

Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2015

Kateřina Perničková

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Příprava transgenních cytoskeletálních
mutantů u rostliny *Arabidopsis thaliana***

Bakalářská práce

Kateřina Perníčková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2015

Vedoucí práce: Mgr. Anna Kuchařová, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky a za použití uvedených literárních zdrojů.

V Olomouci dne 30. 4. 2015

SOUHRN

Cytoskelet je jednou ze zásadních struktur eukaryotické buňky – poskytuje jí oporu, možnost reagovat na vnější podněty a transportovat makromolekulární látky nebo celé organely. Složky rostlinného cytoskeletu – mikrotubuly a aktinová mikrofilamenta – interagují s množstvím dalších proteinů a také spolu navzájem. Přípravou cytoskeletálních mutantů *Arabidopsis thaliana* exprimujících vybrané cytoskeletální markery především pro účely studia aktin-mikrotubulárních interakcí se zabývá tato bakalářská práce.

Mutantní rostliny exprimující cytoskeletální markery byly získány Agrobacteriem zprostředkovanou transformací rostlin *Arabidopsis* s mutovaným genem pro AKTIN 2 (mutace je dále označována jako *der* z anglického deformed root hair) metodou „floral dip“ s využitím konstruktů nesoucích cytoskeletální markery pro zviditelnění aktinového a/i mikrotubulárního cytoskeletu. *Der1-3* mutantní rostliny *Arabidopsis* byly také použity jako mateřské rostliny pro křížení s rostlinami exprimujícími cytoskeletální markery. U T1 a T2 generace získaných semen byla stanovena klíčivost a úspěšnost transformace či křížení a vybrané semenáčky byly poté analyzovány s pomocí konfokálního mikroskopu.

U studovaných rostlin byl pozorován neporušený aktinový cytoskelet, přestože byla potvrzena přítomnost mutantní alely *act2*. Mikrotubulární cytoskelet však vykazoval zvýšenou míru neuspořádanosti a depolymerizace. Tyto výsledky naznačují propojení obou složek cytoskeletu.

SUMMARY

Cytoskeleton is one of the very important part in the eukaryotic cell providing mechanical support, quick reaction to external stimuli and intracellular transport of macromolecules and whole organelles. Microtubules and actin microfilaments, two major components of the plant cytoskeleton, interact both with each other as well as with the large amount of other proteins. Theoretical background of this bachelor thesis is focused on plant cytoskeleton and methods for plant transgenesis. In the practical part, I prepared mutants of *Arabidopsis thaliana* expressing selected cytoskeletal markers using Agrobacterium mediated transformation and crossing methods. Preliminary microscopical observation were also done on T2 generation of transformants and crossed plants.

Mutant plants with expression of cytoskeletal markers were obtained via Agrobacterium-mediated transformation of *ACTIN2* (*ACT2*) mutant Arabidopsis plants (*der1-3*) using „floral dip“ method with constructs carrying cytoskeletal markers to visualize both actin and microtubules. *Der1-3* mutant plants were also used as maternal plants for crossing with plants expressing cytoskeletal markers. Transgenic mutant plants of T1 and T2 generation were analyzed in the confocal microscope.

Studied plants seemed to have intact actin cytoskeleton despite of confirmed presence of mutant *act2* allele. However, microtubular cytoskeleton showed increased bundle formation and disorganization and also increased depolymerization. These results suggest interconnection between both parts of cytoskeleton.

Poděkování

Ráda bych poděkovala především své školitelce Mgr. Anně Kuchařové, Ph.D., za velkou vstřícnost, pomoc, cenné rady a přátelský přístup při zpracovávání této bakalářské práce. Můj dík patří také všem milým lidem z Oddělení buněčné biologie Centra regionu Haná, zvláště pak doc. Mgr. Miroslavu Ovečkovi, Ph.D., a to za ochotu pomoci a poradit, kdykoli bylo potřeba. Rovněž bych chtěla poděkovat svým nejbližším za jejich neutuchající podporu.

Tato práce byla podpořena studentským projektem IGA PřF2015_015.

OBSAH

1	CÍL PRÁCE	8
2	ÚVOD	9
3	SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY	10
3.1	<i>ARABIDOPSIS THALIANA</i> , (L). HEYNH.	10
3.2	CYTOSKELET	10
3.2.1	<i>Mikrotubuly</i>	11
3.2.1.1	Mikrotubulární struktury v rostlinných buňkách	13
3.2.1.2	Proteiny interagující s mikrotubuly	15
3.2.2	<i>Aktinový cytoskelet</i>	16
3.2.2.1	Role ACT2 v polárním apikálním růstu kořenových vlásků	18
3.2.2.2	Proteiny asociované s aktinem	20
3.3	ŠLECHTĚNÍ A KŘÍŽENÍ ROSTLIN	22
3.4	VNÁŠENÍ TRANSGENŮ	23
3.4.1	<i>Přímé metody vnášení transgenů</i>	24
3.4.2	<i>Nepřímé metody vnášení transgenů</i>	25
3.4.2.1	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	25
3.4.2.2	Plazmid jako vektor	26
3.4.2.3	Selekce transformantů	27
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	29
4.1	MATERIÁL	30
4.1.1	<i>Použité chemikálie</i>	30
4.1.2	<i>Použité roztoky a média</i>	30
4.1.3	<i>Použité přístroje</i>	31
4.1.4	<i>Biologický materiál</i>	32
4.2	METODY	32
5	VÝSLEDKY	36
5.1	TRANSFORMACE <i>ARABIDOPSIS</i> METODOU „FLORAL DIP“	37
5.1.1	<i>Selekce der1-3 mutantních rostlin exprimujících selekční markery v T1 generaci transformovaných rostlin</i>	37
5.1.2	<i>Selekce a analýza der1-3 mutantních rostlin exprimujících cytoskeletální markery v T2 generaci transformovaných rostlin</i>	40
5.2	KŘÍŽENÍ ROSTLIN <i>ARABIDOPSIS</i>	43
5.2.1	<i>Klíčivost semen a exprese selekčních markerů v T1 generaci křížených rostlin</i> ..	43
5.2.2	<i>Klíčivost semen a exprese selekčních markerů v T2 generaci křížených rostlin</i> ..	46
6	DISKUZE	49
7	ZÁVĚR	52
8	LITERATURA	53
9	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ	66

1 CÍL PRÁCE

Teoretická část

1. Vypracování literární rešerše týkající se problematiky křížení *Arabidopsis thaliana* a vnášení transgenu do *Arabidopsis thaliana*.
2. Vypracování literární rešerše sumarizující poznatky o rostlinném cytoskeletu s důrazem na studované mutanty aktinového cytoskeletu.

Praktická část

1. Zvládnutí metody „floral dip“ a křížení u *Arabidopsis thaliana*.
2. Zvládnutí základů práce s konfokálním mikroskopem.

2 ÚVOD

Cytoskelet je velice důležitou součástí eukaryotické buňky. Poskytuje jí nejen oporu, ale díky své vysoké dynamičnosti umožňuje buňce také reagovat na podněty z jejího okolí, a to nejen svými mechanickými vlastnostmi, ale také prostřednictvím transportu organel nebo makromolekul, potřebných pro danou buněčnou odpověď. V živočišných buňkách se cytoskelet skládá z mikrotubulů, aktinových mikrofilament a intermediálních vláken. V rostlinách je situace poněkud odlišná: cytoskelet je zde převážně tvořen pouze dvěma složkami – mikrotubuly a aktinovými vlákny.

Různé typy cytoskeletálních struktur spolu mnohdy interagují. Nemohly by však plnit svou funkci, nebýt přítomnosti mnoha dalších specifických proteinů, které napomáhají cytoskeletálním vláknům při jejich stabilizaci, větvení, ukotvování, odbourávání, vzájemném propojování nebo při vazbě na transportované buněčné komponenty. Mezi tyto proteiny se řadí například motorové proteiny nebo proteiny asociované s mikrotubuly (jinak zvané MAPs) či aktinem.

S využitím moderních metod molekulární biologie mohou být vybrané proteiny upraveny tak, aby bylo možné je důkladněji studovat. Pomocí technologie rekombinantní DNA byly geny pro mikrotubul-vazebnou doménu MBD živočišného proteinu MAP4, aktin-vazebnou doménu fimbrinu (FABD2) či monomer tubulinu α pocházející z *Arabidopsis* modifikovány připojením fluorescenčních barviček, jako je zelený fluorescenční protein (GFP) nebo červeně fluoreskující mCherry. Následnou transformací *Arabidopsis* bakteriemi nesoucími tyto konstrukty dochází k začlenění upravených genů z bakteriálního plazmidu do genomu rostliny, kde mohou být poté exprimovány. Díky navázanému GFP a mCherry je možné ve fluorescenčním nebo konfokálním mikroskopu pozorovat lokalizaci označených proteinů v transgenních rostlinách a z toho usuzovat na chování mikrotubulů a aktinových vláken *in vivo*.

Kořenové vlásky jsou ve svém růstu silně ovlivňovány právě dynamikou cytoskeletu. Při mutaci v genu pro ACT2 vykazují kořenové vlásky *Arabidopsis* typický deformovaný fenotyp, podle něžž byly takto mutované rostliny pojmenovány *der* (deformed root hair).

V teoretické části této bakalářské práce je vypracována literární rešerše týkající se rostlinného cytoskeletu a možností transgenozy rostlin. Transformaci a křížení mutantních rostlin *Arabidopsis*, spolu s mikroskopickým pozorováním získaných mutantů exprimujících cytoskeletální markery, se věnuje praktická část práce.

3 SOUČASNÝ STAV PROBLEMATIKY

3.1 *Arabidopsis thaliana*, (L). Heynh.

Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*) je dvouděložná rostlina náležející do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*). Její rozšíření je celosvětové a lze ji nalézt na osluněných půdách v různých nadmořských výškách. V prostředí biologického výzkumu je velmi často využívána jako modelový genetický organismus, a to kvůli řadě výhod, jež oproti mnoha jiným rostlinám nabízí. Mezi tyto výhody patří její prostorová nenáročnost, krátká generační doba (za jeden rok je možné získat i několik generací rostlin), poměrně malý vzrůst, preferenční samosprašnost a jednoduchá křížitelnost a v neposlední řadě produkce vysokého počtu semen. V jádře buňky *Arabidopsis thaliana* je přítomno pouze pět chromozómů, což je další z důvodů její dobré využitelnosti ve výzkumu (Laibach, 1907; 1943). V roce 2000 byly publikovány výsledky sekvenování genomu *Arabidopsis thaliana*, zahrnující mimo jiné zjištění, že tento genom obsahuje celkem 25 498 genů, jež kódují proteiny z 11 000 rodin (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Jednalo se o první známou kompletní genomovou sekvenci rostlinného druhu a tato znalost umožňuje hlubší zkoumání *Arabidopsis* i ostatních eukaryotních organismů (Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Za referenční genotyp se na základě sekvenačních, biochemických a dalších analýz považuje ekotyp Columbia (Koornneef *et Meinke*, 2010). Dalšími ekotypy jsou například Landsberg *erecta*, Wassilewskija nebo C24 (Ringli *et al.*, 2002; Koornneef *et Meinke*, 2010).

3.2 Cytoskelet

Cytoskelet je přítomen ve všech eukaryotních buňkách a v analogii s živočišným tělem představuje kostru s tím zásadním rozdílem, že buněčná kostra je nestabilní a dynamická v závislosti na okamžitých potřebách buňky. Jak již z pojmenování vyplývá, plní cytoskelet především funkci mechanické opory, zvláště v živočišných buňkách, jimž na rozdíl od těch rostlinných neposkytuje oporu buněčná stěna. Další neméně důležitou funkcí cytoskeletu je zásadní uplatnění v intracelulárním transportu organel či makromolekul (Goode *et al.*, 2000). Cytoskelet je složitá trojrozměrná síť tvořená proteinovými vlákny, jež se rozprostírají v cytoplazmě. Tato proteinová vlákna mohou být tří typů, přičemž každý typ plní odlišnou funkci a je tvořen jinými základními stavebními jednotkami.

Mikrotubuly a aktinová vlákna lze najít v živočišných i rostlinných buňkách.

Intermediální filamenta, jež se se svým průměrem kolem 10 nm nacházejí někde mezi mikrotubuly (o průměru 25 nm) a tenkými vlákny aktinu (o průměru 7 nm), propůjčují buňkám mechanickou odolnost. V živočišných buňkách vytvářejí například síť obklopující jádro. Z intermediálních filament je rovněž vytvořena jaderná lamina, nacházející se pod jadernou membránou, které poskytuje oporu (Fiserova *et* Goldberg, 2010). Lamina však plní i jiné než jen mechanické funkce, například se podílí na prostorovém uspořádání chromatinu v jádře (Fiserova *et* Goldberg, 2010). Přítomnost laminy v rostlinných buňkách je stále předmětem výzkumu. V genomové databázi rostlin však zatím nebyly nalezeny žádné homology živočišných laminů (Fiserova *et* Goldberg, 2010). V jádrech BY-2 buněk tabáku byla nicméně pozorována síť vláken připojená k jaderné membráně a vykazující značnou podobnost se živočišnou laminou (Fiserova *et al.*, 2009).

Funkce dalších dvou složek cytoskeletu, mikrotubulární a aktinové, jsou rozmanité. U živočichů se například nacházejí stabilní mikrotubulární i aktinové struktury. Jsou to mikrotubuly tvořené řasinky, jejichž úkolem je rozpohybování tekutiny v okolí buňky, a bičíky, které pohybují celou buňkou, a aktinové kontraktilní aparáty svalových buněk živočichů. V následujících kapitolách teoretického úvodu se budu podrobněji věnovat mikrotubulárnímu a aktinovému cytoskeletu se zaměřením na rostlinnou buňku.

3.2.1 Mikrotubuly

Mikrotubuly jsou pevné polymerní struktury válcovitého charakteru s dutým vnitřním prostorem o vnějším průměru 25 nm a vnitřním průměru přibližně 14 nm (Tilney *et al.*, 1973). Jejich základními stavebními jednotkami jsou monomery α - a β -tubulinu. Tyto dva druhy tubulinu společně díky pevné nekovalentní vazbě vytvářejí heterodimery, jejichž spojováním vznikají polymerní protofilamenta. Každý z mikrotubulů pak obsahuje nejčastěji 13 paralelně uložených protofilament. V každém protofilamentu se podélně střídá α - a β -tubulin a z této struktury vyplývá polarita vlákn – na tzv. plus-konci se nachází β -tubulin, na minus-konci naopak α -tubulin (viz Obr. 1A, B). Název obou konců vychází ze skutečnosti, že na plus-konci dochází k rychlejšímu růstu (nebo odbourávání) mikrotubulu než na jeho minus-konci. Mikrotubuly mohou být minus-koncem ukotveny v mikrotubulárních nukleačních centrech, nazývaných také MTOCs (z anglického microtubule organizing centres).

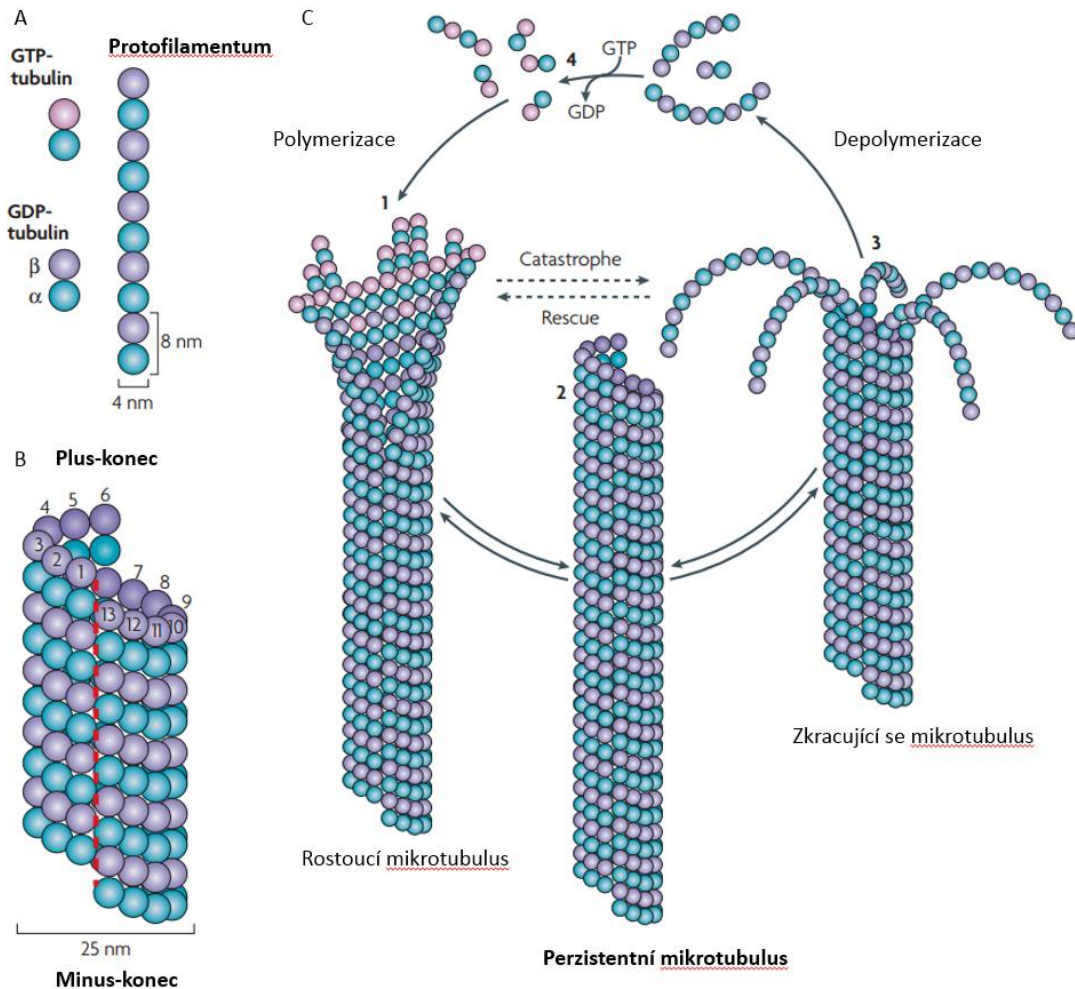
V živočišných buňkách jsou mikrotubuly organizovány z největšího MTOC, kterým je centrozóm – struktura nacházející se v blízkosti středu buňky (O'Toole *et al.*, 2012;

Xavier *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Chavali *et al.*, 2015). Odtud mikrotubuly vyrůstají směrem k buněčné periferii a vytvářejí tak polarizovanou síť drah pro intracelulární transport. V centrozómu je obsaženo velké množství γ -tubulinových prstenců, jež jsou tzv. nukleačními místy, tedy počátečními body pro růst mikrotubulu (O'Toole *et al.*, 2012; Xavier *et al.*, 2015; Fu *et al.*, 2015; Chavali *et al.*, 2015). γ -tubulin také umožňuje vytvoření zóny bez mikrotubulů v nitru centrozómu a je důležitý pro správnou morfologii konců mikrotubulů a pro jejich umístění na periferii centrozómu (O'Toole *et al.*, 2012). Vnitřní prostředí centrozómu, omezující polymerizaci mikrotubulů, dále v průběhu buněčného dělení zabraňuje předčasnému rozchodu centriol, nacházejících se v centrozómu (O'Toole *et al.*, 2012).

Pokud se jedná o rostlinné buňky, nejsou v nich přítomna striktně definovaná MTOCs. Mikrotubuly vyrůstají z nukleačních míst rozptýlených v různých částech buňky, například na jaderné membráně (Stoppin *et al.*, 1994), cytoplazmatické membráně (Schmit, 2002) nebo na membráně Golgiho komplexu (Drykova *et al.*, 2003; Vildanova *et al.*, 2014).

Typickou vlastností mikrotubulů je jejich dynamická nestabilita (Wade, 2009; Gardner *et al.*, 2013; Horio *et Murata*, 2014). Mikrotubuly přecházejí v závislosti na potřebě buňky z rostoucí fáze přes perzistentní mikrotubuly ke zkracujícím se polymerům. Zkracování může vyústit v totální kolaps mikrotubulu (tzv. „catastrophe“) či k obnově růstu (tzv. „rescue“). Dynamická nestabilita je způsobena skutečností, že tubulinové heterodimery mohou vázat GTP a následně jej hydrolyzovat na GDP. Tubulinové podjednotky nesoucí GTP se k sobě díky konformační změně váží pevněji než ty, které nesou GDP (Wade, 2009; Horio *et Murata*, 2014). Jestliže se podjednotky připojují na mikrotubulus větší rychlostí, než jakou probíhá hydrolyza GTP, budou protofilamenta stabilnější a mikrotubulus se může velmi rychle prodlužovat. Na jeho plus-konci vzniká tzv. GTP-čepička, která je tvořena podjednotkami tubulinu s navázaným GTP a chrání mikrotubulus před depolymerací. Pokud však nastane hydrolyza navázaného GTP dříve, než je připojena další podjednotka, bude mikrotubulus zakončen tubulinem nesoucím GDP, v důsledku čehož nastane odebrání tubulinových podjednotek a následný rozpad mikrotubulu (viz Obr. 1C). U neukotvených mikrotubulů, které hojně nacházíme v rostlinných buňkách, dochází díky zkracování na jednom konci a prodlužování na konci druhém ke kontinuálnímu posunu tubulinů, k vnitřnímu toku podjednotek. Tomuto jevu se říká „treadmilling“ (Kueh *et Mitchison*, 2009; Erlenkämper *et Kruse*, 2013).

Pokud mikrotubulus v průběhu svého růstu narazí na určitou molekulu nebo organelu, například na dynein v buněčném kortexu, může k ní být ukotven za vzniku poměrně stabilního spojení (Hendricks *et al.*, 2012). Tím je vytvořena polarizovaná dráha využitelná při buněčném transportu.



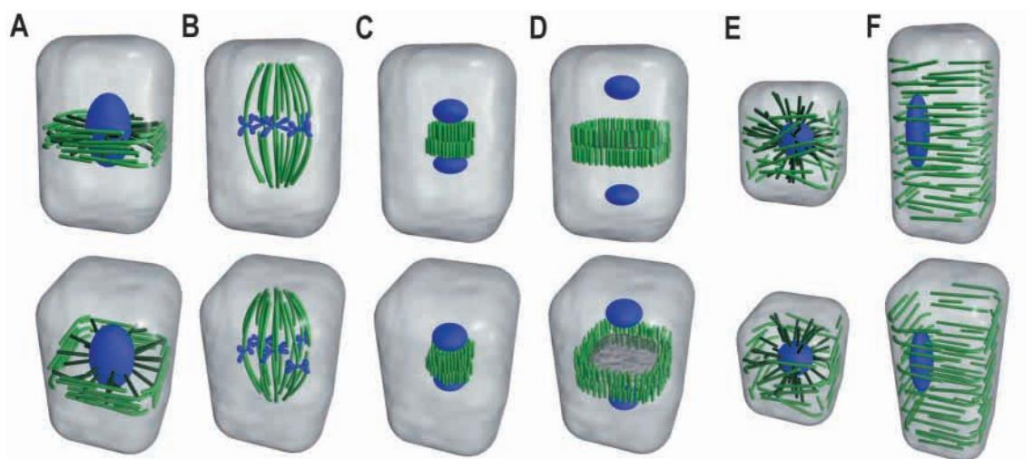
Obr. 1: Znázornění polymerizace tubulinu za vzniku mikrotubulu. A) Protofilamentum je tvořeno stabilními heterodimery α - a β - tubulinu. Na jeho plus-konci se nachází β -tubulin, na minus-konci α -tubulin. B) Cylindrický mikrotubulus je obvykle tvořen 13 paralelními protofilamenty. C) Polymerizace tubulinu za vzniku GTP-čepičky na perzistentním mikrotubulu vede k jeho „rescue“ a mikrotubulus roste. Při růstu pomalejším, než je hydrolýza GTP, dochází k depolymerizaci a „catastrophe“, mikrotubulus se zkracuje. Upraveno podle Akhmanova *et Steinmetz* (2008).

3.2.1.1 Mikrotubulární struktury v rostlinných buňkách

V rostlinných buňkách se v porovnání s těmi živočišnými nacházejí specifické mikrotubulární struktury. V interfázi jsou mikrotubuly organizovány pod plazmatickou membránou ve vysoce dynamických paralelních uskupeních, která ovlivňují buněčnou morfogenezi. Tyto mikrotubuly se nazývají kortikální mikrotubuly. Kortikální mikrotubuly vykazují nejenom vysokou dynamickou nestabilitu, ale také schopnost

lokálně se reorganizovat na základě momentálních potřeb buňky (Wasteneys *et al.*, 2009; Shaw, 2013). V průběhu buněčného cyklu při přechodu z interfáze do buněčného dělení se kortikální mikrotubuly koncentrují kolem jádra do kompaktního úzkého pásu paralelně uspořádaných mikrotubulů, tzv. předprofázního svazku (PPB), který určuje pozici budoucího buněčného dělení (Rasmussen *et al.*, 2013). Mikrotubuly předprofázního svazku se v dalším průběhu dělení rozpadají a reorganizují. Zanechávají nicméně stopu pro budoucí tvorbu buněčné přepážky (Rasmussen *et al.*, 2013). Kolem rozpadající se jaderné membrány se postupně tvoří bipolární acentrozomální dělicí vřeténko, v němž se mikrotubuly samy organizují a postupně pronikají k chromatinu, který také hraje v samoorganizaci mikrotubulů důležitou roli (Dinarina *et al.*, 2009). Po rozchodu chromozómů k opačným pólům vřeténka se v centru dělení začíná tvořit další, pro rostliny specifická mikrotubulární struktura – fragmoplast (Murata *et al.*, 2013). Fragmoplast je tvořen stabilními i dynamickými svazky antiparalelních mikrotubulů uspořádaných kolmo k budoucí centrifugálně expandující buněčné přepážce. Právě reorganizace minus-koncových nukleačních komplexů na již vytvořených mikrotubulech a následná nukleace nových mikrotubulů z těchto míst na vedoucím okraji fragmoplastu určuje centrifugální expanzi nově vznikající buněčné stěny mezi dvěma dceřinými buňkami (Murata *et al.*, 2013).

Přehled mikrotubulárních struktur v rostlinných buňkách je znázorněn na Obr. 2.



Obr. 2: Schematické znázornění rostlinných mikrotubulárních struktur v průběhu buněčného cyklu. A) Předprofázní svazek, naznačující místo buněčného dělení. B) Metafázní dělicí vřeténko s rozptýlenými polárními oblastmi. C) Fragmoplast, vytvářející se v telofázi mezi dceřinými jádry. D) Cytokinetický fragmoplast centrifugálně expanduje spolu se vznikající buněčnou přepážkou. E) Po dokončení cytokineze se mikrotubuly prodlužují směrem k buněčnému kortexu. Vznikají mikrotubuly asociované s cytoplazmatickou membránou. F) Paralelně uložené kortikální mikrotubuly v interfázní buňce. Upraveno podle Wasteneys (2002).

3.2.1.2 Proteiny interagující s mikrotubuly

Celá řada proteinů interagujících s tubuliny v heterodimerním nebo polymerním stavu zásadně ovlivňuje mechanické i funkční vlastnosti mikrotubulů. Významnou skupinu tvoří molekulové motory, specifické proteiny využívající polaritu mikrotubulů k transportu buněčného nákladu. Molekulové motory využívají energii získanou hydrolyzou ATP k vlastnímu pohybu po mikrotubulech (Vale, 2003; Hirokawa *et al.*, 2009). Přepravu buněčného nákladu na dlouhé vzdálenosti zprostředkovávají v rostlinných buňkách spíše aktinové molekulové motory (viz dále). Mikrotubulární motory, kineziny, hrají neméně důležitou roli v organizaci kortikálních mikrotubulů či při stavbě buněčné stěny (Kong *et al.*, 2015). Navíc jsou nepostradatelné při striktně řízených mikrotubulárních přestavbách v průběhu mitózy a cytokineze (Lee *et al.*, 2007; Lipka *et al.*, 2014). Kineziny se pohybují jak k plus-, tak k minus-konci mikrotubulů. V živočišných buňkách se kineziny pohybují převážně k plus-konci mikrotubulů, zatímco k minus-konci se pohybují motory zvané dyneiny (Marx *et al.*, 2005). V genomu buněk vyšších rostlin sekvence dyneinu chybí. V evoluci došlo k této ztrátě již u předchůdců červených řas a roli dyneinů převzala postupně se vyvíjející a rozrůstající rodina kinezinů (Richardson *et al.*, 2006; Wickstead *et Gull*, 2007).

Druhou, neméně významnou skupinou proteinů interagujících s mikrotubuly jsou tzv. proteiny asociované s mikrotubuly (MAPs z anglického microtubule-associated proteins). Tyto proteiny se významnou měrou podílejí na dynamické nestabilitě mikrotubulů. Různými způsoby totiž napomáhají jejich nukleaci, stabilizaci či destabilizaci, umožňují jejich ukotvení, spojování nebo rozvětvoování (Hamada, 2007; Horio *et Murata*, 2014).

Patří sem například +TIPs (plus-end tracking proteins), jež se hromadí u rostoucího plus-konce mikrotubulu a vyskytují se ve všech eukaryotních organismech (Schuyler *et Pellman*, 2001). Jako první +TIP byl u rostlin identifikován EB1 protein (Chan *et al.*, 2003). U *Arabidopsis* je rodina EB1 proteinů zastoupena třemi izoformami, EB1a, EB1b a EB1c (Chan *et al.*, 2003). EB1a a EB1b proteiny jsou vysoce homologní, v aminokyselinové sekvenci jsou identické ze 78 %. Oba na plus-konci mikrotubulů tvoří „kometku“ a jsou často využívány ve studiu cytoskeletu k vizualizaci plus-konce mikrotubulů. Například pro studium v živých buňkách jsou EB1 proteiny tagované různými spektrálními variantami GFP (Ambrose *et Wasteneys*, 2014). Ze skupiny MAPs se také často jako marker mikrotubulů využívá protein MAP65, pravděpodobně specifický pouze pro rostliny. Tento protein pomáhá tvořit svazky mikrotubulů

v interfázních buňkách, ale také v předprofázním svazku (Chan *et al.*, 1999; Smertenko *et al.*, 2000; Wasteneys, 2002). Jeden z nejznámějších konstruktů, využívaných k vizualizaci mikrotubulů a jejich pohybů v živých buňkách, připravili Marc *et al.* (1998). Konstrukt se skládá z mikrotubul-vazebné domény (MBD) savčího proteinu MAP4 fúzovaného s GFP. MBD doména je vysoce konzervovaná, a tak se konstrukt ze savčího proteinu váže i na rostlinné mikrotubuly (Granger *et al.*, 2000; Komis *et al.*, 2014). MBD-GFP byl poprvé využit tranzientně v buňkách listů bobu obecného (Marc *et al.*, 1998).

3.2.2 Aktinový cytoskelet

Na rozdíl od mikrotubulů, aktinová vlákna jsou mnohem tenčí (mají průměr cca 7 nm), pružnější a v buňce jsou přítomna v mnohonásobně větším množství. Kvůli svému malému průměru bývají také označovány jako mikrofilamenta. Obvykle vytvářejí sítě nebo svazky, které mají podstatně vyšší pevnost než samostatná vlákna. Aktin má v rostlinných buňkách klíčovou roli v koordinaci exocytózy a endocytózy. Zprostředkovává tzv. cyklózu, organizované proudění cytoplazmy, díky němuž dochází k rychlé distribuci živin, metabolitů a případně váčků na dlouhé vzdálenosti. Dále se významně podílí na polaritě buněk, se kterou je úzce spjatý tzv. apikální růst pylových láček, trichomů a kořenových vlásků (podrobněji viz kapitola 3.2.2.1).

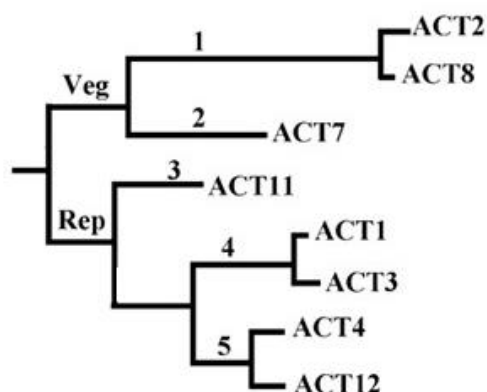
Stejně jako mikrotubuly, i aktinové filamentum je polymerní vlákno. Základní stavební jednotkou je monomerní, vysoce konzervovaný ATP-vázající globulární aktin (neboli G-aktin) o molekulové hmotnosti 43 kDa (Staiger *et al.*, 2006). Polymerizací molekul G-aktinu vzniká fibrilární aktin (F-aktin). Polymerizace molekul G-aktinu může nastat spontánně, při vysoké koncentraci G-aktinu. Takto ale aktin v živých systémech téměř nebývá polymerizován, jakkoli je právě v rostlinných buňkách procento G-aktinu mnohem vyšší než procento F-aktinu (Staiger *et al.*, 2006). Spontánní polymerizaci brání proteiny asociované s aktinem (viz dále; Hussey *et al.*, 2006). Aktinové mikrofilamentum je tvořeno dvěma řetězci F-aktinu, které se vzájemně obtácejí za vzniku pravotočivé šroubovice. Z prostorového uspořádání aktinových monomerů v řetězci vyplývá polarita filamenta. Monomery se k sobě váží v jednom směru, ATP-vazebnou doménou směřující k pomaleji rostoucímu konci protofilamenta. Proto nejen u mikrotubulů, ale i u aktinových vláken rozlišujeme jejich dynamičtější plus-konec (roztřepený) a méně dynamický minus-konec (zašpičatělý; Staiger *et al.*, 2009). Také proces polymerizace probíhá u mikrofilament podobně jako

u mikrotubulů. Monomerní G-aktin nese navázaný ATP, jak je vidět na Obr. 4. Po připojení monomeru k aktinovému řetězci nastává hydrolyza navázaného ATP za vzniku ADP, čímž dochází ke snížení pevnosti vazby mezi aktinovými monomery. Jestliže tedy hydrolyza nastane dříve, než je k vláknu připojena další podjednotka, řetězec se začne rozpadat. Dynamika aktinových vláken, popsána jako „stochastická dynamika“ (Staiger *et al.*, 2009), probíhá velmi rychle a na různých místech v buňce zároveň. Smertenko *et al.* (2010) představili pomocí konfokální mikroskopie a total internal reflection fluorescence microscopy v rostlinách *Arabidopsis* a v tabákových kulturách model této dynamické reorganizace aktinu založený na recyklaci fragmentů polymerního F-aktinu.

Stejně jako na mikrotubulech, i na aktinu se aktivního transportu buněčného nákladu účastní molekulové motory. Motory transportující náklad podél mikrofilament patří do skupiny myozinů (DePina *et Langford*, 1999; Tominaga *et Nakano*, 2012).

Počet izotypů aktinu v rostlinném genomu se liší. Ke komplexnímu pochopení nejenom struktury, ale i funkce a případné redundance jednotlivých paralogů a ortologů aktinu zbývá ještě dlouhá cesta (Schwarzerová *et al.*, 2010). U *Arabidopsis* lze nalézt deset genů pro aktin (ACT), z nichž osm je aktivních – *ACT1*, *ACT2*, *ACT3*, *ACT4*, *ACT7*, *ACT8*, *ACT11* a *ACT12* (Huang *et al.*, 1997; Cvrčková *et al.*, 2004). *ACT5* a *ACT9* jsou tzv. pseudogeny, nebyla u nich prokázána exprese proteinu (Huang *et al.*, 1997; Cvrčková *et al.*, 2004). Obecně jsou zástupci rodiny aktinových proteinů u krytosemenných rostlin děleni na vegetativní a generativní větev, nejinak je tomu i u zástupců rodiny osmi aktinových proteinů u modelové rostliny *Arabidopsis* (McDowell *et al.*, 1996; Meagher *et al.*, 1999; Bhattacharya *et al.*, 2000; Kandasamy *et al.*, 2009). Do první zmiňované skupiny patří *ACT2* a *ACT8*, které jsou ve své struktuře téměř identické (liší se pouze jedním aminokyselinovým zbytkem; Kandasamy *et al.*, 2009), a dále *ACT7* (McDowell *et al.*, 1996; Meagher *et al.*, 1999; Šlajcherová *et al.*, 2012). Evoluční vztahy mezi jednotlivými aktinovými proteiny jsou znázorněny na Obr. 3. T-DNA mutace v jednotlivých genech pro tyto proteiny studovali Gilliland *et al.* (1998). Rostliny navenek nevykazovaly výrazný fenotyp, ukázalo se však, že v kompetici s okolními nemutovanými rostlinami mají nižší fitness ve sporofytickém období životního cyklu, což se projevovalo zrychleným vymizením mutantních homozygotních rostlin v potomstvu v rozporu s Mendelovými zákony (Gilliland *et al.*, 1998). V dalších filialních generacích se frekvence homozygotů dále snižovala a do

deseti generací vymizela mutantní alela zcela. V následujícím textu se budu podrobněji věnovat roli vegetativního ACT2 ve vývoji kořenového vlásku.



Obr. 3: Vztahy mezi aktinovými proteiny. Ve vegetativní větvi (Veg) rozlišujeme dvě podskupiny, ve větvi generativní (Rep) pak tři podskupiny izovariant proteinu. Upraveno podle Kandasamy *et al.* (2009).

3.2.2.1 Role ACT2 v polárním apikálním růstu kořenových vlásků

Aktinová vlákna mají nezanedbatelný podíl na polárním buněčném růstu (Smertenko, 2010). Jeho extrémní formou je apikální růst, pozorovaný v kořenových vláscích, trichomech a v pylové láčce. Apikální růst vyžaduje přesun vezikul s materiálem pro tvorbu nové buněčné stěny a jejich následnou fúzi s buněčnou stěnou na vzdáleném konci buňky (Yang, 1998; Wang *et al.*, 2013).

Velmi vhodným modelem pro pozorování buněčného růstu jsou kořenové vlásky. Nejsou totiž obklopeny jinými buňkami, které by jejich růst omezovaly, takže jakékoli odchylky od normálu jsou na nich dobře pozorovatelné. Epidermální kořenové buňky, z nichž se budou vyvíjet kořenové vlásky, se nazývají trichoblasty. Buňky, které vlásky nevytvářejí, nazýváme atrichoblasty. Zda se buňka stane trichoblastem, záleží na jejím umístění a na signálech přijímaných od spodních kortikálních buněk: epidermální buňky, nacházející se v kontaktu s periklinální buněčnou stěnou mezi dvěma sousedními kortikálními buňkami, se vyvíjejí v trichoblasty, zatímco buňky, sousedící s buněčnou stěnou jediné kortikální buňky, se stávají atrichoblasty (Dolan *et al.*, 1993). Trichoblast je možné rozeznat už před začátkem tvorby kořenového vlásku, a to podle vyšší hustoty cytoplazmy a většího počtu vakuol (Dolan *et al.*, 1994; Galway *et al.*, 1994). Vývoj kořenového vlásku lze obecně rozdělit do tří fází: 1) vznik drobného hrbolku na distálním konci epidermální buňky; 2) pomalý vývoj kořenového vlásku vrcholovým růstem; 3) zrychlení růstu a plné vyvinutí kořenového vlásku (Dolan *et al.*, 1994). Na tvorbě kořenových vlásků se podílí několik genů, například *RHL1-3*, *WER*,

TTG či *ERH3*; mutace v těchto lokusech vedou ke vzniku vlásků v ektopické pozici nebo k jejich sníženému počtu (Schneider *et al.*, 1997; Lee *et Schiefelbein*, 1999; Walker *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 2002).

Ringli *et al.* (2002; 2005) izolovali a charakterizovali několik typů mutantních rostlin s porušeným vývojem kořenových vlásků a zvlněným fenotypem kořínků. Mutaci nazvali *der* – tento název pochází z anglického *deformed root hair* a vyjadřuje skutečnost, že mutanti mají zkrácené a deformované kořenové vlásky. Pomocí genetického screeningu spojeného se sekvenací lokusů s předpokládanou mutací bylo zjištěno, že *der* mutantní rostliny vykazovaly recesivní mutaci v genu pro ACT2, který je důležitý v průběhu celého vývoje kořenových vlásků (Ringli *et al.*, 2002). V rámci *der1* bylo identifikováno několik alelických mutantů, označovaných *der1-1*, *der1-2* a *der1-3*. Nalezené mutace v aminokyselinovém řetězci ACT2 proteinu u tří popisovaných linií odpovídaly velmi konzervovaným místům. Zatímco u *der1-1* (alanin v pozici 183 mutovaný na valin) se mutace projevovala jen slabě, v případě *der1-2* (arginin v pozici 97 mutovaný na histidin) a *der1-3* (arginin v pozici 97 mutovaný na cystein) byl fenotyp podstatně silnější – kořenové vlásky byly oproti kontrolním rostlinám výrazně zkrácené, často s rozšířenou bází. U všech tří typů *der1* občas docházelo k chybnému umístění celého procesu tvorby kořenových vlásků, a to spíše do střední části trichoblastu místo do jeho distálního konce. Podle Ringliho *et al.* (2002) se vliv *der1* mutace omezuje pouze na kořenové vlásky, protože nezaznamenali žádné defekty ve fenotypu trichomů, které – podobně jako kořenové vlásky – nejsou obklopeny okolními buňkami, takže případné odchylky by bylo možné u nich pozorovat. Obecně se tedy dá říci, že mutace v ACT2 poškozují jak ukládání stavebního materiálu nutného k tvorbě nové buněčné stěny, tak samotné určení místa na trichoblastu, kde se vlasek zakládá. Komplementace poškozeného ACT2 jinými vegetativními ACT (ACT8 a ACT7) byla provedena. Kandasamy *et al.* (2009) ukázali, že ACT2 a ACT8, nikoli však ACT7, se mohou plně komplementovat. V živém systému je tato komplementace pravděpodobně znemožněna různými expresními profily jednotlivých izotypů (An *et al.*, 1996).

Ringli *et al.* (2005) popsali také osm dalších recesivních mutantů *der2-9*, přičemž pět z nich představuje další genové lokusy zapojené do vývoje kořenových vlásků. Tito mutanti vykazují mnoho odlišných fenotypů, podle nichž je lze rozdělit do dvou skupin: 1) *der2*, *der5*, *der6*, *der8* a *der9*, které mívají jen velmi krátké pahýly nebo zhroucené kořenové vlásky; 2) *der3*, *der4* a *der7*, jež vytvářejí kořenové vlásky regulérním

způsobem, avšak v případě *der3* může docházet k jejich větvení, v případě *der4* a *der7* ke zkrácení oproti wild-type rostlinám (Ringli *et al.*, 2005). Pomocí křížení s *der1-2* Ringli *et al.* (2005) zjistili, že různé *der* mutace ovlivňují vývoj kořenových vlásků v různých fázích.

Stejným způsobem jako kořenové vlásky se vyvíjí také pylová láčka (Cai *et al.*, 1997), některé *der* mutace by tedy mohly narušit i její růst. Na rozdíl od kořenových vlásků je pylová láčka pro rostliny nezbytná při rozmnožování. Změněná segregace alel, pozorovaná v F2 generaci některých typů *der* mutantů, může být zapříčiněna sníženou viabilitou pylových zrn, méně pravděpodobně pak poškozeným vývojem samičího gametofytu (Ringli *et al.*, 2005).

3.2.2.2 Proteiny asociované s aktinem

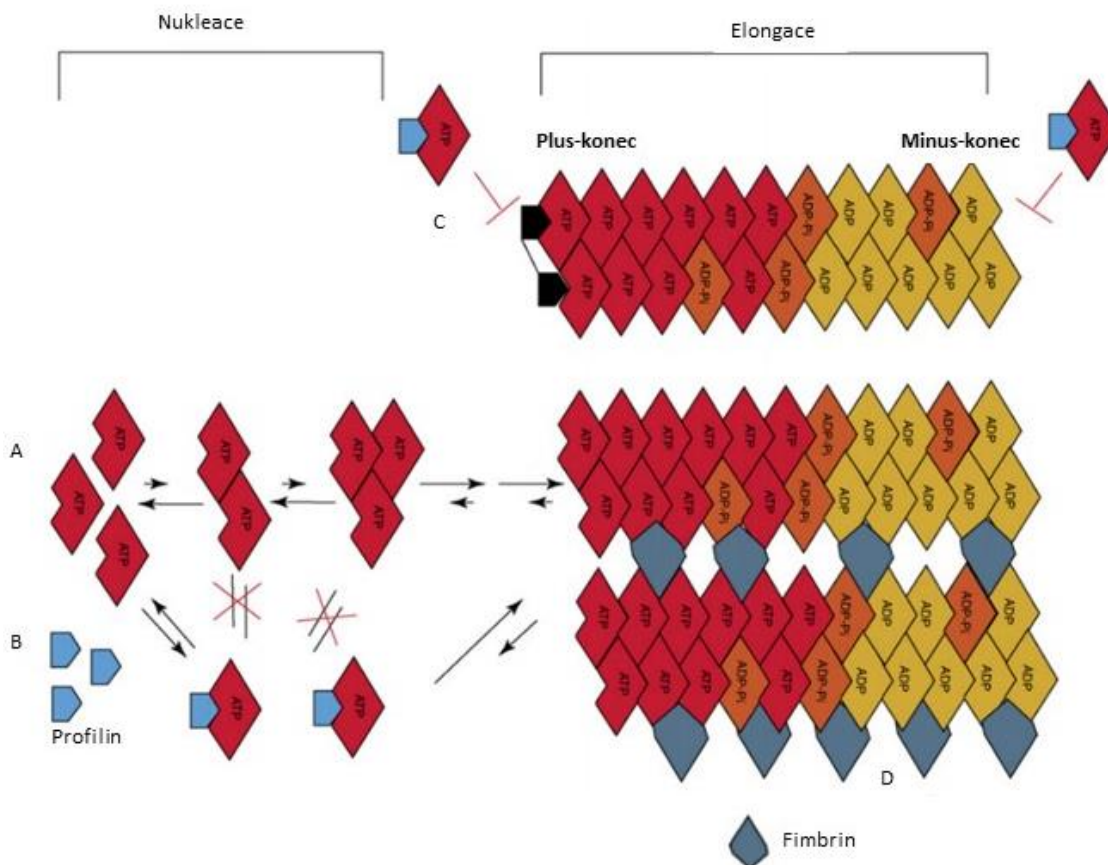
Organizace aktinového cytoskeletu je významně ovlivněna přítomností regulačních proteinů, které vymezují množství F- a G-aktinu nacházejícího se v buňce. Díky kompletnímu osekvenování genomu *Arabidopsis* mohlo dojít k nalezení mnoha genů, kódujících aktin-vazebné proteiny (Hussey *et al.*, 2006). Interakcí těchto regulačních proteinů s G- nebo F-aktinem může být podpořena polymerizace nebo naopak depolymerizace mikrofilament. Na nukleaci aktinu a větvení aktinových vláken se podílejí ARP2/3 komplexy, na nukleaci aktinu bez vlivu na větvení se podílejí forminy (Frank *et al.*, 2004; Blanchoin *et al.*, 2010). Profiliny vyvazují G-aktin a brání tak polymerizaci vláken (viz Obr. 4B; Wang *et al.*, 2005). Fragmentaci a destabilizaci aktinových vláken způsobují proteiny ADF/cofilin (McCurdy *et al.*, 2001). Podrobněji se zde budu zabývat aktin-svazkujícím proteinem fimbrinem (viz Obr. 4B), který je v široké cytoskeletální komunitě využíván ke značení aktinových vláken *in vivo* (Kovar *et al.*, 2001). Jedná se o protein chránící aktinová vlákna před depolymerizací vyvolanou profilinem a fungující nezávisle na přítomnosti vápenatých iontů (Kovar *et al.*, 2000). Fimbrin obsahuje dvě aktin-vazebné domény (nazývané také FABD z anglického fimbrin actin-binding domain), z nichž jedna může být využita pro fúzi s GFP (Ketelaar *et al.*, 2004; Sheahan *et al.*, 2004). Díky takto fluorescenčně značenému fimbrinu lze snáze detekovat mikrofilamenta v živých rostlinných buňkách.

Sheahan *et al.* (2004) pozorovali expresi konstruktů GFP-FABD2 v transformovaných rostlinách *Arabidopsis* a zjistili, že prostřednictvím GFP jsou označeny jemné i husté sítě kortikálního i subkortikálního aktinu, a to bez negativních následků na vývoj nebo morfologii rostlin.

Wang *et al.* (2007) využili pro vytvoření FABD2 spojeného s GFP tří různých konstruktů, v nichž byl GFP v tandemu nebo samostatně vázán na oba konce FABD2. Pro srovnání transformovali *Arabidopsis* konstruktem s jedním GFP pouze na C-konci podle Wanga *et al.* (2004) a také konstruktem s GFP pouze na N-konci FABD2 podobným konstruktům popsaným Sheahanem *et al.* (2004) a Voigtem *et al.* (2004).

Wang *et al.* (2007) nepozorovali v T1 generaci rozdíl ve fluorescenci mezi rostlinami, exprimujícími na jednom konci FABD2 GFP v tandemu, a těmi, jež na jednom konci exprimovaly jeden GFP. Semenáčky exprimující GFP na obou koncích FABD2 vykazovaly buď velmi silnou, nebo naopak velmi slabou fluorescenci podle toho, zda exprimovaly GFP v tandemu, nebo samostatně (Wang *et al.*, 2007). Nebyly identifikovány linie se střední fluorescencí, jež by byly trvale vhodné pro mikroskopii (Wang *et al.*, 2007).

S regulací aktinového cytoskeletu je těsně spojen růst trichomů a kořenových vlásků (Djakovic *et al.*, 2006; Ketelaar *et al.*, 2007). To je zřejmě důvodem, proč se v těchto buňkách po transformaci rostliny konstruktem GFP-FABD2 objevují defekty jako zkrácení kořenových vlásků a rozvětvení trichomů, související se změněnou dynamikou mikrofilament (Wang *et al.*, 2007). Linie GFP-FABD2 také vykazují inhibovaný auxinový transport a pohyblivost organel (Holweg, 2007).



Obr. 4: Polymerizace aktinového mikrofilamenta. A) V nepřítomnosti aktin-vazebných proteinů je polymerizace aktinových filamentů limitována termodynamicky nevýhodným krokem nukleace. B) Profilin navázaný na monomery aktinu zabraňuje spontánní nukleaci tím, že inhibuje tvorbu dimerů a trimerů. Komplex profilin-aktin se však může účastnit elongace na plus-konci již existujícího mikrofilamenta. C) Přítomnost aktivního „capping“ proteinu zabraňuje připojení profilin-aktinového komplexu na plus-konec filamenta a udržuje tak v buňce volný nepolymerizovaný aktin. D) Aktinová filamenta mohou vytvářet svazky v přítomnosti aktin-svazkujících proteinů, jako je např. fimbrin. Upraveno podle Staiger *et* Blanchoin (2006).

3.3 Šlechtění a křížení rostlin

V této kapitole bych ráda pojednala o raných základech manipulace s genetickým kódem v živém organismu. Cílená manipulace s genetickým kódem v širším smyslu slova se objevila již s nástupem zemědělství v neolitu. Neolitický člověk při pěstování obilovin nebo luštěnin zcela logicky vybíral zrna z nejlepších plodin a položil tak základ vědnímu oboru šlechtění. Ke konci 17. století došlo ve studiu rostlin k velkému průlomům. Rudolph Jakob Camerarius popsal existenci pohlavnosti u rostlin. Toto poznání otevřelo nové obzory ve šlechtitelství a připravilo půdu pro rozsáhlé pokusy s křížením rostlin, které je bohatě využíváno dodnes. Křížením (hybridizací) rozumíme záměrné spojení genetické informace rodičovských rostlin nesoucích požadované

znaky. Hybridní potomstvo nese znaky a vlastnosti rodičů v různých kombinacích. Cílem křížení není pouze zesilovat požadované znaky, ale také zeslabovat až eliminovat znaky nežádoucí. Opat augustiánského kláštera Gregor Johann Mendel publikoval v roce 1866 stěžejní dílo *Versuche über Pflanzehybriden*, kde popsal základy dědičnosti (Mendel, 1866; Westerlund *et* Fairbanks, 2010). Ke znovuobjevení jeho díla o křížení a segregaci došlo v roce 1900, a to hned třemi na sobě nezávisle publikujícími autory, jimiž byli Carl Correns, Hugo De Vries a Erich Tschermak (Correns, 1900; de Vries, 1900; Tschermak, 1900). Následoval rozkvět manipulace s genetickou variabilitou a cílevědomé šlechtění mnoha rostlin.

Křížení dělíme na vnitrodruhové a vzdálené (mezidruhové – interspecifické, a mezirodové – intergenerické).

Vnitrodruhovým křížením vznikají odrůdy a linie jednoho druhu. Podstatou křížení je opylení květů mateřské rostliny pylem rostliny otcovské. Technika křížení je volena podle různých aspektů (morfologie květu či biologie kvetení), musí se však vždy řídit následujícími požadavky: 1) dostatečně brzy odstranit prašníky mateřské rostliny, aby se zabránilo samosprašení; 2) izolovat křížené květy, potažmo celé křížené rostliny – to zabrání nežádoucímu „cizímu“ opylení; 3) zajistit kvalitní dozrání pylu otcovské rostliny.

Vzdálené křížení je provázáno řadou překážek. Už z morfologického hlediska dochází k prezygotické nezkřížitelnosti (různá doba kvetení, stavba květu). Postzygotická nezkřížitelnost se vyznačuje např. narušením vývoje embrya nebo endospermu či tvorbou scvrklých a neklíčivých semen. Dalším problémem, pokud se podaří dosáhnout první generace hybridů, je sterilita první generace, kterou lze obejít polyploidizací této generace za vzniku amfidiploidní rostliny, která už je dále fertilní.

V praktické části své bakalářské práce jsem křížila dvě transgenní linie rostliny *Arabidopsis thaliana* s cílem získat cytoskeletální mutanty exprimující cytoskeletální markery. Techniku křížení popisují v metodické a výsledkové části práce.

3.4 Vnášení transgenů

Moderní metody genového inženýrství navazují na tradici šlechtění a křížení transgenozí, cílenou manipulací s genomem daného druhu. Transgenoze je proces, při němž je do cílového organismu vnášena cizorodá genetická informace. Účelem takového zásahu do genomu organismu je získání vlastností, kterých by nebylo možné klasickým šlechtěním dosáhnout. V roce 1983 byl do rostlinného genomu vnesen

bakteriální gen podmiňující rezistenci vůči kanamycinu - neomycinfosfottransferáza II (Fraley *et al.*, 1983). Z hlediska užitkových plodin se často jedná o geny rezistence vůči herbicidům, hmyzím škůdcům nebo nepříznivým klimatickým podmínkám, případně o geny zvyšující nutriční hodnotu jejich plodů nebo jiných částí využívaných jako potraviny. Mezi takto upravené a v mnoha zemích pěstované zemědělské plodiny patří sója, rýže či kukuřice. Transgenní rostliny jsou však hojně produkovány také v rámci výzkumných projektů, neboť výrazně rozšiřují možnosti studia buněčných procesů. Ke vnášení transgenů se využívají různé metody (viz Obr. 5). U přímých metod probíhá transformace vpravením „nahé“ DNA do organismu pomocí fyzikálních a chemických metod. Nepřímé metody využívají ke vpravení cizorodé DNA do organismu vektory, například bakterie rodu *Agrobacterium*.

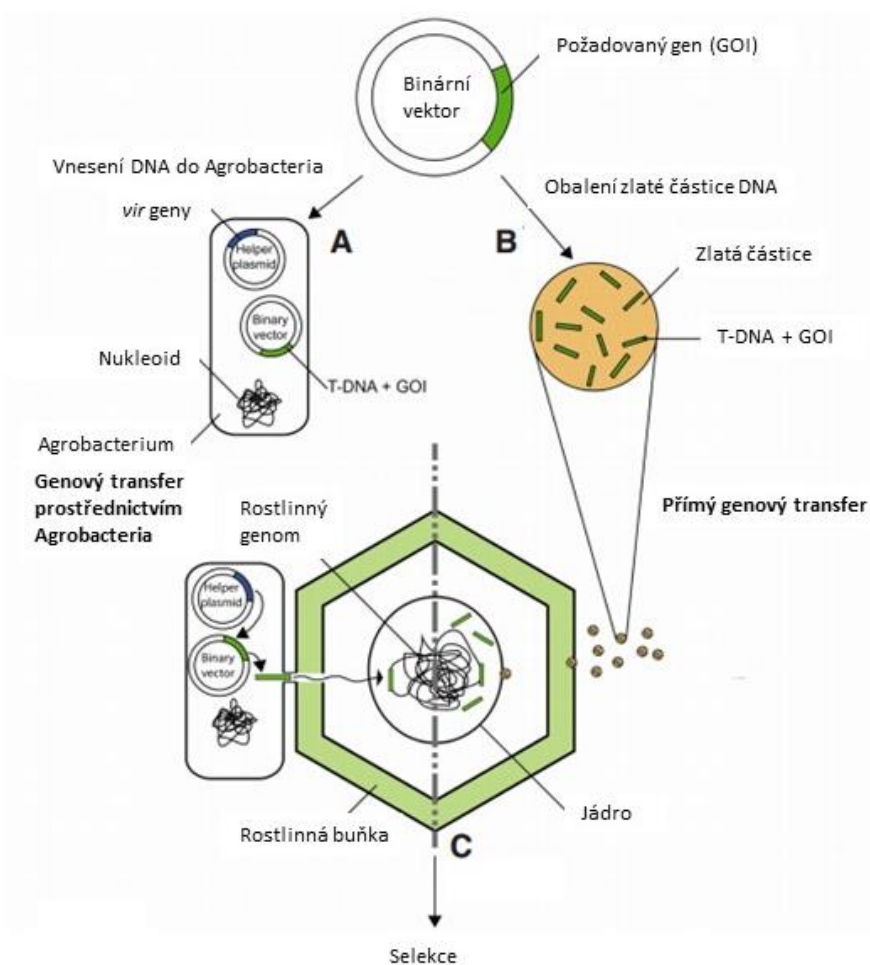
3.4.1 Přímé metody vnášení transgenů

Jak již bylo řečeno, přímá metoda transgenoze využívá vnesení „nahé“ DNA do organismu. DNA by měla být připravena ve vysoké koncentraci. Přímými metodami můžeme transformovat protoplasty, ale i pletiva intaktních rostlin.

Protoplasty mohou být transformovány za využití vysokého osmotického tlaku. DNA je do protoplastů vpravována za přítomnosti polyetylglykolu a dvojmocných kationtů vápníku. Polyetylglykol narušuje cytoplazmatickou membránu (Abel *et Theologis*, 1994; Liu *et Vidali*, 2015) a umožňuje tak vstup a integraci cizorodé DNA. Metoda může být využita transientně, ale také stabilně, zde je ovšem nutné překonat náročnou regeneraci protoplastů.

Další metodou je elektroporace. Tou lze transformovat jak rostlinné buňky, tak protoplasty. Průnik DNA do buňky umožňuje vysokonapěťový elektrický impuls, který destabilizuje plazmatickou membránu (McCormack *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2003).

Velmi efektivní a široce využívanou metodou je tzv. biolistika (particle bombardment) – bombardování tkáně nebo pletiva částicemi zlata nebo wolframu, na nichž je nabalena DNA. Po nastřelení DNA do buněk vysokou rychlostí se DNA uvolňuje a integruje do genomu cílové buňky (Klein *et al.*, 1992; Ivo *et al.*, 2008).



Obr. 5: Znázornění přímé a nepřímé metody vnášení transgenů. A) *Agrobacterium* zprostředkovaná transformace. B) Přímá transformace biolistickou metodou. Upraveno podle Anami *et al.* (2013).

3.4.2 Nepřímé metody vnášení transgenů

Nepřímou metodou transformace je vytvoření vektoru, pomocné molekuly DNA nesoucí požadovaný gen, a jeho vnesení do cílového organismu. Jako vektory mohou být využity plazmidy bakterií rodu *Agrobacterium*, transpozony či virové částice. Blíže se zde budu věnovat transformaci pomocí bakterií rodu *Agrobacterium*.

3.4.2.1 *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je gramnegativní bakterie tyčinkovitého tvaru z čeledi *Rhizobiaceae*. Jedná se o jeden z půdních druhů bakterií, způsobujících morfogenetické změny u dvouděložných rostlin. Výskyt patogenních kmenů *Agrobacteria* v půdě může kolísat v průběhu ročních období (Krimi *et al.*, 2002). Podobně jako jiné bakterie, i *Agrobacterium* obsahuje ve své buňce kromě nukleoidu ještě plazmidy – malé molekuly DNA, nesoucí doplňkovou genetickou informaci. Tumor-indukující (Ti)

plazmid *Agrobacteria* umožňuje vložení části své genetické informace do genomu hostitelské rostliny. Ti plazmid však není přítomen u všech kmenů *Agrobacteria* (Krimi *et al.*, 2002). Část Ti plazmidu, vkládaná do hostitelského genomu, se nazývá T-DNA (transferred DNA) a po vložení je rostlinným transkripčním a translačním aparátem exprimována za vzniku enzymů, způsobujících nekontrolovatelnou produkci hormonů auxinu a cytokininu, a dále enzymů pro syntézu opinů, látek využívaných bakteriemi jako zdroj energie. V důsledku těchto procesů vzniká na kořenech napadené rostliny nádor. Pro svou schopnost integrace části genetické informace do genomu rostliny je Ti plazmid často využíván při genetických modifikacích.

3.4.2.2 Plazmid jako vektor

Vložením DNA viru mozaiky květáku a viru proužkovitosti kukuřice do T-DNA Ti plazmidu *Agrobacteria* a následnou inokulací rostlinných buněk těmito bakteriemi bylo zjištěno, že došlo ke včlenění virové DNA do rostlinného genomu – inokulované rostliny totiž vykazovaly známky příslušné virové infekce (Grimsley *et al.*, 1986, 1987; Nester, 2014). Takto transformované buňky se však vymykají kontrole buněčného dělení a stávají se z nich nádory, neboť jsou do jejich genomu integrovány stále i bakteriální geny způsobující tumorogenezi. Řešením tohoto problému bylo nalezení genů na Ti plazmidu, jež odpovídají za vznik nádorů, a jejich následná delece (Zambryski *et al.*, 1983; Zambryski, 2013). Tyto deletované geny nejsou postrádány, neboť k přenesení T-DNA do rostlinného genomu jsou zapotřebí pouze její hraniční sekvence o délce 25 párů bazí (Lee *et Gelvin*, 2008; Bartlett *et al.*, 2014). Část plazmidu, nazývaná oblast virulence, kóduje proteiny (*vir* proteiny) využívané při integraci T-DNA do genomu rostlinné buňky (Lee *et Gelvin*, 2008; Lacroix *et Citovsky*, 2009). Těchto vlastností Ti plazmidu se využívá při konstrukci binárních vektorů, jež jsou tvořeny dvěma molekulami DNA. Na jedné z nich se nacházejí geny virulence, na druhé pak T-DNA (Lee *et Gelvin*, 2008). Pokud jsou obě molekuly přítomné v téže buňce *Agrobacteria*, mohou *vir* proteiny působit na T-DNA a umožnit tak její přenos do rostlinné buňky (Lee *et Gelvin*, 2008).

Pro odlišení úspěšně transformovaných rostlin se do plazmidu vkládají geny rezistence k antibiotickým nebo jiným látkám, které nedovolí růst netransformovaných buněk a rostlin. Často používaný je gen rezistence vůči kanamycinu, získaný z transpozónu 5 bakterie *Escherichia coli* (Beck *et al.*, 1982). Produktem exprese tohoto genu je neomycin-fosfotransferáza II, jinak nazývaná také aminoglykosid 3'-

fosfotransferáza II, enzym způsobující fosforylaci kanamycinu a dalších antibiotik a tím i jejich inaktivaci (Berg *et al.*, 1975; Ghanem, 2011). Další možností je vložení genu rezistence pro fosfotricin (PPT). Takový gen kóduje PPT acetyltransferázu, enzym připojující acetylovou skupinu na koncovou aminoskupinu ve sloučenině PPT, čímž dochází k inaktivaci herbicidu (Kang *et al.*, 2003).

Z důvodu rozdílných promotorových sekvencí i terminačních transkripčních signálů u prokaryot a eukaryot je nutné kódující sekvenci genu opatřit rostlinným promotorem a rostlinnými terminačními signály namísto původních bakteriálních. Hojně používaný je například 35S promotor viru mozaiky kvěťáku (Franck *et al.*, 1980; Meijer *et al.*, 1991; Debnam *et al.*, 2004). Obklopením prokaryotických kódujících sekvencí eukaryotickými regulačními oblastmi vzniká konstrukt nazývaný chimérický selekční markerový gen.

Vložení celého inzertu, obsahujícího požadované geny a vybrané geny rezistence, do Ti plazmidu se provádí rekombinací nebo pomocí restrikčních endonukleáz. Jedná se o enzymy schopné štěpit dvouvláknovou DNA na určitých místech díky rozpoznávání specifické cílové sekvence.

Po získání plazmidu s vloženým inzertem je nutné jej vpravit do bakteriálních buněk. To lze provést elektroporací nebo chladovou transformací (McCormack *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2003). Na vhodném selekčním médiu je pak možné rozeznat kolonie úspěšně transformovaných bakterií, které jsou po namnožení použitelné k transformaci rostlin. Široce využívanou metodou transformace rostlin *Arabidopsis*, kterou jsem využila i já v praktické části své bakalářské práce, je metoda „floral dip“ (Clough *et al.*, 1998; Davis *et al.*, 2009). Využívá namáčení mladých květů *Arabidopsis* do suspenze *Agrobacteria* za přítomnosti surfaktantu. Metoda funguje i na jiné rostlinné druhy, např. vojtěšku (Trieu *et al.*, 2000), len (Bastaki *et al.*, 2014) nebo rajče (Yasmeen *et al.*, 2009). Vytvořením specifických podmínek je možné *Agrobacteriemi* transformovat také rostliny jednoděložné, to však většinou vyžaduje využití supervirulentních kmenů *Agrobacteria* (Ziemienowicz *et al.*, 2012).

3.4.2.3 Selekce transformantů

Za účelem selekce transformovaných rostlin je vhodné používat takové látky, které způsobují smrt normálních buněk (a tedy i rostlin) pomalu. Jestliže totiž buňka zemře rychle, uvolní se z ní do okolí látky působící toxicky na ostatní buňky, třebaže tyto jsou

k selekčnímu činidlu rezistentní. Z používaných selekčních látek uvádím dvě z těch, které jsem sama ve své praktické části bakalářské práce využívala:

Kanamycin je aminoglykosid s antibiotickými účinky produkovaný bakterií *Streptomyces kanamyceticus* (Umezawa *et al.*, 1957; Yanai *et Murakami*, 2004). Na základě restričního mapování bylo zjištěno, že shluk genů pro biosyntézu tohoto antibiotika obsahuje 24 genů (Yanai *et Murakami*, 2004). Kanamycin se váže do aminokyselinového místa ribozómů, čímž způsobuje chybné čtení nukleotidové sekvence (Recht *et al.*, 1996; Mentewab *et al.*, 2014). Rostliny na médiu s tímto antibiotikem mohou sice vypadat bez symptomů, avšak dochází u nich k deregulaci 116 genů (Mentewab *et al.*, 2014). Patří mezi ně geny kódující proteiny potřebné pro fotosyntézu, dále proteiny nutné při transportu iontů kovů a také enzymy oxidačně-redukčních reakcí (Mentewab *et al.*, 2014).

PPT je produkován bakteriemi *Streptomyces viridochromogenes* a *Streptomyces hygroscopicus* (Bayer *et al.*, 1972; Schwartz *et al.*, 2005). Komerčně se prodává například pod názvem Basta. Mechanismus jeho účinku funguje na základě inhibice enzymu glutaminsyntetázy (Forlani *et al.*, 2006). Tento enzym je nezbytný pro metabolismus amoniaku a uplatňuje se při fotosyntéze (Mifflin *et Habasz*, 2002), při jeho inhibici se tedy v rostlině hromadí amonné ionty (Schwartz *et al.*, 2005), selhává fotosyntéza a rostlina postupně hyne.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

5 VÝSLEDKY

6 DISKUZE

7 ZÁVĚR

Za účelem studia aktin-mikrotubulárních interakcí v rostlinné buňce byla v rámci této bakalářské práce provedena Agrobacteriem zprostředkovaná transformace *der1-3* mutantních rostlin *Arabidopsis* metodou „floral dip“, a to s použitím konstruktů nesoucích cytoskeletální markery: 35S::MBD-GFP a 35S::FABD2-GFP. Rostliny *Arabidopsis* nesoucí *der1-3* mutaci v genu pro ACT2 byly také použity jako mateřské rostliny pro křížení s rostlinami exprimujícími cytoskeletální markery MBD-GFP, FABD2-GFP a FABD2-GFP-mCherry-TUA5.

Provedení transformace i křížení bylo úspěšné. Výsledkem bylo získání *der1-3* mutantních semen, nesoucích cytoskeletální markery. Rostliny T1 a T2 generace byly poté analyzovány za pomoci stereomikroskopu a konfokálního mikroskopu.

Vzhledem k tomu, že nebyl znám vliv PPT na fenotyp rostlin a transformované rostliny byly selektovány na ½ MS médiu s obsahem tohoto selekčního agens, byl proveden také kontrolní výsev rostlin spolu s výsevem na médium bez PPT. Žádný vliv PPT na mutantní fenotyp rostlin však nebyl pozorován.

Rostliny T1 generace získané křížením *der1-3* mutantních rostlin s rostlinami exprimujícími cytoskeletální markery nevykazovaly *der1-3* mutantní fenotyp kořenového vlášení, což bylo zřejmě způsobeno jejich heterozygotností. V T2 generaci křížených rostlin již byl mutantní fenotyp identifikován.

Aktinový cytoskelet studovaných křížených a transformovaných rostlin nejevil žádné známky poškození, navzdory mutaci v *ACT2* genu, potvrzené přítomností *der* fenotypu. Mikrotubulární cytoskelet se v porovnání s kontrolními rostlinami zdál méně uspořádaný, více svazkující a depolymerizující. V rostlinách s mutovaným *ACT2* genem tedy dochází k narušení mikrotubulů, což podobně jako publikované výsledky jiných autorů poukazuje na propojení aktinové a mikrotubulární složky cytoskeletu. Pro skutečné pochopení jejich interakcí je však nezbytné provedení detailnějších analýz.

8 LITERATURA

- Abel S., Theologis T. (1994): Transient transformation of Arabidopsis leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J.* 5: 421-427.
- Akhmanova A., Steinmetz M. O. (2008): Tracking the ends: a dynamic protein network controls the fate of microtubule tips. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 9: 309-22.
- Ambrose C., Wasteneys G. O. (2014): Microtubule Initiation from the Nuclear Surface Controls Cortical Microtubule Growth Polarity and Orientation in Arabidopsis thaliana. *Plant Cell Physiol.* 55:1636-45.
- An Y. Q., McDowell J. M., Huang S., McKinney E. C., Chambliss S., Meager R. B. (1996). Strong, constitutive expression of the Arabidopsis ACT2/ACT8 actin subclass in vegetative tissues. *Plant J.* 10: 107-121.
- Anami S., Njuguna E., Coussens G., Aesaert S., Van Lijsebettens M. (2013): Higher plant transformation: principles and molecular tools. *Int J Dev Biol.* 57: 483-94.
- Áy Z., Mihály R., Cserháti M., Kótai É., Pauk J. (2012): The Effect of High Concentrations of Glufosinate Ammonium on the Yield Components of Transgenic Spring Wheat (*Triticum aestivum* L.) Constitutively Expressing the bar Gene. *The Scientific World Journal.* 2012: 657945.
- Bartlett J. G., Smedley M. A., Harwood W. A. (2014): Analysis of T-DNA/Host-Plant DNA Junction Sequences in Single-Copy Transgenic Barley Lines. *Biology.* 3: 39-55.
- Bastaki N. K., Cullis C. A. (2014): Floral-dip transformation of flax (*Linum usitatissimum*) to generate transgenic progenies with a high transformation rate. *J Vis Exp.* (94).
- Bayer E., Gugel K. H., Hägele K., Hagenmaier H., Jessipow S., König W. A., Zähler H. (1972): Stoffwechselprodukte von Mikroorganismen. 98. Mitteilung. Phosphinothricin und Phosphinothricyl-Alanyl-Alanin. *Helv Chim Acta.* 55: 224-239.
- Beck E., Ludwig G., Auerswald E. A., Reiss B., Schaller H. (1982): Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene.* 19: 327-36.
- Berg D. E., Davies J., Allet B., Rochaix J. D. (1975): Transposition of R factor genes to bacteriophage X. *Proc Natl Acad Sci USA.* 72: 3628-3632.

- Bhattacharya D., Aubry J., Twait E. C., Jurk S. (2000): Actin gene duplication and the evolution of morphological complexity in land plants. *J Phycol.* 36: 813-820.
- Blanchoin L., Staiger C. J. (2010): Plant formins: diverse isoforms and unique molecular mechanism. *Biochim. Biophys. Acta* 1803: 201-206.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16: 735-743.
- Collings D. A. (2008): *Crossed-Wires: Interactions and Cross-Talk Between the Microtubule and Microfilament Networks in Plants*. V publikaci: Nick P, ed. *Plant microtubules*. Berlin, Heidelberg: Springer Verlag. 47-79.
- Correns C. (1900): G. Mendel's Regel über das Verhalten der Nachkommenschaft der Rassenbastarde. – *Ber. Dtsch. Bot. Ges.* 8: 158-168.
- Cvrčková F., Rivero F., Bavlínka B. (2004): Evolutionarily conserved modules in actin nucleation: lessons from *Dictyostelium discoideum* and plants. *Protoplasma* 224: 15-31.
- Davis A. M., Hall A., Millar A. J., Darrah C., Davis S. J. (2009): Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods*. 5: 3.
- Debnam P. M., Fernie A. R., Leisse A., Golding A., Bowsher C. G., Grimshaw C., Knight J. S., Emes M. J. (2004): Altered activity of the P2 isoform of plastidic glucose 6-phosphate dehydrogenase in tobacco (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun) causes changes in carbohydrate metabolism and response to oxidative stress in leaves. *Plant J.* 38: 49-59.
- de Vries H. (1900): Das Spaltungsgesetz der Bastarde. – *Ber. Dtsch Bot. Ges.* 18: 83-90.
- DePina A. S., Langford G. M. (1999): Vesicle transport: the role of actin filaments and myosin motors. *Microsc Res Tech.* 47: 93-106.
- Dinarina A., Pugieux C., Corral M. M., Loose M., Spatz J., Karsenti E., Nédélec F. (2009): Chromatin shapes the mitotic spindle. *Cell* 138: 502-513.
- Djakovic S. N., Dyachok J., Burke M. P., Frank M. J., Smith L. G. (2006): BRICK1/HSPC300 acts with SCAR and the ARP2/3 complex to regulate epidermal cell shape in *Arabidopsis*. *Development* 133: 1091-1100.

- Dolan L., Duckett C. M., Grierson C., Linstead P., Schneider K., Lawson E., Dean C., Poethig S, Roberts K (1994): Clonal relationships and cell patterning in the root epidermis of Arabidopsis. *Development* 120: 2465-2474.
- Dolan L., Janmaat K., Willemsen V., Linstead P., Poethig S., Roberts K., Scheres B. (1993): Cellular organization of the Arabidopsis thaliana root. *Development*. 119: 71-84.
- Drykova D., Cenklova V., Sulimenko V., Volc J., Draber P., Binarova P. (2003): Plant gamma-tubulin interacts with alphabeta-tubulin dimers and forms membrane associated complexes. *Plant Cell*. 15: 465-80.
- Erlenkämper C., Kruse K. (2013): Treadmilling and length distributions of active polar filaments. *J. Chem. Phys.* 139: 164907.
- Fiserova J., Kiseleva E., Goldberg M. W. (2009): Nuclear envelope and nuclear pore complex structure and organization in tobacco BY-2 cells. *Plant J*. 59: 243-255.
- Fiserova J., Goldberg M. W. (2010): Relationships at the nuclear envelope: lamins and nuclear pore complexes in animals and plants. *Biochem Soc Trans*. 38: 829-831.
- Forlani G., Obojska A., Berlicki L., Kafarski P. (2006): Phosphinothricin Analogues as Inhibitors of Plant Glutamine Synthetases. *J. Agric. Food Chem*. 54: 796-802.
- Fraley R. T., Rogers S. G., Horsch R. B., Sanders P. R., Flick J. S., Adams S. P., Woo S. C. (1983): Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 80: 4803-4807.
- Franck A., Guilley H., Jonard G., Richards K., Hirth L. (1980): Nucleotide sequence of cauliflower mosaic virus DNA. *Cell*. 21: 285-94.
- Fu J., Hagan I. M., Glover D. M. (2015): The centrosome and its duplication cycle. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 5: a015800.
- Frank M., Egile C., Dyachok J., Djakovic S., Nolasco M., Li R., Smith L. G. (2004). Activation of Arp2/3 complex-dependent actin polymerization by plant proteins distantly related to Scar/WAVE. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 16379-16384.

- Galway M. E., Masucci J. D., Lloyd A. M., Walbot V., Davis R. W., Schiefelbein J. W. (1994): The TTG gene is required to specify epidermal-cell fate and cell patterning in the Arabidopsis root. *Dev. Biol.* 166: 740-754.
- Gardner M. K., Zanic M., Howard J. (2013): Microtubule Catastrophe and Rescue. *Curr Opin Cell Biol.* 25: 14–22.
- Ghanem S. (2011): Cloning of the nptII gene of Escherichia coli and construction of a recombinant strain harboring functional recA and nptII antibiotic resistance. *Genet. Mol. Res.* 10 (3): 1445-1454.
- Gilliland L. U., McKinney E. C., Asmussen M. A., Meagher R. B. (1998): Detection of deleterious genotypes in multigenerational studies: disruptions in individual Arabidopsis actin genes. *Genetics.* 149: 717-725.
- Goode B. L., Drubin D. G., Barnes G. (2000): Functional cooperation between microtubule and actin cytoskeletons. *Curr Opin Cell Biol.* 12: 63-71.
- Granger C. L., Cyr R. J. (2000): Microtubule reorganization in tobacco BY-2 cells stably expressing GFP-MBD. *Planta.* 210: 502-509.
- Grimsley N., Hohn B., Hohn T., Walden R. (1986): Agroinfection, a novel route for plant viral infection using Ti plasmid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 83: 3282-3286.
- Grimsley N., Hohn T., Davies J. W., Hohn B. (1987): Agrobacterium-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature.* 325: 177-179.
- Gutierrez R., Lindeboom J. J., Paredes A. R., Emons A. M. C., Ehrhardt D. W. (2009): Arabidopsis cortical microtubules position cellulose synthase delivery to the plasma membrane and interact with cellulose synthase trafficking compartments. *Nat Cell Biol.* 11: 797-806.
- Hamada T. (2014): Lessons from in vitro reconstitution analyses of plant microtubule-associated proteins. *Front Plant Sci.* 5: 409.
- Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinnall S., Gray J. C., Cottage A. (2006): A rapid and robust method of identifying transformed Arabidopsis thaliana seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods.* 2: 19.

- Hendricks A. G., Lazarus J. E., Perlson E., Gardner M. K., Odde D. J., Goldman Y. E., Holzbaur E. L. F. (2012): Dynein Tethers and Stabilizes Dynamic Microtubule Plus-Ends. *Curr Biol.* 22: 632-637.
- Hirokawa N, Noda Y, Tanaka Y, Niwa S (2009): Kinesin superfamily motor proteins and intracellular transport. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 10: 682-696.
- Holweg C. L. (2007): Living markers for actin block myosin-dependent motility of plant organelles and auxin. *Cell Motil Cytoskeleton* 64: 69-81.
- Horio T., Murata T. (2014): The role of dynamic instability in microtubule organization. *Front Plant Sci.* 5: 511.
- Huang S. R., An Y. Q., McDowell J. M., McKinney E. C., Meagher R. B. (1997): The Arabidopsis ACT11 actin gene is strongly expressed in tissues of the emerging inflorescence, pollen, and developing ovules. *Plant Mol Biol.* 33: 125-139.
- Hussey P. J., Ketelaar T., Deeks M. J. (2006): Control of the actin cytoskeleton in plant cell growth. *Annu Rev Plant Biol.* 57: 109-125.
- Chan J., Jensen C. G., Jensen L. C., Bush M., Lloyd, C. W. (1999): The 65-kDa carrot microtubule-associated protein forms regularly arranged filamentous cross-bridges between microtubules. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 14931-14936.
- Chan J., Calder G. M., Doonan J. H., Lloyd C. W. (2003): EB1 reveals mobile microtubule nucleation sites in Arabidopsis. *Nat Cell Biol.* 5: 967-971.
- Chavali P. L., Peset I., Gergely F. (2015): Centrosomes and mitotic spindle poles: a recent liaison? *Biochem Soc Trans.* 43: 13-8.
- Ivo N. L., Nascimento C. P., Vieira L. S., Campos F. A., Aragão F. J. (2008): Biolistic-mediated genetic transformation of cowpea (*Vigna unguiculata*) and stable Mendelian inheritance of transgenes. *Plant Cell Rep.* 27: 1475-83.
- Kandasamy M. K., McKinney E. C., Meagher R. B. (2009): A Single Vegetative Actin Isovariant Overexpressed under the Control of Multiple Regulatory Sequences Is Sufficient for Normal Arabidopsis Development. *The Plant Cell.* 21: 701-718.
- Kang T. J., Seo J. E., Loc N. H., Yang M. S. (2003): Herbicide resistance of tobacco chloroplasts expressing the bar gene. *Mol Cells.* 16: 60-66.

- Ketelaar T., Allwood E. G., Anthony R., Voigt B., Menzel D., Hussey P. J. (2004): The actin-interacting protein AIP1 is essential for actin organization and plant development. *Curr Biol.* 14: 145-9.
- Klein T. M., Arentzen R., Lewis P. A., Fitzpatrick-McElligott S. (1992): Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology.* 10: 286-291.
- Klotz J., Nick P. (2011): A novel actin-microtubule crosslinking kinesin, NtKCH, functions in cell expansion and division. *New Phytol.* 2012. 193: 576-89. Epub 2011.
- Komis G., Mistrik M., Samajova O., Duskocilova A., Ovecka M., Illes P., Bartek J., Samaj J. (2014): Dynamics and organization of cortical microtubules as revealed by superresolution structured illumination microscopy. *Plant Physiol.* 165: 129-148.
- Koornneef M., Meinke D. (2010): The development of Arabidopsis as a model plant. *Plant J.* 61: 909-921.
- Kovar D. R., Staiger C. J., Weaver E. A., McCurdy D. W. (2000): AtFim1 is an actin filament crosslinking protein from Arabidopsis thaliana. *Plant J.* 24: 625-636.
- Kovar D. R., Gibbon B. C., McCurdy D. W., Staiger C. J. (2001): Fluorescently-labeled fimbrin decorates a dynamic actin filament network in live plant cells. *Planta.* 213: 390-395.
- Krimi Z., Petit A., Mougel C., Dessaux Y., Nesme X. (2002): Seasonal fluctuations and longterm persistence of pathogenic populations of Agrobacterium spp. in soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 3358-3365.
- Kueh H. Y., Mitchison T. J. (2009): Structural Plasticity in Actin and Tubulin Polymer Dynamics. *Science.* 325: 960-963.
- Lacroix B., Citovsky V. (2009): Agrobacterium aiming for the host chromatin: Host and bacterial proteins involved in interactions between T-DNA and plant nucleosomes. *Commun Integr Biol.* 2: 42-45.
- Laibach F. (1907): Zur Frage nach der individualität der Chromosomen im Pflanzenreich. *Beit. Bot. Zentralbl.* 22: 191-210.

- Laibach F. (1943): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. Als Objekt für genetische und entwicklungsphysiologische Untersuchungen. Bot. Arch. 44: 439-455.
- Lee Y.-R. J., Li Y., Liu B. (2007): Two *Arabidopsis* Phragmoplast-Associated Kinesins Play a Critical Role in Cytokinesis during Male Gametogenesis. *Plant Cell*. 19: 2595-2605.
- Lee L.-Y., Gelvin S. B. (2008): T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Phys*. 146: 325-332.
- Lee M. M., Schiefelbein J. (1999): WEREWOLF, a MYB-related protein in *Arabidopsis*, is a position-dependent regulator of epidermal cell patterning. *Cell*. 99: 473-483.
- Lin L., Liu Y. G., Xu X., Li B. (2003): Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100: 5962-5967.
- Lipka E., Gadeyne A., Stöckle D., Zimmermann S., De Jaeger G., Ehrhardt D. W., Kirik V., Van Damme D., Müller S. (2014): The phragmoplast-orienting Kinesin-12 Class Proteins Translate the Positional Information of the Preprophase Band to Establish the Cortical Division Zone in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 26: 2617-2632.
- Liu Y.-Ch., Vidali L. (2011): Efficient Polyethylene Glycol (PEG) Mediated Transformation of the Moss *Physcomitrella Patens*. *J Vis Exp*. 50: 2560.
- Marc J., Granger C., Brincat J., Fisher D., Kao T., McCubbin A., Cyr R. (1998): A GFP-MAP4 reporter gene for visualizing cortical microtubule rearrangements in living epidermal cells. *Plant Cell*. 10: 1927-1940.
- Marx A., Müller J., Mandelkow E. (2005): The structure of microtubule motor proteins. *Adv Protein Chem*. 71: 299-344.
- McCormac A. C., Elliott M. C., Chen D. F. (1998): A simple method for the production of highly competent cells of *Agrobacterium* for transformation via electroporation. *Mol Biotechnol*. 9: 155-9.
- McCurdy D. W., Kovar D. R., Staiger C. J. (2001): Actin and actin-binding proteins in higher plants. *Protoplasma*. 215: 89-104.

- McDowell J. M., Huang S. R., McKinney E. C., An Y. Q., Meagher R. B. (1996): Structure and evolution of the actin gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Genetics*. 142: 587-602.
- Meagher R. B., McKinney E. C., Vitale A. V. (1999): The evolution of new structures: clues from plant cytoskeletal genes. *Trends Genet.* 15: 278-284.
- Meijer E. G., Schilperoort R. A., Rueb S., van Os-Ruygrok P. E., Hensgens L. A. (1991): Transgenic rice cell lines and plants: expression of transferred chimeric genes. *Plant Mol Biol.* 16: 807-20.
- Mendel, G. (1866): Versuche über Pflanzen-Hybriden. – Verhandlungen des Naturforschenden Vereines, Abhandlungen, Brünn, 4: 3–47. Edice v různých jazycích publikovala Matlová (1973).
- Mentewab A., Matheson K., Adebisi M., Robinson S., Elston B. (2014): RNA-Seq Analysis of the Effect of Kanamycin and the ABC Transporter AtWBC19 on *Arabidopsis thaliana* Seedlings Reveals Changes in Metal Content. *PLoS One.* 9: e109310. Publikováno online 2014.
- Miflin B. J., Habasz D. Z. (2002): The role of glutamine synthetase and glutamate dehydrogenase in nitrogen assimilation and possibilities for improvement in nitrogen utilization of crops. *J Exp Bot.* 53: 979-987.
- Murata T., Sano T., Sasabe M., Nonaka S., Higashiyama T., Hasezawa S., Machida Y., Hasebe M. (2013): Mechanism of microtubule array expansion in the cytokinetic phragmoplast. *Nat. Commun.* 4: 1967.
- Nester E. W. (2014): *Agrobacterium*: nature's genetic engineer. *Front Plant Sci.* 5: 730.
- Ovečka M., Lang I., Baluška F., Ismail A., Illeš P., Lichtscheidl I. K. (2005): Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs. *Protoplasma.* 226: 39-54.
- O'Toole E., Greenan G., Lange K. I., Srayko M., Müller-Reichert T. (2012): The Role of γ -Tubulin in Centrosomal Microtubule Organization. *PLoS One.* 7: e29795.
- Paredes A. R., Somerville C. R., Ehrhardt D. W. (2006): Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science.* 312: 1491-1495.

- Petrášek J., Schwarzerová K. (2009): Actin and mikrotubule cytoskeletal interaction. *Curr Opin Plant Biol.* 12: 728-34.
- Rasmussen C. G., Wright A. J., Müller S. (2013): The role of the cytoskeleton and associated proteins in determination of the plant cell division plane. *Plant J.* 75: 258-269.
- Recht M. I., Fourmy D., Blanchard S. C., Dahlquist K. D., Puglisi J. D. (1996): RNA sequence determinants for aminoglycoside binding to an A-site rRNA model oligonucleotide. *J Mol Biol.* 262: 421-436.
- Richardson D. N., Simmons M. P., Reddy A. S. (2006): Comprehensive comparative analysis of kinesins in photosynthetic eukaryotes. *BMC Genomic.* 7: 18.
- Ringli C., Baumberger N., Diet A., Frey B., Keller B. (2002): ACTIN2 is essential for bulge site selection and tip growth during root hair development. *Plant Physiol.* 129: 1464-1472.
- Ringli C., Baumberger N., Keller B. (2005): The Arabidopsis root hair mutants der2–der9 are affected at different stages of root hair development. *Plant Cell Physiol.* 46: 1046-1053.
- Sampathkumar A., Lindeboom J. J., Debolt S., Gutierrez R., Ehrhardt D. W., Ketelaar T., Persson S. (2011): Live cell imaging reveals structural associations between the actin and microtubule cytoskeleton in Arabidopsis. *Plant Cell.* 23: 2302-2313.
- Shaw S. L. (2013): Reorganization of the plant corticle microtubule array. *Curr Opin Plant Biol.* 16: 693-7.
- Sheahan M. B., Staiger C. J., Rose R. J., McCurdy D. W. (2004): A green fluorescent protein fusion to actin-binding domain 2 of Arabidopsis fimbrin highlights new features of a dynamic actin cytoskeleton in live plant cells. *Plant Physiol.* 136: 3968–3978.
- Schiefelbein J., Galway M., Masucci J., Ford S. (1993): Pollen tube and root-hair tip growth is disrupted in a mutant of Arabidopsis thaliana. *Plant Phys.* 103: 979-985.
- Schmit A. C. (2002): Acentrosomal microtubule nucleation in higher plants. *Int Rev Cytol.* 220: 257-89.

- Schmöckel S. M., Garcia A. F., Berger B., Tester M., Webb A. A. R., Roy S. J. (2015): Different NaCl-Induced Calcium Signatures in the *Arabidopsis thaliana* Ecotypes Col-0 and C24. *PLoS One*. 10: e0117564.
- Schneider K., Wells B., Dolan L., Roberts K. (1997): Structural and genetic analysis of epidermal cell differentiation in *Arabidopsis* primary roots. *Development*. 124: 1789-1798.
- Schuyler S. C., Pellman D. (2001): Microtubule „plus-end-tracking proteins”: the end is just the beginning. *Cell*. 105: 421-424.
- Schwartz D., Grammel N., Heinzemann E., Keller U., Wohlleben W. (2005): Phosphinothricin Tripeptide Synthetases in *Streptomyces viridochromogenes* Tü494. *Antimicrob Agents Chemother*. 49: 4598-4607.
- Schwarzerová K., Vondráková Z., Fischer L., Boríková P., Bellinvia E., Eliášová K., Havelková L., Fiserová J., Vágner M., Opatrný Z. (2010): The role of actin isoforms in somatic embryogenesis in Norway spruce. *BMC Plant Biol*. 10: 89.
- Smertenko A. P., Saleh N., Igarashi H., Mori H., Hauser-Hahn I., Jiang C. J., Sonobe S., Lloyd C. W., Hussey P. J. (2000): A new class of microtubule-associated proteins in plants. *Nat Cell Biol*. 2: 750-753.
- Smertenko A. P., Deeks M. J., Hussey P. J. (2010): Strategies of actin reorganisation in plant cells. *J Cell Sci*. 123: 3019-28.
- Staiger C. J., Blanchoin L. (2006): Actin dynamics: old friends with new stories. *Curr Opin Plant Biol*. 9: 554-62.
- Staiger C. J., Sheahan M. B., Khurana P., Wang X., McCurdy D. W., Blanchoin L. (2009): Actin filament dynamics are dominated by rapid growth and severing activity in the *Arabidopsis* cortical array. *J Cell Biol*. 184: 269-280.
- Stoppin V., Vantard M., Schmit A. C., Lambert A. M. (1994): Isolated Plant Nuclei Nucleate Microtubule Assembly: The Nuclear Surface in Higher Plants Has Centrosome-like Activity. *Plant Cell*. 6: 1099-1106.
- Šlajcherová K., Fišerová J., Fischer L., Schwarzerová K. (2012): Multiple Actin Isootypes in Plants: Diverse Genes for Diverse Roles? *Front Plant Sci*. 3: 226.

- Tilney L. G., Bryan J., Bush D. J., Fujiwara K., Mooseker M. S., Murphy D. B., Snyder D. H. (1973): Microtubules: evidence for 13 protofilaments. *J Cell Biol.* 59: 267-75.
- Tominaga M., Nakano A. (2012): Plant specific myosin XI, a molecular perspective. *Front Plant Sci.* 3: 211.
- Trieu A. T., Burleigh S. H., Kardailsky I. V., Maldonado-Mendoza I. E., Versaw W. K., Blaylock L. A., Shin H., Chiou T. J., Katagi H., Dewbre G. R., Weigel D., Harrison M. J. (2000): Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* 22: 531-541.
- Tschermak E. (1900): Über künstliche Kreuzung bei *Pisum sativum*. *Berichte der deutschen botanischen Gesellschaft.* 18: 232-239.
- Umezawa H., Ueda M., Maeda K., Yagishita K., Kondo S., Okami Y., Utahara R., Osato Y., Nitta K., Takeuchi T. (1957): Production and isolation of a new antibiotic: kanamycin. *J Antibiot.* 10:181-8.
- Vale R. D. (2003): The molecular motor toolbox for intracellular transport. *Cell.* 112:467-80.
- Vildanova M. S., Wang W., Smirnova E. A. (2014): Specific organization of Golgi apparatus in plant cells. *Biochemistry (Mosc).* 79: 894-906.
- Voigt B., Timmers A. C. J., Šamaj J., Müller J., Baluška F., Menzel D. (2005): GFP-ABD2 fusion construct allows in vivo visualization of the dynamic actin cytoskeleton in all cells of *Arabidopsis* seedlings. *Eur J Cell Biol.* 84: 595-608.
- Wade R. H. (2009): On and around microtubules: an overview. *Mol Biotechnol.* 43: 177-91.
- Walker A. R., Davison P. A., Bolognesi-Winfield A. C., James C. M., Srinivasan N., Blundell T. L., Esch J. J., Marks M. D., Gray J.C. (1999): The TRANSPARENT TESTA GLABRA1 locus, which regulates trichome differentiation and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*, encodes a WD40 repeat protein. *Plant Cell.* 11: 1337-1349.
- Wang Y.-S., Motes C. M., Mohamalawari D. R., Blancaflor E. B. (2004): Green fluorescent protein fusions to *Arabidopsis* fimbrin 1 for spatio-temporal imaging of F-actin dynamics in roots. *Cell Motil Cytoskeleton.* 59: 79-93.

- Wang Y.-S., Yoo Ch.-M., Blancaflor E. B. (2007): Improved imaging of actin filaments in transgenic Arabidopsis plants expressing a green fluorescent protein fusion to the C- and N-termini of the fimbrin actin-binding domain 2. *New Phytol.* 177: 525-36.
- Wang H. Y., Yu Y., Chen Z. L., Xia G. X. (2005): Functional characterization of *Gossypium hirsutum* profilin 1 gene (GhPFN1) in tobacco suspension cells. *Planta.* 222: 594-603.
- Wang H., Zhuang X., Cai Y., Cheung A. Y., Jiang L. (2013): Apical F-actin-regulated exocytic targeting of NtPPME1 is essential for construction and rigidity of the pollen tube cell wall. *Plant J.* 76: 367-79.
- Wasteneys G. O. (2002): Microtubule organization in the green kingdom: chaos or selforder? *J Cell Sci.* 115: 1345-54.
- Wasteneys G. O., Ambrose J. C. (2009): Spatial organization of plant cortical microtubules: close encounters of the 2D kind. *Trends Cell Biol.* 19: 62-71.
- Webb M., Jouannic S., Foreman J., Linstead P., Dolan L. (2002): Cell specification in the Arabidopsis root epidermis requires the activity of ECTOPIC ROOT HAIR 3 - a katanin-p60 protein. *Development.* 129: 123-131.
- Westerlund J. F., Fairbanks D. J. (2010): Gregor Mendel's classic paper and the nature of science in genetics courses. *Hereditas.* 147: 293-303.
- Wickstead B., Gull K. (2007): Dyneins Across Eukaryotes: A Comparative Genomic Analysis. *Traffic.* 8: 1708-1721.
- Wu S.-Z., Bezanilla M. (2014): Myosin VIII associates with microtubule ends and together with actin plays a role in guiding plant cell division. *eLife.* 3: e03498.
- www.k8baldwin.com/downloads.html (15.4.2015)
- Xavier G., Anne-Marie T., Iva U., Fabien M., Karine M., Bouvet P. (2015): Centrosomal nucleolin is required for microtubule network organization. *Cell Cycle.* 14: 902-919.
- Xu T., Qu Z., Yang X., Qin X., Xiong J., Wang Y., Ren D., Liu G. (2009): A cotton kinesin GhKCH2 interacts with both microtubules and microfilaments. *Biochem. J.* 421: 171-180.

- Yanai K., Murakami T. (2004): The kanamycin biosynthetic gene cluster from *Streptomyces kanamyceticus*. *J Antibiot (Tokyo)*. 57: 351-354.
- Yang Z. B. (1998): Signaling tip growth in plants. *Curr Opin Plant Biol*. 1: 525-530.
- Yasmeen A., Mirza B., Inayatullah S., Safdar N., Jamil M., Ali S., Choudhry M. F. (2009): In planta transformation of tomato. *Plant Mol Biol Reporter*. 27: 20-28.
- Zambryski P. (2013): Fundamental discoveries and simple recombination between circular plasmid DNAs led to widespread use of *Agrobacterium tumefaciens* as a generalized vector for plant genetic engineering. *Int J Dev Biol*. 57: 449-452.
- Zambryski P., Joos H., Genetello C., Leemans J., Montagu M. V., Schell J. (1983): Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J*. 2: 2143-2150.
- Ziemienowicz A., Shim Y.-S., Matsuoka A., Eudes F., Kovalchuk I. (2012): A Novel Method of Transgene Delivery into Triticale Plants Using the *Agrobacterium* Transferred DNA-Derived Nano-Complex. *Plant Physiol*. 158: 1503-1513.
- Zhang X., Henriques R., Lin S. S., Niu Q. W., Chua N. H. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat protoc*. 1: 641-646.
- Zhu C., Ganguly A., Baskin T. I., McClosky D. D., Anderson C. T., Foster C., Meunier K. A., Okamoto R., Berg H., Dixit R. (2015): The Fragile Fiber1 Kinesin Contributes to Cortical Microtubule-Mediated Trafficking of Cell Wall Components. *Plant Physiol*. 167: 780-792.

9 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK A SYMBOLŮ

ACT	aktin
ADF	adenosindifosfát
ARP	actin related protein
ATP	adenosintrifosfát
BY-2	bright yellow 2
Col-0	Columbia
<i>der</i>	deformed root hair
DNA	deoxyribonukleová kyselina
EB	end binding protein
<i>ERH3</i>	ectopic root hair 3
FABD	fimbrin actin-binding domain
FABD2	fimbrin actin-binding domain 2
F-aktin	fibrilární aktin
F2	2. filiální generace
G-aktin	globulární aktin
GDP	guanosindifosfát
GFP	green fluorescent protein
GOI	gene of interest, požadovaný gen
GTP	guanosintrifosfát
LB	lysogeny broth
MAP(s)	microtubule-associated protein(s)
MBD	microtubule binding domain
MS	Murashige a Skoog
MTOC	microtubule organizing centre
OD	optical density
PPT	fosfotricin
Rep	reproduktivní, generativní
<i>RHL1-3</i>	root hairless 1-3
T0, 1, 2	mateřská, 1., 2. generace transformantů
T-DNA	transferred DNA
Ti	tumor-inducing, tumor indukující
+TIP	plus-end tracking protein
<i>TTG</i>	transparent testa GLABRA
Veg	vegetativní
<i>vir</i> geny	geny virulence
VS	viditelné světlo
<i>WER</i>	werewolf
YEB	yeast extract beef