

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**TESTOVÁNÍ NOVÝCH PROMOTORŮ V RAJČETI
A JEČMENI POMOCÍ LOKALIZACE GFP**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Tereza Slaninová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Katarína Mrízová
Konzultant:	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok:	2014

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním diplomové 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

Děkuji své vedoucí práce Mgr. Kataríně Mrízové za její čas, odborné vedení, cenné rady a připomínky při zpracování této práce. Poděkování také patří RNDr. Ondřejovi Plíhalovi, Ph.D. za odborné rady, konzultace a pomoc při práci na konfokálním mikroskopu, Veronique Bergounoux, Ph.D. za vyselektování kořenově-specifického promotoru z ječmene, který byl předmětem mého testování, Mgr. Márii Šmehilové, Ph.D. za poskytnutí plasmidu AKK 1472B-SU::*GFP*. Chtěla bych poděkovat Mgr. Editě Holáskové a Mehmet Tufanovi Öz, Ph.D. za přípravu konstruktů pBract209-*RSP::HvCKX3-GFP*, pBract209-*pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* a za transformaci ječmene. Dále bych chtěla poděkovat všem členům skupiny prof. RNDr. Šamaje, DrSc. za umožnění přístupu a práce na konfokálním mikroskopu. V neposlední řadě bych chtěla poděkovat všem členům Katedry biochemie, Oddělení molekulární biologie, za ochotu a příjemné pracovní prostředí.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Tereza Slaninová
Název práce	Testování nových promotorů v rajčeti a ječmeni pomocí lokalizace GFP
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Katarína Mrízová
Konzultant	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2014

Abstrakt

Cytokininy jsou rostlinné hormony, které regulují množství fyziologických procesů, jako tolerance k stresu, vývoj prýtu a kořenů, či produkce květu a semen. Cytokindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je enzym, který katalyzuje ireverzibilní degradaci cytokininů (CK) v rostlinách. Snížení hladiny CK v transgenních rostlinách, které nadprodukuje CKX vede k produkci mohutného kořenového systému, avšak negativně ovlivňuje vývoj nadzemní části rostlin. Použitím kořenově specifických promotorů pro řízení exprese *CKX* genů by bylo možné získat transgenní rostliny se zvětšeným kořenovým systémem, jejichž nadzemní část by zůstala nezměněná.

Byl vyselektován nový potencionální kořenově specifický promotor (RSP), který byl použit pro řízení exprese *HvCKX3-GFP* fúzního genu v transgenních rostlinách. *HvCKX3* gen má mutaci v doménové sekvenci, ve které je prolin zaměněn za histidin. Cílem této práce bylo zjistit, či tato mutace u *HvCKX3* genu vede k tvorbě funkčního proteinu. Zároveň byl připraven druhý konstrukt *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*, ve kterém byla exprese *HvCKX2.2* genu řízena *pHvCKX3* promotorem, který řídí nativní expresi *HvCKX3* genu. Cílem bylo otestovat, zda exprese *HvCKX2.2* genu vede také k tvorbě aktivního proteinu. Oba konstrukty, spolu s kontrolním konstruktem *SU::GFP*, byly nejprve testovány v rajčeti, kde byly transformovány pomocí *A.rhizogenes*. U *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenů rajčete byla pomocí PCR reakce na templát z genomové DNA potvrzena přítomnost transgenu. Exprese *HvCKX3-GFP* a transgenu byla potvrzená pomocí kvantitativní PCR a exprese GFP fúzního proteinu pomocí konfokální mikroskopie. Tímto konstruktem v *A.rhizogenes* byly dále transformovány kalusy ječmene, u kterého byly optimalizovány podmínky

pro indukci tvorby „hairy roots“. *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní kalusy produkovaly kořeny, kde byla přítomnost transgenu potvrzena PCR z genomové DNA, exprese GFP fúzního proteinu byla potvrzena konfokální mikroskopií, avšak tyto kořeny nebyly schopné samostatného růstu. Dále byly konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP* v *A.tumefaciens* natransformovány nezralé embrya ječmene a následně bylo získáno 9 nezávislých transgenních linií ječmene. Ve všech transgenních liniích byla potvrzena přítomnost transgenu pomocí kontrolní PCR. Exprese *GFP* genu byla naměřena v různých vývojových stádiích kořenu a listu, co naznačuje, že promotor neřídí expresi specificky v kořenech. Transgenní rostliny ječmene vytvářely mohutný kořenový systém v prvních týdnech vývoje, kde nadzemní část těchto rostlin zůstala bez větších změn ve srovnání s rostlinami divokého typu.

Klíčová slova	Cytokininy, cytokinindehydrogenasa, <i>Arabidopsis thaliana</i> , kořenové vlásky
Počet stran	79
Počet příloh	
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Tereza Slaninová
Title	Testing of new promoters in tomato and barley using GFP localization
Type of thesis	Diploma
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Katarína Mrízová
Consultant	RNDr. Ondřej Plíhal, Ph.D
The year of presentation	2014

Abstract

Cytokinins are plant hormones which regulate many physiological processes – stress tolerance, shoot and root development, flowering and seed production. Cytokinin dehydrogenase (CKX; EC 1.5.99.12) is an enzyme that catalyses irreversible cytokinin (CK) degradation in the plants. Overexpression of *CKX* genes under the control of constitutive promoters in transgenic plants has positive effect on root production but negative effect on shoot development. When root-specific promoters for driving the expression of *CKX* genes are used, transgenic plants produced increased root system with unchanged shoot growth.

We have selected a new potential root-specific promoter (RSP) to drive the expression of *HvCKX3-GFP* fused gene within transgenic plants. *HvCKX3* gene has a mutation in a domain sequence, in which proline was changed for histidine. The goal of our work was to know if the mutation in *HvCKX3* gene leads to a production of a functional protein. We prepared another construct *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* in which the expression of *HvCKX2.2* gene was controlled by promoter *pHvCKX3* (it naturally controls the expression of *HvCKX3* gene). We wanted to test if the expression of *HvCKX2.2* gene leads to a production of a functional protein. Furthermore, we have prepared also another construct *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*, where the *HvCKX3* genes promoter was used for driving the expression of *HvCKX2.2* gene. Both constructs in vector *pGWB1* together with control construct *SU::GFP* were first transformed into tomato by *A. rhizogenes*, which induced production of

tomatoes hairy roots. The presence of the transgene in tomatoes hairy roots was confirmed by PCR from genomic DNA and the expression of transgene was confirmed by qPCR and confocal microscopy. The same constructs in *A. rhizogenes* were used for transformation of barley calluses. We optimized conditions for induction of root growth from calli transformed with *A. rhizogenes*. The presence of the *RSP::HvCKX3-GFP* in transgenic barley roots and calli was confirmed by PCR and the expression of *HvCKX3-GFP* gene was confirmed by confocal microscopy. These transgenic barley roots were not able to grow independently and died together with transgenic calli few weeks after transfer on the selection medium. In addition *RSP::HvCKX3-GFP* construct in pBract209 was transformed into barley immature embryos using *A. tumefaciens*. Together 9 independent transgenic barley lines were prepared which contained target construct. The expression of *GFP* gene was detected in both roots and leaves of transgenic plants, which suggests the leakage unspecificity of the promoter activity. Transgenic barley plants produced bigger roots within first weeks after transfer to the soil, but the shoot development was not significantly changed, in comparison with WT plants.

Keywords	Cytokinins, cytokinin dehydrogenase, <i>Arabidopsis thaliana</i> , hairy roots
Number of pages	79
Number of appendices	
Language	Czech

OBSAH

CÍLE PRÁCE	11
1 ÚVOD.....	12
2 TEORETICKÁ ČÁST	14
2.1 Cytokininy.....	14
2.1.1 Biosyntéza cytokininů.....	15
2.1.2 Aplikace CK.....	16
2.2 Cytokinindehydrogenasa.....	17
2.2.1 Nadprodukce CKX genů ve dvouděložných rostlinách.....	19
2.2.2 Nadprodukce CKX genů v jednoděložných rostlinách.....	22
2.3 Výběr kořenově specifického ječmenného promotoru RSP	24
2.4 <i>Agrobacterium rhizogenes</i>	24
2.4.1 Transformace rostlin pomocí <i>A. rhizogenes</i>	28
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST.....	31
3.1 MATERIÁL.....	31
3.1.1 Přístrojové zařízení.....	31
3.1.2 Chemikálie, kity a biologický materiál	31
3.1.3 Pufry, gely, roztoky a média	32
3.2 METODY	36
3.2.1 Transformace bakterií elektroporací	36
3.2.2 Kultivace bakterií a příprava glycerolových stoků	37
3.2.3 Izolace plasmidové DNA z bakterií <i>E.coli</i>	37
3.2.4 Restrikce DNA	37
3.2.5 Agarosová elektroforéza	37
3.2.6 Purifikace DNA fragmentů z agarosového gelu	38
3.2.7 LR rekombinace	38
3.2.8 Transformace rajčete.....	38
3.2.8.1 Příprava děložních lístků	38

3.2.8.2	Příprava kultury <i>A. rhizogenes</i>	39
3.2.8.3	Ověření plasmidu v <i>A. rhizogenes</i>	39
3.2.8.4	Transformace děložních lístků.....	39
3.2.8.5	Selekce transgenních kořenů	39
3.2.9	Transformace kalusů ječmene.....	40
3.2.9.1	Izolace embryí	40
3.2.9.2	Příprava kultury <i>A. rhizogenes</i> transformace kalusů.....	40
3.2.10	Příprava rostlinných médií	41
3.2.11	Transformace embryí ječmene pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	41
3.2.12	Izolace genomové DNA.....	42
3.2.13	Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	42
3.2.14	Izolace RNA.....	43
3.2.15	Příprava cDNA.....	44
3.2.16	Real – time PCR.....	44
3.2.17	Izolace proteinů	46
3.2.18	Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové	46
3.2.19	Měření specifické enzymové aktivity CKX.....	47
3.2.20	SDS-PAGE elektroforéza podle Laemmliho	47
3.2.21	Western blotting (WB).....	48
4	VÝSLEDKY	49
4.1	Příprava konstruktů <i>SU::GFP</i> v <i>A. rhizogenes</i>	49
4.2	Příprava konstruktů <i>RSP::HvCKX-GFP</i> a <i>pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP</i> v <i>A. rhizogenes</i>	50
4.3	Transformace kořenů rajčete pomocí <i>A. rhizogenes</i>	52
4.4	PCR a RT-PCT analýzy transgenních kořenů rajčete.....	55
4.5	Proteinové analýzy transgenních kořenů rajčete.....	57
4.6	Transformace kalusů ječmene.....	58
4.7	Příprava konstruktů <i>RSP::HvCKX3-GFP</i> v <i>A. tumefaciens</i>	61

4.8	Transformace embryí ječmene pomocí <i>A. tumefaciens</i>	62
4.9	Analýzy T0 generace transgenních rostlin ječmene	64
4.10	Analýza T1 generace <i>RSP::HvCKX3-GFP</i> transgenních rostlin ječmene	66
5	ZÁVĚR	69
6	DISKUZE	70
7	LITERATURA	74
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	78

CÍLE PRÁCE

1. Příprava konstruktů *RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* ve vektoru pGWB1 a jejich transformace do bakterie *A. rhizogenes*
2. Transformace rajčete připravenými konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* v *A. rhizogenes*.
3. PCR a proteinové analýzy transgenních kořenů rajčete.
4. Optimalizace transformace kalusů ječmene pomocí *A. rhizogenes* obsahující konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP* a *SU::GFP* a jejich analýza pomocí PCR a konfokální mikroskopie.
5. Analýzy T0 a T1 generace transgenních rostlin ječmene transformované *A. tumefaciens* obsahující *RSP::HvCKX3-GFP* ve vektoru pBract209 pomocí PCR, RT-PCR a konfokální mikroskopie.

1 ÚVOD

Ječmen (*Hordeum vulgare L*) spolu s kukuřicí (*Zea mays L.*), pšenicí (*Triticum aestivum L.*) a rýží (*Oryza sativa L*) patří mezi čtyři nejvýznamnější plodiny využívané v zemědělství a představují významný zdroj potravy pro člověka a zvířata. Celosvětová produkce ječmene přesahuje 130 milionů tun ročně. Díky své vysoké sladovnické kvalitě je ječmen využíván v pivovarnictví a lihovarnictví, používá se jako přísada do krmiv pro zvířata, nebo je součástí různých pokrmů. Genetické inženýrství zabývající se stabilní transformací ječmene udělalo v posledních letech významné pokroky, které vedly ke zvýšení produktivity ječmene a jeho využití v biotechnologických a průmyslových odvětvích (Mrízová *et al.*, 2014). Řadu let se ječmenná zrna využívají jako bioreaktory v molekulárním farmaření (Dunwell, 2009).

Genetická manipulace metabolismu cytokininů může ovlivnit mnoho fyziologický procesů, jako například odolnost rostlin vůči stresu, produkci rostlin se zvětšenými kořeny anebo zvýšení výnosů. Vhodným cílem k ovlivnění metabolismu cytokininů je enzym cytokinindehydrogenasa (CKX), který ireverzibilně degraduje cytokininy. Účinnost CKX jako transgenu byla už v minulosti prokázána, přičemž nefunkčnost anebo umlčení tohoto genu vedla k produkci větších zrn rýže a ječmene (Ashikari *et al.*, 2005; Zalewski *et al.*, 2010) Volba vhodného tkáňově specifického promotoru pro řízení exprese CKX genů může vést k produkci rostlin se zvětšenými kořeny, které pomůžou rostlině k lepšímu uchycení v půdě a větší toleranci vůči suchu (Werner *et al.*, 2010).

V průběhu několika minulých let byla vyvinuta řada transformačních metod pro stabilní i přechodnou transformaci rostlin. Nejpoužívanějším nástrojem genetického inženýrství pro transformaci rostlin je bakterie *A.tumefaciens* a také *A.rhizogenes*. Tyto půdní bakterie přirozeně napadají dvouděložné rostliny, a proto trvalo řadu let, než byly vyvinuty první transformační protokoly pro jednoděložné rostliny.

Bakterie *A. rhizogenes* se často využívá pro testování genů zapojených do interakcí během symbiózy nebo během patogeneze, pro testování interakce mezi patogenem a mikroby nebo interakcí mezi rostlinou a patogenem (Alpizar *et al.*, 2006; Bonaldi *et al.*, 2010). Většina obilovin pěstovaných ve světě je napadena *Strigou* (patogenním organismem napadajícím kořeny), který snižuje výnosy obilovin. Vytvořením rezistentních rostlin vůči tomuto patogenu by bylo možné zvýšit výnosy plodin,

především v místech, kde jsou obiloviny jednou z nejpotřebnějších plodin. K tomuto účelu byl připraven transformační protokol pro kukuřici, který využívá bakterii *A. rhizogenes* jako hlavní transformační nástroj. Vznikající transformované kořeny se využívají pro testování nových rezistentních genů vůči tomuto patogenu (Runo et al., 2012). V roce 2007 byl připravený první transformační protokol pro sóju využívající bakterie *A. rhizogenes*. Transformovaná sója vytvářela zvětšený kořenový systém, který mohl být využíván ke studiu funkce genů důležitých v biologických procesech kořenů různých druhů rostlin (Kereszt et al., 2007). Nejnovější studie ukázaly, že transgenní kořeny *Althaea officinalis* L., vzniklé napadením bakterie *A. rhizogenes*, jsou schopné exprimovat cyanoviriny-N (CV-N) z antimikrobiálním anti-HIV účinkem. CV-N jsou proteiny patřící mezi lektiny a jsou hojně využívány k testování molekul s anti-HIV vlastnostmi. Cyanoviriny jsou schopné inaktivovat různé kmeny HIV a zabraňují přenosu viru z buňky na buňku. Lze předkládat, že v budoucnu bude transgenních kořenů *A. officinalis* využíváno nejen jako zdroje prodující sekundární metabolity sloužící jako terapeutická léčiva, ale také jako expresního systému pro produkci rekombinantních farmaceutik (Drake et al., 2013). Transgenní kořeny vzniklé transformací *A. rhizogenes* by byly jednou z dalších možných metod jak rychle testovat nové promotory, geny nebo proteiny v ječmeni. V roce 2011 se podařilo připravit transgenní kořeny kalusů ječmene, ale za použití jiného virulentního kmene *Agrobacteria* (*A. tumefaciens*; Imani et al., 2011).

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Cytokininy

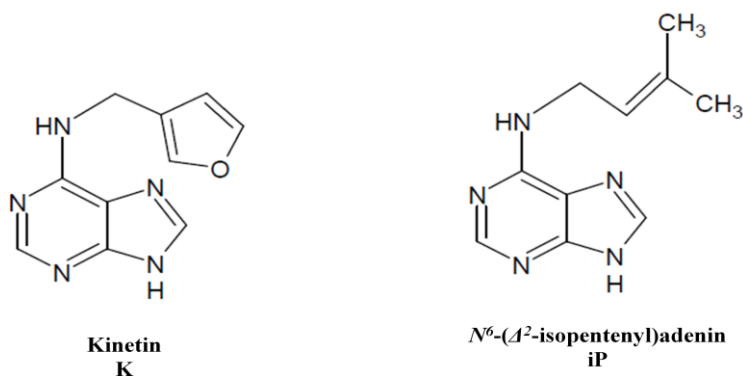
Cytokininy (CK) jsou nízkomolekulární látky, které patří do skupiny fytohormonů. Tyto sloučeniny ovlivňují vývoj a fyziologické funkce rostliny v průběhu jejího života (Werner a Schmölling, 2009). Hlavní funkcí těchto sloučenin je regulace buněčného dělení a morfogeneze. Další důležitou funkcí je zpomalení senescence, zapojení do apikální dominance a ovlivňování vývoje květů a semen (Zalabák *et al.*, 2012). CK se také podílejí na zprostředkování odpovědi na vnější podmínky, např. dostupnost živin a vody v kořeni nebo na množství světla v prýtu (Werner a Schmölling, 2009).

Prvním objeveným cytokininem byl kinetin v roce 1955, který byl nalezen jako degradační produkt DNA (Miller a Skoog, 1955). Po čtyřiceti letech byl tento CK objeven také v rostlinném materiálu (Barciszewski *et al.*, 1996; Ge *et al.*, 2005). Z chemického hlediska jsou CK deriváty adeninu, které mají v pozici N^6 navázaný isoprenoidní nebo aromatický postranní řetězec. Nejpočetnější skupinou cytokininů jsou isoprenoidní CK, které se vyskytují ve dvou typech. První typ jsou CK s navázaným isopentenylovým postranním řetězcem v pozici N^6 , zde patří isopentenyladenin, N^6 -[(Δ^2 -isopentenyl)adenin]. Druhý typ jsou CK s hydroxylovaným isopentenylovým postranním řetězcem v pozici N^6 (Schmölling, 2004; Obr. 1).

CK jsou důležité regulační faktory v rostlině, které pozitivně ovlivňují vývoj listů, naopak však negativně ovlivňují růst kořenů. Nedostatek CK v prýtu vede k zpomalení růstu listů a ke snížení počtu listových buněk. Werner *et al.* (2001) zjistili, že nedostatek CK u *35S::AtCKX* transgenních rostlin tabáku a *Arabidopsis* vede k inhibici růstu nadzemní části rostliny, avšak kořenový systém těchto rostlin je obohacen a rostliny produkují více postranních kořenů ve srovnání s kontrolními netransformovanými rostlinami (Werner *et al.*, 2001; 2003).

Antagonisticky k cytokininům působí hormony auxiny. Oba typy hormonů jsou nezbytné pro vývoj kořenového meristému a pro růst kořene. CK kontrolují přechod meristemických buněk v buňky diferencované tím, že potlačují signalizaci a transport auxinu v tranzitní zóně kořene a auxiny naopak udržují kořenový meristéum aktivní a podporují dělení buněk v meristému (Moubayidin *et al.*, 2009). Shimizu-Sato *et al.* (2009) navrhli model interakce auxinu a cytokininu, který kontroluje větvení prýtu. Podle tohoto modelu auxiny působí v neporušeném apexu prýtu a regulují

hladinu CK tím, že potlačují expresi adenosinfosfát-isopentenyltransferasa (*IPT*) a tedy i biosyntézu CK. Po odstranění apexu, poklesne hladina auxinu, a tím se obnoví exprese *IPT*. Poté jsou nově nasyntetizované CK transportovány do dormantních axilárních pupenů, kde regulují jejich růst. V nově vytvořeném apexu opět vzroste hladina auxinu, dojde k represi exprese *IPT*, k indukci exprese CKX a snížení hladiny CK (Shimizu-Sato *et al.*, 2009).



Obr. 1: Chemická struktura cytokininů odvozených od adeninu (upraveno z Schmülling, 2004)

2.1.1 Biosyntéza cytokininů

V rostlinných tkáních můžou CK vznikat buď *de novo* syntézou anebo degradací tRNA. *De novo* syntéza CK se vyskytuje u rostlin mnohem častěji. Nejdůležitějším enzymem této dráhy je adenosinfosfát isopentenyltransferasa (*IPT*; EC 2.5.1.27, Kakimoto 2001; Takei *et al.*, 2001). Donorem isoprenoidního postranního řetězce jsou dimethylallyl pyrofosfát (DMAPP) a 1-hydroxy-2-methyl-2-(*E*)-butenyl 4-difosfát (HMBDP; Kasahara *et al.*, 2004), které jsou produkty methyletrytritol-fosfátové dráhy (MEP dráha; Rohmer *et al.*, 1993; Lichtenthaler, 1999; Laule *et al.*, 2003) lokalizované v plastidech a mevalonátové dráhy (MVA dráha; Lombard a Moreira, 2011) lokalizované v cytosolu (Zalabák *et al.*, 2013). *IPT* katalyzuje přenos isopentenylu z DMAPP anebo HMBDP na *N*⁶ adenosin 5'- difosfátu nebo *N*⁶adenosin 5'- trifosfát (ADP; ATP, Kakimoto, 2001). Primárními produkty této biosyntézy jsou buď isopentenyladenosin-5'-difosfát anebo isopentenyladenosin-5'-trifosfát. Hlavním enzymem druhé dráhy je tRNA-isopentenyltransferasa, která katalyzuje *N*-prenylaci

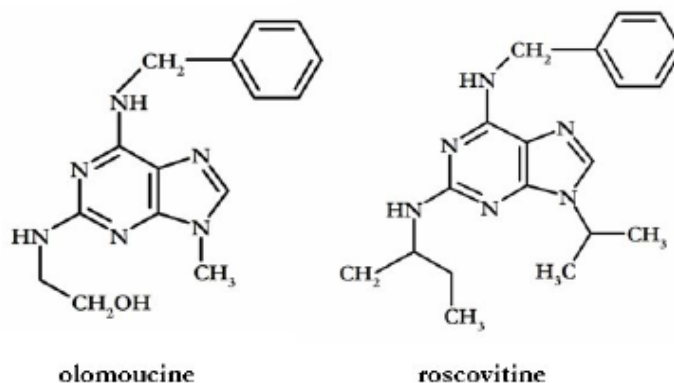
adenosinu vázaného na tRNA (tRNA:IPT; EC 2.5.1.8). Prekurzorem pro isoprenylaci tRNA je DMAPP a touto dráhou vzniká *cis*-zeatin (*cZ*; Kasahara *et al.*, 2004).

Posledním krokem v biosyntéze CK je jejich hydrolytická aktivace pomocí fosforibohydrolasy (tzv. Lonely Guy; LOG). LOG enzym byl poprvé objeven v rýži a katalyzuje odštěpování ribosa 5`-monofosfátu z CK nukleotidu, čímž se uvolňují volné báze cytokininů (Kurakawa *et al.*, 2007).

2.1.2 Aplikace CK

Největší uplatnění cytokininů je v současnosti v zemědělských technologiích. CK slouží jako součást různých kultivačních medií, které se využívají pro regeneraci rostlin *in vivo*. Biotechnologií tkáňových kultur se využívá pro udržení somatoklonální variability plodin nebo pro rychlé a efektivní rozmnožování některých okrasných dřevin, například rododendronů nebo bobulovitých rostlin, které se běžnou metodou těžko množí. Kontrolováním hladiny cytokininů v médiu je možné produkovat rostliny rezistentní vůči patogenům (Galuzska *et al.*, 2008).

CK mají důležité aplikace také v medicíně. V roce 2000 byly ve spolupráci s J. Veselým a M. Strnadem nasyntetizovány deriváty aromatických CK (Olomoucin a Roskovitin; Obr. 2), které vykazují protinádorovou aktivitu. Tyto sloučeniny inhibují cyklin-dependentní kinasy (CDK), které jsou hlavními regulátory buněčného cyklu. Roskovitin a Olomoucin jsou ve fázi klinického testování, při němž jsou optimalizovány hladiny denních dávek pro pacienty. Tyto látky by mohly být využity kromě léčby rakoviny též při léčbě neurogenerativních onemocnění (Alzheimerovy a Parkinsonovy choroby), kardiovaskulárních onemocnění, virálních infekcí a mnoha dalších onemocnění (Meijer a Raymond, 2003). Nedávno bylo zjištěno, že zeatin ribosid může být využitý při léčbě Huntingtonovy choroby, která je způsobena nahromaděním glutaminu v mutantním proteinu huntingtinu (*Htt*), což pak vede k agregaci proteinu. Zeatin ribosid je schopen potlačit tuto agregaci mutantního *Htt* (Lee *et al.*, 2012).



Obr. 2: Syntetické deriváty aromatických CK využitelné jako potenciální léčivo pro léčbu rakoviny a jiných onemocnění (Galuzska *et al.*, 2008).

2.2 Cytokinindehydrogenasa

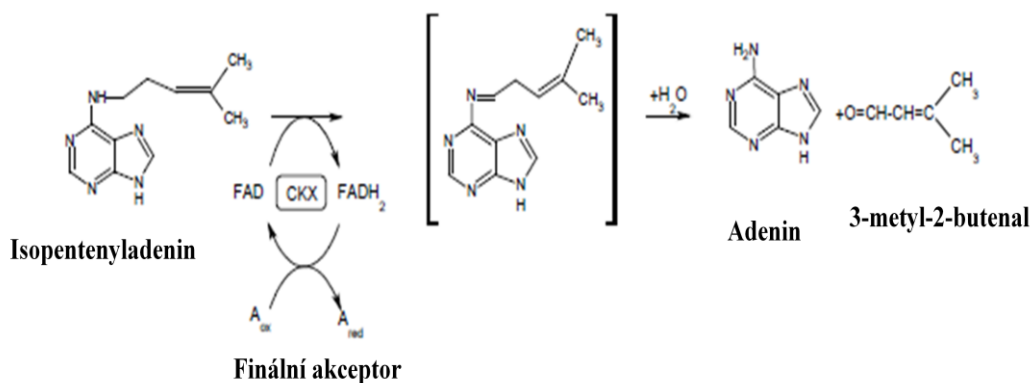
Cytokinindehydrogenasy (CKX) jsou enzymy, které patří do třídy oxidoreduktas (EC 1.5.99.12). Tyto enzymy katalyzují ireverzibilní štěpení postranního řetězce *tZ*, *N*⁶-(Δ^2 -isopentenyl)adeninu a jejich ribosidů, a tím vznikají adenin nebo adenosin a příslušný aldehyd (Šmehilová *et al.*, 2009).

První zmínka o CKX aktivitě je z roku 1971, kdy bylo pomocí radioaktivně značeného isopentenyladeninu zjištěno, že v extraktu buněčné tabákové kultury dochází k degradaci na adenin (Pačes *et al.*, 1971). Původně se předpokládalo, že akceptorem tohoto enzymu je kyslík, proto byl CKX klasifikován jako aminooxidasa obsahující měď, která katalyzuje oxidativní přeměnu biogenních primárních aminů na aldehydy, amoniak a peroxid vodíku (Whitty a Hall, 1974).

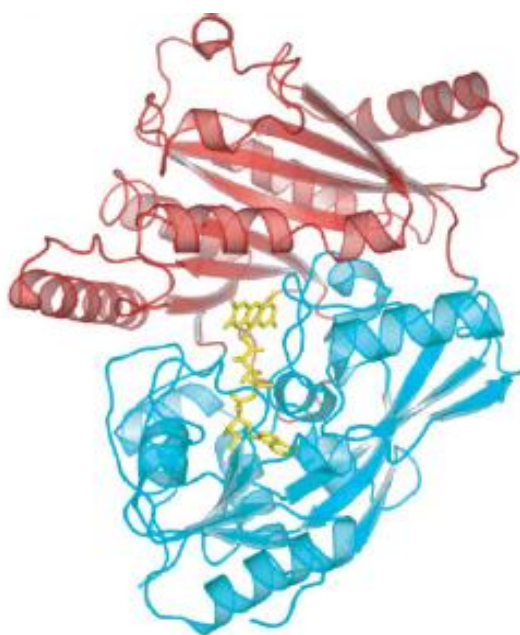
Klonování prvního CKX genu v roce 1999 vyvrátilo teorii, že CKX patří mezi aminooxidasu obsahující měď, naopak potvrdilo teorii, že CKX pravděpodobně patří mezi flavoproteiny s navázaným kofaktorem flavinadenindinukleotidem (FAD; Morris *et al.*, 1999). Studie cytokinioxidasy v kukuřici a pšenici prokázaly, že elektronové akceptory jiné než kyslík (zejména akceptory chinonového typu, například 2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon; Q₀) zvyšují aktivitu CKX proteinů mnohem více. Navíc bylo zjištěno, že během této katalytické reakce nevzniká peroxid vodíku, a že enzym se chová spíše jako dehydrogenasa než oxidasa. Na základě těchto testů byl enzym reklasifikován jako dehydrogenasa (Galuzska *et al.*, 2001; Frébortová *et al.*, 2004). Sekvenční a biochemické analýzy

ukázaly, že CKX jsou flavoproteiny, které patří do třídy oxidoreduktas. Tato třída zahrnuje jak oxidační reakce (elektronovým akceptorem je kyslík), tak i degradační reakce (využívají jiné elektronové akceptory, například Q₀; 2,6-dichlorofenol-indofenol [DCPIP], Schmülling *et al.*, 2003). Katalytická reakce začíná oxidací substrátu, přičemž vzniká intermediát iminu. Iminový meziprodukt se poté hydrolyzuje na adenin a aldehyd, odvozený od jeho postranního řetězce (Obr. 3; Galuszka *et al.*, 2001).

Společným rysem všech známých rostlinných CKX enzymů je přítomnost kovalentně vázané FAD molekuly. Tento kofaktor se připojuje na histidinový zbytek přes 8-methylovou skupinu isoalloxazinového kruhu (Fraaije *et al.*, 1998). Třídimensionální struktura byla jako první navržena pro CKX ze *Zea mays* (ZmCKX1). Tato struktura odhalila čtyři glykosylované asparaginové a histidinové zbytky navázané na kofaktor FAD (Malito *et al.*, 2004). V roce 2008 byla odhalena další krystalická struktura CKX u *Arabidopsis thaliana* (AtCKX7, Obr. 4). Obě struktury vykazují dvoudoménnou topologii, která byla nalezena u členů vanillylalkohol oxidasové rodiny (Bae *et al.*, 2007). Aktivní místo CKX se skládá ze dvou částí. První z nich je vnitřní dutina ohraničená flavinovým kruhem a druhá část je trychtýřovitá oblast na povrchu proteinu. Tyto části tvoří vazebná místa pro alifatický postranní řetězec substrátu a adeninový kruh (Malito *et al.*, 2004).



Obr. 3: Reakční schéma degradace CK. Isopentenyladenin je degradován na adenin a jeho příslušný aldehyd přes intermediát iminu. (upraveno z Frébortová *et al.*, 2004).

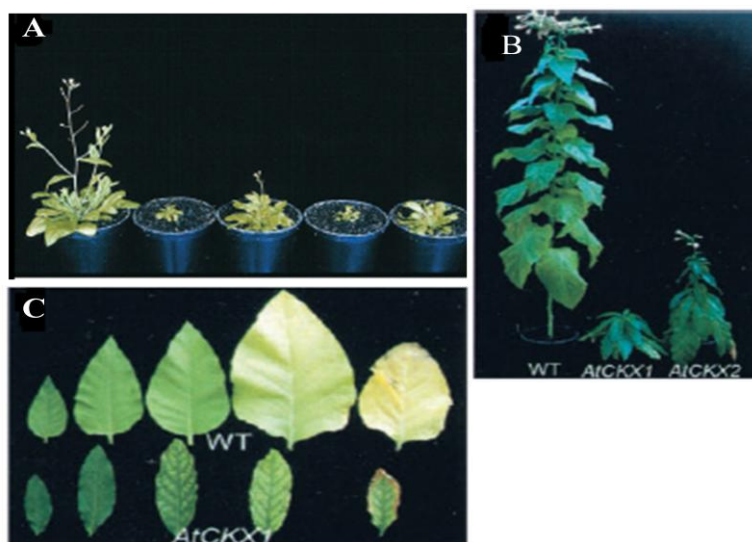


Obr. 4: Krystalická struktura AtCKX7. FAD vazebná doména (modrá), doména vázající substrát (červená), FAD molekula (žlutá). Převzato z Bae *et al.*, 2008.

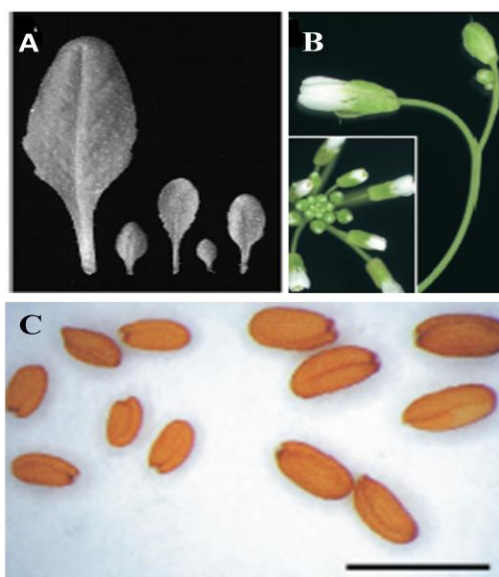
2.2.1 Nadprodukce CKX genů ve dvouděložných rostlinách

Regulační funkce CKX enzymů byly testovány na modelových rostlinách tabáku (*Nicotiana tabacum*) a *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). Nadprodukce šesti CKX genů z *Arabidopsis* pod kontrolou konstitutivního 35S promotoru v modelových rostlinách prokázala kritickou roli cytokininů ve vývoji kořenů a prýtu. Hladina endogenních cytokininů u 35S::*AtCKX* transgenních rostlin *Arabidopsis* a tabáku poklesla a rostliny byly trpasličího vzrůstu (Obr. 5A; B; Werner *et al.*, 2001; 2003). Primární kořeny 35S::*AtCKX* transgenních rostlin byly naopak delší než kořeny rostlin divokého typu (WT rostliny) a transgenní rostliny produkovaly také více postranních kořenů (Obr. 7, Werner *et al.*, 2001; 2003). Změny ve vývoji orgánu těchto rostlin byly způsobené hlavně změnou v buněčném dělení v meristematických zónách, kde vrcholový meristém byl zmenšený, a kořenový meristém byl zvětšený (Werner *et al.*, 2001). Snížená hladina cytokininů v 35S::*AtCKX* transgenním tabáku vedla také k potlačení senescence (Werner *et al.*, 2001, Obr. 5C). Vývoj listů u 35S::*AtCKX* transgenních rostlin *Arabidopsis* byl opožděn (Obr. 6A) a u 35S::*AtCKX1* a 35S::*AtCKX3* transgenních rostlin byl opožděn také vývoj květů, kterých bylo také méně než u WT rostlin (Obr. 6B). Morfologie květů těchto transgenních rostlin se

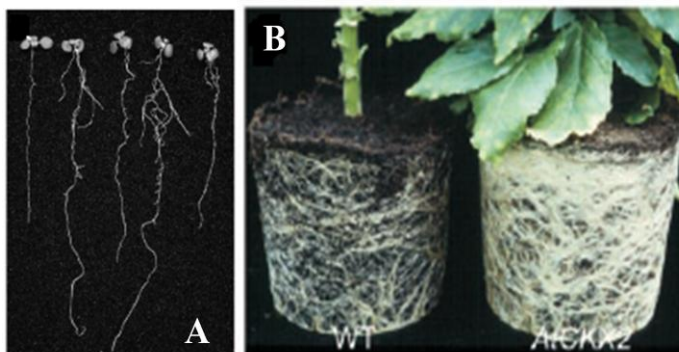
nezměnila ve srovnání s WT rostlinami, ale transgenní rostliny produkovaly méně semen, které však ve zralém stádiu byly větší a jejich váha byla dvojnásobná ve srovnání s váhou WT semen (Obr. 6C; Werner *et al.*, 2003). Podobné změny byly pozorovány též při nadprodukci ječmenných genů *HvCKX6* a *HvCKX9* (podle starého názvosloví jsou to geny *HvCKX3* a *HvCKX2*) pod kontrolou 35S promotoru v transgenním tabáku a *Arabidopsis*. 35S::*HvCKX9* transgenní rostliny tabáku a *Arabidopsis* měly zakrslou nadzemní část a mohutný kořenový systém, naproti tomu nadprodukce *HvCKX6* genu v tabáku a *Arabidopsis* nevedla k výrazným fenotypovým změnám (Galuszka *et al.*, 2004). Zvětšení kořenového systému v rostlinách, které overexprimují *CKX* geny by mohly být využity v zemědělství. Použití kořenově specifických promotorů pro expresi *AtCKX* genů v *Arabidopsis* vedlo u transgenních rostlin k nadměrné produkci kořenů, přičemž nadzemní část těchto rostlin zůstala stejná jako u WT rostlin (Obr. 8, Werner *et al.*, 2010).



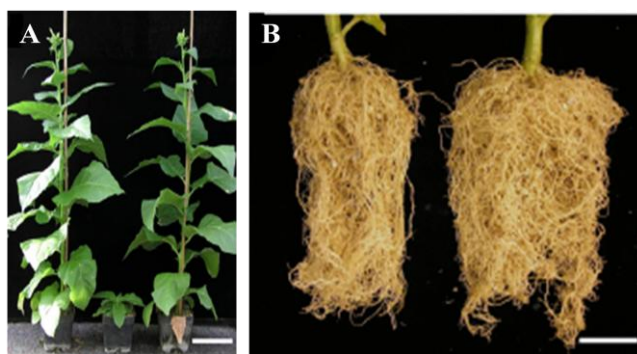
Obr. 5: Změna fenotypu v prýtu tabáku a *A.thaliana* způsobená nadprodukcí 35S::*AtCKX*. (A) Změna ve vývoji prýtu při overexpresi *CKX* genů v *A. thaliana*. Zleva doprava: netransformovaná rostlina *A. thaliana* (WT), transgenní rostliny 35S::*AtCKX1*, 35S::*AtCKX2*, 35S::*AtCKX3* a 35S::*AtCKX4*; (B) Porovnání vzrůstu u transgenní rostliny tabáku a WT rostliny; (C) Porovnání velikosti listů a senescence u jednotlivých listů tabáku. Listy byly sesbírány z horní části rostliny z 4, 9, 12, 16 a 20 nodu (zleva doprava; Werner *et al.*, 2001; 2003).



Obr. 6: Změna ve velikosti listů, vzniku květů a velikosti semen v rostlině *A. thaliana*. (A) Změna ve velikosti listů. Zleva doprava: WT listy, transgenické rostliny *35S::AtCKX1*, *35S::AtCKX2*, *35S::AtCKX3* a *35S::AtCKX4*; (B) Změna v počtu květů na květenství u transgenické rostliny a kontroly; (C) Změna ve velikosti semen u WT rostliny (vlevo) a transgenické rostliny (vpravo). Převzato z Werner *et al.*, 2003



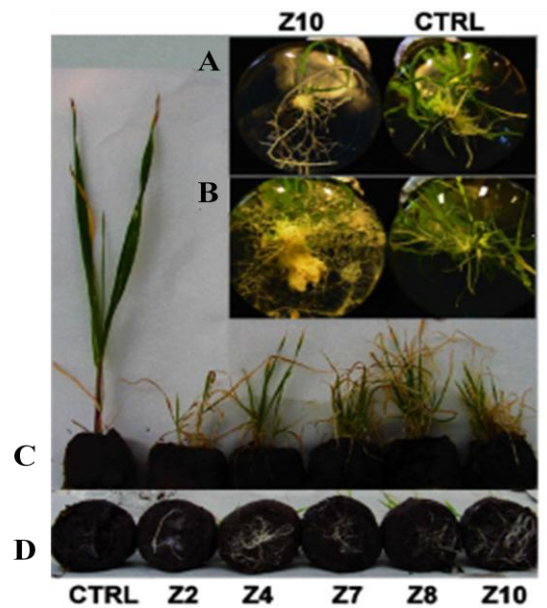
Obr. 7: Srovnání růstu kořenového systému u *35S::AtCKX* transgenických rostlin tabáku a *A.thaliana* s rostlinou divokého typu. (A) Kořenový systém v *A. thaliana*; (B) Kořenový systém v roslině tabáku (Werner *et al.*, 2001; 2003).



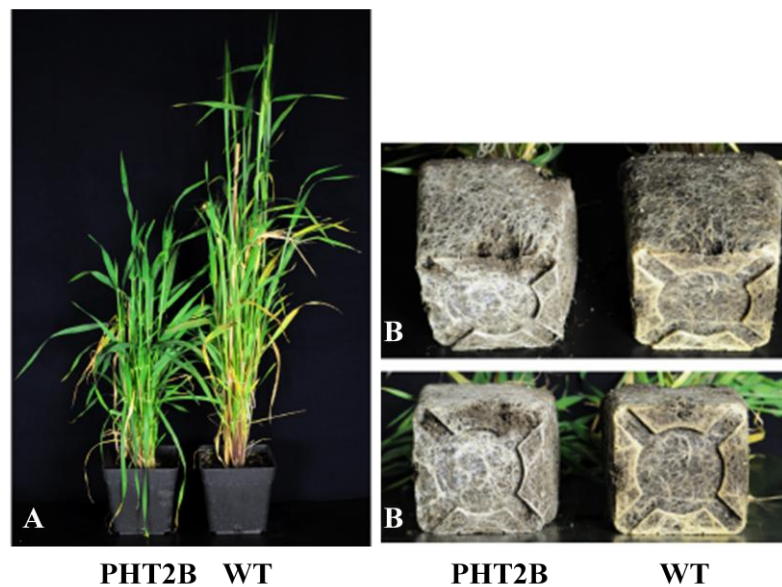
Obr. 8: Expresse *W6::CKX1* v tabáku. (A) Fenotyp prýtu dospělé rostliny. Zleva doprava: netransformovaná rostlina tabáku (divoký typ), *35S::CKX1*, transgenní rostlina z linie *W6::CKX1*; (B) Tvorba kořenů kultivovaných v hydroponickém roztoku a pozorované zvětšení biomasy (Werner et al., 2010).

2.2.2 Nadprodukce CKX genů v jednoděložných rostlinách

Overexpresse *CKX* genu z kukuřice a ječmene (*ZmCKX1* a *HvCKX2.1*) pod kontrolou konstitutivního ubikvitinového promotoru (*Ubi*) v ječmeni vedla k poněkud odlišnému fenotypu, než byl pozorován u *35S::AtCKX* transgenních rostlin tabáku a *Arabidopsis Ubi::CKX* transgenní rostliny ječmene začaly už brzo po přesazení produkovat mohutné kořeny, avšak žádná ze zregenerovaných rostlin nebyla schopná produkovat klasy a u všech těchto rostlin nastala předčasná senescence. Všechny *Ubi::CKX* transgenní rostliny ječmene měly zmenšenou nadzemní část ve srovnání s netransgenními rostlinami (Obr. 9, Mrízová *et al.*, 2013). Pro řízení exprese *ZmCKX1* genu v ječmeni byly také testovány dva kořenově specifické promotory z ječmene (promotor pro fosfátový transportér *PHT* a promotor kořenového transkripčního fakturu *RAF*). Expresse *ZmCKX1* genu a také zvýšená *CKX* enzymová aktivita však byla naměřená v kořenech ale také v listech těchto transgenních liniích. Všechny *RAF::ZmCKX1* a *PHT::ZmCKX1* transgenní linie měly mohutný kořenový systém, byly menší než kontrolní netransgenní rostliny a produkovaly plané klasy. Jenom jedna *PHT::ZmCKX1* transgenní rostlina (s nejslabším fenotypem) měla potomstvo. Fenotyp T1 generace *PHT::ZmCKX1* transgenních rostlin byl podobný jako u T0 generace a žádná z těchto rostlin neměla potomstvo (Obr. 10). Tyto výsledky naznačovaly, že vybrané promotory ztratily svoji tkáňovou specifitu.



Obr. 9: Fenotyp transformantů *Ubi::ZmCKX1* z T0 generace ječmene. (A; B) Růst kořenového systému *Ubi::ZmCKX1* regenerujícího *in vitro*, 20 a 35 dní po přenosu do růstového média; (C) Regenerující nadzemní část *Ubi::ZmCKX1* transgenních rostlin; (D) Kořenový systém regenerujících *Ubi::ZmCKX1* transgenních rostlin, 65 dní staří transformanti přenesení do růstových koleček. **Z2 - Z10** jsou nezávislí transformanti *Ubi::ZmCKX1*, **CTRL** - kontrolní rostlina (převzato z Mrízová *et al.*, 2013).



Obr. 10: Fenotyp transformantů *PHT::ZmCKX1* z T1 generace ječmene. (A) Nadzemní část 4 měsíce staré rostliny; (B) Kořenový systém 4 měsíce staré rostliny (převzato z Mrízová *et al.*, 2013).

2.3 Výběr kořenově specifického ječmenného promotoru RSP

Pomocí programu BLAST bylo v NCBI databázi (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) obsahující data z „microarray analýz“, GEODataSets GDS2722, vyselektováno 134 kandidátních genů se specifickou expresí v kořeni ječmene. Pomocí GEO2R jako analyzačního nástroje bylo těchto 134 vybraných ječmenných kandidátů porovnáno s kandidáty, kteří byli vyselektováni pro rýži stejným způsobem (pro selekci byly použity data z mikroarray analýz GSE6894). Po porovnání dat bylo vybráno sedm vhodných genů se specifickou expresí v kořenech. Pro všech sedm genů byly navrženy specifické primery a pomocí RT-PCR byla měřena jejich exprese v různých vývojových stádiích kořene, listu a květů ječmene divokého typu. Na základě získaných dat byl vybrán jeden gen (GenBank ID AKK250777), který měl nejsilnější expresi v kořenech, ve srovnání s jeho expresí v ostatních vývojových stádiích listů a květu. Jelikož protein, kódovaný tímto genem, dosud nebyl charakterizován, označujeme ho jako potencionální kořenově specifický protein (RSP). Pomocí programu BLAST byla v knihovně, obsahující data ze 454 sekvenování ječmene ([http:// webblast.lpk-gatersleben.de/barley/](http://webblast.lpk-gatersleben.de/barley/)) vyhledána promotorová sekvence pro RSP gen, který byl testován v této diplomové práci (připravili Veronique Bergougnoux, Ph.D. a Mgr. Katarína Mrízová, Oddělení Molekulární biologie).

2.4 *Agrobacterium rhizogenes*

Agrobacterium rhizogenes, dříve nazývané *Phytomonas rhizogenes*, je gramnegativní, patogenní, půdní bakterie, která přirozeně napadá dvouděložné rostliny (Veena a Taylor, 2007). Tato bakterie byla poprvé objevena v roce 1900 a její objev byl spojen s nákazou rostlin známou jako „hairy root“ syndrom. Toto onemocnění způsobuje u rostlin zvětšení kořenového systému, přičemž kořeny mají velký počet jemných kořenových vlásků, které vyrůstají z místa infekce touto bakterií a jsou schopné růst na médiích bez hormonů (Riker *et al.*, 1930).

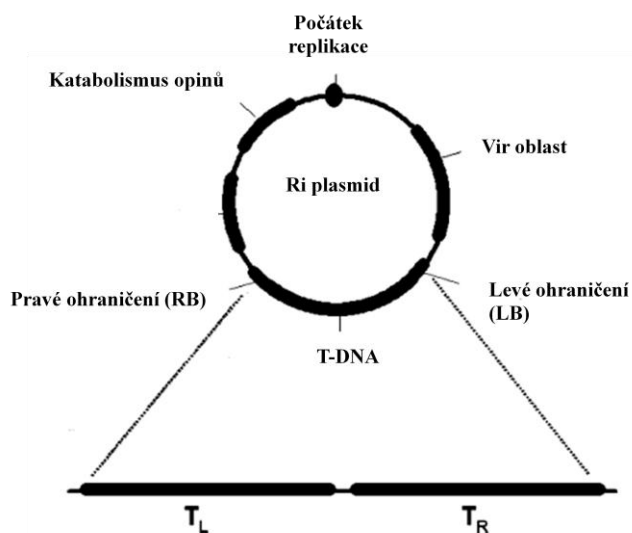
A. rhizogenes vyvolává tvorbu „hairy root“ a patří do kmene bakterií agropinového typu. Tento kmen obsahuje Ri plasmid (root-inducing), který obsahuje dvě oblasti T-DNA (T_L a T_R oblast; Obr. 11). Každá z těchto oblastí nese skupinu genů, které jsou zapojené do regulace a vývoje kořenů (Meyer *et al.*, 2000). T_L oblast obsahuje tzv. *rol* geny, které jsou nezbytné pro zahájení vzniku a vývoje „hairy root“ (White *et*

al., 1985). Naopak T_R oblast obsahuje *aux* geny, které se účastní biosyntézy auxinů a agropinů. Tyto geny nejsou pro vznik „hairy root“ esenciální, pouze napomáhají jejich vzniku. Do hostitelského rostlinného genomu jsou transportovány a integrovány obě části T-DNA (Vilaine *et al.*, 1987).

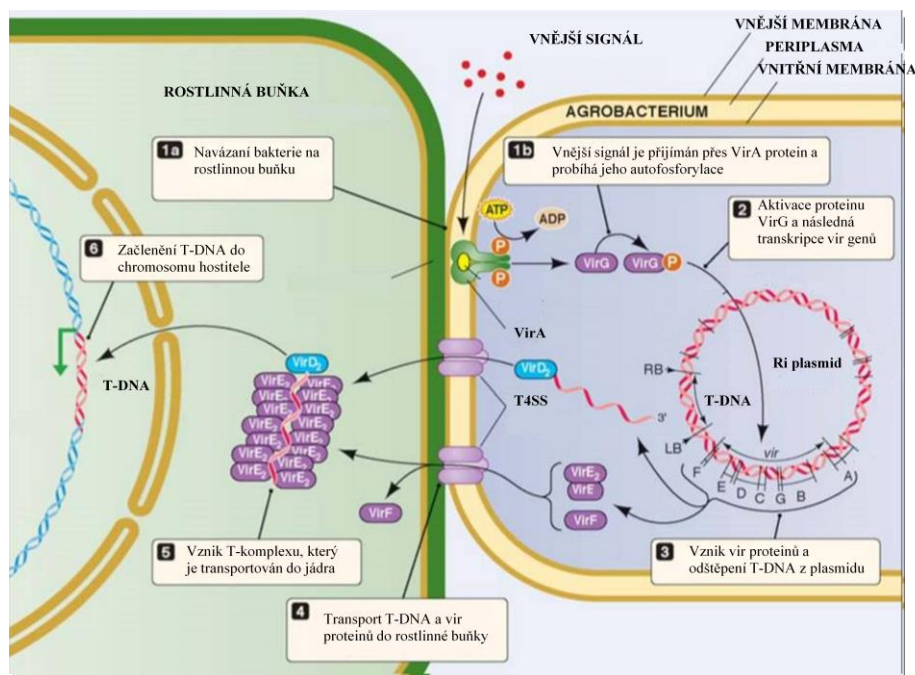
Mechanismus napadení rostliny *A. rhizogenes* je podobný jeho příbuzné bakterii *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*), která vytváří v rostlinných pletivech nádory. Mechanismus zpracování, přenosu a integrace bakteriální T-DNA do hostitelského genomu je až na pár výjimek stejný u obou bakterií (Yadav *et al.*, 1982). Poraněná rostlina vylučuje látky, ke kterým je bakterie citlivá, jako například fenolické látky (acetosyringon) nebo cukerné sloučeniny s pyranosovou formou (L-arabinoza). Poraněná rostlina je rozpoznána pomocí *chv* genů umístěných na bakteriálním chromozomu a ty zprostředkují připojení na rostlinnou buňku (Pitzschke a Hirt, 2010; Obr. 12; 1a). Vnější signál je zachycen receptorovým proteinem VirA, což je dimerní membránový protein, který změnou své konformace aktivuje protein VirG (Obr. 12; 1b). Fosforylací VirG proteinu se spustí exprese ostatních *vir* genů ve vir oblasti Ri plasmidu, které napomáhají přenést T-DNA do jádra hostitelské buňky (Obr. 12; 2). T-DNA je na Ri plasmidu ohraničena dlouhými repeticemi (z levé i pravé strany; Gelvin, 2003). Oblast mezi těmito hraničními sekvencemi je vyštěpena pomocí VirD1 a VirD2 a vznikne jednovláknová molekula T-DNA (T-vlákn), na jehož 5' konec se kovalentně naváže molekula VirD2 (McCullen a Binns, 2006; Obr. 12; 3). Vzniklé vlákno je následně přeneseno přes sekreční proteinový systém IV typu (T4SS) do rostlinné buňky. Tento systém vytváří membránový kanál, který je složený z 11 proteinů VirB a VirD4, kterým je následně transportováno T-vlákn s kovalentně navázaným proteinem VirD2. Spolu s vláknem jsou přeneseny také virulentní efektorové proteiny VirE1, VirE2 a VirF (Obr. 12; 4). Všechny vir proteiny nesou specifickou signální sekvenci, která je cílená do jádra (NLS sekvence). V cytoplasmě rostlinné buňky se na T-vlákn navážou molekuly proteinu VirE2 spolu se specifickými rostlinnými proteiny (importin α , VIP) a vytvoří kolem T-vlákn tzv. plášť (Obr. 12; 5). Tyto rostlinné proteiny také napomáhají transportu vzniklého T-komplexu přes jaderný pór do jádra. Po přenosu T-komplexu do jádra je T-vlákn integrováno do genomu hostitelské buňky (Obr. 12; 6). Přesný

mechanismus integrace T-vláknů do genomu je dosud neznámý, ale předpokládá se, že v jádře se nacházejí pomocné proteiny chromatinu (histony), které napomáhají vláknům integrovat se do genomu. Vir proteiny, tak i rostlinné proteiny jsou uvolněny pomocí proteinu VirF a jsou transportovány zpět do cytoplasmy (Gelvin, 2010; Chandra, 2012).

Rol geny („root locus“) jsou rostlinné onkogeny, které jsou umístěny na T_L DNA a jsou esenciální pro tvorbu tumorů a z nich vyrůstajících kořenů tvořících „hairy root“. Po přenosu a začlenění bakteriální T-DNA do chromosomu hostitelské buňky jsou tyto geny zodpovědné za propuknutí infekce. Důležitou roli při vzniku „hairy root“ má *rolA* gen, který v transgenních rostlinách způsobuje změnu fenotypu, která se vyznačuje hlavně dlouhými internody, stále zelenými, vrásčitými listy a opožděním senescence (Schmülling *et al.*, 1993). Exprese *rolB* genů vede ke zvýšení citlivosti na hladinu auxinů v buňkách, ve kterých se exprimují a k nadměrnému vzniku adventivních a laterálních kořenů (Shen *et al.*, 1990). Fillipi *et al.* (1996) objevili tyrosin fosfátovou aktivitu v transformované mrkvi, která byla lokalizovaná na plasmatické membráně buněk. Tento objev vedl ke zjištění, že přenos zachyceného auxinového signálu je zprostředkován pomocí kinasa/fosfátové kaskády (Fillipi *et al.*, 1996). Změna fenotypu způsobená expresí *rolC* genů je podobná působení cytokininů, které ovlivňují vývoj a morfogenezi rostlin. Exprese *rolC* genů v transgenních rostlinách způsobuje vznik kratších internodů, rostlina produkuje menší počet květů, a to může vést až ke sterilitě rostliny, rostlina je viditelně menší a má níženou apikální dominanci (Estruch *et al.*, 1991). Exprese *rolD* genů v transgenních rostlinách způsobuje předčasné kvetení a rostliny produkují mnohem více květů (Mauro *et al.*, 1996). *Rol* geny zvyšují hladinu sekundárních metabolitů a mění fenotyp rostliny v závislosti na změně hladiny hormonů nebo na základě vnímání signálů. Například auxiny způsobují u rostlin nadměrný růst kořenů, cytokininy způsobují větvení kořenů a gibbereliny způsobují deformaci listů (Christey, 2001).



Obr. 11: Struktura Ri plasmidu *A. rhizogenes* (Veena a Taylor, 2007).



Obr. 12: Transdukcce T-DNA z bakteriální buňky a její začlenění do chromosomu hostitelské buňky. (1a) Znázorňuje navázání bakterie *A. rhizogenes* na rostlinnou hostitelskou buňku; (1b) Po přijetí vnějšího signálu proteinem VirA dojde k jeho autofosforylaci a protein poté aktivuje protein VirG, který následně spouští transkripci ostatních *vir* genů (2); (3) Znázorňuje odštěpení T-DNA pomocí VirD1 a VirD2 proteinů a navázání VirD2 na vzniklé T-vlákno; (4) Transport T-vlákna a ostatních vir proteinů přes vzniklý T4SS kanál; (5) Navázání vir proteinů na T-vlákno a vznik T-komplexu; (6) Transport T-komplexu do jádra a začlenění T-DNA do chromosomu hostitelské rostlinné buňky (McCullen a Binns, 2006).

2.4.1 Transformace rostlin pomocí *A. rhizogenes*

Doposud bylo vyvinuto několik transformačních metod, které umožňují u rostlin buď přechodnou (transientní) nebo stabilní expresi transgenu. Nejčastěji jsou pro transformace rostlin využívány bakterie *A.tumefaciens* a v současné době také *A.rhizogenes*. Tyto půdní bakterie přirozeně napadají dvouděložné rostliny, do jejichž chromosomu začleňují svou T-DNA (viz text výše). Transformace jednoděložných rostlin těmito bakteriemi je obtížná, protože jednoděložné rostliny nejsou přirozeným hostitelem bakterií rodu *Agrobacterium*. Nicméně v posledních letech byly optimalizovány nové metody pro transformaci hospodářsky důležitých plodin, například sóji, kukuřice, ječmene, pšenice a jiných jednoděložných rostlin (Kereszt *et al.*, 2007; Runo *et al.*, 2012). Velkou nevýhodou těchto transformačních metod je časová náročnost přípravy rostlinného materiálu a nízká transformační účinnost, která je způsobena nízkou citlivostí jednoděložných rostlin k těmto bakteriím.

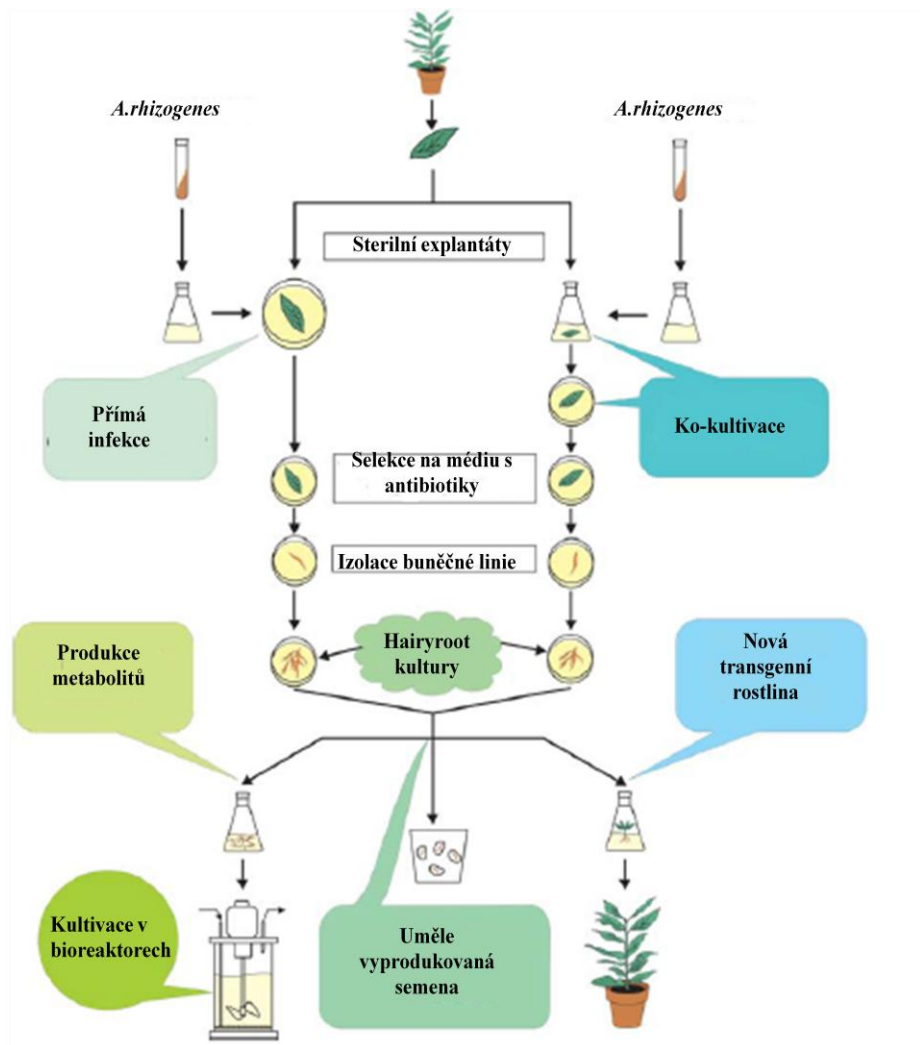
První rostlina, která byla transformována pomocí *A.rhizogenes* byl tabák. Transformovaná rostlina tabáku poté produkovala tumory, na kterých byly viditelné kořeny. Vzniklá tkáňová kořenová kultura byla kultivovaná v půdě a byla schopna regenerovat v novou rostlinu tabáku (Ackermann, 1977). Důležitým mezníkem při transformacích rostlin byl objev kompozitních rostlin. Tyto rostliny vznikají inokulací prýtu rostliny divokého typu s kulturou *A.rhizogenes*, která následně vyvolává růst transgenních kořenů. Objevem kompozitních rostlin se snížil čas potřebný k vytvoření transgenních rostlin, kterých se využívá, například k testování interakcí rostlina-patogen nebo pro testování genových funkcí (Taylor *et al.*, 2006).

Rostliny jsou bohatým zdrojem sekundárních metabolitů, které jsou hojně využívány v různých průmyslových odvětvích, například farmaceutickém, chemickém, kosmetickém a v mnoha dalších. Od roku 1980 byla prováděna řada studií, jak rychle a efektivně získávat tkáňovou kořenovou kulturu, která by produkovala velké množství sekundárních metabolitů, zejména alkaloidů. Pro genetické transformace byla použita bakterie *A.rhizogenes* a vzniklé tkáňové kořenové kultury byly poté pěstovány *in vitro* v bioreaktorech (Kamada *et al.*, 1986; Mano *et al.*, 1986). Od té doby byly úspěšně získány tkáňové kořenové kultury z více než sto druhů rostlin, včetně ohrožených druhů rostlin používaných pro lékařské účely (Georgiev *et al.*, 2007).

Biotechnologické odvětví využívá přírodní strategie *A.rhizogenes* pro transformaci tkáňových kořenových kultur. Přípravené explantáty (zraněné části rostlin) mohou být transformovány dvěma způsoby, buď přímou inokulací bakteriální suspenze nebo ko-kultivací v tekutém médiu s kulturou *A.rhizogenes*. V obou případech jsou explantáty nakonec přeneseny na pevné médium s antibiotiky. Jeden až čtyři týdny po transformaci začne rostlina produkovat první kořeny a následně se začnou objevovat laterální i adventivní kořeny. Po krátké adaptaci jsou „hairy root“ kultury schopné tvorby metabolitů (Sevon a Oskman-Caldentey, 2002), produkci semen nebo vzniku celé nové transgenní rostliny (Crane *et al.*, 2004; Obr. 13).

Bakterie *A.rhizogenes* našla své uplatnění také při testování nových promotorů, genů nebo při testování nových biologických systémů a procesů. Pro identifikaci transgenních „hairy root“ se často využívá fúze s reportérovými geny β -glukoronidasou (GUS) nebo se zeleným fluorescenčním proteinem (GFP). Spojení s reportérovými geny umožňuje snadno identifikovat kořeny exprimující T-DNA, ale také umožňuje snadnou subcelulární lokalizaci exprimujícího se genu (Collier *et al.*, 2005; Runo *et al.*, 2012).

V posledních letech byly vyvinuty nové techniky, které umožňují zvýšit úspěšnost transformace pomocí *A.rhizogenes*, jednou z těchto metod je sonifikace. Metoda využívá působení ultrazvukových vln k zvýšení inokulace rostlin touto baktérií. (Georgiev *et al.*, 2011).



Obr. 13: Dva možné způsoby přípravy „hairy root“ kultur z rostlinných explantátů. (Georgiev *et al.*, 2007).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 MATERIÁL

3.1.1 Přístrojové zařízení

Chemikálie pro přípravu medií a roztoků byly váženy na elektrických váhách PK – 352 (Denver Instrument, New York, USA) nebo pomocí analytických vah 5034/120, Nahita (AUXILAB S. L., Berian, Španělsko). Hodnota pH byla upravována s využitím pH - metru Eutechinstruments, Cyberscan (ThermoFisher SCIENTIFIC, Pardubice, ČR). Roztoky pro kultivaci médií, deionizovaná voda a instrumenty pro pasážování kořenů a kalusů byly sterilizovány autoklávem BMT (Sterivap 666-1ED, BMT Medical Technology, s.r.o., Brno). Pro práci za sterilních podmínek byl využit flow box Polaris 72, Steril (Schoeller INSTRUMENT, Praha, ČR). Rostlinný materiál byl rozdrcen pomocí oscilačního mlýnku MM 400 (Retsch, Praha, ČR). Pro přípravu konstruktů byly použity termocycler T–personal (Biometra, Goettingen, Německo), 96 Well Fast Thermal Cycler (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, ČR), termoblok MC-01-N (Major Science, Saratoga, USA), centrifuga pro stáčení vzorků Mikro200R, Hettich (Labor – Komplet, Praha, ČR), centrifuga (mini) Combi – spin, Biosan, FVL – 2400N (Aest Port, Praha, ČR), elektroporátor ECM399 (BTX, USA). Koncentrace nukleových kyselin byla měřena pomocí mikroobjemového UV/VIS spektrofotometru ACTene, NAS-99 (INYDIA, Madrid, Španělsko). Stanovení koncentrace proteinů a enzymové aktivity byly stanoveny měřením absorbancí na UV/VIS spektrofotometru 8453 Agilent (HPST, Praha, ČR). Stanovení exprese genu byla provedena pomocí Real–time PCR na termocycleru StepOnePlus, Applied Biosystems (Life Technologies, Praha, ČR). Pro detekci chemiluminiscenčního filmu bylo využito Lumi-film 100 NIF (Roche, USA).

3.1.2 Chemikálie, kity a biologický materiál

Chemikálie dodaly firmy Sigma-Aldrich (Praha, ČR), a Duchefa (BioTech, Praha, ČR), Lachner (Neratovice, ČR). Konstrukty byly nasyntetizovány firmou Life Technologies (Praha, ČR) a byly klonovány do buněk *E.coli* (kmen TOP10) a posléze transformovány do *Agrobacteria rhizogenes* (15834). Linearizovaný vektor byl přečištěn pomocí Wizard® SV gel and PCR clean-up systém od firmy Promega (Madison, USA).

Připravené konstrukty byly ověřeny sekvencí firmou SEQme (Dobříš, ČR). Plasmidová DNA byla izolována pomocí QIAprep Spin MiniprepKit (Quiagen). Genomová DNA z rostlinného materiálu byla izolována pomocí Mag MAXTM izolačního kitu (Life Technologies, Praha, ČR). Nanášecí pufr a DNA Ladder pro elektroforézu byly z firmy Fermentas. Pro izolaci RNA byl využit RNAqueous®Kit a TURBO DNA-freeTMKit pro odstranění kontaminující DNA (Life Technologies, Praha, ČR). Pro analýzu western blottingu byl využit chemiluminiscenční reagent SuperSignal®West Pico Chemiluminescent (Fischer Scientific, Pardubice, ČR). Pro rekombinaci byla použita LR klonasa II (Invitrogen) a k zastavení rekombinační reakce byla použita proteinasa K od téže firmy. Použité restriční endonukleasy byly od firem Fermentas, NEB nebo Takara a k nim dodané pufrы (Buffer R nebo 1). Použité standarty pro elektroforézu byly GeneRulerTM1kb DNA Ladder a GeneRulerTM1kb Plus DNA Ladder (Fermentas, Ontario, Kanada). Pro SDS-PAGE elektroforézu byl použitý marker PageRuler Unstained Protein Ladder (Thermo Scientific, Pardubice, ČR). Protilátky pro western blotting analýzu byly: primární anti-GFP (ab 290) Abcam; Velká Británie a sekundární Goat anti-rabbit Santa Cruz Biotechnology, USA. Pro vyvolávání filmu byl použitý chemiluminiscenční reagent SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate (Thermo Scientific, Pardubice, ČR). K detekci western blottingu byl dále použit lumi-film 100 NIF od firmy Roche (Praha, ČR). Bradfordové činidlo pro stanovení koncentrace proteinů (Precision Plus ProteinTM Standard, Bio-Rad, Vídeň, Rakousko). BSA pro měření kalibrační křivky při měření CKX aktivity byl od Acros Organics (Pardubice, ČR). Pro amplifikaci genů pomocí PCR byla použita Go Taq® G2 Flexi DNA polymerasa a Go Taq®G2 Flexi DNA pufr od firmy Promega Corporation (Madison, USA). Pro přípravu cDNA byla použita RevertAid H Minus M-MULV reverzní transkriptasa a její pufr od firmy Thermo Scientific (USA).

3.1.3 Pufry, gely, roztoky a média

Média, pufry pro transformaci a inkubaci kultur, složení v 1 litru

- LB médium: trypton (10 g), NaCl (5 g), kvasniční extrakt (5 g), pH = 7,2 (pomocí NaOH), sterilizace autoklávováním
- LB agar: trypton (10 g), NaCl (5 g), kvasniční extrakt (5 g), agar (w/v = 1,5 %), pH = 7,2 (pomocí NaOH), sterilizace autoklávováním

- SOC médium: trypton (w/v = 2 %), kvasničný extrakt (w/v = 0,5 %), NaCl (10 mM), sterilizace autoklávováním, poté byl přidán Mg²⁺ (20 mM), glukosa (20mM).

Roztoky pro agarosovou elektroforézu

- 10x PCR pufr: Tris (100 mM), KCl (500 mM), MgCl₂·6H₂O (20 mM), Triton X-100 (v/v = 0,1 %), pH = 9 (pomocí HCl)
- TAE pufr: Tris (70 mM), EDTA (1 mM), pH = 8 (pomocí CH₃COOH)
- Příprava agarosového gelu: agarosa (w/w = 1%) v 1x TAE pufru
- DNA – nanášecí pufr: bromfenolová modř (w/v = 0,05%), xylyencyanol FF modř (w/v = 0,05 %), SDS (w/v = 1 %), glycerol (v/v = 25 %).

Pufr pro izolaci genomové DNA (Edwards *et al.*, 1991)

- Extrakční pufr: Tris (200 mM), NaCl (250 mM), EDTA (25 mM), SDS (w/v = 0,5 %), pH = 7,5 (pomocí HCl).
- Lyzační pufr: složení ve 25 ml – NaCl (0,730 g), Tris/HCl (0,303 g), EDTA (0,470 g), NaHSO₃ (0,125 g), kyselina askorbová (0,025 g), merkaptoetanol (25 µl).

Médium pro transformaci rajčete, složení v 1 litru

- MSO médium: MS (basal salt; 4,3 g), sacharosa (30 g), pH = 5,8 (pomocí KOH), sterilizace autoklávováním, poté byly přidány Gamborg's B-5 vitamíny 1000x (1ml)
- ½ MSO agar: MS (basal salt; 2,3 g), sacharosa (30 g), pH = 5,8 (pomocí KOH), agar na rostliny (8 g), sterilizace autoklávováním, poté byly přidány Gamborg's B-5 vitamíny 1000x (1ml)
- DI agar: MS (basal salt; 4,3 g), sacharosa (30 g), pH = 5,8 (pomocí KOH), agar na rostliny (8 g), sterilizace autoklávováním, poté byly přidány Gamborg's B-5 vitamíny 1000x (1ml) a *trans*-zeatin, 45,6 µl (100 mM)
- MG/L agar: kvasničný extrakt (2,5 g), trypton (5 g), manitol (5 g), L-glutamová kyselina (1 g), KH₂PO₄ (0,25 g), NaCl (0,1 g), MgSO₄·7 H₂O (0,1 g), pH = 7,2 (pomocí NaOH), agar na rostliny (15 g), sterilizace autoklávováním, poté byl přidán biotin (10 µl)

- Gamborg`s B-5 agar: Gamborg`s B-5 základní medium s minimálním množstvím organických látek (3.2 g), sacharosa (20 g), pH = 5,7 (pomocí KOH), agar na rostliny (8 g), sterilizace autoklávováním, poté byly přidány Gamborg`s B-5 vitamíny 1000x (1ml)

Před rozlitím na misky byly do Gamborg`s B-5 agaru přidány antibiotika timentin 1000x (250 mg·l⁻¹), hygromycin B 1000x (50 mg·l⁻¹) a fosfinotricin 1000x (3 mg·l⁻¹).

Média pro transformaci kalusů ječmene, složení v 1 litru

- MG/L médium: kvasničný extrakt (2,5 g), trypton (5 g), manitol (5 g), L-glutamová kyselina (1 g), KH₂PO₄ (0,25 g), NaCl (0,1 g), MgSO₄·7H₂O (0,1 g), pH = 7,2 (pomocí NaOH), sterilizace autoklávováním, poté byl přidán biotin (0,1 mg·ml⁻¹, 10 µl)
- Kalus indukující médium (CIM): fytigel (3,5 g), Murashige a Skoog (plant salt base) M0221 (4,3 g), kasein hydrolysat (1 g), maltosa (30 g), pH = 5,8 (pomocí HCl), 100 x kalus indukující vitamíny obsahující: tiamin HCl (100 mg·l⁻¹), myo-inositol (35 g·l⁻¹), prolin (69 g·l⁻¹). Dicamba (2,5 mg·l⁻¹), (2S,4S)-(-)-4-difenylfosfino-2-(difenylfosfinometyl)pyrolidin (PPM; 500 µl)
- Tranzitní médium (TZ) 1: fytigel (3,5 g), MS médium bez NH₄NO₃ M0238 (2,70 g), NH₄NO₃ (0,165 g), glutamin (0,750 g), maltosa (10 g), sacharosa (20 g), pH = 5,8 (pomocí NaOH), 100 x tranzitní vitamíny obsahující: tiamin HCl (40 mg·l⁻¹), myo-inositol (10 g·l⁻¹). CuSO₄·5 H₂O, timentin (160 mg·l⁻¹), hygromycin B (50 mg·l⁻¹), *cis*-zeatin (0,2 mg·l⁻¹), NAA (0,4 mg·l⁻¹)
Tranzitní médium (TZ) 2: fytigel (3,5 g), MS médium bez NH₄NO₃ M0238 (2,70 g), NH₄NO₃ (0,165 g), glutamin (0,750 g), maltosa (20 g), pH = 5,8 (pomocí NaOH), 100 x tranzitní vitamíny, CuSO₄·5 H₂O, timentin (160 mg·l⁻¹), hygromycin B (50 mg·l⁻¹), *cis*-zeatin (0,2 mg·l⁻¹), NAA (0,4 mg·l⁻¹)
Tranzitní médium (TZ) 3: fytigel (3,5 g), MS médium bez NH₄NO₃ M0238 (2,70 g), NH₄NO₃ (0,165 g), glutamin (0,750 g), maltosa (20 g), pH = 5,8 (pomocí NaOH), 100 x FWG vitamíny, CuSO₄·5 H₂O, timentin (160 mg·l⁻¹), hygromycin B (50 mg·l⁻¹), NAA (0,4 mg·l⁻¹)

Tranzitní médium (TZ) 4: fytigel (3,5 g), MS médium bez NH_4NO_3 M0238 (2,70 g), NH_4NO_3 (0,165 g), glutamin (0,750 g), maltosa (20 g), pH = 5,8 (pomocí NaOH), 100 x tranzitní vitamíny, $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$, timentin ($160 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), fosfinitricin ($3 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), *cis*-zeatin ($0,2 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$), NAA ($0,4 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

- MS médium: Murashige a Skoog médium s vitamíny M00222.0050 (4,33 g), sacharosa (10 g), MES (0,5 g), agar na rostliny (8 g), pH = 5,7 (pomocí KOH), sterilizace autoklávováním poté přidat timentin ($160 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$) a hygromycin ($25 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$).

Pufr pro izolaci proteinů

- RIPA extrakční pufr: Tris (20 mM), NaCl (300 mM), EDTA (1 mM), Triton x - 100 (v/v = 0,3 %), poté byl přidán protease inhibitor cocktail (EDTA - free, Roche, cat.no 04693132001).

Pufry, gely, roztoky pro SDS-PAGE elektroforézu:

- elektroforetický pufr: Tris/HCl (0,025 M), glycin (0,192 M), pH = 8,3
- pufr pro separační gel: Tris/HCl (2,25 M), pH = 9,2
- pufr zaostřovací gel: Tris/HCl (0,75 M), pH = 6,8
- roztok akrylamidu-bisakrylamidu: bisakrylamid (w/v = 0,8 %), akrylamid (w/v = 30%)
- roztok dodecylsulfátu sodného: SDS ve vodě (w/v = 10 %)
- roztok persíranu amonného: APS ve vodě (w/v = 20 %, $100 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$)
- separační (running) gel - pro přípravu 1 gelu (10x10 cm): roztok akrylamidu-bisakrylamidu (2,5 ml), pufr pro separační gel (1,25 ml), deionizovaná voda (3,63 ml), roztok SDS ($0,075 \text{ ml}$), N, N, N', N'-tetramethyldiamin (TEMED, $0,0075 \text{ ml}$), roztok APS ($0,375 \text{ ml}$)
- zaostřovací (stacking) gel - pro přípravu 1 gelu (10x10 cm): roztok akrylamidu-bisakrylamidu (1 ml), pufr pro zaostřovací gel (1,25 ml), deionizovaná voda (5,13 ml), roztok SDS ($0,075 \text{ ml}$), TEMED ($0,0075 \text{ ml}$), roztok APS ($0,0375 \text{ ml}$).

Pufry pro western blotting:

- transferový pufr: Tris/HCl (0,2 M), glycin (1,2 M), pH = 8,5
- blotovací pufr: transferový pufr (v/v = 12,5 %), metanol (v/v = 20 %), neionizovaná voda (v/v = 50 %)
- promývací pufr TBS: Tris/HCl (20 mM), NaCl (500 mM), pH = 7,5
- promývací pufr Twee-TBS: Tris/HCl (20 mM), NaCl (500 mM), Tween 20
- blokovací pufr: sušené mléko (w/v = 5 %) v pufru Tween-TBS.
- pufr s primární nebo sekundární protilátkou: sušené mléko (w/v = 1 %) v pufru Tween-TBS.

Roztoky pro odbarvení a obarvení SDS – PAGE gelu:

- barvicí roztok: Comassie Brilliant Blue R250 (w/v = 0,025 %), metanol (v/v = 50%), kyselina octová (v/v = 10 %), deionizovaná voda
- odbarvovací roztok: metanol (v/v = 40 %), kyselina octová (v/v = 10 %).

Roztok pro odbarvení PVDF membrány:

- barvicí roztok: amidočern (w/v = 0,5 %), kyselina octová (v/v = 7 %).

3.2 METODY

3.2.1 Transformace bakterií elektroporací

Na elektroporaci byly použity elektrokompetentní buňky *E.coli* (TOP 10); *A.tumefaciens* (AGL1) and *A.rhizogenes* (15834). 1 μ l připravené ligační anebo rekombinantní směsi byl smíchán s 50 μ l elektrokompetentních buněk a směs byla napipetovaná do předem vychlazených elektroporačních kyvet. Kyvety byly vloženy do elektroporačního přístroje a byla provedena elektroporace při 1800 V po dobu 5 ms. Bezprostředně bylo k buňkám přidáno 300 μ l SOC média (*E.coli*) anebo 300 μ l MGL média (*Agrobacterium*) a směs byla inkubována při 37°C/1hodinu (*E.coli*) anebo 28°C/3hodiny (*Agrobacterium*). Poté byly bakterie inokulované na misky s LB médiem (*E.coli*) nebo na MGL médiu (*Agrobacterium*) obsahujícím příslušné antibiotikum.

3.2.2 Kultivace bakterií a příprava glycerolových stoků

Veškeré práce s bakteriemi byly prováděny v prostoru laminárního boxu. Pro inokulace bakterií byla používána LB média a MGL média (tekutá nebo pevná) s příslušným antibiotikem v závislosti na vektoru, který bakterie obsahovaly (ampicilin, kanamycin, hygromycin). Transformované buňky byly po inkubaci rozetřeny na misky s LB agarem pomocí sterilní hokejky a misky byly inkubovány při 37°C/1 den (*E.coli*) anebo při 28°C/2 dny (*Agrobacterium*). Jednotlivé kolonie byly následně preočkovány do tekutého LB/MGL média s antibiotikem pomocí dřevěných párátek a inkubovány 1 den (*E.coli*), případně 2 dny (*Agrobacterium*) na třepačce při 180 rpm. Všechny kultury určené k uschování byly smíchány v poměru 1:1 s 50 % glycerolem a následně uschovány v mrazicím boxu (-80°C). Kultury určené k transformaci kalusů byly smíchány v poměru 1:1 s 30% glycerolem a uschovány v mrazicím boxu (-80 °C).

3.2.3 Izolace plasmidové DNA z bakterií *E.coli*

Na izolaci plasmidové DNA bylo použito 5ml čerstvě připravené kultury kultivované přes noc. Plasmidová DNA byla izolována pomocí kitu QIAprep Spin podle návodu doporučeného výrobcem. DNA byla eluována z kolonek 50 µl EB pufru.

3.2.4 Restrikce DNA

Restrikce byla nastavena v celkovém objemu 20 µl, inkubace probíhala přes noc při 37°C. Restrikční směs obsahovala:

1. 2,0 µl 10 x pufru (vhodný pro danou restrikci)
2. 0,3 µl restrikční endonukleasy (33-66 U/µl)
3. 1-10 µl izolované DNA (aby byla koncentrace 600 – 800 ng)
4. voda (doplnění do objemu 20 µl)

3.2.5 Agarosová elektroforéza

Na elektroforézu byla používána 1% agarosa v 1 x TAE pufru, do které byl přidán 0,01% etidium bromid. Elektroforéza probíhala v horizontální komoře při 120 V, 20 – 30 minut. Vzorky byly před nanesením na gel smíchány s 6x nanášecím puftrem.

Gely byly vizualizovány pomocí UV transluminátoru a následně vyfocené pomocí digitálního fotoaparátu a počítačově zpracovány programem Alpha DigiDoc RT (East Port Scientific, Praha, ČR).

3.2.6 Purifikace DNA fragmentů z agarosového gelu

Fragmenty o požadované velikosti byly vyříznuty z gelu pomocí sterilního skalpelu a přeneseny do sterilní Eppendorf zkumavky. DNA byla přečištěna pomocí Wizard® SV Gel and PCR Clean-up Systémů (podle doporučeného návodu výrobcem a DNA byla eluována 20 μ L sterilní vody bez nukleas.

3.2.7 LR rekombinace

Rekombinační směs obsahovala:

1. Cílový vektor pGWB1 (150 ng) – 1-7 μ l
2. Vstupní vektor – *RSP::HvCKX3-GFP* nebo *HvCKX3::HvCKX2.2-GFP* (30 ng) - 1 μ l
3. TE pufr (doplnění do finálního objemu)

Celkový objem rekombinační směsi byl 8 μ l, následovala 5 minutová inkubace při 45 °C a poté byly přidány 2 μ l LR Klonasy II. Inkubace probíhala přes noc při 25 °C a reakce byla zastavena 1 μ l proteinasi K a inkubací při 37°C, 10 minut.

3.2.8 Transformace rajčete

3.2.8.1 Příprava děložních lístků

Semena rajčete byla sterilizována 1 minutu v 70% etanolu; 5 minut v 3,5% chlornanu sodném a 5 krát promyta sterilní vodou. Sterilní semena byla rozmístněna na misky s ½ MSO agarem, misky byly utěsněny parafilmem, zabalené do alobalu a inkubovány v lednici 7 dní pro překonání dormance. Sedmidenní lístky byly ostříhány do tekutého MSO media, jejich horní strana byla poraněna a lístky byly umístěny na filtrační papír s D1 agarem. Po utěsnění misek probíhala inkubace v klimakomoře 1-2 dny při 24 °C, při osvětlení 1000-1500 lux.

3.2.8.2 Příprava kultury *A.rhizogenes*

Na přípravu kultury byly použity zamražené glycerolové stoky *A.rhizogenes* nesoucí konstrukty (*RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* a *SU::GFP*), které byly křížovým roztěrem rozetřeny na misky s MGL médiem s příslušným antibiotikem a inkubovány při 28°C/2 dny. Jednotlivé kolonie byly poté přeočkovány do tekutého MGL média s antibiotikem a inkubovány při 28°C/2 dny za stálého třepání při 220 rpm. Po dvoudenní inkubaci byly kultury centrifugovány při 5 000 g, 5 minut, při pokojové teplotě. Pelet byl 3 x promyt v MSO mediu a resuspendován 10 ml MSO média.

3.2.8.3 Ověření plasmidu v *A. rhizogenes*

Plasmid nebo rekombinační směs elektroporované do bakterií *E. coli* (TOP 10) byly kultivované na LB médiu (pevném/tekutém) s antibiotiky 1 den, při 37°C a následně byla izolována plasmidová DNA. Pro transformaci do bakterií *A.rhizogenes* (15834) byl použitý 1 µl vyizolované plasmidové DNA a bakterie byly kultivovány na MGL médiu s antibiotiky (pevném/tekutém) 2 dny, při 28°C. Pro ověření správného transformačního postupu do *A.rhizogenes* byla provedena zpětná transformace vyizolovaného plasmidu do bakterie *E.coli* a po kultivaci bakterií byla opět izolována plasmidová DNA, která byla podrobena restriční analýze.

3.2.8.4 Transformace děložních lístků

Do buněčné suspenze určené k transformaci bylo přidáno 50 µl acetosyringonu (0,074 M). Děložní lístky byly inkubovány 10 minut s buněčnou suspenzí a poté byly přeneseny na D1 agar (orientovány horní stranou dolů). Inkubace probíhala v klimakomoře po dobu 2 dnů, při 24°C a při osvětlení 1000-1500 lux.

3.2.8.5 Selektce transgenních kořenů

Dva dny po transformaci byly lístky umístěny na misky s Gamborg's B-5 agarem a timentinem (bez selekčního tlaku). Po týdnu byly lístky umístěny na stejné médium, ale obsahující také antibiotika. Inkubace probíhala v klimakomoře při 24 °C s fotoperiodou 14 hodin světla (1000-1500 lux) a 10 hodin tmy. Po osmi dnech se začaly na listech objevovat první kořeny, kultivace probíhala do délky kořene cca 1 cm. Po čtrnácti dnech byly kořeny pozorovány pod fluorescenční lupou a kořeny exprimující fúzní protein s GFP byly odděleny od děložního lístku a byly schopné samotného růstu.

3.2.9 Transformace kalusů ječmene

3.2.9.1 Izolace embryí

Všechny rostliny ječmene kultivaru Golden Promise byly pěstovány v místnosti s kontrolovanými podmínkami, při teplotě 15°C (během dne) a 12°C (během noci). Relativní vlhkost vzduchu byla 80% a hladina osvětlení 500 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, která byla udržována pomocí halogenových výbojek (HQI) s wolframovými žárovkami. Nezralé klasy, obsahující embrya o velikosti 1.5 mm, byly odstříženy a zrna byla oddělena od klasu, aniž by byla poraněna. Nezralá zrna byla sterilizována promytím v 70% etanolu (30 sekund), 3 x promytím sterilní vodou, poté promytím v 5% roztoku hypochloridu sodného (4 minuty) a nakonec 3 x promytím sterilní vodou (poslední dva kroky probíhaly v laminárním boxu). Poté byla ze zrn izolována nezralá embrya pomocí stereoskopu (Obr. 14). Vyizolovaná embrya bez embryonální osy byla umístěna na CIM bez antibiotik, misky byly utěsněny mikroporózní papírovou páskou a inkubovány 12 dní v klimakomoře při 24 °C a ve tmě.



Obr. 14: (A) Ječmenný klas vhodný k izolaci; (B) ječmenné zrnو obsahující embryo; (C) vyizolované nezralé embryo; (D) Embryo zbavené embryonální osy (Harwood *et al.*, 2009).

3.2.9.2 Příprava kultury *A. rhizogenesa* transformace kalusů

Na přípravu kultury byly použity zamražené glycerolové stoky *A. rhizogenesa* obsahující konstrukty (*RSP::HvCK3-GFP* a *SU::GFP*), které byly křížovým roztěrem rozetřeny na misky s MGL médiem s příslušným antibiotikem a inkubovány při 28°C/2 dny. Jednotlivé kolonie byly poté přeočkovány do tekutého MGL média s antibiotikem a inkubovány při 28°C/2 dny za stálého třepání při 220 rpm. Na transformaci byly použity dvanáctidenní kalusy. Polovina kalusu byla ponořena do falkony s připravenou

kulturou *A.rhizogenes* (obsahující acetosyringon o finální koncentraci 200 μM) a byla sonifikována 15 sekund. Druhá polovina kalusů byla ponořená do stejné kultury (obsahující acetosyringon o finální koncentraci 200 μM) bez využití sonifikace. Po transformaci byly kalusy inkubovány 3 dny ve tmě, při 24°C na CIM bez antibiotik s 200 μM acetosyringonem. Po třech dnech byly transformované kalusy přeneseny na 4 různé tranzitní média (viz sekce 3.1.3) s timentinem (160 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) bez antibiotik a kultivovány ve tmě při 24°C. Po týdnu byly transformované kalusy přeneseny na TZ se selekční tlakem (hygromycin 50 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$ anebo fosfinitricin 3 $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$). Kalusy byly každé dva týdny pasážovány na čerstvé medium, zhruba po 10 dnech začaly růst první kořeny.

3.2.10 Příprava rostlinných médií

Fytigel byl připravován ve 2 krát větší koncentraci, než bylo požadováno a autoklávován odděleně od média. Všechny média pro kultivaci kalusů byla sterilizována filtrací, kde médium obsahovalo všechny složky ve 2 krát větší koncentraci. Po úpravě pH bylo médium filtrováno přes jednorázový Filter 150 ml (Techno Plastic Products AG, Švýcarsko) a všechny sterilní stoky (antibiotika a vitamíny) byly před uschováním také sterilizovány přes filtr Disposable Gelatin Filters 17528-80-BZD (Sartorius, Německo). Jak 2x fytigel, tak i 2x médium byly předeřhřány na 60°C v inkubátoru a před smícháním byly k médiu přidány vitamíny, hormony a antibiotika. Fytigel byl s připraveným médiem smíchán v poměru 1:1 tak, aby dával správnou koncentraci a nakonec bylo médium rozlito na Petriho misky (Gama Group, ČR) nebo v případě regeneračního média byly využity hlubší Petriho misky (100 x 15mm, Iwaki, USA; Harwood *et al.*, 2009).

3.2.11 Transformace embryí ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Na transformaci ječmene byl použit kultivar Golden Promise, stejně jako je popsáno v sekci 3.8.6. Vyizolovaná nezralá embrya ječmene zbavená embryonální osy byla transformována kulturou *A. tumefaciens* obsahující binární vektor pBract209 s *RSP::HvCKX3-GFP*. Celý proces transformace, následné kultivace a regenerace kalusů byly provedeny dle protokolu Barlett (2008). Konstrukty připravili a

transformaci provedli Mgr. Katarína Mrízová, Mgr. Edita Holásková a Mehmet Tufan Öz, Ph.D (Oddělení molekulární biologie).

3.2.12 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována pomocí metody popsané v Edwards *et al.* (1991) a také pomocí MagMAXTM izolačního kitu. Rostlinný materiál (listy, kořeny a kalusy) byl rozdrcen pomocí oscilačního mlýnku při 27 Hz/2,5 minuty. Na izolaci pomocí MagMAXTM izolačního kitu i izolaci dle Edwards *et al.* (1991) se používal materiál zamražený okamžitě po odebrání na -80°C. Při použití metody MagMAXTM pomocí izolačního kitu byl k homogenizovanému vzorku přidán 1 ml lyzačního pufru (předeřtý na 65 °C), následovala inkubace při 65°C/45 minut a centrifugace 10 000 rpm, 5 minut, při pokojové teplotě. Ke 100 µl lyzátu byly přidány 3 µl magnetických kuliček a 70 µl 100% isopropanolu. Po pětiminutové inkubaci byly vzorky umístěny na magnet (5 minut) a supernatant byl následně odstraněn. DNA zachycená na magnetických kuličkách byla 3 x promyta přídávkem 150 µl 70% EtOH. Po odstranění veškerého supernatantu byly vzorky vysušeny (10 minut) a genomová DNA zachycená na magnetických kuličkách byla eluována 40 µl sterilní vody bez nukleas. Při použití metody dle návodu Edwards *et al.* (1991) bylo k rozdrcenému vzorku přidáno 400 µl extrakčního pufru. Směs byla inkubována 1 hodinu a poté byla centrifugována při 13 000 rpm, 1 minutu, při laboratorní teplotě. K 300 µl supernatantu bylo přidáno 300 µl isopropanolu a po dvouminutové inkubaci následovala centrifugace při 13 000 rpm, 5 minut, při laboratorní teplotě. Pelet byl resuspendován ve 100 µl 1x TE pufru.

3.2.13 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Složení reakční směsi:

1. 4,0 µl Go Taq® Flexi pufr
2. 2,0 µl MgCl₂(25 mM)
3. 0,5 µl dNTP (10 mM)
4. 0,5 µl primer fw (10 mM)
5. 0,5 µl primer rev (10 mM)

6. 1,0 – 3,0 µl templátu (40 – 50 ng)
 7. 0,1 µl Go Taq® DNA polymerasa
- Sterilní voda bez nukleas; do 20 µl

Tab. 1: Teplotní průběh PCR reakce.

Krok	Teplota	Čas	Opakování
1. Počáteční denaturace	95 °C	2 min	1
2. Denaturace	95 °C	30 s	
3. Annealing	56 °C	45 s	35
4. Extenze	72 °C	2 min	
5. Závěrečná extenze	72 °C	5 min	1
6. Chlazení	4 °C	5 min	

Tab. 2: Sekvence primerů použitých při amplifikaci genů RSP::*HvCK3-GFP*, p*HvCKX3::HvCKX22-GFP*.

Název	Nukleotidová sekvence
Prom RSP forward primer	5` AAA TTG TAG GCG CAA CAA CC 3`
<i>HvCKX3 gen</i> reverse primer	5` GCT TGC ATA AAC CCC AGT GT 3`
Prom <i>HvCKX3</i> forward primer	5` TGA CAG CTT CGC CCT TTA GT 3`
<i>HvCKX 2.2 gen</i> reverse primer	5` CCC TCA AGG CAG TAG AGC AC 3`
<i>GFP gen</i> forward primer	5` GAA TTA GGT GAT GTT AAT GG 3`
GFP gen reverse primer	5` CCA TGC CAT GTG TAA TCC C 3`

3.2.14 Izolace RNA

Rostlinný materiál na izolaci RNA byl okamžitě po odběru zamražen a uschován pro izolaci RNA na -80°C. RNA byla izolována pomocí RNAqueous®Kitu. Zamražený rostlinný materiál byl rozdrcen pomocí oscilačního mlýnku (27 Hz/2,5 minuty) a izolace byla provedena podle návodu doporučeného výrobcem. RNA zachycená na filtru kolonek byla eluována 90 µl elučního roztoku (předehřátého na 80 °C). Pro odstranění kontaminující frakce DNA z vyizolované RNA byl použit TURBO DNA-free™Kit. Vzorky RNA byly 2x ošetřeny TURBO DNAsou 45 minut (3µl a 2µl). Po inkubaci byly vzorky precipitovány přídatkem LiCl (polovina celkového objemu směsi) a inkubovány

při -20°C/30 minut. Poté byly vzorky centrifugovány při 20 000 rpm/20 minut, při 4°C. Vzniklý pelet byl promyt přidavkem 500 µl 70% etanolu a vzorky byly opětovně centrifugovány při 20 000 rpm/5 minut. Pelet byl resuspendován ve 20 µl sterilní vody bez nukleas.

3.2.15 Příprava cDNA

Pro přepis RNA do cDNA byla použita RevertAid H Minus reverzní transkriptasa. K 2 µg vzorku RNA v celkovém objemu 12 µl byl přidán 1µl oligo (dT) primeru (100 µM) a směs byla inkubována při 70°C/5 minut. Poté byly přidány 4 µl pufru pro reverzní transkriptasu (5x koncentrovaný), 2 µl dNTPs (10 mM) a směs byla inkubována při 37°C/5 minut. Nakonec byl přidán 1 µl reverzní transkriptasy a směs byla inkubována při 42°C/90 minut. Reakce byla zastavena při 70°C/10 minut. K připravené cDNA bylo přidáno 80 µl EB pufru.

3.2.16 Real – time PCR

Na real-time PCR (RT-PCR) byly použity 96 - jamkové desky. Nejprve byla připravena směs primeru, a to následovně: 100 µl vody bez nukleas; 1,3 µl forward primeru a 1,3 µl reverse primeru. V případě TaqMan® mixu byl do směsi primeru přidán též 1µl próby. Vlastní PCR reakce obsahovala: 2,5 µl cDNA; 2,5 µl směsi primeru a 5 µl SYBR® Green. Sekvence použitých primerů pro RT-PCR jsou uvedeny v tabulkách 4-6. Získaná data byla vyhodnocena pomocí softwaru StepOnePlus v 2.3 (Applied Biosystems).

Tab 3: Teplotní průběh obou RT-PCR (SYBR® Green Power PCR i TaqMan® PCR) byl stejný.

	Krok	Teplota	Čas	Opakování
1.	Počáteční denaturace	95 °C	10 m	1
2.	Denaturace	95 °C	15 s	
3.	Annealing	60 °C	1 m	39

Tab. 4: Sekvence primerů použitých pro relativní kvantifikaci transgenů rajčete.

Název		Nukleotidová sekvence
<i>qEF1</i>	forward primer	5` CCC AAG AGG CCA TCA GAC AA 3`
	reverse primer	5` CCA CAG GGA CAG TTC CAA TAC CA 3`
<i>qUBQ</i>	forward primer	5` TTC CTT CAG ACC AGC AGA GGT TGA 3`
	reverse primer	5` TTT GCA TAC CAC CAC GTA GAC GGA 3`
<i>HvCKX3</i>	forward primer	5` GGG CCA GGC CAA GGC CAA GGT ATA TT 3`
	reverse primer	5` ATG CTG TCA GCT TGC ATA AAC C 3`
<i>HvCKX2.2</i>	forward primer	5` CCCGTGGTCAGAGAATTTTCA 3`
	reverse primer	5` GGGCCAATCGATTAACCTTCGT 3`
<i>HYG</i>	forward primer	5` CGA GGT CGC CAA CAT CTT CTT CT 3`
	reverse primer	5` GCG TCT GCT GCT CCA TAC AA 3`

qEF1 – gen kódující elongační faktor rajčete

qUBQ – gen kódující ubikvitin

HvCKX3 – gen kódující ječmennou cytokinindehydrogenasu 3

HvCKX2.2 – gen kódující ječmennou cytokinindehydrogenasu 2.2

HYG – gen rezistence na hygromycin

Tab. 5: Sekvence primerů použitých pro analýzu SYBR® Green Power PCR.

Název		Nukleotidová sekvence
<i>HvEF2</i>	forward primer	5` CCG CAC TGT CAT GAG CAA GT 3`
	reverse primer	5` GGG CGA GCT TCG ATG TAA AG 3`
<i>HvACT</i>	forward primer	5` TTG ACC TCC AAA GGA AGC TAT TCT 3`
	reverse primer	5` GGT GCA CCT GCT GTT GA 3`
<i>RSP</i>	forward primer	5` GTA CCT ACA ATA AGC TCT GGT TGA ACC3`
	reverse primer	5` GTG AGC TCA CAC ACA TGC ACA AGT G 3`
<i>HvCKX3</i>	forward primer	5` GGG CCA GGC CAA GGC CAA GGT ATA TT 3`
	reverse primer	5` ATG CTG TCA GCT TGC ATA AAC C 3`

HvEF2 – gen kódující ječmenný elongační faktor

HvACT – gen kódující ječmenný aktin

RSP – gen kódující nativní kořenově specifický promotor

HvCKX3 – gen kódující ječmennou cytokinindehydrogenasu 3

Tab. 6: Sekvence primerů použitých pro analýzu TaqMan®PCR.

Název		Nukleotidová sekvence
HvEF2	forward primer	5` AAG TCC TGC CGC ACT GTC AT 3`
	reverse primer	5` GGG CGA GCT TCG ATG TAA AG 3`
	próba	5` AGC AAG TCC CCC AAC AAG CAT AAT CG 3`
HvACT	forward primer	5` GT TGA CCT CCA AAG GAA GCT ATT 3`
	reverse primer	5` GGT GCA AGA CCT GCT GTT GA 3`
	próba	5` TGT AGT ATT CTG CTT GGT GGC ACA GC 3`
GFP	forward primer	5` CTG CTG CCC GAC AAC CA 3`
	reverse primer	5` GT GAT CGC GCT TCT GCT TA 3`
	próba	5` TAC CTG AGC ACC CAG TG 3`
HYG	forward primer	5` CGC GCT CCC GAT TCC 3`
	reverse primer	5` GGT CAG GCT CTC GCT GAA TT 3`
	próba	5` AAG TGC TTG TTG ACA TTG GG 3`

HvEF2 – gen kódující ječmenný elongační faktor

HvACT – gen kódující ječmenný aktin

GFP – gen kódující GFP protein

HYG – gen rezistence na hygromycin

3.2.17 Izolace proteinů

Rostlinný materiál z kořenů rajčete byl okamžitě po odebrání zamražen na -80°C. Odebrané vzorky byly rozdrčeny pomocí oscilačního mlýnku (27 Hz/2,5 minuty) na jemný prášek. K 1 g vzorku bylo přidáno ekvivalentní množství RIPA extrakčního pufru a vzorky byly inkubovány 1 hodinu na ledu a průběžně vortexovány. Poté byly vzorky centrifugovány při 20 000 rpm/20 minut, při 4°C. Veškeré práce s proteiny probíhaly na ledu.

3.2.18 Měření koncentrace proteinů metodou Bradfordové

Vzorky na měření koncentrace proteinů byly připraveny následovně: k 1 ml Bradfordova činidla (naředěného s vodou v poměru 1:4) bylo přidáno 1-10 µl proteinového extraktu a vzorky byly inkubovány 5 min při pokojové teplotě (vzorky se zabarvily domodra). Následně byla změřená absorbance při vlnové délce 595 nm.

Stejným způsobem byly připraveny a změřeny vzorky standardů BSA (o koncentraci $2 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $3 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, $5 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ a $10 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$). Ze změřených absorbancí standardů byla sestavená kalibrační křivka, která sloužila k výpočtu neznámých koncentrací proteinů ve vzorcích.

3.2.19 Měření specifické enzymové aktivity CKX

Reakční směs na měření CKX enzymové aktivity obsahovala:

300 μL 100 mM McIvainov pufr pH 7,5

40 μl 10 mM 2,6-dichlorofenol-indofenol (elektronový akceptor)

20-100 μl proteinového extraktu

10 μl 10mM izopenetenyadeninu (substrát)

Ke každému vzorku byl připraven slepý vzorek o stejném složení jako vzorek, avšak namísto substrátu bylo přidáno 10 μl DMSO. Vzorky byly inkubovány přes noc při 37°C . Reakce byla ukončena přidavkem 300 μl kyseliny trichloroctové (TCA) a 200 μl 2% p-aminofenolu v 6% TCA. Vzorky byly centrifugovány 5 minut při 14000 rpm, při laboratorní teplotě, a následně byla měřena absorbance při vlnové délce 352 nm. Z naměřených dat byla spočítána specifická enzymová aktivita v jednotkách $\text{kat}\cdot\text{mg}^{-1}$ podle rovnice: $a = \frac{[(A_{352} \times \frac{V}{e} \times t) \times V_2]}{c}$, kde A_{352} je absorbance při 352 nm, V je objem v litrech, e je extinkční molární koeficient produktu při $\alpha = 352 \text{ nm}$ ($15\,150 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$), t je doba inkubace při 37°C v sekundách, V_2 je ředění proteinového extraktu a c je koncentrace proteinů v $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Frébort et al., 2002)

3.2.20 SDS-PAGE elektroforéza podle Laemmliho

Na SDS-PAGE elektroforézu bylo použito 100 μg proteinového extraktu v celkovém objemu 15 μl . Do vzorků bylo přidáno 5 μl barvicího pufru a směs byla povařena 10 minut na 95°C . Byla sestavena elektroforetická aparatura, do které byl nejprve nalit separační gel, který byl převrstven tenkou vrstvou 100% butanolu. Po ztuhnutí byl gel převrstven zaostřovacím gelem, do kterého byl vsazen hřebínek. Po ztuhnutí byl připravený gel vložen do elektroforézní vany a zalit elektroforetickým pufrům.

Hřebínek byl vytažen a do jamek byly nanášeny připravené vzorky. Separace proteinů probíhala nejprve při 25 V/20 minut a poté při 60 V/60 minut. Na detekci velikosti proteinu byl použit marker PageRuler Unstained Protein Ladder.

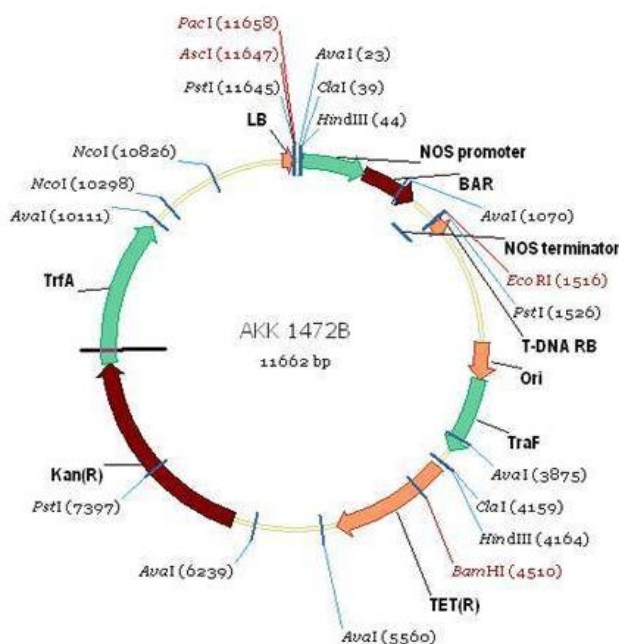
3.2.21 Western blotting (WB)

Po elektroforetické separaci byly proteiny přeneseny na 0,45 μm polyvinylidenfluoridovou membránu (PVDF, Milipore). Pro přenos byl sestaven tzv. „sandwich“, a to následovně: porózní podložka, filtrační papír (oba namočené do blotovacího pufru), gel se separovanými proteiny, PVDF membrána (ustřižená na velikost membrány a aktivovaná 1 minutu ve 100% mentanolu), filtrační papír a nakonec porózní podložka (opět obě namočené v blotovacím pufru). Sestavený „sandwich“ byl vložen do elektroforetické komory, která obsahovala též nádobu s ledem. Přenos byl nastaven na 20 V/24 hodin následovaný 1 hodinou při 100 V. Po přenosu byla membrána blokována 1 hodinu v roztoku 5% sušeného mléka v TBS-T pufru (w/v). Poté následovala hodinová inkubace s primární protilátkou v roztoku 1% mléka v TBS-T pufru (anti-GFP protilátka ředěná 1:1000). Membrána byla následně promyta 1x 5 min v TBS-T pufru, 2x 5 minut v TBS pufru a poté inkubována 1 hodinu se sekundární protilátkou v roztoku 1% mléka v TBS-T pufru (goat anti-rabbit protilátka ředěná 1:5000). Poté byla membrána promyta 1x 10 minut v TBS-T pufru a 2 x 10 minut v TBS pufru. Po posledním promytí byla membrána převrstvena 2 ml chemiluminiscenčního reagentu (Thermo ScientificTM SuperSignalTM West Dura substrát a AmershamTM ECL Prime substrát; v poměru 1:1), zabalena do fólie a vložena do kazety určené k detekci. V temné místnosti byl na membránu přiložen film pro chemiluminiscenční detekci (lumi-film 100 NIF) po dobu 5 – 20 min, v závislosti na intenzitě signálu.

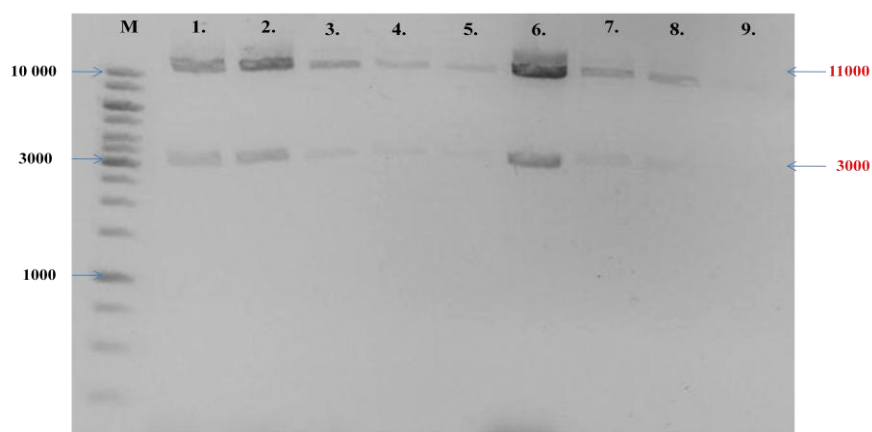
4 VÝSLEDKY

4.1 Příprava konstruktů *SU::GFP* v *A. rhizogenes*

Plasmid AKK 1472B-*SU::GFP* poskytnutý Mgr. Máriou Šmehilovou, Ph.D (Šmehilová *et al.*, 2009), byl transformován elektroporací do bakterií *A. rhizogenes* (15834). Plasmid obsahoval *GFP* gen pod kontrolou konstitutivního superubikvitinového promotoru z kukuřice ve vektoru AKK 1472B (obr. 15). Bakterie byly kultivovány na selekčních mediích, které obsahovaly kanamycin (100 mg.l⁻¹). Pro ověření úspěšné transformace plasmidu do *Agrobacteria* byl ze tří kolonií vyizolován plasmid, který byl transformován do *E. coli*. Po kultivaci byly z každé misky vybrány 3 kolonie, u kterých byla přítomnost plasmidu ověřena restrikcí. Pro restrikci byla použita restrikční endonukleasa *PacI*, která měla tento plasmid rozštěpit na dva fragmenty: 3 kbp, odpovídající velikosti promotoru s *GFP* genem a 11 kbp, odpovídající velikosti plasmidu AKK 1472B. Restrikční směsi byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy (Obr. 16). Osm nastavených reakcí z devíti bylo pozitivních. Byly vybrány 3 pozitivní kolonie, ze kterých byly připravené glycerolové stoky a zamrazeny na -80°C.



Obr. 15: Restrikční mapa vektoru AKK 1472B.



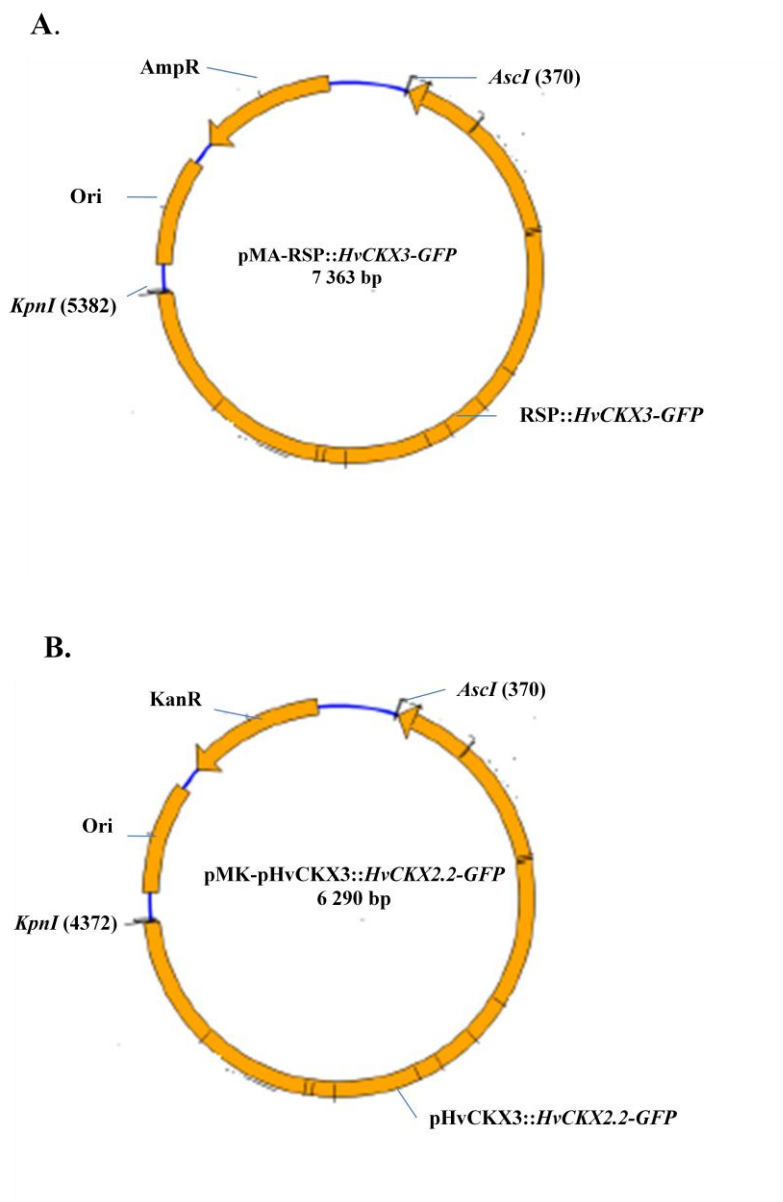
Obr. 16: Ověření přítomnosti *SU::GFP* v bakterii *A. rhizogenes* a *E.coli*.

M - GeneRuler™ 1kb DNA Ladder; **1-8** – plasmid po kontrolní restrikci enzymem, vyzolovaný z 9 kolonií *E.coli* transformovaných konstruktem *SU::GFP*; **9** - negativní kolonie.

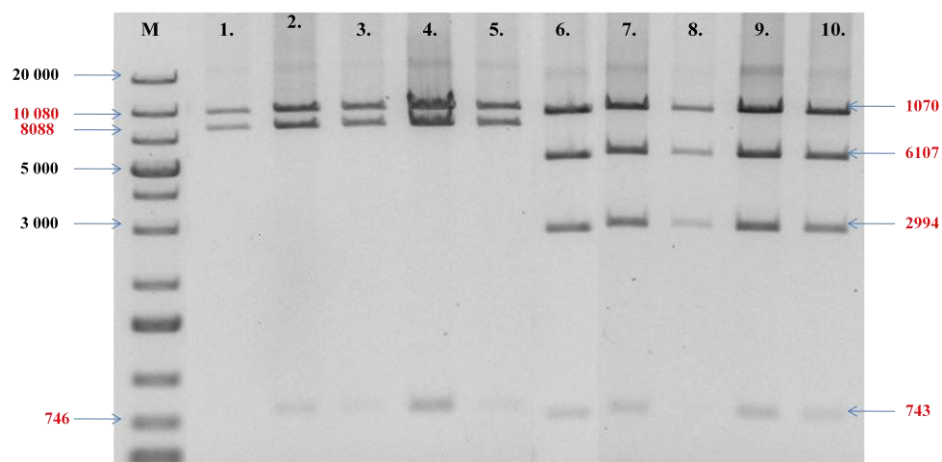
4.2 Příprava konstruktů *RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* v *A. rhizogenes*

Konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* byly nasyntetizovány a vloženy do vektoru pMA a pMK firmou Life Technologies (Praha, ČR). Syntetický konstrukt *RSP::HvCKX3-GFP* obsahoval gen pro ječmennou cytokinidehydrogenasu 3 fúzovaný na C- konci s *GFP* genem (*HvCKX3/GFP*) pod kontrolou vyselektovaného potencionálního kořenově specifického promotoru (*RSP*; Obr. 17). Konstrukt *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* obsahoval gen pro ječmennou cytokinidehydrogenasu 2.2 fúzovaný na C- konci s *GFP* genem (*HvCKX2.2/GFP*) pod kontrolou promotoru pro ječmenný gen *HvCKX3* (*pHvCKX3*; Obr. 17). Oba syntetické konstrukty byly ohraničeny rekombinačními místy attL₁ a attL₂, které specificky rozpoznává LR Klonasa II. Vektory pMA a pMK obsahující tyto konstrukty byly použity pro rekombinaci s binárním vektorem pGWB1 (poskytl prof. T. Nakagawa; Department of Molecular and Functional Genomics, Center for Intergrated Research in Science, Shimane University). Vektor pGWB1 byl před rekombinací linearizován pomocí restrikční endonuklasy *XhoI*. Poté byly rekombinační směsi transformovány do *E.coli*. Úspěšnost transformace byla ověřena restrikcí pomocí restrikčních endonukleas *NotI* a *XhoI*. Tyto enzymy měly plasmid pGWB1-*RSP::HvCKX3-GFP* rozštěpit na 4 fragmenty o velikostech 1070; 6107; 2994; 743 bp a plasmid pGWB1-*pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* na 3 fragmenty o velikostech 10 080; 8088; 746 bp. Z pěti testovaných kolonií, pro každý konstrukt, byly všechny pozitivní (Obr. 18). Výsledky

restrikce byly potvrzeny také sekvenací. Připravené plasmidy byly natransformovány do *A. rhizogenes* a úspěšnost transformace byla ověřena podle metody 3.2.8.3. Z pozitivních kolonií byly připravené zásobní glycerolové stoky, které byly dále použity pro transformaci rajčete a kalusů ječmene.



Obr. 17: Restrikční mapy. (A.) Mapa plasmidu pMA-RSP::HvCKX3-GFP; (B.) Mapa plasmidu pMK-pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP.

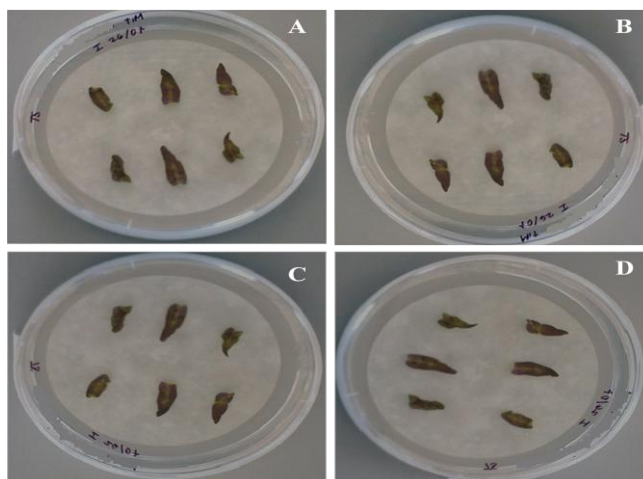


Obr. 18: Ověřovací restrikce konstruktů *RSP::HvCKX3-GFP* a *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* ve vektoru pGWB1. M - GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; 1-5 - plasmidy z 5 kolonií *E.coli* transformované konstruktem *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*; 6-12 - plasmidy z 5 kolonií *E.coli* transformované konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*.

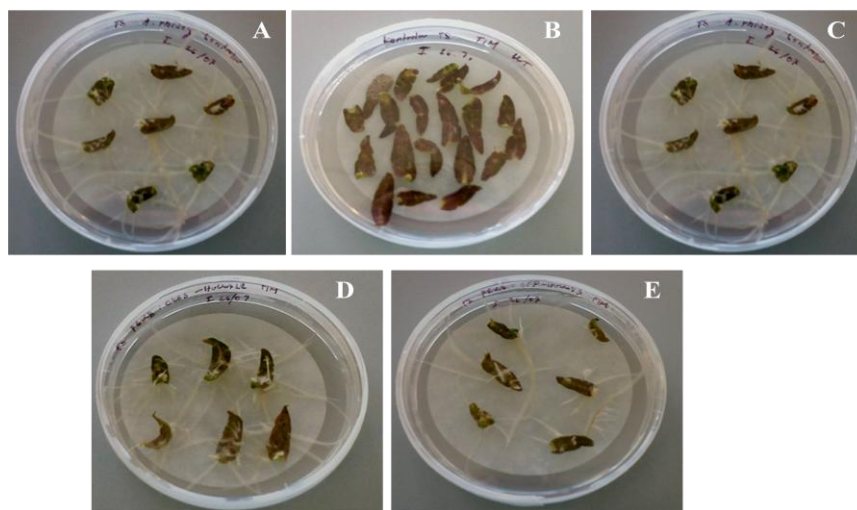
4.3 Transformace kořenů rajčete pomocí *A.rhizogenes*

Celkem bylo natransformováno 150 děložních lístků rajčete; 50 lístků s konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*, 50 *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*, 30 lístků bylo transformováno konstruktem *SU::GFP* (pozitivní kontrola), 30 lístků bylo transformováno samotnou kulturou *A. rhizogenes* a 20 lístků bylo ponecháno bez transformace (negativní kontrola, Obr. 19). Sedm dní po transformaci se začaly objevovat první malé transgenní kořeny. Čtrnáct dnů po transformaci byly transgenní kořeny dlouhé cca 1,5 cm a byly pozorovány pod fluorescenční lupou (Obr. 20). Od každého testovaného konstruktů bylo vyselektováno devět nezávislých transgenních linií kořenů (rostoucích z různých děložních lístků). Pro konstrukt *SU::GFP* bylo vyselektováno pět nezávislých transgenních linií kořenů. Po odstřížení a přepasážování kořenů na čerstvé médium byly kořeny schopny samotného růstu bez původního transformovaného děložního lístku (Obr. 21). Měsíc po odstřížení a přepasážování byly transgenní kořeny pozorovány na konfokálním mikroskopu, kde byla pozorována exprese samotného GFP proteinu (Obr. 22) nebo exprese *GFP* značených HvCKX isoformů (Obr. 22B). Exprese samotného GFP proteinu byla nejsilnější u konstruktů, kde byl GFP protein produkován pod kontrolou *SU* promotoru. U těchto vzorků byla fluorescence pozorována hlavně v kořenové špičce a na subcelulární úrovni byl GFP signál pozorován převším v cytosolu a v jádře buněk.

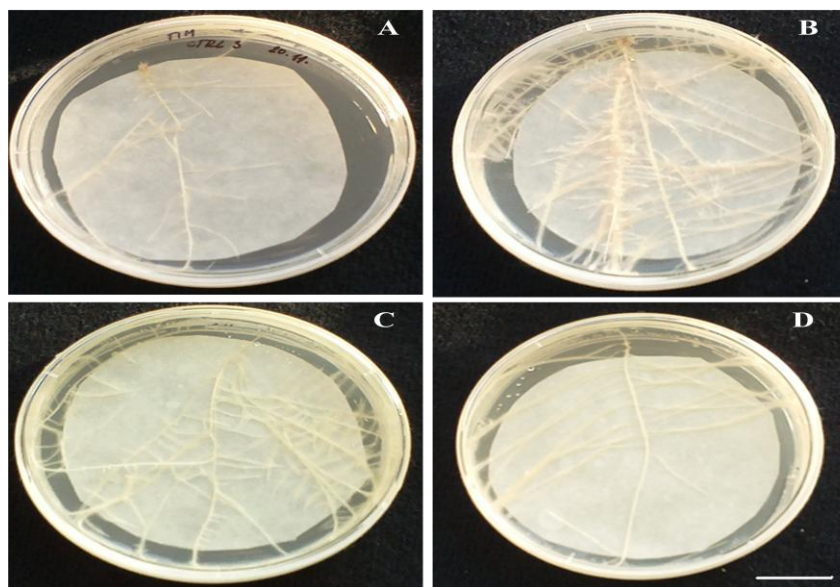
U transgenních kořenů, exprimujících *HvCKX3-GFP* gen, byla fluorescence pozorována taktéž v kořenové špičce, avšak fluorescence byla slabší ve srovnání s *SU::GFP* transgenními kořeny a na buněčné úrovni byla pozorována jen v cytosolu (Obr. 22C). U *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* transgenních kořenů nebyla pozorována žádná exprese studovného proteinu.



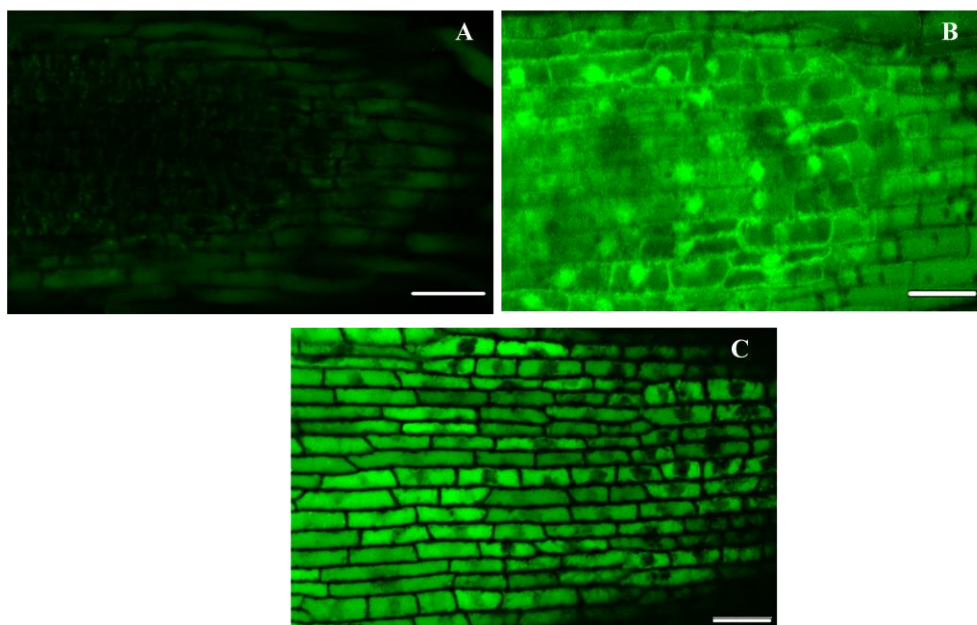
Obr. 19: Děložní lístky dva dny po transformaci. (A) Lísty transformované samotnou kulturou *A. rhizogenes*; (B) Lístky transformované konstruktem *SU::GFP*; (C) Lístky transformované konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; (D) Lístky transformované konstruktem *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*.



Obr. 20: Lísty rajčat deset dní po transformaci. (A) Lístky transformované konstruktem *SU::GFP*; (B) Netransformované lístky; (C) Lístky transformované samotnou kulturou *A. rhizogenes*; (D) Lístky transformované konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; (E) Lístky transformované konstruktem *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*.



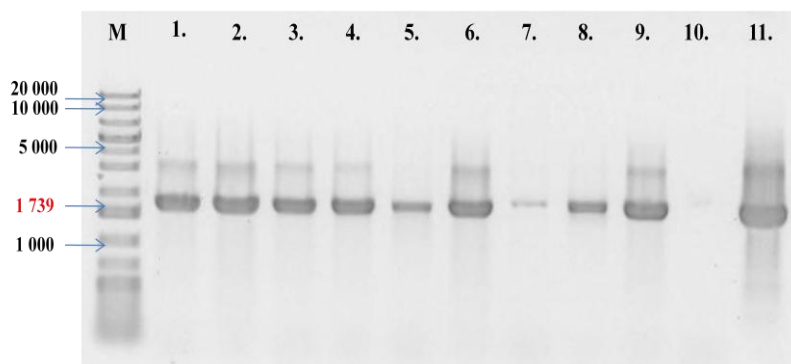
Obr. 21: Měsíční transgenní kořeny oddělené od původního transformovaného děložního lístku. (A) Kořeny po transformaci lístků samotnou kulturou *A.rhizogenes*; (B) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci konstruktem *SU::GFP*; (C) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; (D) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci konstruktem *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*. Velikost měřítka 1,5 cm.



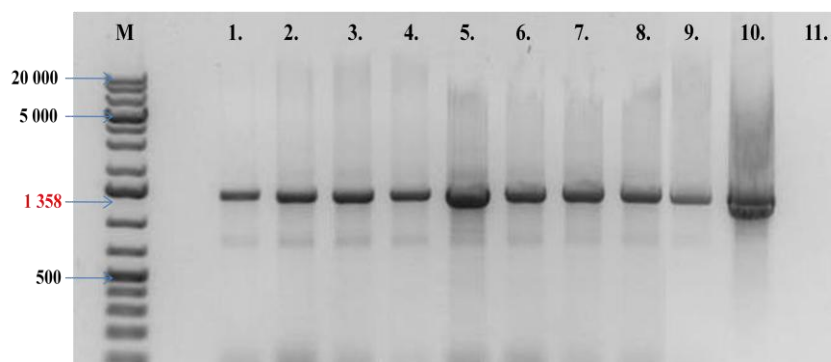
Obr. 22: Subcelulární lokalizace samotného GFP a GFP značených fúzních proteinů v kořenové špičce. (A) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci samotnou kulturou *A. rhizogenes* (negativní kontrola); (B) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci konstruktem *SU::GFP*; (C) Transgenní kořeny vzniklé po transformaci konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*. Velikost pravítka byla 20 μ m.

4.4 PCR a RT-PCR analýzy transgenních kořenů rajčete

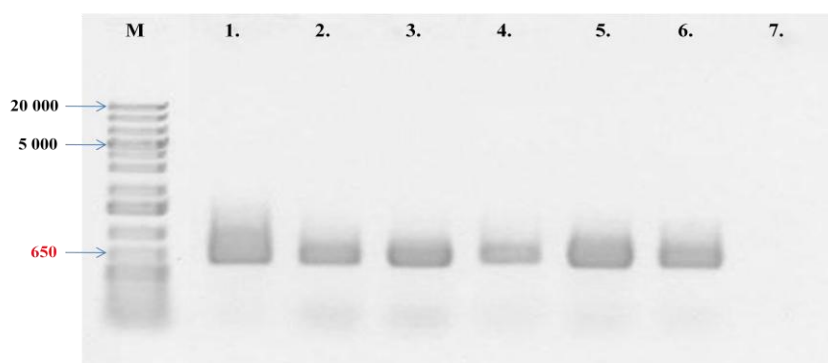
Přítomnost transgenů v transgenních kořenech rajčete byla potvrzena kontrolní PCR z genomové DNA. Byly navrženy specifické primery pro testované konstrukty amplifikující část promotorů a část genů (viz Tab. 2). Očekávané velikosti amplifikovaných fragmentů byly 1739 bp (*RSP::HvCKX3-GFP*) a 1358 bp (*pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*). Pro konstrukt *SU::GFP* byly použity specifické primery, amplifikující *GFP* gen o velikosti 650 bp. Jako pozitivní kontroly pro PCR reakce byly použité plasmidy *pGWB1-RSP::HvCKX3-GFP*, *pGWB1-pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* a *SU::GFP*. Výsledky PCR analýz byly vyhodnoceny elektroforeticky. Všechny devět *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií kořenů bylo pozitivních na přítomnost transgenů (Obr. 23). Všechny *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* (Obr. 24) a také všechny *SU::GFP* transgenní linie kořenů byly pozitivní na přítomnost transgenů (Obr. 25). Relativní exprese *HvCKX3* a *HvCKX2.2* genů v transgenních liniích kořenů rajčete byla měřena pomocí RT-PCR na temlátu z cDNA (příprava viz sekce 3.2.14; 3.2.15). Sekvence navržených primerů použitých na RT-PCR jsou v tabulce č. 3. Výsledky RT-PCR jsou shrnuté v tabulce č. 7. Exprese *HvCKX3* genu a genu rezistence pro hygromycin byly potvrzeny v 8 z 9 *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií kořenů (jedna linie byla vyřazena kvůli nízké koncentraci cDNA). Exprese byly 375-3261 -krát (*HvCKX3*) a 7894-23 670 -krát (hygromycin) větší ve srovnání s expresí v kontrolních kořenech (nespecifická amplifikace v kořenech vzniklých po transformaci samotnou kulturou *A.rhizogenes*). U žádné z devíti analyzovaných *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* transgenních linií kořenů nebyly naměřeny exprese *HvCKX2.2* genu, jenom zvýšena exprese genu rezistence na hygromycin. Pro kontrolu byly ve všech vzorcích vyhodnocovány exprese genů pro elongační faktor 2 a ubikvitin, jejichž exprese byla řízena konstitutivně. Relativní exprese byly spočítané delta delta Ct metodou, pomocí softwaru StepOne Plus v2.3.



Obr. 23: PCR analýza genomové DNA z transgenních kořenů rajčete. M- marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; **1-9** - devět nezávislých *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií kořenů; **10** - kořeny rajčete vzniklé po transformaci samotnou *A.rhizogenes*; **11** - plasmid pGWB1-*RSP::HvCKX3-GFP*.



Obr. 24: PCR analýza genomové DNA z transgenních kořenů rajčete. M- marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; **1-9** - devět nezávislých *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* transgenních linií kořenů; **10** – plasmid pGWB1-*pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP*; **11** - kořeny rajčete vzniklé po transformaci samotnou *A.rhizogene*.



Obr. 25 : PCR analýza genomové DNA z transgenních kořenů rajčete. M - marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; **1** - plasmid AKK 1472B-*SU::GFP*; **2-6** – 5 nezávislých *SU::GFP* transgenních linií kořenů; **7** - kořeny rajčete vzniklé po transformaci samotnou *A.rhizogenes*.

Tab. 7: Relativní exprese *HvCKX3* genu a genu rezistence na hygromycin v 8 *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních liniích kořenů.

<i>RSP-HvCKX3</i> transgenní linie	Expresa ¹ <i>HvCKX3</i>	Expresa ¹ hygromycin
1.	1588	9688
2.	714	23670
3.	576	11 053
4.	3261	9841
5.	1991	10082
6.	479	19380
7.	375	17835
8.	1591	7894
CTRL	1	1

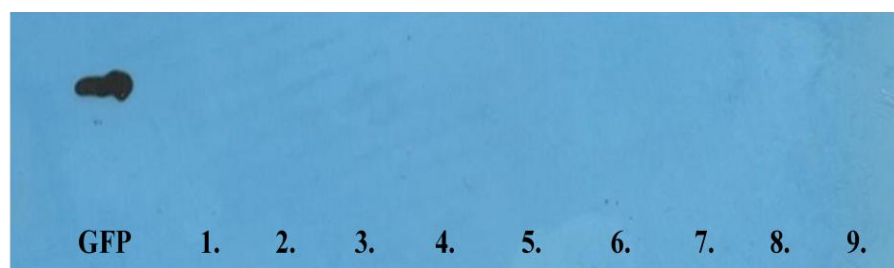
¹ Míra exprese genu *HvCKX3* a genu rezistence na hygromycin byla vztažena k hladině nespecifické exprese naměřené v kontrolních kořenech, kterým byla dána hodnota rovná 1.

4.5 Proteinové analýzy transgenních kořenů rajčete

Pro potvrzení tvorby funkčního *HvCKX3* proteinu v transgenních kořenech rajčete, byla u všech devíti *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií kořenů měřena CKX enzymová aktivita (viz sekce 3.2.19). Z naměřených dat byla spočítána specifická enzymová aktivita, která byla porovnána se specifickou enzymovou aktivitou naměřenou ve čtyřech kontrolních vzorcích kořenů (transformovaných samotnou kulturou *A.rhizogenes*). U dvou z devíti transgenních linií byla aktivita 1,89-3,17 krát zvýšena, ve srovnání s kontrolními vzorky kořenů divokého typu. U ostatních linií byla CKX aktivita srovnatelná s kontrolami (Tab. 8). *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní kořeny byly dále analyzovány pomocí WB s anti-GFP protilátkou. Jako pozitivní kontrola sloužily *SU::GFP* transgenní kořeny rajčete. V proteinovém extraktu z *SU::GFP* transgenních linií kořenu byl detekován proužek svou velikostí odpovídající GFP proteinu (27 kDa), u žádných z devíti *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií však nebyla potvrzena přítomnost GFP fúzního proteinu (Obr. 26).

Tab. 8: Specifická CKX enzymová aktivita v *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenech rajčete. Změna CKX aktivity vyjadřuje poměr specifické CKX aktivity naměřené v transgenních liniích kořenů a průměrné specifické CKX aktivity naměřené v kontrolních vzorcích.

RSP 1-9	Specifická CKX aktivita ($\text{pkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteinu}$) iP	Změna CKX aktivity
1.	12,5	1,83
2.	6,12	0,89
3.	4,35	0,63
4.	4,68	0,68
5.	7,81	1,14
6.	6,93	1,01
7.	7,70	1,12
8.	8,31	1,22
9.	21,8	3,17
CTRL1	6,73	1
CTRL2	3,84	1
CTRL3	5,62	1

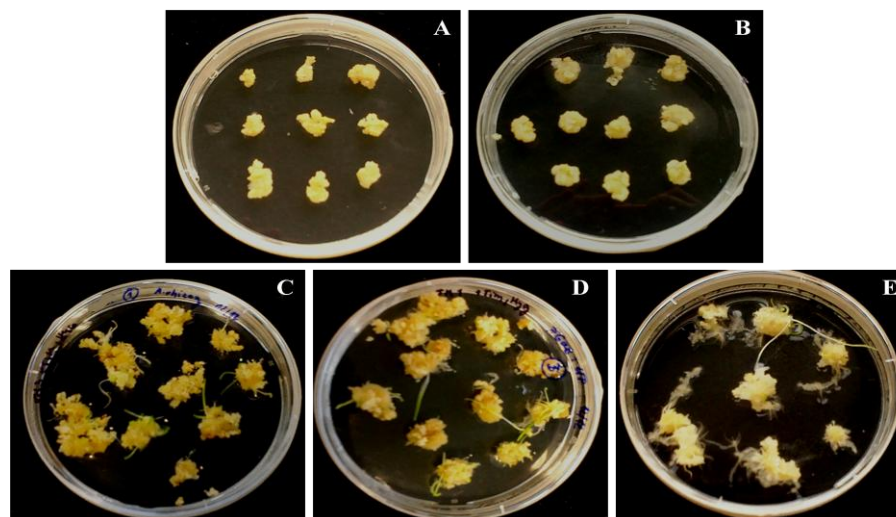


Obr. 26: Výsledek z WB. GFP – proteinový extrakt z *SU::GFP* transgenních kořenů; **1-9** - proteinový extrakt z 9 *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií kořenů.

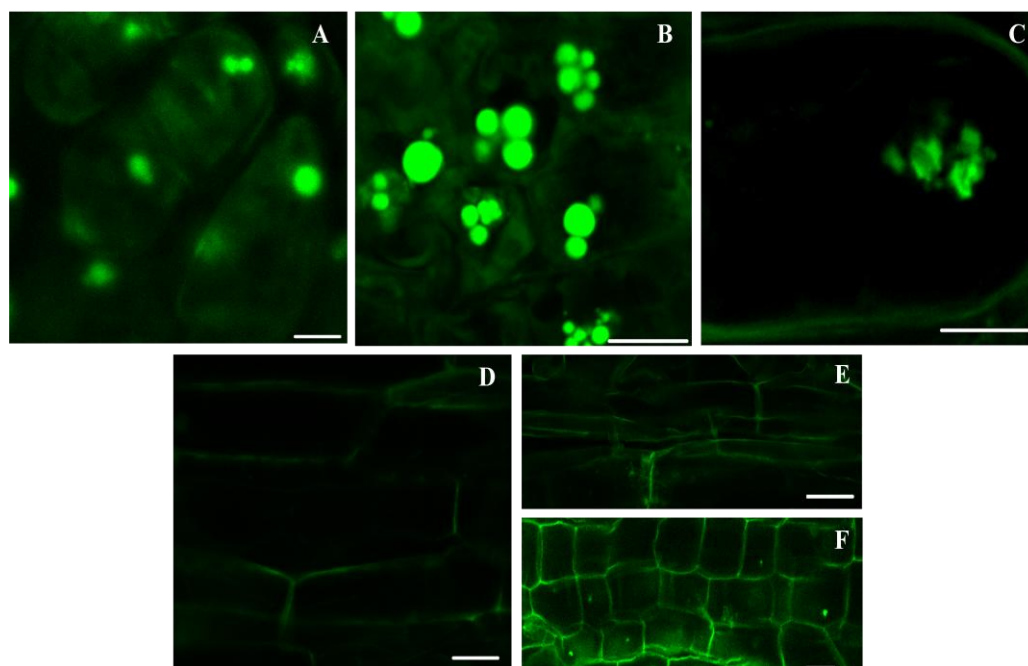
4.6 Transformace kalusů ječmene

Pro transformaci ječmenných kalusů bylo vyizolováno 150 nezralých embryí ječmene, které byly kultivovány 12 dní na kalus indukujícím médiu při 28°C ve tmě. 50 kalusů bylo transformovaných kulturou *A.rhizogenes* s konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; 50 kalusů bylo transformovaných *A.rhizogenes* s konstruktem *SU::GFP*, 30 kalusů bylo transformovaných samotnou kulturou *A.rhizogenes* a 20 kalusů bylo ponecháno bez transformace (Obr. 27 A; B). Polovina kalusů (od každého konstruktu) byla transformována s využitím ultrazvuku a polovina bez

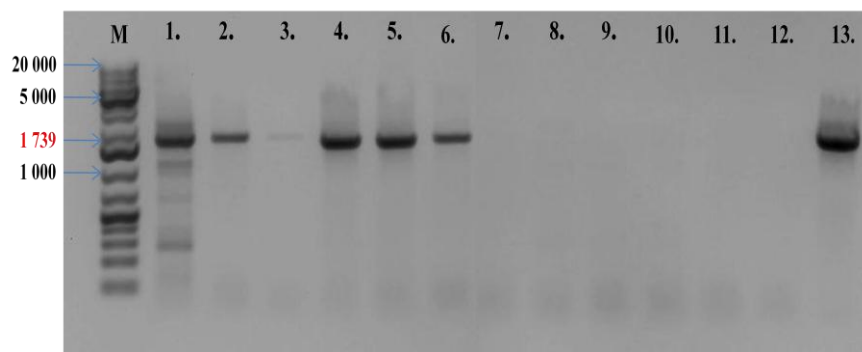
využití ultrazvuku. Po transformaci byly kalusy přeneseny na 4 různé tranzitní média s timentinem, lišící se mezi sebou hormonálním složením. Po zhruba deseti dnech začaly z kalusů růst transgenní kořeny (Obr. 27 C; D; E). Růst kořenů byl patrnější u kalusů, které byly transformované s využitím ultrazvuku. Kořeny se vyvíjely nejlépe na tranzitním médiu 3, které obsahovalo pouze auxiny (viz kapitola 3.2.11). Po týdnu byly kalusy s kořeny přeneseny na selekční tranzitní média (s hygromycinem) a s timentinem. Transgenní kořeny byly pozorovány pod fluorescenční lupou a od obou konstruktů byly vyselektovány kořeny, u kterých byla patrná fluorescence GFP proteinu. Vyselektované transgenní kořeny byly dále pozorovány na konfokálním mikroskopu. V *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenech byla fluorescence pozorována hlavně v plazmatické membráně a v cytosolu. GFP fúzní protein se u těchto transgenních kořenů shlukoval ve formě váčků (Obr. 28 A; B; C). V *SU::GFP* transgenních kořenech byla fluorescence pozorována hlavně v cytosolu a v jádře buněk (Obr. 28 F). U kontrolních kořenů, vzniklých po transformaci samotnou kulturou *A.rhizogenes* a kořenů rostoucích z netransformovaných kalusů, nebyla pozorována žádná fluorescence (Obr. 2 D; E). Pro potvrzení přítomnosti *RSP::HvCKX3-GFP* transgenu byla z transgenních kořenů, a taktéž z transgenních kalusů, vyizolována genomová DNA a nastavena PCR reakce se specifickými primery (stejně jako byly použity při analýze genomové DNA z rajčete, viz kapitola 4.3.1). Jako negativní kontroly sloužily kontrolní kořeny vzniklé po transformaci samotnou kulturou *A.rhizogenes*. Jako pozitivní kontrola sloužil plasmid *RSP::HvCKX3-GFP* ve vektoru pGWB1. Všechny testované *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní kořeny a kalusy byly pozitivní na přítomnost transgenu. Kontrolní kořeny a kalusy byly negativní (Obr. 29). Žádné z kořenů nebyly schopné samostatného růstu a po zhruba 4 týdnech začaly spolu s kalusy odumírat.



Obr. 27: Ječmenné kalusy transformované pomocí *A. rhizogenes*. (A) Ječmenné kalusy dva dny po transformaci kulturou *A. rhizogenes* konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; (B) Netransformované dvanáctidenní ječmenné kalusy; (C) Ječmenné kalusy deset dní po transformaci samotnou kulturou *A. rhizogenes*; (D) Ječmenné kalusy deset dní po transformaci kulturou *A. rhizogenes* s konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*; (E) Netransformované ječmenné kalusy 10 dní po přepasáží na tranzitní medium.



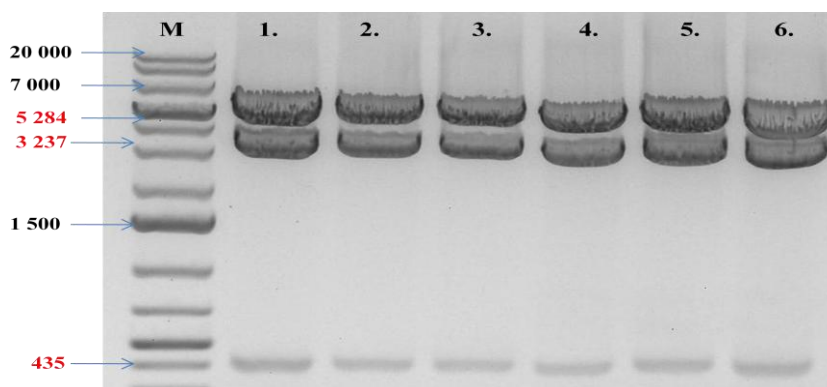
Obr. 28: Subcelulární lokalizace samotného GFP a GFP fúzních proteinů v transgenních kořenech ječmene. (A), (B) a (C) *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní kořeny ječmene; (D) Kořeny z netransformovaných kalusů; (E) Kořeny po transformaci samotnou *A. rhizogenes*; (F) *SU::GFP* transgenní ječmenné kořeny. Velikost pravítka je 20 μm .



Obr. 29: PCR analýza genomové DNA z transgenních kalusů a kořenů ječmene. M- marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; **1-3** – genomová DNA z *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenů ječmene; **4-6** – genomová DNA z *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kalusů ječmene; **7-9** – genomová DNA z kořenů vzniklých po transformaci samotnou *A.rhizogenes*; **10-12** – genomová DNA z kalusů transformovaných samotnou *A.rhizogenes*; **13** - plasmid *RSP::HvCKX-GFP*.

4.7 Příprava konstruktů *RSP::HvCKX3-GFP* v *A.tumefaciens*

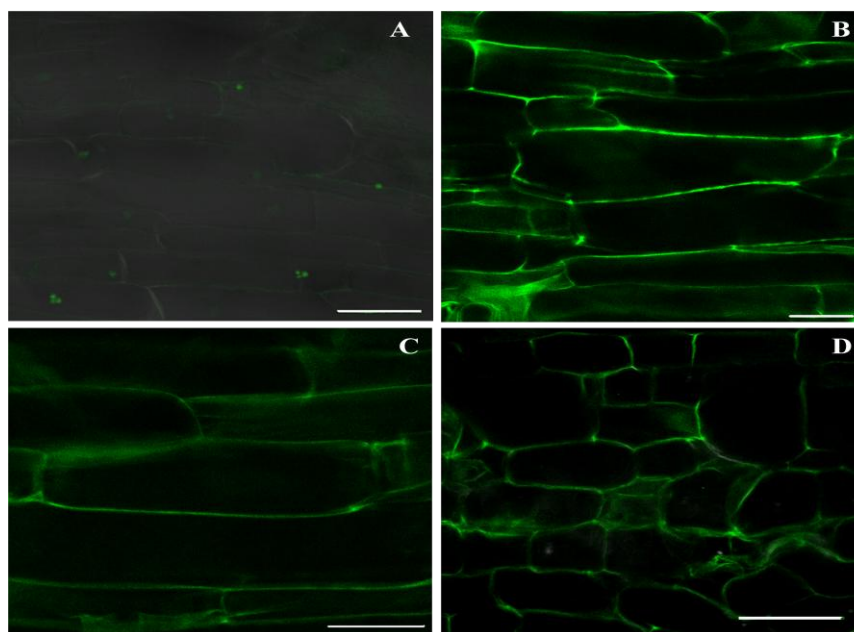
Vektor pMA-*RSP::HvCKX3-GFP* byl použitý pro rekombinaci s binárním vektorem pBract209 (poskytnutý od W. Harwood, JIC). Úspěšnost rekombinace byla ověřena restrikcí s enzymem *XhoI*, který měl produkt rozštěpit na 3 fragmenty o velikostech 5784 bp, 3737 bp a 435 bp. Všech 6 testovaných kolonií bylo pozitivních (Obr. 30). Připravený konstrukt *RSP::HvCKX3-GFP* ve vektoru pBract209 byl transformován do *A.tumefaciens*. Úspěšnost transformace byla ověřena stejným způsobem jako po transformaci konstruktů do *A.rhizogenes* (viz kapitola 3.2.8.3). Z pozitivních kolonií byly připraveny glycerolové stoky, které byly uskladněné na -80°C.



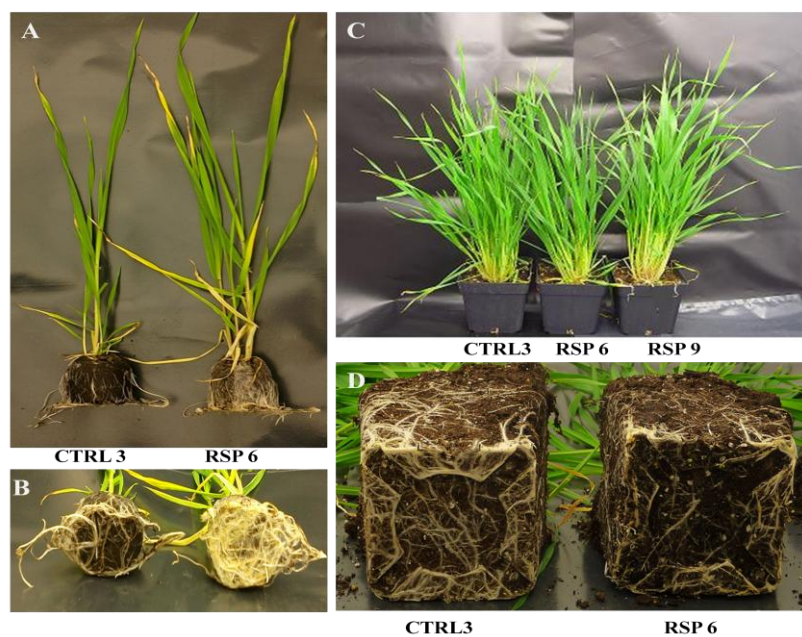
Obr. 30: Ověřovací restrikce konstruktů *RSP::HvCKX3-GFP* ve vektoru pBract209. M- marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; **1-6** - plasmidy z 6 kolonií *E.coli* transformované konstruktem *RSP::HvCKX3-GFP*.

4.8 Transformace embryí ječmene pomocí *A. tumefaciens*

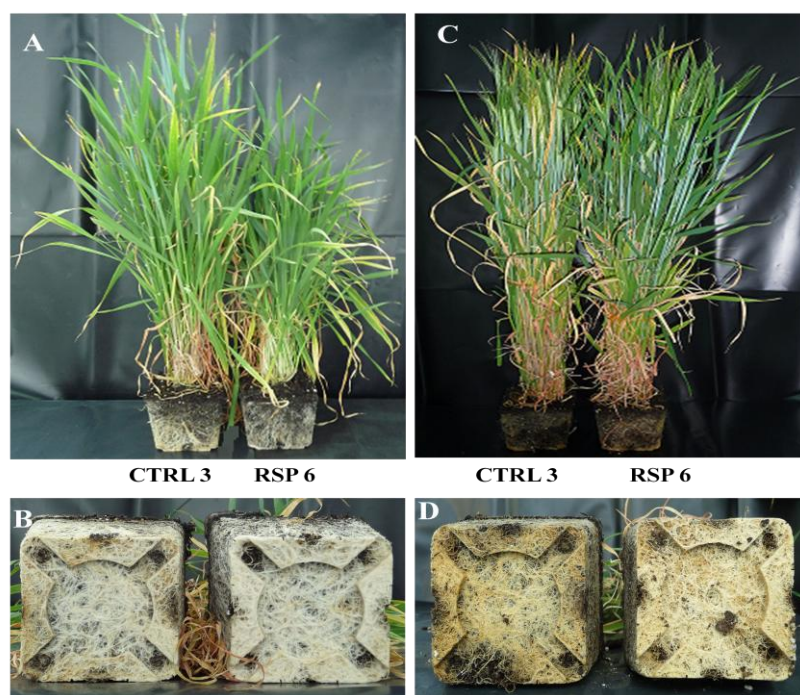
Pro transformaci ječmene, bylo vyizolováno 200 embryí, z kterých byla odstraněna embryonální os. 150 embryí bylo natransformováno *A.tumefaciens* obsahujícím pBract209-*RSP::HvCKX3-GFP* a 50 embryí bylo kultivováno bez transformace (sloužily jako kontrola). Ze 150 transformovaných embryí zregenerovalo 9 nezávislých linií ječmene (zregenerovaly z různých kalusů). 3 rostliny zregenerované z netransformovaných kalusů byly ponechány jako kontrolní rostliny. Při přesázkování do koleček se substrátem byly vybrány 3 nezávislé linie ječmene (č. 2, 4 a 8) a jejich kořeny byly pozorovány na konfokálním mikroskopu (Obr. 31 B; C; D). U všech tří nezávislých linií rostlin byl fluorescenční signál pozorován ve stejné oblasti kořene, a to ve středu kořene a v místě větvení kořene. Na buněčné úrovni byla fluorescence pozorována hlavně v plazmatické membráně a v cytosolu. V prvním měsíci *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní rostliny produkovaly více kořenů ve srovnání s kontrolními rostlinami, přičemž nadzemní část transgenních rostlin byla srovnatelná s kontrolními rostlinami (Obr. 32 B). Ve druhém měsíci byl již kořenový systém transgenních rostlin srovnatelný s kontrolními rostlinami (Obr. 32 D). Všechny *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní rostliny produkovaly klasy, ale jejich vývoj byl zhruba dva týdny opožděn ve srovnání s kontrolními rostlinami (Obr. 33).



Obr. 31: Subcelulární lokalizace GFP fúzních proteinů v T0 linii ječmene. (A) Kořeny kontrolních rostlin, které zregenerovaly z netransformovaných kalusů (B) – (D) Kořeny *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlin č. 2, 4 a 8. Velikost pravítka je 20 μm .



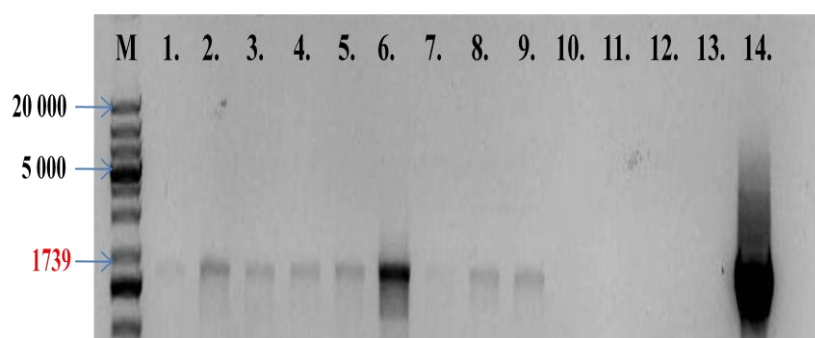
Obr. 32: Jednoměsíční a dvouměsíční *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní rostliny ječmene v T0 generaci. RSP – *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní rostliny; CTRL – kontrolní rostlina; (A) Nadzemní část jednoměsíčních rostlin; (B) a jejich kořeny; (C) Nadzemní část dvouměsíčních rostlin; (D) a jejich kořeny.



Obr. 33: Tříměsíční a čtyřměsíční *RSP-HvCKX3/GFP* transgenní rostliny ječmene v T0 generaci. RSP – *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní rostliny; CTRL – kontrolní rostlina; (A) Nadzemní část tříměsíčních rostlin; (B) a jejich kořeny; (C) Nadzemní část čtyřměsíčních rostlin; (D) a jejich kořeny.

4.9 Analýzy T0 generace transgenních rostlin ječmene

Pro ověření transgenity byla z devíti nezávislých *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií ječmene vyizolována genomová DNA a nastavena PCR reakce se specifickými primery, amplifikujícími *RSP::HvCKX3* transgen (stejně jako u transgenních ječmenných kalusů a transgenního rajčete, viz kapitola 4.3 a 4.5. Jako pozitivní kontrola byl použit plasmid pBract209-*RSP::HvCKX3-GFP*. Všech 9 nezávislých transgenních linií ječmene bylo PCR pozitivních. Kontrolní rostliny vzniklé z netransformovaných kalusů ječmene byly PCR negativní (Obr. 34). Po dobu 4 měsíců byly ze všech 9 nezávislých transgenních linií ječmene odebírány kořeny a listy, které byly následně analyzovány pomocí RT-PCR. Sekvence primeru použitých na RT-PCR jsou uvedeny v kapitole 3.2.16. Jako kontrola sloužily rostliny, které zregenerovaly z netransformovaných kalusů. Výsledky z RT-PCR jsou shrnuty v tabulce 8. Expres *HvCKX3* nebyla výrazně zvýšena v žádném stádiu žádné z transgenních linií ve srovnání s expresí tohoto genu v kontrolních rostlinách. Expres *GFP* genu v *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlinách byla 67-3 402-krát (dvojměsíční kořeny); 45-1033-krát (dvojměsíční listy); 596-10873-krát (čtyřměsíční kořeny) a 285-3464-krát (čtyřměsíční listy) zvýšená ve srovnání s expresí tohoto genu v kontrolních rostlinách (nespecifická amplifikace v rostlinách, které zregenerovaly z netransformovaných kalusů). Hygromycinový gen byl silně exprimovaný ve všech transgenních liniích ječmene (dvojměsíčních i čtyřměsíčních) ve srovnání s expresí v kontrolních rostlinách. Pro kontrolu byly ve všech vzorcích vyhodnocovány exprese genů pro elongační faktor 2 a aktin, jejichž exprese byla řízena konstitutivně. Relativní exprese byly spočítané delta delta Ct metodou, pomocí softwaru StepOne Plus v 2.3.



Obr. 34: Výsledky PCR analýzy z genomové DNA T0 generace transgenních rostlin ječmene. M - marker GeneRuler™ 1kb Plus DNA Ladder; 1-9 – genomová DNA z *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií ječmene; 10–13 – genomová DNA z kontrolních rostlin, vzniklých z netransformovaných kalusů; 14 - plasmid pBract209-*RSP::HvCKX3-GFP*.

Tab. 9: Relativní exprese sledovaných genů ve dvouměsíčních a čtyřměsíčních *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlinách (T0 generace).

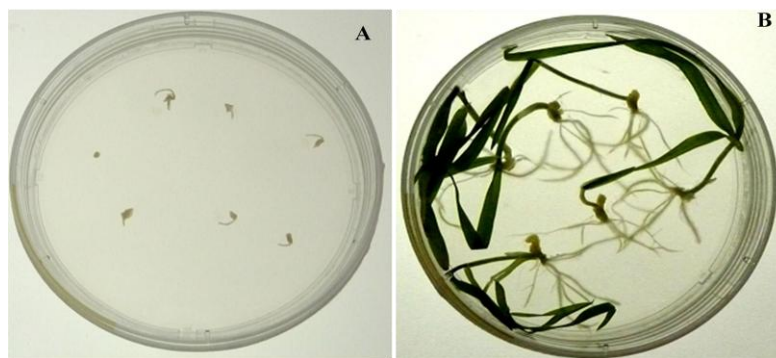
RSP 1-9 KOŘEN (K), LIST (L)	Expresse <i>RSP</i> ¹ 2 měsíce	Expresse <i>HvCKX3</i> ¹ 2 měsíce	Expresse <i>GFP</i> ¹ 2 měsíce	Expresse <i>HYG</i> 2 měsíce	Expresse <i>RSP</i> ¹ 4 měsíce	Expresse <i>HvCKX3</i> ¹ 4 měsíce	Expresse <i>GFP</i> ¹ 4 měsíce	Expresse <i>HYG</i> ¹ 4 měsíce
1. (K)	14 748	58,2	67,3	10 836	1 119	40,2	2 051	4 838
2. (K)	2 861	108,2	790,4	3 642	68 543	11,7	2 726	969
3. (K)	8 639	74,4	173,8	7 089	653 568	67,0	2 223	1 796
4. (K)	4 514	21,2	77,2	10 064	503 926	27,9	1 540	1 388
5. (K)	8 744	100,3	353,1	11 937	1 150 154	28,4	10 783	3 079
6. (K)	2 440	56,7	3 402	6 534	22 970	8,7	7 727	165
7. (K)	21 568	181,7	15,47	12 146	67 079	149,0	596	1 192
8. (K)	47 373	115,4	136,44	8 779	147 180	80,3	1 567	1 613
9. (K)	9 925	56,0	103,5	5 740	11 362	23,5	887	1 659
CTRL3(K)	21 988	14,4	0,1	0,1	23 184	10,7	ND	ND
1. (L)	1,0	5,6	362,3	12 374	19,2	0,8	717	3 243
2. (L)	0,8	9,8	365	5 124	164	3,1	3 927	726
3. (L)	1,3	12,4	54,6	14 483	47,6	1,1	1 053	1 513
4. (L)	0,4	14,8	45,2	16 984	61,4	0,9	285	2 158
5. (L)	1,8	13,8	1 031	22 995	20,5	1,4	3 464	1 811
6. (L)	0,8	16,2	576,4	843	0,2	1,5	684	1,3
7. (L)	2,0	2,6	186,8	48 565	1,0	0,5	953	1 152
8. (L)	3,5	5,5	133,3	19 388	0,7	0,9	2 888	2 639
9. (L)	60,6	4,9	203,2	13 373	4,2	0,6	978	2 209
CTRL3(L)	1	1	1	1	1	1	1	1

¹Míra exprese jednotlivých genů byla vztažena k hladině nespecifické exprese v kontrolních listech (CTRL3), kterým byla dána hodnota rovná 1. ND – nedetekována žádná exprese

4.10 Analýza T1 generace *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlin ječmene

Z jedné *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní linie ječmene (RSP4) byl vybrán jeden klas, ze kterého byla vyizolována embrya, která byla kultivována na MS médiu s hygromycinem. Pro kontrolu byla embrya vyizolována též z klasu kontrolní rostliny (zregenerované z netransformovaných kalusů) a kultivována na MS médiu (polovina na médiu bez hygromycinu a polovina na médiu s hygromycinem pro kontrolu selekčního tlaku; Obr. 35). Z 32 vyizolovaných embryí RSP4 linie vyklíčilo 26 transgenních rostlin ječmene a 7 embryí nevyklíčilo. Z kontrolních embryí vyklíčily jenom embrya kultivována na MS médiu bez hygromycinu. Po 1 týdnu byly kořeny třech RSP4 transgenních rostlin pozorovány na konfokálním mikroskopu a z kořenů a listů těchto rostlin byly odebrány vzorky, které byly dále analyzovány pomocí RT-PCR. Po 2 týdnech byly kořeny RSP4 transgenních rostlin opět pozorovány na konfokálním mikroskopu. U jednotýdenních RSP4 transgenních kořenů byla fluorescence GFP-fúzního proteinu pozorována hlavně v plazmatické membráně (signál byl stejný ve špičce i v místě větvení kořene, Obr. 36 C). Fluorescence byla mnohem silnější v kořenech dvoutýdenních RSP4 transgenních rostlin, kde se GFP-fúzní protein začal akumulovat ve formě váčku (podobných těm, které se tvořily v transgenních kořenech vzniklých po transformaci kalusů *A.rhizogenes* s *RSP::HvCKX3-GFP*; Obr. 36 D; E; F). V kořenech kontrolních rostlin nebyla pozorována žádná fluorescence (Obr. 36 A; B).

Výsledky RT-PCR jsou shrnuty v tabulce 10. Expze *GFP* genu v RSP4 transgenních rostlinách byla 407-3 384 krát (kořeny) a 1473-4135 krát (listy) větší ve srovnání s expzí v kontrolních rostlinách. Ve všech vzorcích RSP4 transgenních rostlin byla také zvýšená expze genu pro hygromycin (kořeny 17 951 - 61 589 a listy 11 609 - 21 006) ve srovnání s expzí tohoto genu v kontrolních rostlinách. Expze *HvCKX3* genu nebyla výrazně zvýšena ve srovnání s kontrolními vzorky. Expze byly vyhodnocené stejným způsobem jako expze v T0 generaci transgenních rostlin (viz kapitola 4.7.1).

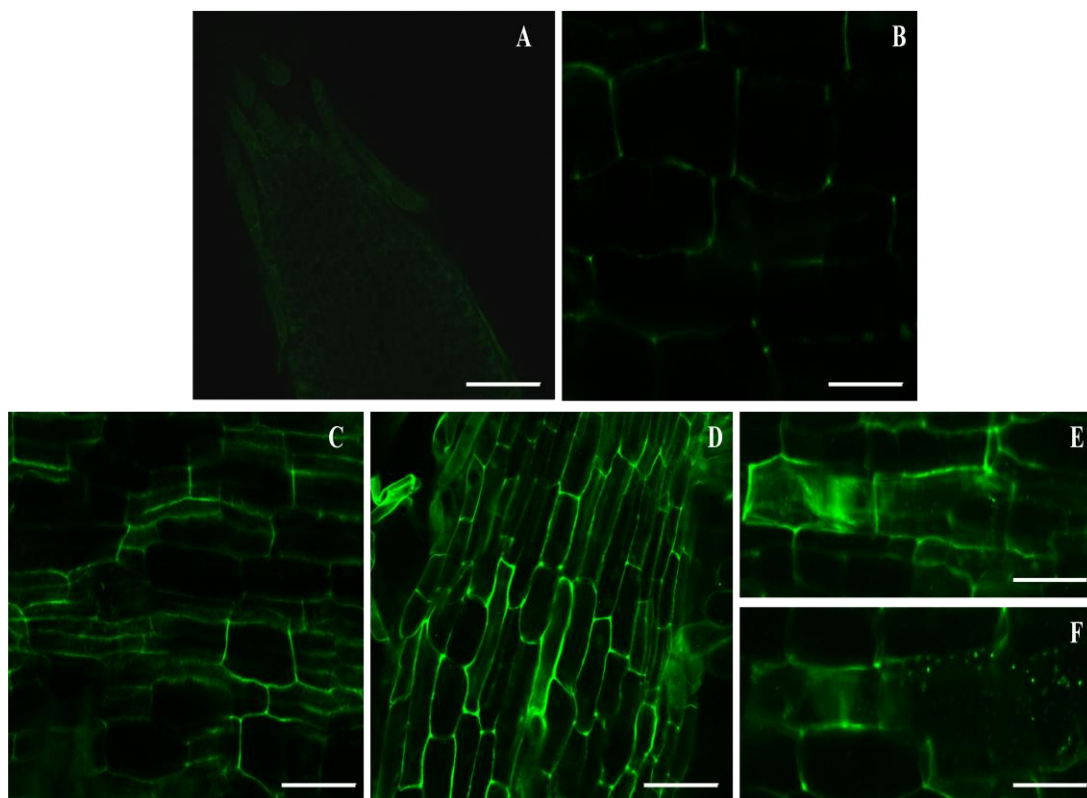


Obr. 35: Vyizolované embrya z *RSP::HvCKX3-GFP* transgenní linie ječmene (RSP4) na MS médiu s hygromycinem. (A) Dvoudenní transgenní embrya z RSP4 linie; (B) Jednotýdenní transgenní rostliny ječmene, vyklíčené z embryí RSP4 linie.

Tab. 10: Relativní exprese sledovaných genů v dvouměsíčních a čtyřměsíčních *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlinách (T1 generace).

RSP 1-3 KOŘENY (K), LISTY (L)	Expresse <i>RSP</i> ¹ 1 týden	Expresse <i>CKX3</i> ¹ 1 týden	Expresse <i>GFP</i> ¹ 1 týden	Expresse <i>HYG</i> ¹ 1 týden
1. (K)	21,9	3,0	3 384	61 589
2. (K)	9,8	3,1	1 679	26 714
3. (K)	13,7	5,6	1 577	17 951
CTRL3 (K)	27,8	2,9	ND	ND
1. (L)	0,1	0,06	4 135	21 006
2. (L)	ND	ND	1 473	16 540
3. (L)	0,1	0,8	1 632	11 609
CTRL3 (L)	1	1	1	1

¹Míra exprese jednotlivých genů byla vztažena k hladině nespecifické exprese v kontrolních listech (CTRL3), kterým byla dána hodnota rovná 1. ND – nedetekována žádná exprese



Obr. 36. Subcelulární lokalizace GFP fúzního proteinu HvCKX3 v T1 generaci ječmene. (A) Kořen kontrolní jednotýdenní rostliny (vyklíčené z embryí kontrolních netransgenních rostlin); (B) Dvoutýdenní kořen kontrolní netransformované rostliny; (C) Kořen jednotýdenní RSP4 transgenní rostliny; (D), (E), (F) Kořen dvoutýdenní RSP4 transgenní rostliny. Velikost pravítka je 20 μm .

5 ZÁVĚR

Úvod diplomové práce je věnován ječmeni (*Hordeum vulgare L*) a jeho důležitosti v zemědělství. V teoretické části jsou shrnuty informace o CK, CKX a vlivu nadprodukce CKX genů v transgenních rostlinách na vývoj kořenů a nadzemní části. Další část je věnována bakterii *A. rhizogenes*, způsobu napadení hostitelské buňky a popisu transformačních metod.

Při této práci se mi podařilo připravit *A. rhizogenes* obsahující konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP*, *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* ve vektoru pGWB1 a *SU::GFP*, které byly dále použity pro transformaci rajčete, ječmenných kalusů a embryí. Pomocí PCR reakce byla potvrzena přítomnost transgenů *RSP::HvCKX3-GFP* a také *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* ve všech 9 nezávislých liniích kořenů rajčete a pomocí RT-PCR byla potvrzena zvýšená exprese *HvCKX3* genu. Exprese *HvCKX2.2* genu zvýšená nebyla, ačkoliv byla potvrzená zvýšená exprese pro hydromycinový gen. Pomocí western blottingu byla potvrzena přítomnost GFP proteinu, avšak jenom v *SU::GFP* transgenních kořenech rajčete.

Pomocí *A. rhizogenes* obsahující konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP* a *SU::GFP* byly úspěšně natransformovány ječmenné kalusy, které produkovaly transgenní kořeny. Přítomnost transgenů byla prokázána PCR reakcí z genomové DNA a fluorescence GFP proteinu byla sledována konfokální mikroskopií. Transgenní kořeny však nebyly schopné samostatného růstu a postupně odumíraly.

Ověřený konstrukt *RSP::HvCKX3-GFP* byl překlonován do vektoru pBract209 a byl použitý na transformaci ječmenných embryí kultivaru Golden Promise pomocí *A. tumefaciens*. Bylo připraveno 9 nezávislých transgenních linií ječmene, u kterých byla pomocí PCR prokázána přítomnost transgenů. Pomocí RT-PCR a konfokální mikroskopie byla potvrzena funkčnost promotoru. Exprese však byla naměřena v kořenech i listech transgenních rostlin, což naznačuje, že promotor ztratil svou tkáňovou specifitu.

6 DISKUZE

CK jsou rostlinné hormony, které ovlivňují vývoj a fyziologické funkce rostlin v průběhu jejich života. Abychom pochopili signalizační funkce CK v rostlinách je důležité pochopit mechanismus jejich regulace a jejich činnost v rostlinných tkáních. Jedním z nejdůležitějších enzymů regulující endogenní obsah CK v rostlinách je cytokinindehydrogenasa (CKX), který katalyzuje ireverzibilní degradaci CK (Werner a Schmülling, 2009). Změna hladiny CK v určité části rostliny způsobí změnu fyziologických funkcí, a tím může být pozměněn jak fenotyp rostliny, tak i její vlastnosti (Zalewski *et al.*, 2010; Zalabák *et al.*, 2011). Werner *et al.* (2010) ve své studii ukázali, že nadprodukce CKX genů pod kontrolou kořenově specifického promotoru ve dvouděložných modelových rostlinách může vést ke zvětšení kořenové biomasy až o 40 %, aniž by byl ovlivněn vývoj nadzemní části rostliny. Rostliny byly tolerantnější vůči suchu a zvýšil se obsah živin (Werner *et al.*, 2010). Mrízová *et al.* (2013) testovala nadprodukcí CKX genů v ječmeni pod kontrolou kořenově specifických promotorů. Takto transformovaný ječmen produkoval větší kořeny, avšak změny se projevíly v nadzemní části a rostliny nebyly schopné produkovat potomstvo (Mrízová *et al.*, 2013).

Hlavním cílem této diplomové práce bylo otestovat nově vyselektovaný ječmenný promotor RSP, který by řídil expresi ječmenného *HvCKX3* genu fúzovaného s GFP. Ječmenný *HvCKX3* gen, spolu s kukuřičným *ZmCKX6*, rýžovým *OsCKX2*, CKX z čiroku (Sb01g019000.1) a CKX z *Brachypodium* (Bradi3g29130), mají mutaci v sekvenci PHPWLN, kde prolin na pozici 375 je zaměněný za histidin, čím se sekvence mění na HHPWLN. Všechny ostatní CKX geny z genových rodin jednoděložných rostlin mají tuto PHPWLN sekvenci konzervovanou. Cílem této práce bylo zjistit, či tato mutace u *HvCKX3* genu vede k tvorbě funkčního proteinu. Nedávno bylo zjištěno, že zpětná mutace histidinu na prolin u *ZmCKX6* genu nevedla k aktivnímu proteinu (CKX enzymová aktivita nebyla naměřená), což naznačuje, že tato mutace v PHPWLN sekvenci není zásadní pro funkci proteinu (Zalabák *et al.*, 2014). *ZmCKX6* gen má mutaci též v jiné konzervované sekvenci HFG, kde fenylalanin na pozici 499 je nahrazen leucinem, čímž se doména mění na HLG. Zpětná mutace leucinu na fenylalanin v této doméně vedla k zvýšení exprese *ZmCKX6* a protein byl detekován též pomocí western-blottingu. V této práci byl také testován nativní promotor pro *HvCKX3* gen, který byl použit pro řízení exprese *HvCKX2.2* genu fúzovaného s GFP. Nejprve byly oba konstrukty testovány v kořenech rajčete, kde byl pro transformaci použit

vektor pGWB1 a bakterie *A.rhizogenes*. Jako kontrola byl použit konstrukt *SU::GFP* ve vektoru AKK 1472B, který obsahoval *GFP* gen pod kontrolou konstitutivního superubikvitinového promotoru z kukuřice. Všechny tři konstrukty byly úspěšně natransformovány do rajčete, což bylo potvrzeno pomocí PCR reakce z genomové DNA (Obr. 23, 24, 25; kapitola 4.3.1). Při pozorování kořenů na konfokálním mikroskopu byla fluorescence GFP proteinu pozorována jen v *RSP::HvCKX3-GFP* a *SU::GFP* transgenních kořenech rajčete. V *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* transgenních kořenech žádná fluorescence pozorována nebyla, což potvrdilo nefunkčnost promotoru, která mohla být způsobena použitím neúplné promotorové oblasti. GFP signál byl pozorován zejména v jádrech buněk u *SU::GFP* transgenních linií rajčete, což je v souladu s publikovanými daty o lokalizaci samotného GFP proteinu (Šmehilová *et al.*, 2009) a v případě *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních linií rajčete se protein nacházel v cytosolu buněk. Expresní studie na RT-PCR potvrdily výsledky konfokální mikroskopie, kde u *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenech rajčete byla naměřena exprese *HvCKX3* genu, ale nebyla naměřena v *pHvCKX3::HvCKX2.2-GFP* transgenních kořenech. Tyto výsledky naznačují, že použitý promotor *HvCKX3* genu je nefunkční. Důvodem může být, že použitá promotorová oblast byla neúplná. RSP promotor byl schopný řídit expresi *HvCKX3* genu, která byla nejsilnější ve špičce kořene. Proteinové analýzy však nepotvrdily produkci funkčního *HvCKX3* proteinu. Zvýšená CKX enzymová aktivita byla naměřena jenom ve dvou vzorcích transgenních kořenů (1,83-3,17 -krát, tabulka 8; kapitola 4.3.1) a protein nebyl detekován v žádném z proteinových vzorků *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenů rajčete ani pomocí western blottingu s anti-GFP protilátkou. Naproti tomu v *SU::GFP* transgenních kořenech byla přítomnost GFP proteinu potvrzena pomocí western blottingu (Obr. 26, kapitola 4.3.1). Ze získaných výsledků není úplně jasné, jestli dochází k tvorbě funkčního proteinu s velmi nízkou aktivitou, anebo se tvoří nefunkční protein, který je hned degradován a nemůže tedy být detekován pomocí western-blottingu.

Dalším cílem této práce byla optimalizace metody transformace ječmenných kalusů, kde snahou bylo připravit transgenní kořenové vlásky. Zavedení této metody by přineslo nový rychlý systém pro ověřování konstruktů, promotorů a proteinů v jednoděložných rostlinách. Pro transformaci kalusů byl zvolen virulentní kmen *Agrobacteria* (*Agrobacterium rhizogenes*; 15834), který indukuje tvorbu kořenových vlásků. Ječmenné kalusy byly transformovány konstrukty *RSP::HvCKX3-GFP* a *SU::GFP*. Při transformaci kalusů ječmene byla využita sonifikace, kde z kalusů transformovaných

s využitím sonifikace kořeny rostly lépe v porovnání s kořeny, kde sonifikace použita nebyla. Sonifikace byla už dříve úspěšně využita při transformaci *Verbascum xanthophoeniceum* (Georgiev et al., 2011). Byly také zkoušeny čtyři tranzitní média s různým obsahem cukerné složky a s různou hladinou auxinů a cytokininů. Nejlepším médiem bylo tranzitní médium s maltósou a auxiny (TZ 3; Obr. 27; kapitola 4.5). Přítomnost transgenu byla v *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenech potvrzena pomocí PCR. V transgenních kořenech byla také pozorována fluorescence GFP proteinu pomocí konfokální mikroskopie. V *SU::GFP* transgenních kořenech byl GFP protein lokalizován v plazmatické membráně a v jádře buněk, podobně jako to bylo u transgenních kořenů rajčete. Naproti tomu v *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních kořenech se GFP protein zhluchoval ve formě váčku, které byly lokalizované v cytoplazmě buněk (Obr. 28; kapitola 4.3). Transgenní kořeny získané transformací kalusů nebyly schopné samostatného růstu a po několika týdnech spolu s kalusy odumíraly. Tato metoda si tedy vyžaduje další optimalizaci. Podobná technika byla též vyvinuta v roce 2011 skupinou Imani *et al.*, kde z transgenních ječmenných kalusů vyrůstaly kořeny. Tato transformační technika, nazývaná „STARTS“, používá *A.tumefaciens* pro transformaci ječmenných embryí, které jsou dále kultivovány na kalus indukujícím médiu, kde vznikají transgenní kalusy. Kalusy jsou poté ko-kultivované na kalus indukujícím médiu obsahujícím tekutý endosperm kokosu, který napomáhá růstu kořenů a každý transgenní kořen regeneruje z jedné embryonální buňky, takže nevznikají himérické kořeny. Tento systém je možné využít např. pro lokalizaci proteinů či pro testování promotorů. Autoři však neuvádějí, jak dlouho transgenní kořeny přežívaly (Imani *et al.*, 2011).

Konstrukt *RSP::HvCKX3-GFP* ve vektoru pBract209 byl pomocí *A.tumefaciens* natransformován dále do nezralých embryí ječmene a bylo získáno 9 nezávislých transgenních linií ječmene. Ve všech 9 liniích byla přítomnost transgenu potvrzena pomocí PCR. Několika týdenní kořeny transgenních rostlin byly pozorovány na konfokálním mikroskopu, kde byla úspěšně detekována fluorescence GFP fúzního proteinu. Podobně jako u transgenních kořenů získaných z transformací kalusů pomocí *A.rhizogenes*, se u těchto kořenů GFP protein shluchoval ve formě váčků, které byly lokalizovány v cytosolu buněk (Obr. 31; kapitola 4.7). Expresní analýzy T0 generace *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních rostlin ječmene potvrdily expresi *GFP* genu, avšak tato exprese byla naměřená jak v kořenech, tak i v listech transgenních rostlin. Pro kontrolu byla měřena také exprese endogenního *RSP* genu, která byla naměřena jenom

v kořenech transgenních rostlin. Tyto výsledky naznačují, že RSP promotor pravděpodobně ztratil svou tkáňovou specifitu. Podobný trend byl předtím sledován při transformaci ječmene *ZmCKX1* genem pod kontrolou promotoru pro fosfátový transportér, který je exprimovaný hlavně v kořenech. Exprese *ZmCKX1* genu byla u tohoto experimentu naměřena v kořenech i v listech transgenních rostlin, což následně vedlo ke sterilitě rostlin (Mrízová *et al.*, 2013). Důvodem pro ztrátu tkáňové specifity promotoru mohou být chybějící regulační *cis* elementy, které jsou nezbytné pro řízení směrované exprese (Furtrado *et al.*, 2009). Exprese *GFP* genu byla potvrzena též v T1 generaci vybrané transgenní linie (RSP4) a to jak pomocí RT-PCR, tak i konfokální mikroskopií, což naznačuje, že transgen byl stabilně integrován do genomu ječmene. Přítomnost HvCKX3 proteinu v *RSP::HvCKX3-GFP* transgenních liniích ječmene se z časového důvodu nepodařilo prokázat. Na základě výsledků z konfokální mikroskopie a dat však lze předpokládat, že se HvCKX3 protein tvoří, jeho funkčnost je však zatím neznámá.

7 LITERATURA

- Ackermann C. (1977): Pflanzen aus *Agrobacterium rhizogenes* tumorem aus *Nicotiana tabacum*. *Plant Science Letters* **8**, 23-30.
- Alpizar E., Dechamp E., Espeout S., Royer M., Lecouls A.C., Nicole M., Bertrand M., Lashermes P., Estienne H. (2006): Efficient production of *Agrobacterium rhizogenes*-transformed roots and composite plants for studying gene expression in coffee roots. *Plant Cell Reports* **25**, 959-967.
- Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Shaoyang L., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E.R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M. (2005): Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Science* **309**, 741-745.
- Bae E., Bingman C.A., Bitto E., Aceti D.J., Phillips G.N. (2007): Crystal structure of *Arabidopsis thaliana* cytokinin dehydrogenase. *Protein-Structure Function and Bioinformatics* **70**, 303-309.
- Barciszewski J., Siboska G.E., Pedersen B.O., Clark B.F., Rattan S.I. (1996): Evidence for the presence of kinetin in DNA and cell extracts. *FEBS Letters* **393**, 197-200.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood W.A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* **4**, 1-12.
- Bonaldi K., Gherbi H., Franche C., Bastien G., Fardoux J., Barker D., Giraud E., Cartieau F. (2010): The nod factor-independent symbiotic signaling pathway: development of *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation for legume *Aeschynomene indica*. *Molecular Plant-microbe Interactions* **23**, 1537-1544.
- Collier R., Fuchs B., Walter N., Lutke W. K., Taylor Ch.G. (2005): *Ex vitro* composite plants: an inexpensive, rapid method for root biology. *Plant Journal* **43**, 449-457.
- Crane C., Wright E., Dixon R.A., Wang Z-Y. (2006): Transgenic *Medicago truncatula* plants obtained from *Agrobacterium rhizogenes*-transformed hairy roots. *Planta* **223**, 1344-1354.
- Drake P.M.W., Madeira L.de M., Szeto T.H., Ma J.K-C. (2013): Transformation of *Althaea officinalis* L. by *Agrobacterium rhizogenes* for the production of transgenic roots expressing the anti-HIV microbicide cyanovirin-N. *Transgenic Research* **22**, 1225-1229.
- Dunwell J.M. (2009): Transgenic wheat, barley and oats: future prospects. In: *Methods in molecular biology, transgenic wheat, barley and oats* (Jones H.D., Shewry P.R., ed.), New York: Humana Press, c/o Springer Science and Business Media, 333-45.
- Estruch J.J., Schell J., Spena A. (1991): The protein encoded by the rolB plant oncogene hydrolyses indole glucosides. *EMBO Journal*. **10**, 3125-3128.
- Filippini F., Rossi V., Marin O., Trovato M., Costantino P., Downey P. M., Schiavo F. L., Terzi M. (1996): A plant oncogene as a phosphatase. *Nature* **379**, 499- 500.
- Fraaije M.W., Van Berkel W.J., Benen J.A., Visser J., Mattevi A. (1998): A novel oxidoreductase family sharing a conserved FAD-binding domain. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 206-207.
- Frébort I., Šebela M., Galuszka P., Werner T. (2002): Cytokinin oxidase/cytokinin dehydrogenase assay: optimized procedures and applications. *Analytical Biochemistry* **306**, 1-7.
- Frébortová J., Fraaije M.W., Galuszka P., Šebela M., Peč P., Hrbáč J., Novák O., Bilyeu K.D., English J.T., Frébort I. (2004): Catalytic reaction of cytokinin dehydrogenase: preference for quiones as electron acceptors. *Biochemical Journal* **380**, 121-130.
- Furtado A., Henry R.J., Pellerineschi A. (2009): Analysis of promoters in transgenic barley and wheat. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 240-253.
- Galuszka P., Frébort I., Šebela M., Sauer P., Jacobsen S., Peč P (2001): Cytokinin oxidase or dehydrogenase? Mechanism of cytokinin degradation in cereals. *European Journal of Biochemistry* **286**, 450-461.
- Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I. (2004): Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. Cloning and heterologous expression. *European Journal of Biochemistry/FEBS* **271**, 3990-4002.
- Galuszka P., Spíchal L., Kopečný D., Tarkowski P., Frébortová J., Šebela M., Frébort I. (2008): Metabolism of plant hormones cytokinins and their function in signaling, cell differentiation

- and plant development. In: *Studies in Natural Products Chemistry* 34. (Atta-ur-Rahman, ed.), Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko, 203-264.
- Gelvin S.B. (2003): *Agrobacterium* in the genomics age. *Plant Physiology* **150**, 1665-1676.
- Gelvin S.B. (2010): Plant protein involved in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *Annual Review Phytopathology* **48**, 45-68.
- Ge L., Yong J.W., Goh N.K., Chia L.S., Tan S.N., Ong E.S. (2005): Identification of kinetin and kinetin riboside in coconut (*Cocos nucifera* L.) water using a combined approach of liquid chromatography tandem mass spectrometry, high performance liquid chromatography, capillary electrophoresis. *Journal of Chromatography B-analytical technologies in the biomedical and life science* **829**, 26-34.
- Georgiev M.I., Pavlov A.I., Bley T. (2007): Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Applied Microbiology and Biotechnology* **74**, 1175-1185.
- Georgiev M., Müller J.L., Alipieva K., Lippert A. (2011): Sonication-assisted *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Verbascum xanthophoeniceum* Griseb. for bioactive metabolite accumulation. *Plant Cell Reports* **30**, 859-866.
- Harwood W. A., Bartlett J. G., Alves S. C., Perry M., Smedley M. A., Leyland N., Snape J. W. (2009): Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In: *Methods in Molecular Biology*. Vol. 478, *Transgenic Wheat, Barley and Oats* (Jones H. D., Shewry P. R. ed.), Humana Press, New York, USA, 137-147.
- Chandra S. (2012): Natural plant genetic engineer *Agrobacterium rhizogenes*: role of T-DNA in plant secondary metabolism. *Biotechnology Letters* **34**, 407-415.
- Christey M.C. (2001): Invited review: Use of ri-mediated transformation for production of transgenic plants. *In Vitro Cellular and Developmental Biology-Plant* **37**, 687-800.
- Imani J., Li L., Schäfer P., Kogel K-H. (2011): STARTS – A stable root transformation system for rapid functional analyse of proteins of the monocot model plant barley. *The Plant Journal* **67**, 726-735.
- Kakimoto T. (2001): Identification of plant cytokinin biosynthetic enzymes as dimethylallyl diphosphate: ATP/ADP isopentenyltransferases. *Plant and Cell Physiology* **42**, 677-685.
- Kamada H., Okamura N., Satake M., Harada H., Shimomura K. (1986): Alkaloid production by hairy root cultures in *Atropa belladonna*. *Plant Cell Reports* **5**, 239-242.
- Kasahara H., Takei K., Ueda N., Hishiyama S., Yamaya T., Kamiya Y., Yamaguchi S., Sakakibara H. (2004): Distinct isoprenoid origins of *cis*- and *trans*-zeatin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 14049-54.
- Kereszt A., Li D., Indrasumunar A., Nguyen C.D.T., Nontachaiyapoom S., Kinkema M., Gresshoff P.M. (2007): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of soybean to study root biology. *Nature Protocols* **2**, 948-952.
- Kurakawa T., Ueda N., Maekawa M., Kobayashi K., Kojima M., Nagato Y., Sakakibara H., Kyojuka J. (2007): Direct control of shoot meristem activity by a cytokinin-activating enzyme. *Nature* **445**, 652-655.
- Laule O., Fürholz A., Chang H.S., Zhu T., Wang X., Heifetz P.B., Grissem W., Lange B.M. (2003): Crosstalk between cytosolic and plastidial pathways of isoprenoid biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 6866-6871.
- Lee Y-C., Yang Y-C., Huang C-L., Kuo T-Y., Lin J-H., Yang D-M., Huang N-K. (2012): When cytokinin, a plant hormone, meets and adenosine A_{2A} receptor: A novel neuroprotectant and lead for treating neurodegenerative disorders? *PLoS One* **7**, 1-11.
- Lichtenhalter H.K. (1999): The 1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**, 47-65.
- Lombard J., Moreira D. (2011): Origins and early evolution of the mevalonate pathway of isoprenoid biosynthesis in the three domains of life. *Molecular Biology and Evolution* **28**, 87-99.
- Malito E., Coda A., Bilyeu K.D., Fraaije M.W., Mattevi A. (2004): Structures of Michaelis and product complexes of plant cytokinin dehydrogenase: implications for flavoenzyme catalysis. *Journal of Molecular Biology* **341**, 1237-1249.

- Mano Y., Nabeshima S., Matsui C., Ohkawa H. (1986): Production of tropane alkaloids by hairy root cultures of *Scopolia japonica*. *Agricultures and biological chemistry* **50**, 2715-2722.
- Mauro M.L., Trovato M., Paolis A.D., Gallelli A., Costantino P., Altamura M.M. (1996): The plant oncogene rolD stimulates flowering in transgenic tobacco plants. *Developmental Biology* **180**, 693–700.
- McCullen C.A., Binns A. (2006): *Agrobacterium tumefaciens* and plant cell interactions and activities required for interkingdom macromolecular transfer. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* **22**, 101-127.
- Meijer L., Raymond E. (2003): Roskovitin and other purines as kinase inhibitors. From starfish oocytes to clinical trials. *Accounts of chemical research* **36**, 417-425.
- Meyer A., Tempé J., Constantino P. (2000): Hairy root: a molecular overview. Functional analysis of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes. In: *Plant-microbe interactions 5*. (Stacey G., Keen N.T., ed), MN: APS Press, Saint Paul, 93-139.
- Miller C.O., Skoog F., von Saltza M.H., Strong F.M. (1955): Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *Journal of the American Chemical Society* **77**, 1392–1392.
- Morris R.O., Bilyeu K.D., Laskey J.G., Cheikh N.N. (1999): Isolation of gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **255**, 328-333.
- Moubayidin L., Di Mmbro R., Sabatini S. (2009): Cytokinin-auxin crosstalk. *Trends in Plant Science* **14**, 557-562.
- Mrázová K., Jiskrová E., Vyroubalová Š., Novák O., Ohnoutková L., Pospíšilová H., Frébort I., Harwood W.A., Galuzska P. (2013): Overexpression of cytosin dehydrogenase genes in barley (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise) fundamentally affects morphology and fertility. *PLoS One* **8**, 1-11.
- Mrázová K., Holásková E., Öz M.T., Jiskrová E., Frébort I., Galuzska P. (2014): Transgenic barley: A prospective tool for biotechnology and agriculture. *Biotechnology Advances* **32**, 137-157.
- Pitzschke A., Hirt H. (2010): New insight into an old story: *Agrobacterium* induced tumour formation in plants by plant transformation. *The EMBO Journal* **29**, 1021-1032.
- Riker A.J., Banfield W.M., Wright W.H., Keitt G.W. (1930): Studies on infectious hairy root of nursery apple trees. *Journal of Agricultural Research* **41**, 507–540.
- Rohmer M., Knani M., Simonin P., Sutter B., Sahm H. (1993): Isoprenoid biosynthesis in bacteria: a novel pathway for the early steps leading to isopentenyl diphosphate. *Biochemical Journal* **295**, 517-524.
- Runo S., Macharia S., Alakonya A., Machuka J., Sinha N., Scholes J. (2012): *Striga* parasitized transgenic hairy roots of *Zea mays* and provides a tool for studying plant-plant interactions. *Plant Methods* **8**, 1-20.
- Sevon N., Oskan-Caldentey K-M. (2002): *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation: root cultures as a source of alkaloids. *Journal of Medicinal Plant Research* **68**, 859-868.
- Shen W.H., Davioud E., David C., Barbier-Brygoo H., Tempe J., Guern J. (1990): High sensitivity to auxin is a common feature of hairy root. *Plant Physiology* **94**, 554–560.
- Shimizu-Sato S., Tanaka M., Mori H. (2009): Auxin-cytokinin interactions in the control of shoot branching. *Plant Molecular Biology* **69**, 429-435.
- Schmülling T., Fladung M., Grossmann K., Schell J. (1993) Hormonal content and sensitivity of transgenic tobacco and potato plants expressing single *rol* genes of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA. *Plant Journal* **3**, 371–382.
- Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., y Manns I.B. (2003): Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase gene of maize, rice, Arabidopsis and other species. *Journal of Plant Research* **116**, 241-252.
- Schmülling T. (2004): Cytokinin. In: *Encyclopedia of Biological Chemistry* (Lennarz W., Lane M.D., ed), Academic Press, Elsevier Science, London.

- Šmehilová M., Galuzska P., Bilyeu K. D., Jaworek P., Kowalska M., Šebela M., Sedlářová M., English J. T., Frébort I. (2009): Subcellular localization and biochemical comparison of cytosolic and secreted cytokinin dehydrogenase enzymes from maize. *Journal of experimental Botany* **60**, 2701-2712.
- Pačes V., Werstiuk E., Hall R.H. (1971): Conversion of N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenosin to adenosine by enzyme activity in tobacco tissue. *Plant Physiology* **48**, 775-778.
- Takei K., Sakakibara H., Sugiyama T. (2001): Identification of genes encoding adenylate isopentenyltransferase, a cytokinin biosynthesis enzyme, in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 26405-26410.
- Taylor C.G., Fuchs B., Collier R., Lutke W.K. (2006): Generation of composite plants using *Agrobacterium rhizogenes*. *Methods in Molecular Biology* **343**, 155-167.
- Veena V., Taylor Ch.G. (2007): *Agrobacterium rhizogenes*: recent developments and promising applications. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant* **43**, 383-403.
- Vilaine F., Charbonnier C., Casse-Delbart F. (1987): Further insight concerning the TL-region of the Ri plasmid of *Agrobacterium rhizogenes* strain A4: transfer of a 1.9 kb fragment is sufficient to induce transformed roots on tobacco leaf fragments. *Molecular Genetics and Genomics* **210**, 111-115.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10487-10492.
- Werner T., Motyka V., Laucou V., Smts R., Onckelen H.V., Schmülling T. (2003): Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alternations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- Werner T., Schmülling T. (2009): Cytokinin action in plant development. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 527-538.
- Werner T., Nehnevajova E., Novák O., Strnad M., Krämer U., Schmülling T. (2010): Root-specific reduction of cytokinin causes enhanced root growth, drought tolerance and leaf mineral enrichment in *Arabidopsis* and Tobacco. *Plant Cell* **22**, 3905-3920.
- White F.F., Taylor B.H., Huffman G.A., Gordon M.P., Nester E.W. (1985): Molecular and genetic analysis of the transferred DNA regions of the root-inducing plasmid of *Agrobacterium rhizogenes*. *Journal of Bacteriology* **164**, 33-44.
- Whitty C.D., Hall R.H. (1974): A cytokinin oxidase in *Zea mays*. *Canadian Journal of Biochemistry* **52**, 787-799.
- Yadav N.S., Vanderleyden J., Bennet D.R., Barnes W.M., Chilton M-D. (1982): Short direct repeats flank the T-DNA on a nopaline Ti plasmid. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **79**, 6322-6326.
- Zalabák D., Pospíšilová H., Šmehilová M., Mrízová K., Frébort I., Galuzska P. (2011): Genetic engineering of cytokinin metabolism: Prospective way to improve agricultural trans of crop plants. *Biotechnology Advances* **1**, 97-117.
- Zalabák D., Galuzska P., Mrízová K., Podlešáková K., Gu R., Frébortová J. (2014): Biochemical characterization of the maize cytokinin dehydrogenase family and cytokinin profiling in developing maize plantlets in relation to the expression of cytokinin dehydrogenase genes. *Plant Physiology and Biochemistry* **74**, 283-293.
- Zalewski W., Galuzska P., Gasparis S., Orczyk W., Nadolska-Orczyk A. (2010): Silencing of the *HvCKX1* gene decreases the cytosin oxidase/dehydrogenase level in barley and lead to higher plant productivity. *Journal of Experimental Botany* **61**, 1839-1851.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

APS	Persíran amonný
<i>A.thaliana</i>	<i>Arabidopsis thaliana</i>
<i>A.rhizogenes</i>	<i>Agrobacterium rhizogenes</i>
<i>A.tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
CDK	Cyklin-dependentní kinasy
CK	Cytokininy
CKX	Cytokinidehydrogenasa
CV-N	Cyanovirin N
CTRL	Kontrolní rostlina
DCPIP	2,6-dichlorofenol-indofenol
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMAPP	Dimethylallyl pyrofosfát
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraoctová kyselina
EF1	Gen kódující ječmenný elongační faktor
GFP	Zelený fluorescenční protein
GUS	β -glukoronidasa
HIV	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
HMBDP	1-hydroxy-2-methyl-2-(<i>E</i>)-butenyl 4-difosfát
Htt	Proteinu huntingtinu
HYG	Gen pro rezistenci na hygromycin
HvACT	Gen kódující ječmenný aktin
<i>HvCKX3</i>	Gen kódující ječmennou cytokinidehydrogenasu 3
<i>HvCKX2.2</i>	Gen kódující ječmennou cytokinidehydrogenasu 2.2
<i>Chv</i> geny	Specificky rozpoznávají poraněnou rostlinu
IPT	Adenosin-isopentenyltransferasa
iP	N^6 -isopentenyladenin
LOG	Lonely Guy
LB médium	Luria-Bertani médium
MEP	Methylerytritol-fosfátová dráha
MS médium	Murashige a Skoog médium
MVA	Mevalonátové dráhy
NCBI	National Center for Biotechnology Information

PHT	Promotor pro fosfátový transportér
PPM	(2S,4S)-(-)-4-difenyfosfino-2-(difenyfosfinometyl)pyrolidin
RAF	Promotor kořenového transkripčního fakturu
Ri-plasmid	„Root inducing“ plasmid
<i>Rol</i> gen	„root locus“
<i>RSP</i>	Pravděpodobný kořenově specifický promotor
SU	Superubikvitinový promotor
Q ₀	2,3-dimethoxy-5-methyl-1,4-benzochinon
qEF1	Gen kódující elongační faktor v rajčeti
qUBQ	Gen kódující ubikvitin
TBS-T	Solný roztok pufovaný Tris/HCl s Tweenem-20
TCA	Trichloroctová kyselina
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylendiamin
<i>tZ</i>	N ⁶ -(<i>Z</i> ² -isopentenyl)adeninu
Ubi	Ubikvitinový promotor
VIP	importin α
<i>Vir</i> geny	Geny virulence, které jsou součástí Ri plasmidu
WB	Western blotting
WT	Divoký typ rostliny (wild typ)