



**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Laboratoř růstových regulátorů**

**Genotypizace a tvorba vícenásobných knockoutových  
linií cytokininových transportérů *Arabidopsis thaliana***

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

Autor: **Miroslav Mareš**  
Studijní program: B1501 Experimentální biologie  
Studijní obor: Experimentální biologie  
Forma studia: Prezenční  
Vedoucí práce: **Mgr. Martin Hudeček**  
Termín odevzdání práce: 2023

## **Poděkování:**

Nejdříve bych chtěl poděkovat vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Martinu Hudečkovi, za vedení při zpracování, vysvětlení problematiky a používaných metod, za věnovaný čas při práci v laboratoři, a hlavně za jeho obrovskou trpělivost. Poděkování také patří celému kolektivu laboratoře růstových regulátorů za umožnění vypracování bakalářské práce.

## Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Miroslav Mareš
Název práce	Genotypizace a tvorba vícenásobných knockoutových linií cytokininových transportérů <i>Arabidopsis thaliana</i>
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Mgr. Martin Hudeček
Rok obhajoby práce	2023
Abstrakt	

Cytokininy jsou rostlinné hormony ovlivňující růst a vývoj rostlin. Strukturně se jedná o N<sup>6</sup> deriváty adeninu. Cytokininy (CK) jsou syntetizovány dvěma možnými způsoby. Prvním způsobem je biosyntéza *de novo*, která spočívá v prenylaci adeninu za vzniku isopentenyladeninu nebo *trans*-zeatinu. Druhým způsobem je tzv. nepřímá biosyntéza, která spočívá prenylaci adeninu, který je obsažen v transferové RNA (tRNA), následně při její degradaci jsou cytokininy *cis*-zeatinového typu uvolněny do okolí. CK jsou v rostlině transportovány xylémem do nadzemní části rostliny a floémem zpět ke kořenům. Transport probíhá pomocí transportérů. Mezi transportéry CK patří Purinové permeasy (PUP) , které transportují nukleobáze, dále Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT) transportující nukleosidy. Dalším transportérem je ABCG14, který se podílí na transportu na dlouhé vzdálenosti. Nedávno objevený transportér AZG2, který hraje důležitou roli při vývoji laterálních kořenů. Cílem praktické části bakalářské práce byly selekce homozygotních rostlin vybraných T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* v genech, které kódují CK transportéry rodiny ENT a transportér ABCG14. toho bylo docíleno pomocí PCR genotypizace a následné vizualizace pomocí elektroforézy. Homozygotní linie rostlin budou následně použité v dalším výzkumu.

Klíčová slova	Cytokininy, transport cytokininů, ekvilibrativní nukleosidové transportéry, ABCG14, Genotypizace, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Počet stran	51
Počet příloh	-
Jazyk	Český

## Bibliographical identification

Author's first name and surname	Miroslav Mareš
Title of thesis	Genotyping and generation of <i>Arabidopsis thaliana</i> multiple knockout lines of cytokinin transporters
Type of thesis	Bachelor
Department	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Mgr. Martin Hudeček
The year of presentation	2023

### Abstract

Cytokinins are plant hormones that affect plant growth and development. Structurally, they are N6 derivatives of adenine. Cytokinins (CK) are synthesized in two possible ways. The first way is *de novo* biosynthesis, which involves the prenylation of adenine to form isopentenyladenine or trans-zeatin. The second way is the so-called indirect biosynthesis, which consists in the prenylation of adenine contained in transfer RNA (tRNA), then upon its degradation, cis-zeatin-type cytokinins are released into the environment. CKs are transported in the plant by the xylem to the aerial part of the plant and by the phloem back to the roots. Transport is by transporters. CK transporters include Purine permeases (PUPs) that transport nucleobases, and Equilibrative nucleoside transporters (ENTs) that transport nucleosides. Another transporter is ABCG14, which is involved in long-distance transport. A recently discovered transporter, AZG2, plays an important role in lateral roots development. The main goal of the practical part of the bachelor thesis was to select homozygous plants of selected T-DNA insertion lines of *Arabidopsis thaliana* in genes encoding CK transporters of the ENT family and ABCG14 transporter. This was achieved by PCR genotyping and subsequent visualization by electrophoresis. The homozygous plant lines will subsequently be used in further research.

Keywords	Cytokinins, cytokinin transport, equilibrative nucleoside transporters, ABCG14, Genotyping, <i>Arabidopsis thaliana</i>
Number of pages	51
Number of appendices	-
Language	Czech (English)

## **Prohlášení:**

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

V Olomouci dne: ..... Podpis bakaláře: .....

## **Cíle práce:**

- Sepsání literární rešerše na transport cytokininů
- Genotypizace T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* v genech kódující cytokininové transportéry, za účelem selekce homozygotů.
- Křížení homozygotních linií a příprava vícenásobných homozygotních linií
- Zpracování výsledků
- Sepsání bakalářské práce

# Obsah

1. Úvod.....	1
2. Současný stav řešené problematiky .....	2
2.1 Struktura cytokininů.....	2
2.2 Biosyntéza cytokininů.....	3
2.2.1 Biosyntéza cytokininů <i>de novo</i> .....	5
2.2.2 Nepřímá biosyntéza cytokininů .....	6
2.3 Regulace cytokininové homeostázy.....	7
2.3.1 Aktivace cytokininů.....	8
2.3.2 Inaktivace cytokininů .....	8
2.3.3 Nevratná degradace cytokininů .....	9
2.4 Cytokininová signalizace .....	10
2.5 Transport cytokininů.....	11
2.5.1 Purinové permeasy (PUP) .....	13
2.5.2 Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT).....	15
2.5.3 AZA-GUANINE RESISTANT (AZG) 2 .....	17
2.5.4 ABCG14 transportér.....	18
2.6 Genotypizace T-DNA inzerčních linií .....	20
2.7 Křížení linií <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	21
3. Experimentální část.....	23
3.1 Materiál.....	23
3.1.1 Chemikálie.....	23
3.1.2 Roztoky a média .....	23
3.1.3 Biologický materiál .....	24
3.1.4 Přístroje.....	25
3.1.5 Softwarové programy .....	26
3.2 Metody .....	26
3.2.1 Příprava MS média pro klíčení semen.....	26
3.2.2 Sterilizace a výsev semen <i>Arabidopsis thaliana</i> na MS médium.....	26
3.2.3 Genotypizace .....	27
3.2.3.1 Izolace genomové DNA <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	27
3.2.3.2 Polymerázová řetězová reakce .....	27
3.2.3.3 Gelová elektroforéza.....	29
4. Výsledky .....	30
4.1 Selektce homozygotní T-DNA inzerčních linií.....	30

4.1.1	Transportér ABCG14 .....	30
4.1.2	Transportér ENT2.....	31
4.1.3	Transportér ENT3.....	32
4.1.4	Transportér ENT 8.....	33
4.2	Příprava vícenásobných homozygotních T-DNA inzerčních linií křížením s linií <i>ent1</i> ...	35
4.2.1	Linie <i>abcg14ent1</i> .....	35
4.2.2	Linie <i>ent1ent3</i> .....	38
5.	Diskuse.....	41
6.	Závěr .....	43
7.	Použitá literatura .....	44
8.	Použité zkratky.....	50



# 1. Úvod

Cytokinininy (CK) jsou fytohormony, mezi jejichž hlavní funkce patří kontrola buněčného dělení, vývoj a růst rostliny, včetně apikální dominance, větvení výhonků a kořenů, expanze a senescence listů, růst postranních pupenů, klíčení semen a florální přechod (Frebort *et al.*, 2011). Krátce po jejich objevu (Miller *et al.*, 1955) bylo navrženo, že spolu s auxiny hrají hlavní roli v morfogenezi rostlin (Skoog a Miller, 1957).

V roce 1955 byla izolována nová sloučenina nazvaná kinetin ze staré nebo autoklátované (ale ne čerstvé) DNA ze spermatu sledě a telecího brzlíku (Miller *et al.*, 1955). Název kinetin byl zvolen proto, že tato látka mohla podporovat buněčné dělení – cytokinezi. Tato schopnost také dala jméno zcela nové třídě fytohormonů – cytokininům. CK jsou definovány jako „látky, které podporují buněčné dělení a vykonávají další regulační funkce růstu stejným způsobem jako kinetin“ (Skoog a Armstrong, 1970).

Mezi další fytohormony se řadí, auxiny, gibbereliny, brassinosteroidy, kyselina abscisová, polyaminy, ethylen, kyselina salicylová a strigolaktony. Dnes jsou fytohormony definované jako látky přirozeně se vyskytující v rostlině působící v nízkých koncentracích, které jsou schopny translokace v rostlině a vázání na specifický receptorový protein (Frebort *et al.*, 2011).

V teoretické části bakalářské práce se věnuji charakteristice CK, jejich struktuře, metabolismu a transportu v rostlině, pomocí purinových permeas (PUP) a ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT). Dále se zaměřuji na transportér AZG2 regulující vývoj laterálních kořenů a transportér AtABCG14, který zajišťuje dálkový CK transport.

Cílem experimentální části mé bakalářské práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny vybraných T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* s nefunkčními geny kódující CK transportéry a jejich následné zkřížení s mutantními liniemi pro domnělý CK transportér - ekvilibrativní nukleosidový transportér 1 (*ENT1*) s cílem vytvoření vícenásobných „knock-out“ (KO) linií.

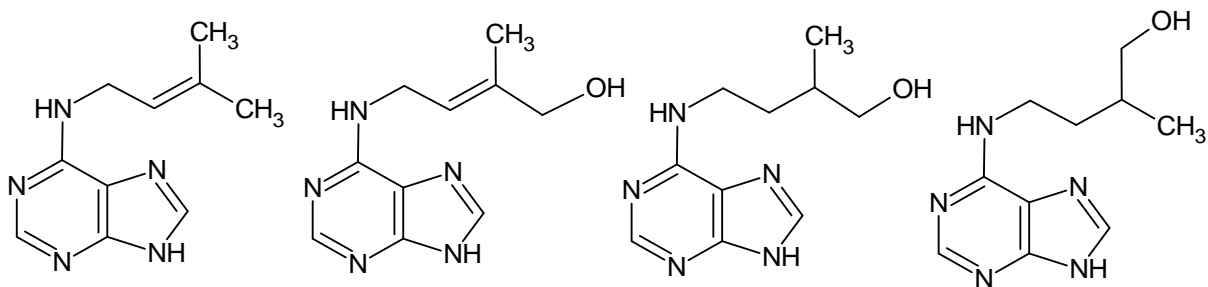
## 2. Současný stav řešené problematiky

### 2.1 Struktura cytokininů

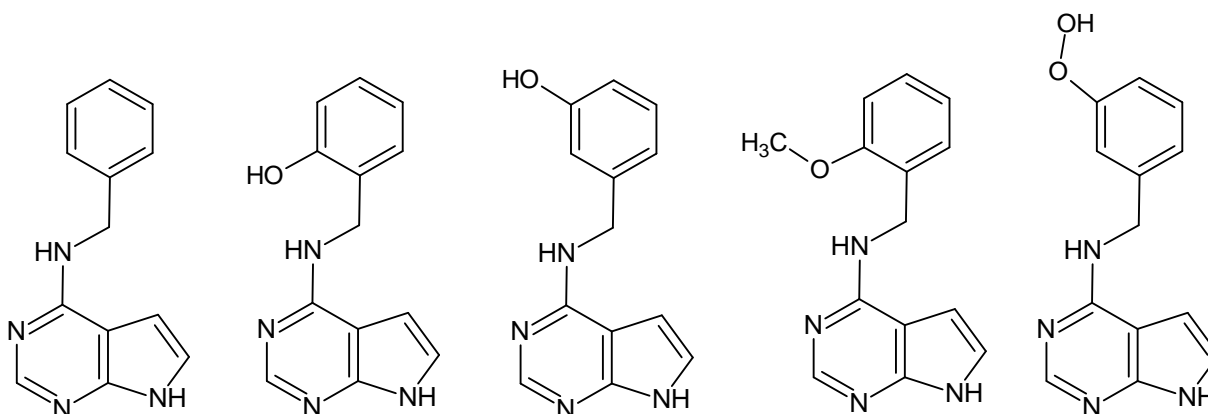
Chemicky CK představují N<sup>6</sup> deriváty adeninu, avšak CK aktivitu vykazují i některé deriváty fenylmočoviny. Přírodně se vyskytující CK jsou adeniny, které mají isoprenoidní, nebo aromatický postranní řetězec právě v poloze N<sup>6</sup>. Isoprenoidní řetězec isopentyladeninu N<sup>6</sup>- ( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin může být hydroxylován buď *cis*-, nebo *trans*- koncové poloze za vzniku zeatinu, který byl pojmenován podle objevu v kukuřici (*Zea mays* L.; Letham, 1963). Dvojná vazba zeatinu je redukována v dihydrozeatinu (dZ) N<sup>6</sup>- (4-hydroxy-3-methylbutyl)adenin redukováný ekvivalent isopentyladeninu však nebyl v rostlině detekován. Isoprenoidní CK jsou velmi rozšířené v přírodě, zatímco aromatické CK byly dlouhou dobu považovány za syntetické látky (Schmitz a Skoog, 1972).

CK se mohou vyskytovat v rostlinách jako volné báze, ale i ve formě nukleosidů a nukleotidů. CK báze mohou být dále konjugovány glukózou na pozicích N<sup>3</sup>, N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> adeninového kruhu, dále pak může docházet ke konjugaci na postranním hydroxylovém řetězci. (Frebort, 2011). Mezi nejvýznamnější isoprenoidní CK vyskytující se v rostlinách patří N<sup>6</sup>- (A<sup>2</sup>-isopentenyl)adenin (iP), *cis*-zeatin (cZ), *trans*-zeatin (tZ), dihydrozeatin (dZ). Isopentyladenin (iP) společně s *trans*-zeatinem (tZ) jsou majoritně zastoupeny v *Arabidopsis thaliana*, naopak větší množství cZ je zastoupeno například v kukuřici, rýži a cizrně (Sakakibara, 2006).

Aromatické CK mají v postranním řetězci na pozici N<sup>6</sup> adeninu umístěnou aromatickou skupinu místo isoprenové. Prvním nalezeným aromatickým CK byl syntetizovaný 6-benzylaminopurin. Další syntézy a výzkumy vedly k objevu dalších aromatických CK *ortho*-topolin, *meta*-topolin a jejich derivátů, konkrétně methoxy-derivátu *ortho*-topolinu a methoxy-derivátu *meta*-topolinu. Aromatické CK a jejich methoxy-deriváty se nacházejí v přírodě velmi vzácně, pouze v některých rostlinách (Strnad, 1997).



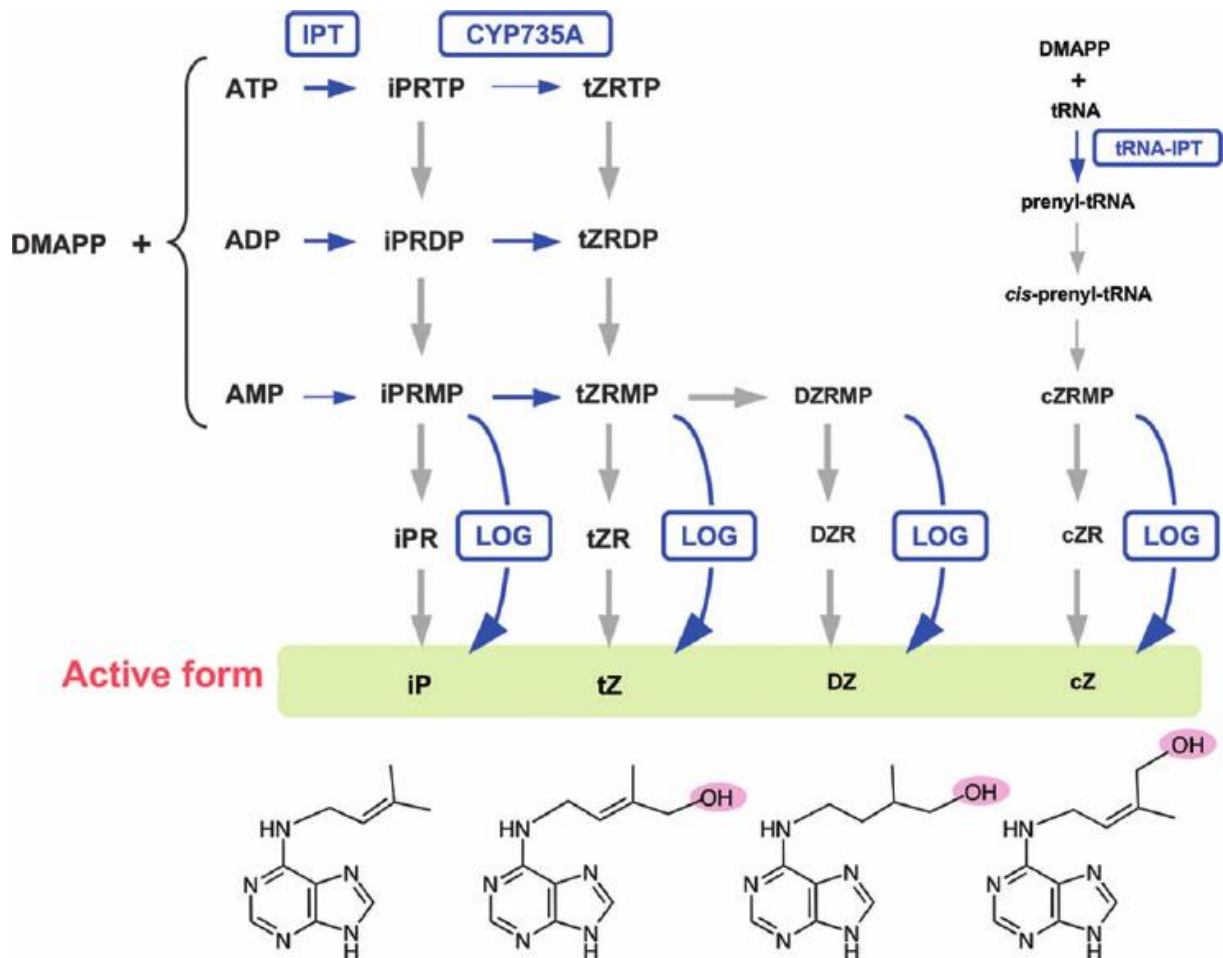
Obrázek 1: Isoprenoidní CK, zleva: Isopentenyladenin, *trans*-zeatin, dihydrozeatin, *cis*-zeatin. obrázky byly vytvořené v aplikaci chemsketch



Obrázek 2: aromatické CK, zleva: Benzyladenin, *ortho*-topolin, *meta*-topolin, *ortho*-methoxytopolin, *meta*-methoxytopolin. Obrázky vytvořeny v aplikaci chemsketch.

## 2.2 Biosyntéza cytokininů

CK mohou být syntetizovány dvěma různými biosyntetickými cestami. První tzv. přímou cestou je syntéza *de novo*, která spočívá v prenylaci adenosin fosfátu, za vytvoření N<sup>6</sup>-isopentenyladenosin fosfátu. Druhá nepřímá cesta, dochází také k prenylaci adenosinu v molekule RNA (tRNA), která je následně degradována a dochází k uvolnění CK (Obrázek 3; Sakakibara, 2006).



Obrázek 3: Model klíčových kroků biosyntézy CK pomocí dvou biosyntetických cest a jejich následná aktivace. Modře zabarvené šipky jsou reakce katalyzované již objevenými enzymy, šedé šipky jsou reakce s dosud nepopsanými enzymy. Více podrobností v (Sakakibara, 2006). DMAPP dimethylallyldifosfát, ATP adenosin trifosfát, ADP adenosin difosfát, AMP adenosin monofosfát, iPRTP isopentenyladenosin ribosid 5'-trifosfát, iPRDP isopentenyladenosin ribosid 5'-difosfát, iPRMP isopentenyladenosin ribosid 5'-monofosfát, iPR isopentenyladenosin ribosid, iP N 6 - ( $\Delta^2$ -isopentenyl)adenin, tZRTP trans-zeatin ribosid 5'-trifosfát, tZRDP trans-zeatin ribosid 5'-difosfát, tZRMP trans-zeatin ribosid 5'-monofosfát, tZR trans-zeatin ribosid, tZ trans-zeatin, DZRMP dihydrozeatin ribosid 5'-monofosfát, DZR dihydrozeatin ribosid, DZ dihydrozeatin, tRNA transferová RNA, cZRMP cis-zeatin ribosid 5'-monofosfát, cZR cis-zeatin ribosid, cZ cis-zeatin, IPT isopentenyl transferáza, CYP735A cytokinin hydroxylasa, LOG lonely guy enzym, tRNA-IPT tRNA isopentenyltransferasa; převzato z Hirose et al., 2007.

## 2.2.1 Biosyntéza cytokininů *de novo*

Biosyntéza *de novo* začíná N-prenylací adenosin 5-fosfátu (mono-, di- a tri-fosfátu) na N<sup>6</sup> konec za katalýzy enzymu adenosin fosfát-isopentenyltransferázou. Donory prenylace mohou být dimethylallyldifosfát (DMAPP) nebo hydroxymehtylbutenyl difosfát (HMBDP) na N<sup>6</sup> konec za katalýzy enzymu adenosin fosfát-isopentenyltransferasou (Sakakibara, 2006). Vzniklým produktem je isopentenyladenin (iP) nebo *trans*-zeatin (tZ) (Sakakibara, 2004).

První biosyntetická aktivita byla popsána u hlenky *D. discoideum* (Taya *et al.*, 1978), avšak první biosyntetický gen byl poprvé objeven v bakterii *Agrobacterium tumefaciens*. Gen *Tmr* (tumour morphology root) kódující enzym IPT, je lokalizovaný v T-DNA oblasti na Ti plazmidu (tumour induction), byl schopný způsobit tumorigenezi nezávisle na jiných T-DNA genech. Kromě genu *Tmr*, je v *Agrobacterium tumefaciens* přítomen ještě gen *Tzs* (trans-zeatin synthesizing), který je exprimován přímo v bakterii, nikoli v rostlině (Lichtenstein *et al.*, 1984).

Pro *Agrobacterium tumefaciens* bylo zjištěno, že IPT, *Tmr* využívá AMP a DMAPP nebo HMBDP substráty *in vitro*, avšak HMBDP je využíván *in vivo* (Sakakibara, 2005), zatímco u vyšších rostlin pro AMP byla zjištěna velmi malá katalytická účinnost a velmi malá koncentrace v buňkách, tudíž AMP není vhodným a upřednostňovaným substrátem pro enzym IPT, který radši upřednostňuje ADP a ATP. jako prenylový donor je použit DMAPP. Výsledný produkt je iP ribosid-5-difosfát (iPRDP) nebo iP ribosid-5-trifosfát (iPRTP) (Kakimoto, 2001).

Jsou nám známy 2 typy enzymu IPT, adenylátový IPT a tRNA IPT. Adenylátový IPT přidává isopentenyllovou skupinu k atomu AMP, ADP a ATP (avšak ne adenin, či adenosin) v pozici N<sup>6</sup>. druhý typ enzymu tRNA IPT přidává isopentenyllovou skupinu na adenin obsažený v tRNA, působí v nepřímé CK biosyntéze (Takei *et al.*, 2001a).

Identifikace isopentenyl transferas byla umožněna, díky sekvenování genomu rostliny *Arabidopsis thaliana*, která nese celkem 9 genů kódujících enzym IPT. 7 genů kóduje adenylátový IPT *AtIPT1* a *AtIPT3-AtIPT8*. Zbývající 2 geny *AtIPT2* a *AtIPT9* kódují tRNA IPT. (Kakimoto, 2001). Pro zjištění lokalizace, byly geny *AtIPT* fúzovány se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Bylo zjištěno, že *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* a *AtIPT8* se nachází v plastidech, produkují CK tZ a iP s DMAPP pomocí methylerythritolfosfátové (MEP) dráhy. Zatímco *AtIPT2* *AtIPT4* a *AtIPT7*, které jsou lokalizovány v cytosolu, produkují cZ a iP pomocí mevalonátové (MVA) dráhy a substrátu DMAPP (Kasahara *et al.*, 2004).

Pro CK *trans*-zeatinového typu existují dvě biosyntetické možnosti. Dráha závislá na isopentenyladeninu, kde po připojení DMAPP a následné tvorby nukleotidu

isopentenyladeninu dochází k hydroxylaci postranního řetězce monooxygenázou cytochromu P450 a dráha nezávislá na isopentenyladeninu, kde je tZ produkován přenesením hydroxylovaného postranního řetězce z prekursoru HMBDP na molekulu adeninu (Sakakibara *et al.*, 2005).

MVA dráha začíná kondenzací 3 molekul acetylkoenzymu-A (Acetyl-CoA), při které dochází k redukci na mevalonát. Ten je poté dvakrát fosforylován za vzniku mevalonát-5-disfosfátu. Mevalonát-5-difosfát je fosforylován potřetí a s následnou dekarboxylací řízenou defosforylací vzniká produkt isopentenyldifosfát, který je izomerován na DMAPP sloužící jako CK prekurzor (Frebort, 2011).

MEP dráha začíná kondenzací pyruvátu a glyceraldehyd-3-fosfátu, kdy vzniká 1-deoxy-d-xyluloza-fosfát, který je převeden na methylethritolfosfát (MEP) pomocí reductoisomerasy. Poté je MEP spojen s cytidylfosfátovou skupinou. Následuje fosforylace a uvolnění cytidin-monofosfátu (CMP) a cyklizace. Následnou redukcí je připraven HMBDP, který může být i nadále redukován na isopentenylypyrofosfát nebo na DMAPP (Sakakibara *et al.*, 2005).

## 2.2.2 Nepřímá biosyntéza cytokininů

*Arabidopsis thaliana* má 2 geny, které kódují enzym tRNA IPT. Jsou to geny *AtIPT2* a *AtIPT9*. Pomocí nepřímé biosyntézy degradací tRNA vznikají *cis*- CK izomery, především *cZ*. V tRNA většiny organismů jsou navázány vedle antikodonů modifikované adeniny. CK jsou syntetizovány pomocí přenosu isopentenylové skupiny z 2 methylallylpyrofosfátu na atom konjugovaného adeninu v poloze N<sup>6</sup>. Tato prenylace probíhá pomocí enzymu tRNA isopentenylyltransferasy. Pokud je tRNA degradována, jsou uvolněny CK do okolí (Golovko *et al.*, 2002).

Degradace tRNA není jediný způsob, jak vytvořit *cis*-izomery CK. Další možnou variantou zdroje *cZ* je aktivita zeatin *cis-trans* izomerasy. Tento enzym pro svoji aktivitu vyžaduje světlo a přítomnost flavinu a dithiothreitolu. Žádná další charakterizace enzymu však nebyla popsána (Bassil *et al.*, 1993).

## 2.3 Regulace cytokininové homeostázy

Množství endogenních cytokininů závisí na rovnováze mezi syntézou *de novo*, rychlostí importu a exportu, vzájemnou přeměnou různých forem, přechodnou inaktivací konjugací (nejvíce glykosylací) a také v neposlední řadě katabolickými reakcemi vedoucími k úplné ztrátě biologické aktivity (Sakakibara, 2006).

CK jsou schopné působit ve velmi malých koncentracích, působí například jako parakrinní lokální signál v meristematických tkáních i jako distální signál například pro signální dostupnost výživy (Sakakibara, 2006). Při vychýlené distribuci *trans*-zeatinových CK v xylému a isopentenyladeninových CK ve floému dochází k zapojení selektivních transportních systémů (Hirose *et al.*, 2008).

Kyselina abscisová (ABA) a ethylen urychlují příznaky senescence rostlin, exogenní aplikace CK inhibuje degradaci chlorofylu a dalších fotosyntetických proteinů a tím dochází ke zpoždění senescence. Senescence je též zpožděna v transgenních rostlinách, které produkují cytokinin pomocí zvýšené exprese bakteriálního genu IPT, který kóduje enzym katalyzující první krok biosyntézy cytokininů (Wingler *et al.*, 1998).

Expese klíčových genů pro biosyntézu cytokininů řídí homeostázu CK nukleotidů. Expese hlavních genů pro biosyntézu CK a homeostázu, mezi které patří IPT, CYP735A a cytokinin oxidasa/hydrogenasa (CKX), je regulována fytohormony, včetně cytokininů, auxinů a kyseliny abscisové (ABA). U *Arabidopsis* je expese genů *AtIPT5* a *AtIPT7* podporována auxinem v kořenech. Zatímco expese genů *AtIPT1*, *AtIPT3*, *AtIPT5* a *AtIPT7* je negativně regulována CK, expese CYP735A1 a CYP735A2 je regulována pozitivně. Naopak je jejich expese negativně regulována pomocí auxinu nebo ABA (Sakakibara, 2006).

Regulace nemusí být řízena jen fytohormony, ale může být řízena i přívodem dusíku, protože anorganický dusík ovlivňuje růst a vývoj rostliny, které vždy reagují na stav živin a přizpůsobují své metabolické dráhy a vývoj za účelem efektivního přizpůsobení nutričnímu prostředí. Mezi látky, které udávají stav o dusíkatých živin v celé rostlině pomocí xylému patří i CK. Expese *AtIPT3* a *AtIPT5* je rozdílně regulována v závislosti koncentraci dusíku. *AtIPT3* reaguje na koncentraci NO<sub>3</sub>, zatímco *AtIPT5* reaguje na koncentraci jak NO<sub>3</sub>, tak i NH<sub>4</sub>. tento systém je důležitý pro rostliny, které se musí vypořádat s měnící se dostupností dusíku. Jelikož se jedná o důležité enzymy, je zde teorie, že biosyntéza CK je závislá na zdrojích dusíku (Sakakibara, 2006).



## 2.3.1 Aktivace cytokininů

CK, které byly syntetizované přímou biosyntézou, jsou nízkoaktivní nukleotidové mono-, di- a trifosfáty. CK syntetizované nepřímou biosyntézou jsou produkovány ve formě nukleotidových monofosfátů. Aktivní formy tZ a isopentenyladeninu vznikají z příslušných nukleotidů přímou cestou, nebo ve dvou krocích (Sakakibara, 2006).

Přímá dráha produkuje příslušné cytokinin nukleové báze z cytokinin ribosid-5'-monofosfátu pomocí enzymu cytokinin ribosid-5'-monofosfát fosforibohydrolasy, která je nazývána Lonely Guy (LOG). Enzym LOG byl poprvé identifikován u rostlin rýže, ve které byly změněné meristémy výhonků, zmenšenou velikostí laty a abnormálním vzorem větvení (Kurakawa *et al.*, 2007). Cílem dvou krokové cesty je přeměna cytokinin ribosid-5'-monofosfátu na odpovídající nukleosid a příslušné nukleové báze pomocí cytokinin-specifické nukleotidasy a nukleosidas (Chen a Kristopeit 1981).

## 2.3.2 Inaktivace cytokininů

CK mohou být inaktivovány dočasně nebo trvale, pomocí glykosylace cytokininu. Glukosylace byla zpozorována na N<sup>3</sup>,N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> purinové skupiny jako N-glukosidy a na hydroxylové skupině postranních řetězců tZ, dZ a cZ jako O-glukosidy a O-xylosidy, kde dochází ke glykosylaci na pozici N<sup>6</sup>. O-glukosidy představují neaktivní a stabilní formy cytokininů odolné vůči enzymu CKX. O-glukosylace je reverzibilní proces a může dojít k deglukosylaci pomocí enzymu β-glukosidasou. Naopak N-glukosylace je nevratný proces pro N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> glukosidy (Sakakibara, 2006). N<sup>3</sup> glykosidy mohou být deglykosylovány společně s O-glukosidy pomocí enzymu β-glukosidas (Brzobohatý *et al.*, 1993).

V *Arabidopsis thaliana* byly zjištěny 2 geny *UGT76C1* a *UGT76C2*, které kódují enzym N-glukosyltranserasu katalyzující přenos glukosidové skupiny z uridin-5'-difosfoglukózy na atomy jak isoprenoidních, tak aromatických CK v pozici N<sup>7</sup> a N<sup>9</sup> (Sakakibara, 2006). Enzym CKX katalyzuje nevratnou přeměnu pomocí štěpením postranního řetězce cytokininu. Stabilita cytokininů má velký vliv na biologickou aktivitu. Pomocí stability je také určen afinita k metabolickým enzymům. CKX velmi snadno katalyzuje iP a tZ, avšak cZ je velmi obtížně přístupný. Aromatické CK a dZ nejsou katalyzovány enzymem CKX (Frebort, 2011).

Při aplikaci inaktivovaných N<sup>9</sup>-glukosidů do určitých rostlinných tkání, jsou glukosidy schopné měnit jejich vývoj v nanomolárních koncentracích způsobem odpovídajících volných



bází. Nevratnost inaktivace N<sup>9</sup>-glukosidů je stále nejasná, kvůli velmi malému množství studií, které se zabývají aktivitou  $\beta$ -glukosidas s různými typy cytokinin- glukosidů. (Frebort, 2011).

### 2.3.3 Nevratná degradace cytokininů

Nevratná degradace cytokininů je způsobena oxidativním štěpením postranního řetězce v pozici N<sup>6</sup>. Produktem této degradace je molekula adeninu a molekula aldehydu, který byl vytvořen z postranního řetězce. CK je dehydrogenován na iminová produkt odebráním dvou elektronů z flavinového komplexu enzymu. Enzym byla nazván CK oxidasa, avšak kyslík nebyl jediným akceptorem elektronů. Hlavním akceptorem elektronů je 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon, který mnohem efektivněji akceptuje elektrony. Proto byl enzym přerazen do skupiny dehydrogenáz přejmenován na cytokinindehydrogenasa (CKX) (Frebortova *et al.*, 2004).

CKX je jediný enzym u které byla prokázána katalýzy nevratná degradace cytokininů. Jeho aktivita byla stanovena u mnoha rostlinných druhů a také u několika nižších organismů, například u hlenky *D. discoideum*, mechu *Funaria hygrometrica* a u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*. Kukuřičný enzym CKX zvaný ZmCKX1 byl nalezen v aurelové vrstvě v jádrech a v doprovodných floémových buňkách v kukuřičném stonku. Spolu s enzymem byly nalezeny i laktázy, což naznačuje, že fenolické sloučeniny by mohly sloužit jako prekurzor akceptoru elektronů enzymu CKX (Galuszka *et al.*, 2005).

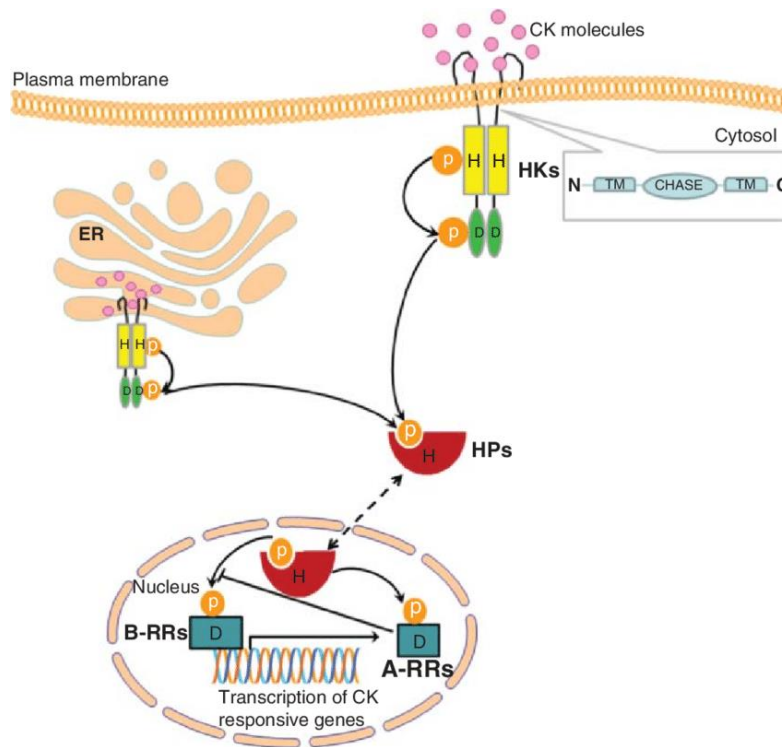
Z důvodu velmi nízké koncentrace enzymů CKX v rostlinách, je izolace čistého proteinu velmi složitá. Nicméně díky klonování genu CKX z kukuřice byla umožněna identifikace enzymu CKX v jiných rostlinách. U všech rostlinných CKX enzymů byla nalezena kovalentně vázaná molekula Flavinadeninukleotidu (FAD), která je připojena k histidinovému zbytku konzervovaného motivu GHS v N-termální části enzymu přes 8-methylovou skupinu isoaloxazinového kruhu (Malito *et al.* 2004).

## 2.4 Cytokininová signalizace

Signalizace CK má velmi důležitou roli při vývoji rostliny. Rostlinné hormony jsou vnímány různých místech v buňce, například signalizace brassinosteroidů začíná na plazmatické membráně (Yu *et al.*, 2018), zatím co ethylenová signalizace na endoplazmatickém retikulu (Yang *et al.*, 2015).

Receptory CK jsou transmembránové proteiny, lokalizované jak na endoplazmatickém retikulu, tak na plazmatické membráně, s histidinkinaseovou aktivitou. Receptory jsou na jedné straně membrány, histidinkinasa s přilehlými doménami je na opačné straně. Po aktivaci receptoru je signál je pístopitě přenášen přes membránu a pomocí histidin-aspartátové fosforylace (Romanov *et al.*, 2018). Signál je přenášen na histidinkinase (HK), která iniciuje přenos pomocí autofosforylace konzervovaného histidinového zbytku na HK, která vede přenos signálu pomocí fosforylace aspartátového zbytku na stejné HK. Fosfátová skupina je následně přenesena na histidin fosfotransferasu, který je transportován do jádra, kde následně přenáší fosfátovou skupinu do regulátorů odpovědi aktivující transkripci CK odpovídajících genů (Obrázek 4; Thu *et al.*, 2017).

Doposud není úplně jednoznačné, která organela je dominantním místem pro příjem a spouštění cytokininové signální dráhy, protože HK *Arabidopsis thaliana* jsou lokalizovány jak na cytoplazmatické membráně, tak na membráně endoplazmatického retikula (Wulfetange *et al.*, 2011). Profil pH aktivity cytokininových receptorů podporuje signalizaci z lumenu endoplazmatického retikula (Romanov *et al.*, 2018). Nedávné studie však potvrdily také důležitost PM signalizace (Antoniadi *et al.*, 2020; Kubiasová *et al.*, 2020). Primárním cílem CK jsou geny na ně citlivé, tudíž nehledě na místo lokalizace receptoru CK, by měla jeho ligandem spuštěná signalizace vyvolat expresi v jádře buňky.



Obrázek 4: Model kaskádového přenosu signálu CK v rostlinách *Arabidopsis*. HK histidinkinasa zahrnující *Arabidopsis* histidinkinasy AHK2, AHK3 a AHK4, HP histidin fosfotransfer, RR regulátor odezvy typu A a typu B. ER endoplazmatické retikulum, CHASE senzitivní extracelulární asociaci s cyklasami/histidinkinasami, TM transmembránové domény; převzato z Thu *et al.*, 2017).

## 2.5 Transport cytokininů

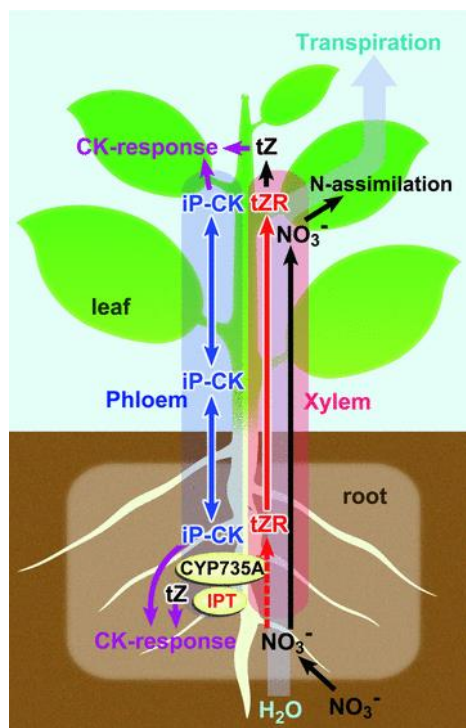
CK mohou vyvolávat účinky na buňku samotnou, ve které byly syntetizovány (autokrinní signalizace), dále mohou působit v lokálně na okolní buňky (parakrinní signalizace) nebo mohou působit na velmi vzdálené buňky formou dálkových signálů. Tyto účinky jsou způsobeny různými druhy CK, které jsou syntetizovány a distribuovány v různých typech rostlinných tkání a orgánů (Sakakibara, 2006).

Při růstu rostliny a dormanci květů, hraje velmi důležitou roli vzájemná regulace fytohormonů auxinu, ABA a právě cytokininů. V hrachu je exprese *IPT* genů, konkrétně *PsIPT1* a *PsIPT2*, které jsou lokalizovány v uzlinách rostliny, negativně řízená auxinem. Platí zde tedy předpoklad protichůdné funkce auxinů při regulaci cytokininů. Bylo dokázáno, že jedna z funkcí apexem odvozeného auxinu v apikální dominanci je inhibice syntézy CK v uzlinách rostliny. Následně jsou CK syntetizovány lokálně ve stonku rostliny, než aby byly transportovány z kořenů (Tanaka *et al.*, 2006).

Geny pro *IPT3* a *IPT5* jsou exprimovány v kořenech, kde následně dochází k transportu přes xylém do nadzemní části rostliny a následně floémem zpět ke kořenům. Potvrzují tak dohad, že CK slouží jako signální molekuly na dlouhé vzdálenosti. Ve vyšších rostlinách je xylémový akropetální transport CK poháněn transpiračním proudem. Floémový transport dodává fotosyntát do celého těla rostliny. V xylémové šťávě byl lokalizován CK tZ ribosid (tZR) (Takei *et al.*, 2001; Hirose *et al.*, 2008), naopak ve floému byly lokalizovány CK typu iP, iP ribosid a iP ribotin (Corbesier *et al.*, 2003; Hirose *et al.*, 2008). Předpokládá se, že molekuly tZR jsou v xylému používány jako akropetální posel, zatímco iP, iP ribosid a iP ribotin fungují jako bazopetální poslové ve floému (Kudo *et al.*, 2010).

Cytokininový transport je regulován enviromentálními a endogenními signály. Xylémový tok CK je regulován přidáním nitrátu, který pozitivně reguluje biosyntézu trans-zeatin ribosidu (tZR). Dohaduje se, že tZR funguje jako posel nitrátových signálů. Následně nitrátem regulované CK transportované xylémovým pletivem vyvolávají v listech akumulaci transkriptů genů, které reagují na cytokininový signál v listech (Kudo *et al.*, 2010).

Jelikož *de novo* syntéza katalyzovaná IPT enzymy je specifická pro různé tkáně a buňky, musí být CK přeneseny k cílovým buňkám pomocí difuze, nebo pomocí selektivních transportních systémů. Teorii selektivního transportního systému podporuje fakt, že rostlinné buňky jsou schopné absorbovat cytokininové nukleobáze a nukleosidy, avšak CK typu iP a tZ jsou hromaděny ve xylému a ve floému. V kultivovaných buňkách *Arabidopsis thaliana* prochází adenin a nukleobáze přes membrány pomocí protonově spřaženého transportního systému s vysokou afinitou (Sakakibara, 2006).



Obrázek 5: Schéma transportu cytokininů na dlouhé vzdálenosti v rostlině akropetálně pomocí xylému (červeně) do nadzemních částí rostliny a bazopetálně pomocí floému (modře) do kořenů, hlavními přenášenými CK jsou trans-zeatin ribosid, trans-zeatin, a isopentenyladenosinové CK. Nitrát pozitivně reguluje koncentraci cytokininů v xylému pomocí exprese *AtIPT3*. tZR trans-zeatin ribosid, tZ trans-zeatin, iP-CK isopentenyladenosinové cytokinininy, IPT isopentenyltransferázy, CYP735A cytokinin hydroxylasa, H<sub>2</sub>O voda, NO<sub>3</sub><sup>-</sup> nitrát; převzato z Kudo, et al., 2010.

## 2.5.1 Purinové permeasy (PUP)

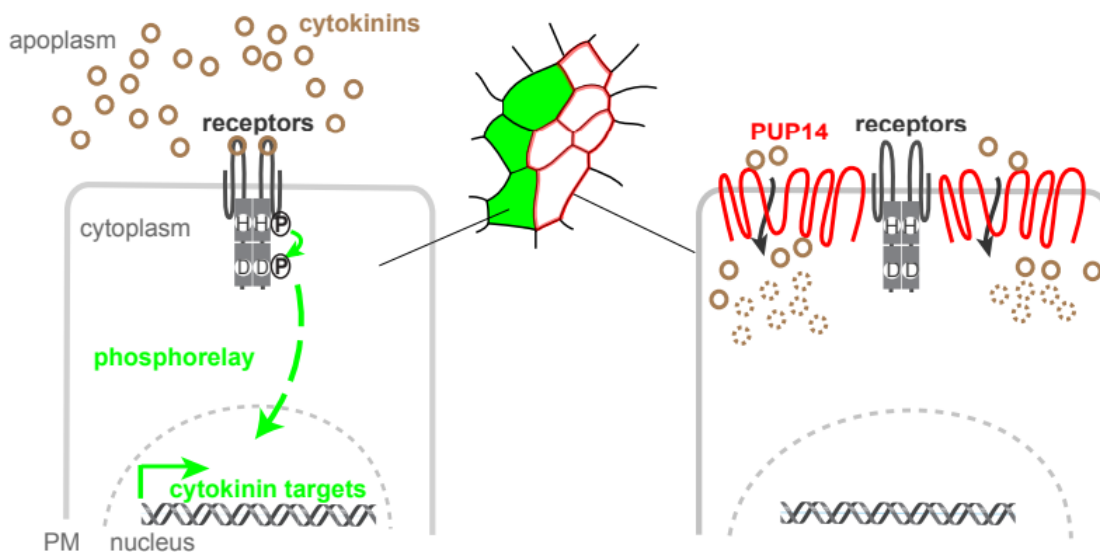
V *Arabidopsis thaliana* se nachází celkem 21 genů, kódujících purinové permeasy. Tyto PUP transportéry mají 10 predikovaných transmembránových domén a jsou lokalizovány v cytoplazmatických membránách (Jelesko, 2012).

Dva geny pro purinové permeasy (PUP) v kultivovaných rostlinách *Arabidopsis*, *AtPUP1* a *AtPUP2*, exprimují enzymy, které zprostředkovávají vstřebávání nukleobáze CK. PUP mají širokou substrátovou specifitu a zprostředkovávají příjem derivátů adeninu, jako je samotný adenin a kofein. Exprese genu *AtPUP1* pozorovanou v epitemu hydrotod a na povrchu stigmatu naznačuje jeho roli při získávání CK z xylémové mízy a tím zabraňuje ztrátě během gutace rostlin. Exprese *AtPUP2* je lokalizována ve floému a má funkci při dálkovém transportu CK v rostlině (Sakakibara, 2006).

Dohaduje se, že heterologně exprimovaný *AtPUP3* transportuje dosud neurčený substrát do pylových buněk. Při porovnání s transportéry *AtPUP1,2* vykazuje *AtPUP3* neofunkční

vlastnosti v rozpoznání substrátu. AtPUP1 se podílí na zachytávání CK během gutace listů, zatímco AtPUP2 se podílí na transportu CK do floému. Tyto fyziologické funkce jsou však jen předpokládáné, na jejich potvrzení či vyvrácení jsou potřeba studie rostlin se změněným AtPUP1 a AtPUP2 na úrovni exprese (Bürkle *et al.*, 2003).

Transportér Purin Permease 14 (PUP14) negativně ovlivňuje odpovědi na signalizaci CK během vývoje *Arabidopsis thaliana*. Exprese *PUP14* byla inverzně korelována se čtením signálů CK. Pokud je funkce PUP14 ztracena, dochází k abnormální morfogenezi embrya, kořenů a apikálního meristému stonku. Protein PUP14 je lokalizován na plazmatické membráně importuje biologicky aktivní CK, čímž dochází k vyčerpání jejich apoplastické zásoby. V důsledku dochází k inhibici percepce na plazmatické membráně (Obrázek 6). CK senzory v plazmatické membráně vytvářejí jímku pro aktivní ligandy. PUP14 je jediným členem PUP, který je spojen přímo s CK signalizací ve všech rostlinných orgánech. Po odstranění funkce PUP14 bylo během časového okna bylo zabráněno sekundárním efektům včetně smrtlosti pomocí umělé mikro RNA (amiR) cílením na PUP14 za vzniku amiRPUP14. Při vyvolání exprese amiRPUP14 byla způsobena signalizace ektopického CK v embryu i v možných buňkách děložních listů, které jinak nereagují na léčbu exogenními CK. N- glykosylace, popřípadě O- glykosylace, oxidační štěpení CK může přispívat ke snížení jejich intracelulární (Zürcher *et al.*, 2016).



Obrázek 6: Popis funkce PUP14 v cytokininové signalizaci. PUP14 (označeno červeně) způsobuje přenos apoplastických cytokininů do buňky, kde jsou přeměněny na neaktivní formy (označeno tečkovanými kruhy). Translokace cytokininů z apoplastu dovnitř buňky vede ke snížení cytokininové signalizace, protože vázání cytokininů na cytokininové receptory na plazmatické membráně se snižuje a tím i přenos cytokininového signálu (označen zeleně). PM: plazmatická membrána; převzato ze Zürcher et al., 2016.

## 2.5.2 Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT)

Ačkoli jsou nukleobáze cytokininů přítomny jak v xylému, tak i ve floému, jsou CK mnohem více zastoupeny ve formě nukleosidů např. tZR. Navíc mají CK nukleosidy větší mobilitu než nukleobáze, proto je považujeme za hlavní formy transportu CK. Dohaduje se, že u vyšších rostlin je pomocí ekvilibrativních nukleosidových transportérů (ENT) zprostředkován selektivní transport cytokininových nukleosidů. (Sakakibara, 2006).

Transportéry nukleosidů pracují na principu protonového symportu. Jsou děleny do dvou skupin. První skupinou jsou Ekvilibrativní nukleosidové transportéry (ENT), které transportují CK po směru koncentračního gradientu. Druhou skupinou jsou koncentrační nukleosidové transportéry (CNT) schopné transportovat nukleosidy CK proti koncentračnímu gradientu. V genomu rýže jsou lokalizovány 4 geny pro ENT, zatímco v *Arabidopsis thaliana* se nachází 8 členů skupiny ENT, přičemž ENT1, 3, 4, 6 a 7 jsou popsány na biochemické úrovni pomocí heterologní exprese v *Saccharomyces cerevisiae* (Möhlmann et al., 2001). Jeden z produktů rýžového genomu OsENT2 je zodpovědný za příjem nukleosidů CK stejně jako adenosinu, dále selektivně upřednostňuje isopentenyladenosin ribosid před tZR. Je zodpovědný za transport



vybraných cytokininů v xylému a ve floému (Hirose *et al.*, 2005). Všechny tyto transportéry mají širokou substrátovou specifitu, kdy jsou schopny transportovat pyrimidinové a purinové nukleosidy s velkou afinitou v rozmezí 3  $\mu\text{M}$  do 90  $\mu\text{M}$  (Bernard *et al.*, 2011).

ENT1 byl prvním detekovaným nukleosidovým transportérem v *Arabidopsis thaliana* (Möhlmann *et al.* 2001). Na základě proteomických studií byl lokalizován v membráně tonoplastu mezofylových buněk *Arabidopsis thaliana* (Jaquinod *et al.*, 2007; Bernard *et al.*, 2011). Jeho exprese byla nejvíce lokalizovaná v pylu, dále v hydatodách pravých listů, kořenové špičce, elongační a diferenciací zóně kořene (Bernard *et al.*, 2011). ENT1 je považován za exportér adenosinu z vakuoly do cytosolu a hraje důležitou roli při klíčení pylu (Bernard *et al.*, 2011). Na rozdíl od ostatních zástupců ENT rodiny, nebyla schopnost transportu cytokininových ribosidů v případě transportéru ENT1 doposud prokázána (Wormit *et al.*, 2004; Sun *et al.*, 2005; Bernard *et al.*, 2011).

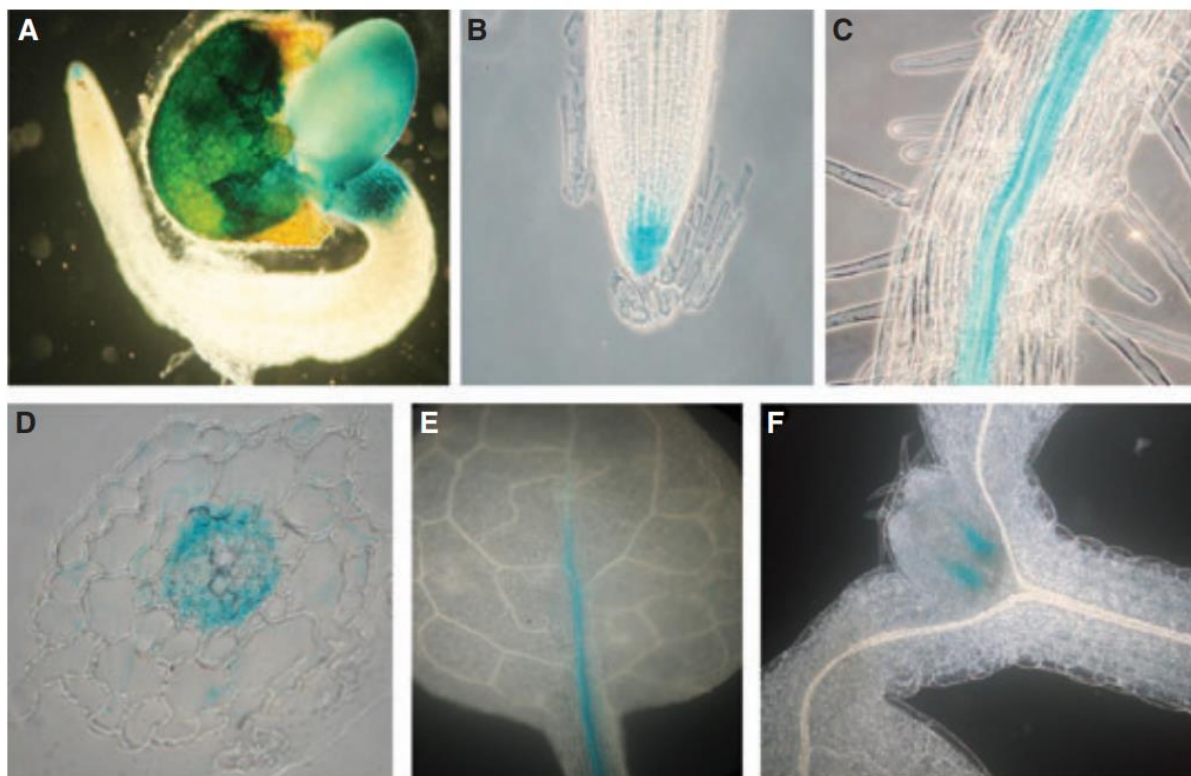
Transportér ENT3 byl lokalizovaný na plazmatické membráně (Li *et al.*, 2003). Použití  $\beta$ -glukuronidázového reportérového systému (GUS) pro analýzu exprese *ENT3* promotoru v semenáčcích odhalilo pletivově specifickou expresi v kořenové špičce a v kořenovém krčku (Obrázek 7; Cornelius *et al.*, 2012). V 16ti denních semenáčcích byla exprese lokalizována v celé délce kořenu, avšak jen v jeho vaskulární oblasti. Další exprese byla lokalizována v listové vaskulatuře a meristému listových primordií (Obrázek 7; Cornelius *et al.*, 2012).

V cytokininovém transportu na dlouhou vzdálenost by ENT3 mohl hrát důležitou roli v dálkovém transportu CK pomocí jejich nakládání do a/nebo vykládání z floému (Cornelius *et al.*, 2012). Rezistence mutantní linie *ent3-1* vůči toxickému flurouridinu (Traub *et al.*, 2007) naznačuje, že ENT3 by mohl představovat vstupní bránu CK ribosidů do symplastu, možná i do endodermis (Cornelius *et al.*, 2012).

Kontrola akumulace CK v kořenech způsobená transportéry ENT se pravděpodobně podílí na regulaci růstu kořenů. ENT3 se také může podílet na modulaci rovnováhy distribuce CK mezi výhonky a kořeny. Tato modulace je klíčová pro správný vývoj obou částí rostliny. (Korobova *et al.*, 2021).

Výrazná exprese genů ENT1 a ENT3 v kořenech *Arabidopsis thaliana* predikuje, že transport nukleosidů v kořenech není tak výrazný jako v listech, květech či v šesuli. ENT1, 3, 6 a 8 byly také exprimovány v šesuli rostliny čímž poukazují na důležitost transportu nukleosidů v embryonální tkáni. Transportéry ENT1, 4 a 8 byly exprimovány ve stonku, mohou se podílet na importu a vychytávání CK nukleosidů v cévních svazcích. Transportér ENT7 byl nejvíce exprimován společně s ostatními transportéry v listech a květech (Li *et al.*, 2003).



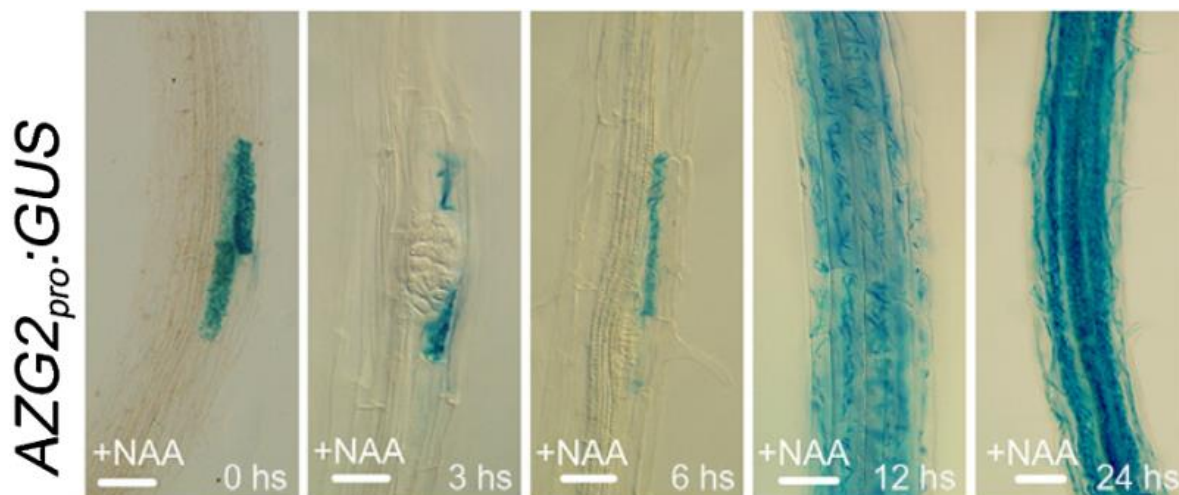


Obrázek 7: Pletivově specifická exprese *ENT3* zobrazená pomocí  $\beta$ -glukuronidasového reportérového systému (*GUS*). A: Dvoudenní semenáček, B–F: 16-denní semenáčky, A: celý semenáček, B: kořenová špička, C: podélný řez diferenciální zóny s kořenovými vlásky, D: průřez elongační zóny kořene, E: list, F: listová primordia reprezentativních linií pro činnost *GUS*; převzato z Cornelius *et al.*, 2012.

### 2.5.3 AZA-GUANINE RESISTANT (AZG) 2

Mezi členy rodiny purinových transportérů AZA-GUANINE RESISTANT (AZG) byl nedávno objeven nový cytokininový transportér v *Arabidopsis thaliana*: AZG2. Na subcellulární úrovni vykazuje tenhle cytokininový transportér duální lokalizaci – je lokalizován na cytoplazmatické membráně, a především na membráně endoplazmatického retikula. Tento transportér je nezávislý na pH a je exprimován v malém počtu buněk obklopujících primordium laterálních kořenů (Obrázek 8; Tessi *et al.*, 2021).

Bylo zjištěno, že AZG2 transportuje s vysokou účinností nejen puriny, ale také tZ a další CK. To naznačuje, že tento transportér je nejspíše zapojen do regulace růstu postranních kořenů pomocí CK. Exogenní ošetření auxinem kyselinou 1-naftyloctovou (NAA) indukovalo expresi AZG2 (Obrázek 8), což naznačuje regulační roli AZG2 v hormonální interakci mezi CK a auxiny během růstu postranních kořenů. (Tessi *et al.*, 2021).



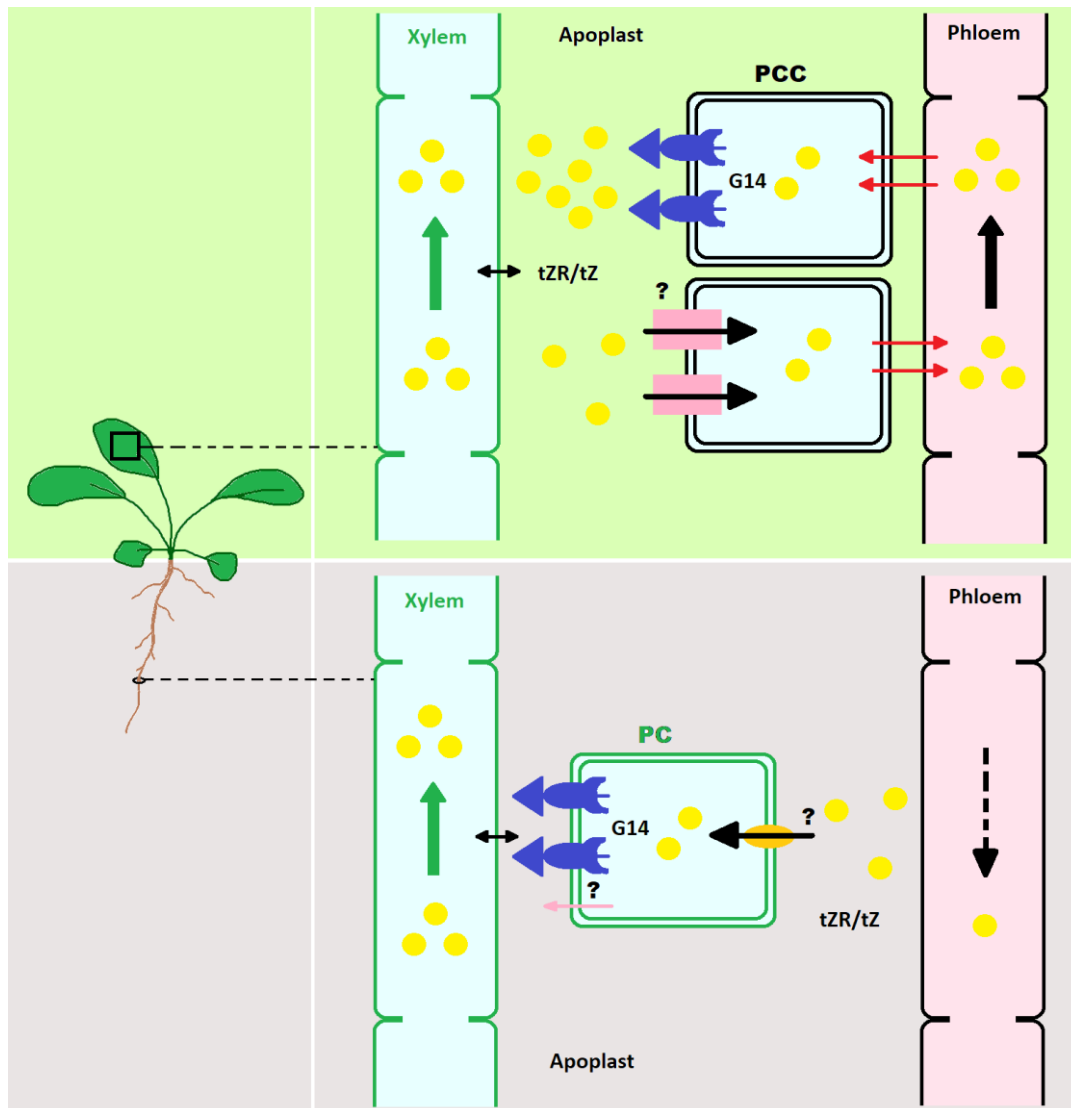
Obrázek 8: Pletivově specifická exprese *AZG2* zobrazená pomocí  $\beta$ -glukuronidasového reportérového systému (*GUS*). Exprese *AZG2* je indukována auxinem: 1  $\mu$ M ošetření kořenů transgenní *Arabidopsis* s *AZG2pro::GUS* konstruktem kyselinou 1-naftyloctovou (*NAA*) po dobu 0, 3, 6, 12 a 24 hodin ukazuje silnou indukci exprese po 12 hodinách ošetření; upraveno podle Tessi *et al.*, 2021.

## 2.5.4 ABCG14 transportér

ATP binding cassette (ABC) transportéry jsou jedna z největších rodin, které katalyzují export a import mnoha metabolitů v organismech. Genom *Arabidopsis* obsahuje přes 120 transportních genů, které jsou z většiny membránově vázaných proteinů. Jeho podrodina G (ABCG) má celkem 28 komplexních polovičních transportérů a 15 plnohodnotných transportérů, které jsou rezistentní na pleiotropní léky (Kudo *et al.*, 2010). Některé ABCG transportéry jsou odpovědné za export auxinových sloučenin, kutinu a vosku, dále za transport ABA (Kuromori *et al.*, 2010). I přes charakterizování mnoha druhů transportérů ABCG zůstávají některé biologické a biochemické funkce neznámé.

Při vyřazení transportéru AtABCG14, který je vysoce exprimovaný ve vaskulárních tkáních kořenů, dochází k narušení transportu a distribuce cytokininů typu tZ syntetizovaných v kořenech *Arabidopsis thaliana*. Toto narušení následně způsobuje morfologické změny v růstu kořenů a výhonků a narušení akropetální distribuce CK v rostlině (Zhang *et al.*, 2014). Na základě výsledků roubovacích experimentů s mutantními liniemi *abcg14* byl představen model transportu CK, především tZ a tZR na dlouhou vzdálenost, z kořene do nadzemní části (Obrázek 9; Zhao *et al.*, 2021).

Nedávní publikace odhaluje roli transportéru ABCG14 v transportu iP a iPR na dlouhou vzdálenost - z kořene do nadzemní části, ale také z nadzemní části zpátky do kořene (Zhao *et al.*, 2023).



Obrázek 9: Schéma znázorňující funkci ABCG14 při nakládání cytokininů produkovaných kořeny a jejich distribuci v *Arabidopsis*. tZR/tZ vznikají v buňkách pericyklu (PCs) nebo jsou získány z apoplastu a nakládány do xylému kořenů pomocí AtABCG14 (G14) nebo dosud neznámou cestou. CK jsou transportovány do xylému prostřednictvím transpiračního proudu v listech a nakládány do nadzemní části nebo do hlavních cév floému neznámým transportérem (?). CK jsou ze zdroje transportovány do malých cév floému a uvolňovány do apoplastu pomocí AtABCG14 v buňkách průvodního pletiva floému (PCCs). Malé množství cytokininů ve floému se může recyklovat zpět do kořene. tZ - trans-zeatin; tZR - tZ-ribosid; G14 - AtABCG14; PCC - buňky průvodního pletiva floému; PC - buňky pericyklu; ? - neznámý mechanismus; upraveno podle Zhao *et al.*, 2021.

## 2.6 Genotypizace T-DNA inzerčních linií

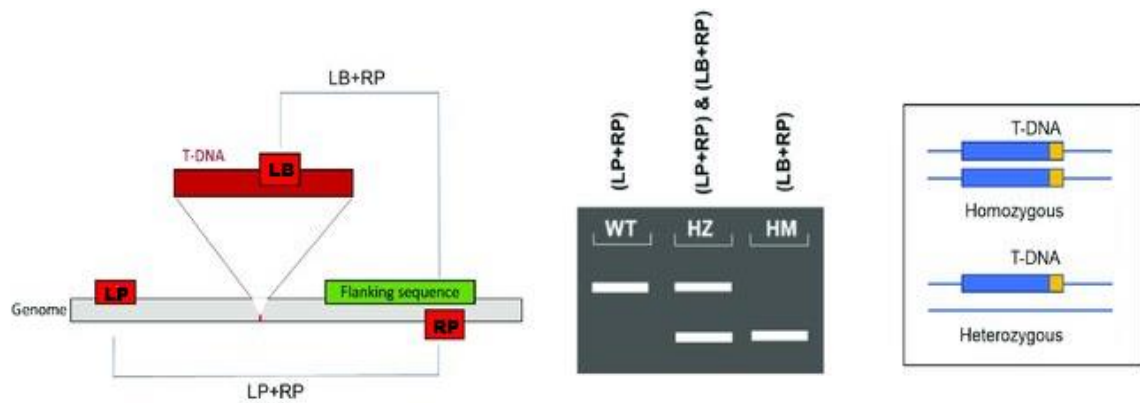
T-DNA inzerční linie jsou rostliny *Arabidopsis*, které byly transformovány pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která obsahuje plasmid s transferovou DNA (T-DNA). Tyto bakterie jsou v přírodě schopné přenášet T-DNA do genomu rostlin (Zambryski *et al.*, 1982). Náhodné vložení T-DNA do genomu *Arabidopsis* může způsobit přerušení čtecího rámce daného genu. T-DNA inzerční linie jsou významné pro výzkum a funkční analýzu genů, protože umožňují vytvoření mutací v konkrétních genech, což umožňuje testovat jejich funkci a význam v různých procesech rostlinné biologie. Tyto linie jsou také využívány pro srovnávací genomiku a identifikaci nových genů, což má potenciál pro vývoj nových rostlinných odrůd s vylepšenými vlastnostmi, jako jsou například větší výnosy nebo lepší odolnost vůči škůdcům nebo podnebí.

Genotypizace je metoda, při které jsou určeny rozdíly v genetické výbavě jedince pomocí biologických testů a zkoumání nukleových kyselin. Genotypizace u rostlin je prováděna pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR) s následnou elektroforetickou vizualizací.

Při genotypizaci T-DNA inzerčních linií se obvykle používají kombinace primerů, které umožňují detekci přítomnosti T-DNA v genomu rostliny. Nejčastěji se používají dva druhy primerů:

1. Levý hraniční (LB) primer - tento primer amplifikuje sekvenci na levé hraně T-DNA
2. Genově-specifický levý a pravý primer (LP a RP) - tyto primery nasedají na sekvenci genu, do kterého byla T-DNA vložena.

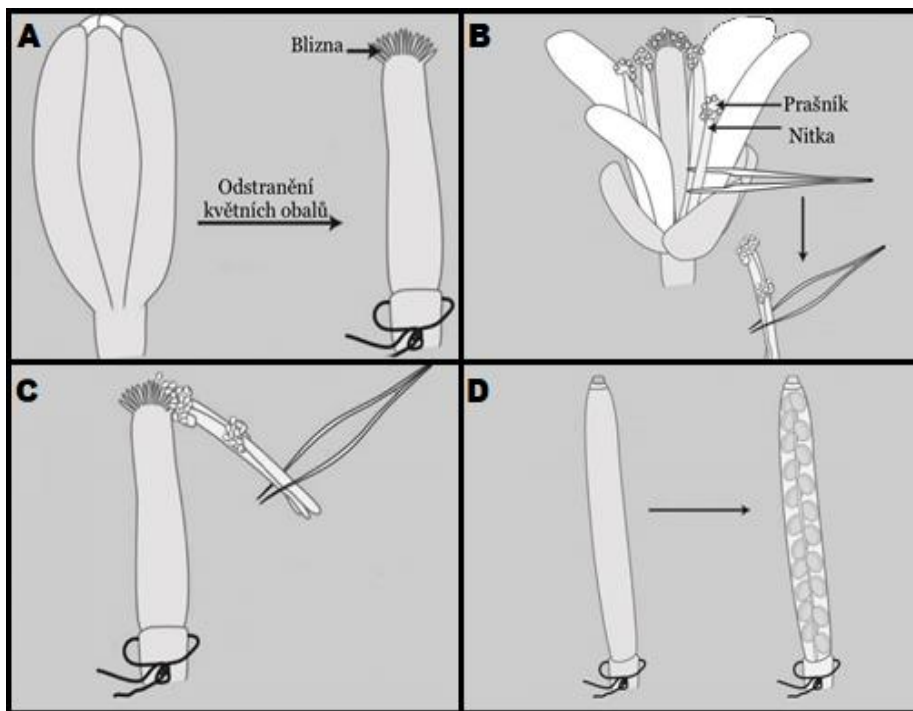
Princip genotypizace T-DNA inzerčních linií spočívá v použití specifických primerů, které se vážou na sekvence v oblasti, kde byla T-DNA vložena do genomu rostliny. Pokud je rostlina heterozygotní, tedy má T-DNA vloženu pouze do jedné alely, amplifikace produktu by měla proběhnout u obou kombinací primerů LP+RP a LB+RP. Pokud je rostlina homozygotní, tedy má T-DNA vloženo do obou alel, amplifikace produktu se očekává pouze z kombinace LB+RP primerů, protože T-DNA inzerce přerušující gen je příliš velká (až 8000bp) na to, aby DNA-polymerasa stihla produkt nasynthetizovat. Rostlina divého typu by měla vytvářet specifický produkt výhradně z kombinace genově specifických primerů LP+RP (Obrázek 10).



Obrázek 10: Schéma ukazující kombinace primerů pro screening T-DNA inserčních mutantů. Amplifikační produkt z heterozygotního jedince by měl být vytvořen z kombinace LP+RP a LB+RP, protože obsahuje inserci T-DNA v jedné alele. Amplifikace z homozygotního jedince se očekává pouze z kombinace LB+RP primerů, protože má T-DNA inserci v obou alelách genu, a WT rostliny by měly vytvářet produkt s kombinací LP+RP. LP - levý primer; RP - pravý primer; LB - levý hraniční primer, HZ – heterozygotní; HM – homozygotní; upraveno podle Batth et al., 2020.

## 2.7 Křížení linií *Arabidopsis thaliana*

*Arabidopsis thaliana* se stala významným modelovým organismem v oblasti rostlinné biologie díky své rychlé reprodukci, jednoduchému pěstování, či malému genomu, jehož kompletní sekvence je známá už přes 20 let (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Díky jednoduché manipulaci, rychlému reprodukčnímu cyklu a tvorbě velkého počtu semen je *Arabidopsis* vhodnou rostlinou také pro křížení a následnou přípravu vícenásobných mutantních linií. Princip křížení spočívá v odstranění všech plodů a otevřených květů. Ze zbylých neotevřených květů mohou být opatrně odstraněny také kališní lístky a korunní lístky. Následně musí být květy emaskulovány – tzn. jsou velmi opatrně odebrány nezralé tyčinky, aby později nebyly schopny samoopylení. Během odstraňování květních obalů a tyčinek nesmí být manipulováno s bliznou pestíku, která je velmi náchylná k poškození. Následně jsou z květů druhé rostliny určené ke křížení vybrány vhodné tyčinky, které jsou opatrně třeny o bliznu obnaženého pestíku. Po provedení opylení, jsou nezkřížené květy vyštípnuty, aby nedošlo k vývoji nezkřížených linií. Pokud je křížení úspěšné, plody jsou po dozrání sklizeny a semena z takových plodů jsou genotypově všechny uniformní - heterozygoti.



Obrázek 11: Model křížení *Arabidopsis thaliana*, A odstranění květních obalů a tyčinek, ponechání pestíku, B výběr tyčinky s pylem, C samotné křížení v podobě tření tyčinky s pylem o bliznu pestíku (oplození), D po oplození začíná růst šišule, ve které zrají semena. Schéma převzato z <https://www.k8baldwin.com/wp-content/uploads/2020/03/crossing-arabi03.pdf>; 10.05.2023

## 3. Experimentální část

### 3.1 Materiál

#### 3.1.1 Chemikálie

1 kb Plus DNA Ladder – Thermo Fisher Scientific (USA)

2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES) – Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

2-amino-2-hydroxymetylpropan-1,3-diol (Tris) – Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

5X Green GoTaq® Flexi Buffer – Promega (USA)

Agarosa – Carl Roth (Německo)

Alfa Aesar Gellan Gum – Thermo Fisher Scientific (USA)

dNTPs – Thermo Fisher Scientific (USA)

Ethanol – Lachner (Česká republika)

Ethylendiaminetetraoctová kyselina (EDTA) – Penta (Česká republika)

GelRed – Sigma-Aldrich (USA)

GoTaq® Flexi DNA Polymerase – Promega (USA)

Hydroxid draselný – Lachner (Česká republika)

Chlorid hořečnatý - Promega (USA)

Chlorid sodný – Lachner (Česká republika)

Kyselina chlorovodíková – Penta (Česká republika)

Murashige & Skoog including vitamins – Duchefa Biochemie (Nizozemsko)

Nuclease-free voda – Sigma-Aldrich (USA)

Sacharosa – Lachner (Česká republika)

SYBR Safe DNA Gel Stain – Thermo Fisher Scientific (USA)

#### 3.1.2 Roztoky a média

##### 1% Agarosový gel

5 g            Agarosa

500 ml        1x TAE pufr

#### Extrakční pufr pro izolaci DNA (50 ml)

2,5 ml	1M Tris-HCl, pH 7,2 c 50 mM
3 ml	5M NaCl
5 g	Sacharosa

#### MS médium (1 litr)

8 g	Alfa Aesar Gellan Gum
2,2 g	Murashige & Skoog including vitamins
10 ml	2-(N-morfolin)ethansulfonová kyselina (MES)
10 g	Sacharosa
pH	5,7 (upraveno pomocí hydroxidu draselného a kyseliny chlorovodíkové)

#### 50x TAE pufr

2 M	Tris-base
0,5 M	Ethylendiaminotetraoctová kyselina (EDTA)
1 M	Kyselina octová
pH	8,2-8,3

### **3.1.3 Biologický materiál**

V experimentální části byla použita semena inzerčních T-DNA linií z rostliny *Arabidopsis thaliana*, která byla objednána z databáze The Nottingham *Arabidopsis* Stock center.



Tabulka 1: použité linie *Arabidopsis thaliana*

Transportér	Gen	Linie
ABCG14	At1g31770	SK_15917
ENT1	At1g70330	SALK_025174
ENT2	At1g78240	SAIL_862_B04
ENT3	At1g05120	SALK_131585
ENT8	At1g02630	SAIL_290_H08

### 3.1.4 Přístroje

Autokláv 3870 EL-D – Tuttnauer (Nizozemsko)

Centrifuga Micro Star 17R – VWR (USA)

Digitální váhy – Mettler toledo (USA)

Elektroforetická souprava Mini Gel II – VWR (USA)

Fytokomora – Sanyo (Japonsko)

Inkubátor - Memmert (Německo)

Kombinovaná lednice – Liebherr (Švýcarsko)

Laminární box Biohazard box SafeFAST Premium – Faster (Itálie)

Magnetická míchačka – IKA (Německo)

Mikrovláková trouba – Sencor (Česká republika)

Milli-Q Reference Water Purification System – Merck Life Science (Německo)

Minitřepačka Thermomixer C – Eppendorf (Německo)

pH metr - Denver Instrument (USA)

Pipety Research plus 1000; 200; 20; 10µl; 2,5 µl – Eppendorf (Německo)

Stolní pikofuga Combi-spin PCV-2400 – VWR (USA)

Termocykler Biometra TAdvanced 96 SG - Analytik Jena (Německo)

Transiluminátor ChemiDoc EZ Imager – Bio-rad (USA)

Vortex – IKA (Německo)

Výrobník ledu GB 903 HC – Brema (Česká republika)

### **3.1.5 Softwarové programy**

Image Lab™ Software – Bio-Rad (USA)

SnapGene - GSL Biotech LLC (USA)

## **3.2 Metody**

### **3.2.1 Příprava MS média pro klíčení semen**

Pro přípravu 1 litru polovičního Murashige-Skoog (MS) média bylo naváženo na analytických vahách 2,2 gramů MS, 10 g sacharózy a 8g Gelan gum. Do kádinky bylo nalito 800 ml destilované vody, 10 ml MES pufru a všechny navážené složky, kromě 8 gramů Gelan gum. Kádinka byla postavena na magnetickou míchačku, kde za stálého míchání došlo k rozpuštění pevných složek. Následně byla do kádinky vložena elektroda pH metru. pH bylo upraveno pomocí 1M KOH na hodnotu 5,7. Destilovanou vodou byla kádinka doplněna na objem 1 litru. Následně byl do roztoku přidán navážený Gelan gum. Výsledné médium bylo sterilizováno v autoklávu. Po autoklávování bylo médium ve flowboxu rozlito do kultivačních Petriho misek.

### **3.2.2 Sterilizace a výsev semen *Arabidopsis thaliana* na MS médium**

Semena rostliny musela být sterilizována. Sterilizace probíhala ve flowboxu, kde byly nejdříve připraveny kulaté filtrační papíry, které byly smočeny ethanolem. Semena byla z pytlíku přesypána do mikrozkuhavek, následně k nim bylo napipetováno 1000  $\mu$ l 70% ethanolu, ve kterém byla semena ponechána po dobu tří minut. 70% ethanol byl po uplynulé době odpipetován a následně byl k semenům přidán 96% ethanol, ve kterém byla semena po dobu 1 minuty. Semena byla s ethanolem nabrána do špičky pipety a přenesena na filtrační papír, kde proběhlo odpaření ethanolu. Suchá sterilizovaná semena byla vyseta na kultivační misku s MS médiem.

Kultivační Petriho misky byly s vyšetými semeny byly zalepeny porézní lepící páskou a umístěny na 2 dny do tmy do ledničky při teplotě 4 °C, kde došlo ke sjednocení klíčení. Následně byly misky umístěny do fytostronu, kde byly vertikálně kultivovány *in vitro* po dobu 14 dní. Denní režim byl nastaven na tzv. dlouhý den, kdy 16 hodin svítilo světlo a 8 hodin byla tma. Po vyklíčení byly vybrané semenáčky přesazeny do květináčů. Následně byly rostliny pěstovány v režimu dlouhý den, při 43% vlhkosti a teplotě 21 °C.

## 3.2.3 Genotypizace

### 3.2.3.1 Izolace genomové DNA *Arabidopsis thaliana*

Pro extrakci DNA byl z rostliny odstřižen pravý list, který byl následně vložen do mikrozkuřavky. Do mikrozkuřavky byla přidána ocelová kulička, a 500 µl extrakčního pufru obsahujícího 10% sacharózy, 1M Tris-HCl pufr o pH 7,2 a koncentraci 50 mM a 5M NaCl o koncentraci 300mM. Mikrozkuřavka byla umístěna do kulového mlýnku a zhomogenizována při frekvenci 25 Hz. Zhomogenizovaný vzorek byl umístěn na 1 minutu do termobloku za účelem inhibice nukleáz. Po inhibici nukleáz byl vzorek zcentrifugován při 3000g po dobu 3 minut. Po centrifugaci byl odebrán supernatant, ze kterého byly 2 µl použity pro PCR.

### 3.2.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Pro polymerázovou řetězovou reakci (PCR) bylo nutné izolovat genomovou DNA a následně připravit reakční směs, ve které byly vybrané vhodné primery navržené pomocí <http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>.

PCR analýza byla provedena se specifickými primery pro detekci WT alely (wild type neboli bez inserce) a se specifickými primery pro detekci inserční T-DNA knockoutové kazety na alele. Pro detekci WT alely byl použit LP primer a RP primer, které komplementárně nasedají na genomovou DNA. Pokud není přítomna inserční T-DNA je amplifikován PCR produkt v rozmezí primerů LP a RP, který má velikost cca 1000 bp (kromě PCR produktu WT alely ABCG14 transportéru, který měl velikost produktu cca 2400 bp).

PCR produkt WT alely je získán pouze u WT rostliny a u heterozygotní rostliny. Pokud je přítomna inserční T-DNA, nestihne se PCR produkt amplifikovat.

Při detekci inzerční T-DNA alely je použit specifický LB primer a stejný RP primer, používaný pro detekci dané WT alely. V případě přítomnosti inzerce se amplifikuje PCR produkt o velikosti cca 500 bp, záleží na typu linie. Pokud však není inzerce přítomna, produkt nevzniká. PCR produkt je amplifikován pouze u heterozygotní a homozygotní linie.

*Tabulka 2: Složení reakční PCR směsi*

složka PCR směsi	objem na 1 reakci (μl)
DNA Polymeráza Go Taq	0.1
Green Buffer Go Taq	4
MgCl <sub>2</sub>	2
DNTPs	0.4
Levý primer	2
Pravý primer	2
izolovaná DNA z rotsliny	2
Voda	7.5
celkový objem (μl)	20

*Tabulka 3: Nastavení průběhu PCR reakce*

	Teplota (°C)	Čas (s)	Počet cyklů
Úvodní denaturace	95	180	1
Denaturace	95	30	
Nasednutí primerů	55	30	35
Elongace	72	60	
Konečná elongace	72	180	1

Tabulka 4: přehled použitých primerů pro jednotlivé linie *Arabidopsis thaliana*

Gen	Linie	primery pro detekci WT alely	sekvence primerů 5'-3'
ABCG14	SK_15917	ABCG14-P1	ATGCCTCAGAACTGCATAGC
		ABCG14-P2	TTACCGCAACTTCACCCGAT
ENT1	SALK_025174	ENT1_LP	CCATTGATGCTCTCCTGGAAGGATCG
		ENT1_RP	CGACGGCCGTGGAAGGATAGA
ENT2	SAIL_862_B04	ENT2_LP01	TAGCTACTTCGGGGAGAGGAG
		ENT2_RP01	GATGAGACAATCCGGTTTACG
ENT3	SALK_131585	ENT3_L02	CTCGTTTCTTGGAACAGTATGC
		ENT3_R02	CAGCAGAAACAGTTTTGGATCC
ENT8	SAIL_290_H08	ENT8_L02	CTGAAAAGAAGAGTCCCGACC
		ENT8_R02	GCAATCCTAAGGAGGGAGATG

Gen	Linie	Primery pro detekci knockoutové kazety	sekvence primerů 5'-3'
ABCG14	SK_15917	ABCG14-P1	ATGCCTCAGAACTGCATAGC
		pSKTAIL-L1	TTCTCATCTAAGCCCCATTTGG
ENT1	SALK_025174	ENT1_RP	CGACGGCCGTGGAAGGATAGA
		LbaI	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
ENT2	SAIL_862_B04	ENT2_RP01	GATGAGACAATCCGGTTTACG
		SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC
ENT3	SALK_131585	ENT3_R02	CAGCAGAAACAGTTTTGGATCC
		LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
ENT8	SAIL_290_H08	ENT8_R02	GCAATCCTAAGGAGGGAGATG
		SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTCATAACCAATCTCGATACAC

### 3.2.3.3 Gelová elektroforéza

Pro elektroforézu byl připraven 1% agarosový gel připravený navážením 5 gramů agarosu na analytických vahách, následně byla agarosa přesypána ve skleněné lahvi společně s 500 ml 1x TAE pufru, který byl připraven z 20 ml 50x TAE pufru a 980 ml destilované vody. Lahev byla dána do mikrovlnné trouby, dokud nebyla agarosa rozpuštěná. Následně byl tento roztok vložen do elektroforetické vaničky, do které byl přidáno barvivo Gel red, pomocí kterého byly vizualizovány bandy DNA. Do elektroforetické vaničky s roztokem agarosu a barviva byl vložen hřebínek kvůli vzniku jamek. Následně byl gel ponechán ke ztuhnutí. Po ztuhnutí byl gel vložen do elektroforetické vany, kde byl převrstven roztokem 1x TAE pufru. Do krajní jamky byl vložen marker molekulové hmotnosti Gene Ruler 1kb plus DNA Ladder. Do zbývajících jamek byly vloženy reakční směsi, které byly již po PCR. Elektroforéza byla probíhala v gelu a 1x TAE pufru při 100 V po dobu 30 minut. Po uplynulé době byl gel vyjmut a vložen do přístroje Bio-Rad Gel Doc™ EZ Systém a vizualizován v softwarovém programu Image Lab Software.

## 4. Výsledky

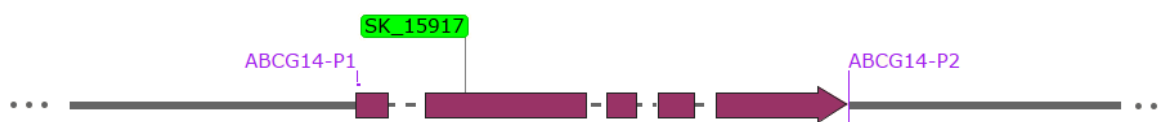
V rámci experimentální části bakalářské práce bylo analyzováno celkem 6 T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* s inzercí v genech *ENT1*, *ENT2*, *ENT3*, *ENT8* a *ABCG14*. Semena linií byla vyseta, následně byly rostliny podrobeny genotypování a vybrané homozygotní line byly určeny ke křížení za účelem tvorby vícenásobné homozygotní linie, která měla homozygotní inzerční alely ve více genech.

Vizualizace proběhla pomocí gelové elektroforézy, kde byly v gelu zobrazeny PCR produkty o různé molekulové hmotnosti. Porovnáním reakce pro WT alelu a pro inzerční alelu bylo zjištěno, zda se jednalo o WT, heterozygota, či homozygota. Rostlina WT měla pouze PCR produkt při detekci WT alely, Heterozygotní rostlina měla přítomné PCR produkty jak v reakci pro detekci WT alely, tak v reakci pro detekci inzerční alely. Homozygotní rostlina měla pouze přítomný produkt v reakci pro detekci inzerční alely. Produkt inzerční alely byl menší než produkt WT alely.

### 4.1 Selektce homozygotní T-DNA inzerčních linií

#### 4.1.1 Transportér ABCG14

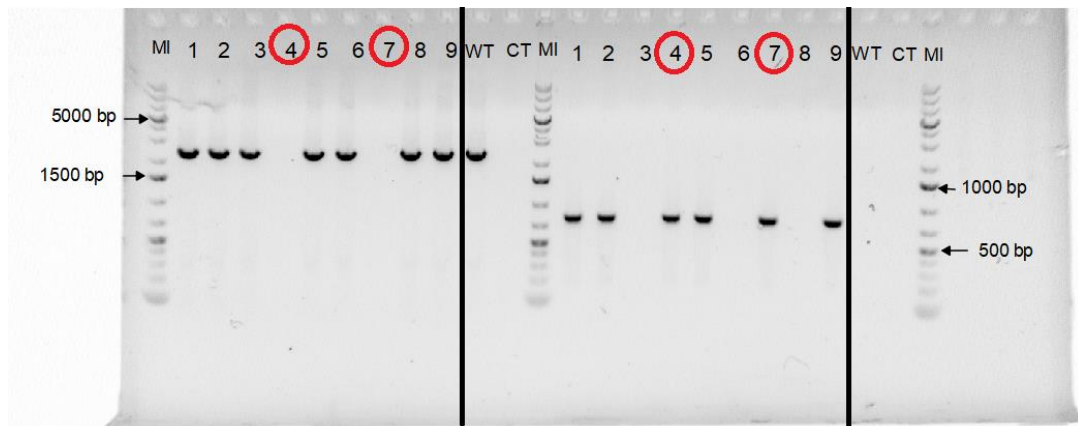
Pro genotypovou analýzu byla použita T-DNA inzerční linie SK\_15917 s inzercí na začátku druhého exonu genu *ABCG14* (Obrázek 12).



Obrázek 12: Schéma umístění T-DNA inzerce v druhém exonu genu *ABCG14* inzerční linie SK\_15917. *ABCG14-P1* a *ABCG14-P2*: primery pro detekci WT alely. Schéma vytvořeno v programu SnapGene.

Pro selekci inzerce v genu *ABCG14* bylo vybráno 9 rostlin linie SK\_15917 ke genotypizaci. Pro detekci WT alely a KO alely byly v PCR reakci použity kompatibilní primery uvedené v Tab. 4. PCR produkt WT alely měl velikost 2400 bp, PCR produkt inzerční alely měl velikost 800 bp. Z devíti kandidátních rostlin byly pouze 2 rostliny označené 4 a 7

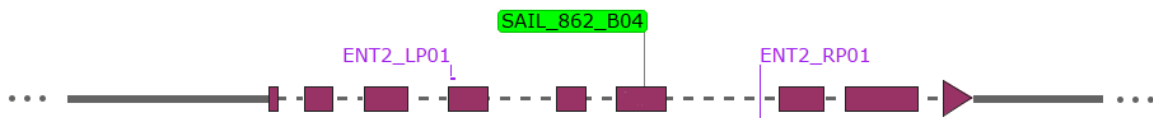
homozygotní (obsahovaly obě inzerční alely). Rostliny označené 3, 6 a 8 obsahovaly pouze WT alely. Zbylé rostliny 1, 2, 5 a 9 byly analyzovány jako heterozygoti (Obrázek 13).



Obrázek 13: Vyhodnocení PCR reakce pro linii *abcG14* (SK\_15917), vlevo 1. PCR reakce s WT primery (ABCG14-P1 + ABCG14-P2), vpravo 2. PCR reakce s primery pro inzerční T-DNA (ABCG14-P1 + pSKTAIL-L1). MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.

## 4.1.2 Transportér ENT2

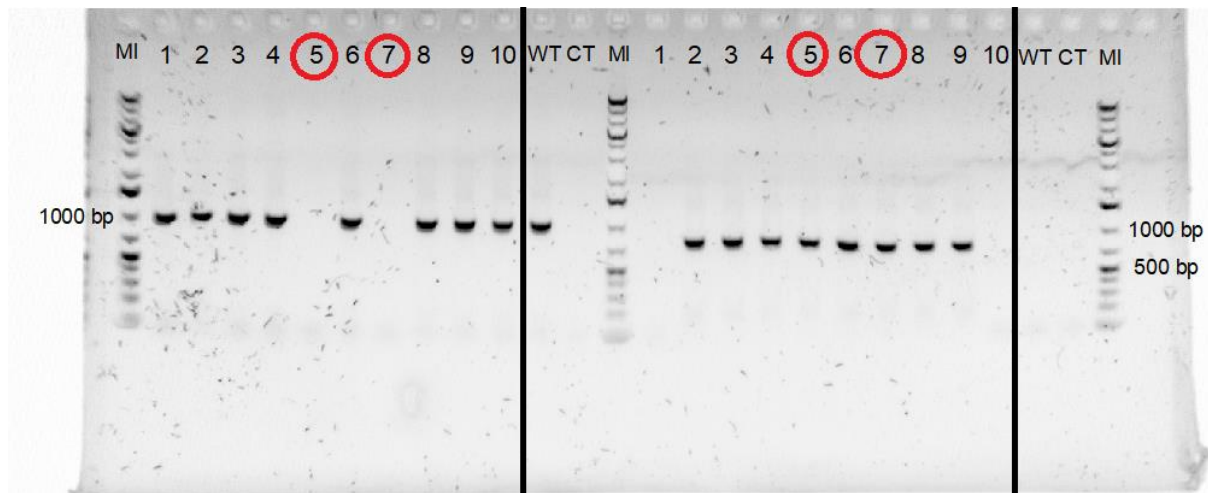
Pro genotypovou analýzu byla použita T-DNA inzerční linie SAIL\_862\_B04 s inzercí uprostřed šestého exonu genu *ENT2* (Obrázek 14).



Obrázek 14: Schéma umístění T-DNA inzerce v šestém exonu genu *ENT2* inzerční linie SAIL\_862\_B04. ENT2\_LP01 a ENT2\_RP01: primery pro detekci WT alely. Schéma vytvořeno v programu SnapGene.

Pro selekci inzerce v genu *ENT2* bylo vybráno 10 rostlin linie SAIL\_862\_B04 ke genotypizaci. Pro PCR detekci WT alely a KO alely byly použity specifické primery uvedené v Tabulce 4. PCR produkt WT alely měl velikost cca 1000 bp, PCR produkt inzerční alely měl velikost cca 800 bp. Z deseti rostlin byly pouze rostliny označené 5 a 7 homozygotní. Rostlina

označená číslem 1 obsahovala pouze WT alely. Zbylé rostliny tj. 2, 3, 4, 6, 8, 9, 10 byly analyzovány jako heterozygotní (Obrázek 15).



Obrázek 15: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ENT2(SAIL\_862\_B04), vlevo 1. PCR reakce s WT primery (ENT2\_LP01 + ENT2\_RP01), vpravo 2. PCR reakce s primery pro inzerční T-DNA (SAIL\_LB3 + ENT2\_RP01). MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.

### 4.1.3 Transportér ENT3

Pro genotypovou analýzu byla použita T-DNA inzerční linie SALK\_131585 s inzercí uprostřed čtvrtého exonu genu *ENT3* (Obrázek 16).

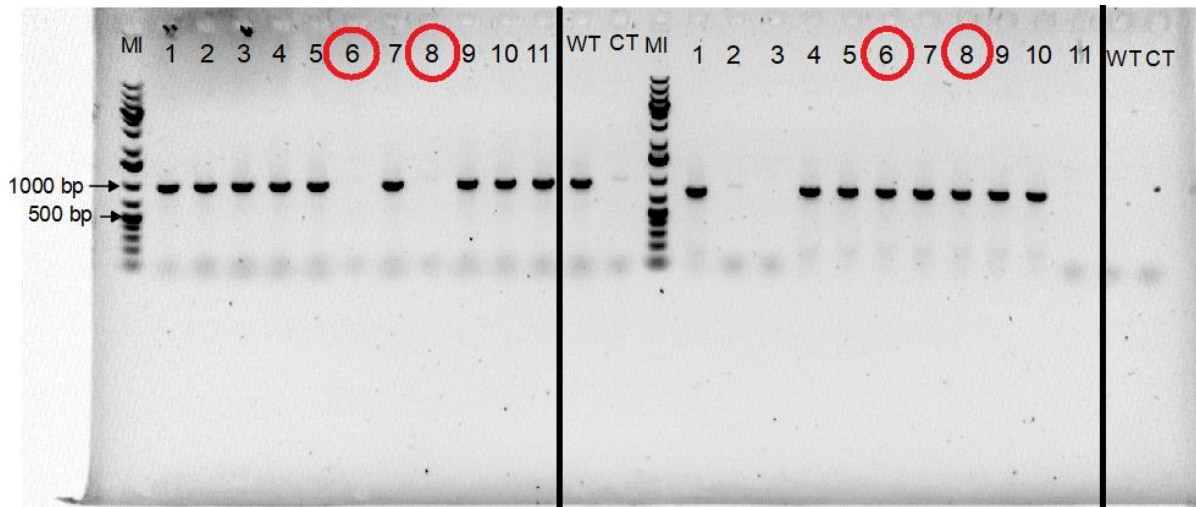


Obrázek 16: Schéma umístění T-DNA inzerce ve čtvrtém exonu genu *ENT3* inzerční linie SALK\_131585. ENT3\_L02 a ENT3\_R02: primery pro detekci WT alely. Schéma vytvořeno v programu SnapGene.

Pro selekci inzerce v genu *ENT3* bylo vybráno 11 rostlin linie SALK\_131585 ke genotypizaci. Pro PCR detekci WT alely a KO alely byly použity specifické primery uvedené v Tabulce 4. PCR produkt WT alely měl velikost cca 1000 bp, PCR produkt inzerční alely měl velikost cca 800 bp. Z 11 genotypovaných rostlin byly rostliny označené 6 a 8 homozygotní,



rostliny 2, 3 a 11 obsahovaly pouze WT alely. Zbylé rostliny 1, 4, 5, 7, 9 a 10 byly heterozygotní (Obrázek 17).



Obrázek 17: Vyhodnocení PCR reakce pro linii *ent3* (SALK\_131585), vlevo 1. PCR reakce s WT primery (*ENT3\_L02* + *ENT3\_R02*), vpravo 2. PCR reakce s primery pro inzerční T-DNA (*ENT3\_R02* + *Lbb1.3*). *Ml*-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, *WT*- pozitivní kontrola wild type, *CT*- negativní kontrola  $H_2O$ .

#### 4.1.4 Transportér ENT 8

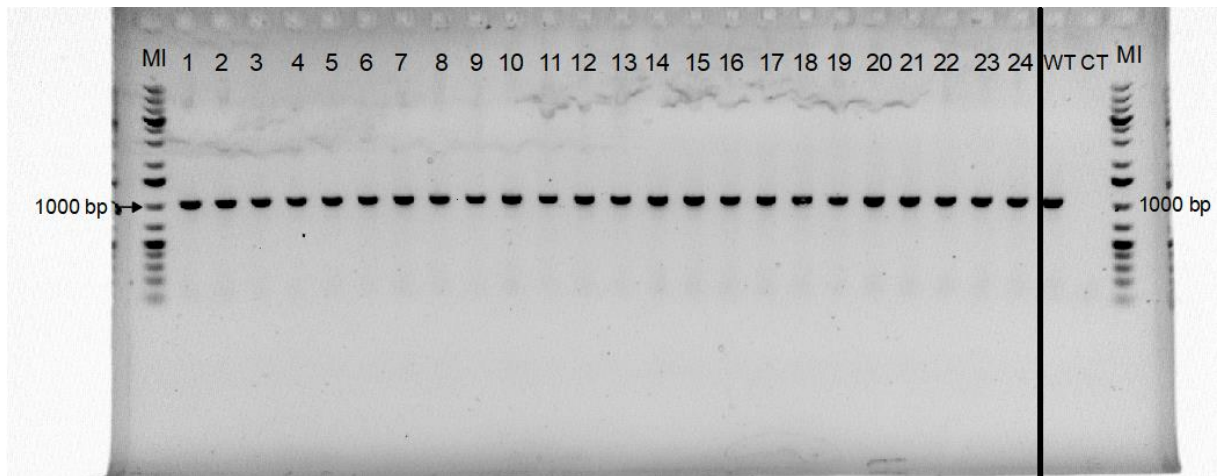
Pro genotypovou analýzu byla použita T-DNA inzerční linie SAIL\_290\_H08 s inzercí na začátku prvního exonu genu *ENT8* (Obrázek 18).



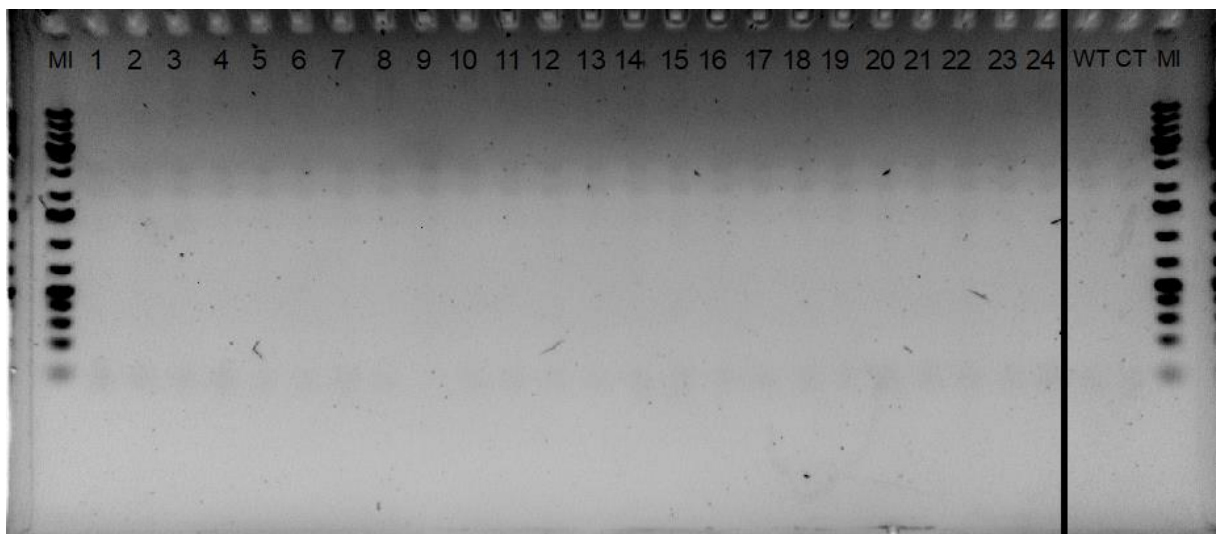
Obrázek 18: Schéma umístění T-DNA inzerce v prvním exonu genu *ENT8* inzerční linie SAIL\_290\_H08. *ENT8\_L02* a *ENT8\_R02*: primery pro detekci WT alely. Schéma vytvořeno v programu SnapGene.

Pro selekci inzerce v genu *ENT8* bylo vybráno 24 rostlin linie SAIL\_290\_H08 ke genotypizaci. Pro PCR detekci WT alely a KO alely byly použity specifické primery uvedené v Tabulce 4. PCR produkt WT alely měl velikost cca 1000 bp, PCR produkt inzerční alely by měl velikost cca 600 bp. Z 24 genotypovaných rostlin obsahovaly všechny rostliny WT alely,

pro detekci inzerční alely nebyla selektována žádná rostlina. Nebylo tak možné selektovat homozygotní rostliny s inzerčními alelami (Obrázek 19, 20).



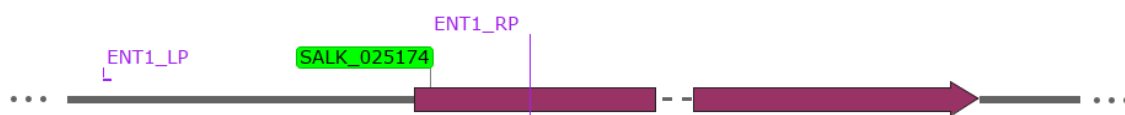
Obrázek 19: Vyhodnocení 1. PCR reakce pro linii ENT8 (SAIL\_290\_H08). Reakce pro s WT primery (ENT8\_L02 + ENT8\_R02), MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 20: Vyhodnocení 2. PCR reakce pro linii ENT8 (SAIL\_290\_H08). Reakce pro s primery pro inzerční T-DNA (SAIL\_LB3 + ENT8\_R02), MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.

## 4.2 Příprava vícenásobných homozygotních T-DNA inzerčních linií křížením s linií *ent1*

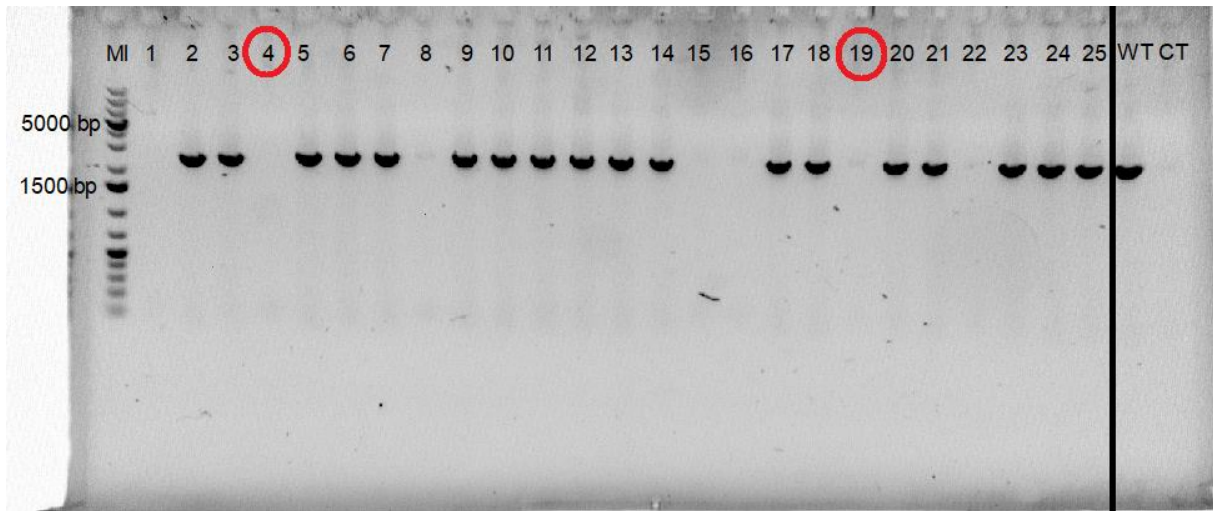
Vyselektované homozygotní KO linie v genech *ABCG14* a *ENT3* byly kříženy s homozygotními rostlinami s T-DNA inzerční linií SALK\_025174 pro gen *ENT1*, za účelem získání vícenásobné homozygotní linie rostlin *Arabidopsis thaliana*. Již dříve selektována homozygotní T-DNA inzerční linie SALK\_025174 byla poskytnuta vedoucím práce, proto ji nebylo potřeba selektovat znovu. Tato linie obsahuje inzerce na začátku prvního exonu genu *ENT1* (Obrázek 21).



Obrázek 21: Schéma umístění T-DNA inzerce v prvním exonu genu *ENT1* inzerční linie SALK\_025174. *ENT1\_LP* a *ENT1\_RP*: primery pro detekci WT alely. Schéma vytvořeno v programu SnapGene.

### 4.2.1 Linie *abcg14ent1*

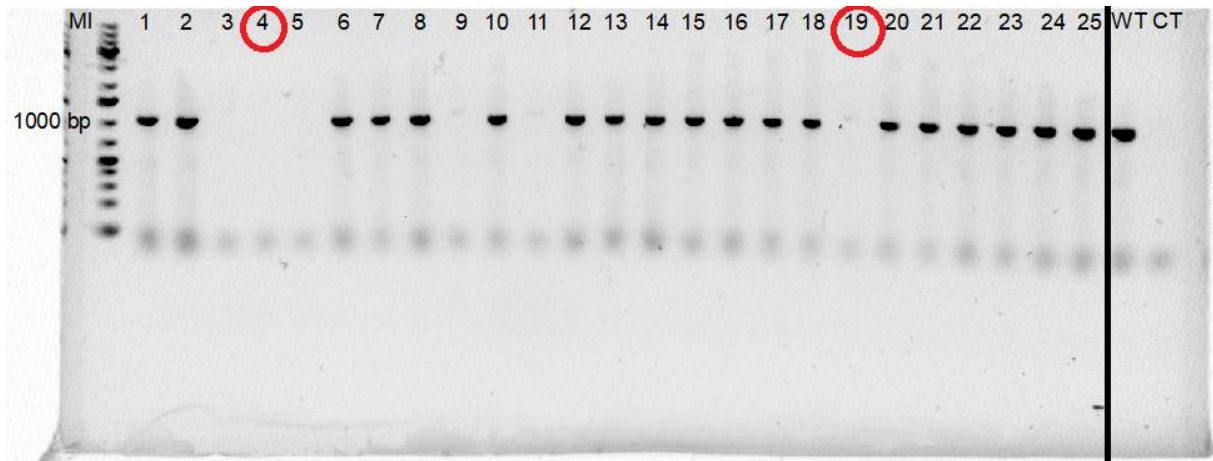
Pro tvorbu vícenásobného homozygota byly zkříženy homozygotní linie SK\_15917 s inzercí v genu *ABCG14* s homozygotní linií SALK\_025174 s inzercí v genu *ENT1*. Při první generaci křížení vznikly heterozygotní rostliny s WT alelami pro geny *ABCG14* a *ENT1* a s alelami s inzercí pro geny *ABCG14* a *ENT1*. Všechny rostliny 1. generace křížení byly testovány pro přítomnost alely WT a alely s inzercí pro gen *ABCG14* a pro gen *ENT1*. Všechny genotypované rostliny byly analyzované jako heterozygotní. Při druhém křížení již vznikly vícenásobné homozygotní linie s inzerčními alelami pro geny *ABCG14* a *ENT1*. Z 25 genotypovaných rostlin bylo nalezeno 7 homozygotů pro gen *ABCG14* a 6 homozygotů pro gen *ENT1*. Z nich byly pouze 2 rostliny č. 4 a 19 double mutantními v genech *ABCG14* a *ENT1* (Obrázek 22, 23, 24, 25).



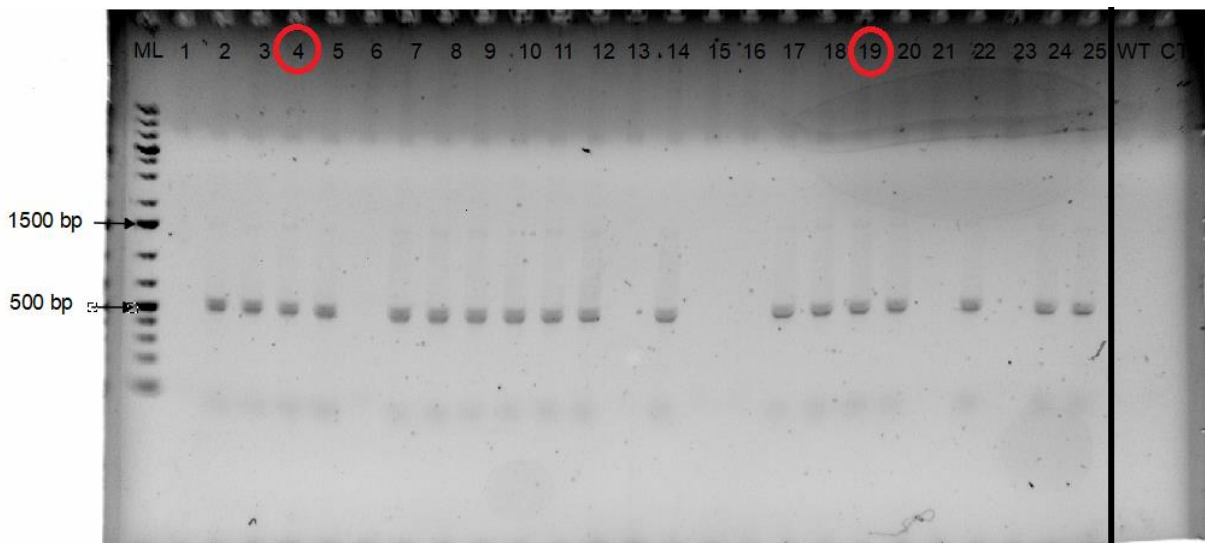
Obrázek 22: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ABCG14xENT1 (SK15917xSALK\_025174), 1. PCR reakce s WT primery (ABCG14-P1 + ABCG14-P2) pro ABCG14. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 23: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ABCG14xENT1 (SK15917xSALK\_025174), 2. PCR reakce s primery pro inzerční T-DNA (ABCG14-P1 + pSKTAIL-L1) pro ABCG14. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 24: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ABCG14xENT1 (SK15917xSALK\_025174), 1. PCR reakce s WT primery (ENT1\_LP + ENT1\_RP) pro ENT1. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.

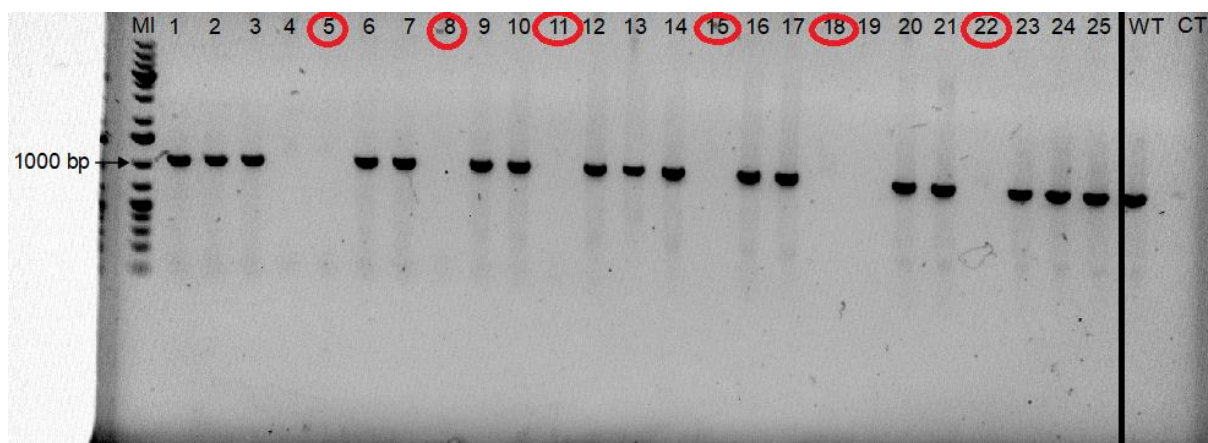


Obrázek 25: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ABCG14xENT1 (SK\_15917xSALK\_025174), 2. PCR reakce s primery inzerční T-DNA (ENT1\_RP + LbaI) pro ENT1. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.

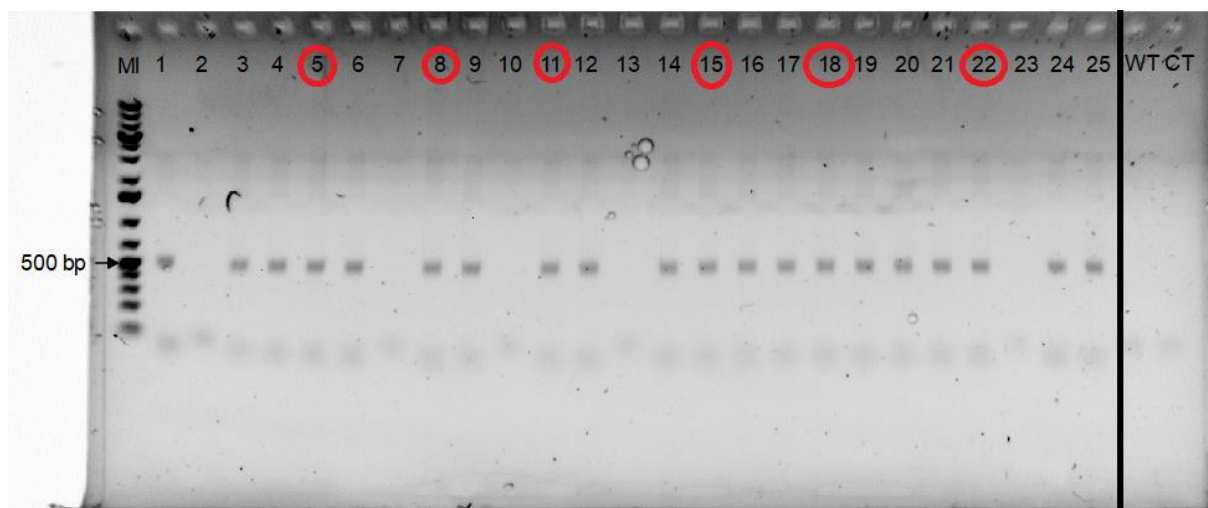


## 4.2.2 Linie *ent1ent3*

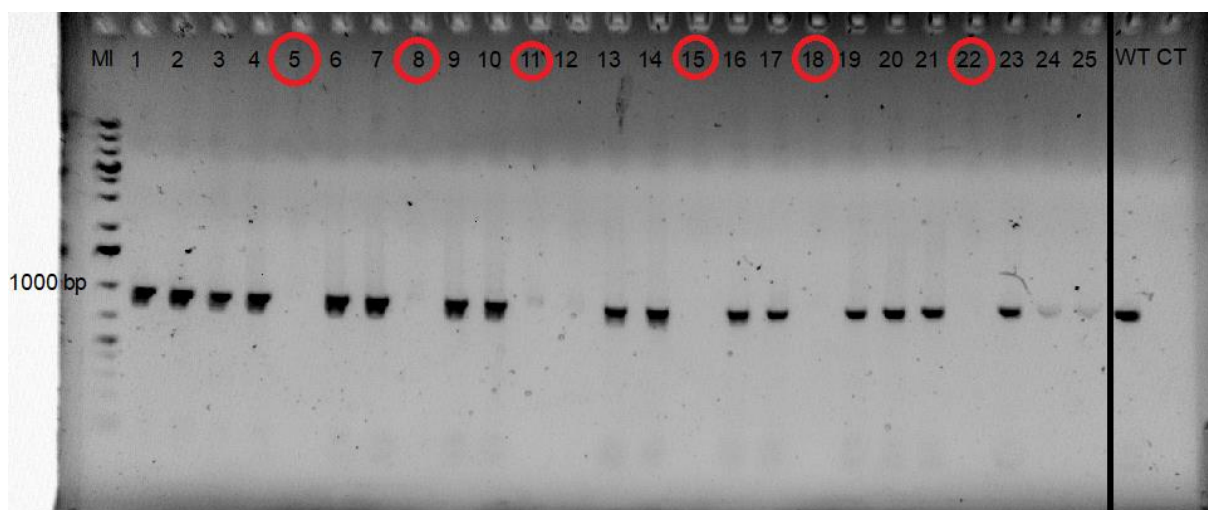
Pro tvorbu vícenásobného homozygota byly zkříženy homozygotní linie SALK\_025174 SALK\_131585 s inzerčí v genu *ENT1* s homozygotní linií SALK\_131585 s inzerčí v genu *ENT3*. Při první generaci křížení vznikly heterozygotní rostliny s WT alelami pro geny *ENT1* a *ENT3* a s alelami s inzerčí pro geny *ENT1* a *ENT3*. Všechny genotypované rostliny první generace byly analyzované jako heterozygotní. Při druhém křížení již vznikly vícenásobné homozygotní linie s inzerčními alelami pro geny *ENT1* a *ENT3*. Z 25 genotypovaných rostlin bylo nalezeno 8 homozygotů pro gen *ENT1* (rostliny č. 4, 5, 8, 11, 15, 18, 19, 22) a 7 homozygotů pro gen *ENT3* (5, 8, 11, 12, 15, 18, 22). Z nich bylo 6 rostlin, konkrétně rostliny č. 5, 8, 11, 15, 18, 22 double mutantními v genech *ENT1* a *ENT3* (Obrázek 26, 27, 28, 29).



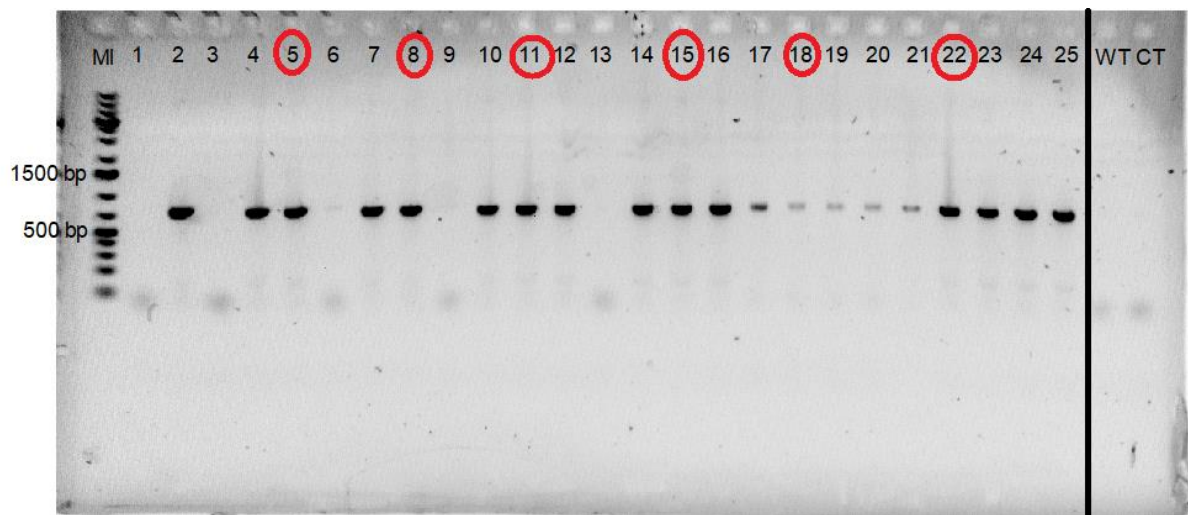
Obrázek 26: Vyhodnocení PCR reakce pro linii *ENT1xENT3* (SALK\_025174xSALK\_131585), 1. PCR reakce s WT primery (*ENT1\_LP* + *ENT1\_RP*) pro *ENT1*, MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 27: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ENT1xENT3 (SALK\_025174xSALK\_131585), 2. PCR reakce s primery pro inzerční T-DNA (ENT1\_RP + LbaI) pro ENT1. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 28: Vyhodnocení PCR reakce pro linii ENT1xENT3 (SALK\_025174xSALK\_131585), 1. PCR reakce s WT primery (ENT3\_L02 + ENT3\_R02) pro ENT3, MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



Obrázek 29: Vyhodnocení PCR reakce pro linii *ENT1xENT3* (SALK\_025174xSALK\_131585), 2. PCR reakce s primery inzerční T-DNA (*ENT3\_R02* + *LBb1.3*) pro *ENT3*. MI-marker molekulové hmotnostní Gene ruler 1kb plus DNA, WT- pozitivní kontrola wild type, CT- negativní kontrola H<sub>2</sub>O.



## 5. Diskuse

Cílem předkládané bakalářské práce bylo selektování homozygotních rostlin *Arabidopsis thaliana* vybraných T-DNA inzerčních linií s inzercí v genech *ENT2* (At1g78240), *ENT3* (At4g05120), *ENT8* (At1g02630) z rodiny ekvilibrativních nukleosidových transportérů a v genu *ABCG14* (At1g31770) z rodiny ATP-binding cassette transporter.

Vybrané T-DNA inzerční linie obsahují inzerci z bakterie *Agrobacterium tumefaciens* v exonech genů zájmu. Tím dochází k pousnu čtecího rámce, vzniku předčasného terminačního kodonu a nedochází tak ke translaci kompletního funkčního transportéru. Semena T-DNA inzerčních linií *Arabidopsis thaliana* byla objednána z databáze Nottingham Arabidopsis Stock Center. Jednotlivé mutantní linie byly vybrány vedoucím práce na základě pozice inzerce, preferenčně v exonech, pokud možno co nejbližší start kodonu. Inzerční linie *ent1* (SALK\_025174) a *ent8* (SAIL\_290\_H08) mají inzerci na začátku prvního exonu, oba tyto geny mají dva exony. Gen *ENT2* má celkově devět exonů, přičemž jeho T-DNA inzerční linie *ent2* (SAIL\_862\_B04) obsahuje inzerci v šestém exonu. T-DNA inzerční linie *ent3* (SALK\_131585) má inzerci ve čtvrtém z celkově osmi exonů genu *ENT3*. U mutantní linie *abcg14* (SK15917) pro gen *ABCG14*, inzerce zasahuje do druhého z pěti exonů tohoto genu.

Selekce homozygotních T-DNA inzerčních linií patří mezi standardní nástroje reverzní genetiky. Pro použití T-DNA inzerčních linií v dalších experimentech bylo nejdříve nutné rostliny genotypovat a zjistit tak přítomnost inzerční KO T-DNA. Toho bylo dosaženo pomocí PCR a použitím specifických primerů pro přítomnost WT alely a specifických primerů pro přítomnost inzerce. Výsledné selektované linie jsou homozygotní, mají fixovanou KO kazetu.

V rámci předkládané bakalářské práce byly úspěšně vyselektovány homozygotní T-DNA inzerční linie *abcg14* (SK15917), *ent2* (SAIL\_862\_B04) a *ent3* (SALK\_131585). Opakovaně se nepodařilo selektovat homozygotní linii *ent8* (SAIL\_290\_H08) pro transportér ENT8. Důvodem nezdaření selekce homozygotní linie mohlo být špatné navržení primerů, špatná kombinace primerů, nebo prosté zaslání jiné linie z databáze Nottingham Arabidopsis Stock Center. Řešením by mohlo být objednání nové linie, navržení nových primerů, popřípadě upravení teploty nasedání primerů. Velký rozdíl ve velikosti primerů SAIL\_LB3 a ENT8\_R02 mohl mít za následek nerovnoměrné vázání primerů na DNA templát a mohl tak ohrozit specifčnost PCR reakce a tím pádem zamezit amplifikaci.

Existuje také možnost, že zaslání semena linie *ent8* neobsahuje očekávanou vloženou sekvenci T-DNA, protože se vložená sekvence ztratila v procesu sloučení (bulking) kvůli

snížené přenosnosti nebo zvýšené úmrtnosti rostlin s mutantní alelou. Inzerce T-DNA navíc mohou být komplexní s mnoha kopiemi a fragmenty T-DNA různé orientace. To může zkomplikovat PCR analýzu. V takovém případě je nutno spolehnout se jenom na absenci produktu specifického pro daný genový pár primerů (LP + RP). Možná je taky špatná anotace pozice T-DNA inzerce v genomu *Arabidopsis*, která reálně může být posunuta v genomu o stovky párů bází.

Jelikož má *ENT* rodina 8 členů v genomu *Arabidopsis*, vyřazení pouze jednoho z nich nemusí být pro studium jeho fyziologické funkce dostatečné, protože ostatní transportéry ENT mohou snadno a efektivně nahradit funkci vyřazeného transportéru. Dobrým příkladem můžou být geny pro *Arabidopsis* CK receptory *AHK2*, *AHK3* a *CRE1/AHK4*, kdy jejich mutantní linie s vyřazením jediného nebo dokonce dvou ze tří CK receptorů nevykazují téměř žádný fenotypový projev (Inoue *et al.*, 2001; Franco-Zorilla *et al.*, 2002). Z tohoto důvodu bylo dalším cílem předkládané bakalářské práce generování vícenásobných mutantních linií. Vhodným kandidátem pro křížení získaných homozygotních T-DNA inzerčních linií byla již kolegy selektovaná homozygotní mutantní linie *ent1* (SALK\_025174) s inzercí v genu *ENT1* (At1g70330), který kóduje domnělý transportér CK ribosidů. Ačkoliv transport CK transportérem *ENT1* nebyl doposud prokázán, předběžná data kolegů z Laboratoře Růstových Regulátorů jeho roli v CK transportu potvrzují.

V rámci předkládané bakalářské práce se podařilo získat šest homozygotních rostlin *ent1ent3*. Tato linie bude v budoucnu sloužit studium cytokininového transportu v kořeni, nakolik oba transportéry vykazují expresi v apikálním meristému kořene (Bernard *et al.*, 2011; Cornelius *et al.*, 2012).

Při selekci homozygotní linie transportéru *ABCG14* (SK\_15917), který hraje důležitou roli v transportu na dlouhé vzdálenosti, byly úspěšně vyselektovány celkem 2 homozygotní rostliny. Tyto rostliny následně posloužily ke křížení a tvorbě vícenásobné mutantní linie společně s homozygotní KO linií transportéru *ent1*. Získaná homozygotní linie *abcg14ent1* může v budoucnu pomoci potvrdit roli *ENT1* v CK transportu a být tak vhodným nástrojem pro studium transportu CK na dlouhou vzdálenost.

Získané homozygotní KO linie a dvojnásobné homozygotní KO linie budou použity k dalšímu křížení a vzniku dalších vícenásobných homozygotních KO linií. Jelikož velmi pravděpodobně dochází k funkční redundanci mezi jednotlivými členy *ENT* rodiny, je příprava vícenásobných homozygotních linií nevyhnutelná a klíčová ke studiu jejich fyziologické funkce *in planta*.

## 6. Závěr

V teoretické části mé bakalářské práce byla vypracována literární rešerše, ve které se věnuji cytokininům, jejich struktuře, biosyntéze, aktivaci, degradaci, signalizaci a transportu. Dále se věnuji vybraným metodám genotypizace a křížení *Arabidopsis thaliana*. V kapitole transportu CK jsem se zaměřil na transportéry PUP, nedávno objevený transportér AZG2 a jeho funkci v rostlině, transportér ABCG14, který se podílí na transportu CK na dlouhé vzdálenosti, ale především na transportéry rodiny ENT. Praktická část mé práce měla za cíl vyselektovat homozygotní rostliny *Arabidopsis thaliana* požadovaných T-DNA inzerčních linií v genech *ENT2*, *ENT3*, *ENT8* a *ABCG14*, a následně křížením vytvořit vícenásobné homozygotní rostliny vybraných T-DNA inzerčních linií v genech *ENT1* a *ABCG14*, *ENT1* a *ENT3*. V praktické části se povedlo vyselektovat homozygotní rostliny s T-DNA inzercí v genech *ENT2*, *ENT3* a *ABCG14*. Bohužel selekce homozygotní linie s inzercí v genu *ENT8* nebyla úspěšná. Následné křížení a tvorba vícenásobných linií již úspěšná byla, povedlo se získat vícenásobné linie *abcg14ent1* a vícenásobná linie *ent1ent3*. Homozygotní linie získané v praktické části poslouží v dalším výzkumu ke tvorbě dalších vícenásobných (trojnásobných, čtyřnásobných) linií za účelem studia transportu CK a popsání fenotypu rostliny *Arabidopsis thaliana* s inhibovanými transportéry cytokininů.

## 7. Použitá literatura

Antoniadi, Ioanna, Ondřej NOVÁK, Zuzana GELOVÁ, et al. Cell-surface receptors enable perception of extracellular cytokinins. *Nature Communications* [on line]. 2020, 11(1) [cit. 2023-05-09]. ISSN 2041-1723. Dostupné z: doi:10.1038/s41467-020-17700-9

Bassil NV, Mok D, Mok MC. Partial Purification of a cis-trans-Isomerase of Zeatin from Immature Seed of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiol.* 1993 Jul;102(3):867-872. doi: 10.1104/pp.102.3.867. PMID: 12231873; PMCID: PMC158858

Bath, Rituraj, Muskan Jain, Ashish Kumar, Preeti Nagar, Sumita Kumari, Ananda Mustafiz, and Mohammad Ansari. 2020. “Zn<sup>2+</sup> dependent glyoxalase I plays the major role in methylglyoxal detoxification and salinity stress tolerance in plants”. *PLOS ONE* 15 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0233493>.

Bernard, Carsten, Michaela Traub, H-Henning Kunz, Stefanie Hach, Oliver Trentmann, and Torsten Möhlmann. 2011. “Equilibrative nucleoside transporter 1 (ENT1) is critical for pollen germination and vegetative growth in *Arabidopsis*”. *Journal of Experimental Botany* 62 (13): 4627-4637. <https://doi.org/10.1093/jxb/err183>.

Brzobohatý, Břetislav, Ian Moore, Peter Kristoffersen, Laszlo Bako, Narciso Campos, Jeff Schell, and Klaus Palme. 1993. “Release of Active Cytokinin by a  $\beta$ -Glucosidase Localized to the Maize Root Meristem”. *Science* 262 (5136): 1051-1054. <https://doi.org/10.1126/science.8235622>.

Bürkle L, Cedzich A, Döpke C, Stransky H, Okumoto S, Gillissen B, Kühn C, Frommer WB. Transport of cytokinins mediated by purine transporters of the PUP family expressed in phloem, hydathodes, and pollen of *Arabidopsis*. *Plant J.* 2003 Apr;34(1):13-26. doi: 10.1046/j.1365-313x.2003.01700.x. PMID: 12662305.

Corbesier L., Prinsen E., Jacquard A., Lejeune P., Van Onckelen H., Périlleux C., Bernier G. 2003: Cytokinin levels in leaves, leaf exudate and shoot apical meristem of *Arabidopsis thaliana* during floral transition. *Journal of Experimental Botany* 54, 2511–2517.

Cornelius, S., M. Traub, C. Bernard, C. Salzig, P. Lang, and T. Möhlmann. 2012. “Nucleoside transport across the plasma membrane mediated by equilibrative nucleoside transporter 3 influences metabolism of *Arabidopsis* seedlings”. *Plant Biology* 14 (5): 696-705. <https://doi.org/10.1111/j.1438-8677.2012.00562.x>.

Franco-Zorilla, J.M., Martin, A.C., Solano, R., Rubio, V., Leyva, A., and Paz-Ares, J. (2002). Mutations at CRE1 impair cytokinin-induced repression of phosphate starvation response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 32, 353–360.

Frébert, I., M. Kowalska, T. Hluska, J. Frébertová, and P. Galuszka. 2011. “Evolution of cytokinin biosynthesis and degradation”. *Journal of Experimental Botany* 62 (8): 2431-2452. <https://doi.org/10.1093/jxb/err004>.

Frébertová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébert I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quinones as electron acceptors. *Biochemical Journal* 380, 121–130.

Galuszka, Petr, Jitka Frébortová, Lenka Luhová, Kristin D. Bilyeu, James T. English, and Ivo Frébort. 2005. "Tissue Localization of Cytokinin Dehydrogenase in Maize: Possible Involvement of Quinone Species Generated from Plant Phenolics by Other Enzymatic Systems in the Catalytic Reaction". *Plant and Cell Physiology* 46 (5): 716-728. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci074>.

Golovko A, Sitbon F, Tillberg E, Nicander B. Identification of a tRNA isopentenyltransferase gene from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*. 2002 May;49(2):161-9. doi: 10.1023/a:1014958816241. PMID: 11999372.

Hirose, Naoya, Nobue Makita, Tomoyuki Yamaya, and Hitoshi Sakakibara. 2005. "Functional Characterization and Expression Analysis of a Gene, OsENT2, Encoding an Equilibrative Nucleoside Transporter in Rice Suggest a Function in Cytokinin Transport". *Plant Physiology* 138 (1): 196-206. <https://doi.org/10.1104/pp.105.060137>.

Hirose N, Takei K, Kuroha T, Kamada-Nobusada T, Hayashi H, Sakakibara H. Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J Exp Bot*. 2008;59(1):75-83. doi: 10.1093/jxb/erm157. Epub 2007 Sep 14. PMID: 17872922.

Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H. (2008): Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *Journal of Experimental Botany* 59, 75–83

Chen, Chong-Maw, and Susan M. Kristopeit. 1981. "Metabolism of Cytokinin". *Plant Physiology* 67 (3): 494-498. <https://doi.org/10.1104/pp.67.3.494>.

Inoue, T., Higuchi, M., Hashimoto, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Kato, T., Tabata, S., Shinozaki, K., and Kakimoto, T. (2001). Identification of CRE 1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* 409, 1060–1063

Jaquinod M, Villiers F, Kieffer-Jaquinod S, Hugouvieux V, Bruley C, Garin J, Bourguignon J. A proteomics dissection of *Arabidopsis thaliana* vacuoles isolated from cell culture. *Mol Cell Proteomics*. 2007 Mar;6(3):394-412. doi: 10.1074/mcp.M600250-MCP200. Epub 2006 Dec 6. PMID: 17151019; PMCID: PMC2391258.

Jelesko, John G. 2012. "An expanding role for purine uptake permease-like transporters in plant secondary metabolism". *Frontiers in Plant Science* 3. <https://doi.org/10.3389/fpls.2012.00078>.

Kakimoto T. 2001: Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* 42, 677– 685.

Kasahara, Hiroyuki, Kentaro Takei, Nanae Ueda, Shojiro Hishiyama, Tomoyuki Yamaya, Yuji Kamiya, Shinjiro Yamaguchi, and Hitoshi Sakakibara. 2004. "Distinct Isoprenoid Origins of cis- and trans-Zeatin Biosyntheses in *Arabidopsis*". *Journal of Biological Chemistry* 279 (14): 14049-14054. <https://doi.org/10.1074/jbc.M314195200>.

Korobova, Alla, Bulat Kuluev, Torsten Möhlmann, Dmitriy Veselov, and Guzel Kudoyarova. 2021. "Limitation of Cytokinin Export to the Shoots by Nucleoside Transporter ENT3 and Its Linkage with Root Elongation in *Arabidopsis*". *Cells* 10 (2). <https://doi.org/10.3390/cells10020350>.

Kubiasová, Karolina, Juan Carlos Montesinos, Olga Šamajová, Jaroslav Nisler, Václav Mik, Hana Semerádová, Lucie Plíhalová, et al. 2020. “Cytokinin fluoroprobe reveals multiple sites of cytokinin perception at plasma membrane and endoplasmic reticulum”. *Nature Communications* 11 (1). <https://doi.org/10.1038/s41467-020-17949-0>.

Kudo, Toru, Takatoshi Kiba, and Hitoshi Sakakibara. 2010. “Metabolism and Long-distance Translocation of Cytokinins”. *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 53-60. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2010.00898.x>.

Kurakawa, Takashi, Nanae Ueda, Masahiko Maekawa, Kaoru Kobayashi, Mikiko Kojima, Yasuo Nagato, Hitoshi Sakakibara, and Junko Kyojuka. 2007. “Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme”. *Nature* 445 (7128): 652-655. <https://doi.org/10.1038/nature05504>.

Kuromori, Takashi, Takaaki Miyaji, Hikaru Yabuuchi, Hidetada Shimizu, Eriko Sugimoto, Asako Kamiya, Yoshinori Moriyama, and Kazuo Shinozaki. 2010. “ABC transporter AtABCG25 is involved in abscisic acid transport and responses”. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 107 (5): 2361-2366. <https://doi.org/10.1073/pnas.0912516107>.

Li, Guangyong, Kunfan Liu, Stephen A. Baldwin, and Daowen Wang. 2003. “Equilibrative Nucleoside Transporters of *Arabidopsis thaliana*”. *Journal of Biological Chemistry* 278 (37): 35732-35742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M304768200>.

Letham, D.S. 1963. “Zeatin, a factor inducing cell division isolated from”. *Life Sciences* 2 (8): 569-573. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(63\)90108-5](https://doi.org/10.1016/0024-3205(63)90108-5).

Lichtenstein C, Klee H, Montoya A, Garfinkel D, Fuller S, Flores C, Nester E, Gordon M. Nucleotide sequence and transcript mapping of the tmr gene of the pTiA6NC octopine Ti-plasmid: a bacterial gene involved in plant tumorigenesis. *J Mol Appl Genet.* 1984;2(4):354-62. PMID: 6330262.

Malito, Enrico, Alessandro Coda, Kristin D. Bilyeu, Marco W. Fraaije, and Andrea Mattevi. 2004. “Structures of Michaelis and Product Complexes of Plant Cytokinin Dehydrogenase: Implications for Flavoenzyme Catalysis”. *Journal of Molecular Biology* 341 (5): 1237-1249. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2004.06.083>.

Miller, Carlos O., Folke Skoog, Malcolm H. Von Saltza, and F. M. Strong. 1955. “KINETIN, A CELL DIVISION FACTOR FROM DEOXYRIBONUCLEIC ACID 1”. *Journal of the American Chemical Society* 77 (5): 1392-1392. <https://doi.org/10.1021/ja01610a105>.

Möhlmann, Torsten, Zeina Mezher, Gabriele Schwerdtfeger, and H.Ekkehard Neuhaus. 2001. “Characterisation of a concentrative type of adenosine transporter from *Arabidopsis thaliana* (ENT1, At)”. *FEBS Letters* 509 (3): 370-374. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(01\)03195-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(01)03195-7).

Romanov, Georgy A., Sergey N. Lomin, and Thomas Schmülling. 2018. “Cytokinin signaling: from the ER or from the PM? That is the question!”. *New Phytologist* 218 (1): 41-53. <https://doi.org/10.1111/nph.14991>.

Sakakibara H. 2004: Cytokinin biosynthesis and metabolism. In: *Plant Hormones: Biosynthesis, Signal Transduction, Action*. (Davies P.J., ed.), Springer, Dordrecht, 95–114.

Sakakibara, Hitoshi. 2005. “Cytokinin Biosynthesis and Regulation”. In *Plant Hormones*, 271-287. Vitamins & Hormones. Elsevier. [https://doi.org/10.1016/S0083-6729\(05\)72008-2](https://doi.org/10.1016/S0083-6729(05)72008-2).

Sakakibara, Hitoshi. 2006. “CYTOKININS: Activity, Biosynthesis, and Translocation”. *Annual Review of Plant Biology* 57 (1): 431-449. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.57.032905.105231>.

Schmitz, Ruth Y., Folke Skoog, Anthony J. Playtis, and Nelson J. Leonard. 1972. “Cytokinins: Synthesis and Biological Activity of Geometric and Position Isomers of Zeatin”. *Plant Physiology* 50 (6): 702-705. <https://doi.org/10.1104/pp.50.6.702>.

Skoog F, Armstrong DJ. Cytokinins, *Annual Review of Plant Physiology*, 1970, vol. 21 (pg. 359-384)

Skoog F, Miller C. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissue cultured *in vitro*, *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 1957, vol. 11 (pg. 118-131).

Strnad, Miroslav. 1997. “The aromatic cytokinins”. *Physiologia Plantarum* 101 (4): 674-688. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1997.tb01052.x>.

Sun, Jiaqiang, Naoya Hirose, Xingchun Wang, Pei Wen, Li Xue, Hitoshi Sakakibara, and Jianru Zuo. 2005. “Arabidopsis SOI33/AtENT8 Gene Encodes a Putative Equilibrative Nucleoside Transporter That Is Involved in Cytokinin Transport In Planta”. *Journal of Integrative Plant Biology* 47 (5): 588-603. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2005.00104.x>.

Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001a): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 26405–26410.

Takei K, Sakakibara H, Sugiyama T. Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*. 2001 Jul 13;276(28):26405-10. doi: 10.1074/jbc.M102130200. Epub 2001 Apr 19. PMID: 11313355.

Tanaka, Mina, Kentaro Takei, Mikiko Kojima, Hitoshi Sakakibara, and Hitoshi Mori. 2006. “Auxin controls local cytokinin biosynthesis in the nodal stem in apical dominance”. *The Plant Journal* 45 (6): 1028-1036. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02656.x>.

Taya, Yoichi, Yoshimasa Tanaka, and Susumu Nishimura. 1978. “5'-AMP is a direct precursor of cytokinin in *Dictyostelium discoideum*”. *Nature* 271 (5645): 545-547. <https://doi.org/10.1038/271545a0>.

Tessi, Tomás M., Sabine Brumm, Eva Winklbauer, Benjamin Schumacher, Georgina Pettinari, Ignacio Lescano, Claudio A. González, et al. 2021. “Arabidopsis AZG2 transports cytokinins *in vivo* and regulates lateral root emergence”. *New Phytologist* 229 (2): 979-993. <https://doi.org/10.1111/nph.16943>.

The Arabidopsis Genome Initiative. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408, 796–815 (2000). <https://doi.org/10.1038/35048692>



Thu, Nguyen Binh Anh, Xuan Lan Thi Hoang, Mai Thuy Truc, Saad Sulieman, Nguyen Phuong Thao, and Lam-Son Phan Tran. 2017. "Cytokinin Signaling in Plant Response to Abiotic Stresses". In *Mechanism of Plant Hormone Signaling under Stress*, edited by Girdhar K. Pandey, 71-100. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons. <https://doi.org/10.1002/9781118889022.ch4>.

Traub M, Flörchinger M, Piecuch J, Kunz HH, Weise-Steinmetz A, Deitmer JW, Ekkehard Neuhaus H, Möhlmann T. The fluorouridine insensitive 1 (fur1) mutant is defective in equilibrative nucleoside transporter 3 (ENT3), and thus represents an important pyrimidine nucleoside uptake system in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 2007 Mar;49(5):855-64. doi: 10.1111/j.1365-313X.2006.02998.x. Epub 2007 Jan 23. PMID: 17253988.

Wingler A., von Schaewen A., Leegood R.C., Lea P.J., Quick W.P. (1998): Regulation of leaf senescence by cytokinin, sugars, and light. Effects on NADH-dependent hydroxypyruvate reductase. *Plant Physiology* 116, 329-335.

Wormit, Alexandra, Michaela Traub, Martin Flörchinger LÖRCHINGER, H. Ekkehard Neuhaus, and Torsten Möhlmann. 2004. "Characterization of three novel members of the *Arabidopsis thaliana* equilibrative nucleoside transporter (ENT) family". *Biochemical Journal* 383 (1): 19-26. <https://doi.org/10.1042/BJ20040389>

Wulfetange, Klaas, Sergey N. LOMIN, Georgy A. ROMANOV, Andrea STOLZ, Alexander HEYL a Thomas SCHMÜLLING. The Cytokinin Receptors of *Arabidopsis* Are Located Mainly to the Endoplasmic Reticulum . *Plant Physiology* [online]. 2011, 156(4), 1808-1818 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1532-2548. Dostupné z: doi:10.1104/pp.111.180539

Yang, Chao, Xiang LU, Biao MA, Shou-Yi CHEN a Jin-Song ZHANG. Ethylene Signaling in Rice and *Arabidopsis*: Conserved and Diverged Aspects. *Molecular Plant* [online]. 2015, 8(4), 495-505 [cit. 2023-05-09]. ISSN 16742052. Dostupné z: doi:10.1016/j.molp.2015.01.003

Yu, Mei-Hui, Zhe-Ze ZHAO a Jun-Xian HE. Brassinosteroid Signaling in Plant–Microbe Interactions. *International Journal of Molecular Sciences* [online]. 2018, 19(12) [cit. 2023-05-09]. ISSN 1422-0067. Dostupné z: doi:10.3390/ijms19124091

Zambryski P, Depicker A, Kruger K, Goodman HM. Tumor induction by *Agrobacterium tumefaciens*: analysis of the boundaries of T-DNA. *J Mol Appl Genet*. 1982;1(4):361-70. PMID: 7108407.

Zhang, Kewei, Ondrej Novak, Zhaoyang Wei, Mingyue Gou, Xuebin Zhang, Yong Yu, Huijun Yang, Yuanheng Cai, Miroslav Strnad, and Chang-Jun Liu. 2014. "Arabidopsis ABCG14 protein controls the acropetal translocation of root-synthesized cytokinins". *Nature Communications* 5 (1). <https://doi.org/10.1038/ncomms4274>.

Zhao, Jiangzhe, Xiaojuan Deng, Jiayun Qian, Ting Liu, Min Ju, Juan Li, Qin Yang, et al. 2023. "Arabidopsis ABCG14 forms a homodimeric transporter for multiple cytokinins and mediates long-distance transport of isopentenyladenine-type cytokinins". *Plant Communications* 4 (2). <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2022.100468>.

Zhao, Jiangzhe, Bingli Ding, Engao Zhu, Xiaojuan Deng, Mengyuan Zhang, Penghong Zhang, Lu Wang, et al. 2021. "Phloem unloading via the apoplastic pathway is



essential for shoot distribution of root-synthesized cytokinins”. *Plant Physiology* 186 (4): 2111-2123. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiab188>.

Zürcher, Evelyne, Jingchun Liu, Martin di Donato, Markus Geisler, and Bruno Müller. 2016. “Plant development regulated by cytokinin sinks”. *Science* 353 (6303): 1027-1030. <https://doi.org/10.1126/science.aaf7254>.

## 8. Použité zkratky

ABA	Kyselina abcisová
ABC	ATP binding cassette
ADP	Adenosindifosfát
AMP	Adenosinmonofosfát
ATP	Adenosintrifosfát
AZG	AZA guanine resistant
CK	Cytokinin
CKX	cytokinin oxidasa/hydrogenasa
CMP	cytidin monofosfát
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DNTPs	deoxynukleotidtrifosfáty
DZ	<i>dihydro</i> -zeatin
ENT	ekvilibrativní nukleosidový transportér
FAD	flavinadenindinukleotid
GFP	zelený fluorescenční protein
GUS	$\beta$ -glukuronidázový reportérový systém
HK	histidinkinasa
HMBDP	hydroxymehtylbutenyl difosfát
iP	isopentenyladenosin
iPR	isopentenyladenosin ribosid
iPRDP	isopentenyladenosin difosfát
iPRTP	isopentenyladenosin trifosfát
KO	knockout
LB	primer odpovídající Knockoutové inzerci
LOG	enzym lonely guy
LP	levý primer
MEP	methylerythritolfosfátová dráha
MES	Morfolinethansulfonová kyselina

MS	Murashige a Skoog medium
MVE	mevalonátová dráha
NAA	kyselina 1-naftyloctová
PCR	polymerázová řetězová reakce
PUP	purinové permeasy
RP	pravý primer
T-DNA	transferová DNA
tRNA	transferová RNA
tZ	<i>trans</i> -zeatin
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
WT	wild type, divoký typ