

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Transformace *Arabidopsis thaliana* genem
pro cytokinindehydrogenasu pod kořenově
specifickým promotorem**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Denisa Paulů
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Šárka Vyroubalová
Termín odevzdání práce:	14. 5. 2010

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně za použití citované literatury.

V Olomouci dne 14. 5. 2010

Chtěla bych poděkovat své vedoucí bakalářské práce Mgr. Šárce Vyroubalové za veškeré rady, připomínky a odborné vedení, které mi poskytla.

Děkuji také všem pracovníkům katedry biochemie PřF UP v Olomouci za jejich ochotu kdykoli poradit a pomoci.

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora	Denisa Paulů
Název práce	Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i> genem pro cytokinindehydrogenasu pod kořenově specifickým promotorem
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Šárka Vyroubalová
Rok obhajoby práce	2010

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá transformací rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, následnou selekcí a testováním těchto rostlin pomocí metody PCR.

První část teoretické části pojednává o rostlinných hormonech cytokininech, které mají důležitou roli v rostlinném vývoji a růstu, a cytokinindehydrogenase, což je enzym katalyzující nevratnou deaktivaci cytokininů. S tímto tématem úzce souvisí kapitola transgenní rostliny se změněným obsahem cytokininů. Dalším zpracovaným tématem teoretické části je přímá a nepřímá transformace. Na závěr je vytvořen přehled vývoje transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*.

V praktické části je popsána transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV 3101, nesoucí plazmid pBract 303 s genem pro kukuřičnou cytokinindehydrogenasu 1 (*ZmCKX1*) pod kontrolou kořenově specifického promotoru z ječmene (*HvPHT 1-1*). Dále je popsáno stanovení vhodné koncentrace fosfinotricinu pro selekci transformantů (5,5 mg/l) a testování vyselektovaných rostlin pomocí metody PCR. Bylo vyselektováno padesát čtyři rostlin z devíti set semen. Celkem bylo použito při PCR reakci šest dvojic primerů. U dvou dvojic primerů se vyskytly kontaminace v negativní kontrole nebo ve wild-type rostlině. Pouze u tří rostlin došlo pomocí jedné dvojice primerů k velice slabé amplifikaci části genu *ZmCKX1*. S použitím ostatních primerů k amplifikaci nedošlo. Jen dva ze tří endogenních genů byly amplifikovány z genomové DNA rostlin. Integrace transgenů nebyla tedy potvrzena v jedenapadesáti vyselektovaných rostlinách. Výsledky ani jednoznačně nepotvrzují inzerci transgenů ve třech rostlinách, z jejichž DNA byla získána slabá amplifikace genu *ZmCKX1*. V rámci bakalářské práce se nestihly provést další PCR amplifikace či jiné metody potvrzující transformaci, proto práce bude pokračovat během navazujícího studia.

Klíčová slova	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinindehydrogenasa, transformace, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , „floral-dip“.
Počet stran	49
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname	Denisa Paulů
Title	Transformation of <i>Arabidopsis thaliana</i> by cytokinin dehydrogenase gene controlled by root-specific promoter
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Šárka Vyroubalová
The year of presentation	2010

Abstract

This bachelor's thesis is focused on transformation of *Arabidopsis thaliana* mediated by bacterium *Agrobacterium tumefaciens*, selection and verifying plants by PCR method.

Theoretical part deals with plant hormones cytokinins and cytokinin dehydrogenase. Cytokinins play a crucial role in plant growth and development and their degradation is mediated by enzyme cytokinin dehydrogenase (CKX). Transgenic plants with altered cytokinin content and methods of direct and indirect transformation including the development of *Arabidopsis thaliana* transformation are discussed.

In the practical part, the transformation of *Arabidopsis thaliana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* is described. *Agrobacterium* cells contained plasmid with the gene for maize cytokinin dehydrogenase 1 under the control of barley root-specific promoter (*HvPHT 1-1*). Further, suitable concentration of phosphinotricin for selection of transformants was determined (5.5 mg/l). Nine hundred seeds were put on selection medium and fifty-four plants were obtained. PCR method was used for testing plants after transformation. PCR reactions with six different primer pairs were set up. Contamination in negative controls or in wild-type plants was observed in PCR reactions performed with two different primer pairs. Very weak amplification of partial sequence of *ZmCKX1* gene was obtained for three plants. Amplification with the other primers did not occur. These results did not clearly confirm the integration of transgene. Therefore, the study will continue during the master study programme.

Keywords	<i>Arabidopsis thaliana</i> , cytokinin dehydrogenase, transformation, <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , „floral-dip“.
Number of pages	49
Number of appendices	0
Language	Czech

Obsah

1	CÍLE PRÁCE	- 8 -
2	TEORETICKÁ ČÁST	- 9 -
2.1	Cytokininy a cytokindehydrogenasa	- 9 -
2.1.1	Transgenní rostliny se změněným obsahem cytokininů	- 13 -
2.2	Transgenoze	- 16 -
2.2.1	Transgenoze dočasná a přímá	- 16 -
2.2.1.1	Elektroporace	- 16 -
2.2.1.2	Biolistická metoda	- 16 -
2.2.1.3	Další transformační metody	- 17 -
2.2.2	Transgenoze trvalá a nepřímá	- 17 -
2.2.2.1	Transformace prostřednictvím bakterie <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	- 17 -
2.2.3	Binární vektory pro genetickou modifikaci rostlin	- 20 -
2.2.3.1	Selekce transgenních rostlin	- 21 -
2.3	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 23 -
2.3.1	<i>Arabidopsis thaliana</i> (Husníček rolní)	- 23 -
2.3.2	Vývoj metody transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 23 -
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	- 26 -
3.1	Rostlinný a bakteriální materiál	- 26 -
3.2	Chemikálie	- 26 -
3.3	Přístrojové vybavení	- 27 -
3.4	Metody	- 29 -
3.4.1	Transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 29 -
3.4.2	Sterilizace semen	- 31 -
3.4.3	Příprava selekčních misek	- 32 -
3.4.4	Selekce a pěstování	- 33 -

3.4.5	Izolace genomové DNA	- 33 -
3.4.6	PCR metoda	- 34 -
3.4.6.1	Elektroforéza v agarosovém gelu	- 37 -
3.5	Výsledky, diskuze	- 39 -
3.5.1	Stanovení koncentrace fosfinitricinu použité pro selekci rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	- 39 -
3.5.2	Selekce	- 41 -
3.5.3	PCR	- 41 -
4	ZÁVĚR	- 43 -
5	SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	- 44 -
6	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	- 49 -

1 Cíle práce

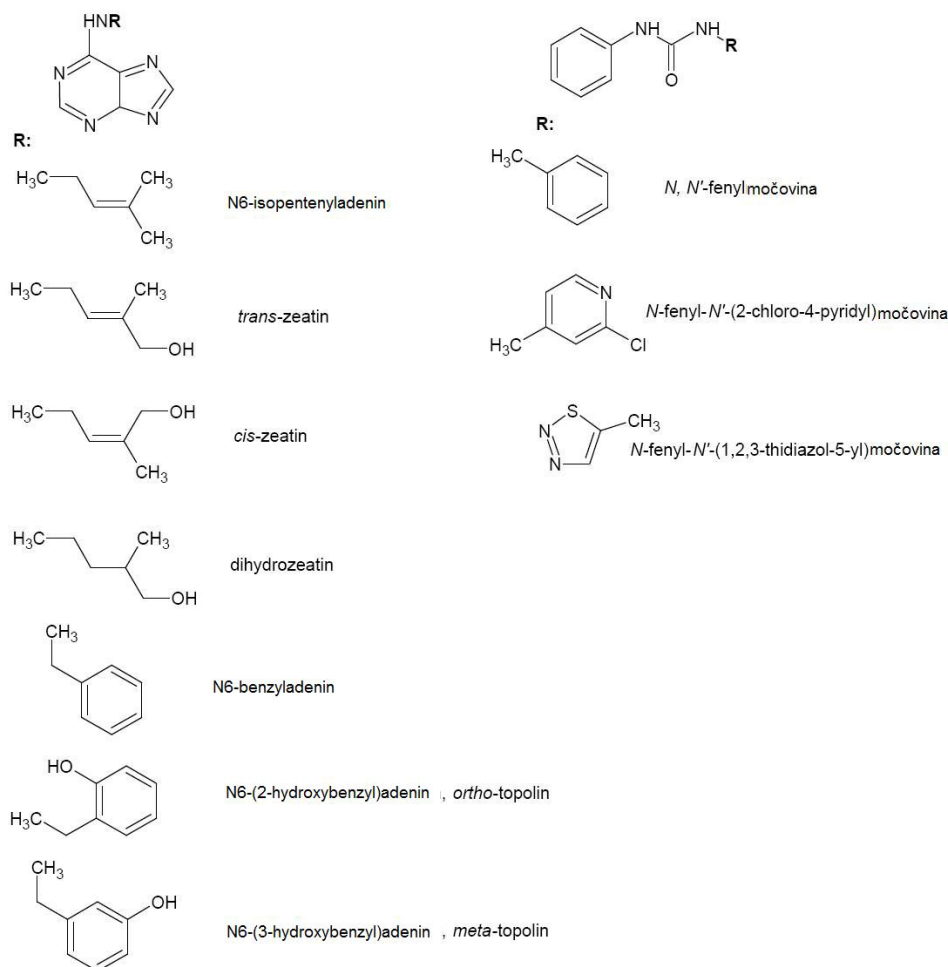
- Zpracování literární rešerše zabývající se tématy vývoj transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*, cytokininy, cytokindehydrogenasa a transgenní rostliny se změněným obsahem cytokininů.
- Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* metodou „floral-dip”.
- Stanovení vhodné koncentrace fosfinitricinu pro selekci transformantů.
- Testování vyselektovaných rostlin pomocí metody PCR.

2 Teoretická část

2.1 Cytokininy a cytokindehydrogenasa

Cytokininy řadíme mezi rostlinné hormony (fytohormony), které hrají velice důležitou roli v mnoha vývojových a růstových procesech rostlin. Hlavním účinkem cytokininů je stimulace buněčného dělení a kontrola orgánové diferenciaci. Nejvyšší hladiny cytokininů se nachází v intenzivně se dělících a rostoucích pletivech (Procházka et al., 1998). Je dokázáno, že cytokininy jsou zapojeny v mnoha procesech jako např. vývoj květů a plodů, senescence, diferenciaci plastidů, tvorba chlorofylu, klíčení semen a vývoj kořene (Ashikari et al., 2005; Kim et al., 2006; Werner et al., 2001; 2003). Cytokininy rovněž ovlivňují apikální dominanci a to prostřednictvím regulace aktivity úžlabních pupenů. Díky potlačování apikální dominance působí cytokininy jako antagonisté auxinů (Procházka et al., 1998). Účinek současného působení cytokininů a auxinů na vývoj rostlin v tkáňových kulturách je závislý na koncentracích těchto hormonů. Pokud je poměr koncentrací auxinů a cytokininů vyrovnaný, dochází k tvorbě nediferencovaného pletiva, tzv. kalusu. Když je koncentrace cytokininů vyšší, vytváří se prýty. Naopak nadbytek auxinů způsobí regeneraci kořenů (Miller et al., 1955).

Prvním objeveným cytokininem byl zeatin, který byl nalezen v nezralém endospermu kukuřice (Letham, 1963). Podle chemické struktury dělíme cytokininy do dvou hlavních skupin. První skupinu tvoří deriváty adeninu a do druhé skupiny patří deriváty močoviny a thiomočoviny (Obr.1). Přirozené cytokininy jsou deriváty adeninu, kdežto deriváty močoviny a thiomočoviny řadíme do cytokininů syntetických (Mok a Mok, 2001). Podle postranního řetězce na aminoskupině v poloze šest dělíme přirozené cytokininy na aromatické a isoprenoidní. Tato konfigurace v poloze šest je podmínkou biologické aktivity. Nejvyšší aktivitu mají látky, u kterých se nachází isoprenoidní řetězec s dvojnou vazbou (Procházka et al., 1998). Mezi isoprenoidní cytokininy řadíme např. *trans*-zeatin (tZ), *cis*-zeatin (cZ) a N⁶-isopentenyladenin (iP). Do aromatických cytokininů patří benzyladenin, kinetin a topoliny.

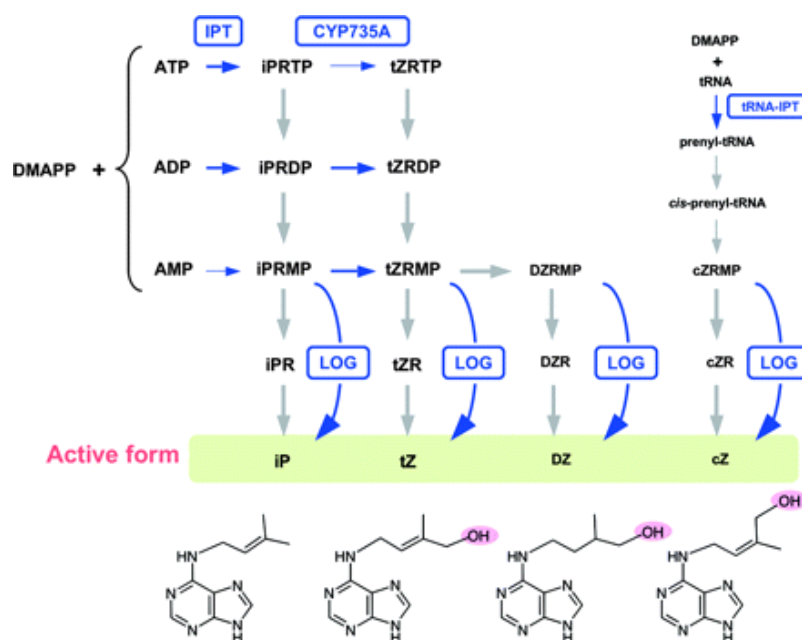


Obrázek 1: Strukturní vzorce cytokininů odvozených od adeninu a močoviny (Mok a Mok, 2001).

Hlavním místem biosyntézy cytokininů jsou kořenové vrcholy (Procházka et al., 1998). Odtud jsou cytokininy transportovány xylémem do nadzemních částí rostlin. Klíčovým enzymem biosyntézy cytokininů u vyšších rostlin je isopentenyltransferasa (IPT; Obr.2). IPT přenáší dimethylallyldifosfát na AMP, ADP nebo ATP za vzniku biologicky málo aktivních nukleotidů N⁶-isopentenyladenin ribosid-5'-fosfátů (iPRMP, iPRDP, iPRTP; Hirose et al., 2008). V *Arabidopsis thaliana* jsou iP-nukleotidy přeměňovány na tZ-nukleotidy pomocí cytochrom P450 monooxygenas CYP735A1 a CYP735A2 (Takei et al., 2004). Aby cytokininy získaly biologickou aktivitu, musí dojít k přeměně iP- a tZ-nukleotidů na volné báze (Sakakibara, 2006). Důležitým enzymem katalyzující tuto reakci je cytokininnukleosid-5'-monofosfátfosforibohydrolasa nazývaná lonely guy (LOG; Kurakawa et al., 2007). Dalším zdrojem cytokininů může být i přeměna tRNA pomocí enzymu tRNA-IPT, který využívá tRNA jako prenylové akceptory

(Miyawaki et al., 2006). Tato degradace tRNA je zdrojem *cis*-zeatinu (cZ).

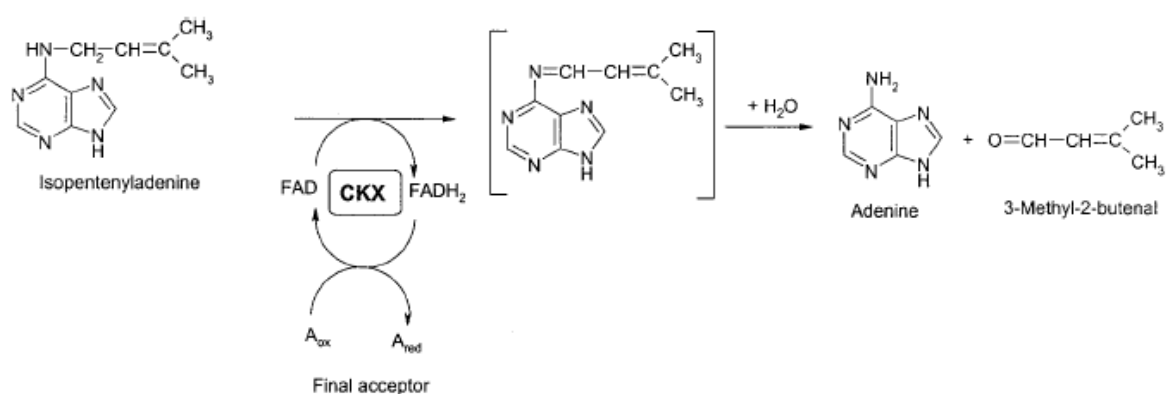
Při metabolismu cytokininů dochází k modifikaci adeninového kruhu nebo postranního řetězce. Modifikace na postranním řetězci zahrnuje glykosylaci a přeměnu mezi cZ a tZ (*cis-trans*-zeatinisomerasa) a mezi dihydrozeatinem a zeatinem (zeatinredukta-sa). Modifikace adeninového kruhu zahrnuje ribosylaci a ribotilaci v pozici N⁹ a glykosylace v pozici N³, N⁷ a N⁹ (Mok a Mok, 2001). Glykosylace na pozici N⁷ a N⁹ adeninového kruhu je zodpovědná za inaktivaci cytokininů. Tato modifikace kruhu je zprostředkována enzymem *N*-glukosyl transferasou. Glykosylace na hydroxylové skupině postranního řetězce je katalyzovaná enzymem *O*-glukosyl transferasou. Tyto zásobní formy cytokininů mohou být přeměněny zpět na cytokininové báze enzymem β-glukosidasa (Brzobohatý et al., 1993).



Obrázek 2: Model biosyntézy cytokininů (Hirose et al., 2008).

ADP - adenosin difosfát, AMP - adenosin monofosfát, ATP - adenosin trifosfát, cZ - *cis*-zeatin, cZR - *cis*-zeatin ribosid, cZRMP - *cis*-zeatin ribosid monofosfát, DMAPP - dimethylallyldifosfát, DZ - dihydrozeatin, DZR - dihydrozeatin ribosid, dZRMP - dihydrozeatin ribosid monofosfát, iP - N⁶-isopentenyladenin, iPR - N⁶-isopentenyladenin ribosid, iPRMP - N⁶-isopentenyladenin ribosid monofosfát, iPRDP - N⁶-isopentenyladenin ribosid difosfát, iPRTP - N⁶-isopentenyladenin ribosid trifosfát, IPT - isopentenyltransferasa, LOG - lonely guy, tZ - *trans*-zeatin, tZR - *trans*-zeatin ribosid, tZRDP - *trans*-zeatin ribosid difosfát, tZRMP - *trans*-zeatin ribosid monofosfát, tZRTP - *trans*-zeatin ribosid trifosfát

Cytokinindehydrogenasa (CKX; EC 1.5.99.12) je enzym, který katalyzuje nevratnou deaktivaci cytokininů. Tento enzym má zásadní roli ve vývoji rostliny a homeostázi cytokininů. CKX obsahuje flavinadenindinukleotid (FAD) jako koenzym, který se váže prostřednictvím histidinového zbytku kovalentní vazbou. Tento enzym štěpí cytokininy za vzniku adeninu a aldehydu odvozeného od postranního řetězce (Werner et al., 2001; 2003). Příkladem může být štěpení isopentenyladeninu na adenin a aldehyd vzniklý z postranního řetězce 3-methyl-2-butenal (Obr.3; Frébortová et al., 2004).



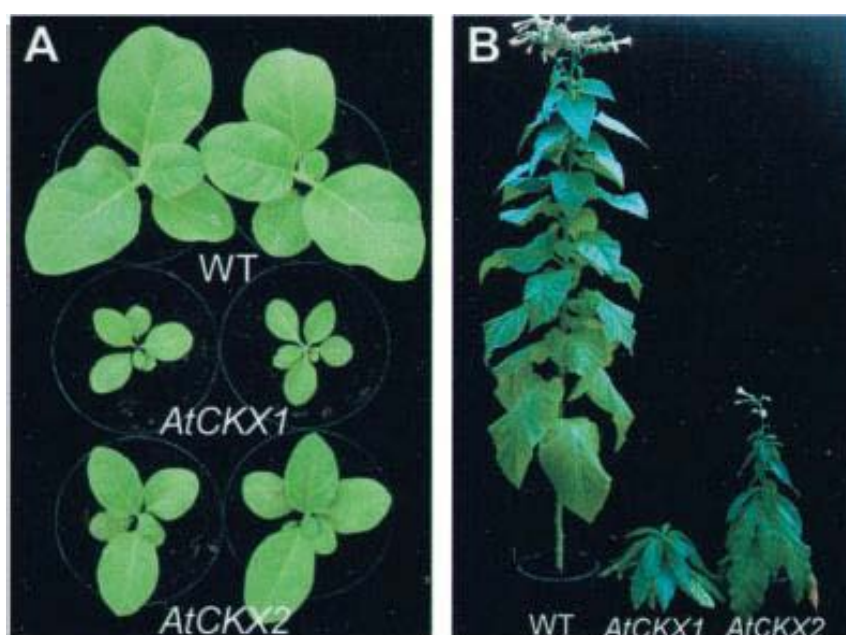
Obrázek 3: Reakční schéma přeměny N⁶-isopentenyladeninu katalyzovaného enzymem *ZmCKX1* (Frébortová et al., 2004).

Geny kódující CKX enzymy v rostlinách byly objeveny např. v kukuřici (Houba-Hérin et al., 1999), v rýži (Schmülling et al., 2003) v *Arabidopsis thaliana* (Werner et al., 2001) v pšenici a ječmeni (Galuszka et al., 2004) a v orchideji (Yang et al., 2003). Bylo popsáno, že exprese různých CKX genů ve stejném rostlinném druhu se liší jak prostorově tak časově (Werner et al., 2003; Brugière et al., 2003).

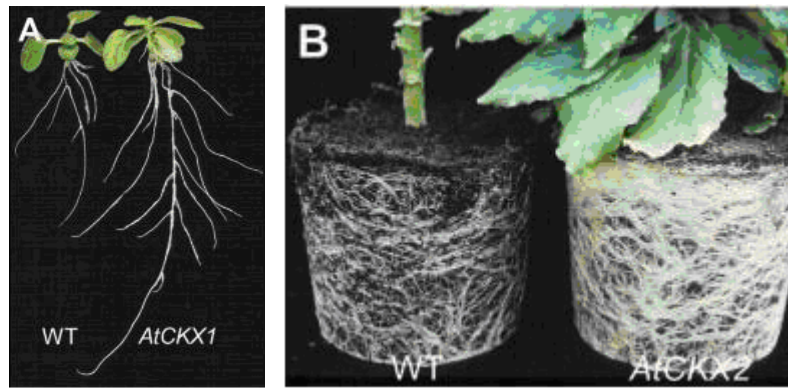
Gen kódující funkční CKX enzym byl poprvé izolován z kukuřice (Houba-Hérin et al., 1999; Morris et al., 1999). Ve své praktické části jsem transformovala rostliny *Arabidopsis thaliana* právě tímto genem pro kukuřičnou cytokinindehydrogenasu 1 (*ZmCKX1*). Bylo zjištěno, že tento gen je exprimován v cévních svazcích vyvíjejících se zrn, kořenů a koleoptyle (Brugière et al., 2003). *ZmCKX1* je monomerní protein o velikosti 57,4 kDa obsahující FAD-vazebnou doménu a vazebnou doménu substrátu.

2.1.1 Transgenní rostliny se změněným obsahem cytokininů

Zvýšený katabolismus cytokininů v transgenních rostlinách je vhodný nástroj pro studium funkce těchto rostlinných hormonů. Bylo dokázáno, že snížená hladina cytokininů způsobuje fenotypové změny v transgenních rostlinách. Jednou z těchto změn je velikost rostliny. Tabák s vloženým genem pro cytokinindehydrogenasu z *Arabidopsis thaliana* měl zmenšenou nadzemní část s užšími listy (Obr.4). Rostliny exprimující gen *AtCKX1* vykazovaly výrazně zakrslý vzrůst v porovnání s rostlinami s vloženým *AtCKX2* genem. Naopak kořenový systém transgenního tabáku byl významně zvětšen (Obr.5). Bylo tedy dokázáno, že cytokiny mají rozdílný účinek v nadzemní části a v kořeni (Werner et al., 2001).



Obrázek 4: Transgenní rostliny tabáku s vloženým genem *AtCKX1* a *AtCKX2*. Porovnání velikosti listů (A) a vzrůstu (B) wild-type (WT) rostliny a transgenních rostlin (Werner et al., 2001).



Obrázek 5: Porovnání kořenového systému u transgenní a wild-type (WT) rostliny tabáku (Werner et al., 2001). A - zvětšený kořenový systém rostliny exprimující gen *AtCKX1*. B - zvětšený kořenový systém rostliny exprimující gen *AtCKX2*.

Nedostatek cytokininů v transgenních rostlinách tabáku změnil ultrastrukturu buněk apikálního meristému a vyvíjejících se listů. Apikální meristém transgenního tabáku obsahoval menší počet buněk a byl tudíž menší než apikální meristém v netransformovaných rostlinách. Listy cytokinin-deficientního tabáku obsahovaly také menší počet buněk, ale byly větší oproti kontrolní rostlině (Werner et al., 2001). Buňky periferní zóny apikálního meristému u WT rostliny obsahovaly málo malých vakuol, diferenciovaných protoplastů a mitochondrií. Jádra měla více méně kulatý tvar a bylo možné pozorovat jasnou síť tvořenou heterochromatinem a euchromatinem, což je typické pro síťkovitý typ jader tabáku (Werner et al., 2008). Při sledování transgenního tabáku byla odhalena řada cytologických změn, které způsobily zmenšení apikálního meristému. Ve srovnání s WT rostlinou byl vakuolární systém zvětšený, heterochromatická síť jádra byla zmenšená a mitochondrie byly zvětšené a protáhlé. U plastidů byla pozorována předčasná diferenciaci (Werner et al., 2008).

Nedostatek cytokininů měl vliv i na buněčný cyklus. U vyvíjejících se listů tabáku exprimujících *AtCKX1* gen byl nalezen zvýšený počet tetraploidních buněk (4C). To naznačuje, že přechod z G2 fáze do mitózy byl omezen.

Je známo, že cytokininy mohou ovlivňovat biosyntézu a obsah chlorofylu (Yaron-skaya et al., 2006). Rostliny s nedostatkem cytokininů měly nižší obsah chlorofylu v porovnání s WT rostlinami. Transgenní rostliny absorbovaly méně fotosyntetického světla (absorpce fotonů v rozmezí 400-700 nm), což mohlo být způsobeno nižší hladinou chlorofylu a tím, že listy obsahovaly více vody ve srovnání s WT rostlinami. Tkáně sinku transgenního tabáku obsahovaly méně rozpustných sacharidů, vykazovaly sníženou aktivitu vakuolárních invertas a hladina ATP byla nižší oproti WT rostlinám. Redukovaná síla sinku pravděpodobně zapříčinila zakrslost nadzemní části rostlin. Z toho

vyplývá, že cytokininy jsou nejspíše zapojeny v regulaci síly sinku (Werner et al., 2008).

Dále bylo dokázáno, že cytokininy jsou negativními regulátory v kořenovém růstu (Werner et al., 2001). U transgenních rostlin tabáku byl vidět zvětšený kořenový systém, který obsahoval více postranních a adventivních kořenů. Bylo zjištěno, že růst primárních kořenů souvisel se zvětšeným počtem dělicích se buněk v meristému kořene. Kořeny rostlin se sníženým obsahem cytokininů obsahovaly méně rozpustných sacharidů, které byly nejspíše spotřebovávány během zrychleného růstu kořenů (Werner et al., 2003; 2008).

Rostliny tabáku byly transformovány také ječmennými geny *HvCKX2* a 3 (Galuszka et al., 2004). Bylo dokázáno, že i u transgenního tabáku exprimujícího genomovou formu *HvCKX2* genu dochází ke stejným fenotypovým změnám (Obr.6) jako u transgenního tabáku, který byl transformován geny *AtCKX1* a 3 (Werner et al., 2001).



Obrázek 6: Transgenní tabák s vloženým genem pro cytokinindehydrogenasu 2 z ječmene (*gHvCKX2*).

Porovnání velikosti a kořenového systému u WT a transgenní rostliny. Transgenní rostliny byly zakrslé a kořenový systém výrazně zvětšen (Galuszka et al., 2004).

2.2 Transgenoze

Vnášení cizorodých genů do rostlin nazýváme transgenoze. Transgenozí můžeme rozdělit na dočasnou a trvalou či na přímou a nepřímou. Když je změna genetické informace přenášena na potomstvo, mluvíme o transgenozí trvalé. Příkladem může být transgenoze zprostředkovaná pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pokud je genetická informace změněna pouze u vegetativní části rostliny a nepřenáší se na potomstvo, jedná se o transgenozí dočasnou. Transgenoze dočasné se docílí pomocí elektroporace a biolistické metody. Pokud k transformaci použijeme *Agrobacterium*, je transgenoze nazývána nepřímou, protože je zprostředkována pomocí bakterie. Když dojde k vpravení cizorodé DNA do buněk rostlin bez přispění mikroorganismů, jedná se o transgenozí přímou.

2.2.1 Transgenoze dočasná a přímá

2.2.1.1 Elektroporace

Princip spočívá v tom, že buňky v roztoku obsahujícím exogenní DNA jsou vystaveny krátkému elektrickému impulzu o vysokém napětí. Tímto impulzem jsou v buněčné stěně vytvořeny póry, jimiž DNA vstupuje do buněk. Nevýhoda metody je možné četné vložení transgenů, které může mít za následek ztrátu aktivity a nestabilitu transgenů. Při elektroporaci jsou všechny buňky po transformaci ve stejném fyziologickém stavu jako před transformací, kdežto u biolistické metody mohou být buňky při transformaci porušeny (Newell, 2000; Lessard et al., 2002).

2.2.1.2 Biolistická metoda

Biolistická metoda se využívá pro přechodnou transformaci pletiv. Při této metodě jsou k transformaci rostlin využity částice kovu (zlaté nebo wolframové) pokryté DNA. Tyto částice jsou nastřelovány pomocí speciálního zařízení do rostlinných buněk, protoplastů nebo meristémových pletiv. Biolistická metoda zahrnuje stejné nevýhody jako elektroporace. Příliš málo DNA použité pro transformaci může vést k nižší frekvenci transformace, ale naopak velké množství DNA vede k velkému množství integrovaných kopií transgenů do genomu rostlin a k přestavbám transgenů. Výhodou metody oproti jiným je možnost přenášet geny také do genomu mitochondrií a plastidů a ovlivňovat tak např. procesy fotosyntézy. Výhodou také je, že plastidová transformace může vést k rozšíření genu, protože plastidový genom je replikován několikanásobně uvnitř jediného plastidu a plastidy existují uvnitř mnoha buněk ve vysokém počtu (Lessard et al., 2002).

2.2.1.3 Další transformační metody

Mezi další transformační metody patří mikroinjekce a makroinjekce, transformace pomocí polyethylenglykolu nebo karbidových vláken a lipofekce.

Transformace pomocí mikroinjekce a makroinjekce je založena na zavedení DNA do jádra, cytoplazmy nebo do rostlinných pletiv pomocí skleněné injekční pipety. Mikroinjekce se používá převážně u živočišných buněk. Její využití pro rostlinné buňky je omezené, protože buněčná stěna tvoří překážku pro mikroinjekci. Lze provádět mikroinjekce protoplastů, kde ale hrozí nebezpečí uvolnění toxických látek z vakuol.

Protoplasty mohou být transformovány i pomocí polyethylenglykolu. Transformace je prováděna pomocí DNA v přítomnosti vápenatých kationtů. Polyethylenglykol a vápenaté ionty způsobí destabilizaci plazmatické membrány protoplastů a umožní vstup DNA do buňky.

Při lipofekci se molekuly DNA obalí vrstvou syntetických lipidů za vzniku částic podobných liposomům. Ty pak snadno pronikají do protoplastů díky schopnosti tukových látek splývat s buněčnými membránami.

2.2.2 Transgenoze trvalá a nepřímá

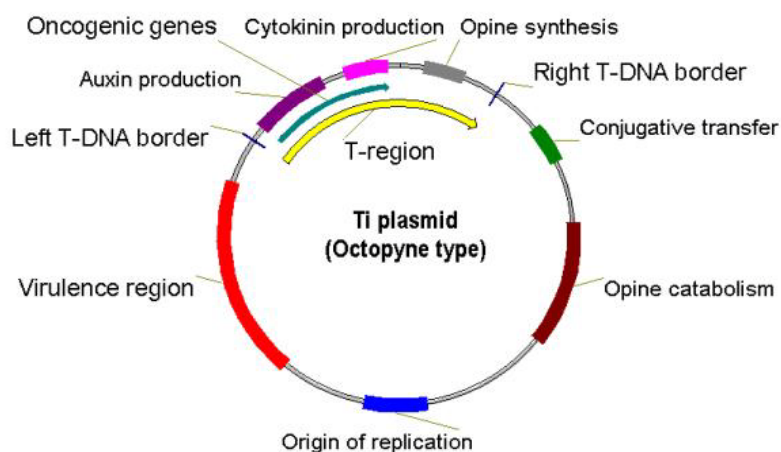
2.2.2.1 Transformace prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens je půdní gram-negativní bakterie způsobující tvorbu krčkových (crown - gall) nádorů u dvouděložných rostlin (Obr.7).



Obrázek 7: Nádor na rostlině způsobený bakterií *Agrobacterium tumefaciens* (<http://courses.washington.edu/z490/gmo/natural.html>).

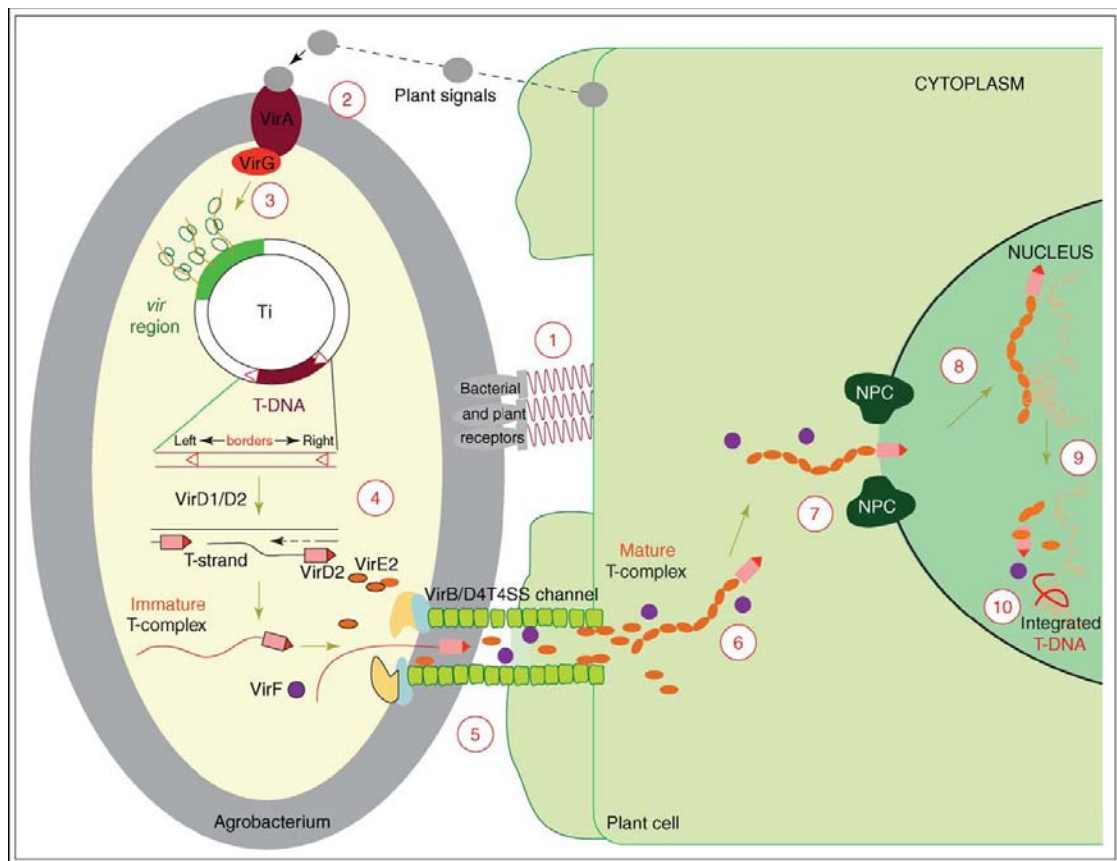
Agrobacterium infikuje poraněné nebo poškozené rostliny. Poškozená rostlinná buňka uvolňuje do prostředí chemické látky fenolické povahy. Díky těmto látkám nalezne *Agrobacterium* poškozené místo a uchytlí se na rostlinu pomocí fibril. *Agrobacterium* je schopné přenášet do rostlinného genomu část svého Ti plasmidu (200 kb; Obr.8). Tato část se nazývá T-DNA a nese geny pro tvorbu auxinů a cytokininů, které zapříčiní proliferaci napadených buněk. Druhým typem sloučenin, které se tvoří po začlenění T-DNA do rostlinné buňky, jsou opiny. Jedná se o deriváty aminokyselin, které rostlina uvolňuje do prostředí a slouží jako zdroj uhlíku a dusíku pro *Agrobacterium*. T-DNA je vymezena pravou a levou hraniční sekvencí. Jakákoliv DNA mezi těmito hraničními sekvencemi může být přenesena do genomu hostitelské rostliny (Brown, 2007). Pomocí *Agrobacteria* se podařilo transformovat prokaryota, kvasinky, houby i lidské buňky (Lacroix et al., 2006; Lessard et al., 2002). Jednoděložné rostliny nejsou *Agrobacteriem* sice přirozeně infikovány, ale přesto byla provedena úspěšná transformace obilovin (Chan et al., 1992; Hiei et al., 1994; Cheng et al., 1997; Ishida et al., 1996). Transformace ječmene pomocí *Agrobacteria* byla poprvé popsána v roce 1997 (Tingay et al., 1997). Účinnost přenosu T-DNA do buněk byla zlepšena použitím supervirulentního kmene *Agrobacteria tumefaciens* a použitím acetosyringonu v suspenzi *Agrobacteria*. Acetosyringon je látka fenolické povahy způsobující chemotaxi bakterie k rostlinným buňkám a aktivaci *vir* genů nutných pro infekci.



Obrázek 8: Ti plasmid (http://arabidopsis.info/students/paaras/ti_plasmid.htm).

origin of replication - počátek replikace, virulence region - vir oblast, right T-DNA border - pravá hranice T-DNA, left T-DNA border - levá hranice T-DNA, auxin production - tvorba auxinů, oncogenic genes - geny způsobující nádor, cytokinin production - tvorba cytokininů, opine synthesis - syntéza opinů, conjugative transfer - konjugační přenos, opine catabolism - katabolismus opinů

Proces transformace začíná přichycením *Agrobacteria* na rostlinnou buňku. Poraněná rostlina uvolňuje fenolické látky, které *Agrobacterium* rozpozná pomocí proteinů VirA a VirG (Obr.9). VirG indukuje expresi všech vir genů. VirD1 a VirD2 vyštěpí jednořetězcovou molekulu DNA (Zupan a Zambryski, 1995). Na 5' konci řetězce je navázán VirD2 protein (Ward a Barnes, 1988). Tento komplex je spolu s dalšími *vir* proteiny přenesen do hostitelské buňky. V cytoplazmě hostitelské buňky se jednořetězcová DNA (T-řetězec) pokryje VirE2 proteiny, které ho chrání před nukleázami (Abu-Arish et al., 2004). T-řetězec je transportován do jádra pomocí proteinů VirD2 a VirE2. V jádře se proteiny od řetězce odpojí a T-řetězec se začlení do genomu hostitelské buňky (Tzfira a Citovsky, 2006). Předpokládá se, že dosud známý mechanismus je založen na schopnosti opravného mechanismu hostitele přeměnit T-řetězec na dvouvláknovou T-DNA (Tzfira et al., 2004).

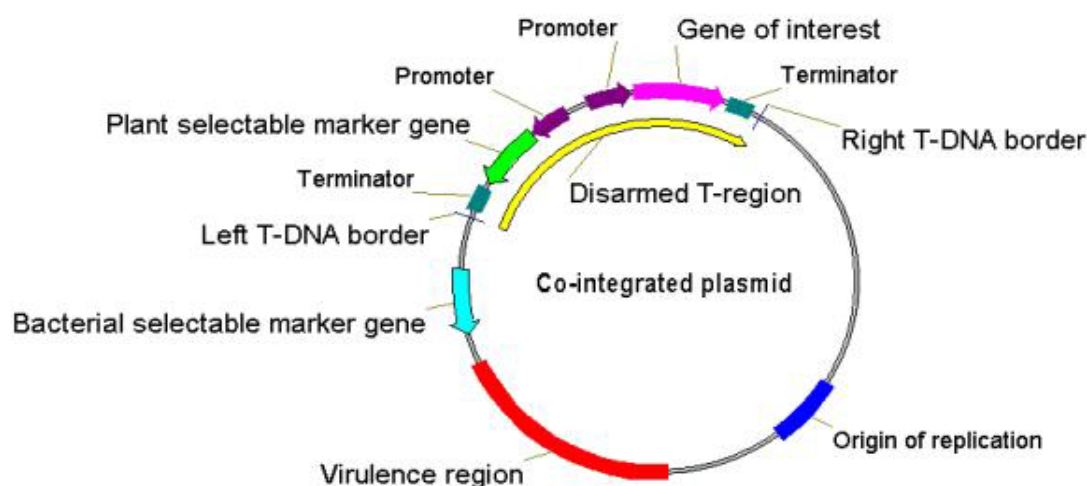


Obrázek 9: Mechanismus transformace (Tzfira a Citovsky, 2006).

2.2.3 Binární vektory pro genetickou modifikaci rostlin

Konstrukce transformačních vektorů je založena na původním Ti-plazmidu. Z Ti-plazmidu byly odstraněny geny pro tvorbu fytohormonů a opinů a byly nahrazeny cizorodou DNA, kterou chceme integrovat do rostlinného genomu (Obr.10).

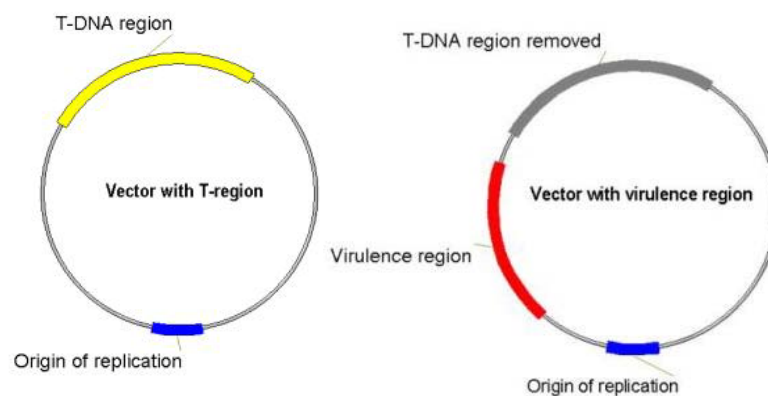
Principem binárních vektorů je rozdělení Ti plazmidu na dva plazmidy menší, protože Ti-plazmid je velice rozsáhlý (Obr.11). Úsek virulence a T-DNA nejsou tedy společně přítomny na jednom plazmidu. Menší plazmid se nazývá klonovací a větší je označován jako pomocný plazmid. Menší plazmid obsahuje hraniční sekvence T-DNA, mezi něž se naklonuje DNA určená k přenosu a selekční gen. Pomocný plazmid nese větší část Ti-plazmidu, která obsahuje všechny geny potřebné pro infekci s hostitelem a přenos T-DNA .



Obrázek 10: Schéma transformačního vektoru

(<http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/1051/version/default/part/ImageData/data>).

promoter - promotor, gene of interest - gen našeho zájmu, terminator - terminátor, right T-DNA border - pravá hranice T-DNA, origin of replication - počátek replikace, virulence region - *vir* oblast, bacterial selectable marker gene - bakteriální selekční gen, left T-DNA border - levá hranice T-DNA, plant selectable marker gene - rostlinný selekční gen



Obrázek 11: Rozdělení Ti plazmidu na dva menší (binární systém)

(<http://www.patentlens.net/daisy/AgroTran/1055/version/default/part/ImageData/data>).

T-DNA region - T-DNA oblast, origin of replication - počátek replikace, T-DNA region removed - odstraněný úsek T-DNA, virulence region - *vir* oblast, origin of replication - počátek replikace

Geny, které se mají exprimovat v transformovaných rostlinách musí mít vhodný promotor a terminátor, které budou funkční v rostlinách. Vhodný terminátor transgenu na 3' konci je důležitý, aby transkripce skončila na správném místě. Promotor je sekvence DNA, která má schopnost vázat RNA-polymerasu a tím zahajovat přepis genu. Terminátor *nos* genu pro nopalín syntasu z *Agrobacterium tumefaciens* je běžně používaným terminátorem v transformačních vektorech. Promotor 35S viru kvěťákové mozaiky, který způsobuje velmi vysoký stupeň transkripce ve většině pletiv, je také běžně využíván.

Kořenově specifický promotor *HvPHT 1-1* z ječmene, použitý v experimentální části, řídí expresi genu pro fosfátový transportér. Tento promotor byl testován v transgenní rýži. Expres byla detekována převážně v kořenech a velice málo v listech. Promotor řídil expresi v několika typech kořenových buněk a byl indukován nedostatkem fosforu. Maximální expres byla pozorována v pokožce kořene a v buňkách kořenového vlášeňní (Schünmann et al., 2004).

2.2.3.1 Selekcce transgenních rostlin

Selekční geny způsobují rezistenci k látce, která může být přidána do agarového média nebo kterou mohou být rostliny sprejovány. Pomocí těchto genů selektujeme transgenní rostliny.

Antibiotika jsou jedny z nejběžněji užívaných selekčních látek. Využití genů, kódujících enzymy způsobující rezistenci k antibiotikům, umožňují přežití a dělení transgenních buněk na selektivních médiích. Tyto selekční geny jsou vnášeny do genomu rostliny spolu s genem našeho zájmu. Mezi nejrozšířenější antibiotikum používané pro selekci transgenních rostlin patří kanamycin (selekční gen – *NPTII*; Miki a McHugh, 2004), ale využívá se i hygromycin (gen *HPT*; Miki a McHugh, 2004), streptomycin (gen *aadA*; Magrini et al., 1998) a další antibiotika.

Další možností je použití selekčních genů, které způsobí rezistenci k herbicidům. Herbicidy, které se využívají pro selekci transgenních rostlin jsou glyfozát a fosfinotricin. Glyfozát blokuje aktivitu enzymu, který zajišťuje syntézu aromatických aminokyselin (5-enolpyruvátšikimát-3-fosfátsynthasa; Vikram a Koiwa, 2009) a selekční gen, který způsobí rezistenci ke glyfozátu, se nazývá *GAT* (Vikram a Koiwa, 2009). Jiný typ herbicidu, nazvaný fosfinotricin, blokuje enzym glutaminsyntetasy. Glutaminsyntetasa řídí přeměnu glutamátu na glutamin. Vazbou amonných iontů na glutamát se snižuje podíl volného amoniaku. Pokud je enzym inhibován, dochází k hromadění amoniaku v rostlinných buňkách, tím je blokována fotosyntéza a dochází k rozpadu chloroplastů (Harrison et al., 2006). K fosfinotricinu můžeme také zařadit herbicid bialaphos, který je sekundárním metabolitem *Streptomyces hygroscopicus* (Thomson et al., 1987). Tento tripeptid je složen ze dvou alaninových residuí a fosfinotricinu.

Gen *bar*, který jsem použila v praktické části, kóduje enzym způsobující rezistenci k herbicidu fosfinotricin a bialaphos. Tento gen byl naklonován z genomu *Streptomyces hygroscopicus* a kóduje enzym fosfinotricinacetyltransferasu, který acetyluje volnou amino skupinu a tím dojde k inaktivaci fosfinotricinu. Pro selekci transformantů se využívá kódující sekvence genu opatřená rostlinnými regulačními sekvencemi (Thompson et al., 1987, Ondřej M., 1992).

2.3 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

2.3.1 *Arabidopsis thaliana* (Huseníček rolní)

Jednoletá bylina *Arabidopsis thaliana* (Obr.12) je řazena do čeledi brukvovitých a patří mezi dvouděložné rostliny. Díky svým výhodným vlastnostem se *Arabidopsis thaliana* stala modelovou rostlinou. *Arabidopsis thaliana* dorůstá výšky pouze 10-30 cm. Její životní cyklus je velice rychlý, trvá pouze 6-8 týdnů. Rostlina produkuje tisíce semen na jedné rostlině a snadno se mutuje a transformuje (Gandhi et al., 2001). Celý genom této rostliny je odsekvencován (5 chromozomů, 25 500 genů). Mimo jiné je rostlina schopná samoopylení (autogamie) a dá se dobře pěstovat v laboratorních podmínkách.



Obrázek 12: Rostlina *Arabidopsis thaliana*.

2.3.2 Vývoj metody transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Jedna z prvních metod transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* byla provedena pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Tato metoda byla zavedena v roce 1985 a byla nazvána jako disková metoda (Horsch et al., 1985). Transformace byla založena na tom, že části rostlin (část listu, internodia nebo děložní lístky) byly ve sterilních podmínkách nastříhány a několik minut až dní kultivovány s bakteriální suspenzí. Poté se části rostlin přemístily na médium obsahující hormony v takovém složení, aby indukovaly na řezných plochách tvorbu kalusů a následnou regeneraci prýtlů. Médium také obsahovalo selekční antibiotikum, aby byla regenerace umožněna pouze transformo-

vaným rostlinám a antibiotikem, které eliminovalo buňky *Agrobacteria*. Zregenerované nadzemní části byly poté přenášeny na zakořeňovací médium.

V roce 1987 byla popsána metoda transformace semen. Princip spočíval v tom, že se semena nechala 12-16 hodin klíčit a poté se k nim přidala bakteriální suspenze *Agrobacteria* a vše se kultivovalo 24 hodin. Aby došlo k eliminaci *Agrobacteria*, bylo nutné rozmístit semena na médium obsahující antibiotikum, které *Agrobacterium* usmrtilo. Získané rostliny se označovaly jako T1 generace. U T2 generace byla provedena selekce na příslušném antibiotiku (Feldmann a Marks, 1987).

Další transformační metoda, kterou v roce 1993 popsal N. Bechtold, se nazývá infiltrační metoda. Metoda je založena na předpokladu, že k přenosu T-DNA dojde i v pozdním stádiu vývoje rostliny a že transport bakteriálních buněk do rostlinných pletiv je usnadněn vlivem podtlaku. Rostliny byly v raných stádiích kvetení umístěny do roztoku *Agrobacteria* na 2-5 minut za použití vakua, které způsobilo účinnější vniknutí *Agrobacteria* do buněk. Rostliny se pěstovaly, dokud nevytvořily semena. Pouze část z těchto semen byla transformovaná. Semena se selektovala na médiu, které umožnilo identifikovat transformanty (Bechtold et al., 1993).

Vylepšení metody infiltrace provedli Steven J. Clough a Andrew F. Bent v roce 1998. Metoda byla nazvána „floral-dip“ a bylo zjištěno, že vakua k účinné transformaci není potřeba. Květy rostliny byly ponořeny do roztoku obsahující *Agrobacterium* v přítomnosti povrchově aktivního činidla (Silwet L-77). Díky povrchově aktivnímu činidlu došlo ke zlepšení smáčivosti média. T-DNA je vložena do samičího gametofytu a přes vajíčko se transgen přenáší do další generace. Protože T-DNA se integruje do samičího gametofytu inokulovaných rostlin, měla by být T1 generace hemizygotní na transgen. Semena vyprodukovaná z T1 rostlin se označují jako T2 generace a mohou být hemizygotní, homozygotní a nebo transgen nemusí obsahovat (Bent, 2000; Clough a Bent, 1998).

Rostliny nemusí být do roztoku *Agrobacteria* pouze ponořovány, ale mohou být roztokem i stříkány. Tento postup, který se nazývá „floral spray“, byl publikován v roce 2000 a mohl by být využíván u velkých rostlinných druhů, u kterých by mohl nastat problém s ponořováním rostlin do roztoku *Agrobacteria* (Chung et al., 2000).

Chung et al. (2000) publikovaly výsledky, které ukazují, že nejvyšší transformační účinnosti bylo dosaženo metodou „floral-spray“. U rostlin starých 6 týdnů byla provedena transformace metodami „floral-dip“, „floral-spray“ a metodou vakuové infiltrace. U metody „floral-dip“ byly rostliny nejdříve ponořeny do roztoku *Agrobacteria* na 5 sekund nebo na 5 minut. U „floral-spray“ metody se rostliny stříkaly roztokem *Agrobacteria* jednou nebo třikrát v osmihodinovém intervalu. U infiltrace bylo využito vakua a to po dobu dvou nebo deseti minut. Podle tabulky výsledků vyplývá, že nejlep-

ší účinnost měla metoda „floral-spray“, a to v případě, kdy se rostliny nastříkaly třikrát (Tab.1).

Tabulka 1: Porovnání metod „floral-dip“, infiltrační metoda a „floral-spray“ (Chung et al., 2000).

infiltrační metoda		„floral-dip“		„floral-spray“	
2 min.	10 min.	5 s	5 min.	jednou	třikrát
1,76 %	0,76 %	0,92 %	2,09 %	1,33 %	2,41 %

3 Experimentální část

3.1 Rostlinný a bakteriální materiál

K experimentu byla použita semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia 1. Transformace rostlin byla provedena pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV 3101, nesoucí plazmid pBract 303 s genem pro kukuřičnou cytokinindehydrogenasu 1 (*ZmCKX1*) pod kontrolou kořenově specifického promotoru z ječmene (*HvPHT1-1*).

3.2 Chemikálie

- Agar (Merck, Německo)
- Agarosa (Amresco, USA)
- Betain (Serva, USA)
- Biotin (BangCo, Německo)
- Bromfenolová modř (Fluka, USA)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká Republika)
- Dimethyl sulfoxid (DMSO) (Duchefa, Nizozemsko)
- DNA standard molekulové hmotnosti -100 bp (Fermentas, Německo)
- Dodecylsulfát sodný (SDS) (Penta, Česká Republika)
- Dusičnan amonný (Lachema, Česká Republika)
- Dusičnan draselný (Penta, Česká Republika)
- Ethanol 100% (Merck, Německo)
- Ethidium bromid (NeoLab, Německo)
- Fosfinotricin (Duchefa, Nizozemsko)
- Glycerol (Penta, Česká Republika)
- *HindIII* – restrikční enzym (TaKaRa, Japonsko)
- Hydroxid draselný (Lach-Ner, Česká Republika)
- Hypochlorid vápenatý (Aldrich, Německo)
- Chlorid kobaltnatý hexahydrát (Penta, Česká Republika)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká Republika)
- Chlorid vápenatý (Fluka, USA)
- Jodid draselný (NeoLab, Německo)
- Kanamycin (Duchefa, Nizozemsko)

- Kyselina boritá (NeoLab, Německo)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Penta, Česká Republika)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová dvojsodná sůl (Penta, Česká Republika)
- Kyselina chlorovodíková (Lachema, Česká Republika)
- Kyselina molybdenová dihydrát (Penta, Česká Republika)
- Kyselina morfolinethansulfonová (MES) (Duchefa, Nizozemsko)
- M pufr pro restriční endonukleasu *Hind III* (TaKaRa, Japonsko)
- Murashige-Skoog sůl (Sigma, Německo)
- Murashige-Skoog vitamíny (Sigma, Německo)
- Myo-inositol (Sigma, Německo)
- Nukleotidy (10 mM dNTP mix) (TopBio, Česká Republika)
- Vzorovací pufr (loading dye) (TaKaRa, Japonsko)
- Sacharosa (Lachner, Česká Republika)
- Silwet L-77 (ClonTech, USA)
- Síran hořečnatý (Penta, Česká Republika)
- Síran manganatý monohydrát (NeoLab, Německo)
- Síran měďnatý pentahydrát (Penta, Česká Republika)
- Síran železnatý heptahydrát (NeoLab, Německo)
- Síran zinečnatý heptahydrát (NeoLab, Německo)
- Taq DNA polymerasa (Promega, USA)
- Tris (Duchefa, Nizozemsko)
- Trypton (Duchefa, Nizozemsko)
- Xylencyanol FF (Sigma, USA)

3.3 Přístrojové vybavení

- Analytické váhy (Nahita, Španělsko)
- Aseptický box (DN Formed, ČR)
- Autokláv (Sanyo, Japonsko)
- Centrifuga (Thermo E.C., USA)
- Elektromagnetická míchačka (IKA, Německo)
- Klimatická testovací komora (Sanyo, Japonsko)
- pHmetr (Eutech, USA)
- Sada pipet (Eppendorf, Německo)
- Termocycler T-gradient (Biometra, Německo)

- Třepačka (Eppendorf, Německo)
- Vortex (Shelton Scientific, USA)
- Zdroj pro elektroforézu (Biometra, Německo)

3.4 Metody

3.4.1 Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* byla provedena metodou „floral dip“. Tato metoda je založena na tom, že neotevřené květy rostlin jsou ponořeny do roztoku *Agrobacterium tumefaciens* v přítomnosti povrchově aktivního činidla (Silwet L-77).

Zjednodušený protokol transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* zahrnuje tyto kroky:

- Zdravé netransformované rostliny *Arabidopsis thaliana* se pěstují v květináčích s půdou, dokud neobsahují co nejvíce neotevřených květů (Obr.13).



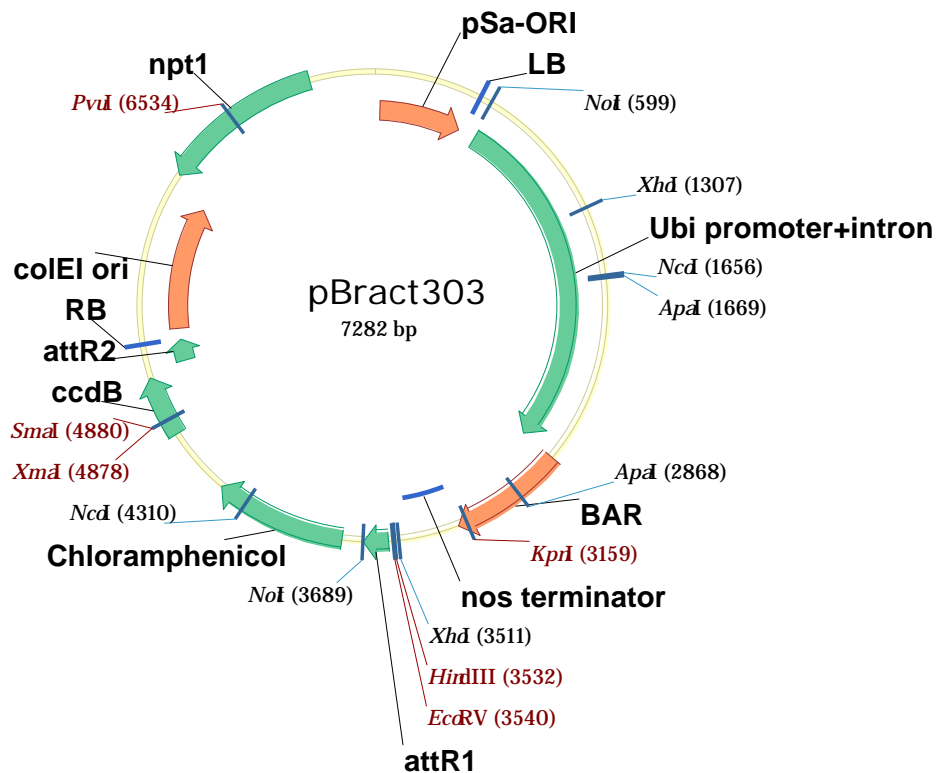
Obrázek 13: Květy *Arabidopsis thaliana*.

- Připraví se kultura *Agrobacterium tumefaciens*, která nese požadovaný gen na binárním vektoru. Ověřená kultura se napěstuje přes noc v 5 ml LB média (28°C, 200 rpm). Poté se kultura přenesení do 500 ml LB média a opět se kultivuje přes noc (28°C, 200 rpm). Obě kultivace probíhají v přítomnosti antibiotika kanamycin (50 µg/ml). Pro úspěšnou transformaci není hustota buněk kritickým bodem (OD₆₀₀ se může pohybovat v rozmezích 0,1-2).
Složení LB média: NaCl - 10 g/l, kvasničný extrakt - 10 g/l, trypton – 5 g/l, pH 7. Médium se autoklávuje 20 min. při 120°C.
- Kultura *Agrobacterium* se stočí na dno kyvety (6000 rpm/10 min) a pelet se roz-suspenduje v 5% roztoku sacharosy – 500 ml.

- Před inokulací rostlin se do roztoku přidá detergent Silwet L-77 (finální koncentrace v roztoku 0,05%), který je nutné dobře promíchat (je-li problém s toxicitou L-77, může být použita koncentrace 0,02%).
- Nadzemní část rostliny se ponoří do roztoku *Agrobacteria* na 20 sekund. Poté se rostlina nechá okapat.
- Rostliny se zakryjí na 16-24 hodin průhledným plastovým krytem, aby se udržela vysoká vlhkost (rostliny by neměly být vystavovány silnému slunečnímu záření). Další den je kryt odstraněn.
- Rostliny se pravidelně zalévají. Přestane se, jakmile jsou semena zralá.
- Sklízí se suché šišule se semeny.

Tímto postupem lze dosáhnout transformační účinnosti přes 1% (jedna transformace na každých 100 semen). Pro vyšší stupně transformace se rostliny noří do roztoku *Agrobacteria* dvakrát nebo třikrát v sedmidenních intervalech.

K transformaci rostlin *Arabidopsis* byl využit binární vektor pBract 303 (Obr.14), ve kterém byla nahrazena kazeta ohraničená místy attR1 a attR2 genem *ZmCKX1* pod kontrolou promotoru *HvPHT 1-1*.



Obrázek 14: Binární vektor, který se použil při transformaci rostlin *Arabidopsis thaliana* (www.bract.org).

BAR je selekční gen zodpovědný za rezistenci k fosfinitricinu a řízený konstitutivním ubikvitinovým promotorem (**Ubi**). Část plazmidu vymezená místy **attR1** a **attR2** byla nahrazena genem *ZmCKX1* řízeným kořenově-specifickým promotorem *HvPHT1-1* a zakončeným **nos terminátorem**. Plazmid obsahuje pro bakteriální selekci gen **npt1**, který způsobuje rezistenci k antibiotiku kanamycin. Část ohraničená místy **LB** (levá hranice) a **RB** (pravá hranice) se přenáší do rostlinného genomu. **CoIE1 ori**, **pSa-ORI** jsou počátky replikace.

3.4.2 Sterilizace semen

Semena se nasypou do sterilní mikrozkušavky. Přidá se k nim 1 ml 70% etanolu a nechají se 5 minut na třepačce. Poté se ethanol odsaje a napipetuje se 1 ml nasyceného roztoku hypochloridu vápenatého. Na třepačce se mikrozkušavky ponechají 9 minut. Hypochlorid vápenatý se odsaje a přidá se 1 ml sterilní vody. Sterilní vodou se semena promývají pětkrát, na třepačce se nechají vždy 2-3 minuty. Na sterilní mis-

ku s filtračním papírem se semena vyklepnou a nechají se vyschnout. Miska se utěsní parafilmem. Pro zachování sterility se celý proces sterilizace provádí v aseptickém boxu (flowboxu).

3.4.3 Příprava selekčních misek

Připravila jsem si selekční misky pro stanovení vhodné koncentrace fosfinotricinu pro selekci rostlin. Fosfinotricin patří mezi herbicidy a způsobuje ireverzibilní inaktivaci důležitého enzymu metabolismu dusíku - glutaminsyntetasy.

Připraví se Murashige-Skoog (MS) médium, které obsahuje tyto látky:

- Murashige-Skoog sůl – 4,6 g/l (Tab.2)
- Sacharosa – 30 g/l
- MES – 0,5 g/l
- Myo-inositol – 0,1 g/l
- Agar – 7 g/l.

Tabulka 2: Složení Murashige–Skoog soli (Sigma).

Látka	mg/l
Dusičnan amonný	1650
Kyselina boritá	6,2
Chlorid vápenatý	332,2
Hexahydrát chloridu kobaltnatého	0,025
Pentahydrát síranu měďnatého	0,025
Dvojsodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové	37,26
Heptahydrát síranu železnatého	27,8
Síran hořečnatý	180,7
Hydrát síranu manganatého	16,9
Dihydrát kyseliny molybdenové	0,25
Jodid draselný	0,83
Dusičnan draselný	1900
Dihydrogenfosforečnan draselný	170
Heptahydrát síranu zinečnatého	8,6

MS sůl, sacharosa, MES a myo-inositol se rozpustí v destilované vodě a upraví se pH pomocí hydroxidu draselného na hodnotu 5,7. Poté se médium přelije

do Erlenmayerových baněk, přidá se agar a nechá se vše vyautoklávovat (120°C/20 min). Dále se do média o teplotě přibližně 60°C přidá Murashige-Skoog vitamíny a biotin.

- Biotin – 1 mg/l
- MS vitamíny (thiamin, kyselina nikotinová, pyridoxin) – 0,103 g/l

Nakonec se do baněk napipetuje různé množství fosfinotricinu a médium se rozlije do Petriho misek.

- Použité koncentrace fosfinotricinu – 1,5 mg/l, 3 mg/l, 4,5 mg/l, 5 mg/l, 5,5 mg/l, 6 mg/l, 6,5 mg/l, 7 mg/l, 7,5 mg/l, 8 mg/l

Sterilní semena *Arabidopsis thaliana* se rozmístí na médium. Petriho misky se utěsní parafilmem a umístí se do lednice na 3 dny, aby semena začala lépe klíčit. Poté se přemístí do klimakomory. Podmínky v klimakomoře byly 16 hodin světlo a 8 hodin tma, teplota byla nastavena na 22°C. Po třech týdnech se vyhodnotila nejvhodnější koncentrace fosfinotricinu.

3.4.4 Selekcce a pěstování

Sterilní semena získaná po transformaci se selektují na médiu, které je výše popsáno, ale bez dihydrogenfosforečnanu draselného. Koncentrace fosfinotricinu použitá pro selekci byla 5,5 mg/l. Jedna miska sloužící jako kontrola obsahuje médium bez fosfinotricinu a pěstují se na něm semena netransformované rostliny.

Po třech týdnech růstu na médiu se rostliny přesadí do květináčků stejné velikosti obsahující směs hlíny a perlitu 1:1, které se umístí do skleníku s regulovanou teplotou 25°C. Rostliny jsou zalévány a během růstu je možné odebírat materiál k ověření úspěšnosti transformace. Rostliny se zalévají, dokud nezačnou semena dozrávat.

3.4.5 Izolace genomové DNA

Izolace DNA se provedla z listu rostliny podle Kasajima et al. (2004). Z rostliny se odebralo 3-5 mg listu. Vždy pro kontrolu je důležité použít i netransformovanou rostlinu, nebo-li wild-type (WT). Rostlinný materiál se umístí do 1,5 ml mikrokumavky. Připraví se TE pufr, který má složení

- 10 mM Tris-HCl (pH 8)
- 1 mM kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA).

Extrakční pufr se připraví z těchto komponent:

- 200 mM Tris-HCl (pH 7,5)
- 250 mM NaCl
- 25 mM EDTA

- 0,5% SDS.

Extrakční pufr je nutné desetkrát naředit pomocí TE pufru. Ke vzorkům se přidá 200 μ l naředěného pufru a struktura listu se rozruší o stěnu mikrozkušavky pomocí „drtítek“ (Obr.15). Z mikrozkušavky se přímo odebírá vzorek pro PCR reakci.



Obrázek 15: Mikrozkušavka s „drtítkem“.

3.4.6 PCR metoda

PCR je založena na využití enzymu DNA-polymerasy, který opakovaně syntetizuje templátovou molekulu DNA. Syntéza DNA je řízena primery, což jsou krátké oligonukleotidy, které se párují s templátovou DNA na počátku a konci amplifikovaného fragmentu.

Na začátku každého prvního cyklu je nutné od sebe oddělit oba řetězce dvouřetězcové DNA (rozrušit vodíkové můstky) krátkým zvýšením teploty na 94-98°C po dobu 20-30 sekund - tento krok nazýváme denaturace. Po denaturaci nastává druhý krok (hybridizace primerů), kdy je reakční roztok ochlazen v přítomnosti velkého nadbytku obou primerů na teplotu 50-65°C. Primery nasedají na obě komplementární sekvence DNA. V třetím kroku při teplotě 75-80°C, který nazýváme syntéza DNA pomocí primerů, jsou pomocí obou primerů syntetizovány nové řetězce DNA v přítomnosti DNA-polymerasy a všech čtyř deoxyribonukleosidtrifosfátů (značení dNTP).

Technika PCR je založena na použití speciální DNA-polymerasy, která se izoluje z termofilní bakterie *Thermus aquaticus* (značení *Taq* polymerasa).

Připraví se mikrozkušavky pro PCR a označí se podle použitých primerů. Důležité je, že každá PCR reakce musí mít negativní kontrolu, která obsahuje místo DNA vodu.

Ve 2 ml mikrozkušavkách se připraví premix složený z:

- Taq polymerasy nebo TA polymerasy (musí být stále chlazená) – 2 μ l
- nukleotidů (10 mM) – 0,5 μ l
- 10x pufru k polymerase – 2 μ l
- vody – 12,5 μ l

– primerů – 1 μ l každého.

Vždy musíme použít dvojici primerů, z nichž jeden nasedá na počátek jednoho vlákna a druhý nakonec druhého vlákna (Tab.3 a 4). Premix se rozpipetuje do mikrokumavek a nakonec se přidá 1 μ l DNA vzorku. Mikrokumavky se zvortexují a stočí na pikofuze.

Nastaví se termocycler v rozmezí teplot tání (T_m), které jsou určeny pro dané primery.

Cykly probíhající při PCR reakci:

1. 94°C...3 minuty
2. 94°C...45 sekund
3. 56,4 - 69,1°C ...45 sekund
4. 72°C...1 minuta 30 sekund
5. 72°C...10 minut
6. 4°C...5 minut

Cykly 2 až 4 se opakují 45x po sobě.

Amplifikace části genu pro aktin (provozní gen), genu *AtCKX1* a *AtCKX5* sloužila jako kontrola kvality DNA. Pro zlepšení amplifikace byly PCR reakce nastaveny s různými aditivami (DMSO, betain) či s našťípanou genomovou DNA. DNA byla šťípána přes noc pomocí endonuklasy *Hind III* v pufru M (Takara) při teplotě 37°C. Inaktivace enzymu probíhala při 70°C po dobu 25 minut.

Tabulka 3: Primery použité pro testování rostlin *Arabidopsis thaliana*.

Název primerů	T_m	Velikost fragmentu
1)Amplifikace části genu pro aktin: ARAact fw+ARAact rev	58°C	695 bp
2)Amplifikace části genu <i>ZmCKX1</i> : Cko1 fw+Cko1 rev	56,4°C	228 bp
3)Amplifikace fragmentu - promotor PHT/gen <i>ZmCKX1</i> : Hvpht1-1 fw+ZmCKX1 rev	65 °C	1700 bp
4)Amplifikace fragmentu – gen <i>ZmCKX1/nos</i> terminátor: Cko1 fw+nos hindiii	61,4°C	557 bp
5)Amplifikace promotoru PHT: Hvpht1-1 fw+hvpht1-1 rev	69,1°C	1400 bp
6)Amplifikace genu <i>AtCKX1</i> : AtCKX1 fw+AtCKX1 rev	65°C	1196 bp
7)Amplifikace části genu <i>ZmCKX1</i> ZmCKX1sal1+ZmCKX1 rev	58°C	300 bp
8)Amplifikace části genu <i>bar</i> BAR fw+BAR rev	60°C	421 bp
9)Amplifikace genu <i>AtCKX5</i> : AtCKX5 fw+AtCKX5 rev	66°C	2018 bp

Tabulka 4: Sekvence primerů použitých pro testování rostlin *Arabidopsis thaliana*.

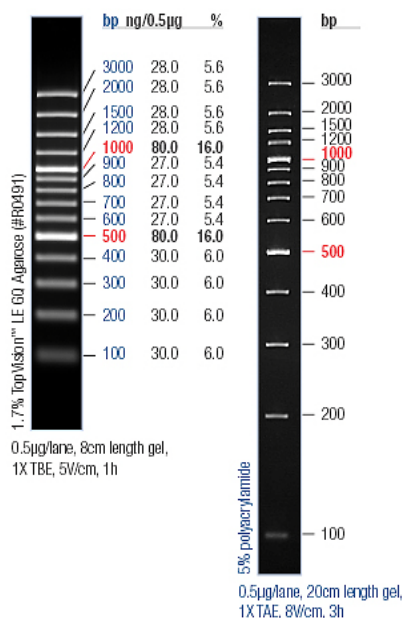
Název primerů	Sekvence
ARAact fw+ARAact rev	5'-GCCATCCAAGCTGTTCTCTC-3' 5'-GGTGGTGCAACGACCTTAAT-3'
Cko1 fw+Cko1 rev	5'-ACGCCGTCTGAGGACGTGTT-3' 5'-GGTCGTA CT TGTTCATCTCCA-3'
Hvpht1-1 fw+ZmCKX1 rev	5'-GAGCTCCGACTACCCCGCGATA-3' 5'-GAACGCGATGGTGTAGGGCCA-3'
Cko1 fw+nos hindiii	5'-ACGCCGTCTGAGGACGTGTT-3' 5'-CCCAAGCTTATCTAGTAACATAGATGACA-3'
Hvpht1-1 fw+hvpht1-1 rev	5'-GAGCTCCGACTACCCCGCGATA-3' 5'-GGTCGCCGCGATCTCTCAGC-3'
AtCKX1 fw+AtCKX1 rev	5'-GAAGTCGTAACCTGTTCTGAGAAGCG-3' 5'-AGAATCGCTAGAGGGTCGTAGGCTTG-3'
ZmCKX1sal1+ZmCKX1 rev	5'-ACGCGTCGACATGGCGGTGGTTTATTACCT-3' 5'-GAACGCGATGGTGTAGGGCCA-3'
BAR fw+BAR rev	5'-AGCACGGGA ACTGGCATGAC-3' 5'-GGTCTGCACCATCGTCAACC-3'
AtCKX5 fw+AtCKX5 rev	5'-GCACGAATCTCTCTCGAACCACTC-3' 5'-CGCTGACGAAGAAGACGACGACG-3'

3.4.6.1 Elektroforéza v agarosovém gelu

DNA fragmenty vzniklé díky PCR reakcím byly analyzovány pomocí agarosové elektroforézy. Elektroforéza je metoda dělení částic na základě jejich elektrického náboje ve stejnosměrném elektrickém poli. DNA fragmenty se pohybují v agarosovém gelu vlivem působení stejnosměrného elektrického pole tak, že negativně nabitě molekuly

DNA putují od záporně nabitě elektrody (katody) ke kladně nabitě elektrodě (anodě). Dělení fragmentů je závislé na jejich velikosti. Kratší úseky DNA se pohybují rychleji a delší naopak pomaleji, protože jsou v hustém gelu více zpomalovány. Protože DNA není na agarosovém gelu vidět, je nutné ji označit. Do gelu se přidává ethidium bromid, který se interkaluje do řetězce DNA a má schopnost v ultrafialovém světle fluoreskovat.

Ke vzorku po PCR reakci se přidají 4 μ l vzorkovacího pufru, který je složen z 0,09% bromfenolové modři, 60% glycerolu, 60 mM EDTA a 0,09% xylencyanol FF (6x Loading Dye Buffer). Vzorky se nanesou do jamek na agarosovém gelu, které se vytvoří pomocí hřebínků. Byl použit 1% agarosový gel, který se připraví z 5 g agarosy, 10 ml 50x TAE (0,01M EDTA a 0,4M Tris pH 8) a 490 ml vody. Agarosa se zahřívá v mikrovlnné troubě, dokud není roztok průhledný. Rozpuštěný gel se nalije spolu s ethidium bromidem (0,03%) do misek s hřebínky a nechá se 20 min tuhnout. Poté se gel přemístí do elektroforetické vany s elektrodovým pufrům TAE. Pufř je důležitý pro vedení elektrického proudu. Po nanesení vzorků a DNA standardu se vana připojí k elektrickému zdroji nastavenému na 125 voltů. DNA standard (100 bp DNA Ladder; Obr.16) nám usnadňuje orientaci na gelu a určujeme podle něho velikost amplikonů. Rozdělení částic trvá přibližně dvacet minut. S použitím ultrafialového světla vizualizujeme DNA fragmenty. Poté se gel může vyfotit.

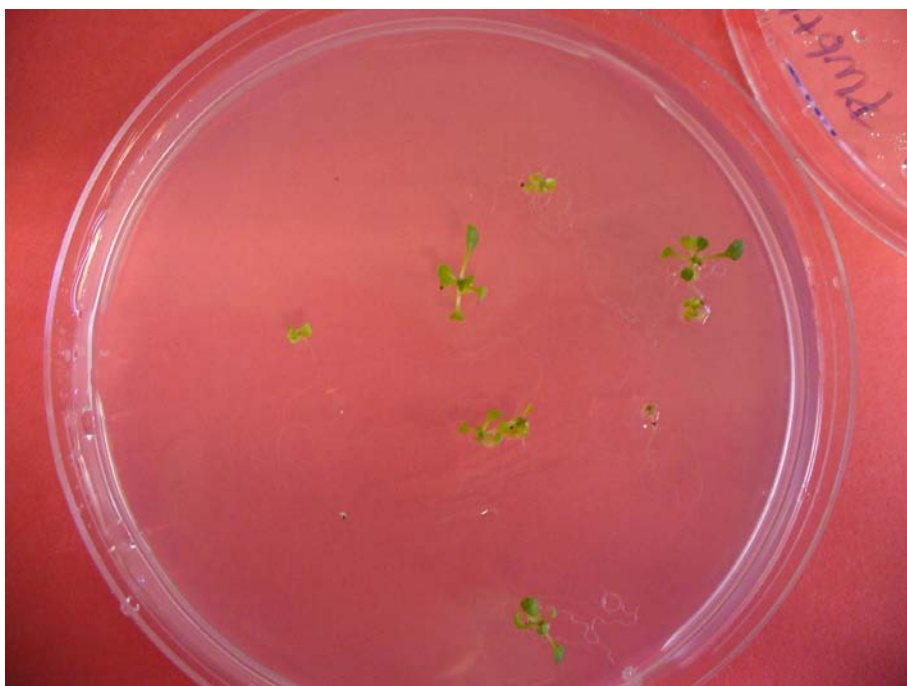


Obrázek 16: DNA standard použitý při agarosové elektroforéze – 100 bp DNA Ladder (Takara).

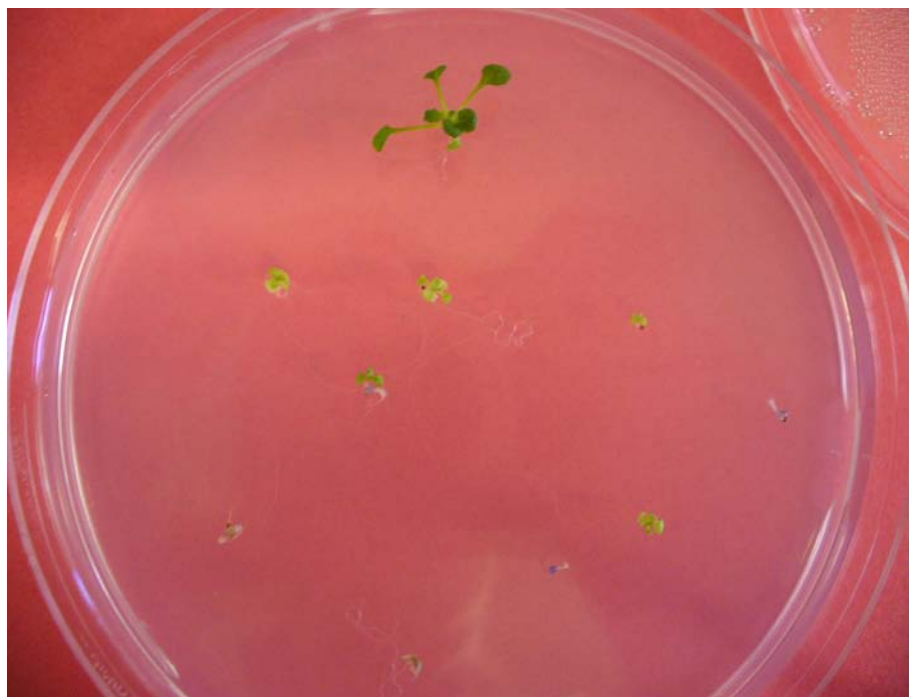
3.5 Výsledky, diskuze

3.5.1 Stanovení koncentrace fosfinotricinu použité pro selekci rostlin *Arabidopsis thaliana*

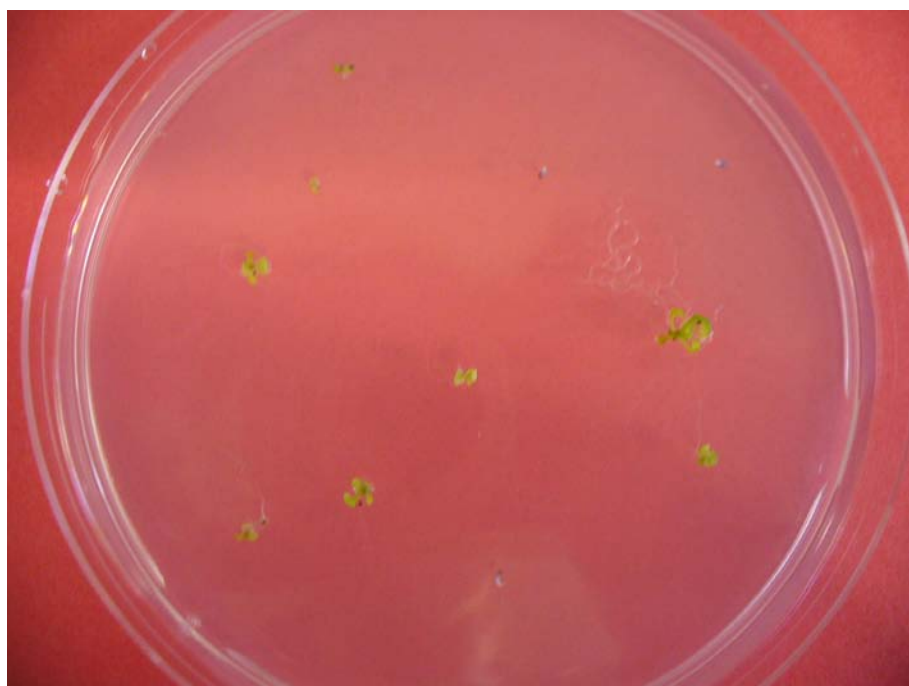
Pro určení vhodné koncentrace fosfinotricinu byly použity netransformované rostliny *Arabidopsis thaliana*. Rostliny bez genu pro selekci nemohou růst na médiu s fosfinotricinem (inhibuje enzym glutaminsyntetasu). Byly testovány tyto koncentrace: 1,5 mg/l, 3 mg/l, 4,5 mg/l, 5 mg/l, 5,5 mg/l, 6 mg/l, 6,5 mg/l, 7 mg/l, 7,5 mg/l, 8 mg/l. Jako vhodná koncentrace fosfinotricinu pro selekci transformantů byla stanovena hodnota 5,5 mg/l (Obr.17, 18, 19). Při této koncentraci všechny rostliny zežloutly, byly zakrslé a následně uhynuly.



Obrázek 17: Koncentrace fosfinotricinu 4,5 mg/l.



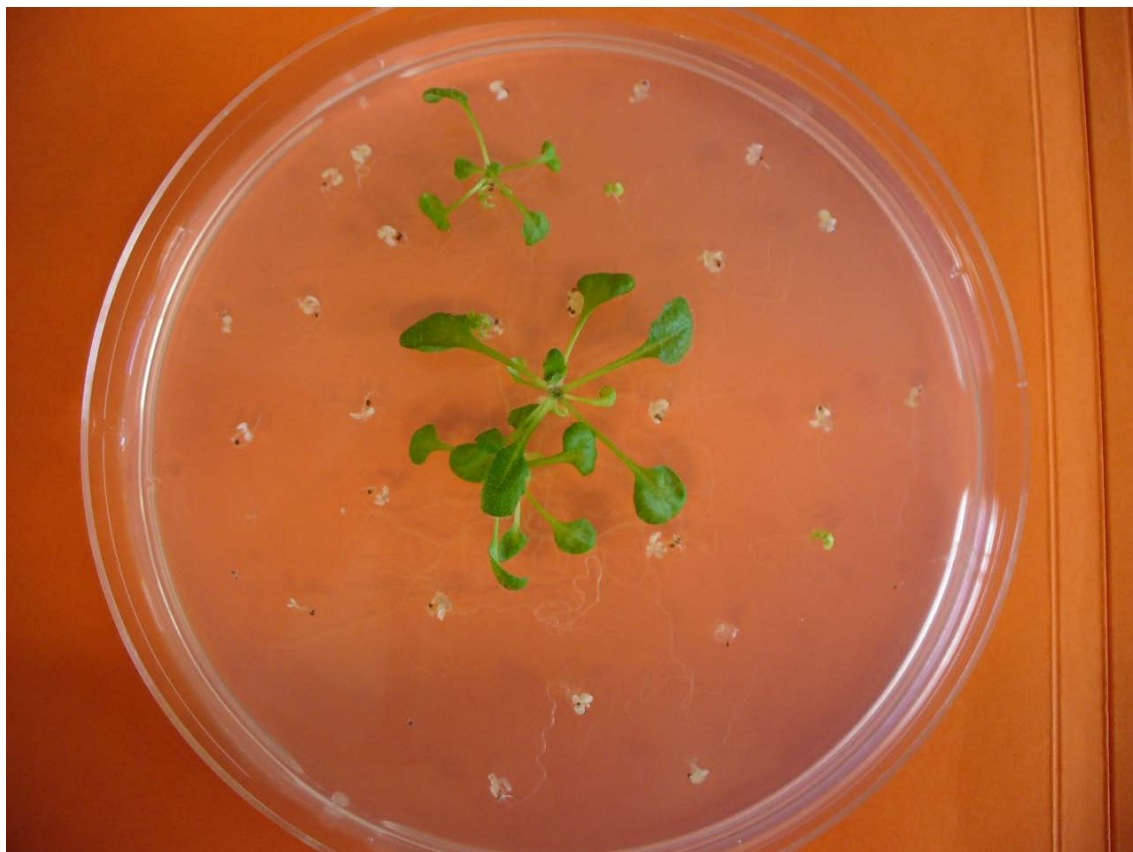
Obrázek 18: Koncentrace fosfinitricinu 5 mg/l.



Obrázek 19: Koncentrace fosfinitricinu 5,5 mg/l.

3.5.2 Selekcce

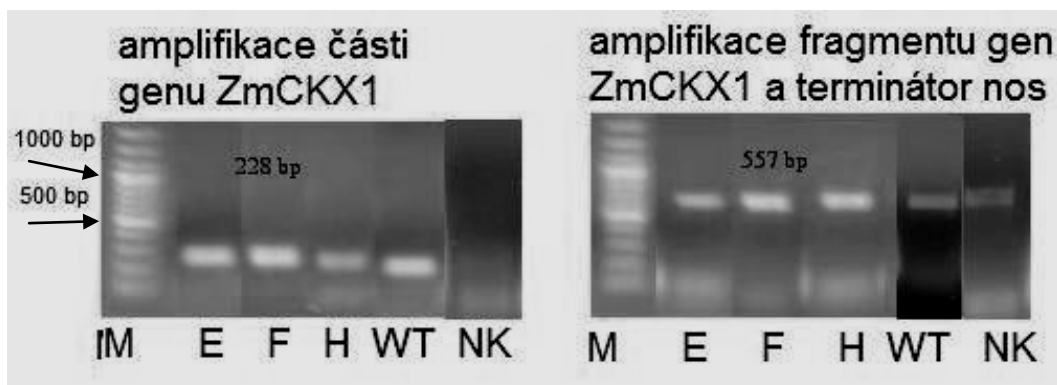
Vždy jsem si připravila deset Petriho misek. Na každou misku jsem rozmístila přibližně 30 semen. Po první selekci mi vyrostlo 8 rostlin. Při druhé a třetí selekci vyrostlo celkem 46 rostlin. Přibližně tedy z 900 semen selekci přežilo 54 rostlin (Obr.20).



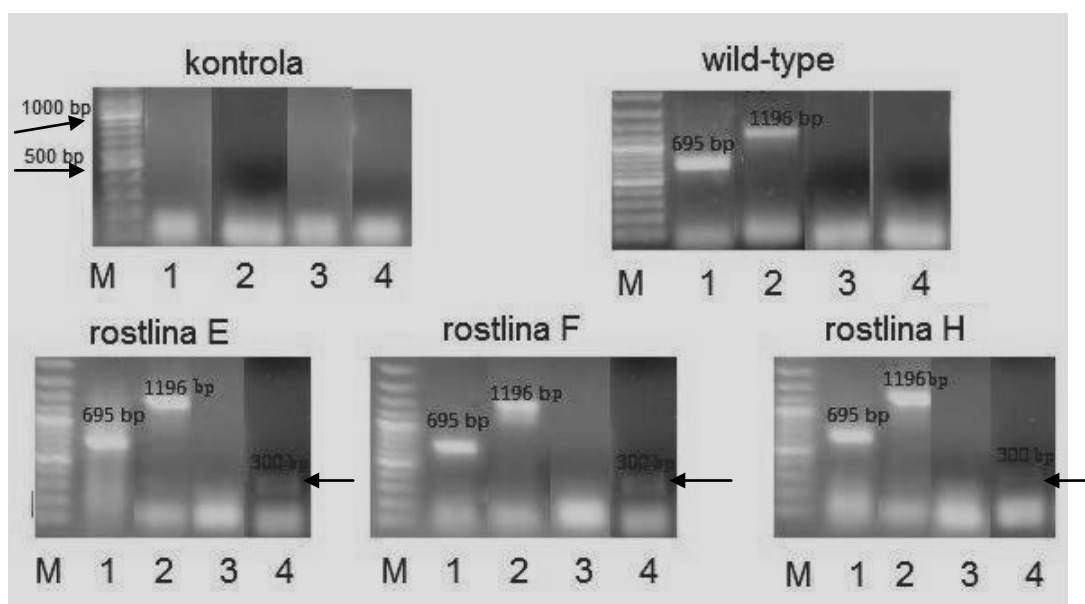
Obrázek 20: Selekcce transgenních rostlin na médiu obsahující fosfotricin (5,5 mg/l).

3.5.3 PCR

Vyselektované rostliny byly označeny písmeny podle abecedního pořádku. Pro kontrolu byly amplifikovány sekvence endogenních genů – aktin, *AtCKX1* a *AtCKX5* (Obr.22). Úspěšně byly amplifikovány jen sekvence genů pro aktin a *AtCKX1*. U primérů č. 2 a 4 (číslování podle tabulky 3) byly v negativních kontrolách nebo ve wild-type rostlinách pozorovány kontaminace (Obr.21). Amplifikace části genu *ZmCKX1* (priméry č. 7) byla u tří rostlin velice slabá (Obr.22).



Obrázek 21: Amplifikace části genu *ZmCKX1*, primery č. 2 - 228 bp a amplifikace fragmentu genu *ZmCKX1*/terminátor *nos*, primery č. 4 - 557 bp. E, F, H - rostliny; NK - negativní kontrola, M – standard molekulové hmotnosti.



Obrázek 22: Rostliny E, F a H. Amplifikace endogenních genů aktin (1), *AtCKX1* (2), *AtCKX5* (3) a části genu *ZmCKX1*, primery č. 7 (4), M – standard molekulové hmotnosti.

Amplifikace pomocí primerů č. 3, 5, 8 a 9 byla neúspěšná nejspíše kvůli kvalitě genomové DNA, která byla izolována metodou nevyužívající žádné purifikační kroky. PCR reakce byly nastaveny s různými aditivami (DMSO, betain) či s naštípanou genomovou DNA (*Hind III*, přes noc 37°C). Bohužel ani toto amplifikaci nezlepšilo. Je tedy možné, že metoda izolace genomové DNA nebyla vhodná pro PCR amplifikaci.

Pouze u tří rostlin došlo k slabé amplifikaci části genu *ZmCKX1*. Bohužel z těchto výsledků nelze jednoznačně říci, že jsou rostliny transgenní.

4 Závěr

Cílem teoretické části práce bylo zpracovat literární rešerši související s tématem mé praktické části, ve které jsem transformovala rostliny *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. V bakalářské práci je popsán vývoj metody transformace rostlin *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens* a rozdělení metod transformace na přímé a nepřímé. Další kapitoly se věnují rostlinným hormonům cytokininům a transgenním rostlinám s vloženým genem pro cytokin-dehydrogenasu. Pro transformaci byly použity buňky *Agrobacteria* nesoucí plazmid pBract 303 s genem pro kukuřičnou cytokinidehydrogenasu 1 (*ZmCKX1*) pod kontrolou kořenově specifického promotoru z ječmene (*HvPHT1-1*).

V praktické části mé bakalářské práce jsem nejdříve transformovala rostliny *Arabidopsis thaliana* pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Dále bylo důležité určit koncentraci fosfinitricinu pro selekci transformantů. Optimální koncentrace fosfinitricinu měla hodnotu 5,5 mg/l. Metodou „floral-dip” bylo transformováno patnáct rostlin *Arabidopsis thaliana*. Z přibližně 900 semen bylo vyselektováno 54 rostlin. Pro PCR reakci jsem izolovala genomovou DNA z listů a používala jsem šest dvojic primerů pro potvrzení integrace transgenů. Další tři dvojice primerů byly použity pro amplifikaci endogenních genů. Úspěšně byly amplifikovány pouze dva endogenní geny. Při ověřování inserce transgenů do genomu rostlin byla u dvou dvojic primerů amplifikace i v negativní kontrole či ve wild-type rostlině. Velice slabá amplifikace části genu *ZmCKX1* vyšla u tří rostlin pomocí jedné dvojice primerů. Ke kontaminaci u těchto primerů nedošlo. Amplifikace pomocí ostatních dvojic byla pro všechny rostliny negativní. Amplifikace genu *ZmCKX1* byla velice slabá, i přesto, že PCR reakce byly nastaveny i s různými koncentracemi aditiv (DMSO, betain) či s naštípanou genomovou DNA. Je tedy možné, že metoda izolace genomové DNA nebyla vhodná pro PCR amplifikaci. Nelze proto jednoznačně tvrdit, že došlo k inserci transgenů do genomu rostliny *Arabidopsis thaliana*. Bude proto nutné PCR analýzu opakovat s genomovou DNA vyizolovanou pomocí jiné metody využívající i purifikační kroky. Bylo by také vhodné navrhnout nové primery pro testování rostlin. Z časových důvodů již nebylo možné toto provést. Práce bude pokračovat během navazujícího studia.

5 Seznam použité literatury

- **Abu-Arish A., Frenkiel-Krispin D., Fricke T., Tzfira T., Citovsky V., Wolf S. G., Elbaum M.** (2004) Three-dimensional reconstruction of *Agrobacterium* VirE2 protein with single-stranded DNA. *J. Biol. Chem.* **279**, 25359-25363.
- **Ashikari M., Sakakibara H., Lin S., Yamamoto T., Takashi T., Nishimura A., Angeles E. R., Qian Q., Kitano H., Matsuoka M.** (2005) Cytokinin oxidase regulates rice grain production. *Sci.* **309**, 741-745.
- **Bechtold N., Elis J., Pelletier G.** (1993) In planta *Agrobacterium*-mediated gene transfer by infiltration of adult *Arabidopsis thaliana* plants. *Life Sci.* **316**, 1194-1199.
- **Bent A. F.** (2000) *Arabidopsis* in planta transformation. Uses, mechanisms, and prospects for transformation of other species. *Plant Physiol.* **124**, 1540-1547.
- **Brown, T. A.** (2007) Klonování genů a analýza DNA, pp. 141-150, Univerzita Palackého Olomouc, Olomouc, Česká Republika.
- **Brugière N., Jiao S. P., Hantke S., Zinselmeier C., Roessler J. A., Niu X. M., Jones R. J., Habben, J. E.** (2003) Cytokinin oxidase gene expression in maize is localized to the vasculature, and is induced by cytokinins, abscisic acid, and abiotic stress. *Plant Physiol.* **132**, 1228-1240.
- **Brzobohatý B., Moore I., Kristoffersen P., Bako L., Campos N., Schell J., Palme K.** (1993). Release of active cytokinin by a *beta*-glucosidase localized to the maize root meristem. *Sci.* **262**, 1051-1054.
- **Clough S. J., Bent A. F.** (1998) Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735-743.
- **Chan M. T., Lee T. M., Chang H. H.** (1992) Transformation of indica rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Physiol.* **33**, 577-583.
- **Cheng M., Fry J. E., Pang S., Zhou H., Hironaka C. M., Duncan D. R., Conner T. W., Wan Y.** (1997) Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol.* **115**, 971-980.
- **Chung M. H., Chen M. K., Pan S. M.** (2000) Floral spray transformation can efficiently generate *Arabidopsis* transgenic plants. *Transgenic Res.* **9**, 471-476.
- **Feldmann K. A., Marks M. D.** (1987) *Agrobacterium*-mediated transformation of germinating seeds of *Arabidopsis thaliana*: a non-tissue culture approach. *Mol. Gen. Genet.* **208**, 1-9.

- **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 quinones as electron acceptors. *Biochem. J.* **380**, 121-130.
- **Galuszka P., Frébortová J., Werner T., Yamada M., Strnad M., Schmölling T., Frébort I.** (2004) Cytokinin oxidase/dehydrogenase genes in barley and wheat. *Eur. J. Biochem.* **271**, 3990-4002.
- **Gandhi R., Maheshwari S. C., Jitendra P., Khurana J. P., Khurana P.** (2001) Genetic and molecular analysis of *Arabidopsis thaliana* (ecotype Estland) transformed with *Agrobacterium*. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* **37**, 629-637.
- **Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinall 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**, 1746-1748.
- **Hiei Y., Ohta S., Komari T., Kumashiro T.** (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* **6**, 271-282.
- **Hirose N., Takei K., Kuroha T., Kamada-Nobusada T., Hayashi H., Sakakibara H.** (2008) Regulation of cytokinin biosynthesis, compartmentalization and translocation. *J. Exp. Bot.* **59**, 75-83.
- **Horsch R. B., Fry J. E., Hoffman N. L., Eichholtz D., Rogers S. G., Fraley R.T.** (1985) A simple method for transferring genes into plants. *Sci.* **227**, 1229-1231.
- **Houba-Hérin N., Pethe C., d'Alayer J., Laloue M.** (1999) Cytokinin oxidase from *Zea mays*: Purification, cDNA cloning and expression in moss protoplasts. *Plant J.* **17**, 615-626.
- **Indurker S., Misra H. S., Eapen S.** (2007) Genetic transformation of chickpea (*Cicer arietinum* L.) with insecticidal crystal protein gene using particle gun bombardment. *Plant Cell Rep.* **26**, 755-763.
- **Ishida I., Saito H., Ohta S., Hiei Y., Komari T., Kumashiro T.** (1996) High efficiency transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Nat. Biotechnol.* **14**, 745-750.
- **Kasajima I., Ide Y., Ohkama-Ohtsu N., Hayashi H., Yoneyama T. a Fujiwara T.** (2004) A protocol for rapid DNA extraction from *Arabidopsis thaliana* for PCR analysis. *Plant Mol. Biol. Rep.* **22**, 49-52.
- **Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I.** (2006) Cytokinin-mediated control of leaf longevity by

AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **103**, 814-819.

- **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.
- **Lacroix B., Tzfira T., Vainsten A., Citovsky V.** (2006) A case of promiscuity: *Agrobacterium's* endless hunt for new partners. *Trends Genet.* **22**, 29-37.
- **Lessard P. A., Kulaveerasingam H., York G. M., Strong A., Sinskey A.J.** (2002) Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab. Eng.* **4**, 67-79.
- **Letham D. S.** (1963) Zeatin, a factor inducing cell division isolated from *Zea mays*. *Life Sci.* **8**, 569-573.
- **Magrini V., Creighton C., White D., Hartzell P. L., Youderian P.** (1998) The *aadA* gene of plasmid R100 confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **180**, 6757-6760.
- **Miki B., McHugh S.** (2004) Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety. *J. Biotechnol.* **107**, 193-232.
- **Miller C. O., Skoog F., von Saltza M. H., Strong M.** (1955) Kinetin, a cell division factor from deoxyribonucleic acid. *J. Am. Chem. Soc.* **77**, 1329-1334.
- **Miyawaki K., Tarkowski P., Matsumoto-Kitano M., Kato T., Sato S., Tarkowska D., Tabata S., Sandberg G., Kakimoto T.** (2006) Roles of *Arabidopsis* ATP-ADP isopentenyltransferases and tRNA isopentenyltransferases in cytokinin biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A* **103**, 16598-16603.
- **Mok D., Mok M. C.** (2001) Cytokinin metabolism and action. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **52**, 89-118.
- **Morris R. O., Bilyeu K. D., Laskey J. G., Cheikh N. N.** (1999) Isolation of a gene encoding a glycosylated cytokinin oxidase from maize. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **255**, 328-333.
- **Newell C.** (2000) Plant transformation technology. *Mol. Biol.* **16**, 53-65.
- **Ondřej M.** (1992) *Genové inženýrství kulturních rostlin*, pp. 147-174, Academia, Praha, Česká Republika.
- **Procházka S., Macháčková I., Krekule J., Šebánek J.** (1998) *Fyziologie rostlin*, pp. 253-259, Academia, Praha, Česká Republika.
- **Sakakibara H.** (2006) Cytokinins: activity, biosynthesis and translocation. *Annual Rev. Plant Biol.* **57**, 431-449.

- **Schmülling T., Werner T., Riefler M., Krupková E., Bartrina y Manns I.** (2003) Structure and function of cytokinin oxidase/dehydrogenase genes of maize, rice, *Arabidopsis* and other species. *J. Plant Res.* **116**, 241-52.
- **Schünmann P. H. D., Richardson A. E., Smith F. W., Delhaize E.** (2004) Characterization of promoter expression patterns derived from the Pht1 phosphate transporter genes of barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Exp. Bot.* **55**, 855-865.
- **Takei K., Yamaya T., Sakakibara H.** (2004) *Arabidopsis* CYP735A1 and CYP735A2 encode cytokinin hydroxylases that catalyze the biosynthesis of trans-zeatin. *J. Biol. Chem.* **279**, 41866-41872.
- **Tarkowski P., Doležal K., Strnad M.** (2004) Analytické metody studia cytokini-nů. *Chem. Listy* **98**, 834-841.
- **Tingay S., McElroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R.** (1997) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *Plant J.* **11**, 1369-1376.
- **Thomson C. J., Movva N. R., Tizard R., Cramer R., Davies J. E., Lauwereys M., Botterman J.** (1987) Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *The EMBO Journal* **6**, 2519-2523.
- **Tzfira T. L. J., Lacroix B., Citovsky V.** (2004) *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends Genet.* **20**, 375-383.
- **Tzfira T., Citovsky V.** (2006) *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **17**, 147-154.
- **Vikram M., Koiwa H.** (2009) Glyphosate resistance as a versatile selection marker for *Arabidopsis* transformation. *Plant Mol. Biol. Rep.* **27**, 132-138.
- **Ward E., Barnes W.** (1988) VirD2 protein of *Agrobacterium tumefaciens* very tightly linked to the 5' end of T-strand DNA. *Science* **242**, 927-930.
- **Werner T., Motyka V., Laucou V., Smets R., Onckelen H., Schmülling T.** (2003) Cytokinin-deficient transgenic *Arabidopsis* plants show multiple developmental alterations indicating opposite functions of cytokinins in the regulation of shoot and root meristem activity. *The Plant Cell* **15**, 2532-2550.
- **Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmülling T.** (2001) Regulation of plant growth by cytokinin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 10487-10492.
- **Werner T., Schmülling T.** (2008) Cytokinin action in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* **12**, 527-538.
- **Yang S. H., Yu H., Goh C. J.** (2003) Functional characterisation of a cytokinin oxidase gene *DSCCKX1* in *Dendrobium orchid*. *Plant Mol. Biol.* **51**, 237-248.

- **Yaronskaya E., Vershilovskaya I., Poers I., Alawady A. E., Grimm N. A. B.** (2006) Cytokinin effects on tetrapyrrole biosynthesis and photosynthetic activity in barley seedlings. *Planta* **224**, 700-709.
- **Zupan J. R., Zambryski P.** (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiol.* **107**, 1041-1047.

6 Seznam použitých zkratek

<i>AtCKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu z <i>Arabidopsis thaliana</i>
CKX	cytokinindehydrogenasa
cZR	<i>cis</i> -zeatin ribosid
cZRMP	<i>cis</i> -zeatin ribosid monofosfát
DMAPP	dimethylallyldifosfát
DZ	dihydrozeatin
DZR	dihydrozeatin ribosid
DZRMP	dihydrozeatin ribosid monofosfát
<i>HvCKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu z ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>)
iP	N ⁶ - isopentenyladenin
iPR	N ⁶ - isopentenyladenin ribosid
iPRDP	N ⁶ - isopentenyladenin ribosid difosfát
iPRMP	N ⁶ - isopentenyladenin ribosid monofosfát
iPRTP	N ⁶ - isopentenyladenin ribosid trifosfát
IPT	isopentenyltransferasa
LOG	lonely guy
MES	kyselina 2-(N-morfolino)ethansulfonová
Ti	tumor inducing
tZR	<i>trans</i> -zeatin ribosid
tZRDP	<i>trans</i> -zeatin ribosid difosfát
tZRMP	<i>trans</i> -zeatin ribosid monofosfát
WT	wild-type
ZmCKX	cytokinindehydrogenasa z kukuřice (<i>Zea mays</i>)
<i>ZmCKX</i>	gen kódující cytokinindehydrogenasu z kukuřice