

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2018

Barbora Hanzlíková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Identifikace genů kódujících domnělé
auxin-aminokyselinové hydrolasy v ječmeni.**

Bakalářská práce

Barbora Hanzlíková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: RNDr. Lenka DZUROVÁ, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech

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

V Olomouci dne

SOUHRN

Auxiny jsou jedny z nejdůležitějších rostlinných hormonů, které patří mezi fytohormony. Nejčastějším auxinem je kyselina indoyl-3-octová, jejíž hladiny rostliny regulují prostřednictvím tvorby konjugátů s jinými molekulami, které slouží jako skladovací nebo inaktivní forma auxinů. Rostliny jsou schopny opětovně využívat auxiny v konjugované formě, prostřednictvím enzymů hydrolas, mezi které patří také amidohydrolasy. Tyto enzymy jsou schopny štěpit amidové vazby mezi auxinem a konjugovanou aminokyselinou. Doposud však amidohydrolasy byly identifikovány pouze u *Arabidopsis* a u několika dalších rostlin, avšak nikoliv u ječmene.

Na základě transkriptomických dat ze základu stonků 1DAG semenáčků ječmene (*Hordeum vulgare*) kultivaru Golden promise bylo identifikováno 6 genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy (MLOC_14346, MLOC_43138, MLOC_51086 atd.). Analýzou jejich sekvence bylo zjištěno, že sdílejí stejné domény a rysy jako Zn peptidasy a Zn-dependentní exopeptidasy, které patří do rodiny peptidas M20 a amidohydrolas. Expresí těchto genů byla stanovována v 11 různých biologických vzorcích (listy, semena, kořeny, klasy, základy stonků a zelené nadzemní části). Metodou qRT-PCR byly nalezeny vhodné referenční geny, které byly použity pro stanovení expresního profilu pro zkoumané geny. Podařilo se nám identifikovat přítomnost tří genů MLOC_51086, MLOC_54194 a MLOC_70768, které se nacházejí ve všech pletivech ječmene.

SUMMARY

Auxines are some of the most important plant hormones that belong to phytohormones. The most common auxin is indoyl-3-acetic acid whose plant levels regulate through the formation of conjugates with other molecules that serve as the storage or inactive form of auxins. Plants are able to reuse auxins in conjugated form, via enzymes hydrolas, including amidohydrolases. These enzymes are able to cleave amide linkages between auxin and conjugated amino acid. So far, however, amidohydrolases have been identified only in *Arabidopsis* and in several other plants, but not in barley.

Based on transcriptomic data from the base of 1DAG barley seedlings (*Hordeum vulgare*) of the Golden Promis cultivar, 6 genes for the suspected auxin-amino acid hydrolases (MLOC_14346, MLOC_43138, MLOC_51086, etc.) were identified. Their sequence analysis was found to share the same domains and traits as Zn peptidases and Zn-dependent exopeptidases belonging to the M20 peptidase family and amidohydrolas. The expression of these genes was determined in 11 different biological samples (leaves, seeds, roots, ears, crowns and shoots). Using the qRT-PCR method, suitable reference genes were used which were used to determine the expression profile for the genes under investigation. We have succeeded in identifying the presence of three genes MLOC_51086, MLOC_54194 and MLOC_70768, found in all barley tissues.

OBSAH

SOUHRN	4
SUMMARY	5
SEZNAM TABULEK.....	9
1. ÚVOD.....	1
2. CÍLE PRÁCE.....	3
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED.....	4
3.1. Ječmen (Hordeum).....	4
3.1.1. Domestikace ječmene.....	5
3.1.2. Fyziologie ječmene	6
3.1.3. Využití ječmene	7
3.1.4. Kultivar Golden promise.....	8
3.2. Auxiny.....	9
3.2.1. Struktura a rozdělení auxinů	11
3.2.2. Kyselina indolyl-3- octová (IAA)	12
3.2.3. Typy konjugátů	13
3.2.4. Konjugáty IAA s aminokyselinami.....	14
3.2.5. Kvantifikace IAA- konjugátů v rostlinných tkáních	14
3.2.6. Biosyntéza IAA	15
3.2.7. Transport auxinů	17
3.2.8. Vztah auxinů a cytokininů	18
3.3. Hydrolasy IAA konjugátů.....	19
3.3.1. IAA-aminokyselinové hydrolasy	19
3.3.2. Výskyt IAA aminokyselinových hydrolas	21
4. MATERIÁL A METODY	23
4.1. Použité chemikálie	23
4.2. Seznam použitých přístrojů a zařízení	24
4.3. Výběr genů.....	25
4.4. Biologický materiál.....	28
4.5. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy.....	29

4.5.1.	Naklíčení semen a následné pěstování v hydroponii.....	29
4.5.2.	Izolace RNA.....	29
4.5.2.1.	RNA izolace pomocí ZR Plant RNA MiniPrep kitu	29
4.5.2.2.	RNA izolace pomocí TriReagentu	30
4.5.3.	Ošetření DNasou	30
4.5.4.	Příprava vzorků a elektroforéza na agarosovém gelu	31
4.5.5.	Ověření čistoty a stability vyizolované RNA.....	31
4.5.6.	Měření koncentrace na Nanodropu	32
4.5.7.	Reverzní transkripce.....	33
4.5.8.	qRT-PCR.....	34
4.5.8.1.	Stanovení efektivity primerů.....	34
4.5.8.2.	qRT-PCR analýza exprese	35
4.5.9.	Příprava vzorků na sekvenování	35
5.	VÝSLEDKY.....	37
5.1.	Ověření čistoty a stability RNA	37
5.2.	PCR analýza cDNA v jednotlivých biologických vzorcích	39
5.3.	Účinnost primerů.....	41
5.4.	Vyhodnocení stability jednotlivých referenčních genů.....	42
5.5.	Relativní exprese genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy	44
5.6.	Kontrola průběhu qRT-PCR	46
5.7.	Sekvenování	46
6.	DISKUZE	47
7.	ZÁVĚR.....	50
8.	LITERATURA	51

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obrázek 1: Rostlina ječmene se semeny	4
Obrázek 2: Fylogenetický strom čeledi lipnicovitých (<i>Poaceae</i>)	4
Obrázek 3: Vyobrazení různých typů rachis ječmene.....	5
Obrázek 4: Rostlina ječmene	6
Obrázek 5: A) klas ječmene šestiřadého, B) klas ječmene dvouřadého, C) Semena ječmene	7
Obrázek 6: Rozdíly mezi kultivary Maythorpe a Golden promise	9
Obrázek 7: Struktura auxinů	11
Obrázek 8: Biosyntetické dráhy IAA	16
Obrázek 9: Fylogenetický strom amidohydrolasových homologů z rostlin a mikrobů	20
Obrázek 10: Ukázka hydroponie s využitím krabičky se špičkami	29
Obrázek 11: Ověření čistoty amplifikovaných vzorků RNA	37
Obrázek 12: Ověření stability vyizolované RNA	38
Obrázek 13: Exprese genů v různých biologických vzorcích ječmene.....	39
Obrázek 14: Stabilita testovaných referenčních genů podle metody BestKeeper	42
Obrázek 15: Relativní exprese genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy.	45
Obrázek 16: Přečištěné vzorky z qPCR pro jednotlivé geny	46

SEZNAM TABULEK

Tabulka 1: Shrnutí analyzovaných referenčních genů.	25
Tabulka 2: Shrnutí analyzovaných genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy.....	26
Tabulka 3: Primery a velikosti produktů pro analyzované geny.....	27
Tabulka 4: Seznam všech použitých tkání ječmene a jejich stáří	28
Tabulka 5: Složení reakční směsi pro 1 vzorek.....	32
Tabulka 6: První krok přepisu RNA do cDNA.	33
Tabulka 7: Druhý krok přepisu RNA do cDNA.	33
Tabulka 8: Komponenty pro přípravu kontrolní reakce syntézy.....	34
Tabulka 9: Složení reakční qRT-PCR směsi pro 1 vzorek.....	35
Tabulka 10: Příprava vzorků na sekvenování	36
Tabulka 11: Shrnutí všech získaných výsledků genové exprese v 11 biologických vzorcích ječmene.	40
Tabulka 12: Výsledná efektivita primerů analyzovaných genů	41
Tabulka 13: Vyhodnocení stability podle metody NormFinder.....	43
Tabulka 14: Vyhodnocení stability podle metody geNorm	43
Tabulka 15: Shrnující tabulka všech dostupných metod pro vyhodnocení stability referenčních genů.....	43

1. ÚVOD

Ječmen (*Hordeum*) je obilovina patřící do čeledi lipnicovitých. Existují různé druhy ječmene, které se na základě plodnosti klasů dělí na dvouřadé nebo víceřadé, přičemž každý druh má své charakteristické využití. Ječmen je důležitou složkou nejenom lidské stravy a krmiv, ale je také velmi často používán jako modelový organismus, jelikož má spoustu výhodných vlastností. V této bakalářské práci byl použit kultivar Golden promise, který vznikl ozářením kultivaru Maythorpe gama zářením. Tento kultivar se vyznačuje nižším vzrůstem a krátkými tuhými stébly. Výhodnou jsou také jeho agronomické znaky, které jsou žádané hlavně ve sladovnictví.

Každá rostlina je schopná regulovat svůj růst a vývoj. Tato regulace je zprostředkovaná řadou rostlinných hormonů, jako jsou například fytohormony. Do této skupiny patří auxiny, cytokininy, gibereliny, ethylen a kyselina abcisová. Dalším typem rostlinných hormonů jsou steroidní hormony zvané brassinosteroidy a rozsáhlým spektrem účinků na morfologii rostliny během jejího vývoje.

Auxiny jsou jedny z nejdéle studovaných rostlinných hormonů. Už v 19. století byl pozorován jejich účinek na tropické prodlužování rostlin. Spolu s cytokininy jsou auxiny považovány za nezbytné pro životaschopnost rostliny, jelikož oba hormony regulují klíčové procesy rostlinného růstu. Oba hormony spolu také interagují v mnohých vývojových procesech rostlin a jejich hladiny jsou schopny se navzájem ovlivňovat. Auxiny můžeme rozdělit na přírodní a uměle připravené. Mezi přírodní se řadí i nejčastěji se vyskytující auxin kyselina indoyl-3-octová, kterou jsou rostliny schopny v určitých koncentracích produkovat ve všech svých tkáních. Rostliny si vyvinuly řadu mechanismů, kterými regulují hladiny této kyseliny. Nejčastějším mechanismem je tvorba konjugátů s různými skupinami látek. Až 95 % kyseliny se nachází právě v konjugovaném stavu. U rostlin se předpokládají dvě hlavní cesty syntézy kyseliny indoyl-3-octové, které se liší svojí závislostí na tryptofanu, nicméně její úplná biosyntéza není doposud plně objasněna.

Nicméně jsou rostliny schopny využívat konjugáty jako zdroj volných auxinů, a to prostřednictvím štěpení vazby v konjugátech enzymy zvanými hydrolasy. Jako první z nich byly identifikovány konjugáty kyseliny indoyl-3-octové s aminokyselinami. Hydrolasy pro tyto konjugáty byly nalezeny u *Arabidopsis* a celkově zde bylo identifikováno 7 genů pro tyto hydrolasy. Tyto enzymy byly

identifikovány i v dalších rostlinách, například u pšenice seté (*Triticum aestivum*) nebo u semen fazolí (*Phaseolus vulgaris*). U ječmene žádné z hydroláz doposud identifikovány nebyly.

2. CÍLE PRÁCE

Hlavním cílem této bakalářské práce je vytvořit expresní profil genů kódujících domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy. Pro dosažení tohoto cíle je nevyhnutelné navrhnout vhodné primery pro identifikované geny domnělých auxin-aminokyselinových hydrolas v genomu ječmene (*Hordeum vulgare*) kultivaru Golden promise. Následně izolovat RNA z různých biologických vzorků ječmene a její reverzní transkripce. Neméně důležitým krokem je kontrola čistoty a stability jak RNA, tak cDNA. Vzniklá cDNA poslouží jako templát pro samotné stanovení expresního profilu zkoumaných genů metodou qRT-PCR.

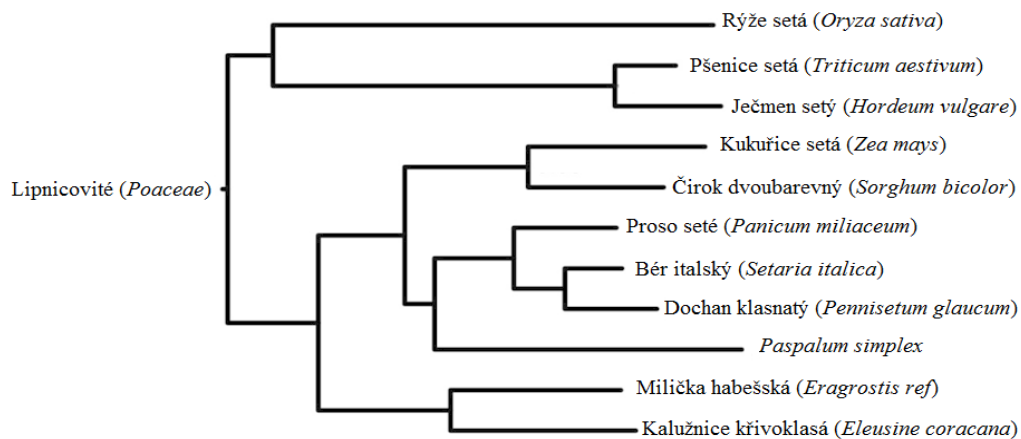
3. LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1. Ječmen (*Hordeum*)

Ječmen je obilovina patřící do rodiny jednoděložných trav, konkrétně do čeledi lipnicovitých (*Poaceae*, Obrázek 2). K rodu *Hordeum* patří asi 30 druhů, z toho je 16 druhů divokých. Běžný ječmen (*Hordeum vulgare*, Obrázek 1) je odvozen z jeho divokého předka *Hordeum vulgare ssp. Spontaneum* (The international barley genome sequencing consortium, 2012). Ze všech druhů ječmene má právě ječmen setý (*Hordeum vulgare* L.) největší význam pro šlechtění. Běžně pěstovaný ječmen je jednoroční rostlina, což znamená, že během jednoho roku vyklíčí, rozmnoží se a uhyne. Rozlišujeme u něho dvě formy, a to jednoroční ozimý nebo jarní typ. Ječmen nejlépe roste v mírném podnebí, nicméně je velmi adaptivní i odolný vůči stresu, a proto se mu může dařit jak v mokrých, tak suchých podmínkách. Oproti pšenici je tolerantnější vůči půdním solím, ale je velmi citlivý na hliník (Edwards, 2010).



Obrázek 1: Rostlina ječmene se semeny (převzato z <https://leporelo.info/jecmen>).



Obrázek 2: Fylogenetický strom čeledi lipnicovitých (*Poaceae*), (převzato a upraveno z <https://www.researchgate.net>).

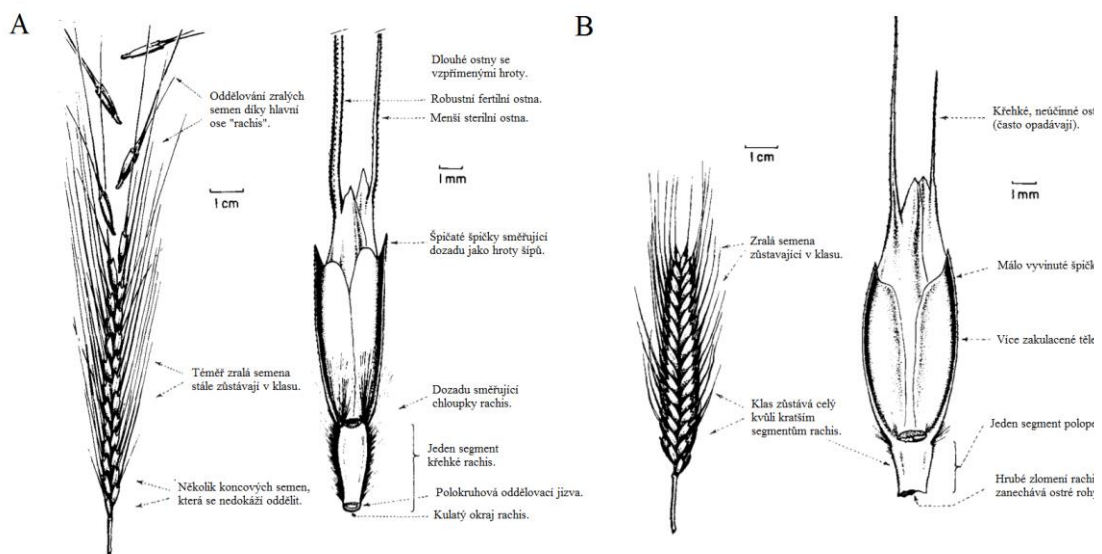
3.1.1. Domestikace ječmene

Domestikace je definována jako proces, který způsobuje, že populace kultivovaných rostlin ztratila rysy (jedná se hlavně o reprodukční vlastnosti) nezbytné pro jejich přežití ve volné přírodě; tj. proces, díky kterému jsou populace plodin závislé na lidském zásahu za účelem jejich reprodukce (Hillman a Davies, 1990).

První obiloviny vysévané člověkem, byly pěstovány právě ze semen, které byly sbírány z divokých porostů. Tato semena obilovin byla zcela divokého typu a až v průběhu kultivace docházelo k jejich domestikaci v důsledku sklizení specifickými způsoby. Dále musí být plodina sklizena aspoň částečně zralá nikoli zelená. Pokud jsou splněny tyto dva požadavky, plodina může být domestikována do dvou staletí a možná dokonce i za kratší období v rozmezí 20–30 let bez jakékoliv vědomé formy výběru (Hillman a Davies, 1990).

Přesný geografický původ ječmene není příliš jasný, pokud chceme blíže specifikovat, kdy a kde byl ječmen pěstován, musíme se zaměřit na místo jeho přirozeného výskytu jako je například Egypt, Etiopie, Blízký východ nebo Tibet (Bard *et al.*, 2000). Ječmen byl domestikován před více než 10 000 lety (Grando 2005). Důvodem brzké domestikace byla nejspíše jeho velká produktivita a také jeho využití nejen jako složka potravy, ale i na výrobu alkoholických nápojů.

U volně rostoucího ječmene se nachází mezi každým z plodných klásků hlavní osa „rachis“, která umožňuje spontánní uvolnění semen (Obrázek 3A). Oddělování



Obrázek 3: A) Divoký typ ječmene (wild type) a vyobrazení jeho rachis, B) Domestiková forma ječmene a vyobrazení rozdílného typu rachis (převzato a upraveno Hillman a Davies, 1990).

jednotlivých zralých semen z klasu probíhá od horní části směrem dolů. Šípkovitý tvar jim spolu s dalšími vlastnostmi umožňuje rychle proniknout do trhlin v povrchu půdy a vyklíčit. U domestikovaných typů ječmene ztratila jejich hlavní osa svoji schopnosti spontánně uvolňovat semena, což má za následek to, že klasy zůstávají celé až do doby jejich sklizení (Obrázek 3 B). Pokud jsou tyto domestikované rostliny vysazeny do volné přírody, nejsou schopny se samy reprodukovat, jelikož nedochází k uvolnění semen.

3.1.2. Fyziologie ječmene

Ječmen je tvořen 50–100 cm dlouhými dutými stébly, která jsou složena z 5–8 hladkých článků. Na jedné rostlině může vyrůst 2–6 stébel, přičemž z každého kolénka vyrůstají úzké pravotočivé listy. Květenství ječmene se nazývá klas, který nese generativní orgány zvané semeníky obsahující dvě blizny a tři tyčinky. Klas je tvořen rozdělujícím se větvením na jednotlivé články, ke kterým přisedají tři klásky. Ječmen je samosprašná rostlina, což mu umožňuje se opylovat vlastním pylem. Plodem ječmene je obilka, kterých může být v jednom klasu 15–30 (Obrázek 4).



Obrázek 4: Rostlina ječmene

Podle plodnosti klasů rozlišujeme ječmen na dvouřadý nebo víceřadý (Obrázek 5). U dvouřadých forem ječmene je pouze jeden z klásků plodný. Nejběžnějším víceřadým typem je šestiřadý, který je používán pouze jako krmivo. Častěji se však pěstují dvouřadé typy, které se používají na výrobu sladu nebo jako součást lidské stravy (Viz kapitola 3.1.3). Jeho využití je závislé na kvalitě a ceně.



Obrázek 5: A) klas ječmene šestiřadého, B) klas ječmene dvouřadého, C) Semena ječmene (převzato a upraveno z <https://cit.vfu.cz>).

Ječmen má 7 chromozomových párů ($2n = 14$) a je diploidní o velikosti haploidního genomu 5,1 gigabáze (The international barley genome sequencing consortium, 2012). Je velmi často používán jako modelový organismus pro studii genomu, a to především kvůli jeho diploidnímu charakteru, schopnosti samoopylení, velkým (6–8 mm) dobře rozlišitelným chromozomům, vysokému stupni přirozené nebo mutacemi jednoduše indukované variability a pro svoji vysokou adaptabilitu (Kleinohfs a Graner 2001).

3.1.3. Využití ječmene

Ječmen představuje důležitý základ lidské stravy. V mnoha částech světa je konzumován jako běžná potrava, jelikož semena obsahují ve své buněčné stěně i necelulózoové polysacharidy, které nejsou tráveny lidskými střevními enzymy, a proto tyto polysacharidy snižují riziko vzniku závažných onemocnění jako je diabetes II. typu, kardiovaskulární choroby nebo kolorektální karcinomy (Collins *et al.*, 2010). Přibližně 75 % světové produkce ječmene je použito jako krmivo pro zvířata, 20 % je použito při výrobě alkoholických a nealkoholických nápojů, a 5 % je využito do různých potravinářských výrobků (The international barley genome sequencing consortium, 2012). Obecně se k produkci potravin pro lidskou potřebu využívají zrna s vyšším obsahem bílkovin, ty s nižším obsahem se využívají jako složka krmiv nebo v pivovarnictví.

Přibližná celosvětová produkce ječmene je v rozmezí 125 až 155 milionů tun za rok. V roce 2016/2017 bylo celosvětově vyprodukováno 148 milionů tun ječmene (Statista, statiska.com). Mezi nejvýznamnější země produkující ječmen patří Austrálie, Kanada, Francie a Německo. V dnešní době je ječmen pěstován přibližně na 57 milionech hektarech, z toho se 32 milionů hektarů nachází v rozvojových zemích (Grando 2005). Ječmen je zde preferovaná plodina, kvůli svému vysokému výnosu a adaptivním vlastnostem. Spotřeba ječmene pro lidskou výživu je v hospodářsky vyspělých státech velmi nízká. Ječmen je zde využíván na výrobu sladu nebo jako hospodářské krmivo. Dále se ječmen může využívat i na výrobu krup nebo náhražek kávy. Z nepotravinářských odvětví se ječmen využívá převážně v chemickém a papírenském průmyslu.

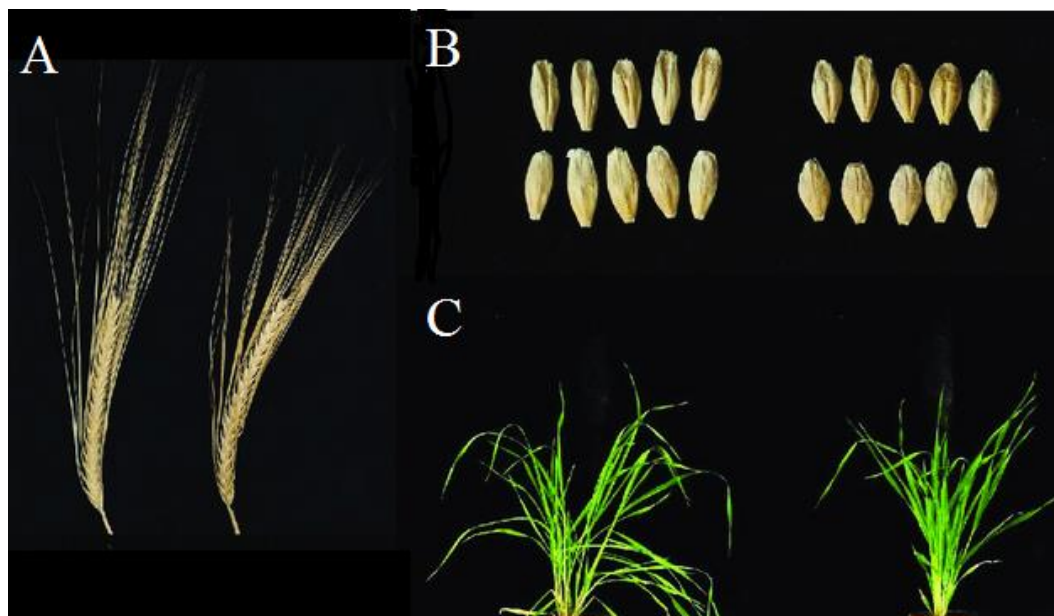
V současné době je v Česku pěstován, jak ječmen jarní, tak ozimý, přičemž ozimý ječmen je pěstován zhruba na poloviční ploše než ječmen jarní. Tomu taky odpovídá jeho sklizené množství, které je také o polovinu nižší (Český statistický úřad, czso.cz). V roce 2016 byl ječmen pěstován na 325 000 hektarech půdy a ve stejném roce bylo sklizeno 1,8 milionů tun obou typů ječmene (Český statistický úřad, czso.cz).

3.1.4. Kultivar Golden promise

Ve Skotském výzkumném institutu plodin (SCRI) začal v roce 1953 výzkum, který byl zaměřen na prověřování změn v kultivovaných (*Hordeum vulgare*) a divokých (*H. spontaneum*) ječmenových liniích. V roce 1956 použili gama záření k ozáření kultivaru „Maythorpe“, díky kterému došlo k mutaci a následnému vzniku nového vysoce úspěšného ječmene Golden promise, který je hojně využíván ve sladovnictví (Obrázek 6).

Kultivar Golden promise nese recesivní mutaci genu GPert, který je lokalizován na krátkém rameni sedmého chromozomu (Thomas *et al.*, 1984) a je zodpovědný za nižší vzrůst rostlin s krátkými tuhými stébly. Velmi dobře snáší také přítomnost různých solí a při růstu v solném prostředí jich akumuluje mnohem méně než velmi blízce příbuzný kultivar Maythorpe. Tato tolerance je způsobená mutací na lokusu Ari-e, která vznikla při ozáření kultivaru Maythorpe. Tyto dva kultivary jsou si geneticky velmi blízce příbuzné, ale nejsou izogenní, proto se liší jejich odpovědi na různé typy stresu (Walia *et al.*, 2007).

Po vystavení obou kultivarů působení NaCl, je jejich růst výrazně snížen. Tato sůl má ovšem větší vliv na Maythorpe, zatímco Golden promise je stále schopný



Obrázek 6: Rozdíly mezi kultivary Maythorpe a Golden promise (znázorněno zleva doprava), A) Rozdíly v klasech, B) rozdíly v semenech, C) Rozdíly v růstu (převzato a upraveno Wendt *et al.*, 2016).

udržovat přijatelný poměr mezi mladýv porovnání s Maythorpe. Koncentrace Cl^- udržují oba kultivary nižší v mezofilu než v epidermálních buňkách. Golden promise má ve svých tkáních, hlavně mladých tkáních listů, vyšší poměry $K^+ : Na^+$ a $Ca^{2+} : Na^+$. Udržování vyšších poměrů těchto iontů je nejspíše důležitý pro zlepšenou snášenlivost vůči solím (Wei *et al.*, 2003).

Kultivar Golden promise má velmi žádané agronomické znaky, jako je například ušlechtilost, krátká tuhá stébla, rychlý růst a vývoj, odolnost vůči ztrátě semen a v neposlední řadě tvoří velmi kvalitní slad (Forster, 2001). Byl pěstovaný Británii a odtud se později rozšířil do Skotska, kde způsobil velký rozvoj a umožnil tak Skotsku dostat se do popředí v produkci sladovnického ječmene.

Nevýhodou tohoto kultivaru je jeho vysoká citlivost vůči plísním (*Erysiphe graminis sp. Hordei*), nicméně díky používání účinných chemických přípravků si tento kultivar udržel svoje dominantní postavení na britském trhu (Forster, 2001).

3.2. Auxiny

Hormony jsou chemické látky, které jsou produkovány v jedné buňce a následně moduluji buněčné procesy v buňce jiné. Interagují se specifickými proteiny zvanými receptory, přičemž tato interakce vyvolá kaskádu reakcí vedoucích ke specifické odpovědi typické pro daný hormon (Taiz a Zeiger, 2002). Auxiny patří mezi rostlinné

hormony konkrétně k fytohormonům. Tato skupina je dále tvořena gibereliny, cytokininy, ethylenem a kyselinou abscisovou. Na rozdíl od živočišných hormonů mají tyto hormony rozšířené spektrum účinku, a i přes to, že jsou obvykle méně specifické jejich funkce je důležitá pro mnoho vývojových procesů a většinou mají v rostlinném těle více než jednu funkci. Všechny tyto hormony působí ve velmi nízkých koncentracích. Dalším typem rostlinných hormonů jsou steroidní hormony zvané brassinosteroidy s rozsáhlým spektrem účinků na morfologii rostliny během jejího vývoje. U rostlin byly také identifikovány řady dalších signalizačních molekul, které mají důležitou roli při obraně proti patogenům a býložravcům. Mezi tyto molekuly je ražena kyselina jasmonová nebo kyselina salicylová. U rostlin jsou stále identifikovány další typy hormonů a signálních molekul (Taiz a Zeiger, 2002).

Auxiny jsou jedněmi z nejstarších studovaných oblastí rostlinného výzkumu. Už Charles Darwin prováděl experimenty, ve kterých pozoroval účinky hypotetické látky regulující tropické prodlužování rostlin. Právě tento objev byl jeden z prvních zaznamenaných efektů auxinů (Darwin, 1880). Podstatu tropismů popsal a vysvětlil F. W. Went při práci s koleoptilemi ovsa. Prokázal, že špičky koleoptilů produkují látku, které stimuluje prodlužování.

Všeobecně jsou auxiny a cytokininy považovány za nezbytné pro životaschopnost rostliny na rozdíl od ostatních rostlinných hormonů a signalizačních molekul. Doposud nebyli vytvořeni žádní mutanti, kteří by nebyli schopni syntetizovat auxiny nebo cytokininy. Mutace vedoucí ke ztrátě tvorby jednoho z hormonů, není slučitelná s životem rostliny a je pro ni letální (Taiz a Zeiger, 2002).

Hlavní funkcí auxinů je regulovat klíčové procesy rostlinného růstu a vývoje. Modifikují také různé procesy, jako jsou tropické reakce na světlo a gravitaci, rozdělování a prodlužování buněk, diferenciaci, apikální dominanci, stárnutí a kvetení (Woodward a Bartel, 2005). Auxiny také velmi významně ovlivňují morfologii kořenů a to tak, že inhibují jejich prodlužování a zvyšují tvorbu postranních kořenů.

V praxi se většinou využívají auxiny syntetické, a to kvůli nestálosti IAA. V minulosti se využívaly jako herbicidy, nicméně kvůli jejich vysoké toxicitě pro živočichy bylo jejich používání zakázáno. Využívají se převážně v zahradnictví ke stimulaci zakořeňování řízků. Spolu s cytokininy jsou základními složkami pro tkáňové kultury. Používání exogenních auxinů pro podporu růstu rostliny způsobuje pouze mírnou a krátkodobou stimulaci. U některých typů semenáčků může mít dokonce taková to aplikace auxinu inhibiční účinky. Optimální koncentrace podporující

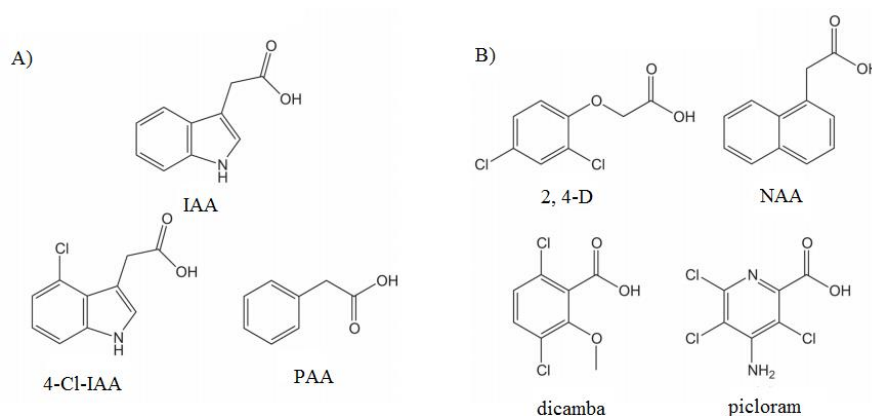
prodlužovací růst je v rozmezí 10^{-6} až 10^{-5} M (Taiz a Zeiger, 2002). Koncentrace nad tuto hodnotu způsobují inhibici růstu, kvůli vznikajícímu ethylenu.

3.2.1. Struktura a rozdělení auxinů

Struktura auxinů byla objevena náhodně při testu lidské moči, ze které Köhl izoloval látku, která byla následně identifikována jako kyselina indolyl-3-octová (z angl. indol-3-acetic acid: IAA).

Auxiny se rozdělují na dvě skupiny podle původu jejich vzniku na přírodní a uměle připravené neboli syntetické (Obrázek 7). Mezi přirozené auxiny patří skupina strukturně podobných látek, a to kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina indolyl-3-máselná (z angl. indole-3-butyric acid: IBA), kyselina 4-chlorindolyl-3-octová (4-Cl-IAA) a kyselina fenylacetová (z angl. phenylacetic acid: PAA) (Pavlová, 2011). PAA se nenachází ve všech rostlinách, její největší zastoupení je v plodech ovocných stromů. Kvůli nižší účinnosti se vyskytuje v řádově vyšších koncentracích než IAA. Na rozdíl od IAA je PAA stabilní, během skladování se nerozkládá a je schopna odolat i autoklávování (Leuba *et al.*, 1989).

4-Cl-IAA je 1,3 až 50krát silnější než samotná IAA (Reinecke, 1999). Byla identifikována v rostlinách kmene *Viciaea* rodiny *Fabaceae* (Reinecke, 1999), aktivně byla zkoumána hlavně u luštěnin. Za použití analýzy plynové chromatografie s hmotnostním spektrometrem (GC-MS) byla identifikována v nezralých i zralých semenech *Pisum sativum*, nicméně nebyla nalezena v žádných jiných orgánech této



Obrázek 7: Struktura auxinů: A) Přirozeně se vyskytující auxiny: kyselina indolyl-3 octová (IAA), kyselina 4-chloroindolyl-3-octová (4-Cl-IAA), kyselina fenylacetová (PAA). B) Syntetické aktivní auxiny: kyselina 2,4-dichlorofenoxyoctová (2, 4-D), kyselina 1-naftalenoctová (NAA), kyselina 3,6-dichlor-2-methoxybenzoová (dicamba), kyselina 4-amino-3, 5, 6-trichlorpyridinová (picloram). (Převzato a upraveno Korasick *et al.*, 2013).

rostliny. Ostatní tkáň obsahuje pouze IAA (Katayama, 1988). U *Arabidopsis* přítomnost této kyseliny dosud nebyla prokázána.

Existuje i velké množství synteticky připravení auxinů (Obrázek 7 B), jejichž společným znakem je aromatický kruhový charakter s karboxylovou skupinou v postranním řetězci. Všechny známé syntetické auxiny jsou slabé organické kyseliny a využívají se převážně v zahradnictví a zemědělství jako herbicidy. Bylo zjištěno, že kyselina α -naftyloctová (z angl. **n**aphtalene**a**cetic **a**cid: NAA) stimuluje dělení buněk v koncentracích, které jsou mnohem nižší než koncentrace potřebné ke stimulaci buněčného dělení. Oproti tomu další ze syntetických auxinů kyselina 2,4-dichlorfenoxycetová (2,4-D) stimuluje pouze buněčné dělení, nikoliv prodlužování buněk (Campanoni a Nick, 2005).

3.2.2. Kyselina indolyl-3- octová (IAA)

Nejvíce zastoupeným přírodním auxinem v rostlinných tělech je kyselina indolyl-3- octová (IAA). Je velmi důležitá pro regulaci růstu a vývoje rostlin. Všechny rostlinné tkáň jsou schopné v nízkých koncentracích IAA produkovat, avšak její hlavní biosyntéza probíhá v mladých rychle se dělících buňkách rostlin, jako jsou například buňky apikálního meristému stonku, mladých listů nebo meristému kořene. V těchto pletivech je koncentrace volné IAA nejvyšší (Taiz a Zeiger, 2002). S rostoucím stářím pletiva klesá i množství IAA, které obsahuje. IAA se přirozeně vyskytuje jak v apoplastu, tak i v cytosolu, kde se nachází převážně v konjugované formě. Až jedna třetina veškeré IAA v buňce se nachází v chloroplastech, jelikož právě chloroplasty jsou místem syntézy tryptofanu, který je prekurzorem IAA (Viz kapitola 3.3.4.). V buňce je distribuce IAA regulována převážně hodnotou pH, jelikož auxiny se hromadí v alkalických oblastech buňky.

I přes skutečnost, že jsou auxiny nezbytnými růstovými a vývojovými regulátory a byly objeveny jako jeden z prvních rostlinných hormonů, princip jejich regulace není doposud plně popsán. V rostlinách existuje několik mechanismů, kterými je možné regulovat hladinu IAA. Může vytvářet konjugáty s různými skupinami látek, včetně cukrů, aminokyselin nebo peptidů (Rampey *et al.*, 2004). 95 % veškeré IAA přítomné v rostlině se nachází v konjugovaném stavu (Campanella *et al.*, 2003) Nejčastější lokalizace je v cytosolu nebo zásobních pletivech, kde slouží jako zdroj volné IAA. Při konjugaci IAA hrají velmi důležitou roli konjugační enzymy, na kterých závisí míra

konjugace a také rozhodují o sloučenině, ke které bude IAA konjugována (Taiz a Zeiger, 2002).

3.2.3. Typy konjugátů

Konjugáty vznikají spojením karboxylové skupiny IAA s cukry prostřednictvím esterových vazeb nebo s aminokyselinami či peptidy, prostřednictvím amidových vazeb. Cukerné konjugáty převažují v endospermových tkáních, zatímco konjugáty IAA s aminokyselinami ve zralých semenech a ve většině rostoucích vegetativních tkáních. Poměr mezi volnou a konjugovanou IAA je řízen tkáňově specifickými a vývojem regulovanými procesy. Biologicky aktivní endogenní konjugáty IAA, které jsou v rostlině hydrolyzovány, mohou fungovat jako skladovací formy, zatímco konjugáty, které se prokázaly v biologických testech jako neúčinné, mají roli při degradaci IAA (Bartel, 2001).

Většina studií je zaměřena na konjugáty s nižší molekulovou hmotností, které se účastní kontroly hladiny IAA u vyšších rostlin. Jsou součástí transportu IAA uvnitř rostliny, slouží k uskladnění IAA a jejímu uvolňování v případě potřeby a v neposlední řadě také i k ochraně IAA před enzymatickou destrukcí (Cohen, 1983, Bartel, 2001). O konjugátech IAA s vyšší molekulovou hmotností existuje méně informací. Byly identifikovány esterové sloučeniny, jako je například glykoprotein z ovesné šťávy (Percival a Bandurski, 1976) a celulósový glukán z kukuřice (Piskornik a Bandurski, 1972). Obě tyto sloučeniny představují hlavní formy IAA v tkáních, z kterých byly izolovány. Kukuřičný glukánový ester představuje více než 50 % celkové IAA. Degradace tohoto konjugátu nastává během klíčení. Většina konjugátů uložených v semenech je velmi rychle hydrolyzována za účelem získání volné IAA, která je nezbytná pro klíčení.

Zrna ovsa (*Avena*) obsahují 8 mg/kg IAA, z toho 5,5 % představuje volná IAA a zbylých 94,5 % je esterifikováno. V těchto semenech byla také nalezena IAA vázána peptidovou vazbou, ale pouze ve stopových množstvích (Percival *et al.*, 1976). Ovesné, kokosové, sójové, slunečnicové, rýžové, hrachové, pšeničné a kukuřičné tkáně obsahují většinu IAA v konjugované formě. U obilných zrn převažují estery IAA, kdežto u semen luštěnin převažuje peptidyl IAA (Bandurski a Schulze, 1977). U kukuřice (*Zea mays*) bylo zjištěno, že semena jako svůj zdroj IAA využívají estery IAA, nikoliv tryptofan nebo některé jeho deriváty (Epstein *et al.*, 1980).

3.2.4. Konjugáty IAA s aminokyselinami

V různých druzích rostlin byly identifikovány různé konjugáty IAA s aminokyselinami jako je IAA-leucin (IAA-Leu), IAA alanin (IAA-Ala), IAA-aspartát (IAA-Asp), IAA-glutamát (IAA-glut), IAA- tryptofan (IAA-Trp), IAA-valin (IAA-Val) a IAA-fenylalanin (IAA-Phe). Například u Huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*) bylo identifikováno několik typů konjugátů IAA s aminokyselinami a to IAA-Leu, IAA-Ala IAA-Asp, IAA-Glu a IAA-Glc (Tam *et al.*, 2000, Kowalczyk a Sandberg, 2001). Velké množství volných hormonů se nachází převážně v listech a kořenech, kde byly zjištěny nejvyšší hladiny právě IAA-Asp a IAA-Ala. Koncentrace IAA-Leu je nejvyšší v kořenech a koncentrace IAA-Ala ve vzdušných tkáních (Kowalczyk a Sandberg, 2001). U semenáčků je až 99 % z celkového množství IAA v konjugovaném stavu, zatímco pouze 1 % IAA je volné, tedy biologicky aktivní (Tam *et al.*, 2000).

V sójových bobech jsou přítomny pouze dva konjugáty a to IAA-Asp a IAA-Glutamát (Epstein *et al.*, 1984), z kterých je za hlavní považován IAA-Asp.

V rostlinách se konjugáty aminokyselinami účastní různých biologických procesů. IAA-Glu a IAA-Asp jsou považovány za prekurzory degradace auxinů, konjugáty jako IAA-Ala, -Leu, -Phe nebo -Val jsou biologicky aktivní s podobným účinkem jako volná IAA. Mohou inhibovat prodloužení kořenů a hypokotylů (Bartel a Fink, 1995). Existuje přímý vztah mezi biologickou aktivitou těchto čtyř konjugátů a rychlostí jejich hydrolýzy, která je zprostředkována příslušnými amidohydrolasami z rodiny ILR1 (odvozen od mutanta *ilr1*, který je IAA-Leu rezistentní) (Sanchez *et al.*, 2016).

3.2.5. Kvantifikace IAA- konjugátů v rostlinných tkáních

Dlouhou dobu byly konjugované druhy IAA kvantifikovány nepřímou pomocí hydrolýzy na volný hormon (Bialek a Cohen, 1989). K hydrolýze esterových konjugátů je nutné mírné alkalické prostředí a pokojová teplota, zatímco amidové konjugáty jsou hydrolyzovány v silně alkalickém prostředí při teplotě alespoň 100°C.

Další metoda je kvantifikace je celková IAA metoda (total IAA method), při které se hydrolyzují oba typy konjugátů tedy esterové i amidové. Následně se měří množství volné IAA přítomné ve vzorku a tento výsledek se srovná s množstvím volné IAA před hydrolýzou. I přesto, že tato metoda není dostatečně specifická ani selektivní, byla pro svoji jednoduchost dlouho používána. Některé indolové sloučeniny, které jsou

příbuzné s IAA, narušují průběh této metody. Například indolyl-3-acetonitril (IAN) může být během testu v silně alkalickém prostředí přeměněn na IAA a následně dochází ke zkreslení výsledků. Jedním ze způsobů, jak se této chybě vyhnout, je přímé měření jednotlivých konjugátů (Kowalczyk a Sandberg, 2001).

K identifikaci IAA konjugátů byla vyvinuta metoda založená na plynové chromatografii a hmotnostní spektrometrii. Vzorky tkání jsou nejprve rozděleny na několik frakcí pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC: **high-performance liquid chromatography**) a následně je každý vzorek analyzován. Tato metoda je velmi přesná a její výhodou je v tom, že je schopná detekovat nízké koncentrace konjugátů, čím se snižuje také množství rostlinné tkáně potřebné k analýze (Kowalczyk a Sandberg, 2001).

3.2.6. Biosyntéza IAA

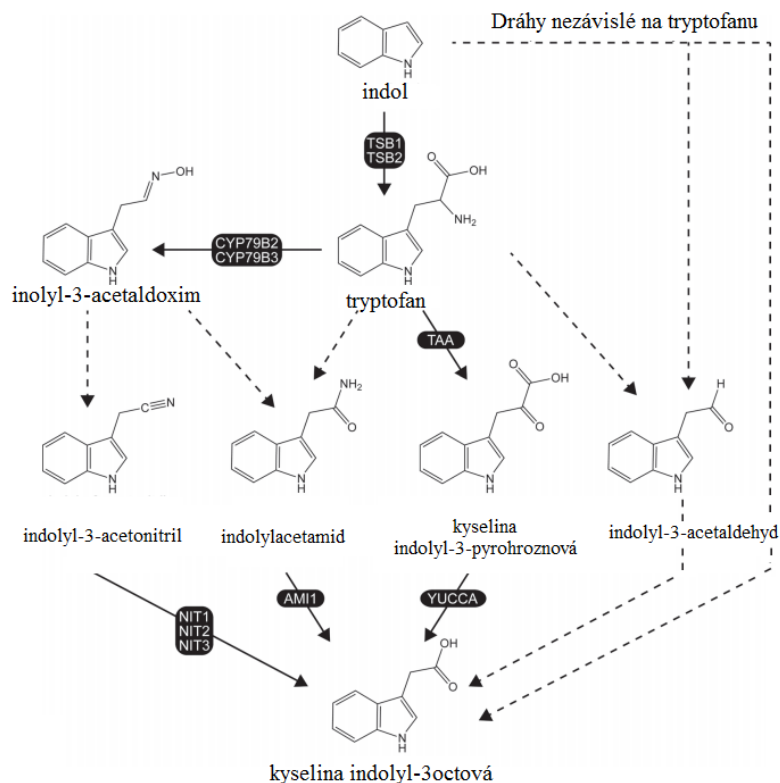
I přesto, že IAA byla identifikována jako jeden z prvních rostlinných hormonů, její biosyntetická dráha na úrovni genů, enzymů a meziproduktů není doposud úplně objasněná. Předpokládá se, že rostliny budou mít podobné hlavní mechanismy syntézy IAA a to proto, že IAA představuje základní látku v jejich životním cyklu. Metabolické cesty IAA u jednotlivých druhů rostlin se mohou lišit.

U rostlin se předpokládá existence dvou hlavních drah biosyntézy IAA, které se vzájemně liší závislostí na tryptofanu (Trp) (Obrázek 8).

Biosyntéza IAA, které není závislá na Trp, využívá jako svůj prekurzor pravděpodobně indolyl-3-glycerolfosfát nebo indol (Ouyang et al., 2000), žádné další meziprodukty ani geny nebyly dosud identifikovány, tedy ani úplná biologická cesta, která by vedla ke vzniku IAA není u tohoto typu dráhy zatím jasná.

Bylo navrženo několik cest Trp-závislé syntézy, které byly pojmenovány podle vznikajícího meziproduktu. Rozlišujeme tedy dráhy indolyl-3-pyrohroznové kyseliny (IPA), indolyl-3-acetamidu (IAM), tryptaminovou a dráhu indolyl-3-acetaldoximu (IAOx) (Obrázek 8) (Woodward a Bartel, 2005). Na základě biochemických, molekulárních a bioinformatických výsledků se předpokládá, že nejpravděpodobnější dráhou biosyntézy IAA je IAM nebo IPA dráha (Mano a Nemoto, 2012).

Cesta biosyntézy IAA a tedy i výchozí látka, se může měnit v závislosti na typu pletiva a jeho vývojovém stádiu. To, že má IAA několik výchozích metabolitů i biosyntetických cest dokazuje její důležitost v rostlinném organismu a zároveň znemožňuje rostlině vyčerpat auxinové zásoby.



Obrázek 8: Biosynetické dráhy IAA. Černé plné šipky mezi jednotlivými látkami znázorňují identifikované enzymy, přerušované šipky zatím neidentifikované (Převzato a upraveno Korasick et al., 2013).

IAM dráha je považována za biosynetickou dráhu IAA závislou na tryptofanu (Obrázek 8). V minulosti byla považována za specifickou pro bakterie, nicméně se prokázalo, že IAM je metabolický meziprodukt auxinové biosyntézy také u mnoha druhů rostlin. IAM může být syntetizován prostřednictvím indolyl-3-glycerolfosfátu v dráze nezávislé na Trp nebo pomocí tryptofan-2-monooxygenasy, která je kódována genem homologním k bakteriálnímu genu *aux1* (Mano a Nemoto, 2012).

Rostlinný patogen *Agrobacterium rhizogenes* nese plazmid (Ri), kterého část zvaná T DNA obsahuje geny *aux1* a *aux2* zodpovědné za dvoustupňovou syntézu IAA z Trp. Samotný plazmid je zodpovědný za růst chloupků na kořenech hostitele. Při infekci rostliny dojde k transferu T-DNA a její začlenění do hostitelského genomu. Vzniklé kořeny s chloupky jsou pak schopné růst na aseptických médiích bez fytohormonu v důsledku integrace genů *aux1* a *aux2* (Mano a Nemoto, 2012). Při syntéze nejprve vzniká IAM převedením Trp pomocí enzymu tryptofan-2-monooxygenasy, kterou kóduje gen *aux1* (Yamada et al., 1985). Následně je IAM převedena na IAA pomocí dalšího enzymu indolyl-3-acetamidhydrolasy, který je kódován *aux2* (Yamada et al., 1985). GenAMI1 je lokalizován v cytoplazmě buněk a kóduje indolyl-3-acetamid hydrolasu, která je schopna přeměnit IAM na IAA.

Dráha kyseliny indolyl-3-pyrrohoznové (IPA) je stejně jako IAM závislá na tryptofanu (Obrázek 8). Trp je na IPA konvertován pomocí enzymu aminotransferasy, která je kódovaná genem TAA1 (Tryptofan Aminotransferaza z *Arabidopsis*). Mutace tohoto genu způsobuje dramatické snížení hladiny volné IAA, z čehož vyplývá, že tato dráha biosyntézy IAA je velmi důležitá pro udržování její hladiny (Mano a Nemoto, 2012).

V IPA dráze popsané u bakterií se nejprve Trp převede deaminační reakcí na IPA pomocí Trp aminotransferasy která je konvertována dekarboxylační reakcí na inolyl-3-acetaldehyd (IAD) za pomoci enzymu inolyl-3-pyruvát dekarboxylasy. IAA vzniká oxidací IAD prostřednictvím enzymu indolyl-3-acetaldehyd oxidasy (Taiz a Zeiger, 2002, Mano a Nemoto, 2012). U rostlin zatím nebyl identifikován gen ani enzym, který by přeměňoval IPA na IAD, proto není jasné, jestli u rostlin probíhá tato dráha stejně jako u bakterií. Aldehydové oxidasy se řadí k strukturálně konzervovaným cytosolickým enzymům a pro svoji funkci vyžadují molybdopterinový kofaktor (Mendel, 2007) Jejich zástupce můžeme najít jak v živočišné, tak rostlinné říši.

3.2.7. Transport auxinů

Auxiny jsou na krátké vzdálenosti (mezi jednotlivými buňkami) transportovány pomocí membránového nebo polárního transportu, jehož rychlost je 5 až 20 cm.h⁻¹ (Taiz a Zeiger, 2002). Při membránovém transportu auxin opustí buňku přes plazmatickou membránu, následně difunduje střední lamelou a vstupuje do další buňky plazmatickou membránou. Celkový proces transportu vyžaduje energii a je velmi citlivý ke sníženým hladinám O₂ nebo různým metabolickým inhibitorům. Polární transport je také velmi specifický pro aktivní auxiny, ať už se jedná o umělé nebo přírodní. Neaktivní analogy nebo metabolity auxinů nejsou tímto typem transportu přenášeny (Taiz a Zeiger, 2002).

Vstup i výstup auxinu z buňky závisí na míře disociace IAA a na transportních proteinech. V kyseleném prostředí buněčné stěny dochází k disociaci 50 až 70 % přítomných molekul, které se následně dostávají do protoplastu pomocí symportu s dvěma H⁺ a přenašečových proteinů AUX1 (z angl. **auxin resistant 1**). IAA je z cytosolu do apoplastu přenášena pomocí transportních proteinů PIN (název odvozený od mutanta *Arabidopsis*, jehož defektní transport IAA z cytosolu do apoplastu způsobuje deformaci květenství, které připomíná jehlici – *pin*). Pokud je IAA

v nedisociovaném stavu, dostává se do buňky přes membránu pomocí pasivní difúze (Pavlová, 2011).

U auxinu, jako jediného fytohormonu, probíhá mezi buňkami polární typ transportu. Vytváří gradienty v určitých buňkách a pletivech, a tím dochází k tvorbě základů jednotlivých orgánů a umožňuje jejich další vývoj. Je velmi významný pro vývoj, a především polarizaci embrya, kdy formuje kořenový a stonkový pól. Není ovlivněn orientací tkáně a není tedy závislý na gravitaci.

Na dlouhé vzdálenosti jsou auxiny transportovány pomocí sítkových elementů floému. Většina IAA je syntetizována v listech, odtud je transportována nahoru nebo dolů, a to s mnohem větší rychlostí, než s jakou jsou auxiny přenášeny pomocí polárního transportu. Tento typ transportu se odlišuje od polárního v tom, že je pasivní, tudíž nevyžaduje energii. Oba typy transportů jsou schopny fungovat nezávisle na sobě.

3.2.8. Vztah auxinů a cytokininů

Cytokininy jsou dalšími z rostlinných fytohormonů, které byly objeveny v padesátých letech minulého století. Prvním objeveným syntetickým cytokininem byl analog kinetinu. Tento objev učinil Folke Skoog a jeho spolupracovníci z University ve Wisconsinu. Kinetin je malá molekula podobná adeninu vyskytující se v molekule DNA, který vzniká jako vedlejší produkt při tepelně indukované degradaci DNA. Až několik let po objevu kinetinu byl nalezen první přirozený cytokinin zeatin, chemicky *trans*-6-(4-hydroxy-3-metylbut-2-enylamino) purin (Letham, 1973), který byl izolován z nezralého endospermu kukuřice.

Funkcí cytokininů je ovlivňovat mnoho fyziologických i vývojových procesů v tělech rostlin. K nejdůležitějším funkcím patří jejich význam při dělení buněk. Dále také ovlivňují diferenciaci pletiv, vaskulární diferenciaci, formování chloroplastů, propagaci klíčení, snižují apikální dominanci, významně působí na transportní procesy a oddalují senescenci listů (Mok, 1994). Za přítomnosti auxinů stimulují buněčné dělení a toto spojení jejich účinků je základem regeneračních procesů. Při těchto procesech velmi záleží na poměru těchto hormonů, jejich vyrovnaný poměr obvykle vede k tvorbě nediferenciovaného pletiva zvaného kalus (Skoog a Miller, 1965). Jak auxiny, tak cytokininy se podílejí na regulaci buněčného cyklu a to tím, že kontrolují aktivitu cyklin-dependentních kináz.

Cytokininy a auxiny společně interagují v mnohých vývojových procesech rostlin, zejména v případě apikální dominance a při vývoji kořenů a výhonků

(Nordström *et al.*, 2004). Apikální dominance je řízena právě jejich poměrem, což dokazuje množství experimentů s mutantními rostlinami *Arabidopsis*, jejichž geny pro auxiny a cytokininy byly pozměněny nebo narušeny. Bylo prokázáno, že mezi nimi existuje mnoho synergických, antagonistických i aditivních interakcí, což vede k předpokladu, že mezi nimi musí být vytvořena komplexní síť signálních interakcí (Coenen a Lomax, 1997). Hladiny těchto hormonů se navzájem ovlivňují a regulují. U tabáků s vyšší produkcí cytokininu, byly pozorovány nižší hladiny IAA a naopak nadprodukce IAA vedla u těchto rostlin ke snížení hladiny cytokininů (Eklöf *et al.*, 2000). Účinek auxinů na biosyntézu cytokininů je velmi rychlý a z toho důvodu může být rostlinou využíván k regulaci hladiny cytokininů, nicméně pokud dojde k ovlivnění syntézy auxinů působením cytokininů, je tato reakce pomalejší a projeví se až po delší době, tento účinek je tedy dlouhodobější, nemůže být tedy rostlinou využit pro rychlou regulaci (Nordström *et al.*, 2004).

3.3. Hydrolasy IAA konjugátů

Hydrolasy patří do skupiny enzymů, jejichž funkcí je štěpit kondenzací vzniklé vazby za pomoci molekul vody. Tyto enzymy jsou děleny podle vazeb, které jsou schopny štěpit. Peptidové vazby jsou štěpeny pomocí peptidas a proteas, vazby glykosidové za pomoci glykosidas (např. amylas) a vazby esterové štěpí esterasy (např. fosfatasy).

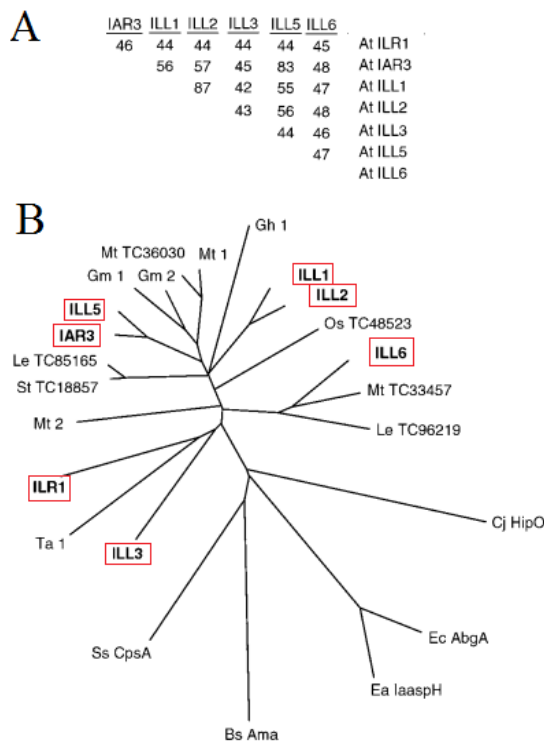
3.3.1. IAA-aminokyselinové hydrolasy

Konjugáty pro tyto hydrolasy vznikají spojením karboxylové skupiny IAA s aminokyselinami prostřednictvím amidových vazeb. IAA-aminokyselinové hydrolasy jsou tedy schopny štěpit amidové vazby mezi IAA a aminokyselinami.

První geny kódující IAA-aminokyselinové hydrolasy byly identifikovány v mutantních rostlinách *Arabidopsis*. *ilr1* a *iar3* mutanti jsou méně citliví vůči IAA-Leu a IAA-Ala, než divoký typ *Arabidopsis*. U mutantů se za nepřítomnosti některých konjugátů neprojevovaly žádné morfologické abnormality, což poukazuje na to, že pro zjištění přesné funkce jednotlivých hydrolas a konjugátů je nezbytné narušit funkci více genů kódujících tyto hydrolasy. U *Arabidopsis* byly proto zkoumány trojití mutanti *ilr1 iar3 ill2*. Na fenotypu těchto rostlin se projevil nízké hladiny endogenních auxinů kratšími hypokotyly a menším množstvím bočních kořenů. Tyto rostliny měly nižší

hladiny volné IAA a naopak vyšší hladiny konjugované IAA. Důvodem byly chybějící geny pro příslušné hydrolasy, které by hydrolyzovaly nadbytečnou konjugovanou IAA. Ze srovnání dvojitých, trojitých mutantů a rostliny mutantní v jediném genu vyplývá, že každá hydrolasa může mít jak jedinečnou, tak překrývající se roli v udržování homeostáze auxinů (Rampey *et al.*, 2004).

Celkově u *Arabidopsis* bylo identifikováno 7 genů pro IAA-aminokyselinové hydrolasy. *ILR1* je odvozen od mutantu *ilr1*, který je IAA-Leu rezistentní. Samotný gen kóduje IAA-aminokyselinovou hydrolasu, která je schopna štěpit IAA-Leu. *IAR3* je odvozen od mutantu *iar3*, který je IAA-Ala rezistentní a kóduje IAA-aminokyselinovou hydrolasu selektivní pro IAA-Leu. Dalších 5 genů *ILL1*, *ILL2*, *ILL3*, *ILL5* a *ILL6* je velmi podobných genu *ILR1* (Obrázek 9). Z těchto 7 genů kódují enzymy schopné štěpit IAA-aminokyselinové konjugáty pouze 4 z nich a to *ILR1*, *ILL1*, *ILL2* a *IAR3*. Enzymy genů *ILL3* a *ILL6* nevykazují *in vitro* aktivitu pro štěpení IAA-aminokyselinových konjugátů (Rampey *et al.*, 2004). *ILL5* je pseudogen nejvíce podobný *IAR3* (Davies *et al.*, 1999). I přes to, že je pseudogen inaktivní, je stabilní součástí genomu a je podobný jinému genu, jelikož vzniká mutací aktivních genů.



Obrázek 9: Fylogenetický strom amidohydrolasových homologů z rostlin a mikrobů. A: Procento identity mezi hydrolasami *Arabidopsis*, B: Evoluční vztahy mezi hydrolasami IAA konjugátů a příbuzných proteinů z rostlin a mikrobů (Převzato a upraveno LeClere *et al.*, 2002).

ILR1 a *IAR3* jsou ze 46 % identické, na základě jejich podobnosti bylo u *Arabidopsis* identifikováno dalších pět genů, které kódují podobné hydrolasy (LeClere *et al.*, 2002). Mezi těchto pět genů se řadí *ILL1* a *ILL2*, které jsou z 87 % navzájem identické, s genem *IAR3* identické z 57 % a s *ILR1* pak z 44 %. *ILL3* je identický v rozmezí od 42 do 48 % s ostatními hydrolasami (Obrázek 9). *ILR1* gen kóduje IAA-aminokyselinovou hydrolasu selektivní pro IAA-Leu a IAA-Phe. Druhým genem kódující hydrolázy IAA-aminokyselin je *IAR3*, který je velmi podobný genu *ILL5*, s kterým je úzce spojen a společně tvoří podrodinu šesti hydrolas štěpící konjugáty IAA (Davies *et al.*, 1999).

Gen *IAR3* je nejvíce exprimován v kořenech, stoncích a květech, z čehož vyplývá, že tyto tkáně jsou místy hydrolýzy IAA konjugátů (Davies *et al.*, 1999). *ILR1* nejrychleji hydrolyzuje IAA-Phe a IAA-Leu a to až osmkrát rychleji než hydrolyzuje IAA-Ala, IAA-Gly a IAA-Val (Bartel a Fink, 1995). Hydrolasa kódovaná *IAR3* genem nejrychleji hydrolyzuje IAA-Ala a to až šestkrát rychleji než IAA-Gly. Pokud srovnáme rychlost hydrolýzy IAA-Ala s ostatními konjugáty Val, Phe nebo Leu, je rychlost hydrolýzy IAA-Ala až 200-krát vyšší. IAA-Ile není detekovatelně hydrolyzován žádným z těchto enzymů

(Davies *et al.*, 1999). *IAR3*, *ILL2* a *ILR1* jsou lokalizovány v endoplazmatickém retikulu, což ho činí místem pro modulaci rychlosti hydrolýzy konjugátů IAA s aminokyselinami, která následně vyvolá aktivaci auxinové signalizace (Sanchez *et al.*, 2016).

3.3.2. Výskyt IAA aminokyselinových hydrolas

U *Arabidopsis* čtyři amidohydrolasy ze sedmi kódované geny, *ILR1*, *IAR3*, *ILL1* a *ILL2* jsou schopny hydrolyzovat konjugáty IAA *in vitro* (LeClere *et al.*, 2002). Jsou exprimované *in vivo* v listech, stoncích a květech. V semenech byly detekovány pouze produkty genů *ILL2* a *ILR1* a u kořenů *IAR2* a *ILL1*. Nejaktivnější *in vitro* z amidohydrolas je *ILL2*. *ILL2* a *ILR1* jsou přítomny v částečně se překrývajících tkáních, z čehož vyplývá, že obě tyto hydrolázy mohou mít překrývající se funkci. Produkt genu *ILR1* je důležitý pro hydrolýzu IAA-Leu a IAA-Phe v kořenech a také pro hydrolýzu IAA-Leu v hypokotylech. *ILR1* hydrolasa v porovnání s ostatními hydrolasami má jiné optimální pH, kofaktor i substrát. *IAR3* hydrolyzuje IAA-Ala v kořenech a také konjugáty IAA s malými vedlejšími řetězci (Rampey *et al.*, 2004).

Žádná z amidohydrolas identifikovaných u *Arabidopsis* nedokáže účinně hydrolyzovat IAA-Asp a IAA-Glu (LeClere *et al.*, 2002).

U pšenice seté (*Triticum aestivum*) byl izolován gen *TaIAR3*, který vykazuje 79 % podobnost s genem *ILR1* u *Arabidopsis*. Protein *TaIAR3* se liší v tom, že velmi slabě hydrolyzuje IAA-Ala a nehydrolyzuje žádné další aminokyselinové konjugáty IAA (Campanella *et al.*, 2004). Dalším rozdílem je, že *TaIAR3* má nízkou specifitu pro konjugáty esterů IAA-Glc a IAA-myoinositol a naopak vysokou specifitu pro konjugáty kyseliny indol-3-butyrové (IBA-Ala, IBA-Gly) a kyseliny indol-3-propionové (IPA-Ala) (Campanella *et al.*, 2004).

U semen fazolí *Phaseolus vulgaris* byl nalezen gen *IAP1*. Jeho exprese je závislá na vývojovém období a rychlosti růstu semen. Produkty genu se tedy akumulují během vývoje v semenech a jsou využívány během klíčení, tak jako ostatní skladovací proteiny. U semen fazolí jsou hlavní formou auxinu proteiny, které jsou modifikované IAA a které představují odlišnou třídu konjugovaných fytohormonů. Tyto IAA-modifikované proteiny se nacházejí i v dalších vývojových fázích fazolových rostlin (Walz *et al.*, 2002).

4. MATERIÁL A METODY

4.1. Použité chemikálie

- Chemikálie
 - Agarosa, Sigma
 - Dihydrogenfosforečnan draselný, Lach-Ner
 - Dusičnan amonný, Sigma-Aldrich
 - Dusičnan vápenatý tetrahydrát, Penta
 - Dusičnan draselný, Penta
 - dNTPs 10 mmol.l⁻¹, Bio-Rad
 - EDTA, Penta
 - Ethanol 96%, Lach-Ner
 - Ethidium bromid 0,5 %, Ambion
 - Hydroxid draselný, Lach-Ner
 - Citronan sondný, NeoLab
 - Chlorid manganatý, Penta
 - Chlorid litný, Invitrogen
 - Chlorid sodný, Lach-Ner
 - Chloroform, Sigma-Aldrich
 - Isopropanol, Lach-Ner
 - Kyselina boriná, NeoLab
 - Mili Q H₂O
 - Molybdenan sodný dihydrát, Penta
 - Octan sodný trihydrát, Lach-Ner
 - Pufr TURBO DNase, Invitrogen
 - Síran hořečnatý heptahydrát, Merck
 - Síran měďnatý, Penta
 - Síran zinečnatý heptahydrát, NeoLab
 - TRI Reagent Solution, Invitrogen
 - Tris, Duchefa
 - TURBO DNase, Invitrogen
 - Vzorkovací pufr 5x, GelPilot

- Komerční kity
 - Gb SG PCR Master Mix, Generi Biotech
 - GoTag G2 Flexi DNA Polymeráza, Promega
 - NucleoSpin Gel and PCR clean-up, Macherey-Nagel
 - RevertAid first strand cDNA synthesis kit, Thermo Scientific
 - ZR Plant RNA MiniPrep, Zymo Research

- Použité roztoky
 - 2% agarózový gel: 1 g agarózy; 50 ml TAE pufr.
 - TAE pufr (Tris-Acetate-EDTA): 1 mol·l⁻¹ EDTA; 40 mol·l⁻¹ Tris-acetát; ddH₂O; pH 8, sterilizováno autoklávováním
 - Solný roztok: 0,8 M citronan sodný, 1,2 M NaCl, sterilizováno autoklávováním
 - Hoaglandův roztok: 1 L Mili Q H₂O, 5 ml 1M KNO₃, 5 ml 1M Ca(NO₃)₂*4 H₂O, 1 ml Fe-EDTA, 2 ml 1M MgSO₄*7H₂O, 0,5 ml 1M KH₂PO₄ (pH upravit na 6.0 pomocí 3M KOH), 0,5 ml roztoku s obsahem: H₂BO₃, MnCl₂*4H₂O, ZnSO₄*7H₂O, CuSO₄, Na₂MoO₄*2H₂O

- Software
 - BioEdit 7.0.5, Ibis Therapeutics
 - program ImageLab 5.1, Bio-Rad
 - program ViiATM7 Software v1.2.2, Applied Biosystems
 - Statistica 64, TIBCO Software Inc.

4.2. Seznam použitých přístrojů a zařízení

- Komůrka pro elektroforézu, ENDURO gel XL, Labnet
- Mikrovlnná trouba EMM 2005, Elektrolux
- Mrazák Ultra low, Sanyo
- NanoDrop Lite spektrofotometr, Thermo scientific
- Pipetovací robot Bravo, Agilent technologies
- Stolní centrifuga chlazená Scanspeed 1730R, Labogene
- Stolní centrifuga NF 400, Nüve
- Thermocyklér T personal, Biometra

- Thermocyklér T personal ViiA 7, Applied biosystems
- Thermocyklér Veriti, 96 well fast, Applied biosystems
- Třepačka MS 3 digital, IKA
- UV transluminátor Gel Doc EZ imager, Bio-Rad
- Vortex VSM-3, Shelton scientific
- Vyhřívací a chladicí termoblok Thermocell, Bioer
- Výrobní ledu AF 80, Scotsman

4.3. Výběr genů

Pro analýzu bylo vybráno 7 referenčních genů, které jsou shrnuty v Tabulce 1 na základě vědeckých článků (Cai *et al.*, 2018 a Gines *et al.*, 2018).

Tabulka 1: Shrnutí analyzovaných referenčních genů.

Gen	Celý název genu	Forward primer	Velikost cDNA (bp)
		Reverse primer	Velikost gDNA (bp)
Act	Aktin	TGTTGACCTCCAAAGGAAGCTATT	74
		GGTGCAAGACCTGCTGTTGA	154
EF2 α	Elongační faktor 2 alpha	CCGCACTGTCATGAGCAAGT	59
		GGGCGAGCTTCCATGTAAAG	59
EF1	Elongační faktor 1	CCAACTTCACTGCCCAGGTCA	290
		CACAGCAACCGTCTGCCTCAT	290
MHD	Malát dehydrogenasa	GCACTGGTGTGAATGTTGC	218
		CTTCTCAGGGATAGATGGAGC	
TUB	Tubulin α	CCATCAAGACCAAGCGCACTA	238
		CATACCCTCACCCACATACCA	238
PGK	Phosphoglycerát kinasa	GGAAGAGAAGAACGAACC	218
		CAACAATGGCAGCAAATG	
E2	Ubiquitin konjugační enzym 2	CCATCCGAACATCAATEGC	112
		CGGTAAGCAGCGAGCA	

Na základě analýzy transkriptomických dat ze základu stonků 1DAG rostlin bylo identifikováno 6 genů, které by mohly kódovat auxin-aminokyselinové hydrolasy (Tabulka 2). Porovnání jejich sekvencí se sekvencemi genů uvedených v databázi Ensembl Plants se známými funkcemi bylo možné určit jejich nejbližšího homologa, a tím pádem predikovat jejich funkci.

Tabulka 2: Shrnutí analyzovaných genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy, AMK (aminokyseliny)

Starý název genu	Nový název genu	GenBank (předpokládaný protein)	Nejbližší homolog	Počet transkriptů
MLOC_14346	HORVU5Hr1G118040	AK377038.1	IAA-AMK hydrolasa ILR1	3/4
MLOC_43138	HORVU5Hr1G027710	AK361501.1	IAA-AMK hydrolasa ILR1	4/16
MLOC_51086	HORVU3Hr1G048560	AK361432.1	IAA-AMK hydrolasa ILR1-like 4	3/5
MLOC_54194	HORVU2Hr1G090000	AK370808.1	IAA-AMK hydrolasa ILR-like 3	2/4
MLOC_54858	HORVU2Hr1G089950	AK362651.1	IAA-AMK hydrolasa ILR-like 3	5/14
MLOC_70768	HORVU5Hr1G055060	AK370527.1	IAA-AMK hydrolasa ILR-like 1	6/10

Tabulka 3: Primery a velikosti produktů pro analyzované geny

Název genu	Forward primer	Velikost cDNA (bp)
	Reverse primer	Velikost gDNA (bp)
MLOC_14346	GCTGCTACAGTCTCGGAAGG	228
	CCCGGTTATGATAGCCTTGA	228
MLOC_43138	CATTTTTGGTCTGCATGTCG	187
	TTTGTTGGAGGCTGATGATG	187
MLOC_51086	CCCTCCAACAATCAACAACC	168
	CAGCATCCCCACGAAGTAGT	168
MLOC_54194	CCCTCACACCCAATGTATCC	200
	CGAGCCGACTTTCTCATTTC	200
MLOC_54858	GAAGCCGACAGGCTCAATAG	181
	GGTCGTCTTCTCTCGAGGTG	181
MLOC_70768	GGACTTCATGGAGGAAACGA	192
	GACTCCGATGGTGAAGAAGG	192

4.4. Biologický materiál

Byly použity rostliny ječmene (*Hordeum vulgare*) kultivaru Golden promise. Celkem bylo analyzováno 11 různých rostlinných tkání každá ve třech replikátech. Shrnutí typů tkání je v Tabulce 4. Dohromady tedy bylo zpracováno 33 různých vzorků tkání ječmene.

Tabulka 4: Seznam všech použitých tkání ječmene a jejich stáří. DAG (**d**ay **a**fter **g**ermination neboli den po klíčení)

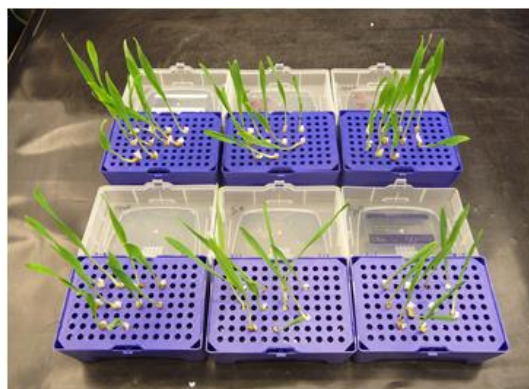
Použitá tkáň	Označování v experimentech	Stáří rostliny v dnech
Listy	List 1	37 dní
Listy	List 2	50 dní
Semena	0 DAG	0 dní
Semena	1 DAG	1 den
Semena	2 DAG	2 dny
Kořeny	Kořeny	10 dní
Základ stonku	Základ stonku	10 dní
Nadzemní zelená část	Nadzemní zelená část	10 dní
Klas	Klas A	66 dní (GS75 medium milk; rostlina má vytvořené klasy, které jsou stále zelené, po narušení semena je obsah mléčný)
Klas	Klas B	83 dní (GS85 soft dough; rostlina má plně vyvinuté klasy, které začíná sesychat, stále převažuje zelená barva listů, po narušení zrna je obsah stále vlhký, ale začíná být moučný)
Klas	Klas C	97 dní (GS87 hard dough; klasy jsou z části seschlé, po narušení semene je obsah tuhý)

4.5. Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.5.1. Naklíčení semen a následné pěstování v hydroponii

Semena ječmene kultivaru Golden Promise byla sterilizována ponořením na 40 s do 70% ethanolu pak na 3–4 min do 4% Sava. Po uplynutí této doby byla minimálně 6x propláchnuta sterilní destilovanou vodou a položena na navlhčený ubrousek do Petriho misek (10 semen do každé misky). Takto připravená semena byla vložena do chladničky za účelem sjednocení procesů klíčení (tzv. jarovizace). Po uplynutí 3 dní byla přenesena do fytotronu k vyklíčení, které trvá 1–2 dny.

Vyklíčená semena byla následně přenesena do hydroponického systému, který byl vytvořen krabičkou od špiček (Obrázek 10). Do krabičky se následně nalil Hoaglandův roztok o poloviční koncentraci, než se používá pro dospělé rostliny. Každé naklíčené semeno bylo zbaveno zbytků ubrousku a vloženo do připravených špiček kořeny dolů. Takto připravené semenáčky byly transportovány do fytotronu.



Obrázek 10: Ukázka hydroponie s využitím krabičky se špičkami.

4.5.2. Izolace RNA

Po dosažení potřebného stáří rostliny byl proveden odběr jednodílných vzorků. Části rostlin byly odebírány pomocí sterilních pomůcek a ihned zmrazeny v tekutém dusíku. Po odebrání všech vzorků byl materiál zamrazen na -80°C . Před samotnou izolací byly vzorky nadrceny v třecí misce s tloučkem a chlazeny pomocí tekutého dusíku až těsně do doby, než byla zahájena izolace.

4.5.2.1. RNA izolace pomocí ZR Plant RNA MiniPrep kitu

Pomocí tohoto kitu byla izolována RNA z listů, kořenů, základů stonků a zelené části ječmene. Nejprve bylo do mikrozkuhavky naváženého 150 mg nadrceného rostlinného materiálu. Ke vzorkům bylo přidáno 800 μl RNA lyzačního roztoku a důkladně zvortexováno. Mikrozkuhavky byly stočeny 1 min při 15 000 g a 4°C (po dobu celé izolace se parametry stáčení nemění). 700 μl supernatantu bylo přeneseno na

kolonky Zymo-Spin IIC kolonku a opět stočeno za stejných podmínek. Filtrát byl smíchán se 700 μ l 96% ethanolu a nanesen na kolonku Zymo-Spin IIC. Následovalo stočení, přičemž veškerý filtrát, který přes kolonku IIC protekl, byl vylit. Kolonka Zymo-Spin IIC byla postupně přemyta 400 μ l RNA Prep roztokem a 700 μ l, 400 μ l promývacím roztokem. Mezi jednotlivými objemy byly mikrozkuhavky stočeny a filtrát vylit. Nakonec byla kolonka IIC přenesena do mikrozkuhovek, kde na ni bylo přidáno 50 μ l ddH₂O a následně byla stočena po dobu 2 min při 15 000 g a 4°C. Izolovaná RNA byla uskladněná v mrazáku na -80°C nebo použita v dalším kroku (ošetření DNasou).

4.5.2.2. RNA izolace pomocí TriReagentu

Pomocí této metody byla izolována RNA ze všech semen a klasů, kvůli vysokému obsahu škrobu, který znemožňoval izolaci RNA pomocí kitu. Do mikrozkuhavky bylo naváženo 0,8 mg rozdrčeného rostlinného materiálu, který byl uchováván v tekutém dusíku do doby, než k němu byl přidán 1 ml TriReagentu. Od tohoto kroku probíhala práce v digestoři. Vzorky byly důkladně zvortexovány po dobu přibližně 30 s a inkubovány 5 min na třepačce při frekvenci 2 000 a při pokojové teplotě. Následně byly stočeny při 12 000 g, 10 min a 4°C. Supernatant byl přenesen do nových mikrozkuhovek, kde k němu bylo přidáno 200 μ l chloroformu. Opět následovalo zvortexování a inkubování na třepačce při frekvenci 2 000, 5 min a při pokojové teplotě a následné stočení při 12 000 g, 15 min a 4°C. Vytvořená vodní fáze byla přenesena do nových mikrozkuhovek. Další kroky už probíhaly mimo digestoř. Ke vzorkům bylo přidáno 250 μ l isopropanolu a 250 μ l solného roztoku, kvůli přítomnému škrobu. Mikrozkuhavky byly několikrát převráceny a inkubovány 10 min při pokojové teplotě a následně stočeny při 12 000 g, 8 min při 4°C. Supernatant byl z mikrozkuhovek odstraněn a vzniklý pelet byl promyt 1 ml 70% ethanolu. Následně byly vzorky stočeny při 7 500 g, 5 min a při 4°C. Ethanol byl odstraněn a pelet byl nechán sušen při pokojové teplotě až do zprůhlednění. Nakonec byl rozpuštěn v 50 μ l ddH₂O. Izolovaná RNA byla uskladněná v mrazáku na -80°C nebo použita v dalším kroku (ošetření DNasou).

4.5.3. Ošetření RNA DNasou

Tento krok slouží k přečištění vyizolované RNA, za účelem odstranit genomickou DNA ve vzorcích. K 50 μ l izolované RNA bylo přidáno 6 μ l 10x

TurboDNasa pufru a 2 μ l TurboDNasy. Tato směs byla inkubována po dobu 30 min při 37°C. Po uplynutí doby byly přidány další 2 μ l TurboDNasy a opět inkubováno 30 min při 37°C. Následně bylo přidáno 30 μ l chloridu litného a vzorky byly vloženy do mrazáku na -20°C nejméně na 1 h. Poté byly vzorky stočeny na 30 min, 17 000 g a 4°C. Supernatant byl odstraněn a k peletu bylo přidáno 500 μ l 70% ethanolu a stočeno 10 min při 17 000 g a 4°C. Následovalo promytí peletu 500 μ l 96% ethanolu. Supernatant byl odstraněn a pelet byl sušen po dobu 5 min na stole při pokojové teplotě. Po vysušení byl rozpuštěn v 20 μ l ddH₂O a takto připravená RNA byla uskladněna na -80°C.

4.5.4. Příprava vzorků a elektroforéza na agarosovém gelu

Před samotnou elektroforézou byly analyzované vzorky smíchány v poměru 1:5 s vzorkovacím pufrům a následně pipetovány na gel. Pokud se jednalo o vzorky z PCR reakce, vzorkovací pufr nebyl přidáván, jelikož vzorky obsahovaly 5x Green GoTaq Flexi pufr, díky kterému bylo možno vzorky v gelu vizualizovat.

Pro všechny provedené elektroforézy byl použit 2% roztok agarosy v 1x TAE pufru. Bylo naváženo příslušné množství agarosy a smícháno s TAE pufrům a pomalu rozehríváno, dokud nedošlo k rozpuštění veškeré agarosy. Tento roztok byl smíchán s 0,5% ethidium bromidem na 50 ml bylo přidáno 5 μ l ethidium bromidu. Takto připravený roztok byl nalit do elektroforetické komůrky a následně byl do něho vložen hřebínek. Takto připravený gel byl nechán tuhnout po potřebně dlouhou dobu. Po ztuhnutí byl z gelu vytáhnut hřebínek a gel přenesen do elektroforetické komůrky s 1x TAE pufrům. Elektroforéza probíhala 30 min při napětí 100 V. Po provedení elektroforézy byl gel vyjmut z komůrky a přenesen na snímací desku a vzorky byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a zobrazeny v programu ImageLab 5.1.

4.5.5. Ověření čistoty a stability vyizolované RNA

Čistota a stabilita vyizolované RNA byla zjištěna pomocí provedení PCR reakce (polymerázové řetězové reakce, zkratka z ang. **p**olymerase **c**hain **r**eaction), která umožňuje rychlé namnožení přítomné DNA za pomoci DNA polymerázy. Reakční směs pro tuto analýzu byla připravena podle Tabulky 5. V našem případě by žádná DNA neměla být přítomna, pokud je tomu jinak, jedná se o znečištění genomickou DNA. Po PCR byla provedena elektroforéza za použití 2% agarosovém gelu.

Tabulka 5: Složení reakční směsi pro 1 vzorek

PCR – grade H ₂ O	12,75 µl
5x Green GoTaq Flexi pufr	4,00 µl
10 mM dNTP	0,25 µl
10 µM primer Forward	0,50 µl
10 µM primer Reverse	0,50 µl
25 mM MgCl ₂	1,20 µl
GoTaq G2 Flexi polymerasa (5U/ µl)	0,10 µl
Templátová RNA	1,00 µl
Celkový objem reakce	20,00 µl

Podmínky PCR reakce

- 1) Počáteční denaturace: 95°C, 3 min
 - 2) Denaturace: 95°C, 30 s
 - 3) Navázání primerů: 56°C, 30 s
 - 4) Prodlužování: 72°C, 30 s
 - 5) Finální prodlužování: 72°C, 5 min
 - 6) Konec reakce: 4°C, ∞
- } 40 x

4.5.6. Stanovení koncentrace na Nanodropu

Pro měření koncentrace vzorků byl použit Nanodrop. Před měřením byly vzorky zvortexovány a stočeny. Příklad byl zapnut a byl navolen program pro měření koncentrace v závislosti na typu nukleové kyseliny. Následně byl na měřič Nanodropu napipetován 1 µl vody, který sloužil pro nastavení pozadí měření blank. Pak byl nanášen vzorek RNA/DNA na měřicí oblast v množství 1 µl a po měření bylo toto místo očištěno buničinou a bylo provedeno další měření. Po skončení měření bylo měřicí místo očištěno pomocí vody a buničiny.

U DNA i RNA byly měřeny dvě vlnové délky 260 a 280 nm, z těchto dvou hodnot byl vypočítán podíl 260/280, který se měl pohybovat pro DNA v hodnotách okolo 1,8 a pro RNA v hodnotách okolo 2. Nízký podíl 260/280 v obou případech značí kontaminaci vzorku proteiny.

4.5.7. Reverzní transkripce

U všech vzorků izolované RNA byla změřena koncentrace pomocí Nanodropu. Reakce přepisu byla napočítána na 500 ng izolované RNA za použití RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit. Potřebné komponenty kitu byly před použitím rozmrazeny, zvortexovány a stočeny. Při práci byly komponenty kitu i vzorky RNA uchovávány na ledu. Následně byly reakce napipetovány podle následující tabulky (Tabulka 6).

Tabulka 6: První krok přepisu RNA do cDNA.

Templát celkové RNA	500 ng
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 μ l
ddH ₂ O	Doplnit do 12 μ l

Následně byly připravené mixy inkubovány 5 min při 65°C za použití termocykléru. Po inkubaci byly do mikrozkušavek napipetovány následující komponenty kitu (Tabulka 7). Souběžně byla také připravena kontrolní reakce podle Tabulky 8.

Tabulka 7: Druhý krok přepisu RNA do cDNA.

5x Reakční pufr	4 μ l
RiboLock RNase inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
10 mM dNTP mix	2 μ l
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ l)	1 μ l
Celkový objem	20 μ l

Tabulka 8: Komponenty pro přípravu kontrolní reakce syntézy.

Kontrolní GAPDH RNA (50 ng/ μ l)	2 μ l
Oligo (dT) ₁₈ primer	1 μ l
5x Reakční pufr	4 μ l
RiboLock RNase inhibitor (20 U/ μ l)	1 μ l
10 mM dNTP mix	2 μ l
RevertAid M-MuLV RT (200 U/ μ l)	1 μ l
ddH ₂ O	9 μ l
Celkový objem 20 μ l	

Po smíchání všech reagensů byly vzorky krátce stočeny a inkubovány 60 min při 42°C. Reakce byla ukončena zahřátím vzorků na 70°C po dobu 5 min. Vzniklá cDNA byla uskladněna v mrazáku na -20°C nebo ihned použita pro další experimenty.

4.5.8. qRT-PCR

4.5.8.1. Stanovení efektivity primerů

Pro stanovení efektivity primerů a pro kvantitativní stanovení exprese analyzovaných genů ve vybraných tkáních byla provedena qRT-PCR reakce (z angl. **real time polymerase chain reaction**). Jako templáty byly použity všechny vzorky cDNA smíchané ve stejném poměru a byla vytvořena ředící řada pěti různých ředění 1:5, 1:10, 1:25, 1:50 a 1:100. Pro všechny zkoumané geny byly vzorky napipetovány ve třech technických replikátech. Veškeré reakční směsi i vzorky byly napipetovány pomocí robota Bravo (Agilent Technologies). Samotná qRT-PCR byla provedena podle níže uvedeného postupu. Výsledky byly zpracovány pomocí programu ViiA™7 Software v1.2.2 a následně byla vyhodnocena stabilita referenčních genů pomocí tří programů Genorm, NormFinder a BestKeeper.

Tabulka 9: Složení reakční qRT-PCR směsi pro 1 vzorek

Gb SG PCR Master mix	2,50 µl
GreenMaster SYBR Premix with high ROX	0,10 µl
10 mM Fw primer	0,15 µl
10 mM Rv primer	0,15 µl
PCR – grade H ₂ O	0,85 µl
Templátová cDNA	1,25 µl
Celkový objem reakce	5,00 µl

Podmínky qRT-PCR reakce:

- 1) Fáze 1: 50 °C, 2 min
95°C, 2 min
- 2) Fáze 2: 95°C, 0,15 min
60°C, 1 min } 40 x
- 3) Fáze 3: 95°C, 0,15 min
60°C, 1 min

4.5.8.2. qRT-PCR analýza exprese

Byla sledována exprese 5 genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy. Jako templát byly použity veškeré vzorky cDNA, tedy 33, každý ve třech technických replikátech a ředění 1:10. Reakční směs byla připravena podle Tabulky 9 a qRT-PCR proběhla za podmínek uvedených v kapitole 4.5.8.1. Vzorky byly pipetovány za pomoci robota Bravo (Agilent Technologies).

4.5.9. Příprava vzorků na sekvenování

Vzorky z kvantitativní analýzy pomocí qRT-PCR byly pro každý gen smíchány. Následně bylo provedeno čištění těchto vzorků pomocí NucleoSpin Gel and PCR clean-up kitu. K vzorkům bylo přidáno dvojnásobné množství pufru NT1. Tato směs byla promíchána a napipetována do čistících kolonek. Kolonky byly stočeny při 11 000 g po dobu 30 s. Filtrát byl vylit a na kolonky bylo přidáno 700 µl pufru NT3. Opět následovalo stočení při stejných podmínkách. Filtrát byl odstraněn a bylo přidáno 700 µl pufru NT3. Vzorky byly stočeny při 11 000 g po dobu 30 s a následně ještě při 11 000 g po dobu 1 min. Kolonky byly přemístěny do čistých mikrozkuvek. Pro

eluci produktu reakce bylo na kolonky přidáno 25 μ l pufru NE. Jednotlivé kolonky byly inkubovány 1 min při pokojové teplotě a následně stočeny při 11 000 g po dobu 1 min.

U takto přečištěných produktů qRT-PCR byla změřena koncentrace, díky které bylo vypočteno množství potřebné pro přípravu vzorků na sekvenování. Vzorky byly připraveny podle následující tabulky (viz Tabulka 10). Vzorky byly připraveny zvlášť pro forward a reverse primer.

Tabulka 10: Příprava vzorků na sekvenování

Přečištěný PCR produkt	Výsledná koncentrace 50 ng
Forward primer, reverse primer 10 mM	2,5 μ l
Doplnit ddH ₂ O do	10 μ l

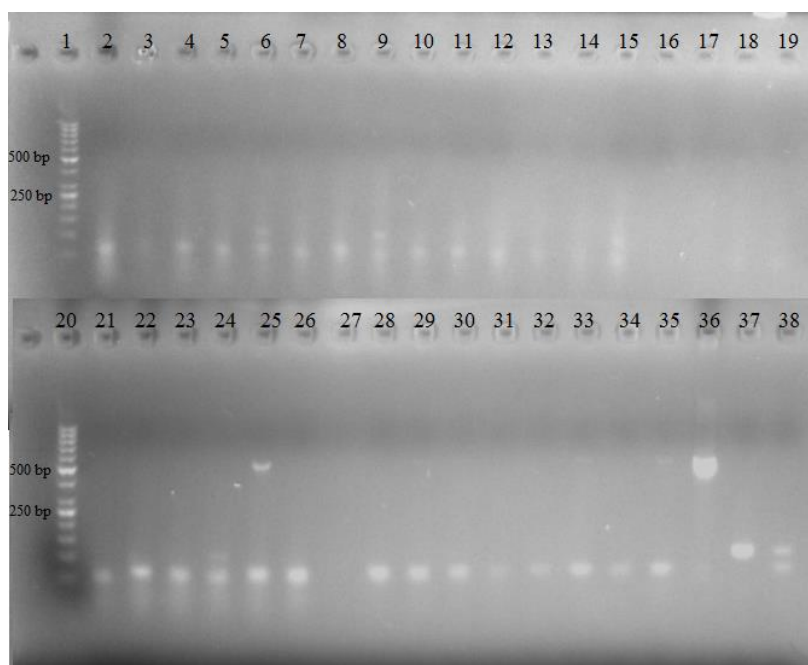
5. VÝSLEDKY

Pro analýzu bylo použito 11 různých biologických tkání ječmene (*Hordeum vulgare*) kultivaru Golden promise, každý ve třech replikátech. Izolace RNA z těchto vzorků byla provedena dvěma odlišnými postupy. RNA z listů, základů stonků, kořenů a zelené nadzemní části byla izolována pomocí kitu ZR Plant RNA MiniPrep zatímco všechna semena a klasy obsahovaly velké množství škrobu, které znemožňovalo izolaci RNA, a proto byla RNA z těchto vzorků izolována pomocí TriReagentu.

Všechny vyizolované vzorky RNA byly ošetřeny DNasou a zbaveny možné kontaminace genomickou DNA.

5.1. Ověření čistoty a stability RNA

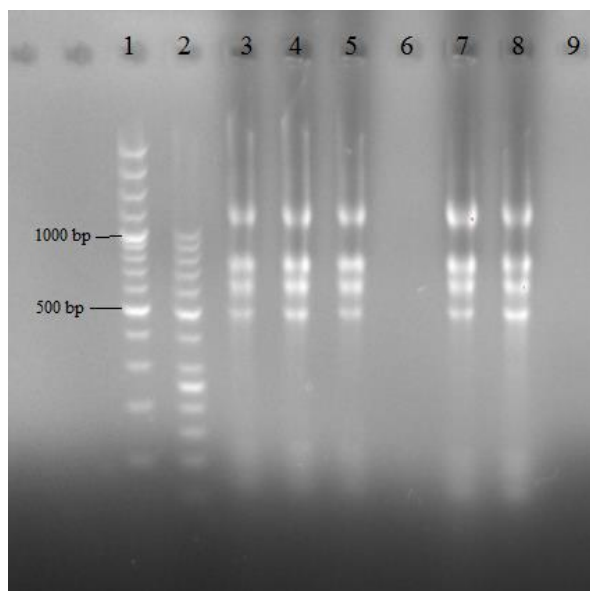
Pro ověření čistoty a stability vyizolované RNA byla provedena PCR reakce a následná separace amplifikovaných vzorků pomocí agarosové elektroforézy. Jako primery byly použity primery pro gen TIP42 z důvodů snadného odlišení amplifikované RNA od genomické DNA. Velikost amplifikovaného produktu z genomické DNA je 568 bp, z cDNA 108 bp a z RNA 55 bp.



Obrázek 11: Ověření čistoty amplifikovaných vzorků RNA. 1: Standart 50bp plus; 2–4: Základ stonku 1, 2, 3; 5–7: Zelená nadzemní část 1, 2, 3; 8–10: Kořeny 1, 2, 3; 11–13: Klas 1A, 2A, 3A; 14–16: Klas 1B, 2B, 3B; 17–19: Klas 1C, 2C, 3C; 20: Standart 50bp plus; 21–23: list 1 1, 2, 3; 24–26: list 2 1, 2, 3; 27–29: semena 0DAG 1, 2, 3; 30–32: semena 1DAG 1, 2, 3; 33–35: semena 2DAG 1, 2, 3; 36: pozitivní kontrola; genomická DNA; 37: cDNA; 38: negativní kontrola.

Jako pozitivní kontrola byla použita genomická DNA získaná z ječmene. Na základě výsledků vizualizovaných na gelech (Obrázek 11) se jako znečištěné jeví vzorky list 2 měsíce 2 (jamka 25), semena 0DAG 3 (jamka 29), semena 1DAG 1 (jamka 30), semena 2DAG 1 (jamka 33) a semena 2DAG 3 (jamka 35). Těchto 5 vybraných vzorků bylo znovu podrobena ošetření DNAsou a byla znovu ověřena jejich čistota. Následně byla s těmito vzorky opět provedena PCR reakce za účelem zjištění čistoty.

Pro kontrolu stability byla provedena další elektroforéza. Do jamek byly pipetovány vzorky RNA smíchané v poměru 1:5 s vzorkovacím pufrům kvůli pozdější vizualizaci. Výsledky pro všechny biologické vzorky byly obdobné, a proto byl vybrán pouze jeden reprezentativní gel znázorňující výsledky ověření stability RNA pro list 1 a 2 (Obrázek 12).

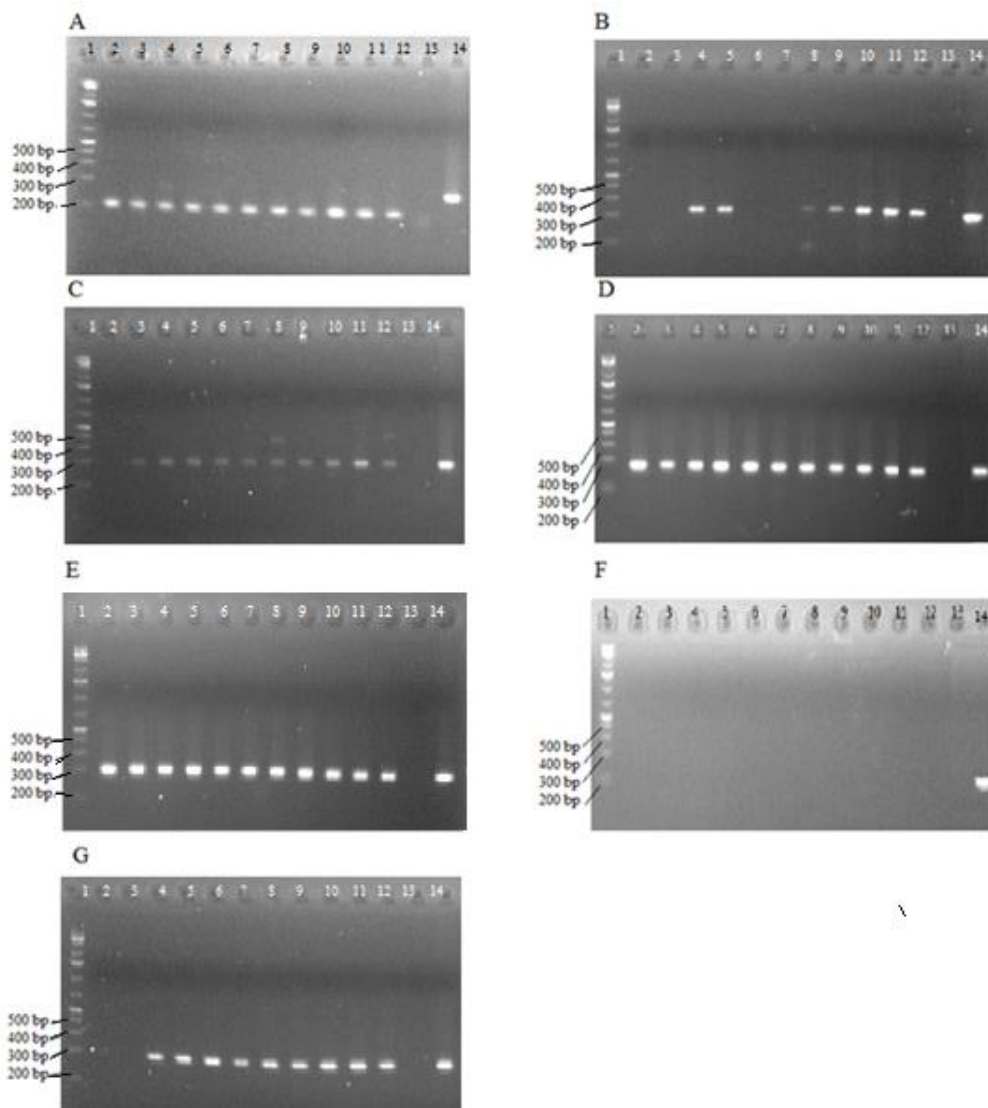


Obrázek 12: Ověření stability vyizolované RNA. 1: Standart 100bp plus, 2: Standart 50 bp, 3-8: Listy 1 a 2, 9: negativní kontrola.

Na gelu nebyl patrný jeden vzorek izolované RNA (jamka 6). Izolace byla z této části tkáně opakována a následně byla opět ověřena její stabilita.

5.2. PCR analýza cDNA v jednotlivých biologických vzorcích

Všechny vzorky RNA byly přepsány do cDNA pomocí RevertAid first strand cDNA synthesis kitu. Pro potřeby tohoto experimentu byly jednotlivé technické replikáty pro jednu biologickou tkáň smíchány a naředěny v poměru 1:5. Po PCR reakci následovala separace PCR produktů pomocí agarosové elektroforézy. Celkem tedy byla sledována amplifikace v 11 biologických vzorcích pro 13 různých genů (7 referenčních genů a 6 genů kódující domnělé IAA amidohydrolasy).



Obrázek 13: Expresse genů v různých biologických vzorcích ječmene. A) Act, B) MLOC_14346, C) MLOC_43138, D) MLOC_51086, E) MLOC_54194, F) MLOC_54858, G) MLOC_70768

1: Standard 1 kb; 2: list 1; 3: list 2; 4: semeno 0DAG; 5: semeno 1DAG; 6: semeno 2DAG; 7: Základ stonku 10DAG; 8: Zelená nadzemní část 10DAG; 9: Kořeny 10DAG; 10: Klas A; 11: Klas B; 12: Klas C; 13: negativní kontrola; 14: pozitivní kontrola gDNA.

U referenčních genů byla exprese pozorována ve všech vzorcích (Obrázek 13 A). Exprese u ostatních genů byla velmi obdobná, proto zde gely s dalšími referenčními geny nejsou zobrazeny.

U genu MLOC_14346 je možné genovou expresi pozorovat ve všech vzorcích, kromě vzorků obou listů (jamka 2 a 3) a semena 2 DAG (jamka 6) a základ stonků (jamka 7). U genu MLOC_43138 je možné genovou expresi pozorovat ve všech vzorcích, kromě vzorku 1 měsíc starého listu (jamka 2). U genu MLOC_51086 je možné genovou expresi pozorovat ve všech vzorcích. U genu MLOC_54194 je možné genovou expresi pozorovat ve všech vzorcích. U genu MLOC_54858 nelze pozorovat genovou expresi v žádném z testovaných vzorků. Tento gen byl proto vyřazen z další experimentů. U genu MLOC_70768 je možné genovou expresi pozorovat ve všech vzorcích kromě vzorků obou listů (jamka 2 a 3) (Obrázek 13). Pro snadnější orientaci jsou výsledky amplifikace produktů z jednotlivých cDNA shrnuty v Tabulce 11.

Tabulka 11: Shrnutí všech získaných výsledků genové exprese v 11 biologických vzorcích ječmene. Legenda: zelené + označuje genovou expresi, oranžové – označuje negativní genovou expresi; 2: list 1; 3: list 2; 4: semeno 0DAG; 5: semeno 1DAG; 6: semeno 2DAG; 7: Základ stonku 10DAG; 8: Zelená nadzemní část 10DAG; 9: Kořeny 10DAG; 10: Klas A; 11: Klas B; 12: Klas C.

		Vzorky										
		2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Geny	EF1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	TUB α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	E2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	PGK	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MDH	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Act	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	EF2 α	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MLOC_14346	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+
	MLOC_43138	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MLOC_54194	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	MLOC_54858	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	MLOC_51086	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MLOC_70768	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	

5.3. Účinnost primerů

Pro správnou kvantifikaci genové exprese je nutné vybrat referenční gen, který vykazuje vysokou stabilitu ve všech použitých tkáních. Stabilita byla posuzována u všech referenčních genů, tedy u 7. Proto byla jako následující provedena qRT-PCR pro zjištění účinnosti primerů pro 12 (7 referenčních a 5 genů pro domnělé auxinaminokyselinové hydrolasy) genů v každém vzorku cDNA. Na základě předcházejících výsledků byl gen MLOC_54858 z další experimentů vyloučen. Všechny vzorky i reakční směsi byly napipetovány pomocí robota Bravo (Agilent technologies) a výsledky byly zpracovány pomocí programu ViiATM7 Software v1.2.2.

Z C_t (z angl. cycle threshold) hodnot, které byly naměřeny pomocí qRT-PCR byla vyhodnocena účinnost primerů pro jednotlivé geny (Tabulka 12) podle vzorce $E=10^{(-1/\text{slope})}$, přičemž její hodnota se pohybuje v rozmezí $> 0,85$ a zároveň $< 1,15$. V tomto rozmezí se nachází primery pro 5 referenčních genů a to E2, EF, TUB, MDH a PGK. Nejlepší účinnost vykazují primery pro gen EF. Z genů pro domnělé auxinaminokyselinové hydrolasy splňuje požadované rozmezí účinnosti pouze gen MLOC_51086, u ostatních dvou testovaných genů byla účinnost nižší.

I přes to, že u genů MLOC_14346 a MLOC_43138 byla v některých vzorcích detekována amplifikace pomocí klasické PCR (krok 5.2; Obrázek 13), qRT-PCR tuto amplifikaci nepotvrdila, proto byly tyto dva geny z další analýzy vyloučeny.

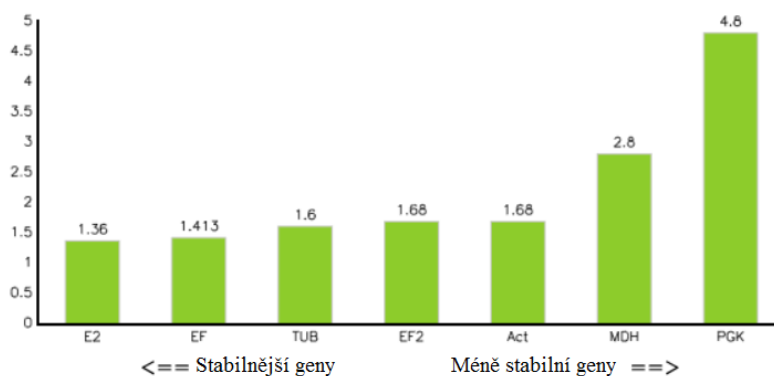
Tabulka 12: Výsledná efektivita primerů analyzovaných genů vypočtena podle vzorce $E=10^{(-1/\text{slope})}$

	slope	Efektivita
Act	-3,81	0,83
EF2 α	-3,78	0,84
E2	-3,45	0,95
EF	-3,49	0,93
TUB	-3,56	0,91
MDH	-3,70	0,86
PGK	-3,70	0,86
MLOC_51086	-3,73	0,85
MLOC_54194	-4,36	0,70
MLOC_70768	-3,85	0,82

5.4. Vyhodnocení stability jednotlivých referenčních genů

Stabilita exprese byla pozorována u 7 vybraných referenčních genů. Pro vlastní experiment bylo nutné vybrat minimálně 3 referenční geny, u kterých byla zjištěna nejlepší účinnost primerů a vysoká stabilita genů. Pro analýzu stability byl použit vyhodnocovací nástroj z webu Cotton Est Database, East Carolina (dostupné z <http://150.216.56.64/referencegene.php>), který automaticky vyhodnotí stabilitu jednotlivých referenčních genů ze vstupních Ct hodnot z qPR-PCR (kapitola 5.3) třemi různými programy a to BestKeeper, NormFinder a geNorm. Jako vzorový je zde uveden graf vyhodnocení stability podle metody BestKeeper (Obrázek 14), pro ostatní metody jsou uvedeny pouze tabulky skrující výsledky stability genů (Tabulka 13, 14).

Program BestKeeper využívá C_t hodnot jednotlivých genů pro výpočet koeficientu variace (CV) a směrodatné odchylky (SD). Jako nejstabilnější je vyhodnocen gen s nejnižšími hodnotami CV a SD. V našem případě byl jako nejstabilnější gen vyhodnocen E2 (Obrázek 14).



Obrázek 14: Stabilita testovaných referenčních genů podle metody BestKeeper (Tichopad et al., 2004).

Metoda NormFinder je založena na zjištění variace exprese genu na základě dat z různých podskupin vzorků v experimentu. Program vyhodnotí variaci exprese v rámci každé podskupiny, a i mezi jednotlivými podskupinami. Čím nižší hodnoty tento program vypočítá, tím vyšší je stabilita genu. Jako nejstabilnější gen podle této metody byl vyhodnocen E2.

Tabulka 13: Vyhodnocení stability podle metody NormFinder (Andersen *et al.*, 2004)

Název genu	Stabilita exprese (M)
E2	1,377
TUB	1,495
Ef2 α	1,523
Act	1,578
EF	1,651
MDH	4,920
PGK	7,162

Další metodou je metoda geNorm, která vypočítává tzv. párové variace mezi každými dvěma referenčními geny. Výsledkem je průměrná stabilita exprese (M). Gen bude stabilnější, čím nižší bude M hodnota. Tato metoda vyhodnotila jako nejstabilnější dva geny, a to TUB a EF2 α .

Tabulka 14: Vyhodnocení stability podle metody geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002)

Název genu	Stabilita exprese (M)
TUB/EF2 α	0,258
Act	0,365
E2	0,427
EF	0,481
MDH	2,303
PGK	3,793

Tabulka 15: Shrnující tabulka všech dostupných metod pro vyhodnocení stability referenčních genů (dostupné z <http://150.216.56.64/referencegene.php>)

Metoda	Pořadí (lepší – dobrý – průměrný)						
	1	2	3	4	5	6	7
Delta CT	EF2 α	TUB	E2	Act	EF	MDH	PGK
BestKeeper	E2	EF	TUB	EF2 α	Act	MDH	PGK
NormFinder	E2	TUB	EF2 α	Act	EF	MDH	PGK
geNorm	TUB/ EF2 α	-	Act	E2	EF	MDH	PGK
Celkové hodnocení	E2	TUB	EF2 α	Act	EF	MDH	PGK
Efektivita	0,95	0,91	0,84	0,83	0,93	0,86	0,86

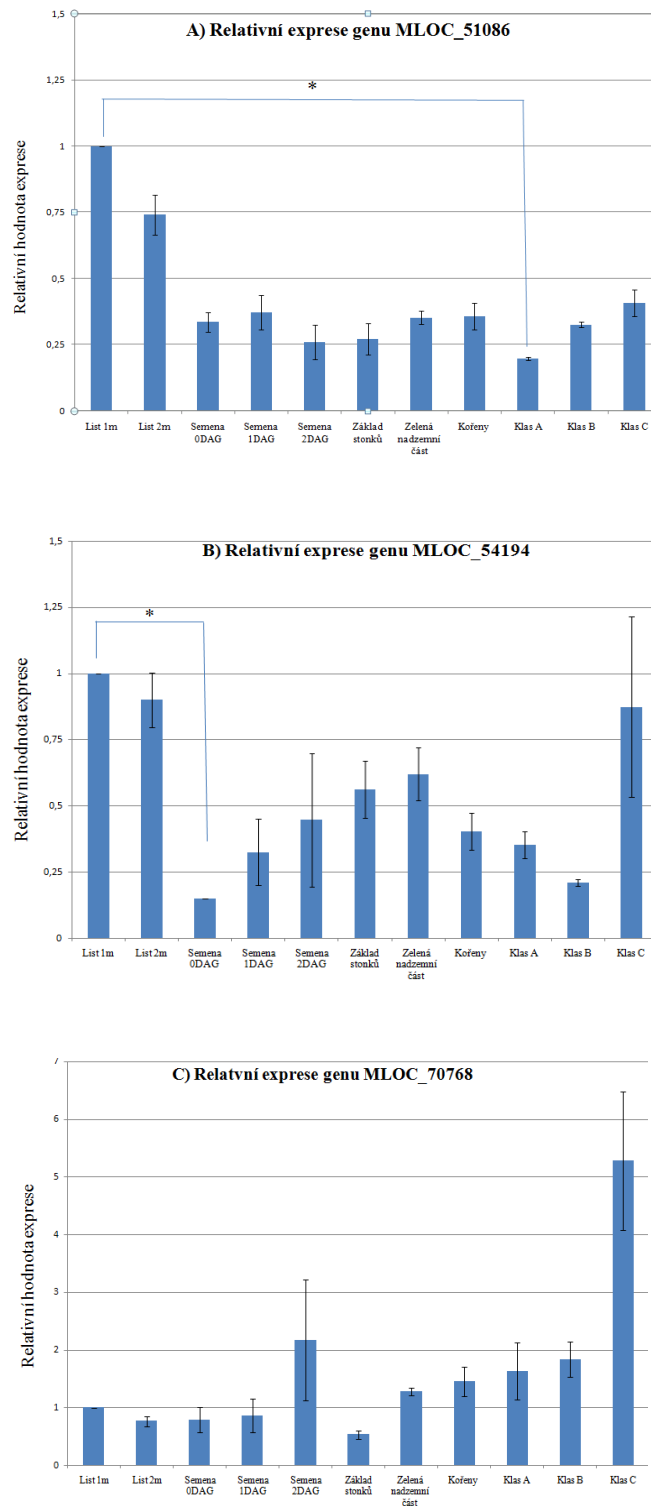
Na základě výsledků těchto různých metod byly pro další experimenty vybrány 4 referenční geny, a to EF1, E2, TUB a EF2 α .

5.5. Relativní exprese genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy

Cílem tohoto experimentu bylo zjistit, jestli se analyzované geny pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy nacházejí v testovaných pletivech. Pomocí metody qRT – PCR byla sledována exprese 3 genů v 11 různých rostlinných tkání ječmene. Data získaná qRT – PCR byla normalizována ke geometrickému průměru tří referenčních genů EF, E2 a TUB. Gen EF2 α , který podle předchozích analýz vykazuje vyšší stabilitu exprese než EF, nebyl vybrán z důvodu nízké účinnosti primerů (Tabulka 12). K vyhodnocení relativní exprese byla použita Pfafflova metoda, která bere do úvahy rozdílnou účinnost primerů (Pfaffl, 2001).

U genu MLOC_51086 byl největší nárůst exprese ve vzorcích obou listů (List 1, 2). Naopak nejnižší nárůst byl u klasu A. U ostatních vzorků se hodnoty relativní exprese pohybovaly v rozmezí 0,25–0,50. Gen MLOC_54194 měl největší nárůst exprese ve vzorcích obou listů (List 1, 2) a klasu C. Nejnižší nárůst byl u semen 0DAG a relativní exprese u dalších vzorků byla v rozmezí 0,15–0,7. Jako poslední byla vyhodnocena exprese u genu MLOC_70768, u kterého byl největší nárůst pozorován u vzorku klasu C a nejnižší u základu stonku, ostatní hodnoty se pohybovaly v rozmezí 0,5–2,5. U toho genu byla relativní exprese ve všech vzorcích o několik desetin vyšší (Obrázek 15).

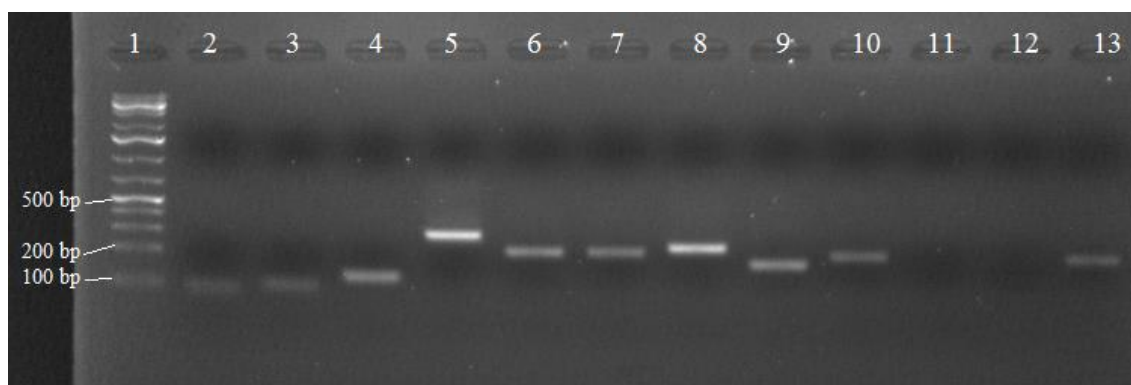
Data z expresních profilů byla statisticky vyhodnocena pomocí programu Statistica 64. Nejprve byla data analyzována neparametrickou analýzou (nonparametric), následně došlo k porovnání více nezávislých vzorků pomocí Kruskal-Wallis ANOVA testu, jehož výsledkem pro gen MLOC_51086 byla rovnice $H(10, N=31) = 20,93358$, $p=0,216$. Na základě mnohočetného vzájemného porovnání p hodnot (multiple comparisons p values) byl nalezen statistický signifikantní rozdíl v expresi u vzorku listu 1 a klasu A (tento rozdíl byl zaznačen do grafů pomocí symbolu *, Obrázek 15). Oba další geny byly podrobeny stejným testům. Pro gen MLOC_54194 byla výsledná rovnice Kruskal-Wallis ANOVA testu $H(10, N=33) = 24,21482$, $p=0,071$ a jako statisticky signifikantní změny v expresi byly vyhodnoceny pro vzorky semen 0DAG a list 1. U genu MLOC_70768 nebyly pozorovány žádné signifikantní změny v expresi.



Obrázek 15: Relativní exprese genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy. A) pro gen MLOC_51086, B) pro gen MLOC_54194, C) pro gen MLOC_70768. Pro vyhodnocení byla použita Pffaflova metoda a jako referenční geny byly použity E2, EF a TUB. * znázorňuje statisticky vyhodnocený signifikantní rozdíl $p < 0,5$.

5.6. Kontrola průběhu qRT-PCR

Pro ověření správnosti amplifikace námi sledovaných genů pomocí qRT-PCR byly všechny vzorky z reakčních směsí pro stanovení účinnosti primerů (různé ředění poměry) pro jeden gen smíchané dohromady a poté byla vzniklá směs přečištěna pomocí NucleoSpin Gel a PCR clean-up kitu. Následně byla část přečištěných vzorků smíchaná v poměru 1:5 se vzorkovací mpuřem a nanášena na 2% agarosový gel. Na gelu bylo možné pozorovat jeden pás pro každý vzorek, který přibližně odpovídá velikosti amplikonu (Tabulka 3). Amplifikace se potvrdila u všech genů, kromě MLOC_14346 a MLOC_43138, které byly z dalších experimentů vyloučeny, tento gel sloužil jako kontrola správnosti tohoto kroku (Obrázek 16).



Obrázek 16: Přečištěné vzorky z qPCR pro jednotlivé geny, 1: Standart 1kp plus; 2: Act; 3: EF2 α ; 4: E2; 5: EF1; 6: PGK; 7: MGH; 8: TUB; 9: MLOC_51086; 10: MLOC_54194; 11: MLOC_14346; 12: MLOC_43138; 13: 70768.

5.7. Sekvenování

Vzorky byly připraveny podle postupu uvedeného v kapitole 4.5.10). Sekvence sloužila k potvrzení správnosti amplifikace u jednotlivých genů. Celkem bylo analyzováno 12 genu (Obrázek 16). Správná amplifikace byla potvrzena u všech testovaných genů, i u genu MLOC_14346 a MLOC_43138, u kterých sice byla detekována amplifikace v určitých tkáních klasické PCR (Obrázek 13), nicméně qRT-PCR tuto amplifikaci nepotvrdila.

6. DISKUZE

Auxiny jsou pro rostliny životně důležité hormony, které regulují velké množství jejich procesů, Proto je nevyhnutelné, aby byly rostliny schopny si hladiny těchto hormonů samy regulovat. Regulace probíhá pomocí vzniku/zániku konjugátů nejčastějšího auxinu kyseliny indoyl-3-octové s různými typy látek. Štěpení konjugátů je zprostředkováno enzymy zvané hydrolasy. Jako první hydrolasy byly identifikovány IAA-aminokyselinové hydrolasy u *Arabidopsis*. Celkem zde bylo identifikováno 7 genů pro tyto enzymy. U ječmene žádné z hydrolas zatím prokázány nebyly.

Analýzou transkriptomických dat ze základů stonků u 1DAG semenáčků ječmene a porovnáním namapovaných sekvencí se sekvencemi genů uvedených v databázi Ensembl Plants se známými funkcemi bylo možné identifikovat a zároveň predikovat funkci 6 genů, které by mohly kódovat auxin-aminokyselinové hydrolasy. Produkty těchto genů byly zařazeny do rodiny peptidas M20 (metalopeptidasy a amidohydrolasy mající v aktivním místě 2 zinkové iony a uvolňují aminokyselinu z N-konce peptidového řetězce), která sestává ze 4 podrodin, mezi nimiž jsou také amidohydrolasy. Amidohydrolasy schopné štěpit auxin-aminokyselinové konjugáty. Tyto skutečnosti podporují naši domněnku, že by tyto geny mohly kódovat auxin-aminokyselinové hydrolasy.

Pro identifikaci přítomnosti těchto genů v ječmeni byly odebrány vzorky různých rostlinných pletiv (listy, zelené nadzemní části, základy stonků, kořeny, semna a klasy) různě starých rostlin, ze kterých byla následně izolovaná RNA. Při samotné izolaci RNA ze semen a klasů došlo ke komplikacím z důvodu velkého množství škrobu v těchto částech, které znemožnilo izolaci pomocí kitu. Proto byla použita jiná metoda izolace využívající TriReagentu. Pomocí které byla RNA ze semen a klasů úspěšně vyizolována. Izolace byla provedena několikrát, jelikož jednou izolací bylo získané jen velmi malé množství RNA, které nebylo dostačující pro následnou reverzní transkripci. Problém nastal i u ošetřování vzorků DNasou. RNA se jevila stále jako znečištěná, kvůli nerozpuštěnému peletu (proteiny, zbytky tkaniv, genomická DNA apod.), který se objevoval pouze u semen a klasů. Proto bylo nutné tuto RNA několikrát přečišťovat, dokud nebyla pomocí PCR reakce potvrzena její čistota. Při analýze čistoty byly nejdříve používány primery pro EF2 α , nicméně jednotlivé amplifikované produkty nebyly dobře rozlišitelné, tudíž nešlo s jistotou určit, zda jsou vzorky znečištěné

genomickou DNA nebo ne. Proto byly použity primery pro Act a TIP41, díky kterým jsme mohli amplifikované vzorky lépe analyzovat.

PCR analýza cDNA v jednotlivých vzorcích byla provedena pro 13 testovaných genů. Amplifikace pro referenční geny byla pozorována ve všech vzorcích. Na gelech byla patrná vyšší amplifikace u některých vzorků cDNA, což se jevílo silnějšími pásy. U analyzovaných genů nebyla amplifikace pozorována u genu MLOC_54858 a u některých vzorků dalších genů. Nepřítomnost amplifikace v některých vzorcích může být způsobena tím, že gen v určité tkáni není exprimován. Pro úplné potvrzení této domněnky by bylo vhodné zopakovat tuto analýzu s více různými tkáněmi.

Pro analýzu expresního profilu vybraných genů je nutné mít vhodné referenční geny vykazující vysokou účinnost a stabilitu, která byla stanovena metodou qRT-PCR. Z C_t hodnot, které byly naměřeny pomocí qRT-PCR byla vyhodnocena účinnost primerů pro jednotlivé geny (Tabulka 12) podle vzorce $E=10^{(-1/\text{slope})}$. Účinnost primerů by se měla pohybovat v rozmezí $> 0,85$ a zároveň $< 1,15$. Tuto podmínku splnilo 5 referenčních genů a to E2, EF, TUB, MDH a PGK. Nejlepší účinnost vykazují primery pro EF. Z genů pro domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy splňuje požadované rozmezí účinnosti pouze gen MLOC_51086, u ostatních dvou testovaných genů byla účinnost nižší. Při této analýze nebylo možné detekovat amplifikaci u genů MLOC_14346 a MLOC_43138, což mohlo být způsobeno použitím příliš velkého zředění cDNA sestávajícího z cDNA ze všech 33 biologických vzorků nebo vysokým naředěním vzorků cDNA v důsledku přítomnosti vzorků, u kterých nebyla detekována amplifikace klasickou PCR. Následně byla ze získaných C_t hodnot a účinnosti primerů vyhodnocena stabilita jednotlivých referenčních genů pomocí tří metod. Jako nejstabilnější geny byly vyhodnoceny E2, TUB, EF2 α a Act. Jako nejméně stabilní byly vyhodnoceny geny MDH a PGK. Ve vědeckém článku Gines *et al.*, 2018 byly jako nejstabilnější geny pro kultivar Golden promise vyhodnoceny geny MDH, EF2 α a Act. V této studii byly použity jiné rostlinné tkáně a nedošlo k míchání zelených částí se semeny či klasy. Proto by bylo vhodné u této analýzy rozdělit vzorky na dvě skupiny, a to na skupinu tvořenou listy, základem stonků, zelenou nadzemní částí a kořeny a druhou skupinu tvořenou semeny a klasy. Což kvůli časovému harmonogramu nebylo možné provést.

Metoda qRT-PCR byla využita i pro analýzu relativní exprese tří genů MLOC_51086, MLOC_54194 a MLOC_70768. Nejvyšší hodnoty relativní exprese byly pozorovány u listu 1 a 2. U genu MLOC_70768 byly zaznamenány o několik

desetin vyšší hodnoty relativní exprese než u ostatních dvou genů, což bylo způsobeno větší expresí genu v jednotlivých tkáních. Odchytky v datech mohou být způsobeny různorodostí analyzovaných tkání neboli rozdílnou expresí sledovaných genů v různých tkáních a z různě starých rostlin. Chybovost mohla být také způsobena špatným pipetováním nebo nepřesností koncentrace použité templátové cDNA. Data z expresních profilů byla statisticky vyhodnocena pomocí Kruskal-Wallis ANOVA testu a následného mnohočetného vzájemného porovnání p hodnot, jako statisticky signifikantní byly vyhodnoceny vzorky list 1 a klas A pro gen MLOC_51086 a pro gen MLOC_54194 vzorky semen 0DAG a listu 1. Pro statistiku i pro lepší expresní profily by bylo dále vhodné analyzovat více biologických a technických replikátů.

Na základě sekvenování byla potvrzena správná amplifikace u všech testovaných genů, i u genu MLOC_14346 a MLOC_43138, u kterých sice byla detekována amplifikace v určitých tkáních při klasické PCR, ale tato amplifikace nebyla potvrzena qRT-PCR. Důvodem mohla být špatně zvolená koncentrace pro ředění cDNA, proto by bylo vhodné zopakovat tento experiment s vhodnějšími koncentracemi.

7. ZÁVĚR

V teoretické části bakalářské práce byl vypracován literární přehled o studované problematice, který byl zaměřen na auxiny a IAA-aminokyselinové hydrolasy.

V experimentální části bylo celkem analyzováno 7 referenčních genů a 6 genů kódujících domnělé auxin-aminokyselinové hydrolasy. Analýza byla provedena v 11 různých tkání ječmene (*Hordeum vulgare*) kultivaru Golden promise, a to z důvodu možnosti rozdílné exprese genů napříč jednotlivými pletivy. Na základě qRT-PCR byly vybrány referenční geny s vysokou stabilitou a efektivitou (E2, EF a TUB). Díky, nimž bylo možné navrhnout expresní profil pro 3 zkoumané geny MLOC_51086, MLOC_54194 a MLOC_70768. U genů MLOC_54858, MLOC_14346 a MLOC_43138 nebyl expresní profil vytvořen, jelikož se u nich nepotvrdila amplifikace v testovaných tkáních, což mohlo být způsobeno nepřítomností exprese genu v určitém pletivu nebo nevhodně zvolenou koncentrací cDNA.

Rešením by mohlo být rozdělení jednotlivých biologických vzorků do dvou skupin (zelené části a semena) a opětovné provedení analýzy a stanovení expresního profilu pro všechny zkoumané geny. Dále by bylo vhodné zařadit více biologických vzorků ve více technických replikátech a zvážit návrh nových primerů.

8. LITERATURA

- Badr A., Sch R., Rabey H. E., Effgen S., Ibrahim H. H., Pozzi C., Rohde W., Salamini F. (2000); On the Origin and Domestication History of Barley (*Hordeum vulgare*), *Molecular Biology and Evolution*, Volume 17, Issue 4, Pages 499–510,
- Balounová M., Vaculová K., Ehrenbergerová J., Smutná P. (2010): Metodika křížení ječmen, pšenice: certifikovaná metodika. Kroměříž: Agrotest fyto, 26 s. ISBN 978-80-904594-4-1.
- Bandurski R. S., Schulze A. (1977): Concentration of Indole-3-acetic Acid and Its Derivatives in Plants, *Plant Physiology*, 60 (2) 211–213; DOI: 10.1104/pp.60.2.211
- Bartel B., Fink G. R. (1995): ILR1, an amidohydrolase that releases active indole-3-acetic acid from conjugates. *Science*, 268.5218: 1745-1748.
- Bartel B., LeClere S., Magidin M., Zolman B. K. (2001): Inputs to the active indole-3-acetic acid pool: de novo synthesis, conjugate hydrolysis, and indole-3-butyric acid β -oxidation. *J Plant Growth Regul* 20: 198–216
- Benada J., Flašarová M., Hubík K., et al. (2001): Metodika pěstování jarních obilnin. Kroměříž: Zemědělský výzkumný ústav, 143 s. ISBN 80-902545-4-3.
- BestKeeper: Pfaffl MW, Tichopad A., Prgomet C., Neuvians T. P. (2004): Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters* 26:509-515.
- Bialek K., Cohen J. D. (1986): Isolation and Partial Characterization of the Major Amide-Linked Conjugate of Indole-3-Acetic Acid from *Phaseolus vulgaris* L. *Plant Physiology*, 80 (1) 99-104; DOI: 10.1104/pp.80.1.99
- Bialek K., Cohen J. D. (1989): Quantitation of indoleacetic-acid conjugates in bean seeds by direct tissue hydrolysis. *Plant Physiol* 90:398–400.
- Cai J., Li P., Luo X., Chang T., Li J., Zhao Y., Xu, Y. (2018): Selection of appropriate reference genes for the detection of rhythmic gene expression via quantitative real-time PCR in Tibetan hullless barley. *PloS one*, 13(1), e0190559.
- Campanella J. J., Larko D., Smalley J. (2003): A Molecular Phylogenomic Analysis of the ILR1-Like Family of IAA Amidohydrolase Genes. *Comparative and Functional Genomics*. 4(6):584-600. doi:10.1002/cfg.340.

- Campanella J. J., Olajide A. F., Magnus V., Ludwig-Müller J. (2004): A Novel Auxin Conjugate Hydrolase from Wheat with Substrate Specificity for Longer Side-Chain Auxin Amide Conjugates. *Plant Physiology* Aug, 135 (4) 2230-2240; DOI: 10.1104/pp.104.043398
- Campanoni P., Nick P. (2005): Auxin-dependent cell division and cell elongation. 1-Naphthaleneacetic acid and 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid activate different pathways. *Plant Physiology*, 137(3), 939-948.
- Coenen C., Lomax T. L. (1997): Auxin—cytokinin interactions in higher plants: old problems and new tools. *Trends in plant science*, 2(9), 351-356.
- Collins H. M., Burton R. A., Topping D. L., Liao M. L., Bacic A., Fincher G. B. (2010): Variability in fine structures of noncellulosic cell wall polysaccharides from cereal grains: potential importance in human health and nutrition. *Cereal Chemistry*, 87(4), 272-282.
- Černý L. (2007): Jarní sladovnický ječmen: pěstitelský rádce. Praha: Pro katedru rostlinné výroby, FAPPZ, ČZU v Praze vydalo vydavatelství Kurent. ISBN 978-80-87111-04-8.
- Davies R. T., Goetz D. H., Lasswell J., Anderson M. N., Bartel B. (1999): IAR3 encodes an auxin conjugate hydrolase from Arabidopsis. *The Plant Cell*;11(3):365-376.
- Edwards J. (2010): Barley growth and development. *Barley growth and development*.
- Eklöf S., Åstot C., Sitbon F., Moritz T., Olsson, O., Sandberg, G. (2000): Transgenic tobacco plants co-expressing *Agrobacterium* *iaa* and *ipt* genes have wild-type hormone levels but display both auxin- and cytokinin-overproducing phenotypes. *The Plant Journal*, 23(2), 279-284.
- Epstein E., Cohem J. D., Bandurski R. S. (1980): Concentration and Metabolic Turnover of Indoles in Germinating Kernels of *Zea mays* L. *Plant Physiol* 65: 415–421
- Forster B. P. (2001): Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. *Euphytica*; 120:317-328
- Genorm: Vandesompele J., De Preter K., Pattyn F., Poppe B., Van Roy N., De Paepe A., Speleman F. (2002): Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome biology* 3: RESEARCH0034.
- Gines M., Baldwin T., Rashid A., Bregitzer P., Maughan P. J., Jellen E. N., Klos, K. E. (2018): Selection of Expression Reference Genes with Demonstrated Stability in

- Barley among a Diverse Set of Tissues and Cultivars. *Crop Science*, 58(1), 332-341.
- Gordon C., Hillman M., Davies S. (1990): Domestication rates in wild-type wheats and barley under primitive cultivation, *Biological Journal of the Linnean Society*, Volume 39, Issue 1, Pages 39–78, <https://doi.org/10.1111/j.1095-8312.1990.tb01611.x>
- Grando S., Gómez Macpherson H. (2005): Food barley: importance, uses and local knowledge. Aleppo: ICARDA, 2005, x, 156. ISBN 92-9127-173-0.
- Hraška Š. (1989): Špeciálna genetika poľnohospodárskych rastlín. Bratislava: Príroda, 1989, 211 s. ISBN 8007000224.
- Hyams E. (1976): Rostliny ve službách člověka. *Orbis*, 154 s. ISBN: 11-118-76
- Katayama M., Thiruvikraman S.V., Marumo S. (1988); Localization of 4-Chloroindole-3-acetic Acid in Seeds of *Pisum sativum* and Its Absence from All Other Organs, *Plant and Cell Physiology*, Volume 29, Issue 5, Pages 889–891,
- Kleinhofs A., Graner A. (2001): An integrated map of the barley genome. In: Phillips R.L., Vasil I.K. (eds) *DNA-Based Markers in Plants. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, vol 6. Springer, Dordrecht
- Korasick D. A., Enders T. A., Strader L. C. (2013): Auxin biosynthesis and storage forms. *Journal of Experimental Botany*, 64(9), 2541–2555.
<http://doi.org/10.1093/jxb/ert080>
- Kowalczyk M., Sandberg G. (2001): Quantitative analysis of indole-3- acetic acid metabolites in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol* 127: 1845–1853
- LeClere S., Tellez R., Rampey E. A., Matsuda S. P., Bartel B. (2002): Characterization of a family of IAA-amino acid conjugate hydrolases from *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(23), 20446-20452.
- Ledvina M., Stoklasová A., Cerman J. (2009): *Biochemie pro studující medicíny*. Vyd. 2. V Praze: Karolinum. ISBN 9788024614144.
- Lekeš J. (1997): Šlechtění obilovin na území Československa: dosažené výsledky a další vývoj ve šlechtění, semenářství a odrůdovém zkušebnictví. Praha: Brázda, 279 s. ISBN 80-209-0271-6.
- Leuba V., LeTourneau D., Oliver D. (1989): *J Plant Growth Regul*, 8: 163.
<https://doi.org/10.1007/BF02025283>

- Mano Y., Nemoto K. (2012): The pathway of auxin biosynthesis in plants, *Journal of Experimental Botany*, Volume 63, Issue 8, Pages 2853–2872, <https://doi.org/10.1093/jxb/ers091>
- Mendel R. R. (2007): Biology of the molybdenum cofactor. *Journal of experimental botany*, 58(9), 2289-2296.
- Mok M. C. (1994): Cytokinins and plant development – an overview. In *Cytokinins: Chemistry, Activity and Function*, 155-166. Boca Raton, London, Tokyo
- Nordström A., Tarkowski P., Tarkowska D., Norbaek R., Åstot C., Dolezal K., Sandberg, G. (2004): Auxin regulation of cytokinin biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*: a factor of potential importance for auxin–cytokinin-regulated development. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(21), 8039-8044.
- NormFinder: Andersen C. L., Jensen J. L., Orntoft T. F. (2004): Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer research* 64:5245-5250.
- Östin, A., Kowalyczk M., Bhalerao R. P., Sandberg G. (1998): Metabolism of Indole-3-Acetic Acid in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 118, 285–296.
- Ouyang J., Shao X., Li J. (2000): Indole-3-glycerol phosphate, a branchpoint of indole-3-acetic acid biosynthesis from the tryptophan biosynthetic pathway in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 24(3), 327-334.
- Pavlová L., Fisher L. (2011): *Růst a vývoj rostlin. Ilustrovala Magda ANDRESOVÁ.* Praha: Karolinum, 325 s. ISBN 978-80-246-1913-2.
- Percival F. W., Bandurski R. S. (1976): Esters of indole-3-acetic acid from *Avena* seeds. *Plant physiology*, 58.1: 60-67.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT–PCR. *Nucleic Acids Research*, 29(9), e45.
- Piskornik Z., Bandurski R. S. (1972): Purification and Partial Characterization of a Glucan Containing Indole-3-acetic Acid. *Plant Physiology*, 50(1), 176–182.
- Procházka S., *et al.* (1998): *Fyziologie rostlin. Vyd. 1.* Praha: Academia, ISBN 80-200-0586-2.
- Rampey R. A., LeClere S., Kowalczyk M., Ljung K., Sandberg G., Bartel B. (2004): A Family of Auxin-Conjugate Hydrolases That Contributes to Free Indole-3-Acetic

- Acid Levels during Arabidopsis Germination. *Plant Physiology*, 135 (2) 978-988; DOI: 10.1104/pp.104.039677
- Reinecke D. M. (1999): *Plant Growth Regulation*, 27: 3.
<https://doi.org/10.1023/A:1006191917753>
- Sanchez A. P., *et al.* (2016): Hydrolases of the ILR1-like family of *Arabidopsis thaliana* modulate auxin response by regulating auxin homeostasis in the endoplasmic reticulum. *Sci. Rep.* 6, 24212; doi: 10.1038/srep24212.
- Skoog F., Miller C. O. (1965): Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In *Molecular and Cellular Aspects of Development*, E. Bell, ed., Harper and Row, New York, p.481-494.
- Taiz L., Zeiger E. (2002): *Plant physiology*. 3rd ed. Sunderland, Sinauer Associates, xxvi, 690 s. ISBN 0878938230.
- Tam Y. Y., Epstein E., Normanly J. (2000): Characterization of auxin conjugates in *Arabidopsis*. Low steady-state levels of indole-3-acetyl-aspartate, indole-3-acetyl-glutamate, and indole-3-acetyl-glucose. *Plant Physiol* 123: 589–595
- The comparative delta-Ct method: Silver N., Best S., Jiang J., Thein S. L. (2006): Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology* 7:33.
- Thomas W. T. B., Powell W., Wood W. (1984): The chromosomal location of the dwarfing gene present in the spring barley variety Golden Promise. *Heredity*, 53(1), 177.
- TIBCO Software Inc. (2017): *Statistica* (data analysis software system), version 13. <http://statistica.io>.
- Walia H., Wilson C., Condamine P., Ismail A. M., Xu J., Cui X., Close T. J. (2007): Array-based genotyping and expression analysis of barley cv. Maythorpe and Golden Promise. *BMC genomics*, 8(1), 87.
- Walz A., Park S., Slovin J. P., Ludwig-Müller J., Momonoki Y. S., Cohem J. D. (2002): A gene encoding a protein modified by the phytohormone indoleacetic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.*; 99(3): 1718-1723. doi: 10.1073/pnas.032450399.
- Wareing P. F., Phillips I. D. J. (1970): *The control of growth and differentiation in plants*. Oxford: Pergamon, 303 s. Commonwealth and international library. Botany division. ISBN 0-08-015500-6.

- Wei W., Bilsborrow P. E., Hooley P., Fincham D. A., Lombi E., Forster B. P. (2003): Salinity induced differences in growth, ion distribution and partitioning in barley between the cultivar Maythorpe and its derived mutant Golden Promise. *Plant and Soil*, 250(2), 183-191.
- Wendt T., Holme I., Dockter C., Preuß A., Thomas W., Druka A., ... Braumann, I. (2016): HvDep1 is a positive regulator of culm elongation and grain size in barley and impacts yield in an environment-dependent manner. *PloS one*, 11(12), e0168924.
- Woodward A. W., Bartel B. (2005): Auxin: regulation, action and interaction. *Annals of Botany* 95:707-735
- Fallon M. D., Keller A. H. (2012): Auxins: Structure, Biosynthesis and Functions. Nova Science Publishers, Inc, Botanical Research and Practices.
- Woodward A. W., Bartel B. (2005): Auxin: Regulation, Action, and Interaction, *Annals of Botany*, Volume 95, Issue 5, Pages 707–735
- Yamada T., Palm C. J., Brooks B., Kosuge T. (1985): Nucleotide sequences of the *Pseudomonas savastanoi* indoleacetic acid genes show homology with *Agrobacterium tumefaciens* T-DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 82, 6522–6526.
- Zhang R., Wang B., Ouvang J., Li J., Wang Y. (2008): Arabidopsis indole synthase, a homolog of tryptophan synthase alpha, is an enzyme involved in the Trp-independent indole-containing metabolite biosynthesis. *Journal of integrative plant biology* 50, 1070-1077.

Internetové zdroje:

- Agrární poradensko-informativní centrum agrární komory České republiky. [online] [navštíveno 5.2.2018] Dostupné z <http://www.apic-ak.cz>
- Cit Vfu. [online] [navštíveno 18.2.2018] Dostupné z <https://cit.vfu.cz>
- CoBo social. [online] [navštíveno 14.3.2018] Dostupné z <https://www.cobosocial.com>
- Cotton est database. [online] [navštíveno 21.4.2018] Dostupné z <http://150.216.56.64/referencegene.php?type=reference>
- Ensembl plants. [online] [navštíveno 21.2.2018] Dostupné z <https://plants.ensembl.org/index.html>
- Greene Jim. Barley. Salem Press Encyclopedia [online]. 2017 [navštíveno 3.1.2018].

Kodíček M. Hydrolasy. From Biochemické pojmy : výkladový slovník [online]. Praha: VŠCHT Praha, 2007 [navštíveno 5.4.2018]. Dostupné z [www: <http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=hydrolasy>](http://vydavatelstvi.vscht.cz/knihy/uid_es-002/ebook.html?p=hydrolasy)

Leporelo info. [online] [navštíveno 21.3.2018] Dostupné z <https://leporelo.info/jecmen>

ResearchGate. [online] [navštíveno 21.3.2018] Dostupné z <https://www.researchgate.net>

Statista, The Statistics Portal. [online] [navštíveno 4.1.2018] Dostupné z <https://www.statista.com/>