stádií

Otevírání květů *A. arenosa* bylo rozděleno na pět fází (obrázek 3.3). Stádium nula odpovídalo poupěti, u kterého byly korunní lístky v porovnání s kalichem stále ještě velmi krátké. Ve stádiu jedna již korunní lístky přerostly kalich co do délky, ale byly ještě těsně svinuté a společně s kalichem zaujímaly tvar připomínající válec. V následujícím stádiu se korunní lístky již začaly rozvolňovat a svíraly úhel přibližně 45°. V dalším, třetím, stádiu se od sebe jednotlivé korunní lístky oddělily a svíraly mezi sebou úhel přibližně 90°. Poslední stádium odpovídalo takovému květu, který byl již plně otevřen – korunní lístky byly rozprostřeny do roviny.

Proces dehiscence prašníků byl definován čtyřmi stádii (obrázek 3.4). První stádium odpovídalo takovému prašníku, který byl zcela zavřený. Ve stádiu jedna bylo možné na apexu prašných váčků pozorovat drobné pukliny v oblasti stomia. Pylová zrna však ještě nebylo možné vidět. V druhém, stádiu došlo k výraznému zvětšení zmíněných otvorů a pylová zrna již byla jasně patrná. Poslední stádium bylo charakterizováno výraznou změnou ve stavbě prašníků. Kromě stále se směrem k bázi prohlubujících otvorů se na apexu prašných váčků tvořily kupky pylových zrn. Na abaxiální části prašníku se postupně vytvořilo esovité prohnutí (obrázek 3.4, stádium 3\*).



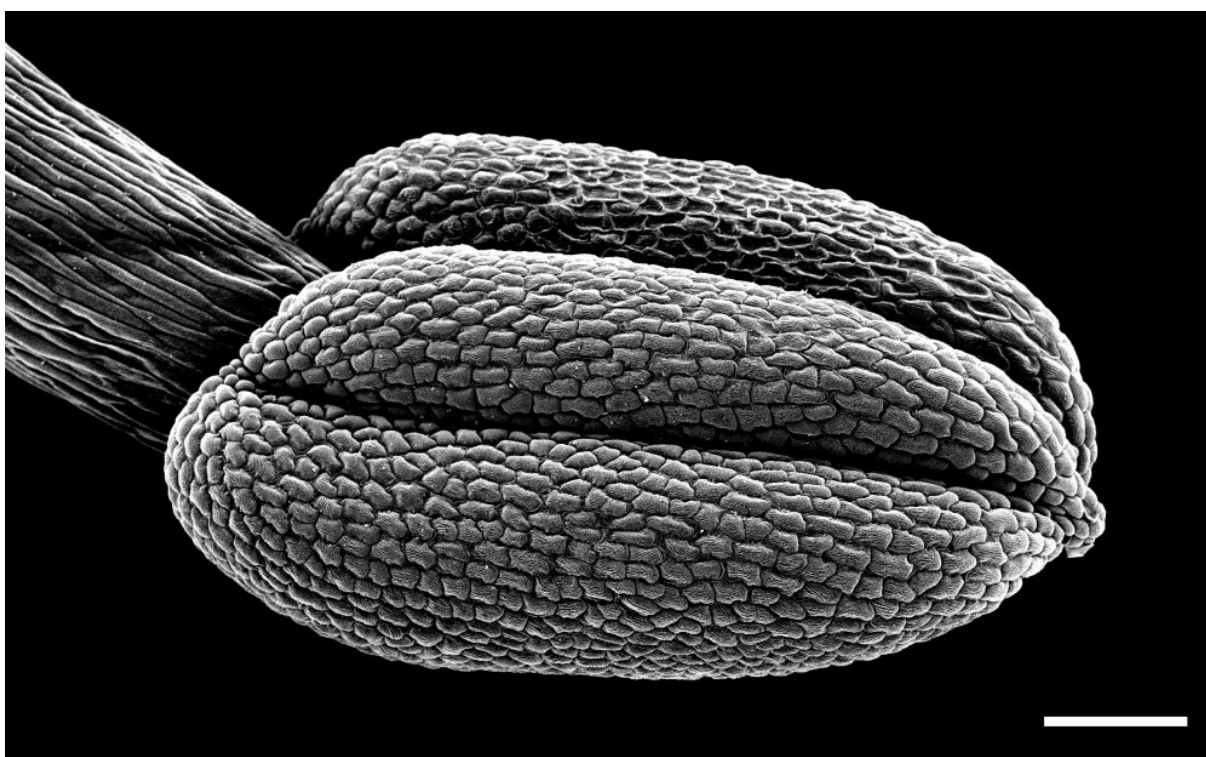


Obrázek 3.3: 0 – korunní lístky nepřesahují délku kalicha; 1 – korunní lístky přesahují délku lístků kališních, 2 – korunní lístky se začínají rozevírat, 3 – korunní lístky jsou od sebe již zřetelně oddělené a svírají mezi sebou úhel přibližně 90°, 4 – květ zcela otevřen. Měřítko 1 mm.

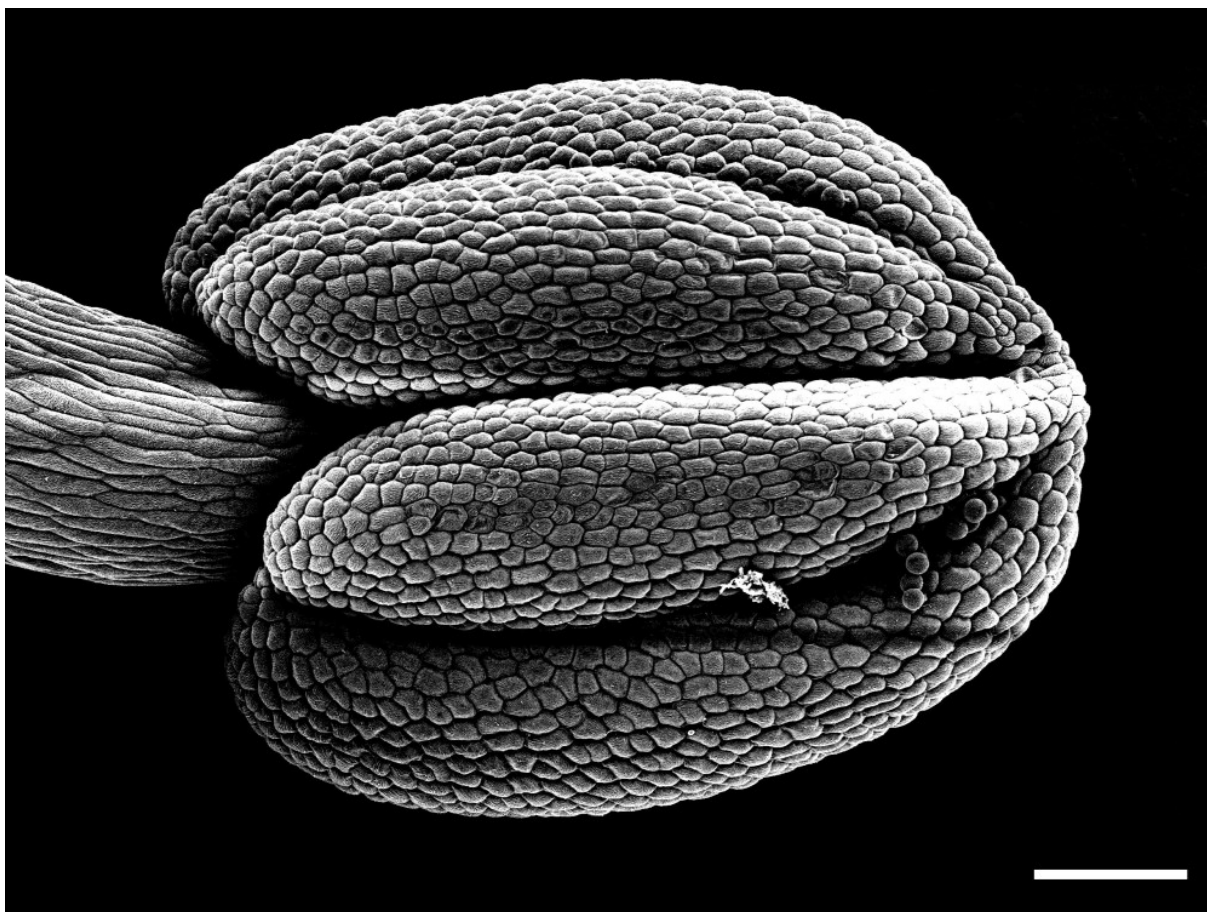


Obrázek 3.4: 0 – uzavřený prašník; 1 – prašné vácčky s vytvořeným otvorem v oblasti stomia (viz šipka); 2 – míra otevření prašných vácčků se zvětšuje, jsou již viditelná pylová zrna; 3 – prašník plně otevřen, na apexu jsou nahromaděná pylová zrna, 3\* – boční pohled na prašník ve stádiu 3, jehož zadní stěna je výrazně prohnutá. Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

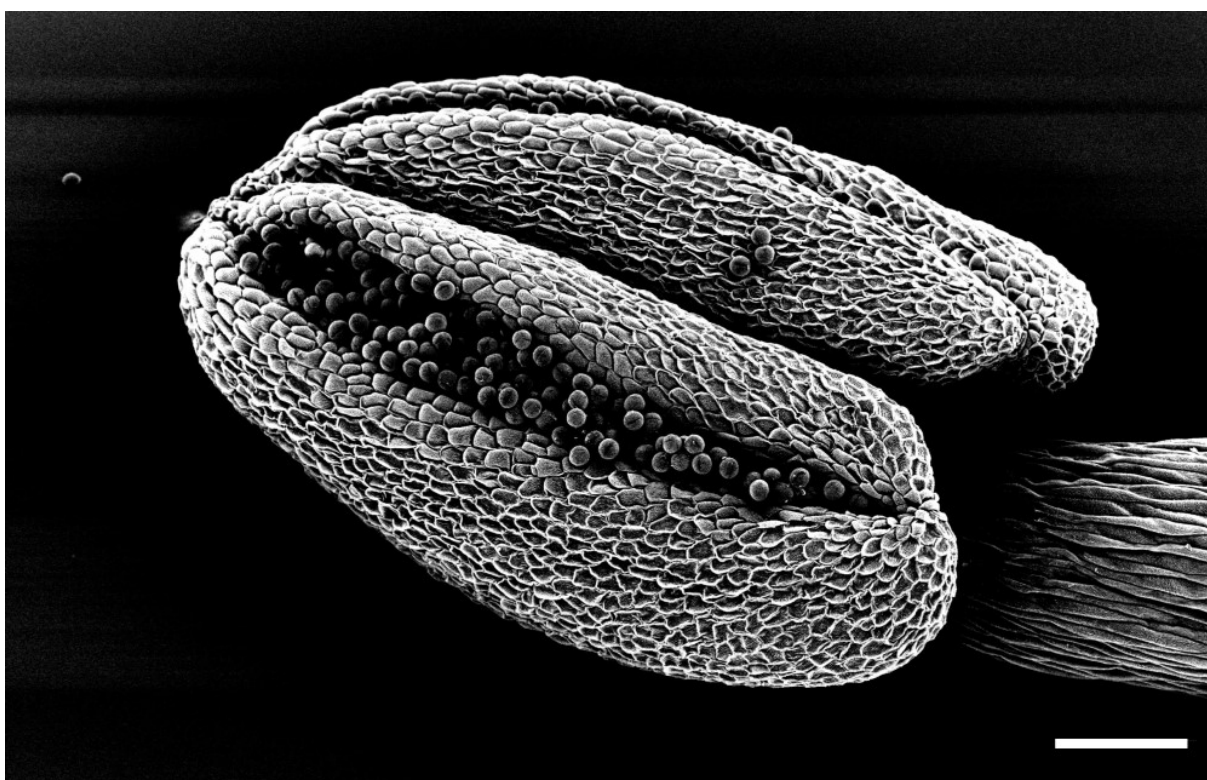
Vzhledem k omezeným možnostem stereomikroskopu bylo pro zřetelnější demonstraci rozdílů mezi jednotlivými stádii otevírání prašníků využito SEM. Zde bylo ale možné zdokumentovat pouze prašníky z prvních třech stádií. Prašné váčky jsou u prašníku ve stádiu nula zavřeny (obrázek 3.5). Ve stádiu jedna jsou na snímku ze SEM již patná pylová zrna, která však při pozorování lupou či stereomikroskopem nebylo možné jasně zaznamenat (obrázek 3.6). Rozdíl je možné rovněž pozorovat u stádia dva, ve kterém otvory v prašných váčkách běžně nedosahovaly až k bázi váčků (obrázek 3.7). Jedná se tedy o artificiální záležitost, která vznikla následkem přípravy vzorků pro SEM (před umístěním prašníků do fixáže byl jejich stav zkontrolován za pomoci stereomikroskopu). Poslední stádium otevírání prašníků, kdy má již pletivo prašníku, pravděpodobně následkem změny vodního režimu buněk, jiné vlastnosti se zdokumentovat nepodařilo: prašík vlivem fixace a následného zpracování změnil výrazně svou stavbu, která neodpovídala stavu *ex vitro*. Došlo k rehydrataci stěn prašíku, která způsobila k návratu do morfologické fáze číslo dva.



Obrázek 3.5: Prašík ve stádiu 0 (spot size 42, accelerating voltage 10 kV). Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 3.6: Prašník ve stádiu 1 (spot size 42, accelerating voltage 10 kV). Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 3.7: Prašník ve stádiu 2 (spot size 42, accelerating voltage 10 kV). Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.3 *Rosa* způsobuje opoždění finální fáze dehiscence prašníků *A. arenosa*, na otevírání květů však vliv nemá

Poslední stádium dehiscence prašníků *A. arenosa* lze odložit působením vody ve formě rosy. V průběhu rosení zůstávaly prašníky buď zcela zavřené, či se na jejich apexu objevoval drobný otvor v oblasti stomia (graf 3.1 B, hodnoceno na základě výše uvedených kategorií v kapitole 3.2.2). Po ukončení rosení docházelo v řádu jedné hodiny k dokončení procesu dehiscence, prašníky dosáhly stádia tři. Scénář po skončení ošetření vodou byl stejný, ať bylo rosení ukončeno v 10:00, 11:00, 12:00 nebo 13:00 (grafy 3.2 A, C, E, G). Získaná data vychází z pozorování tohoto počtu květů a jejich prašníků: v případě konce rosení v 10:00 se jednalo o 114 rosených a 112 kontrolních květů (stav každého květu a jeho prašníků byl vyhodnocen 5x); při ukončení rosení v 11:00 o 46 rosených a 42 kontrolních (stav každého květu a prašníků zkontrolován 6x), ve 12:00 o 51 rosených a 51 kontrolních (stav každého květu a prašníků zkontrolován 7x) a ve 13:00 o 40 rosených a 41 kontrolních květů (stav každého květu a prašníků vyhodnocen 8x).

Následně byl na menším počtu květů v intervalu jedné hodiny pozorován vliv dlouhodobého rosení. To bylo následně prováděno až do 20:00 (tj. celková doba aplikace vody byla 13 hodin), pro orientační představu, jak moc lze finální fázi otevření prašníků oddálit (graf 3.1 B). Při ukončení rosení ve 14:00 bylo sledováno 10 květů, v 15:00 7 květů, v 16:00 16 květů, v 17:00 24 květů a v 18:00, 19:00 a 20:00 7 květů. Menší množství květů pochopitelně může zkreslovat procentuální zastoupení jednotlivých stádií v grafu 3.1 B, cílem pozorování v pozdně odpoledních a večerních hodinách však bylo pouze demonstrovat, kam až lze finální fázi dehiscence odložit. Rosené prašníky ani ve večerních hodinách nedospěly do stádia tři před ukončením rosení (graf 3.1 B). Prašníky kontrolních květů, které rosené nebyly, dosahovaly stádia tři zpravidla nejdéle mezi 9:00 a 10:00. V 11:00 byl už pouze nízký počet těch, které se ve finální fázi nenacházely (graf 3.1 A, grafy 3.2 A, C, E, G), rozdíl oproti roseným prašníkům byl tedy značný. Stejný vliv rosení byl pozorován i u prašníků *A. thaliana* (předběžné výsledky, data neuvedena).

Na rozdíl od simulace deště nebyly rosené květy plné vody, ale jejich povrch byl pokryt pouze drobnými kapkami. Otevření květů nebylo rosou nikterak ovlivněno (grafy 3.2 B, D, F, H). Rosené květy se otevíraly neohledně na aplikaci vody či dobu ukončení aplikace vody. Otevírání květů probíhalo ve shodě s otevíráním květů kontrolních – tedy těch, které nebyly vystaveny působení rosy.

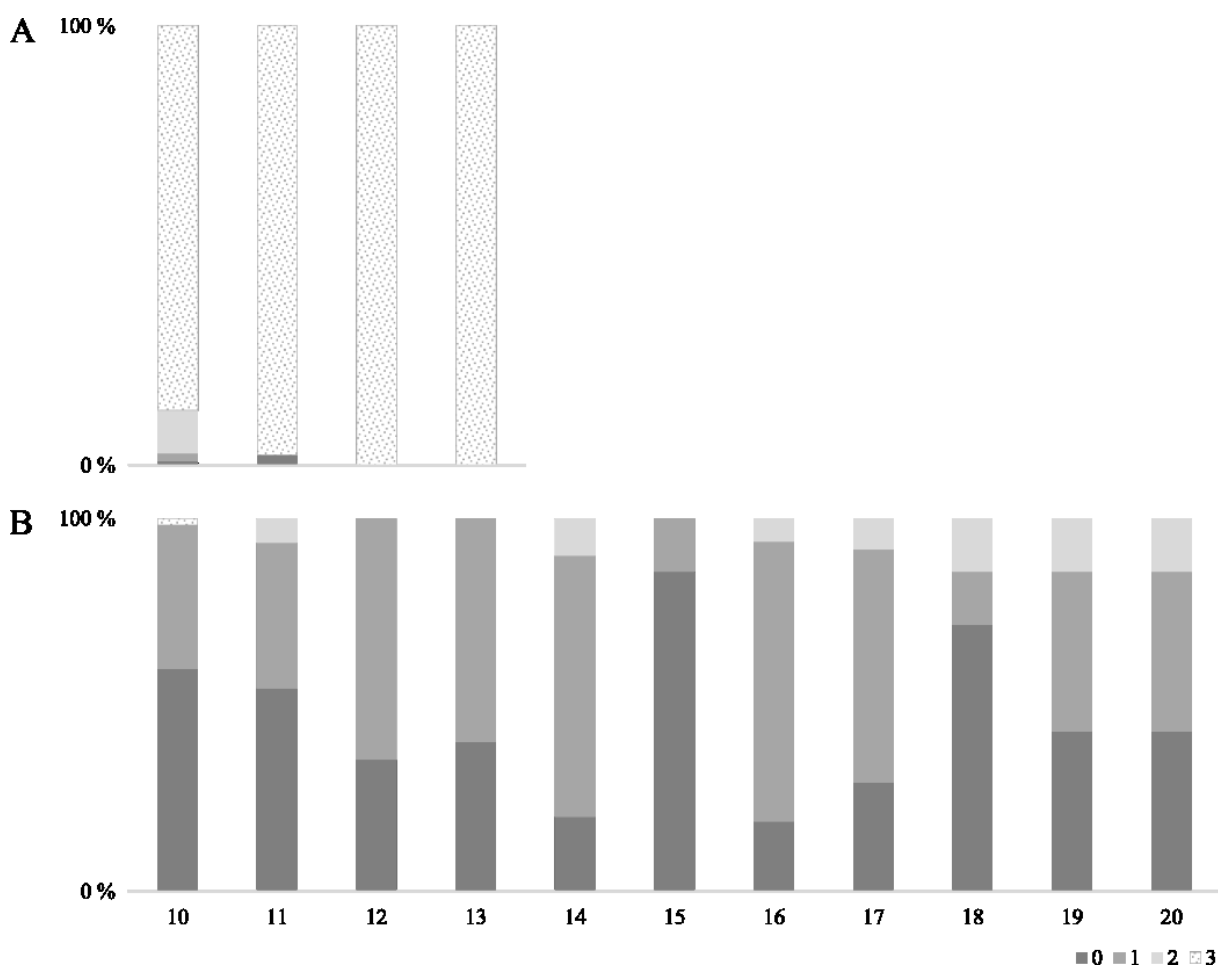
Při rosení byla v uzavřeném boxu vždy 100% relativní vzdušná vlhkost. V případě, že byl experiment prováděn až do odpoledních či večerních hodin, teplota v boxu bývala o 4–10 °C vyšší než v jeho okolí.

Pro podrobnější analýzu – především v hodině, kdy po ukončení rosení docházelo k rychlému dokončení procesu dehiscence – by bylo vhodnější zkrátit interval pro kontrolu stavu prašníků (dehiscence pak může být dokončena i méně než za půl hodiny, data neuvedena). Právě tento hodinový interval, který se při vyhodnocování dat ukázal jako příliš dlouhý, je příčinou více i méně výrazných vln, tedy artefaktu v grafech 3.2.

Komentář ke grafům 3.2 a 3.3: pro vyhotovení grafů posloužila data, která se skládala z údajů o míře otevření květů a prašníků (kapitola 3.2.2). V případě, že se křivka v grafu nachází mezi hodnotami uvedených na ose y, neznamená to, že se jedná o přechodné stádium. Např. pokud je křivka v grafu 3.2 A v 10:00 mezi hodnotami 0 a 1, přičemž je blíže hodnotě 0,

znamená to, že více prašníků bylo v danou hodinu ve stádiu nula. Kontrolou mohou být grafy 3.1, které zobrazují procentuální zastoupení jednotlivých fází otevírání prašníků.

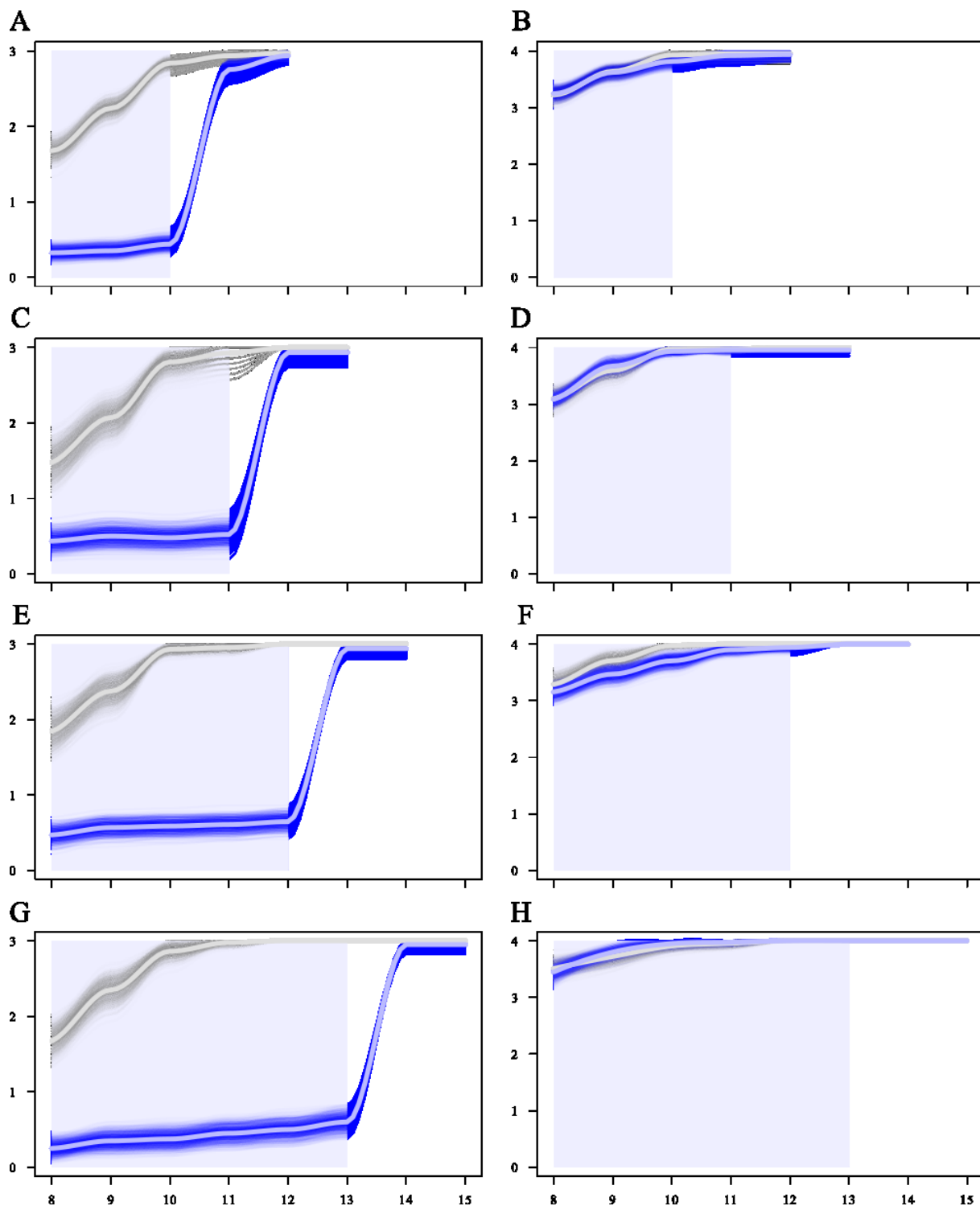
Data získaná z experimentu s rosením byla proložena křivkou pomocí funkce `loess` (více kapitola 2.2.3). Toto se týká světlých křivek, které udávají hlavní trend sytě zbarvených oblastí a jsou světlými křivkami proloženy. Dle zvolené metody statistického zpracování jsou široká pole křivek sytých barev tvořena 1000 křivkami. Ty byly vygenerovány náhodným výběrem ze souboru dat, a to i s možností opakování (bootstrapping). Tímto způsobem byl získán interval spolehlivosti získané regresní křivky.



Grafy 3.1:

**A. Stav prašníků *A. arenosa* bez působení rosy.** Jednotlivé sloupce reprezentují prašníky květů, které byly paralelně kontrolovány ve chvíli, kdy byla u rosených prašníků ukončena aplikace vody. V 10:00 a 11:00 bylo jen minimální množství prašníků, které nedosáhly stádia tři. Od 11:00 byly všechny prašníky zcela otevřeny, proto nebylo pozdější sledování prováděno. **B. Stav prašníků *A. arenosa* v momentu ukončení ošetření vodou (rosení).** Každý sloupec reprezentuje jednotlivé části experimentů, při kterých bylo ukončováno rosení v 10:00, 11:00 atd. Z dat vyplývá, že k finální fázi dehiscence nedochází v případě, že je prašník vystaven působení rosy. Převážně v pozdních hodinách (od 16:00 do 20:00) však začalo docházet ke zvětšování otvoru v oblasti stomia, prašníky se nacházely i ve stádiu dva). Od 14:00 dále však grafy vychází z menšího množství dat než v přechodných hodinách, cílem bylo určit, zda je vůbec možné odložit finální fázi dehiscence až do pozdních večerních hodin. Výrazný rozdíl však především mezi grafem A a B, je jasně patrné, jak mocně dokáže aplikace vody ovlivnit proces dehiscence prašníků, ale nemusí bránit jejich otevření v oblasti stomia.

Popis grafu: osa x – čas [hodiny], v případě grafu B značí dobu, kdy bylo ukončeno rosení (začátek již v 5:00, v grafu nezahrnuto). Osa y – podíl jednotlivých stádií otevírání prašníků na celkovém množství [%]. Legenda barevného rozlišení stádií v pravém dolním rohu [0 – zavřeno, 1 – prašník s drobnými otvory na apexu, 2 – otevřené prašníky s jasně patrnými pylovými zrny, 3 – prašník plně otevřen, adaxiální strana se prohýbá, pyl vytlačován ven].



Grafy 3.2:

A, C, E, G. **Vliv rosy na průběh dehiscence prašníků *A. arenosa*** při ukončení aplikace vody v 10:00, 11:00, ve 12:00 a 13:00. V průběhu rosení docházelo k pozvolnému otevírání prašníků, avšak pouze do stádia jenda. Po ukončení rosení došlo v průběhu jedné hodiny k rychlé finalizaci celého procesu dehiscence. Dehiscence prašníků kontrolních květů vykazovala ve všech případech stejný trend, většina prašníků byla v 10:00 hodin plně otevřená.

Popis grafu: modré křivky – prašníky/květy vystavené působení rosy, šedé křivky – prašníky kontrolních květů/prašníků. Světle modrá pole demonstrují dobu, kdy probíhala simulace rosy (začátek již v 5:00, v grafu nezahrnuto). Osa x – čas [hodiny]. Osa y – stádia otevírání prašníků [0 – zavřeno, 1 – prašík s drobnými otvory na apexu, 2 – otevřené prašníky s jasně patrnými pylovými zrny, 3 – prašík plně otevřen, adaxiální strana se prohýbá, pyl vytlačován ven].

B, D, F, H. **Vliv rosy na otevírání květů *A. arenosa*** při ukončení aplikace vody v 10:00, 11:00, ve 12:00 a 13:00. Modré a šedé křivky se překrývají, mezi otevíráním rosených a kontrolních květů nebyl zaznamenán výrazný rozdíl.

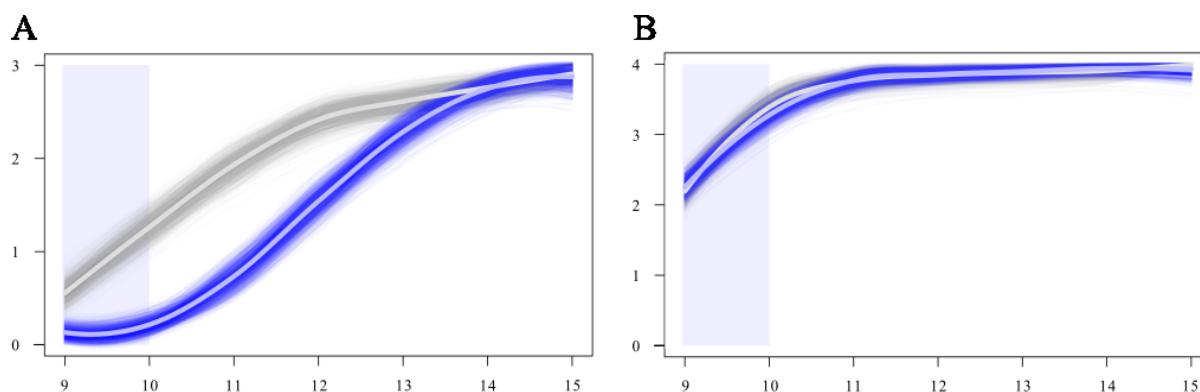
Popis grafu: osa y grafu B – stádia otevírání květu [0 – zavřený květ, 1 – korunní lístky rovnoběžně s kališními, 2 – korunní lístky svírají úhel cca 45°, 3 – korunní lístky svírají úhel přibližně 90°, 4 – květ plně otevřen].

### 3.2.4 Simulace deště rovněž vede k odložení závěrečné fáze dehiscence prašníků *A. arenosa*, otevření květů taktéž není ovlivněno

Působením vody ve formě, která napodobující efekt deště, lze taktéž ovlivnit průběh otevírání prašníků *A. arenosa*. Na rozdíl od prašníků vystavených působení rosy (grafy 3.2), se ale prašníky ve většině případů začínaly otevírat až po ukončení aplikace vody (graf 3.3 A), tzn. po dobu kropení zůstávaly ve stádiu nula. K otevírání prašníků začalo docházet převážně až tehdy, když došlo k odpaření vody z květů. Květy totiž byly většinou plné vody, na rozdíl od těch, které byly pouze rosené. Naopak na samotné otevírání květů nemá simulace deště tak jako rosa žádný vliv. Na grafu 3.3 B je zcela jasně vidět, že průběh otevírání květů je shodný u květů vystavených vodě, tak u květů kontrolních, které byly před působením vody chráněny.

Vzhledem k tomu, že experimenty simulující dešť a rosu byly uskutečněny v prvním případě v zimních/jarních měsících, ve druhém v jarních/letních měsících, může být příčinou pozvolnějšího otevírání prašníků (a to i kontrolních ke kropeným) v porovnání prašníky rosených květů (grafy 3.2) i nižší teplota, která průběh dehiscence rovněž ovlivňuje. Realizace experimentů v odlišnou dobu byla způsobena nedostatkem kvetoucích rostlin v roce 2019, který byl zapříčiněn poruchou kultivačního boxu a posléze i kultivační místnosti. S ohledem na delší vegetační období než například v porovnání s *A. thaliana* je to zároveň i důvodem toho, proč je dat získaných z experimentů z kropení méně než u rosení a nemohlo tedy dojít k jejich detailnější analýze jako v případě rosení (např. grafy 3.1).

Údaje v grafech se zakládají na datech nashromážděných pozorováním 83 květů vystavených umělému dešti a 72 květů kontrolních, které působení vody nebyly vystaveny. Stav každého prašníků a květů byl zaznamenán 7x.



Grafy 3.3:

**A. Vliv umělého deště na dehiscenci prašníků *A. arenosa*.** Modrá křivka reprezentuje stav prašníků těch květů, které byly vystaveny působení simulovaného deště, šedá křivka znázorňuje stav prašníků květů ponechaných jako kontrola volně na vzduchu. Je patrné, že u prašníků, na které působila voda, začalo docházet k otevírání prašníků až tehdy, když byla ukončena simulace deště, ač konečné fáze dosáhly ve stejnou dobu, jako prašníky kontrolní.

Popis grafu: modré křivky – prašníky/květy vystavené působení umělého deště, šedé křivky – prašníky kontrolních květů/prašníků. Světle modrá pole demonstrují dobu, kdy probíhala simulace deště (začátek již v 5:00, v grafu nezahrnuto). Osa x – čas [hodiny]. Osa y – stádia otevírání prašníků [0 – zavřeno, 1 – prašník s drobnými otvory na apexu, 2 – otevřené prašníky s jasně patrnými pylovými zrny, 3 – prašník plně otevřen, adaxiální strana se prohýbá, pyl vytlačován ven].

**B. Vliv simulovaného deště na otevírání prašníků *A. arenosa*.** Šedé a modré křivky se kopírují. Nebyl pozorován žádný rozdíl v otevírání mezi květy vystavených umělému dešti a květy, které byly jako kontroly ponechány volně na vzduchu. Popis grafu: osa y – stádia otevírání květu [0 – zavřený květ, 1 – korunní lístky rovnoběžně s kališními, 2 – korunní lístky svírají úhel cca 45°, 3 – korunní lístky svírají úhel přibližně 90°, 4 – květ plně otevřen].



### 3.2.5 Vliv rosení na finální fázi dehiscence je možné pozorovat i na anatomické úrovni prašníků *A. arenosa*

Vystavení prašníků *A. arenosa* vodě v podobě rosy oddaluje dehiscenci, odlišnosti oproti kontrolním, tzn. suchým, prašníkům byly zaznamenány i na úrovni jejich anatomické stavby, která byla zkoumána na jejich příčných řezech.

Před samotným zdůvodněním, na základě kterého byl tento závěr formulován, je však nutné zmínit i několik artefaktů, které při přípravě preparátů vznikly a které je při pohledu na výsledné snímky vzít v úvahu. Již bylo zmíněno, že působení rosy nebrání vytvoření drobného otvoru v prašném váčku, přesněji v oblasti stomia (kapitola 3.2.3). Rosené prašníky byly v době odběru ve fázi otevírání nula či jedna (obrázek 3.4). Naproti tomu nerosené prašníky nebyly ani v jednom případě odebrány zavřené. V 8:00 a 10:00 byly odebírány buď ve stádiu dvě či tři. Ve 12:00 a 14:00 byly již pouze ve stádiu tři, oproti stavu prašníků v dopoledních hodinách navíc bylo (pomocí stereomikroskopu či lupy) možné zaznamenat ještě výraznější prohnutí abaxiální strany prašníků, nejspíše jako výsledek postupující dehydratace.

Prašníky byly bez použití fixáže přímo zalévány do agarózy a v řádu jednotek minut byly na vibratomu vytvořeny řezy. První artefakt vznikl právě při použití vibratomu, který v případě zcela zavřených prašníků ve většině případů narušil oblast stomia, kde došlo k tvorbě drobného otvoru. Protože však otevření stomia pro dokončení celého procesu dehiscence nepostačuje, neboť ta spočívá v dehydrataci pletiva, prašníky se proto více neotevřely. Druhým artefaktem byla rehydratace pletiv kontrolních prašníků umístěných do agarózy. U těchto prašníků před izolací z květu již začala probíhat jejich dehydratace. Po vložení prašníků do agarózy tak docházelo k opětovnému nabytí, alespoň částečně, původního tvaru.

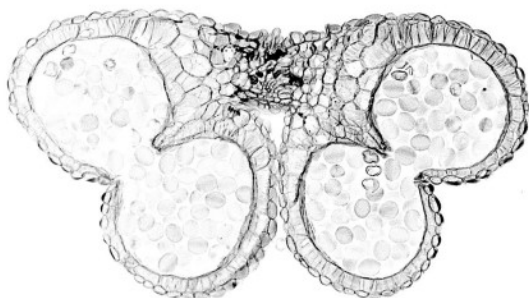
Při zvážení všech artefaktů, které při přípravě preparátů pro mikroskopování vznikly, však při prozkoumání pořízených snímků lze dojít závěru, že vystavení prašníků působení rosy ovlivňuje jejich anatomickou stavbu. Při srovnání rosených a nerosených prašníků je jasně patrné, že u rosených (obrázky 3.8 A, C, E, G) fáze dehiscence, totiž dehydratace pletiva, ještě ani nezačala. Tyto prašníky si stále zachovávají svůj tvar, i v případě, že oblast stomia byla narušena. Prašníky mají na průřezu tvar, který se občas označuje jako „motýlí křídla“. Naproti tomu u prašníků nerosených toto nalézt nejde. Stěny prašných váčků pravidelný tvar nemají (obrázky 3.8 B, D, F, H) a jsou různými způsoby zprohýbané (především obrázek 3.8 H, kde byla míra dehydratace pletiva prašníků v době odběru pravděpodobně nejvyšší).

Přes všechny uvedené nedostatky má však zvolený způsob získávání snímků příčných řezů prašníků jistou výhodu. Ta spočívá ve velmi krátkém čase, který uběhne od izolace prašníků po zahájení snímání na konfokálním mikroskopu. Tato metoda má proto pro budoucí účely studia průběhu dehiscence prašníků potenciál při sledování distribuce fluorescenčně značených proteinů, a to právě z toho důvodu, že nebyla použita žádná fixáž. V případě, že nebude potřeba preparát barvit, doba od odebrání prašníků po zahájení pozorování může být i méně než deset minut.

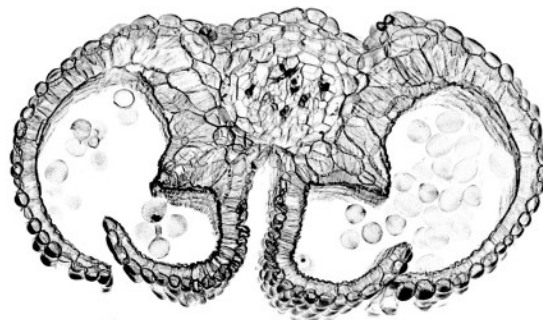
Obrázek 3.8: Příčné řezy prašníky *A. arenosa*. (strana 50)

Snímky vlevo zobrazují stavbu prašníků v 8:00, 10:00, 12:00 a 14:00, kdy byly vystaveny působení rosy. Snímky vpravo pak zobrazují prašníky kontrolních rostlin v tytéž hodiny. Zatímco prašníky, které byly ve vlhkém prostředí, si po celou dobu zachovávají svůj tvar (A, C, E, G), a i přes otevřené stomium (C, E, G) se více neotevřají, prašníky vpravo (B, D, F, H) se v průběhu sledování otevřely a došlo ke změně jejich stavby. Prašníky byly zalaty do agarózy, nařezány na 30  $\mu\text{m}$  řezy na vibratomu, nabarveny CW a snímány na konfokálním mikroskopu Leica TSC SP2.  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 405 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 410\text{--}499 \text{ nm}$ , objektiv HC PL APO Ibd.BL 20x/0.7 IMM CORR s použitím vodní imerze. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ .

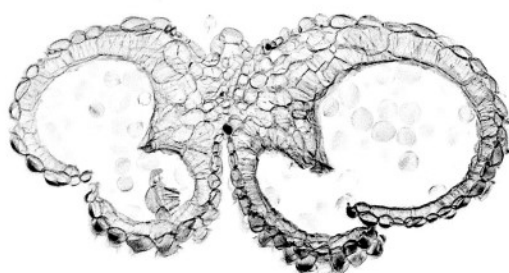
8:00  
A.



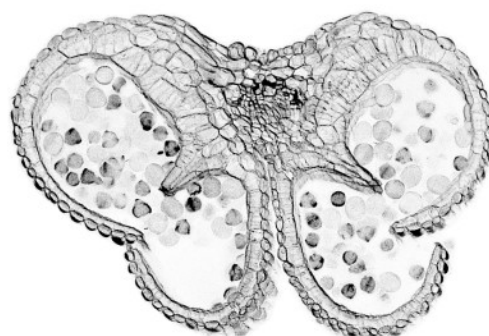
B.



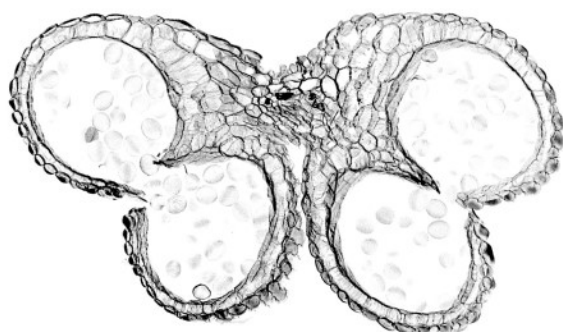
10:00  
C.



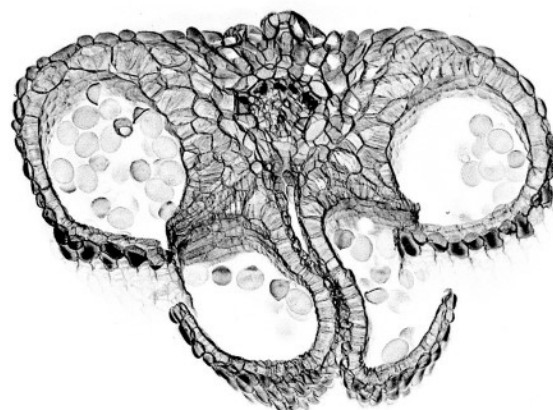
D.



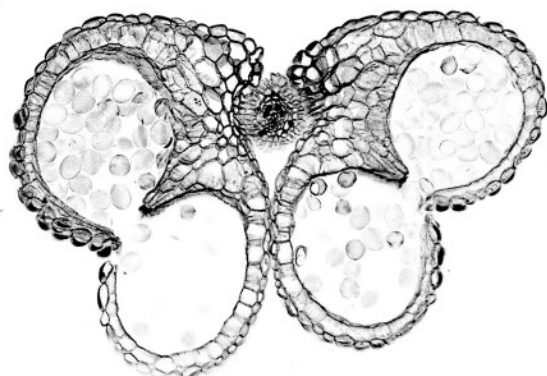
12:00  
E.



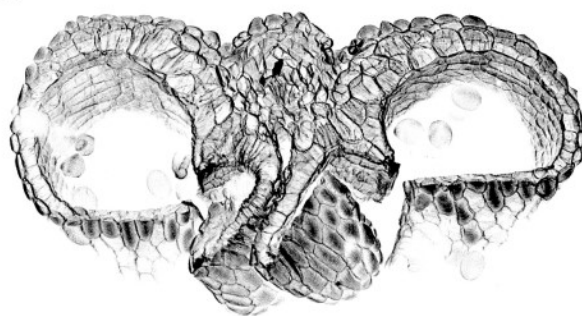
F.



14:00  
G.



H.



Obrázek 3.8: Příčné řezy prašníky *A. arenosa*. (popis na straně 49)

### 3.3 Role vodného a nevodného prostředí na dehiscenci prašníků *A. arenosa*

#### 3.3.1 Vodné prostředí a PFD vedou k pozastavení procesu dehiscence

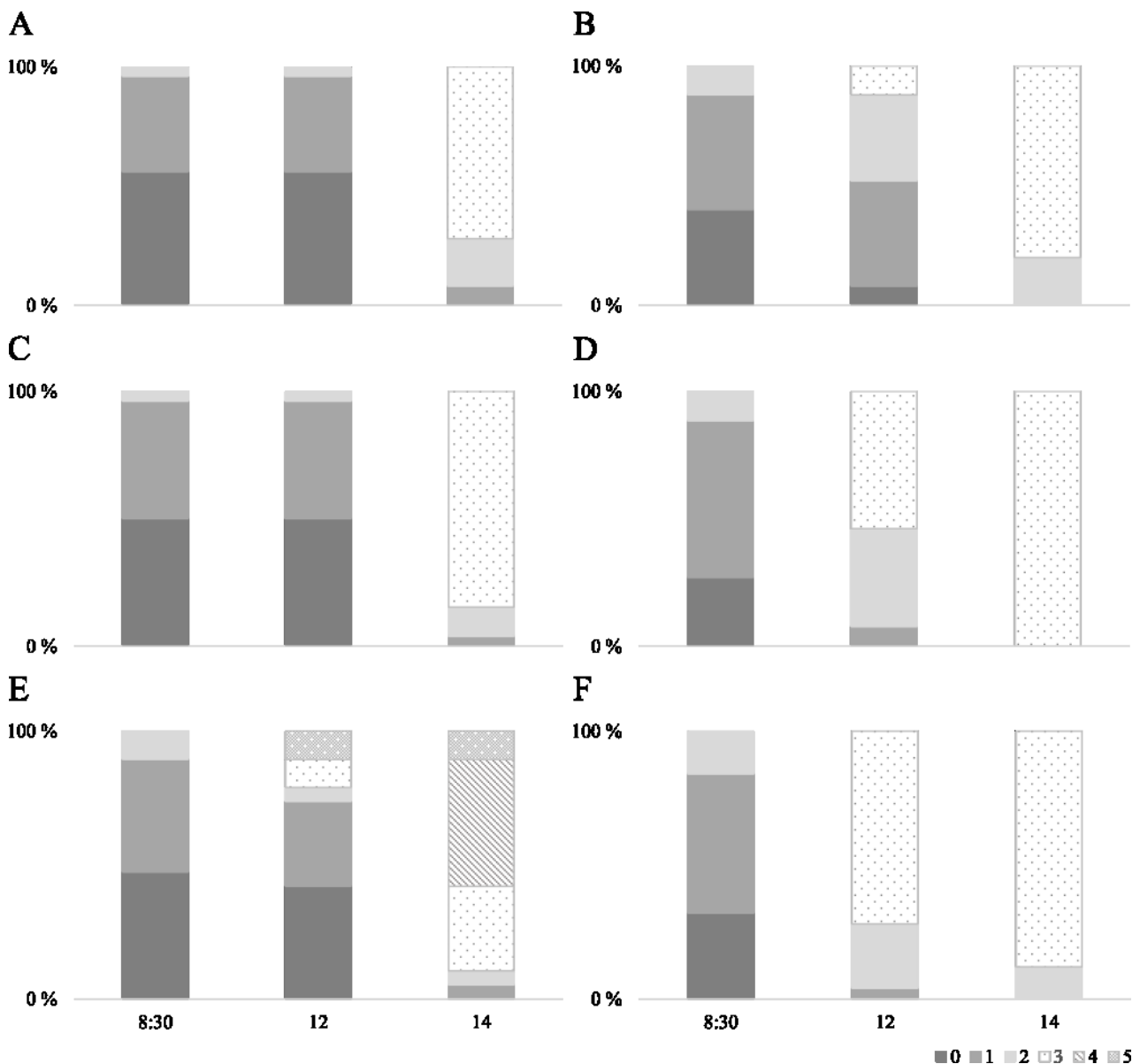
Vystavení prašníků *A. arenosa* několikahodinovému působení vody a PFD brání postupu v procesu dehiscence. Testována byla kapalina PFD, která představovala netoxické a nevodné prostředí (kapitola 2.4), voda a roztok smáčedla. Roztok smáčedla byl zvolen z toho důvodu, že byla snaha nalézt takové prostředí, které by umožňovalo snadnou penetraci například barviv a inhibitorů (kapitola 3.6) do pletiva prašníku.

Podobně jako v případě, kdy byly při simulaci deště květy plné vody, tak i v případě, že byl květ ponořen do PFD, vody či roztoku smáčedla, se prašníky ani v těchto prostředích neotevíraly (grafy 3.4 A, C, E): nedocházelo k výraznému postupu v procesu ani mezi stádii nula až dva, především však prašníky nedosahovaly konečného stádia tři (graf 3.3 A). Prašník byl zpravidla z mikroskopu vyňat v takovém stádiu, v jakém do něj byl vložen. Umístění květů do roztoku smáčedla po dobu několika hodin mělo v některých případech letální následky (graf 3.4 E, stádium pět). Množství smáčedla se vzhledem k době, jakou byly stonky s květy v kapalině, ukázalo jako příliš vysoké, vzhledem k tomu, že docházelo k jejich trvalému poškození. Množství smáčedla bylo proto posléze sníženo z 0,05 % na 0,025 %. Přibližně polovina prašníků po vyjmutí z mikroskopu s roztokem smáčedla nepůsobila nijak poškozeně. Avšak po dvou hodinách tyto prašníky, kdy byly již volně na vzduchu, zcela seschly (graf 3.4 E, stádium čtyři).

Na stěnách celistvých mikroskopů docházelo během dopoledne k vysrážení vody v podobě drobných kapek. V tomto prostředí většina prašníků nedosahovala konečného stádia tři, nicméně docházelo k tvorbě puklin a větších otvorů v prašných váčcích, tj. prašníky se při vyjmutí květů z mikroskopů nacházely buď ve stádiu jedna či dva (graf 3.4 B). Naproti tomu většina prašníků květů, které se nacházely v mikroskopu s otvory či volně na vzduchu, byly ve stádiu dva a tři (tj. již se nacházely v končené fázi dehiscence, grafy 3.4 F a D). Je možné konstatovat, že v mikroskopu s otvory byla nižší vlhkost vzduchu než v mikroskopu bez otvorů.

Otevírání květů (data neuvedena) v PFD nijak omezeno nebylo, květy se ze stádia jedna (dle obrázku 3.3) v PFD dostaly až do stádia čtyři. Totéž platilo i pro všechny květy kontrol. Voda otevření květu zpravidla bránila, jakmile z ní však byl květ vyjmut, ihned se rozevřel a korunní lístky byly v postavení jako ve stádiu čtyři. Květy v roztoku smáčedla bylo po vyjmutí z mikroskopu nutno mechanicky rozdělit, jelikož k sobě byly vlivem smáčedla „slepené“. Ihned poté však korunní lístky taktéž zaujaly pozici stádia čtyři.

Data byla získána na základě testování následujícího počtu květů pro jednotlivá prostředí: 25 květů v destilované vodě, 26 květů v PFD, 19 v roztoku smáčedla, 25 květů v celistvých mikroskopu, 26 květů v mikroskopu s otvory a 25 květů ponechaných volně na vzduchu.



Grafy 3.4:

A. Stav prašníků z květů *A. arenosa* umístěných v PFD. Nevodné prostředí neumožňuje prašníkům pokračovat v procesu dehiscence. Do dvou hodin od vyjmutí z PFD však většina prašníků dosahuje konečného stádia.

B. Stav prašníků z květů *A. arenosa* umístěných v celistvé mikrozkumavce. Docházelo ke vzniku kapek vody na povrchu mikrozkumavky. Průběh dehiscence není zablokován, pouze zpomalen.

C. Stav prašníků z květů *A. arenosa* umístěných ve vodě. Vodné prostředí zabraňuje prašníkům v otevření či v pokračování procesu dehiscence. Do dvou hodin od opuštění vodného prostředí se však většina prašníků nachází ve finální fázi dehiscence.

D. Stav prašníků z květů *A. arenosa* umístěných v mikrozkumavce s otvory. Dehiscence prašníků není v tomto prostředí nijak výrazně omezena.

E. Stav prašníků z květů *A. arenosa* umístěných v roztoku smáčedla. Proces dehiscence je u většiny prašníků nejprve zastaven, u více než poloviny však do dvou hodin po vyjmutí z mikrozkumavky dochází ke svaštění a seschnutí pletiva. U části prašníků je aplikace roztoku smáčedla i přímo letální.

F. Stav kontrolních prašníků z květů *A. arenosa* ponechaných volně na vzduchu. Dehiscence probíhá bez jakéhokoli omezení zcela normálním způsobem.

Popis grafu: osa x – čas [hodiny], 8:30 – doba umístění květů se sledovanými prašníky do mikrozkumavek, 12:00 – vyjmutí z mikrozkumavek, 14:00 – dvě hodiny po vyjmutí květů z mikrozkumavek. Osa y – podíl jednotlivých stádií otevírání prašníků na celkovém množství [%]. Legenda barevného rozlišení stádií v pravém dolním rohu [0 – zavřeno, 1 – prašík s drobnými otvory na apexu, 2 – otevřené prašíky s jasně patrnými pylovými zrny, 3 – prašík plně otevřen, adaxiální strana se prohýbá, pyl vytlačován ven, 4 – prašík seschlý a svaštělý; 5 – roztok smáčedla způsobil odumření celého květu včetně sledovaných prašníků].

### 3.4 Transformace *A. arenosa* pomocí *A. tumefaciens* prozatím bez výsledku

#### 3.4.1 *A. arenosa* má velmi nízký regenerační potenciál

Jedním z cílů této diplomové práce bylo vytvořit stabilního transformanta rostliny *A. arenosa*, který by mohl sloužit ke sledování exprese fluorescenčně značeného proteinu. Za tímto účelem byla vybrána metoda transformace pomocí *A. tumefaciens* skrze kořenové segmenty (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007)

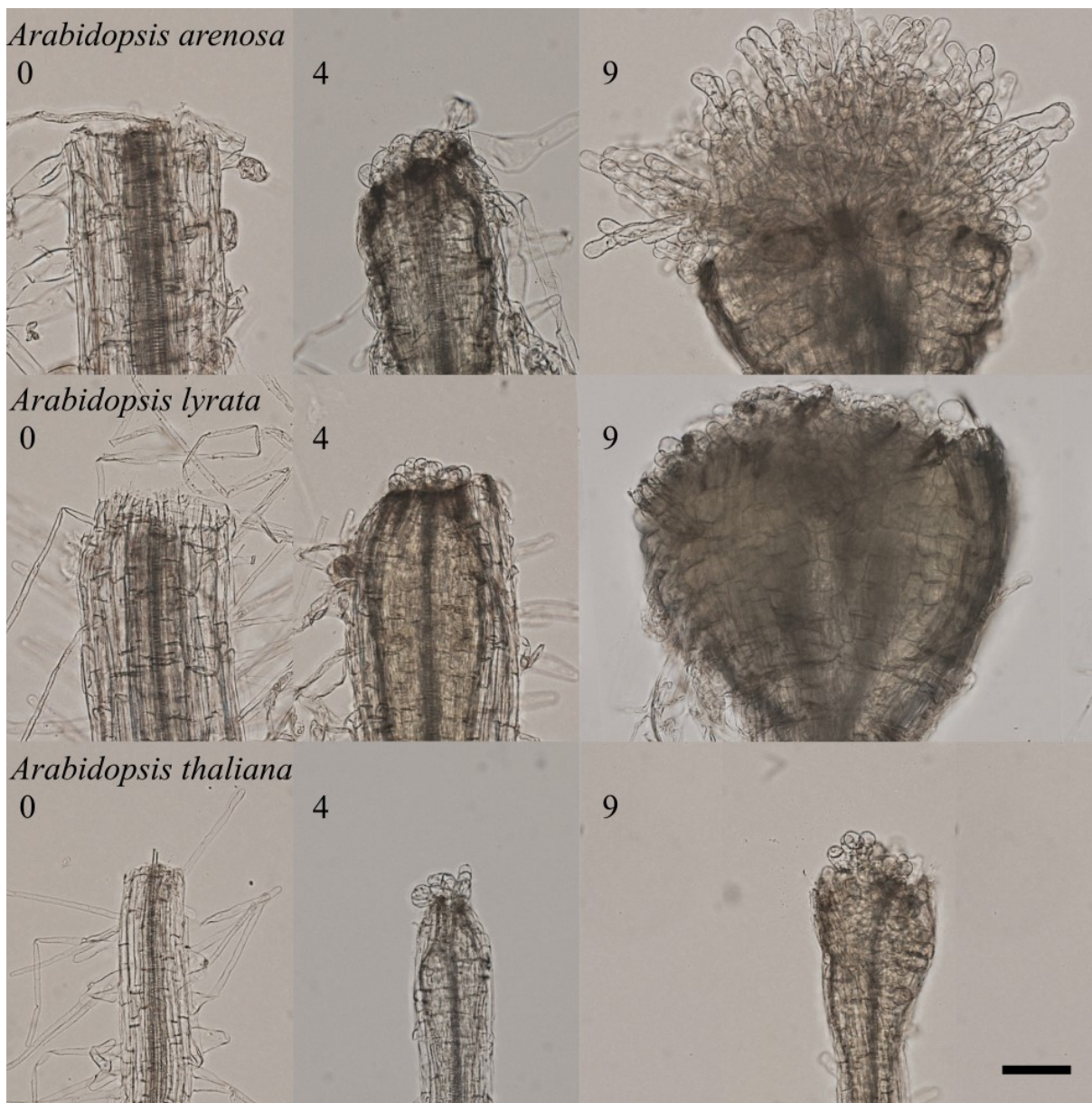
V průběhu realizace experimentů ale vyšlo najevo, že *A. arenosa* má poměrně malý potenciál zregenerovat z kořenových segmentů opět v celou rostlinu. To i v případě, pokud se jednalo o kontrolní segmenty, u kterých nedošlo ke kokultivaci s *A. tumefaciens*. Za celou dobu se nepodařilo zregenerovat transformovanou ani netransformovanou rostlinu. Mimo regenerace z kořenových segmentů byl stejný postup vyzkoušen i s listy, výsledek byl však ještě méně uspokojivý než u kořenových segmentů. Kořenové segmenty *A. arenosa* byly dále rovněž kultivovány na médiu s vyšším obsahem cytokininů, než jak uvádí původní protokol (jednalo se o 2x a 5x vyšší koncentraci 2iP, viz kapitola 2.3.5). Ani tato modifikace však nevedla k navození regenerace prýtu. Stejně slabý regenerační potenciál se ukázal i u kořenových segmentů *A. thaliana*.

Pozoruhodně velký rozdíl ve schopnosti regenerovat byl v porovnání s *A. arenosa* a *A. thaliana* zjištěn u *A. lyrata* (ekotyp Island a Point Pelée). Jedná se o druh, pro který je transformační protokol (kapitola 2.3) přímo určený. Na rozdíl od *A. arenosa* bylo u *A. lyrata* možné zregenerovat celou rostlinu jak z kořenových segmentů, tak z listů (platí pro ekotyp Isl. i PP). K alespoň částečné regeneraci prýtu pak docházelo i u segmentů kokultivovaných s *A. tumefaciens*. Na úrovni kalogeneze na kořenových segmentech nebylo zpočátku možné zaznamenat jakýkoli rozdíl mezi *A. arenosa*, *A. lyrata* a *A. thaliana* po prvních čtyřech dnech kultivace na CIM, po dalších pěti dnech však *A. arenosa* a *A. lyrata* co do velikosti i počtu nových buněk vykazovaly značné rozdíly v porovnání s *A. thaliana* (obrázek 3.9).

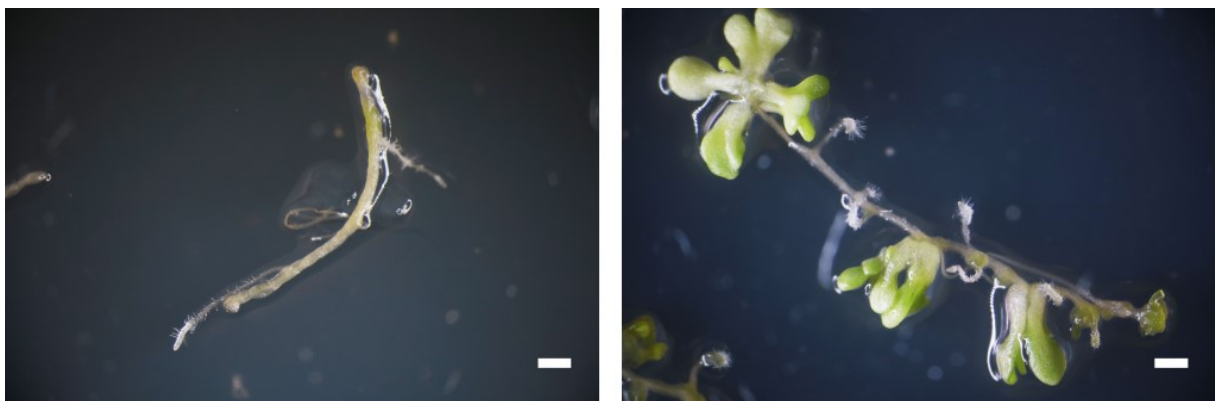
Největší rozdíl mezi uvedenými druhy však bylo možné zaznamenat po přesunu z CIM na SIM. Na kořenových segmentech *A. lyrata* již po sedmi dnech na CIM a alespoň sedmi dnech na SIM docházelo k tvorbě drobných lístků o velikosti přibližně 3 mm (obrázek 3.10).

Zatímco kořenové segmenty *A. arenosa* a *A. thaliana* po čtyřech týdnech dosáhly pouze toho, že získaly v některých částech díky chlorofylu zelenou barvu, *A. lyrata* (Isl. i PP) již měla za stejnou dobu zpravidla do deseti lístků o velikosti do 1 cm, nejčastěji 7–8 mm (obrázek 3.11). Po třech týdnech od přesunu ze SIM na *Ara* MIN médium bylo možné přesunout rostliny – už i s vytvořenými kořeny – z *in vitro* do *ex vitro* podmínek (viz obrázek 3.12).

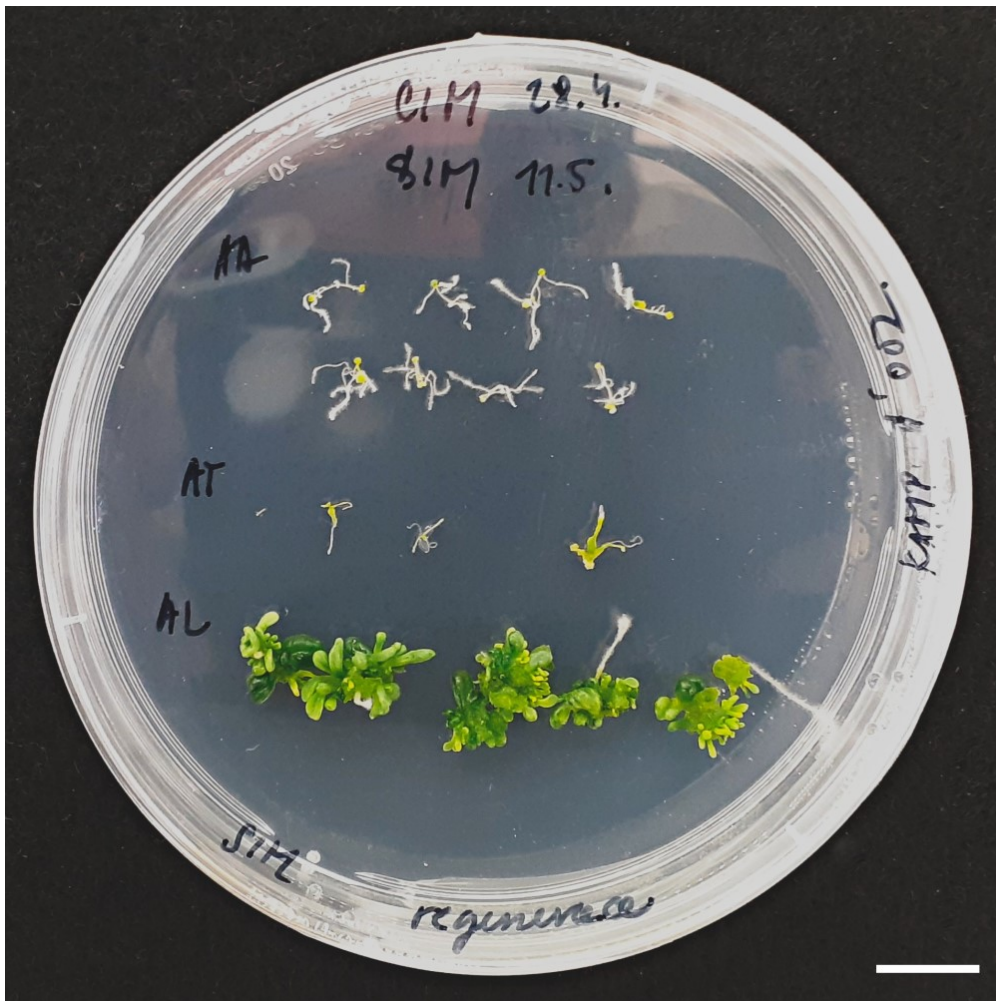
V poslední fázi *in vitro* kultivace bylo původně používané RIM, připravované podle protokolu Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007, nahrazeno právě *Ara* MIN médiem. RIM se ukázalo jako nevyhovující, bylo příliš řídké a olistěné segmenty se do média celé zanořovaly. Oproti protokolu byl použit jiný typ agaru (běžně užívaný v naší laboratoři). Médium bylo zahuštěno přidáním 2,5 g agaru navíc k předepsaným 3 g agaru na 1 l média. Ani tato modifikace však nebyla dostatečná, výsledky mnoha opakování tohoto experimentu nakonec vedly k plnému nahrazení RIM *Ara* MIN médiem.



Obrázek 3.9: Kontrolní kořenové segmenty *A. arenosa*, *A. lyrata* a *A. thaliana* před kultivací na CIM [0], po čtyřech dnech kultivace na CIM [4] a devět dní po kultivaci na CIM [9]. Již po čtyřech dnech došlo k vytvoření kalusu, jehož množství se po dalších pěti dnech ještě zvýšilo. V případě *A. arenosa* a *A. lyrata* je po devíti dnech v porovnání s *A. thaliana* patrný rozdíl v intenzitě tvorby kalusu. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ .



Obrázek 3.10: Kontrolní kořenové segmenty *A. arenosa* (vlevo) a *A. lyrata* (vpravo) deset dní po kultivaci na SIM. Měřítka 1 mm.



Obrázek 3.11: Kontrolní kořenové segmenty *A. arenosa* (AA), *A. thaliana* (AT) a *A. lyrata* (AL Isl.) čtyři týdny po zahájení procesu regenerace, která u *A. lyrata* probíhá výrazně rychleji než u ostatních dvou druhů. Měřítko 1 cm.



Obrázek 3.12: Rostliny *A. lyrata* (Isl.) po přesunu do *ex vitro* podmínek. Měřítko 1 cm.

V případě *A. arenosa* byla kalogeneze zcela bezproblémová, byl ale zjištěn značný problém s regenerací. *A. arenosa* nicméně nemá žádný problém s iniciací kvetení. Zato u dobře regenerující *A. lyrata*, která disponuje podobně velkými, snadno pozorovatelnými prašníky jako *A. arenosa*, vyvstal u islandského ekotypu problém s indukcí kvetení. Krátkodobá ani dlouhodobá vernalizace při 4 °C, ani extrémní změna světelného režimu (20 hod světlo a 4 hod tma – simulace dlouhého islandského dne) nevedly k indukci kvetení. Po téměř třech měsících vykvetla pouze jediná rostlina (obrázek 3.13), proto nebylo možné uskutečnit experimenty s kropením a rosením i na tomto druhu, neboť pro nasbírání dostatečného množství dat by bylo potřeba více rostlin. Rovněž v případě ekotypu PP se první květy objevily až po více než dvou měsících, rovněž pouze u jedné z několika rostlin.



Obrázek 3.13: *A. lyrata* (Isl.) zregenerovaná z kořenového segmentu před (vlevo) a po (vpravo) vykvetení. Měřítko 1 cm.

Druh *A. lyrata* se ukázal v mnoha ohledech jako více vyhovující než původně vybraný druh *A. arenosa* (osekvenovaný genom, větší potenciál při regeneraci a transformaci, viz dále). Zmíněný problém v otázce kvetení byl však doprovázen další nepříjemnou komplikací, a to velmi nízkou klíčivostí semen, často ani ne 5 % (semena byla nejspíše sklizena nezralá, nebyla možnost vyzkoušet prokazatelně kvalitní semena). Při sterilním výsevu na plotny s médiem byla vyzkoušena třítýdenní, při nesterilním až čtyřtýdenní stratifikace, vyšší klíčivosti semen však nebylo dosaženo. V případě *in vitro* výsevu se však s každým dalším týdnem stratifikace zvyšoval problém s kontaminací materiálu.

### 3.4.2 Vytvoření stabilního transformanta *A. arenosa* nebylo – na rozdíl od *A. lyrata* – úspěšné

Žádný z uskutečněných pokusů o transformaci kořenových segmentů *A. arenosa* pomocí *A. tumefaciens*, a následné regeneraci celé rostliny, nebyl úspěšný. Ač není důvod proč by transformace nebyla možná, k regeneraci listů z kořenových segmentů nedošlo ani v jednom případě. Transformace a regenerace uvedeným způsobem se nezdařila ani u *A. thaliana*. Naopak v případě *A. lyrata*, pro kterou je originální protokol určen, se transformace a částečná regenerace podařila (viz dále).

V tabulce 3.1 je možné shlédnout soupis všech uskutečněných pokusů. V přehledu je uveden použitý rostlinný materiál a jeho stáří, stejně tak doba kultivace kořenových segmentů



Číslo pokusu	Materiál	Stáří rostlin	Doba na CIM	Konstrukty	OD <sub>600</sub> bakteriální suspenze
1	AA	61	3	PRX	PRX 0,15
2	AA	6	3	PRX	PRX 0,72
3	AA T1, AAT2, AL Isl., AT	7	3	DREPP2, PRX	DREPP2 1,42; PRX 1,30
4	AA, AA T1, AA T2, AL Isl., AT	35	10	DREPP2, PRX	DREPP2 0,32; PRX 0,22
5	AA, AA F, AC	21	4	DREPP2, PRX	DREPP2 0,21, PRX 0,38
6	AA, AA F, AC, AL Isl.	28; 69 (Al Isl.)	4	DREPP2, PRX	DREPP2 0,22; PRX 0,17
7	AA, AC, AL Isl., AL PP	11	4	DREPP2, PRX	DREPP2 0,18; PRX 0,18
8	AA, AL Isl.	4; 38	11	DREPP2, PRX	DREPP2 0,18; PRX 0,18
9	AA, AA F, AC, AL PP, AT	10	4	DREPP2, PRX	DREPP2 0,31; PRX 0,54
10	AL Isl., AL PP	38, 83 (AL Isl.); 24 (AL PP)	4	DREPP2, PRX, VGE	DREPP2 0,18; PRX 0,18; VGE 0,21
11	AA, AL Isl., AT	21; 28; 21	9	DREPP2	DREPP2 0,21
12	AA, AL Isl., AT	42; 49; 42	9	DREPP2	DREPP2 0,19

Tabulka 3.1: Přehled všech transformačních experimentů. V případě pokusu č. 3 a 4, 5 a 6 se jednalo o rostliny z téhož výsevu, AL Isl. z pokusu 3 a 6 byly rovněž z jednoho výsevu, stejně jako rostliny v experimentu 8 a 9 (AA), 11 a 12.

Legenda: AA – *A. arenosa* z Jizerských hor, AA F – *A. arenosa* z Faragasu (tetraploid), AA T1 – *A. arenosa* z Tater (alpínský ekotyp, diploid), AA T2 – *A. arenosa* z Tater (ekotyp z úpatí, diploid), AC – *A. croatica* z Velebitu, AL Isl. – *A. lyrata* z Islandu, AL PP – *A. lyrata* z Point Pelée, AT – *A. thaliana* Col. Stáří rostliny, doba na CIM [dny]. Konstrukty: PRX (35S::PRX-mCherry), DREPP2 (35S::DREPP2-GFP), VGE (VGE-iGFP). OD<sub>600</sub> – optická denzita bakteriální suspenze.

na CIM před kokultivací s *A. tumefaciens*. Dále je v přehledu uvedeno, jakých konstruktů bylo použito a jaká byla OD jednotlivých bakteriálních suspenzí.

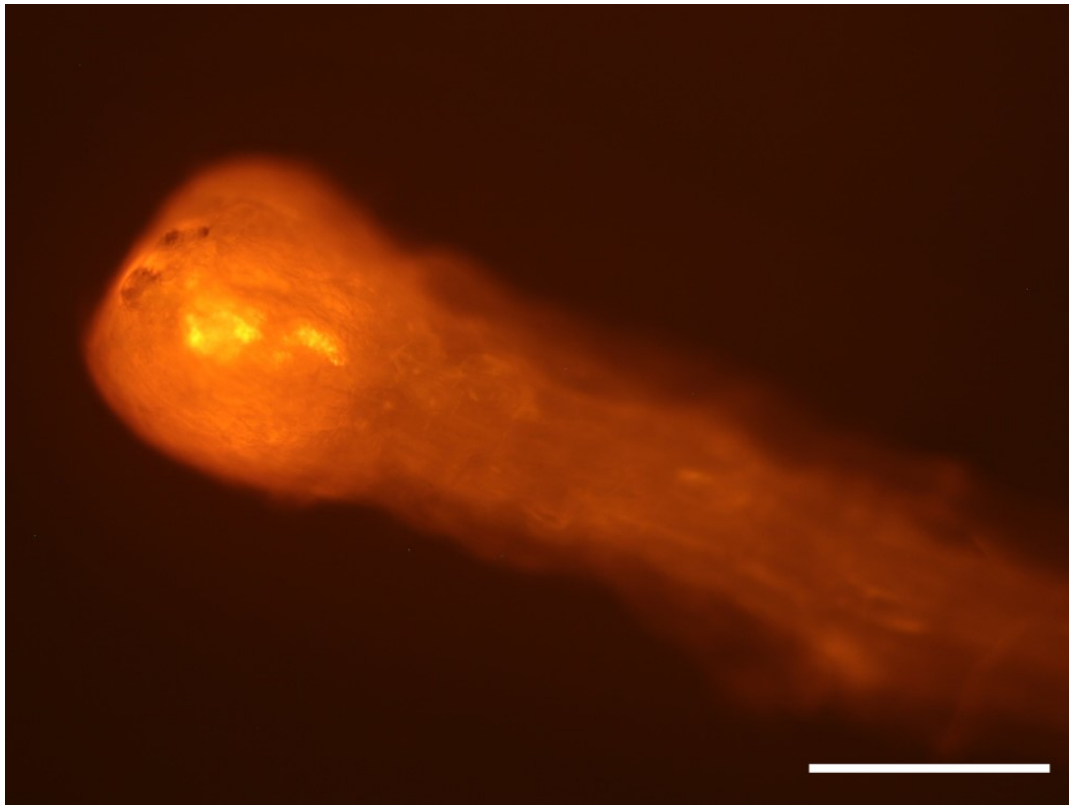
Pro transformaci bylo použito široké spektrum rostlinného materiálu (podrobný popis viz legenda tabulky 3.1). Z tohoto důvodu bylo poměrně obtížně docílit toho, aby byly pro každý daný experiment všechny rostliny stejně staré a stejně velké. Semena klíčila postupně, růst jednotlivých druhů nebyl stejně rychlý. Ne všechna semena vždy vyklíčila, rostlinného materiálu i přes velké výsevy občas nebyl dostatek. Například semena *A. lyrata* (Isl.) z jednoho výsevu klíčila velmi nepravidelně, pozvolna. Na jedné plotně proto občas bývaly jak několikadenní semenáčky, tak i několikátýdenní. Z tohoto důvodu je stáří použitého rostlinného materiálu poměrně pestré. Při pokusech byly několikrát (viz legenda tabulky 3.1) použity rostliny z jednoho výsevu s časovým rozestupem. Vliv stáří rostlin na úspěšnost transformace nicméně nebyla zaznamenána.

Rovněž rozpětí OD bakteriální suspenze je především v první polovině pokusů, kdy probíhala postupná optimalizace transformačního protokolu, značně široké. Množství bakterií nebylo po 24 hodinách kultivace vždy stejné. Z důvodu ušetření bakteriální kultury byla její OD měřena na velmi malém vzorku ředěném destilovanou vodou, což vedlo k nepřilíš přesným výsledkům měření. Od tohoto způsobu měření bylo později upuštěno, OD pak byla v tolerovatelné odchylce vůči vzorovému protokolu. Následují podrobnější popisy experimentů a jejich nejdůležitějších výsledků.

#### *Pokus 1 a 2*

První dva experimenty sloužily především k seznámení s metodou transformace a k osvojení práce ve sterilním prostředí laminárního flow boxu. V tomto případě bylo k transformaci *A. arenosa* využito konstruktů 35S::PRX-mCherry. Byl zvolen z toho důvodu, že se jednalo o – v naší laboratoři ozkoušený – dobře fungující konstrukt. V obou případech nebylo s *A. tumefaciens* kokultivováno více než 20 segmentů. Stav transformace byl proto hodnocen pouze pomocí fluorescenčního stereomikroskopu, který umožňoval ponechat segmenty ve sterilním prostředí. Zamezilo se tím tak ztrátě materiálu, kterou by montáž segmentu mezi podložní a krycí sklo za účelem mikroskopie představovala. Již po několika týdnech bylo antibiotikum Carb nahrazeno antibiotikem Tim. K oplachování narostlých bakterií bylo využito sterilních sítok připevněných na krátkých skleněných trubičkách. Tento způsob byl výhodný v tom, že s kořenovým segmentem bylo manipulováno pouze při umístění na sítko a při jeho přesunu na médium. Pinzetou bylo možné uchopit vrchní část skleněné trubičky, a pohybem nahoru a dolů v nádobce s tekutým SIM kořenové segmenty proplachovat.

Výsledkem těchto experimentů bylo zjištění, které již bylo diskutováno výše (kapitola 3.4.1), tedy že ani u kořenových segmentů, které nebyly kokultivovány s bakteriemi, nedochází k regeneraci listů a následně kořenů. Na úrovni tvorby kalusu nebyl zaznamenán žádný problém. U kokultivovaných kořenových segmentů bylo na řezných plochách, kde docházelo ke kalogenezi, možné zaznamenat silný signál (obrázek 3.14). Kontrola na konfokálním mikroskopu nebyla provedena. Přibližně po šesti týdnech od zahájení experimentu však signál přestával být patrný.

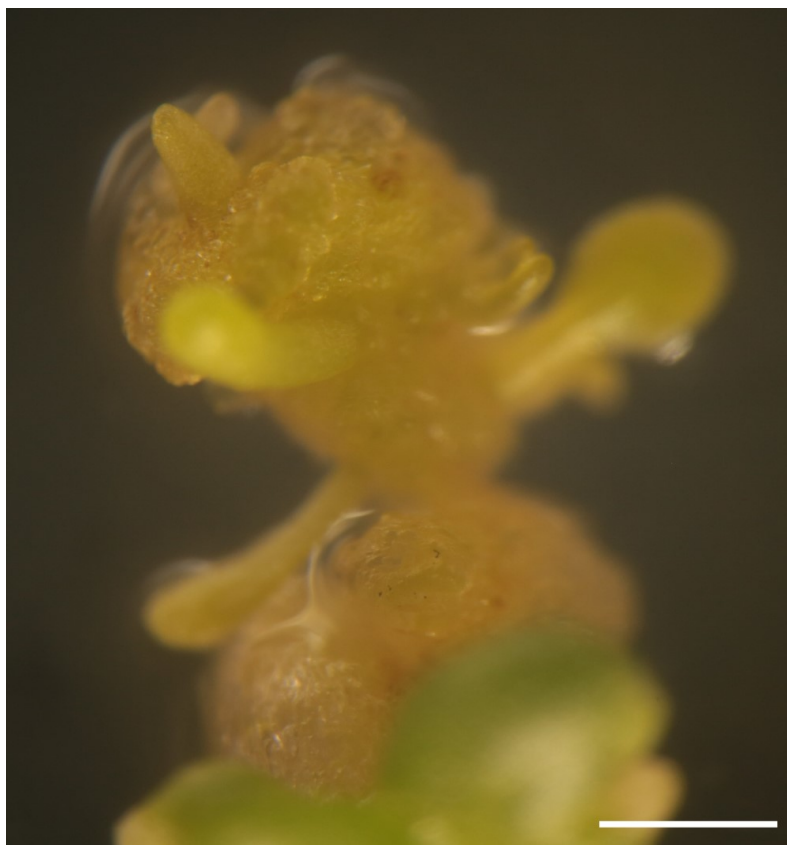


Obrázek 3.14: Kalus na kořenovém segmentu *A. arenosa* 18 dní od zahájení transformace pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::PRX-mCherry. Snímek pochází z fluorescenčního stereomikroskopu Olympus SZX7, jasné potvrzení o úspěšnosti transformace z konfokálního mikroskopu však chybí. Měřítko 250  $\mu\text{m}$ .

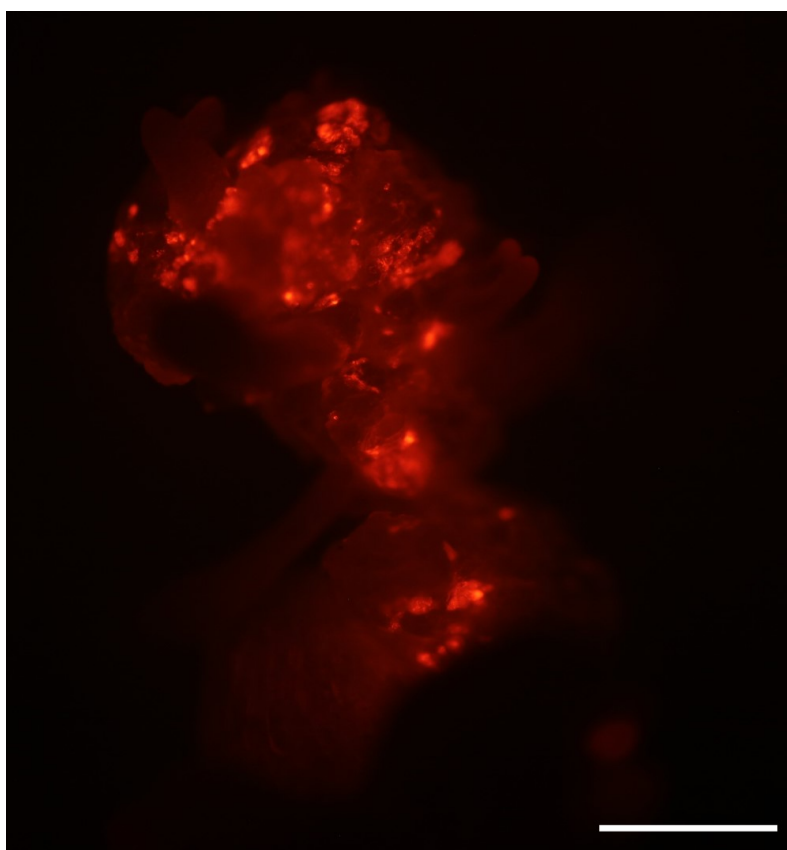
### Pokus 3

V rámci tohoto experimentu bylo po prvotním neúspěchu jak s transformací, tak s regenerací – byť jen u kontrolních segmentů, přistoupeno k využití dalších ekotypů *A. arenosa* (tabulka 3.1), dále i *A. thaliana*. Především byl ale do experimentu zařazen i druh *A. lyrata* (Isl.). Protokol, podle kterého se při transformaci postupovalo, byl právě pro tento druh určený. Mohl tedy posloužit jako kontrola, zda předchozí selhání s *A. arenosa* spočívalo v nedobré reprodukci protokolu. Kromě konstruktů 35S::PRX-mCherry začal být od tohoto experimentu dále využíván i osvědčený konstrukt 35S::DREPP2-GFP, se kterým měl bohaté zkušenosti vedoucí této diplomové práce. Při kultivaci však byla chybně využívána kombinace antibiotik Kan+Hyg namísto Tim+Hyg. Výsledkem tohoto omylu byla tvorba silných povlaků bakterií na kořenech kokultivovaných s *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::DREPP2-GFP.

Kořenový segment *A. lyrata* (Isl.) po čtyřech týdnech od kokultivace s *A. tumefaciens* s konstruktem 35S::PRX-mCherry – při srovnání s předchozími výsledky s *A. arenosa* – nabyl v původním místě řezné plochy značných rozměrů. Došlo k výrazné tvorbě nejen kalusu, ale dokonce i několika drobných listů (obrázek 3.15). Při kontrole na fluorescenčním stereomikroskopu však v listech signál patrný nebyl, bylo možné ho zaznamenat pouze v některých oblastech kalusu (obrázek 3.16). V případě různých ekotypů *A. arenosa* a ani v případě *A. thaliana* se vzhled a vývoj kořenových segmentů vystavených působení *A. tumefaciens* nelišily od výše uvedeného v pokusu 1. Z kontrolních kořenových segmentů *A. lyrata* bylo možné dopěstovat celé rostliny.



Obrázek 3.15: Kalus a drobné listy, které vyrostly z kořenového segmentu *A. lyrata* (Isl.) 28 dní od zahájení transformace pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::PRX-mCherry. Měřítka 1 mm.



Obrázek 3.16: Kalus a drobné listy, které vyrostly z kořenového segmentu *A. lyrata* (Isl.) 28 dní od zahájení transformace pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::PRX-mCherry. Snímek pochází z fluorescenčního stereomikroskopu Olympus SZX7, jasné potvrzení o úspěšnosti transformace z konfokálního mikroskopu ale chybí. Měřítka 1 mm.

#### Pokus 4

V rámci čtvrtého experimentu byla mimo kořenových segmentů vyzkoušena i transformace a následná kultivace listových segmentů *A. arenosa*. Žádný výrazný výsledek, ať co do transformace či co do regenerace, však nebyl zaznamenán.

Problémem tohoto experimentu byla rozsáhlá kontaminace, která znehodnotila většinu rostlinného materiálu. Jeden kořenový segment *A. lyrata* (Isl.) 35 dní ode dne transformace měl sice stále zelené listy, ale bez jakéhokoli signálu.

#### Pokus 5 a 6

Během těchto dvou experimentů nebyl zaznamenán žádný významný pokrok. U pokusu 6 navíc opět došlo k rozsáhlé kontaminaci, především u *A. lyrata* (Isl.), a to pravděpodobně kvůli stáří výchozího materiálu (příliš dlouhá kultivace). Z kontrolních kořenových segmentů *A. arenosa* (Faragas) a *A. croatica* (pokus 5) bylo možné dopěstovat celé rostliny, které pak byly z *in vitro* podmínek přesunuty do *ex vitro* podmínek. Transformované segmenty těchto lépe regenerujících druhů však nevykazovaly v porovnání s *A. arenosa* (hlavní používaný ekotyp z Jizerských hor) nijak odlišný vývoj od vývoje popsání v pokusu 1.

#### Pokus 7, 8 a 9

Pro účely těchto experimentů byla objednána semena osekvenované linie *A. lyrata*. Semena však nebylo možné přimět ke klíčení ani několikátýdenní stratifikací při 4 °C.

#### Pokus 8

V porovnání s předchozími experimenty došlo ke změně ve způsobu oplachování nárůstu bakterií po jejich kokultivaci. Kořeny byly vkládány do Petriho misky s tekutým SIM, přidrženy pinzetou a pomocí pipety opláchnuty.

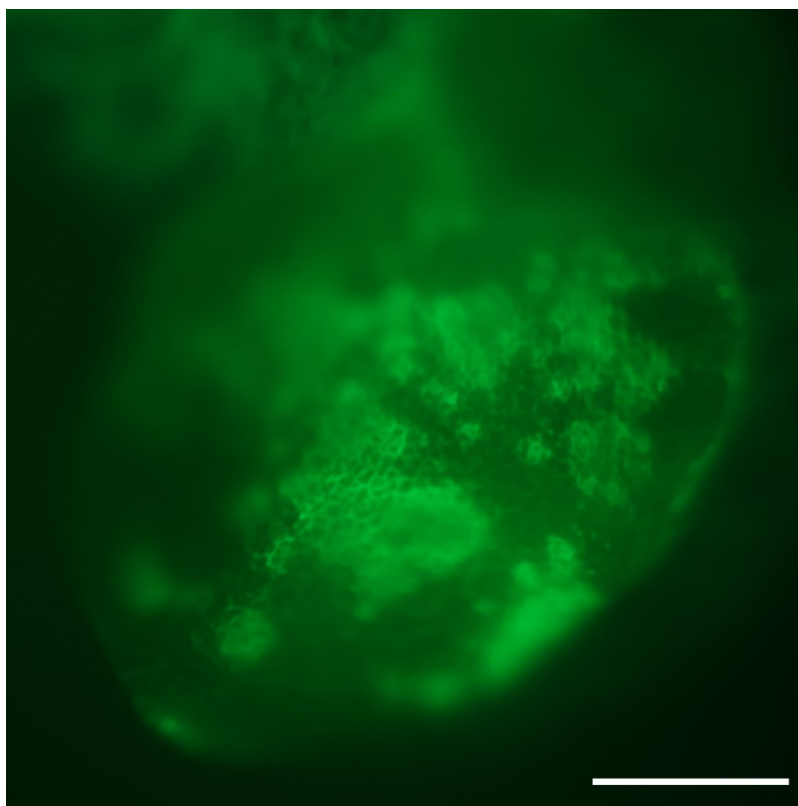
Díky neplánovým změnám v harmonogramu práce zůstaly kořenové segmenty na CIM déle, než bylo běžné (tj. o sedm dní déle). Tato delší kultivace však měla na průběh transformace a následné regenerace pozitivní vliv. Segmenty druhu *A. lyrata* (Isl.) začaly lépe a rychleji regenerovat (obrázek 3.17). Zároveň byla poprvé pozorována nesporná exprese konstruktů 35S::DREPP2-GFP v listech. Exprese byla nicméně mozaikovitá (obrázek 3.18). Z důvodu malého počtu zregenerovaných segmentů ani v tomto případě nebyla provedena kontrola pomocí konfokálního mikroskopu. K regeneraci listů došlo i u segmentů kokultivovaných s *A. tumefaciens* s konstruktem 35S::PRX-mCherry, pozorovaná exprese však byla zcela minimální. Listy pak nejdéle do dvou týdnů ztrácely zelené barvivo.

#### Pokus 9

Experiment byl zahajován v těsném sledu za předchozím, proto ještě jednoznačně pozitivní efekt delší kultivace na CIM nebyl potvrzený. V tomto případě trvala délka kultivace na CIM opět pouze čtyři dny. Byl však navýšen počet kořenových segmentů, u kterých proběhl pokus o transformaci (60 kořenových segmentů celkem), v předchozích případech bývalo i více než o polovinu méně segmentů. Z tohoto pokusu však nezely žádné zmínky hodné výsledky.



Obrázek 3.17: Listy, které vyrostly z kořenového segmentu *A. lyrata* (Isl.) 12 dní od zahájení transformace pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::DREPP2-GFP. Šipka označuje list, který je přiblížen na obrázku 3.18. Měřítka 1 mm.



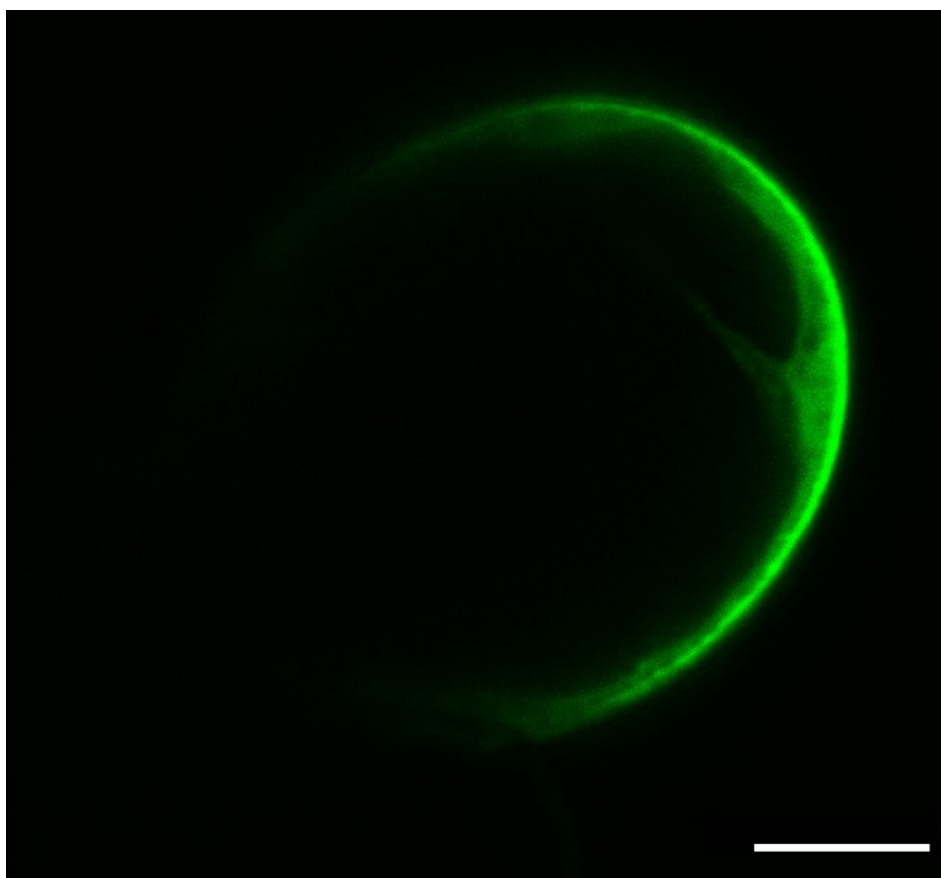
Obrázek 3.18: Detail listu, který vyrostl z kořenového segmentu *A. lyrata* (Isl.) 12 dní od zahájení transformace pomocí *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::DREPP2-GFP. Snímek pochází z fluorescenčního stereomikroskopu Olympus SZX7, byl použit úzkopásmový emisní filtr pro GFP. Jasně potvrzení o úspěšnosti transformace z konfokálního mikroskopu ale chybí. Měřítka 500  $\mu\text{m}$ .

### Pokus 10:

Po vzoru předchozího experimentu bylo zvětšeno množství kořenových segmentů, které byly kokultivovány s *A. tumefaciens* (pro všechny typy použitých konstruktů celkem 129 segmentů), zároveň byl v tomto případě použit pouze druh *A. lyrata* (oba ekotypy Isl. i PP). Od tohoto experimentu začalo být pro oplachování kořenových segmentů od bakterií používáno zařízení Nalgene filter holders plus receiver. Způsob uvedený u pokusu 8 se ukázal jako nevyhovující (nasátí kořenových segmentů pipetou aj.).

U kořenových segmentů transformovaných konstruktem 35S::PRX-mCherry byla od desátého dne po transformaci zkoušena různá koncentrace antibiotika Kan (5x, 10x a 50x vyšší než běžně používaná koncentrace, kapitola 2.3.4), jehož cílem bylo selektovat transformované a netransformované rostlinné buňky. Antibiotikum potlačující růst bakterií, Tim, bylo ponecháno ve standardní koncentraci. Pouze u běžně používaného poměru Kan 1:1000 došlo k částečné regeneraci listů, které však záhy (v řádu jednotek dnů) ztrácely zelené barvivo. U segmentů, které byly udržovány na vyšších koncentracích Kan, nedošlo ani k náznakům regenerace, navíc docházelo k přerůstání segmentů silnými nánosy bakterií. Po následném přemístění segmentů na *Ara* MIN médium bez jakýkoliv antibiotik nedošlo ani k tvorbě listů, ani k následné regeneraci celé rostliny.

Za pomoci konfokálního mikroskopu byla provedena kontrola několika kořenových segmentů kokultivovaných s *A. tumefaciens* nesoucí konstrukt 35S::DREPP2-GFP, což poskytlo jasný doklad o transformaci buňky kalusu *A. lyrata* (Isl.).



Obrázek 3.19: Kalusová buňka *A. lyrata* (Isl.) šest dní po transformaci *A. tumefaciens* exprimující 35S::DREPP2-GFP. Snímek pochází z konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 a byl pořízen za použití objektivu HCX PL APO lbd.BL 63x/1.2 W CORR (s vodní imerzí).  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 500\text{--}535 \text{ nm}$ . Měřítka 10  $\mu\text{m}$ .

V rámci experimentu 10 bylo rozšířeno spektrum používaných konstruktů, a to o VGE-iGFP (pDB3O1:KanR-VGE-5xM-GFP-RB7). Tento konstrukt byl zvolen z toho důvodu, že se v předchozích případech u regenerovaných listů projevoval silencing. Jako možné řešení proto připadal konstrukt s jiným promotorem než 35S. Konstrukt obsahoval inducibilní promotor (indukce látkou methoxyfenozid). Po kokultivaci segmentů s *A. tumefaciens* docházelo po transformaci k regeneraci listů, přibližně o délce 0,5 cm. Listy však velmi rychle ztrácely zelené barvivo a odumíraly, a to ještě před přesunem na médium obsahující inducibilní látku. Čtyři segmenty byly zachyceny a přesunuty ze SIM (s antibiotiky) na *Ara* MIN. Po několika týdnech kultivace regenerované segmenty prospívaly a listy dosáhly délky až 1 cm. Po přesunu na médium s indukční látkou (pouze jedno opakování, v metodice proto neuvedeno) však nebylo možné pozorovat žádnou expresi, netransformovaná pletiva nejspíše přerostla ta transformovaná. Postup bude v případě dalšího použití tohoto konstruktů nutné optimalizovat.

#### *Pokus 11 a 12:*

Určení, zda došlo či nedošlo k transformaci buněk, hlavně pak zda zregenerované pletivo exprimuje daný konstrukt, se u konstruktů 35S::PRX-mCherry ukázalo jako poměrně náročné. Nejsnáze – a především jednoznačně – šlo úspěšnost procesu transformace určit při použití konstruktů 35S::DREPP2-GFP. V posledních dvou experimentech bylo proto od použití jiného než tohoto konstruktů upuštěno. Rovněž došlo k několika změnám oproti původnímu protokolu: za účelem zvýšení plochy pro kalogenezi byly na CIM umístěovány rovnou již kořenové segmenty, nikoli celé kořenové systémy. Doba kultivace na CIM před transformací byla ze čtyř dní prodloužena na devět (po vzoru pokusu 8). V rámci další optimalizace protokolu bylo upuštěno od máčení kořenových segmentů po dobu pěti minut v bakteriální kultuře s infiltračním roztokem. Ta byla nově aplikována přímo na jednotlivé segmenty (3  $\mu$ l na jeden segment). Nakonec bylo také v porovnání s prvotními pilotními pokusy jako v pokusu 10 znásobeno množství kořenových segmentů, se kterými se pracovalo (80 u pokusu 11 a 82 u pokusu 12, dohromady od tří druhů – *A. arenosa*, *A. lyrata* (Isl.), *A. thaliana* a všech konstruktů).

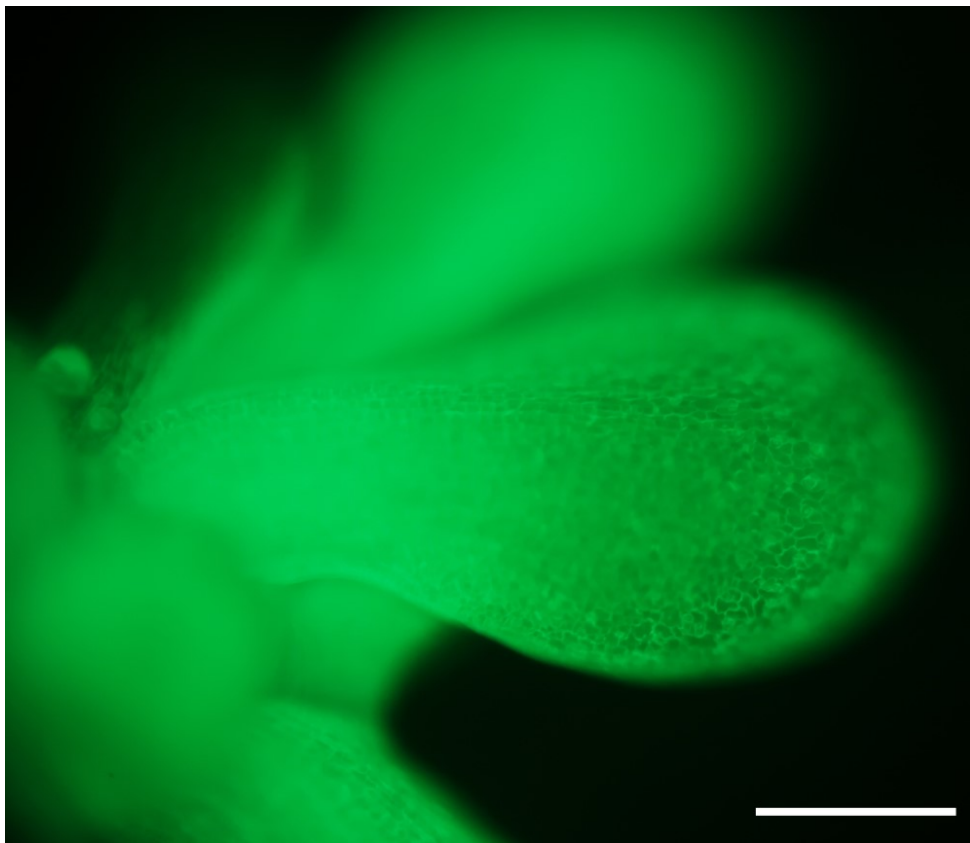
Pokus 11 byl úspěšný co do regenerace listů na transformovaných kořenových segmentech *A. lyrata* (Isl.), ty však v řádu jednotek dnů ztrácely zelené zbarvení.

Při pokusu 12 došlo k transformaci kalusových buněk na kořenových segmentech *A. lyrata* (Isl.), buňky exprimovaly konstrukt 35S::DREPP2-GFP, podobně, jako na obrázku 3.19. V tomto případě došlo dále k tvorbě listů (obrázek 3.20), tentokrát však exprese v porovnání s expresí v pokusu 8 (obrázek 3.18) nebyla mozaikovitá, ale bylo možné ji lokalizovat v celém pletivu (obrázky 3.21 a 3.22). Dopěstovat a udržet ve vitálním stavu zregenerovaný segment s listy se v případě konstruktů 35S::PRX-mCherry ani jednou nepodařilo (viz pokus 8). Oproti tomu expresi 35S::DREPP2-GFP v listech bylo v míře zobrazené na obrázcích 3.21 a 3.22 možné pozorovat i 61 dní ode dne transformace a to u 12 olistěných segmentů (ze 33 segmentů, zbytek však nevytvořil listy) *A. lyrata* (Isl.). Před tím ani u tohoto konstruktů nebyla dlouhodobá kultivace úspěšná – viz pokus 8. V každém případě k rostlině schopné tvořit květy mají tyto drobné rostliny poměrně dalekou cestu. Transformace a regenerace *A. arenosa* a *A. thaliana* měla průběh identický s přechodnými pokusy.

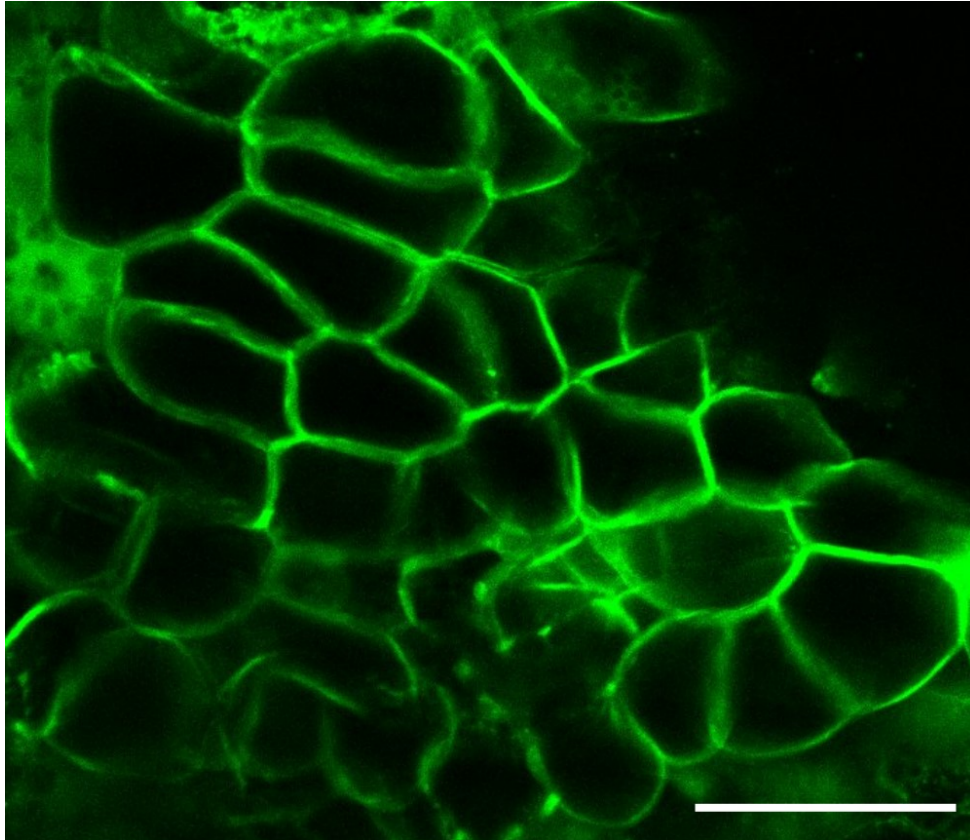




Obrázek 3.20: Listy *A. lyrata* (Isl.), které vyrostly z kořenového segmentu transformovaného pomocí *A. tumefaciens* exprimující 35S::DREPP2-GFP. Šipka označuje list, který je přiblížen na obrázku 3.21. Snímek byl pořízen 36 dní po transformaci. Měřítka 1 mm.



Obrázek 3.21: Listy *A. lyrata* (Isl.), které vyrostly z kořenového segmentu transformovaného pomocí *A. tumefaciens*. Na obrázku je vidět exprese 35S::DREPP2-GFP. Snímek byl pořízen 36 dní po transformaci na fluorescenčním stereomikroskopu Olympus SZX7, byl použit úzkopásmový emisní filtr pro GFP. Měřítka 500  $\mu$ m.



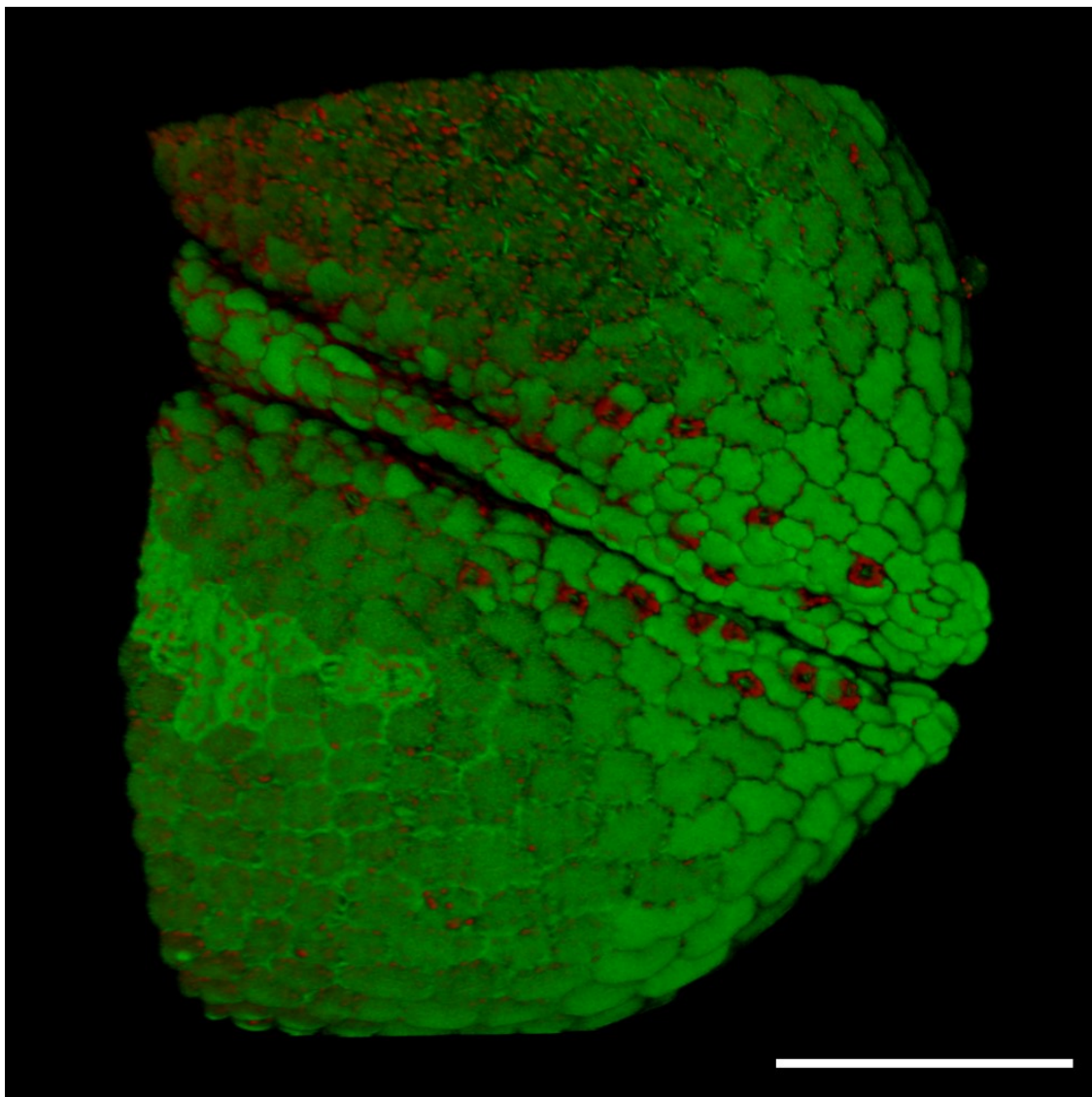
Obrázek 3.22: Detail buněk listu *A. lyrata* (Isl.), který vyrostl z kořenového segmentu transformovaného pomocí *A. tumefaciens*, exprimujících 35S::DREPP2-GFP. Snímek byl pořízen na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP2 za použití objektivu HCX PL APO Ibd.BL 63x/1.2 W CORR (s vodní imerzí).  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 500\text{--}535 \text{ nm}$ . Měřítko 100  $\mu\text{m}$ .

### 3.4.3 Floral dip *A. arenosa* prozatím bez výsledků

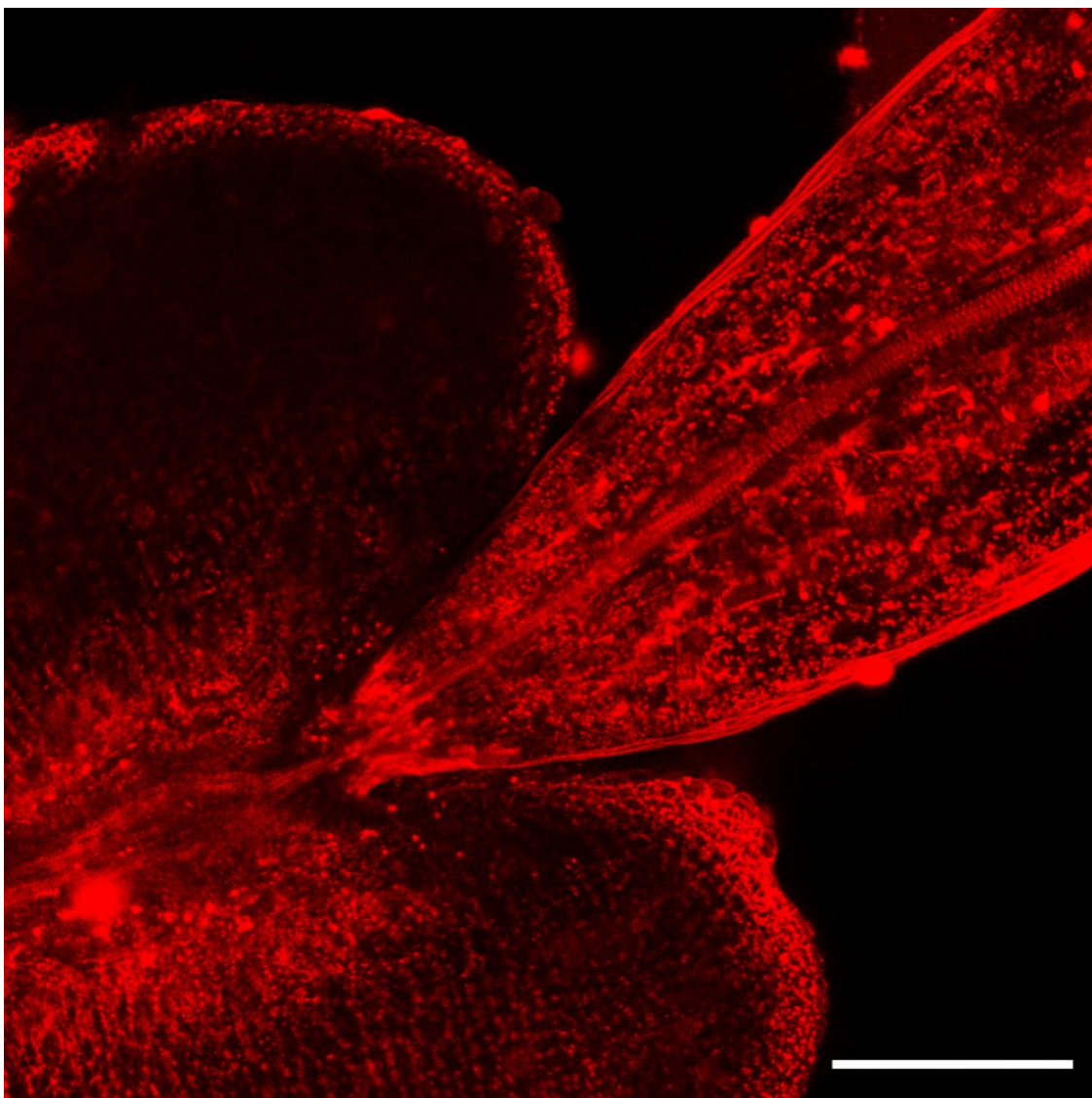
Kvůli dosavadním neúspěšným pokusům o transformaci a regeneraci *A. arenosa* bylo přistoupeno ke klasické metodě floral dip, která se běžně využívá u *A. thaliana*. Vzhledem k tomu, že jaro 2020 bylo díky karanténě pro experimenty značně nepříznivým obdobím, byl floral dip uskutečněn později, než bylo původně v plánu. V momentě odevzdání této práce semena teprve dozrávala. Potvrzení o úspěšnosti celého procesu proto zatím nebylo známo.

### 3.5 Využití PFD v mikroskopii prašníků *A. arenosa*

PFD se při konfokální mikroskopii osvědčilo jako vhodná látka pro projasnění i pro samotné pozorování a snímání tyčinek, především však prašníků, *A. arenosa*. PFD bylo využíváno například při pozorování povrchu prašníků, konkrétně například průduchů na abaxiální straně prašníku (obrázek 3.23). PFD ale především zlepšilo pozorování struktur, které jsou uloženy i ve větší hloubce, jako jsou například vodivá pletiva (obrázek 3.24).



Obrázek 3.23: Apex prašníku *A. arenosa* z abaxiální strany, červeně zobrazeny průduchy. Snímek byl pořízen na konfokálním mikroskopu Leica TCS SP8 za použití objektivu HC PL APO CS2 63x/1.20 WATER (s vodní imerzí). Kombinace více excitačních vlnových délek za účelem získání co nejlepšího autofluorescenčního signálu. Měřítka 100  $\mu\text{m}$ .



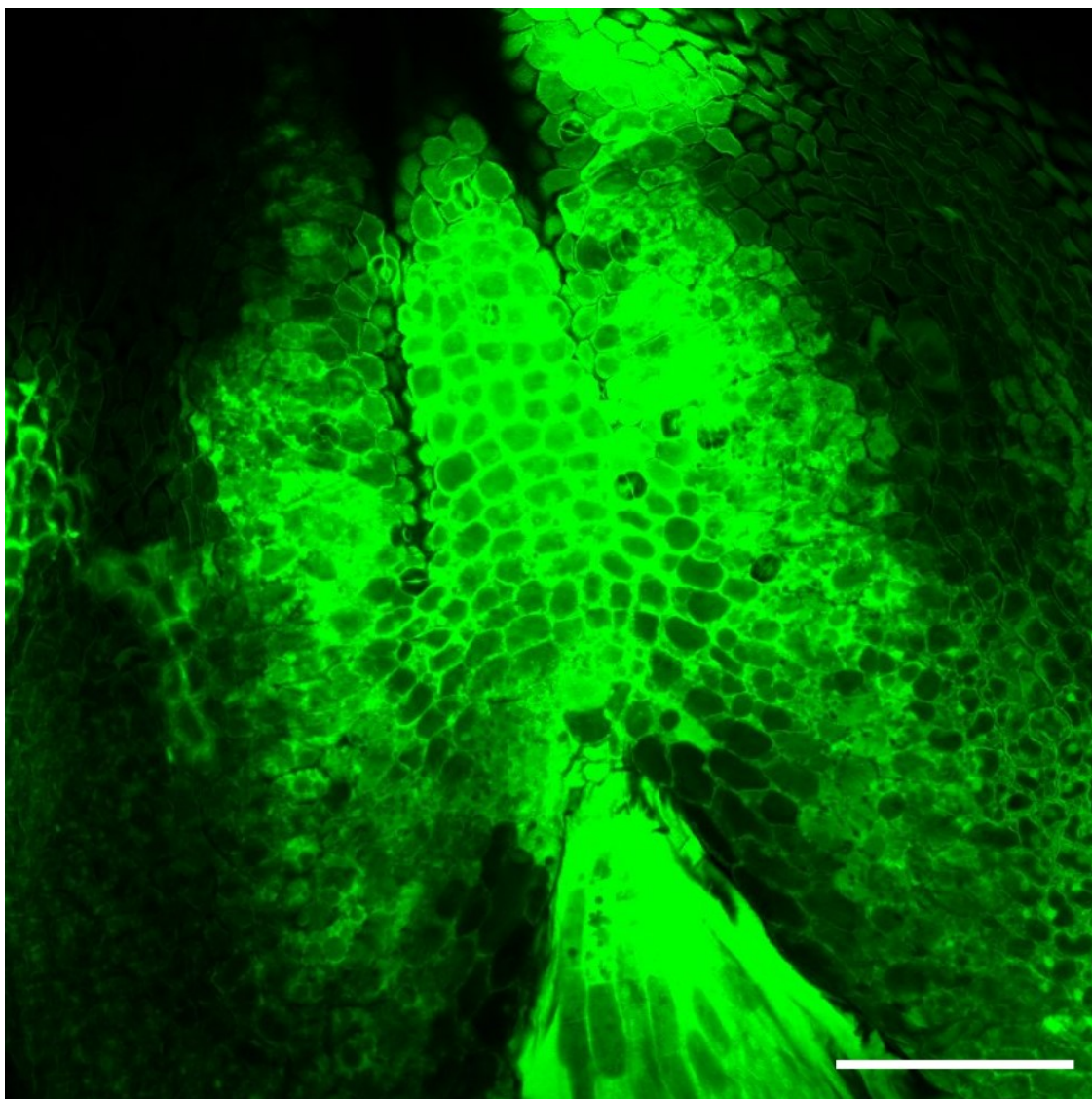
Obrázek 3.24: Prašník *A. arenosa* obarvený PI, projasněný a snímáný v PFD (doba barvení 10 minut, 10  $\mu$ l PI na 1 ml vody; zásobní roztok 1 mg na 1 ml vody; finální obsah PI v 1 ml vody byl 0,01 mg). Snímek pochází z konfokálního mikroskopu Leica TCS SP2 za použití objektivu HC PL APO lbd.BL 20x/0.7 IMM CORR s vodní imerzí.  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 543 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 600\text{--}671 \text{ nm}$ . Měřítka 100  $\mu$ m.

### 3.6 Nejednoznačný efekt cordycepinu na finální fázi dehiscence prašníků *A. arenosa*

Experimenty, jejichž cílem bylo zjistit, jestli a jakým způsobem působí inhibitor transkripce na závěrečnou část procesu dehiscence prašníků, nevedly k jasné odpovědi na zadané otázky. V některých případech se dehiscence prašníků *A. arenosa* oproti kontrolním opozdila, a to až o dvě hodiny. Ovšem případů, kdy efekt cordycepinu nebyl vůbec žádný nebo natolik výrazný nebylo zanedbatelné množství. Nejednoznačné výsledky proto nelze interpretovat tak, že cordycepin má nebo nemá na odložení dehiscence vliv.

Tato problematika však bude dále a intenzivněji zkoumána. Možnou příčinou, proč z nasbíraných dat nelze vyvodit jasný závěr, je doba působení inhibitoru. Ta nemusela být – vzhledem k charakteru pletiva prašníků (kutikula na jejich povrchu) – dostatečná. Inhibitor tak mohl špatně penetrovat do pletiva prašníků. Za účelem poznání vlastností pletiva prašníků byla vyzkoušena aplikace různých fluorescenčních barev, jejichž působení bylo posléze

hodnoceno na konfokálním mikroskopu. Dovnitř pletiv prašníků se některé fluorescenční barvy dostávaly pouze v zanedbatelném množství (např. CW), naopak některé do pletiva pronikaly snadno (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate), ale pouze v určitých oblastech (obrázek 3.25). Je proto možné, že účinek cordycepinu nebyl vždy stejný, proto bude potřeba optimalizovat jeho aplikaci. V rámci dalšího studia regulace dehiscence bude inhibice transkripce hlouběji zkoumána. V případě jednoznačného vyvrácení hypotézy bude pozornost obrácena na další možné úrovně regulace tohoto procesu, tj. na úroveň translace či posttranslačních úprav.



Obrázek 3.25: Pohled na abaxiální stranu prašníku a části nitky *A. arenosa*, které byly obarveny CFDA (doba barvení 30 minut, 3  $\mu$ l CFDA na 1 ml PFD; zásobní roztok 1 mg na 100  $\mu$ l DMSO; finální obsah CFDA v 1 ml PFD byl 0,03 mg). PFD bylo kromě samotného barvení využito i při snímání na konfokálním mikroskopu typu Leica TCS SP2, a to za pomoci objektivu HC PL APO lbd.BL 20x/0.7 IMM CORR s vodní imerzí.  $\lambda_{\text{EXCITACE}} = 488 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{\text{EMISE}} = 500\text{--}535 \text{ nm}$ . Měřítka 100  $\mu$ m.

## 5. Diskuze

Rostlinný druh *A. arenosa*, středobod této diplomové práce, byl zvolen jako modelový organismus pro studium dehiscence prašníků. Dehiscence prašníků byla a je studována na poměrně širokém počtu druhů (kapitola 1.2). Rostlina *A. arenosa* byla vybrána především kvůli své cizosprašnosti. Výhodou byly ale i – v porovnání s *A. thaliana* – velké prašníky. Na počátku stála myšlenka, že tendence samosprašného příbuzného druhu *A. thaliana* (rev. Clauss & Koch, 2006) zabránit otevření prašníků ve chvíli, kdy prší či je rosa, by nemusela být tak silná jako u *A. arenosa*. Zároveň zde byl předpoklad a možnost využití metod či postupů zavedených u *A. thaliana*. Druh *A. arenosa* je, vzhledem ke své přirozeně se vyskytující diploidii či tetraploidii (Koch & Matschinger, 2007) a mnoha různým ekotypům (Koch, Wernisch & Schmickl, 2008) využíván pro studium ekologie a evoluce (Schmickl *et al.*, 2012; Kolář *et al.*, 2016; Preite *et al.*, 2019). Využití *A. arenosa* v hlubším studiu dehiscence prašníků v experimentech navazujících na tuto diplomovou práci je v tuto chvíli limitováno skutečností, že transformace a regenerace *A. arenosa* metodou kokultivace kořenových segmentů s *A. tumefaciens* (Fobis-Loisy, Chambrier & Gaude, 2007) nebyla prozatím úspěšná. Byl však zjištěn pozoruhodný rozdíl v potenciálu k transformaci a regeneraci mezi *A. arenosa* a *A. lyrata* (kapitola 3.4). Výsledky transformace *A. arenosa* metodou floral dip nebyly v dobu dokončení diplomové práce známy (nezralá semena; Yew, Kakui & Shimizu, 2018). Z těchto důvodů nebylo možné potvrdit ani vyvrátit hypotézu, že kropení či rosení má vliv na expresi či aktivitu sacharózových transportérů během dehiscence prašníků.

Dehiscence prašníků není proces, který by byl v rámci rostlinné biologie opomíjen (např. Salinas-Grenet *et al.*, 2018; Song *et al.*, 2018). Naopak je mu pozornost věnována již poměrně dlouhou dobu (Purkyně, 1830). Jedná se o děj, který se sestává z několika na sebe navazujících a spolu spjatých kroků: degradace tapeta, septa, lignifikace endothecia a tvorby otvoru v oblasti stomia (Sanders *et al.*, 1999). Dehiscence musí být navíc zkoordinována se zráním pylových zrn a včasným otevřením květu. Poslední krok v celém procesu dehiscence – totiž dehydratace pletiv (Wilson *et al.*, 2011), která tvoří stěny prašníku – je však do značné míry opomíjen, a ne tak důkladně prozkoumán. Tato změna ve vodním režimu prašníku vede k jeho úplnému otevření. Některé studie zabírající se jedním z předcházejících kroků dehiscence prašníků tuto závěrečnou, nedílnou část dehiscence v jejím základním popisu opomíjejí zmínit (např. Xu *et al.*, 2019). Avšak i v práci detailně popisující vývoj prašníku a jeho následnou dehiscenci tato informace zcela chybí (Sanders *et al.*, 1999). Tabulka 1.1 nepopíratelně poskytuje podrobné informace o vývoji prašníku a počátečních fázích dehiscence (Sanders *et al.*, 1999). Nicméně závěr dehiscence, ač rozdělen do několika částí, neposkytuje ani zprávy o dehydrataci pletiv, ale ani o makroskopických změnách prašníku (např. postupné prodlužování otvoru v oblasti stomia či prohnutí abaxiální strany prašníku viz stádium 3\*, obrázek 3.4), ke kterým dochází a které byly při pozorování dehiscence v rámci této práce zaznamenány.

Finální fáze dehiscence není důkladně prozkoumána, přestože je načasování jejího průběhu nesmírně důležité pro fitness rostliny ve vztahu k počasí i opylovačům. V rámci snahy podrobně vyšetřit, jaký vliv mají atmosférické srážky na dehiscenci prašníků *A. arenosa*, byly vytvořeny experimentální systémy umožňující simulaci deště a rosy (ke vzniku rosy docházelo při 100% relativní vzdušné vlhkosti). K tomuto účelu upravené boxy umožňovaly sledování průběhu dehiscence bez nutnosti květy či přímo prašníky od rostliny, respektive od květu,

oddělovat. Tak bylo učiněno například v rámci experimentů s prašníky meruňky *Prunus armeniaca*, broskvoně *P. persica* a mandloně *P. dulcis* (Gradziel & Weinbaum, 1999), rýže *O. sativa* (Matsui, Omasa & Horie, 1999) či ořechovce pekanového *Carya illinoensis* (Yates & Sparks, 1993). Tyto experimenty se rovněž snažily objasnit, jaký vliv má vysoká relativní vzdušná vlhkost na dehiscenci prašníků.

Nashromážděná data ukázala, že u prašníků, které byly vystaveny simulaci deště či rosy (při 100% relativní vzdušné vlhkosti), dochází k pozastavení dehiscence. Takové prašníky po dobu aplikace vody nedosahovaly konečného stádia dehiscence – nedocházelo k odvodu vody z buněk stěn prašných váčků a k jejich svrašnění. Do této fáze se prašníky dostaly až po ukončení aplikace vody. Teprve tehdy byla pylová zrna plně přístupná a mohla být účastna opylení a oplození (kapitoly 3.2.3 a 3.2.4). Závěrečná část dehiscence prašníků *A. arenosa* byla rozdělena na čtyři stádia (obrázek 3.4): uzavřený prašník, prašník s otvory v prašných váčcích, prašník s většími otvory, kterými byly jasně vidět pylová zrna a zcela otevřený prašník s pylovými zrny nahromaděnými na apexu prašníku. Oproti práci Sanderse *et al.*, 1999, bylo závěr dehiscence fáze možné rozlišit podle postupně se zvětšujícího otvoru v oblasti stomia jednotlivých prašných váčků.

Výsledky podrobného zkoumání vlivu rosy na dehiscenci prašníků ukázaly, že prašníky vystavené působení vody v této podobě mohly v dehiscenci postoupit ze stádia nula, od zcela uzavřeného prašníku, do stádia jedna, tedy prašníku s drobnými otvory v prašných váčcích (grafy 3.1 a 3.2). Posledního stádia tři, kdy je prašník zcela otevřen, však po dobu aplikace vody prašníky nedosahovaly. Až 13 hodin trvajícím rosením vedlo u prašníků k odložení dosažení posledního stádia až do večerních hodin (graf 3.1). Obdobný efekt měla rosa i na prašníky rostlin *A. thaliana*. Působení rosy bylo možné pozorovat i na anatomické úrovni. Rosené prašníky zachovávaly na rozdíl od nerosených prašníků tvar, který se na příčných řezech podobal motýlím křídům (obrázek 3.8). I přes artefakty, které při přípravě příčných řezů vznikly, byl vliv rosy jednoznačně patrný: i ty prašníky, které měly otvor v oblasti stomia, nedospěly do finálního stádia, kdy by došlo k dehydrataci pletiv. Data z podmínek s vysokou, ale ne 100% vzdušnou vlhkostí, kdy by nedocházelo ke kondenzaci vody na květech a prašnicích v podobě kapek, však zatím nejsou k dispozici. Svou roli sehrály i technické problémy a potřeba optimalizovat způsob měření relativní vzdušné vlhkosti.

Experimenty, které byly založeny na simulaci deště, měly výsledky podobné. Prašníky se začaly otevírat až po ukončení aplikace vody (grafy 3.3). Na rozdíl od rosení však při kropení byly květy zpravidla plné vody. Prašníky po dobu aplikace vody formou kropení častěji než v případě mlžení zůstávaly ve stádiu nula. S ohledem na skutečnost, že experimenty se simulací atmosférických srážek byly prováděny v experimentálním skleníku v různých ročních obdobích, mohly být uvedené rozdíly mezi kropením a rosením způsobeny odlišnými teplotními podmínkami, které na dehiscenci prašníků mají rovněž vliv (Keijzer, 1987; Yates & Sparks, 1993). Jaký efekt má květ plný vody, bylo dále testováno pomocí ponořování květů do vodného, ale i nevodného prostředí (za využití PFD, kapitola 3.3). Ať byly květy umístěné do vodného nebo nevodného prostředí, zůstávaly jejich prašníky zpravidla v takovém stavu, v jakém byly do kapaliny umístěny (graf 3.3). Nedocházelo k výrazným změnám a přesunům prašníků z nižších fází dehiscence (stádium nula a jedna: uzavřený prašník a prašník s drobnými otvory na apexu) do vyšších, závěrečných (stádium dva a tři: prašník s velkými otvory na apexu a prašník zcela otevřený).

K odložení dehiscence docházelo po otevření stomia, ke kterému může dojít i při rosení (a to i v případě nežádoucího otevření stomia při řezání na vibratomu, kapitola 3.2.5) nebo

kropení, ač v tomto případě se to týkalo menšího množství květů než u rosení. Obecně prašníky při aplikaci vody v jakékoli formě nedosahovaly konečného stádia dehiscence (tj. stádia tři), i pokud měly delší dobu otevřené stomium. Ani ty prašníky, které při rosení až do večerních hodin byly v boxu vystaveny působení vyšší teplot, dehiscenci nedokončily (graf 3.1 B). Lze konstatovat, že 100% relativní vzdušná vlhkost je nadřazena vlivu vysoké teploty. Vyšší teplota může potlačit vliv vysoké relativní vzdušné vlhkosti s nižší hodnotou, např. 64 % (Yates & Sparks, 1993).

Uvedené výsledky jsou ve shodě s experimenty, které se zabíraly vlivem vysoké relativní vzdušné vlhkosti na dehiscenci prašníků na jiných rostlinných druzích, a to na rýži *O. sativa* (Matsui, Omasa & Horie, 1999), meruňce *P. armeniaca*, broskvoni *P. persica* a mandloni *P. dulcis* (Gradziel & Weinbaum, 1999) nebo ořechovci pekanovém *C. illinoensis* (Yates & Sparks, 1993). I v těchto případech vysoká relativní vzdušná vlhkost prokazatelně dehiscenci prašníků zpomalila či zastavila.

Kropení ani rosení však nemělo žádný vliv na květy *A. arenosa*, k jejichž otevírání docházelo i přes aplikaci vody (grafy 3.2 B, D, F, H a 3.3 B). Stejně tak nemělo na otevírání květů vliv nevodné prostředí, pouze umístění květu do vodného prostředí bránilo rozevření korunních lístků. Otevírání květů a dehiscence prašníků jsou vzhledem k environmentálním faktorům nejspíše regulovány různými způsoby.

Pro potvrzení první hypotézy, tj. že dehiscence není ryze fyzikální proces, ale je i pod kontrolou rostliny, nebyla získána jednoznačná podpora. K zahájení procesu otevření prašníku (k tvorbě otvorů na apexu prašníku) dochází i přes aplikaci vody. Pouze závěrečná fáze dehiscence prašníků, tj. dehydratace pletiva tvořící stěny prašných váčků, je ovlivnitelná aplikací vody ve formě deště a rosy. Simulací deště či rosy lze dosáhnout pozastavení dehiscence a oddálení vstupu prašníků *A. arenosa* do finální fáze dehiscence, kdy dochází k dehydrataci pletiv stěn prašných váčků. Toto potvrzuje hypotézu číslo dva, tedy že umělým kropením či rosením je možné manipulovat průběhem dehiscence. Na jaké úrovni je vnímán a předáván signál o počasí však zatím není jasné (kapitola 3.6). Po pokusech s PFD (kapitola 3.5) bude nezbytné najít vhodnou metodu pro mikroskopické zkoumání tohoto posledního stádia dehiscence (kapitola 3.2.5), aby bylo možné objasnit, jakým způsobem je voda z prašníku odváděna či jakou roli hraje v transportu vody protoplastické propojení buněk endothecia nebo zmiňovaný SUC1 transportér. Vzhledem k vytvoření stabilního experimentálního systému bude tyto oblasti možné zkoumat i s ohledem na okolní podmínky, především tedy atmosférické srážky. Výše uvedené bude klíčové pro další testování hypotézy o roli rostliny v kontrole procesu dehiscence. S přihlédnutím ke zjištěné skutečnosti, že pletivo prašníku je schopné rehydratovat (kapitola 3.2.2 a 3.2.5), nelze vyloučit fyzikální aspekt celého procesu. Skutečnost, že prašníky *A. thaliana* reagují na rosení podobným způsobem jako prašníky *A. arenosa*, rovněž umožní využití mnoha mutantních linií, například těch, které byly zmíněny v úvodu této práce.



## 6. Závěry

1. Tato diplomová práce byla zaměřena na studium vlivu atmosférických srážek, deště a rosy, na dehiscenci prašníků. Rostlinný druh *A. arenosa* byl ustanoven jako hlavní modelový organismus pro zkoumání této problematiky, a to především kvůli své cizosprašnosti.
2. Důležitým úkolem byla konstrukce experimentálních systémů pro simulaci atmosférických srážek. Bylo možné navodit podmínky podobné těm, které panují v přírodě, a tak studovat efekt deště a rosy na dehiscenci prašníků, které zůstávaly v kontaktu s mateřskou rostlinou a nemusely být od ní oddělovány. Aplikaci vody byly vystaveny pouze květy, zbylá část rostliny jejímu působení vystavena nebyla.
3. Data, která byla díky použití zmíněných experimentálních systémů nasbírána, ukázala, že umělý déšť (kropení) a rosa (rosení) mají na dehiscenci prašníků vliv. Aplikace vody vedla k odložení vstupu prašníků do závěrečné fáze dehiscence: pletiva stěn prašníků neztrácela vodu, a proto si prašné váčky zachovávaly svůj tvar. Pylová zrna tudíž zůstávala uvnitř prašníků, a byla tak chráněná před vlivem vody. I přes aplikaci vody často docházelo k tvorbě drobných otvorů na apexu prašných váček v oblasti stomia. Jednalo se o proces na dešti či rose nezávislý. Ani tyto prašníky však do finální fáze nedospěly. K dokončení dehiscence docházelo až poté, co bylo kropení a rosení ukončeno.
4. Skutečnost, že rosení způsobuje odložení úplného otevření prašníků, bylo možné sledovat i na jejich anatomické úrovni. I přes artefakty, které při přípravě příčných řezů prašníky vznikly, byl rozdíl mezi rosenými a nerozenými prašníky jasně patrný.
5. Odložení vstupu prašníků do finální fáze dehiscence se projevilo i v případě, že byly vystaveny vodnému a nevodnému prostředí (PFD). I při tomto experimentu se prašníky zcela otevřely až poté, kdy vodné prostředí či PFD přestaly působit.
6. V rámci této diplomové práce nebyla jednoznačně zodpovězena otázka, jakou roli má transkripce v zahájení finální fáze dehiscence prašníků. Vyhodnocení výsledků experimentů s cordycepinem, inhibítorem transkripce, vedlo k závěru, že je nezbytné další a podrobnější prozkoumání této problematiky.
7. Transformace *A. arenosa* nemá do této chvíle uspokojivý výsledek. Doposud se zvolenou metodou transformace kokultivací kořenových segmentů s *A. tumefaciens* nepodařilo transformovat a regenerovat žádnou rostlinu *A. arenosa*. Aplikace této metody se však zdařila u *A. lyrata*. Kvůli neúspěšnému zavedení zmíněné metody byla vyzkoušena metoda floral dip. V tento moment stále nezralá semena však dosud neposkytla důkaz o úspěšné transformaci *A. arenosa* touto metodou.

## 7. Literatura

- Aloni, R., Aloni, E., Langhans, M., & Ullrich, C. I. (2006). Role of auxin in regulating *Arabidopsis* flower development. *Planta*, 223(2), 315–328.
- Béais, T. P., & Goldberg, R. B. (1997). A novel cell ablation strategy blocks tobacco anther dehiscence. *Plant Cell*, 9(9), 1527–1545.
- Bent, A. (2006). *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, 343, 87–103.
- Bleecker, A. B., & Kende, H. (2000). Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 16(1), 1–18.
- Bonner, L. J., & Dickinson, H. G. (1989). Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* Mill. I. Structural aspects. *New Phytologist*, 113(1), 97–115.
- Bonner, L. J., & Dickinson, H. G. (1990). Anther dehiscence in *Lycopersicon esculentum* II. Water relations. *New Phytologist*, 115(2), 367–375.
- Bots, M., Feron, R., Uehlein, N., Weterings, K., Kaldenhoff, R., & Mariani, T. (2005). PIP1 and PIP2 aquaporins are differentially expressed during tobacco anther and stigma development. *Journal of Experimental Botany*, 56(409), 113–121.
- Bots, M., Vergeldt, F., Wolters-Arts, M., Weterings, K., Van As, H., & Mariani, C. (2005). Aquaporins of the PIP2 class are required for efficient anther dehiscence in tobacco. *Plant Physiology*, 137(3), 1049–1056.
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Brunetti, P., Petrocelli, V., Falasca, G., Ljung, K., ... Cardarelli, M. (2013). Auxin controls *Arabidopsis* anther dehiscence by regulating endothecium lignification and jasmonic acid biosynthesis. *Plant Journal*, 74(3), 411–422.
- Cecchetti, V., Altamura, M. M., Falasca, G., Costantino, P., & Cardarelli, M. (2008). Auxin regulates *Arabidopsis* anther dehiscence, pollen maturation, and filament elongation. *Plant Cell*, 20(7), 1760–1774.
- Cecchetti, V., Celebrin, D., Napoli, N., Ghelli, R., Brunetti, P., Costantino, P., & Cardarelli, M. (2017). An auxin maximum in the middle layer controls stamen development and pollen maturation in *Arabidopsis*. *New Phytologist*, 213(3), 1194–1207.
- Chatin, A. (1870a). Causes de la déhiscence des anthères: Rôle de la deuxième membrane. *Presse et Revues Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences*, 70, 410–413.
- Chatin, A. (1870b). Causes de la déhiscence des anthères. *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Séances de l'Académie Des Sciences*, 70, 201–203.
- Cheng, Y., Dai, X., & Zhao, Y. (2006). Auxin biosynthesis by the YUCCA flavin monooxygenases controls the formation of floral organs and vascular tissues in *Arabidopsis*. *Genes and Development*, 20(13), 1790–1799.
- Cheng, Z. M., Schnurr, J. A., & Kapaun, J. A. (1998). Timentin as an alternative antibiotic for suppression of *Agrobacterium tumefaciens* in genetic transformation. *Plant Cell Reports*, 17(8), 646–649.
- Chiba, Y., Mineta, K., Hirai, M. Y., Suzuki, Y., Kanaya, S., Takahashi, H., ... Naito, S. (2013). Changes in mRNA stability associated with cold stress in *Arabidopsis* cells. *Plant and Cell Physiology*, 54(2), 181–194.
- Clauss, M. J., & Koch, M. A. (2006). Poorly known relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Trends in Plant Science*, Vol. 11, pp. 449–459.

- Cleveland, W. S., Grosse, E., & Shyu, W. M. (1992). *Local regression models: Chapter 8 of Statistical Models in S*. J.M. Chambers and T.J. Hastie, Wadsworth & Brooks/Cole.
- Cline, M. G., Rehm, M. M., & Wilson, R. H. (1974). Rapid inhibition of auxin-induced elongation of avena coleoptile segments by cordycepin. *Plant Physiology*, 54(2), 160–163.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, 16(6), 735–743.
- Coulter, J. M., & Chamberlain, C. J. (1903). *Morphology of Angiosperms (Morphology of Spermatophytes. Part II.)*. New York a London: D. Appleton and Company.
- Creelman, R. A., & Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 48(1), 355–381.
- Dai, S. Y., Hsu, W. H., & Yang, C. H. (2019). The gene *ANTHER DEHISCENCE REPRESSOR (ADR)* controls male fertility by suppressing the ROS accumulation and anther cell wall thickening in *Arabidopsis*. *Scientific Reports*, 9(1), 1–14.
- Dawson, J., Sözen, E., Vizir, I., Van Waeyenberge, S., Wilson, Z. A., & Mulligan, B. J. (1999). Characterization and genetic mapping of a mutation (*ms35*) which prevents anther dehiscence in *Arabidopsis thaliana* by affecting secondary wall thickening in the endothecium. *New Phytologist*, 144(2), 213–222.
- Dobritzsch, S., Weyhe, M., Schubert, R., Dindas, J., Hause, G., Kopka, J., & Hause, B. (2015). Dissection of jasmonate functions in tomato stamen development by transcriptome and metabolome analyses. *BMC Biology*, 13, 1–18.
- Du Sablon, L. (1885). Recherches sur la structure et la déhiscence des anthères. *Annales Des Sciences Naturelles, Botanique*, 7, 97–134.
- Feng, X., & Dickinson, H. G. (2010). Tapetal cell fate, lineage and proliferation in the *Arabidopsis* anther. *Development*, 137(14), 2409–2416.
- Feys, B. J. F., Benedetti, C. E., Penfold, C. N., & Turner, J. G. (1994). *Arabidopsis* mutants selected for resistance to the phytotoxin coronatine are male sterile, insensitive to methyl jasmonate, and resistant to a bacterial pathogen. *Plant Cell*, 6(5), 751–759.
- Fobis-Loisy, I., Chambrier, P., & Gaude, T. (2007). Genetic transformation of *Arabidopsis lyrata*: Specific expression of the green fluorescent protein (GFP) in pistil tissues. *Plant Cell Reports*, 26(6), 745–753.
- Ge, Y. X., Angenent, G. C., Wittich, P. E., Peters, J., Franken, J., Busscher, M., ... Creemers-Molenaar, T. (2000). NEC1, a novel gene, highly expressed in nectary tissue of *Petunia hybrida*. *Plant Journal*, 24(6), 725–734.
- Ghelli, R., Brunetti, P., Napoli, N., De Paolis, A., Cecchetti, V., Tsuge, T., ... Cardarelli, M. (2018). A newly identified flower-specific splice variant of *AUXIN RESPONSE FACTOR8* regulates stamen elongation and endothecium lignification in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 30(3), 620–637.
- Goldberg, R. B., Beals, T. P., & Sanders, S. M. (1993). Anther development: Basic principles and practical applications. *Plant Cell*, 5(10), 1217–1229.
- Gradziel, T. M., & Weinbaum, S. A. (1999). High relative humidity reduces anther dehiscence in apricot, peach, and almond. *HortScience*, 34(2), 322–325.
- Harrington, B. (n.d.). *Inkscape*. <http://www.inkscape.org/>.
- Hase, A. Von, Cowling, R. M., & Ellis, A. G. (2006). Petal movement in cape wildflowers protects pollen from exposure to moisture. *Plant Ecology*, 184(1), 75–87.

- Hu, T. T., Pattyn, P., Bakker, E. G., Cao, J., Cheng, J. F., Clark, R. M., ... Guo, Y. L. (2011). The *Arabidopsis lyrata* genome sequence and the basis of rapid genome size change. *Nature Genetics*, 43(5), 476–483.
- Huang, H., Gao, H., Liu, B., Qi, T., Tong, J., Xiao, L., ... Song, S. (2017). *Arabidopsis MYB24* regulates jasmonate-mediated stamen development. *Frontiers in Plant Science*, 8, 1525.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000). Analysis of the genome sequence of *Arabidopsis thaliana*. *Nature*, 408(December), 796–815.
- Ishiguro, S., Kawai-Oda, A., Ueda, J., Nishida, I., & Okada, K. (2001). The *DEFECTIVE IN ANTHHER DEHISCENCE1* gene encodes a novel phospholipase A1 catalyzing the initial step of jasmonic acid biosynthesis, which synchronizes pollen maturation, anther dehiscence, and flower opening in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 13(10), 2191–2209.
- Johnson, S. A., & McCormick, S. (2001). Pollen germinates precociously in the anthers of *raring-to-go*, an *Arabidopsis* gametophytic mutant. *Plant Physiology*, 126(2), 685–695.
- Keijzer, C. J. (1987). The processes of anther dehiscence and pollen dispersal: I. The opening mechanism of longitudinally dehiscing anthers. *New Phytologist*, 105(3), 487–498.
- Kerner von Marilaun, A. (1887). *Pflanzenleben*.
- Klepikova *Arabidopsis* Atlas. <https://www.arabidopsis.org/>.
- Koch, M. A., & Matschinger, M. (2007). Evolution and genetic differentiation among relatives of *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(15), 6272–6277.
- Koch, M. A., Wernisch, M., & Schmickl, R. (2008). *Arabidopsis thaliana* 's wild relatives: an updated overview on systematics, taxonomy and evolution. *TAXON*, 57(3), 933–43.
- Kolář, F., Lučanová, M., Závěská, E., Fuxová, G., Mandáková, T., Španiel, S., ... Marhold, K. (2016). Ecological segregation does not drive the intricate parapatric distribution of diploid and tetraploid cytotypes of the *Arabidopsis arenosa* group (*Brassicaceae*). *Biological Journal of the Linnean Society*, 119(3), 673–688.
- Koltunow, A. M., Truettner, J., Cox, K. H., Wallroth, M., & Goldberg, R. B. (1990). Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *The Plant Cell*, 2(12), 1201–1224.
- Lasin, P., Weise, A., Reinders, A., & Ward, J. M. (2020). *Arabidopsis* sucrose transporter *AtSUC1* introns act as strong enhancers of expression. *Plant & Cell Physiology*, 61(6), 1054–1063.
- Leyser, O. (2018). Auxin signaling. *Plant Physiology*, 176(1), 465–479.
- Li, L., Zhao, Y., McCaig, B. C., Wingerd, B. A., Wang, J., Whalon, M. E., ... Howe, G. A. (2004). The tomato homolog of *CORONATINE-INSENSITIVE1* is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell*, 16(1), 126–143.
- Littlejohn, G. R., Gouveia, J. D., Edner, C., Smirnov, N., & Love, J. (2010). Perfluorodecalin enhances in vivo confocal microscopy resolution of *Arabidopsis thaliana* mesophyll. *New Phytologist*, 186(4), 1018–1025.
- Mariani, C., De Beuckeleer, M., Truettner, J., Leemans, J., & Goldberg, R. B. (1990). Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 347(6295), 737–741.
- Kenji & Takeshi
- Matsui, T., Omasa K., Horie T. (1999a). Rapid swelling of pollen grains in response to floret opening unfolds anther locules in rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Production Science*, 2(3), 196–199.

- Matsui, T., Omasa, K., & Horie, T. (1999). Mechanism of anther dehiscence in rice (*Oryza sativa* L.). *Annals of Botany*, 84(4), 501–506.
- Meyerowitz Elliot M. (1987). *Arabidopsis thaliana*. *Annual Review of Genetics*, 21, 93–111.
- Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K., & Ohme-Takagi, M. (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell*, 17(11), 2993–3006.
- Nagpal, P., Ellis, C. M., Weber, H., Ploense, S. E., Barkawi, L. S., Guilfoyle, T. J., ... Reed, J. W. (2005). Auxin response factors ARF6 and ARF8 promote jasmonic acid production and flower maturation. *Development*, 132(18), 4107–4118.
- Ogawa, M., Kay, P., Wilson, S., & Swain, S. M. (2009). ARABIDOPSIS DEHISCENCE ZONE POLYGALACTURONASE1 (ADPG1), ADPG2, and QUARTET2 are polygalacturonases required for cell separation during reproductive development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21(1), 216–233.
- PICOLAY. <https://www.picolay.de/>.
- Preite, V., Sailer, C., Syllwasschy, L., Bray, S., Ahmadi, H., Krämer, U., & Yant, L. (2019). Convergent evolution in *Arabidopsis halleri* and *Arabidopsis arenosa* on calamine metalliferous soils. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 374(1777), 20180243.
- Purkyně, J. E. (1830). *De cellulis antherarum fibrosis nec non de granorum pollinarium formis: commentatio phytotomica*.
- R Core Team. (2020). R: A language and environment for statistical computing. <https://www.r-project.org/>.
- Rieu, I., Wolters-Arts, M., Derksen, J., Mariani, C., & Weterings, K. (2003). Ethylene regulates the timing of anther dehiscence in tobacco. *Planta*, 217(1), 131–137.
- Salinas-Grenet, H., Herrera-Vásquez, A., Parra, S., Cortez, A., Gutiérrez, L., Pollmann, S., ... Blanco-Herrera, F. (2018). Modulation of auxin levels in pollen grains affects stamen development and anther dehiscence in *Arabidopsis*. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9), 1-13.
- Sanders, P. M., Bui, A. Q., Le, B. H., & Goldberg, R. B. (2005). Differentiation and degeneration of cells that play a major role in tobacco anther dehiscence. *Sexual Plant Reproduction*, 17(5), 219–241.
- Sanders, P. M., Bui, A. Q., Weterings, K., McIntire, K. N., Hsu, Y. C., Lee, P. Y., ... Goldberg, R. B. (1999). Anther developmental defects in *Arabidopsis thaliana* male-sterile mutants. *Sexual Plant Reproduction*, 11(6), 297–322.
- Sanders, P. M., Lee, P. Y., Biesgen, C., Boonem, J. D., Beals, T. P., Weiler, E. W., & Goldberg, R. B. (2000). The *Arabidopsis* DELAYED DEHISCENCE1 gene encodes an enzyme in the jasmonic acid synthesis pathway. *The Plant Cell*, 12(7), 1041–1062.
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., ... Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, (9), 676–682.
- Schmickl, R., Paule, J., Klein, J., Marhold, K., & Koch, M. A. (2012). The evolutionary history of the *Arabidopsis arenosa* Complex: Diverse tetraploids mask the Western Carpathian center of species and genetic diversity. *PLoS ONE*, 7(8), 1–10.
- Schmid, R., & Alpert, P. H. (1977). A test of Burck's hypothesis relating anther dehiscence to nectar secretion. *New Phytologist*, 78(2), 487–498.

- Schönbrodt, F. (2012). Visually weighted/watercolor plots, new variants: Please vote! <https://www.nicebread.de/visually-weighted-watercolor-plots-new-variants-please-vote/>.
- Scott, R. J., Spielman, M., & Dickinson, H. G. (2004). Stamen structure and function. *Plant Cell*, 16, 46–60.
- Seeley, K. A., Byrne, D. H., & Colbert, J. T. (1992). Red light-independent instability of oat phytochrome mRNA in vivo. *Plant Cell*, 4(1), 29–38.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., Johnson, M. E., Krentz, A. D., Grof, C. P. L., Perroux, J. M., & Ward, J. M. (2007). *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC9. High-affinity transport activity, intragenic control of expression, and early flowering mutant phenotype. *Plant Physiology*, 143(1), 188–198.
- Sivitz, A. B., Reinders, A., & Ward, J. M. (2008). *Arabidopsis* sucrose transporter AtSUC1 is important for pollen germination and sucrose-induced anthocyanin accumulation. *Plant Physiology*, 147(1), 92–100.
- Song, S., Chen, Y., Liu, L., See, Y. H. B., Mao, C., Gan, Y., & Yu, H. (2018). *OsFTIP7* determines auxin-mediated anther dehiscence in rice. *Nature Plants*, 4(7), 495–504.
- Stadler, R., Truernit, E., Gahrtz, M., & Sauer, N. (1999). The AtSUC1 sucrose carrier may represent the osmotic driving force for anther dehiscence and pollen tube growth in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 19(3), 269–278.
- Stintzi, A., & Browse, J. (2000). The *Arabidopsis* male-sterile mutant, *opr3*, lacks the 12-oxophytodienoic acid reductase required for jasmonate synthesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(19), 10625–10630.
- Thines, B., Katsir, L., Melotto, M., Niu, Y., Mandaokar, A., Liu, G., ... Browse, J. (2007). JAZ repressor proteins are targets of the SCF<sup>COI1</sup> complex during jasmonate signalling. *Nature*, 448(7154), 661–665.
- Van Norman, J. M., & Benfey, P. N. (2009). *Arabidopsis thaliana* as a model organism in systems biology. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Systems Biology and Medicine*, 1(3), 372–379.
- Venkatesh, C. S. (1957). The form, structure and special ways of dehiscence of anthers of *Cassia* — III. Subgenus *Senna*. *Phytomorphology*, 7, 253–273.
- Vosolobě, S., Petrášek, J., & Schwarzerová, K. (2017). Evolutionary plasticity of plasma membrane interaction in DREPP family proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1859(5), 686–697.
- Wang, D. K., Sun, G. F., Wang, L. F., Zhai, S., & Cen, X. J. (2009). A novel mechanism controls anther opening and closing in *Paris polyphylla* var. *Yunnanensis*. *Chinese Science Bulletin*, 54(2), 244–248.
- Wang, Y., & Kumar, P. P. (2007). Characterization of two ethylene receptors PhERS1 and PhETR2 from petunia: PhETR2 regulates timing of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, 58(3), 533–544.
- Wilson, Z. A., Song, J., Taylor, B., & Yang, C. (2011). The final split: The regulation of anther dehiscence. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 62, pp. 1633–1649.
- Woodward, A. W., & Bartel, B. (2005). Auxin: Regulation, action, and interaction. *Annals of Botany*, 95(5), 707–735.
- Woycicki, Z. (1924). Recherches sur la déhiscence des anthères et le rôle du stômium. *Revue Générale de Botanique*, 36, 196–212.

- Xiao, Y., Chen, Y., Charnikhova, T., Mulder, P. P. J., Heijmans, J., Hoogenboom, A., ... Ouwerkerk, P. B. F. (2014). *OsJAR1* is required for JA-regulated floret opening and anther dehiscence in rice. *Plant Molecular Biology*, *86*(1–2), 19–33.
- Xu, L., Liu, F., Lechner, E., Genschik, P., Crosby, W. L., Ma, H., ... Xie, D. (2002). The SCF<sup>CO11</sup> ubiquitin-ligase complexes are required for jasmonate response in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, *14*(8), 1919–1935.
- Xu, X. F., Wang, B., Feng, Y. F., Xue, J. S., Qian, X. X., Liu, S. Q., ... Yang, Z. N. (2019). AUXIN RESPONSE FACTOR17 directly regulates *MYB108* for anther dehiscence. *Plant Physiology*, *181*(2), 645–655.
- Yang, C., Song, J., Ferguson, A. C., Klisch, D., Simpson, K., Mo, R., ... Wilson, Z. A. (2017). Transcription factor MYB26 is key to spatial specificity in anther secondary thickening formation. *Plant Physiology*, *175*(1), 333–350.
- Yang, C., Xu, Z., Song, J., Conner, K., Barrena, G. V., & Wilson, Z. A. (2007). *Arabidopsis* MYB26/MALE STERILE35 regulates secondary thickening in the endothecium and is essential for anther dehiscence. *Plant Cell*, *19*(2), 534–548.
- Yates, I. E., & Sparks, D. (1993). Environmental regulation of anther dehiscence and pollen germination in pecan. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, *118*(6), 699–706.
- Yew, C. L., Kakui, H., & Shimizu, K. K. (2018). *Agrobacterium*-mediated floral dip transformation of the model polyploid species *Arabidopsis kamchatica*. *Journal of Plant Research*, *131*(2), 349–358.
- Zhang, D., & Yang, L. (2014). Specification of tapetum and microsporocyte cells within the anther. *Current Opinion in Plant Biology*, *17*(1), 49–55.
- Zhao, Y., Christensen, S. K., Fankhauser, C., Cashman, J. R., Cohen, J. D., Weigel, D., & Chory, J. (2001). A role for flavin monooxygenase-like enzymes in auxin biosynthesis. *Science*, *291*(5502), 306–309.
- Zoner Photo Studio X. <https://www.zoner.cz/>.