

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Příprava transgenních rostlin s expresí fluorescenčně značených mitogen-aktivovaných proteinkinas

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Petra Rašmanová
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Dominik Novák
Rok:	: 2017

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

V Olomouci dne 2. 5. 2017

Poděkování

Ráda bych v první řadě poděkovala vedoucímu mé bakalářské práce Mgr. Dominiku Novákovi za jeho cenné rady, které mi neúnavně předával po celou dobu mé práce a za jeho bezmeznou podporu, kterou mi během studia poskytl. Dále bych ráda poděkovala celému oddělení buněčné biologie CRH za pomoc při realizaci mé experimentální části a poskytnutí všech prostředků, které jsem k experimentům potřebovala. Na závěr chci poděkovat mé rodině, především mamince, která celou dobu stojí po mém boku a také mým přítelkyním, které mi byly během všech školních let na blízku.

Tato práce byla podpořena Grantovou agenturou České Republiky (GAČR), GA16-22044S, Funkční regulace fosfolipasy D alfa 1 prostřednictvím MPK3 závislé fosforylace.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Petra Rašmanová
Název práce	Příprava transgenních rostlin s expresí fluorescenčně značených mitogen-aktivovaných proteinkinas
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Dominik Novák
Rok obhajoby práce	2017

Abstrakt

Kaskády mitogen-aktivovaných proteinkinas fungují v rostlinách jako přenašeči signálu, který může být vyvolán různými podněty, jako například solným stresem, stresem vyvolaným suchem, stresem z těžkých kovů anebo také stresem vyvolaným patogeny, jako například bakteriemi nebo parazitickými houbami. Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 je součástí těchto mitogen-aktivovaných proteinkinasevých kaskád a je zapojena v indukované rezistenci vůči biotickému i abiotickému stresu. Cílem této práce bylo připravit transgenní rostliny s expresí fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy 3. Pro tento účel byly konstrukty pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW použity pro transientní transformaci do listů *Nicotiana benthamiana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Následně byla provedena stabilní transformace těchto konstruktů do rostlin *Arabidopsis thaliana* ekotyp Columbia metodou floral dip a tato práce byla završena úspěšnou selekcí a mikroskopickou dokumentací T2 generace transgenních rostlin.

Klíčová slova	MAPK, MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , transformace
Počet stran	53
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Petra Rašmanová
Title	Development of transgenic plants with expression of fluorescently labeled mitogen-activated protein kinases
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Dominik Novák
The year of presentation	2017

Abstract

Mitogen-activated protein kinase cascades are involved in signal transduction in plants. The signal can be caused by various kinds of stimuli such as salt stress, drought stress, heavy metal stress or pathogen stress, like bacteria or fungi. Mitogen-activated protein kinase 3 is part of the mitogen-activated protein kinase cascades and is involved in induced resistance to biotic and abiotic stress. The aim of this thesis was to produce transgenic plants with expression of fluorescently labeled mitogen-activated protein kinase 3. For this purpose, constructs for C-terminal fusion *pMPK3::MPK3:mCherry* in a vector pB7m34GW and for N-terminal fusion *pMPK3::mCherry:MPK3* in a vector pB7m34GW were used for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transient transformation of *Nicotiana benthamiana* leaves. Subsequently, those constructs were stably transformed into *Arabidopsis thaliana* plants, ecotype Columbia, by the floral dip method. The thesis was completed by successful selection and microscopic documentation of transgenic plants of T2 generation.

Keywords	MAPK, MPK3, <i>Arabidopsis thaliana</i> , <i>Agrobacterium tumefaciens</i> , transformation
Number of pages	53
Language	Czech

OBSAH

1. ÚVOD	9
2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	10
2. 1 <i>Arabidopsis thaliana</i> jako modelový organismus	10
2. 2 Transformace pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
2. 2. 1 Ti plasmid.....	13
2. 2. 2 Přenos T-DNA do buňky hostitele	14
2. 2. 3 Přenos T-DNA do jádra buňky hostitele	17
2. 2. 4 Integrace T-DNA.....	18
2. 3 MAPK signalizace.....	20
2. 3. 1 MAPKKK.....	22
2. 3. 2 MAPKK	22
2. 3. 3 MAPK	23
2. 3. 3. 1 MPK3	24
3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	26
3. 1 Materiál a metody.....	26
3. 1. 1 Laboratorní přístroje.....	26
3. 1. 2 Mikroskopické vybavení laboratoře.....	26
3. 1. 3 Chemikálie	27
3. 1. 4 Rostlinný materiál	27
3. 1. 5 Mikrobiologický materiál.....	27
3. 1. 6 Metody.....	27
3. 1. 6. 1 Transientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> L.	27
3. 1. 6. 2 Mikroskopická dokumentace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> L.	29
3. 1. 6. 3 Povrchová sterilizace semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3. 1. 6. 4 Příprava ½ MS média pro pěstování rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	29
3. 1. 6. 5 Vysazení semen <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3. 1. 6. 6 Stabilní transformace rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3. 1. 6. 7 Selektce transgenních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i>	31
3. 1. 6. 8 Mikroskopická dokumentace <i>Arabidopsis thaliana</i> T2 generace	32

4. VÝSLEDKY A DISKUZE	33
4. 1 Transientní transformace listů <i>Nicotiana benthamiana</i> L. a mikroskopická dokumentace.....	33
4. 2 Selektce transgenních rostlin <i>Arabidopsis thaliana</i> , T1 generace.....	35
4. 3 Mikroskopická dokumentace <i>Arabidopsis thaliana</i> T2 generace	36
5. ZÁVĚR	43
6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	44
7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	53

CÍLE PRÁCE

TEORETICKÁ ČÁST

Samostatné zpracování literární rešerše týkající se *Arabidopsis thaliana* jako modelového organismu, dále rešerše týkající se *Agrobacterium tumefaciens* a transformace na molekulární úrovni a v poslední řadě zpracování tématu mitogen-aktivovaných proteinkinas.

PRAKTICKÁ ČÁST

- 1) Transientní transformace *Nicotiana benthamiana* konstrukty pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW.
- 2) Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* konstrukty pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW metodou floral dip.
- 3) Identifikace transformovaných semenáčků *Arabidopsis thaliana*.

1. ÚVOD

Transformace rostlin je proces genetické manipulace, pomocí které jsou cizorodé geny vneseny do rostlinných buněk a stabilně integrovány do genomu rostlin (Zhang *et al.*, 2006). V roce 1983 byla vytvořena první transgenní pletiva a rostliny za použití kmenu *Agrobacterium tumefaciens*, v němž byly jeho onkogeny nahrazeny geny pro rezistenci vůči antibiotikům (Van Lijsebettens a Angenon, 2013). Původně transformace pomocí *A. tumefaciens* probíhala složitě a byla časově náročná. Transformace byla prováděna například tak, že rostlině byly odříznuty apikální meristémy, v místě odříznutí byla inokulována kultura *A. tumefaciens* a následoval růst výhonků z odříznutého místa (Chang *et al.*, 1994). Další metody transformace vyžadovaly například pletivové kultury kořenů rostliny, části hypokotylu, semena a samotou regeneraci celé rostliny. Proto byla vyvinuta spolehlivější a jednodušší metoda, a to transformace rostlin pomocí vakuové infiltrace (Bechtold a Pelletier, 1998; Clough a Bent, 1998; Ye *et al.*, 1999). Přesto byla v roce 1998 S. J. Cloughem a A. F. Bentem publikována metoda s názvem „floral dip“. Vytvoření protokolu pro floral dip výrazně usnadnilo transformaci *A. thaliana* pomocí *A. tumefaciens* (Davis *et al.*, 2009). Tato metoda je velmi jednoduchá na provedení – *Agrobacterium* je aplikováno na květy *Arabidopsis* za použití smáčedla. Není třeba žádných pletivových kultur, proto je také zamezeno somaklonální variabilitě (Bent, 2006). V této bakalářské práci je využita metoda floral dip pro stabilní transformaci *Arabidopsis thaliana*, kde jsou připraveny transgenní rostliny s expresí fluorescenčně značené mitogen-aktivované proteinkinasy 3 (MPK3). MPK3 je součástí tzv. MAPK kaskád, které tvoří signální dráhy a účastní se procesů jako je buněčná proliferace, diferenciace, apoptóza a reakce na biotický nebo abiotický stres (Plotnikov *et al.*, 2011).

2. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 *Arabidopsis thaliana* jako modelový organismus

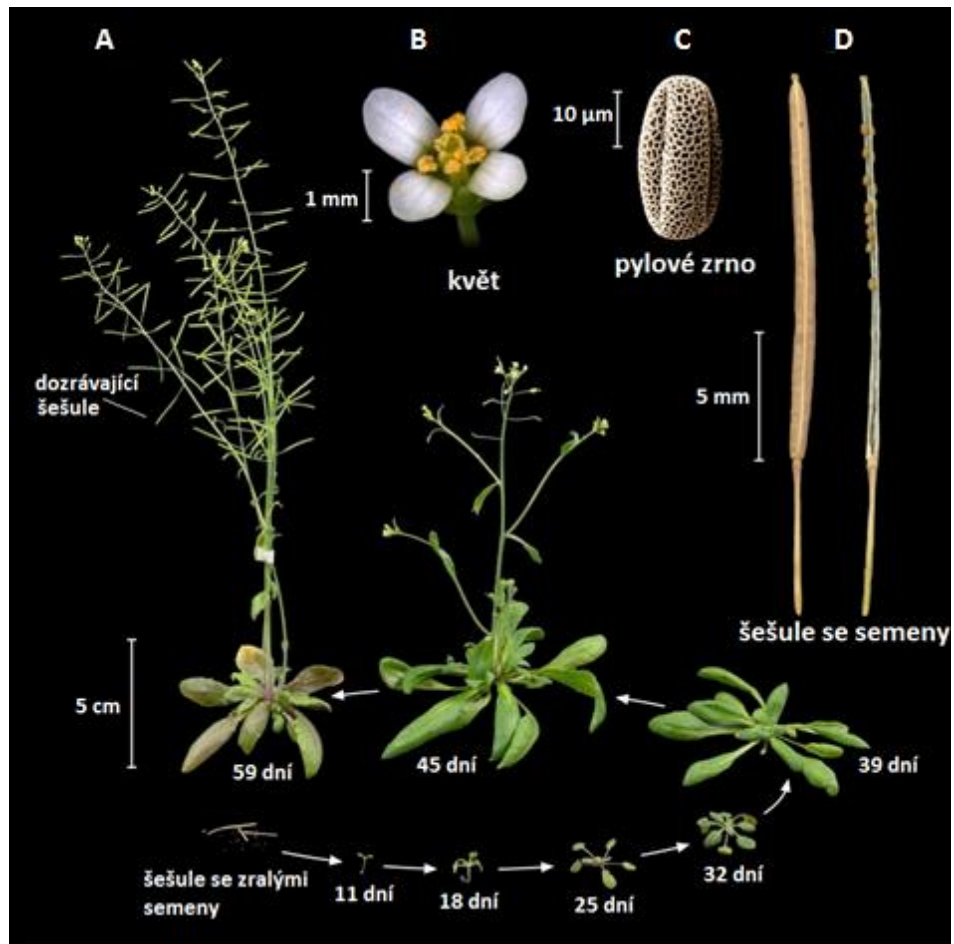
Modelové organismy jsou nezbytnou součástí biologického a biomedicínského výzkumu (Edison *et al.*, 2016). *Arabidopsis thaliana* (česky huseníček rolní) slouží jako modelový organismus pro studium základních fyziologických, buněčných a molekulárních procesů (Obr. 1) (Alonso-Blanco *et al.*, 2016). Jedná se o malou, jednoletou rostlinu, která obývá rozmanité podnebné pásy. Řadí se do skupiny dvouděložných krytosemenných cévnatých rostlin (Lasky, 2012; Krämer, 2015). Taxonomicky zapadá do čeledi brukvovitých (*Brassicaceae*) (Krämer, 2015). Rostlina se poprvé z východu rozšířila do Evropy před cca 10 000 lety směrem na západ přibližnou rychlostí 0,9 km za rok (François *et al.*, 2008). *Arabidopsis thaliana*, která byla prvně pojmenována *Pilosella siliquosa*, byla poprvé popsána v roce 1577 v pohoří Harz v Německu Johannem Thalem, německým botanikem (Zhu *et al.*, 2016). Další zmínka o *A. thaliana* se objevila v roce 1907, kdy Friedrich Laibach publikoval výčet počtu chromozomů několika rostlin, když se pokoušel najít rostlinu s malým počtem velkých chromozomů. Nicméně *A. thaliana* s jejími malými chromozomy nespĺňovala očekávání (Meyerowitz, 2001). V roce 1943 F. Laibach poprvé navrhnul *A. thaliana* jako modelový organismus (Laibach, 1943).

V 50. a 60. letech bylo publikováno několik vědeckých prací s cílem vytvořit mutanty *A. thaliana*, například Biochemical Mutations in the Crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. (Langridge, 1955). V roce 1964 byl založen specializovaný časopis Arabidopsis Information Service, jehož publikace pokračovala až do roku 1990. V původním poradním sboru byl kromě jiných právě již zmiňovaný Friedrich Laibach (Meyerowitz, 2001). Popularita *A. thaliana* jako modelového organismu vzrostla v 80. letech (Krämer, 2015), kdy byl v USA podpořen její výzkum klíčovými administrátory agentur pro financování z National Science Foundation (NSF) (Koornneef a Meinke, 2010).

V roce 2000 byla v článku Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana* publikována první kompletní sekvence genomu *A. thaliana*, který obsahuje 25 498 genů. Sekvenování započala v roce 1996 v mezinárodní spolupráci skupina s názvem The Arabidopsis Genome Initiative (The Arabidopsis Initiative, 2000).

A. thaliana představuje několik hlavních výhod jejího využití. Zaprvé, *A. thaliana* je poměrně nízká rostlina, což umožňuje její pěstování v laboratořích na malém prostoru ve velkém množství. Tato rostlina má také dobrou schopnost reprodukce, což umožňuje

generování velkého množství semenáčků během krátké doby. Dále je *A. thaliana* samosprašná, což znamená, že její proces oplození je méně ovlivněn vnějším prostředím a je pod genetickou kontrolou, navíc většina genů divokého typu *A. thaliana* jsou vysoce homozygotní, takže je snadné vyvolat specifickou mutaci (Kinoshita *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2016).



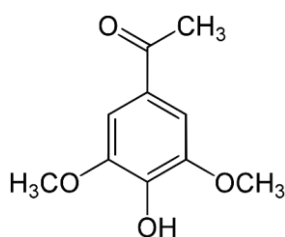
Obr. 1 Životní cyklus *Arabidopsis thaliana*. (A) *A. thaliana* ekotyp Columbia v jednotlivých stádiích života od semene, přes semenáček až po dospělou rostlinu schopnou reprodukce. (B) Květ *A. thaliana*, (C) pylové zrno a (D) dozralé šešule se semeny. Upraveno podle: Krämer, 2015.

2. 2 Transformace pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens bylo poprvé izolováno z nádorů rostlin v roce 1897 Fridianem Cavarainem v Itálii (Kado, 2014). Rod *Agrobacterium* je půdní gram-negativní bakterie vykazující převážně saprofytický způsob života (Bourras *et al.*, 2015). Tato bakterie obsahuje velké extrachromozomální plasmidy, tzv. Ti (tumor-inducing) plasmidy (Shell *et al.*, 1979). Nejedná se o obligátní patogen (Matthysse, 1986).

Agrobacterium tumefaciens způsobuje nádory neboli tzv. crown gall disease u různých rostlinných druhů tím, že zabuduje svou T-DNA (transfer-DNA) ze svého Ti plasmidu do genomu hostitelské rostliny (Chilton a Drummond, 1978; Tzfira a Citovsky, 2006). Jedná se o neoplastickou chorobu postihující zejména dvouděložné rostliny (Shell *et al.*, 1979). Tato genetická transformace má za následek onkogenní přeprogramování hostitele ve prospěch patogenu (Bourras *et al.*, 2015). Aminokyseliny, organické kyseliny a cukry uvolněné ze zraněných rostlinných buněk působí jako chemoatraktanti k *Agrobacteriu*, jenž infikuje rostlinnou buňku v místě rány nebo skrze průduchy tak, že se bakterie volně naváže na povrch buňky, a poté takto navázaná bakterie syntetizuje celulózová vlákna, která toto spojení stabilizují (Matthysse, 1986; Matthysse *et al.*, 1994; Gelvin, 2000; Escobar a Dandekar, 2003).

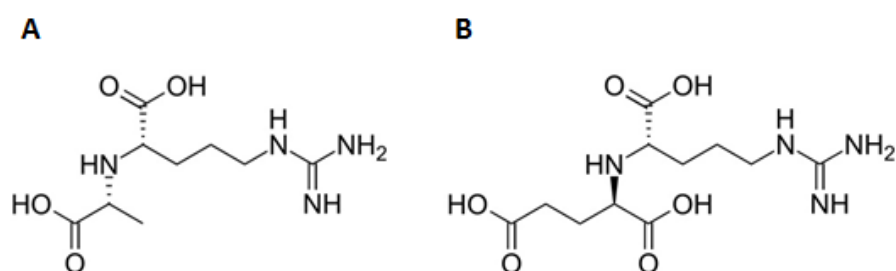
Jakmile se bakterie dostane do rostliny a detekuje fenolické molekuly uvolňované aktivně rostoucími rostlinnými buňkami, dopraví do jádra rostlinné buňky svou T-DNA odvozenou od úseku Ti plasmidu. Tuto T-DNA může bakterie začlenit do genomu příjemce, a to díky několika virulentním bakteriálním proteinům (Vir) jako například VirD2 nebo VirE2, které obsahují signální sekvence a jsou kódovány právě virulentními geny, jejichž exprese je indukována fenolickými látkami aktivně rostoucí buňky. (Gelvin, 2000; Lee *et al.*, 2009; van Kregten *et al.*, 2009). Těmito fenolickými látkami se míní především dimethoxyfenoly – acetosyringon (Obr. 2) a α -hydroxyacetosyringon, které se vyskytují speciálně ve výměšku poraněných, ale metabolicky aktivních rostlinných buněk, a které umožňují *Agrobacteriu* rozpoznat náchylné buňky (Stachel *et al.*, 1985).



Obr. 2 Chemický vzorec acetosyringonu.

2. 2. 1 Ti plasmid

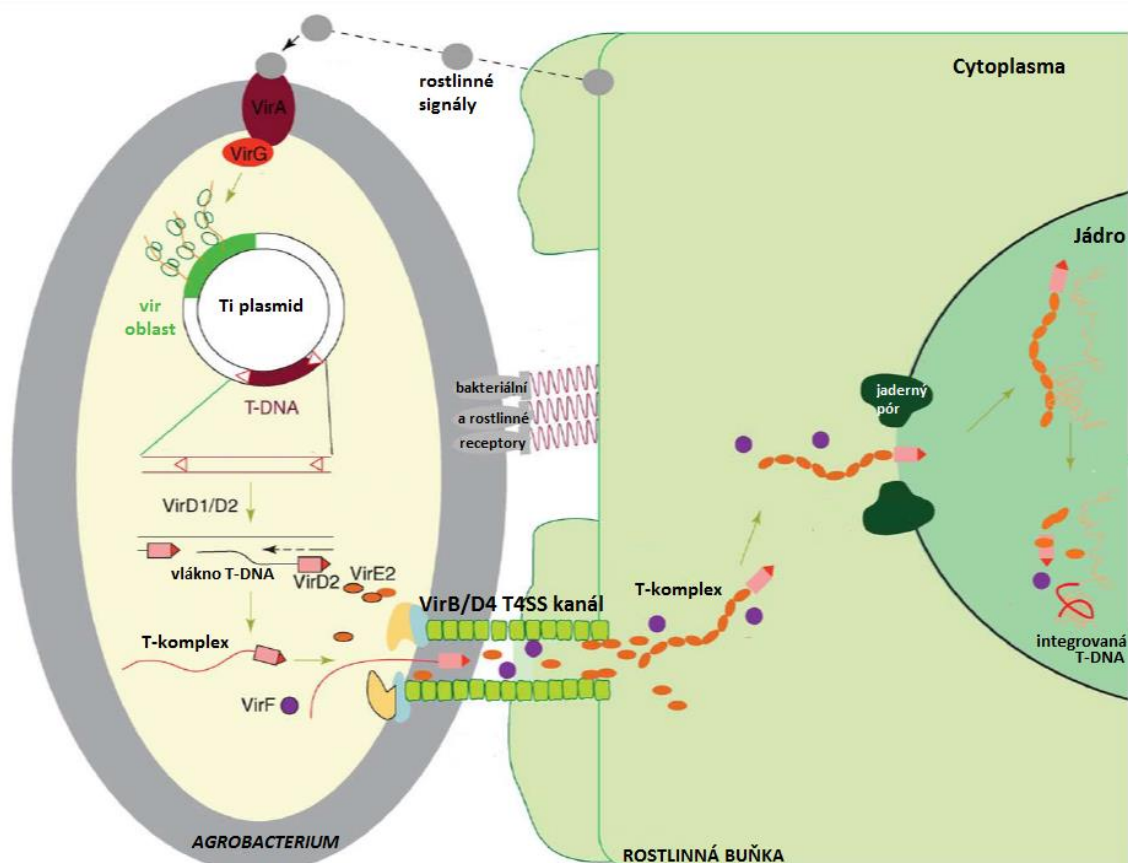
Ti plasmid je odpovědný za onkogenetické vlastnosti kmenu *Agrobacterium*. T-DNA, segment Ti plasmidu, obsahuje informace odpovědné za růst nádorů a tvorbu takzvaných opinů, jako například oktopin (N- α -(D-1-karboxyethyl)-L-arginin) nebo nopalin (N- α -(1,3-dikarboxypropyl)-L-arginin, Obr. 3). Tento segment je přepsán a stabilně exprimován v transformovaných rostlinných buňkách (Shell *et al.*, 1979) a řídí nadprodukcí fytohormonů, jako jsou auxiny a cytokininy, které způsobují proliferaci infikovaných rostlinných buněk a produkci opinů (Kalogeraki a Winans, 1995). Bakterie díky Ti plasmidu mají schopnost tyto opiny, které slouží bakteriím jako zdroj živin, katabolizovat (Chilton a Drummond, 1978; Zhu *et al.*, 2000). Proto můžeme Ti plasmidy rozdělit na několik skupin podle typů opinů, jejichž katabolismus Ti plasmidy řídí, nicméně v posledních letech bylo zjištěno, že všechny známé Ti plasmidy řídí katabolismus více opinů. Plasmidy pTiA6NC, pTi15955, pTiAch5, pTiR10 a pTiB6S3, které jsou považovány za funkčně identické, jsou označovány jako oktopinové Ti plasmidy (Zhu *et al.*, 2000). Oktopinové plasmidy nesou geny pro indukci drsných nádorů, ve kterých je tvořen oktopin. T-DNA se v oktopinovém Ti plasmidu skládá z tří přilehlých úseků T-DNA: levý (13 kb), centrální (1,5 kb) a pravý (7,8 kb), které jsou při transportu z bakterie do rostlinné buňky přenášeny nezávisle na sobě. Nopalinové plasmidy řídí tvorbu hladkých nádorů, které obsahují nopalin, a jejich T-DNA tvoří souvislý 22 kb dlouhý úsek, který je při transportu přenášen v celku (Hooykaas *et al.*, 1980; Sheng a Citovsky, 1996).



Obr. 3 Chemický vzorec oktopinu (A) a nopalinu (B).

2. 2. 2 Přenos T-DNA do buňky hostitele

Ti plasmid kóduje přibližně 25 *vir* genů uspořádaných v šesti nebo sedmi operonech (*virA*, *virB*, *virG*, *virC*, *virD*, *virE* a *virF*). Produkty těchto *vir* genů zprostředkovávají přenos segmentu plasmidové DNA (T-DNA) z bakterie do jádra infikované rostlinné buňky (Obr. 4), kde je T-DNA kovalentně integrována do genomové DNA rostliny (Winans *et al.*, 1986; Winans, 1992). VirA a VirG proteiny, které jsou kódovány *virA* a *virG* geny z Ti plasmidu, jsou nezbytné pro indukci ostatních *vir* genů a tvorbu nádorů v rostlině. VirA je citlivý na přítomnost fenolických látek produkovaných rostlinou a může být autofosforylován, přičemž se fosfát váže na histidinový zbytek. Tento signál ve formě vysokoenergetické vazby je dále přenesen na VirG a takto fosforylovaný protein interaguje s tzv. *vir* boxem (konzervovaná 12 párů bazí dlouhá sekvence) v oblasti promotoru, kde specificky aktivuje transkripci všech *vir* genů (Jin *et al.*, 1990; Winans, 1992; Sheng a Citovsky, 1996). Takto indukovaná buňka *Agrobacterium tumefaciens* začne produkovat jednovláknovou kopii T-DNA, jenž se nachází pouze v jedné kopii na jednu bakteriální buňku (Stachel *et al.*, 1986). Při tomto procesu fungují proteiny VirD1 a VirD2 jako endonukleasy (De Vos a Zambryski, 1989). *virC* kóduje dva proteiny – VirC1 a VirC2 (Close *et al.*, 1987). VirC1 může zvýšit produkci jednovláknové T-DNA z oktopinového Ti plasmidu v případě, že proteiny VirD1 a VirD2 jsou nějakým způsobem omezeny (De Vos a Zambryski, 1989).

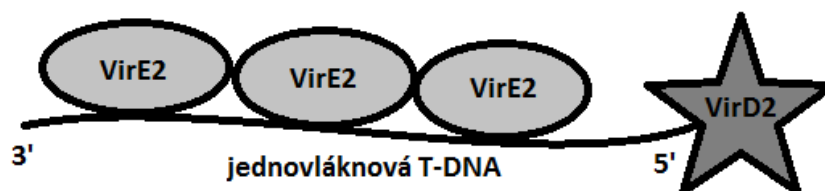


Obr. 4 Schéma přenosu T-DNA z bakterie do rostlinné buňky. Proces začíná rozeznáním poraněné rostlinné buňky a připojením bakteriální buňky na rostlinnou. Bakteriální buňka přijme z rostlinné buňky signál pomocí proteinů VirA a VirG, které aktivují *vir* oblast Ti plasmidu. Pomocí proteinů VirD1 a VirD2 se vyštěpí jednovláknová T-DNA, na jejíž 5' konec se naváže protein VirD2 a vytvoří T-komplex. Ten pak s dalšími Vir proteiny putuje do rostlinné buňky skrz VirB/D4 T4SS kanál. V rostlinné buňce je potom po celé délce T-DNA navázán protein VirE2, který chrání tuto T-DNA před nukleázami rostlinné buňky. T-komplex je poté přenesen do jádra, proteiny VirD2 a VirE2 jsou odštěpeny a T-DNA je integrována do DNA rostliny. Upraveno podle: Tzfira a Citovsky, 2006.

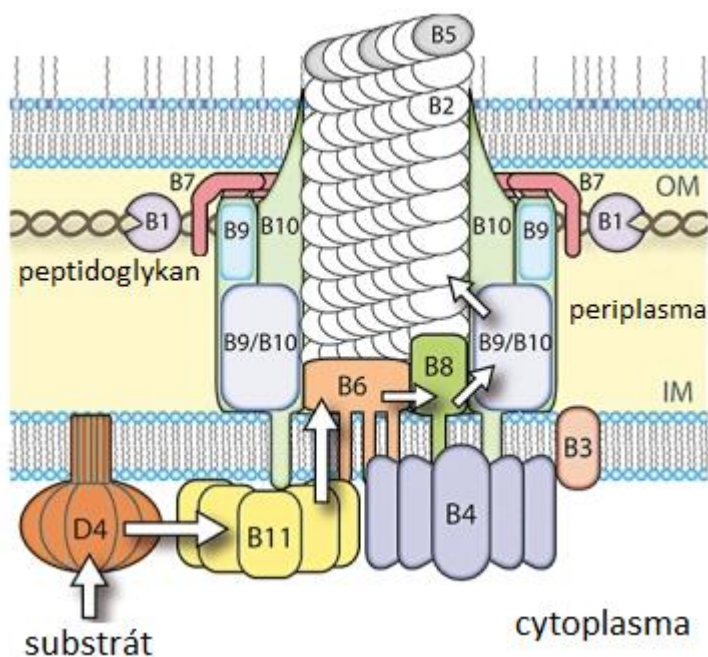
Pro přenos T-DNA z bakterie do rostlinné buňky je nutný tzv. T-komplex (Obr. 5). Ten se skládá právě z jednovláknové kopie T-DNA a jedné molekuly VirD2 proteinu, která je kovalentně vázána na 5' konec T-DNA. Tento komplex je po celé jeho délce po přenosu do rostlinné buňky pokryt VirE2 proteiny, které se váží na jednovláknovou DNA (Herrera-Estrella *et al.*, 1988; Zupan *et al.*, 2000). Protein VirD2 udržuje vlákno T-DNA tenké a nesbalené, protože jen tak je možno vlákno přenést z bakteriální buňky do rostlinné (Sheng a Citovsky, 1996). VirE2 poté v rostlinné buňce nasedá na T-komplex a chrání T-DNA před nukleázami (Lacroix a Citovsky, 2013). *virB* operon kóduje 11 VirB proteinů (VirB1-VirB11), z nichž všechny, kromě VirB1, jsou esenciální pro virulanci bakterie, a tedy i přenos DNA. VirB1 je potřebný pro účinný přenos DNA (Berger a Christie, 1994; Anderson *et al.*, 1996). VirB4 obsahuje doménu vážící nukleotid

trifosfát (NTP), což znamená, že protein VirB4 hydrolyzuje NTP, a poskytuje tak energii pro transport T-komplexu (Berger a Christie, 1993). VirB11 má ATPasovou aktivitu, která je stimulována přítomností jednovláknové DNA. Tento protein však s DNA neinteraguje přímo, nýbrž asociuje s jinými proteiny vážící se na DNA, jako například VirD2 a VirE2. Rovněž může být VirB11 autofosforylován, čímž si protein reguluje svou vlastní aktivitu i aktivitu ostatních Vir proteinů. Tyto dvě vlastnosti (ATPasová aktivita, autofosforylace) hrají důležitou roli při transportu T-DNA (Christie *et al.*, 1989).

Pro přenos T-DNA z bakterie do rostlinné buňky je nutný tzv. T-komplex (Obr. 5). Ten se skládá právě z jednovláknové kopie T-DNA a jedné molekuly VirD2 proteinu, která je kovalentně vázána na 5' konec T-DNA. Tento komplex je po celé jeho délce po přenosu do rostlinné buňky pokryt VirE2 proteiny, které se váží na jednovláknovou DNA (Herrera-Estrella *et al.*, 1988; Zupan *et al.*, 2000). Protein VirD2 udržuje vlákno T-DNA tenké a nesbalené, protože jen tak je možno vlákno přenést z bakteriální buňky do rostlinné (Sheng a Citovsky, 1996). VirE2 poté v rostlinné buňce nasedá na T-komplex a chrání T-DNA před nukleasami (Lacroix a Citovsky, 2013). *virB* operon kóduje 11 VirB proteinů (VirB1-VirB11), z nichž všechny, kromě VirB1, jsou esenciální pro virulanci bakterie, a tedy i přenos DNA. VirB1 je potřebný pro účinný přenos DNA (Berger a Christie, 1994; Anderson *et al.*, 1996). VirB4 obsahuje doménu vážící nukleotid trifosfát (NTP), což znamená, že protein VirB4 hydrolyzuje NTP, a poskytuje tak energii pro transport T-komplexu (Berger a Christie, 1993). VirB11 má ATPasovou aktivitu, která je stimulována přítomností jednovláknové DNA. Tento protein však s DNA neinteraguje přímo, nýbrž asociuje s jinými proteiny vážící se na DNA, jako například VirD2 a VirE2. Rovněž může být VirB11 autofosforylován, čímž si protein reguluje svou vlastní aktivitu i aktivitu ostatních Vir proteinů. Tyto dvě vlastnosti (ATPasová aktivita, autofosforylace) hrají důležitou roli při transportu T-DNA (Christie *et al.*, 1989).



Obr. 5 Schéma T-komplexu. Jednovláknová T-DNA má na svém 5' konci kovalentně vázaný protein VirD2, který T-DNA udržuje nataženou. Spolu s dalšími proteiny je tato T-DNA přenesena z bakteriální buňky do rostlinné. Tam je po celé své délce pokryta proteinem VirE2, který T-DNA chrání před nukleasami hostitelské buňky.



Obr. 6 Experimentálně předpovězená struktura VirB/D4 sekrečního systému typu IV u *Agrobacterium tumefaciens*. Šipky znázorňují směr, kterým je substrát (T-DNA) přenesen z bakteriální buňky. OM = vnější membrána, IM = vnitřní membrána. Upraveno podle: Wallden *et al.*, 2010.

Při přenosu VirE2 skrz VirB/D4 T4SS hraje roli protein VirE1, který funguje jako chaperon pro VirE2, jenž brání tvorbě homodimeru VirE2-VirE2. Chaperon VirE1 je také zapojen při rozeznání proteinu VirE2 VirB/D4 sekrečním systémem typu IV (Deng *et al.*, 1999), ale není pro interakci proteinu VirE2 a VirB/D4 T4SS nutný. Spolu s VirD2 a VirE2 jsou do hostitelské buňky přes VirB/D4 T4SS přeneseny i proteiny VirE3 a VirF, které jsou dále zapojeny při procesu integrace T-DNA (Vergunst *et al.*, 2003).

2. 2. 3 Přenos T-DNA do jádra buňky hostitele

Sekvenční analýza VirD2 proteinu prokázala, že VirD2 obsahuje dva jaderné lokalizační signály (NLS) situované na C i N konci proteinu (Herrera-Estrella *et al.*, 1996; Howard *et al.*, 1992), přičemž hlavní roli při infekci hraje NLS na C konci proteinu (Shurvinton *et al.*, 1992). VirE2 rovněž obsahuje NLS na obou svých koncích a funguje jako prostředník, který zajišťuje, že T-komplex zůstane natažený a nesbalený a chrání T-DNA před degradací. Navíc T-komplex obsahuje až 600 molekul tohoto proteinu, proto VirE2 zvyšuje díky svým NLS pravděpodobnost, že bude T-komplex dopraven do jádra (Citovsky *et al.*, 1988; Citovsky *et al.*, 1992). Pro přenos T-DNA do jádra buňky je u *Arabidopsis* důležitá interakce VirD2 s karyoferinem α (KAP α), jenž interaguje

s VirD2 přes C konec jeho NLS sekvence a pomáhá T-komplex dopravit do jádra. KAP α je svou sekvencí homologní s proteiny, které se váží na NLS u kvasinek a zvířat, jenž patří do skupiny karyoferinů α (Ballas a Citovsky, 1997).

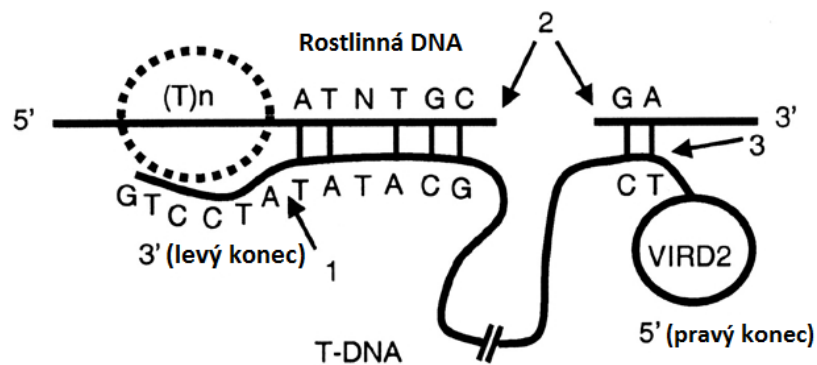
Dále je nutná specifická interakce VirE2 proteinu s proteinem VIP1 (VirE2-interacting protein 1) a VIP2 (VirE2-interacting protein 2). VIP1 má schopnost transportovat VirE2 do jádra buňky a je esenciální pro vznik nádoru způsobeného *Agrobacterium* u rostlin (Tzfira et al., 2001). Rostliny s vyřazeným genem pro VIP2 není možné stabilně transformovat pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, navíc nedojde k integraci T-DNA do genomu rostliny, tudíž je VIP2 důležitý při procesu přenosu i integrace T-DNA (Anand et al., 2007).

2. 2. 4 Integrace T-DNA

Integrace T-DNA je komplexní proces, který může probíhat různými mechanismy v závislosti na stavu genomu hostitele, a proto se při tomto procesu zapojují různé skupiny faktorů. T-DNA je do genomu rostliny zabudována na základě nehomologní rekombinace, přičemž často nejde o stabilní transformaci. Obecně je většinou vyšší hladina transientně exprimovaných genů z T-DNA než exprese stabilně integrovaných genů T-DNA. Při integraci T-DNA jsou zapojeny oba proteiny, které jsou asociovány s vláknem T-DNA, a to VirD2 a VirE2, které jsou rovněž spolu s T-DNA dopraveny do jádra. Předpoklady, že VirD2 funguje dále jako ligasa nebo integrasa nebyly potvrzeny, proto podstatnou roli při integraci T-DNA do genomu rostliny nejspíš hrají jiné faktory, především další rostlinné proteiny. VirD2 protein interaguje s mnoha rostlinnými proteiny, které mohou být přímo nebo nepřímo zapojeny v procesu integrace. Předpokládá se, že VirD2 může mít funkci při interakci s rostlinnými enzymy zapojujícími se při opravách DNA nebo při interakci s některými strukturálními proteiny chromatinu (Sheng a Citovsky, 1996; Ballas a Citovsky, 1997; Gelvin, 2000; Ziemienowicz *et al.*, 2001; Ziemienowicz *et al.*, 2008). U vojtěšky VirD2 protein interaguje také s ortologem cyklin-dependentní kinasy CAK2M, která fosforyluje C konec regulační domény největší podjednotky RNA polymerasy II, která se v jádře buněk váže na TATA-box (Deng *et al.*, 1998; Bako *et al.*, 2003). VirE2 se na integraci podílí nepřímo tím, že chrání T-DNA před degradací (Rossi *et al.*, 1996). Za to VIP1, který asociuje s proteinem VirE2 a napomáhá jeho lokalizaci do jádra buňky, se na integraci podílí přímo svou interakcí s histonem H2A v hostitelské buňce a je rovněž nezbytný

pro vznik nádoru (Li *et al.*, 2005). Před samotnou integrací je nutné proteolyticky odstranit proteiny navázané na T-DNA tak, že VIP1 vytvoří komplex s VirE2 a VirF, přičemž VirF způsobuje destabilizaci VIP1 a může vést oba proteiny k degradaci (Tzfira a Citovsky, 2006).

Místa integrace T-DNA souvisejí s oblastmi chromozomu s vyšším počtem genů. V místech kolem centromery nebo poblíž telomer, kde je obsaženo méně genů, bylo zaznamenáno méně inzercí. Oblasti míst iniciace transkripce a polyadenylace genů jsou častým cílem integrace T-DNA (Szabados *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2006). Na úrovni DNA se integrace odehrává v místech bohatých na thymin. Mezi hostitelskou DNA a levým koncem T-DNA vznikne krátký úsek dvoušroubovice, což nastiňuje rámec průběhu rekombinace. Rekombinace mezi pravým koncem T-DNA a hostitelskou DNA zahrnuje další vznik 2-3 párů bazí dlouhé dvoušroubovice (Obr. 7). Po degradaci 3' konce T-DNA (po směru dvoušroubovice) dojde mezi naštěpeným hostitelským vláknem DNA a 3' koncem T-DNA k ligaci pomocí rostlinných enzymů. Na druhém vlákně hostitelské DNA dojde k vzniku tzv. nicku (jednovláknový zlom DNA, Vriend *et al.*, 2017), což vede k syntéze komplementárního vlákna T-DNA. Neshody ve šroubovici jsou opraveny rostlinnými enzymy, přičemž je sekvence T-DNA použita jako templát. Tento proces může mít za následek delecí určité části hostitelské DNA (Brunaud *et al.*, 2002).



Obr. 7 Proces integrace T-DNA do genomu rostliny. (T)n = místo bohaté na thymin, 2 = nick. T-DNA hledá komplementární úsek hostitelské DNA za místem bohatým na thymin. Po vzniku nicku dochází k syntéze komplementárního vlákna T-DNA, dokud není dosaženo pravého konce T-DNA. Upraveno podle: Brunaud *et al.*, 2002.

2. 3 MAPK signalizace

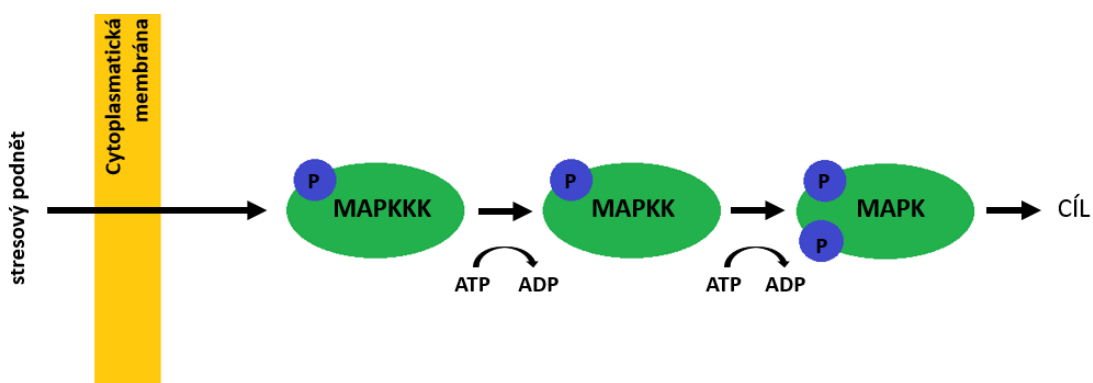
Tolerance vůči stresu u rostlin závisí na mnoha faktorech, mezi kterými hrají hlavní roli mitogen-aktivované proteinkinasy (MAPK) (Šamajová *et al.*, 2013). MAPK kaskády jsou evolučně konzervované univerzální přenašeči signálu, který může být vyvolán biotickým nebo abiotickým stresem (Šamaj *et al.*, 2004), a kteří jsou schopni přeložit extracelulární signály do příslušné odpovědi eukaryotní buňky (Marshall, 1994; Opdenakker *et al.*, 2012). Za odpověď jsou považovány jak změny na subcelulární úrovni, tak i transaktivace genové exprese (Šamajová *et al.*, 2013), mitóza, apoptóza, diferenciace, pohyblivost nebo samotné přežití buňky (Cargnello M. a Roux P. P., 2011). MAPK signální dráhy mohou být aktivovány také pomocí druhých (sekundárních) posílů, jako jsou například inositol fosfáty, ROS (reaktivní formy kyslíku), oxid dusnatý a kyselina fosfatidová. Ty mohou ovlivňovat intracelulární hladiny Ca^{2+} , které dále iniciují spuštění proteinových fosforylačních kaskád, jenž se přímo podílejí na buněčné ochraně nebo ovlivňují transkripční faktory. Tyto transkripční faktory aktivují specifické geny, které se mohou podílet na vzniku regulačních hormonů, jako je např. kyselina abscisová, ethylen, kyselina jasmonová a kyselina salicylová (Xiong *et al.*, 2002).

Na biochemické úrovni existují dva možné způsoby, jak mohou MAPK regulovat aktivitu jiných proteinů. První způsob – aktivované MAPK mohou fosforylovat, a tím regulovat funkci jaderných transkripčních faktorů nebo cytoplasmatických složek cytoskeletu a/nebo jiných kinas. Druhý způsob – ostatní regulační proteiny mohou být ovlivněny MAPK přímou fyzickou interakcí s MAPK komponenty (s následnou nebo bez následné fosforylace) (Šamaj *et al.*, 2004).

MAPK signální dráhy jsou tvořeny z dynamických proteinových komplexů (Obr. 8). Každá MAPK dráha se skládá ze souboru tří evolučně konzervovaných, kaskádovitě působících kinas: mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa (MAPKKK, MAP3K nebo MEKK), mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa (MAPKK, MAPK2K nebo MKK) a mitogen-aktivovaná proteinkinasa (MAPK nebo MPK) (Cargnello M. a Roux P. P., 2011). MAPKKK mohou být obecně aktivovány receptory, a to buď přímým fyzickým kontaktem s receptorem a/nebo mohou být MAPKKK fosforylovány daným receptorem (Jonak *et al.*, 2002). Serin/threonin MAPKKK potom dále fosforylují serinové nebo threoninové zbytky v konzervovaném motivu S/T-X3-5-S/T v aktivační smyčce odpovídající MAPKK, nicméně každá MAPKK může být aktivována více než jen jednou MAPKKK. MAPKK poté dvojité fosforylují threoninové a tyrosinové zbytky

konzervovaného motivu T-X-Y v aktivační smyčce jejich MAPK partnera (Chang a Karin, 2001). Každý typ buňky obsahuje několik druhů MAPK kaskád, proto kromě rozeznání a následné fosforylace T-X-Y aktivační smyčky, MAPKK také obsahují konzervovaný sekvenční motiv, který je odpovědný za vysokou afinitu MAPKK pouze k její správné MAPK (Bradwell a Thorner, 1996). MAPK dále fosforylují řadu substrátů, včetně transkripčních faktorů, proteinkinás a cytoskeletárních proteinů (Jonak *et al.*, 2002). Takto jsou regulovány důležité buněčné funkce jako je například produkce cytokininů a proteas, buněčný cyklus, metabolismus, buněčná proliferace nebo apoptóza (Cuevas *et al.*, 2007).

Při dokončení projektu sekvenování genomu *A. thaliana* bylo zjištěno, že existuje 20 MAPK, 10 MAPKK a 60 MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002).



Obr. 8 Schématické znázornění MAPK kaskád. Stresový podnět skrze receptor aktivuje příslušnou MAPKKK tak, že je daným receptorem fosforylována. Tyto MAPKKK dále fosforylují Ser nebo Thr zbytky v aktivační smyčce svého MAPKK partnera. MAPKK pak dále dvojitě fosforyluje Thr a Tyr v aktivační smyčce příslušné MAPK. Ta potom dále předá signál dalším cílovým substrátům.

2. 3. 1 MAPKKK

MAPKKK představují největší rodinu v rámci MAPK kaskády, ale jen málo z těchto genů bylo přímo spojeno s fyziologickými funkcemi *A. thaliana* (Sun *et al.*, 2014). Analýza založená na sekvenování aminokyselin katalytické domény proteinkinás ukázala, že MAPKKK u *Arabidopsis* spadají do dvou hlavních skupin: MEKK proteinové kinasy a Raf-like proteinové kinasy (Ichimura *et al.*, 2002). Vedle těchto dvou skupin se také hovoří o ZIK-like skupině, také nazývané WNK (With No lysine Kinase) (Sun *et al.*, 2014). U savců se podílí na regulaci iontové homeostázy a jiných patofyziologických procesů jako například rakovina nebo vysoký krevní tlak. WNK-like geny byly rovněž identifikovány v rostlinných systémech, včetně deseti genů u *Arabidopsis*. U *Arabidopsis* tato WNK skupina reguluje dobu kvetení tak, že je ovlivněna dobou fotoperiody (Kumar *et al.*, 2011).

Do třídy MEKK patří 12 členů. Příkladem mohou být MEKK1 u savců, STE11 u kvasinek, OMTK1 (oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1) u vojtěšky (*Medicago sativa*) nebo YODA u *Arabidopsis*, která je asociována s tvorbou průduchů; nepřítomnost genu *YDA* vede k nadměrné tvorbě průduchů a při jeho zvýšené expresi je tvorba průduchů blokována (Ichimura *et al.*, 2002; Bergmann *et al.*, 2004; Nakagami *et al.*, 2004; Meng a Zhang, 2013).

Do třídy Raf-like se řadí přibližně 50 členů (Meng a Zhang, 2013), jako například CTR1 u *Arabidopsis*, EDR1 nebo DSM1 u rýže (*Oryza sativa*) (Sun *et al.* 2014) a další. MEKK skupina zahrnuje všechny proteiny, jejichž kinasové domény mají výraznou podobnost s typickými MAPKKK, jako například STE11 nebo BCK1 (Bypass of C kinase 1) u kvasinek. Do skupiny Raf-like jsou klasifikovány všechny Raf kinasy, které se svou sekvencí liší od MEKK (Ichimura *et al.*, 2002).

2. 3. 2 MAPKK

Rostlinné MAPKK mohou být rozděleny do 4 skupin (A-D) založených na podobnosti sekvencí. První skupina A zahrnuje MKK1, MKK2 a MKK6 u *Arabidopsis* (Meng a Zhang, 2013). MKK1 a MKK2 jsou asociovány s biotickým a abiotickým stresem, navíc obě interagují s MPK4, což bylo potvrzeno dvou-hybridním kvasinkovým testem (Qiu *et al.*, 2008). MKK2 je specificky aktivována solným stresem a chladem (Teige *et al.*, 2004). Skupina B zahrnuje MKK3 u *Arabidopsis*. MKK3 se účastní kaskád, které jsou vyvolány patogeny a jsou iniciovány kyselinou jasmonovou (Rodriguez *et al.*, 2010). Skupina C

zahrnuje MKK4 a MKK5, které předávají signál na MPK3 a MPK6 při regulaci rostlinného vývoje a obranných odpovědí. Do skupiny C se také řadí SIMKK (salt-stress inducible protein kinase kinase) u vojtěšky. SIMKK zprostředkovává solí indukovanou aktivaci SIMK, přičemž ale může SIMK aktivovat i bez přijetí signálu od MAPKKK (Ichimura *et al.*, 2002; Kiegerl *et al.*, 2000; Cardinale *et al.*, 2002). Skupina D zahrnuje MKK7, MKK8, MKK9 a MKK10 (Meng a Zhang, 2013). MKK geny skupin C a D u *Arabidopsis* neobsahují introny (Ichimura *et al.*, 2002).

2.3.3 MAPK

Rostlinné MAPK mají ve svých aktivačních smyčkách T-D-Y nebo T-E-Y fosforylační motiv (Rodriguez *et al.*, 2010). Tyto MAPK mohou být rozděleny do 4 skupin (A-D), podle toho, zda v aktivační smyčce obsahují ve svém motivu kyselinu glutamovou (T-E-Y) nebo kyselinu asparagovou (T-D-Y). MAPK s fosforylačním motivem T-E-Y se dělí do skupin A, B a C. MAPK s fosforylačním motivem T-D-Y spadají do skupiny D (Ichimura *et al.*, 2002).

Skupina A je nejvíce zapojena při hormonálních odpovědích na stres anebo při reakci na životní prostředí. U *Arabidopsis* jsou MPK3 a MPK6 aktivovány při oxidativním stresu, zejména reaktivními formami kyslíku jako například H₂O₂ nebo K₂O. Především MPK6 je aktivována také 3-amino-1,2,4-triazolem nebo paraquatem, což je toxický kontaktní herbicid (Kovtun *et al.*, 2000; Yuasa *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002; Saravu *et al.*, 2013). MPK3 může být aktivována patogeny (například receptorem pro bakteriální protein flagelin), reakcí na dotek, solným stresem nebo při dehydrataci (Mizoguchi *et al.*, 1996; Asai *et al.*, 2002). MPK3 je svou sekvencí výrazně podobná WIPK u tabáku, kde je zapojena při transdukci signálu při poranění. V tabáku se také nachází SIPK (salicylic-acid-induced protein kinase) a může být aktivována biotickým i abiotickým stresem. U vojtěšky (*Medicago sativa*) je SIMK zapojena při reakcích na stres (Ichimura *et al.*, 2002).

Do skupiny B se řadí především MPK4, jejíž aktivita je zvýšena biotickým a abiotickým stresem, jako například poraněním, chladem, dotekem, nízkou vlhkostí nebo elicitory patogenů (Ichimura *et al.*, 2000; Desikan *et al.*, 2001; Ichimura *et al.*, 2002). MPK4 u *Arabidopsis* funguje jako negativní regulátor obrany proti biotrofním parazitům zprostředkované kyselinou salicylovou. MPK4 je také důležitá při obraně proti patogenům, která je zprostředkována ethylenem nebo kyselinou jasmonovou (Brodersen

et al., 2006). Dále do skupiny B patří např. MMK3 u vojtěšky, která je přítomna během celého buněčného cyklu, nicméně její kinasová aktivita je zapnutá pouze při mitóze (Bögre *et al.*, 1999). Ntf6 u tabáku (*Nicotiana tabacum*) je aktivována specificky během mitózy, konkrétně v pozdní anafázi nebo rané telofázi a nachází se dočasně ve fragmoplastu (Calderini *et al.*, 1998; Ichimura *et al.*, 2002).

Skupina C a její funkce při přenášení stresového signálu v rostlině jsou do teď málo známy. Do této skupiny patří například MPK7 (Cheong a Kim, 2010).

Skupina D zahrnuje 8 MPK u *Arabidopsis*: MPK8, MPK15, MPK9, MPK17, MPK16, MPK18, MPK19 a MPK20 (Ichimura *et al.*, 2002). Dále pak například BWMK1 a MAPK2 u rýže (*Oryza sativa*) nebo TDY1 u vojtěšky (*Medicago sativa*), přičemž jsou tyto MAPK indukovány plísněmi nebo poraněním. Především BWMK1 hraje významnou roli při signalizaci a obraně u rýže, kde tato MPK aktivuje transkripční faktory, jako jsou EREBP a WRKY33. (Zhang a Klessing, 2001; Cheong *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2009; Cheong a Kim., 2010). MPK8 je aktivována mechanickým poškozením, její aktivace však vyžaduje přímé navázání kalmodulinů (CaM), což jsou Ca²⁺ dependentní proteiny hrající významnou roli při šíření signálu v buňce (Xiong *et al.*, 2002; Ranty *et al.*, 2006). MPK8 zabraňuje akumulaci ROS v buňce tím, že kontroluje expresi *Rboh D* genu, který hraje klíčovou roli ve vytváření a signalizaci ROS. *RbohD* enzymová aktivita je regulována navázáním Ca²⁺ a fosforylací (Takahashi *et al.*, 2011).

2. 3. 3. 1 MPK3

Mitogen-aktivovaná proteinkinasa 3 hraje důležitou roli v přenášení stresového signálu u rostlin (Gao *et al.*, 2010). MPK3 je aktivována exogenním peroxidem vodíku, který vzniká ve svěřacích buňkách průduchu při napadení rostliny patogeny, ve tmě anebo v přítomnosti ozónu. K její aktivaci peroxidem vodíku může dojít pomocí ANP1 (*Arabidopsis* NPK1-like protein kinase) patřící do skupiny MAPKKK, která iniciuje MAPK kaskády vedoucí k indukci MPK3 (Kovtun *et al.*, 2000). MPK3 se tedy účastní signální dráhy peroxidu vodíku při zavírání nebo při inhibici otevírání průduchů. Rovněž se účastní inhibice otevírání průduchů vyvolaného kyselinou abscisovou (Gudesblat *et al.*, 2007). MPK3 hraje v rostlinách důležitou roli nejen při vývoji indukované rezistence na abiotický, ale i na biotický stres (Beckers *et al.*, 2009). MPK3 je u rostlin odpovědná za riboflavinem indukovanou rezistenci vůči patogenům (Nie a Xu, 2016) a je také aktivována při zaznamenání flagelinu, bakteriálního proteinu z bičíku, receptorem FLS2

(Goméz-Goméz a Boller, 2000; Asai *et al.*, 2002). MPK3 je také aktivována mechanickým stresem nebo hypoosmotickým tlakem (Droillard *et al.*, 2002).

3. EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3. 1 Materiál a metody

3. 1. 1 Laboratorní přístroje

Chlazená centrifuga Scanspeed 1730R (Labogene), laboratorní předvážky S1502 (BEL Engineering), analytické váhy XA 110/2X (Radwag), pH metr PC 2700 (Eutech Instruments), laminární box (Merci), vortex MIXER (Labnet International, Inc.), lednice Liebherr (MED line), třepačka s nastavitelnou teplotou inkubace Orbital Shaker ES-20 (Biosan), spektrofotometr SmartSpec™ Plus (Bio-Rad), mikrovlnná trouba MGE23 (Hitachi), magnetická míchačka MSH-420 (Boeco), fytotronová komora Weiss (Gallenkamp), autokláv Sterivap HP IL (MMM Group).

3. 1. 2 Mikroskopické vybavení laboratoře

Všechny uvedené mikroskopy a objektivy pocházejí od firmy Zeiss a jsou řízeny programy ZEN Blue edition a Zen Black edition.

Konfokální laserový skenovací mikroskop LSM 710 Axio Imager 2 s použitými objektivy:

Plan-Apochromat 20x/0,8 M27

Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27

Alpha Plan-Apochromat 63x/1,46 Oil Korr M27

Konfokální mikroskop s rotujícím diskem Cell Observer SD Axio Observer.Z1 s použitými objektivy:

Plan-Apochromat 20x/0,8 M27

EC Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil DIC M27

Epifluorescenční mikroskop Imager.M2 s použitým objektivem:

EC-Plan Neofluar 10x/0,3

3. 1. 3 Chemikálie

<u>AgroBio:</u>	Silwet STAR
<u>Duchefa Biochemie:</u>	MES, Murashige & Skoog médium Basal salt mixture (M0222.0050), Phyto agar, Phosphinotricin (fosfinotricin), Ticarcillin (tikarcilin)
<u>Plant media:</u>	YEB médium
<u>Sigma-Aldrich:</u>	3',5'-Dimethoxy-4'-hydroxyacetophenon (acetosysingon), chlorid horečnatý (MgCl ₂), sacharosa, Phytigel™, hydroxid draselný (KOH)
<u>Zeiss:</u>	Imerzní olej 518F

3. 1. 4 Rostlinný materiál

Rostliny *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh: ekotyp Columbia (Col-0).

Rostliny *Nicotiana benthamiana* L.

3. 1. 5 Mikrobiologický materiál

Konstrukty pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW pro transformaci *Agrobacterium tumefaciens* byly připraveny Mgr. Dominikem Novákem metodou MultiSite Gateway®. Obě fúze *MPK3* genu byly klonovány pod nativním promotorem. Tyto konstrukty byly Mgr. Dominikem Novákem transformovány do bakteriálního kmenu *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, nesoucího rezistenci vůči rifampicinu.

3. 1. 6 Metody

3. 1. 6. 1 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* L.

Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* L. pomocí *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 konstrukty *pMPK3::MPK3:mCherry* v pB7m34GW a *pMPK3::mCherry:MPK3* v pB7m34GW.

Rostliny *Nicotiana benthamiana* použité pro transientní transformaci byly pěstovány *in vivo* v květináčích na panelu fytostronu při 21 °C a dlouhé fotoperiodě 16 hodin světlo a 8 hodin tma.

Obdržená tekutá kultura *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, nesoucí příslušný plasmid, byla kultivována na třepačce při 28 °C, 220 rpm do OD₆₀₀ 0,4 v 5 ml YEB média (Plant Media) obsahujícím příslušná antibiotika (rifampicin o koncentraci 50 ng/ml a spektinomycin o koncentraci 100 ng/ml).

Bakteriální kultura *A. tumefaciens* byla poté centrifugována při 3 000 g po dobu 10 min při 4 °C. Supernatant byl odlit a pelet byl rozsuspendován vortexováním v 5 ml sterilního kultivačního média (10 mM MES, 150 µM acetosyringon, 10 mM MgCl₂; pH 5,6). Inkubace probíhala 2h při pokojové teplotě. Plastovou stříkačkou byla suspenze skrze průduchy na spodní straně listu vtlačena do mezofylu listu *N. benthamiana* (Obr 9). Rostliny byly poté překryty tmavým igelitovým sáčkem a inkubovány přes noc, druhý den byly odkryty a přeneseny na panely fytotronu. Třetí den od transformace byly pozorovány pomocí mikroskopu.



Obr. 9 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana*, demonstrace vtlačení bakteriální suspenze *A. tumefaciens* do mezofylu listu *N. benthamiana*.

3. 1. 6. 2 Mikroskopická dokumentace listů *Nicotiana benthamiana* L.

Z části listu *N. benthamiana* byl zhotoven preparát, který byl pozorován pod krycím sklíčkem z abaxiální strany, a byly dokumentovány optické řezy v Z rovině. Jako médium byla použita voda. Pro pozorování listu byl použit konfokální mikroskop s rotujícím diskem s nastavenými parametry pro detekci mCherry. Pro excitaci byl použit excitační laser o vlnové délce 561 nm a emisní filtr propouštěl světlo o vlnové délce 610 nm. Byly použity objektivy Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 EC a Plan-Neofluar 40x/1,30 Oil DIC M27.

3. 1. 6. 3 Povrchová sterilizace semen *Arabidopsis thaliana*

Malé množství odpovídající 50 μ l dozrálých semen *A. thaliana* bylo přeneseno do laminárního boxu v plastové zkumavce typu Eppendorf. Poměr semen ku sterilizačnímu roztoku byl přibližně 1:32. Do zkumavky bylo přidáno 1,6 ml 70% ethanolu a semena byla 5 minut promývána. 70% ethanol byl pomocí pipety odsát a poté byla semena promývána ve stejném množství 96% ethanolu po dobu 1 min. Ethanol byl opět odsát a dále byla semena 2x po dobu 5 min promyta sterilní destilovanou vodou. Semena byla pomocí pipety rozkapána na filtrační papír ve sterilní Petriho misce a voda se nechala odpařit. Poté byla semena v Petriho misce skladována v lednici při 4 °C.

3. 1. 6. 4 Příprava ½ MS média pro pěstování rostlin *Arabidopsis thaliana*

½ MS médium (Murashige a Skoog, 1962) bez vitamínů bylo připraveno podle navážek z Tab. 1. Jako vodný roztok byla použita destilovaná voda. Takto připravené médium bylo v skleněných lahvích sterilizováno autoklávováním a dále se s médiem pracovalo ve sterilních podmínkách. Dle potřeby bylo ztuhlé médium rozvařeno v mikrovlnné troubě a nalito do čtvercových Petriho misek. Po vychladnutí média na přibližně 35 °C došlo k jeho opětovné polymerizaci a ztuhnutí.

Tab. 1 Složení ½ MS média pro pěstování rostlin *Arabidopsis thaliana*

	Navážka na 1 l média připraveného v dH ₂ O
MS sůl – Basal salt mixture	2,15 g
Phytigel	8 g
Sacharosa	10 g
pH	5,8 *

* Upraveno pomocí 1,0 mol.l⁻¹ a 0,1 mol.l⁻¹ KOH

3. 1. 6. 5 Vysazení semen *Arabidopsis thaliana*

Semena *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 byla pomocí dřevěné tyčinky ve sterilních podmínkách vysazena na ½ MS médium v Petriho misce. Petriho misky byly uchovány 2 dny v lednici v horizontální poloze při 4 °C kvůli stratifikaci semen a poté byly Petriho misky 18 dní ve svislé poloze inkubovány na panelu fytotronu. Poté byly semenáčky přeneseny do hlíny v květináčích a pěstovány dále ve fytotronu. Po dalších 3 týdnech byla provedena stabilní transformace, tzv. floral-dip (Clough a Bent, 1998), popsána níže.

Rostliny *Arabidopsis thaliana* ekotyp Col-0 byly pěstovány ve fytotronu při 21 °C a světelných podmínkách dlouhé fotoperiody 16 h světlo, 8 h tma v květináčích.

3. 1. 6. 6 Stabilní transformace rostlin *Arabidopsis thaliana*

Stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* pomocí *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 konstrukty *pMPK3::MPK3:mCherry* v pB7m34GW a *pMPK3::mCherry:MPK3* v pB7m34GW metodou floral-dip.

Při této metodě bylo vycházeno z článků Clough a Bent, 1998 a Zhang *et al.*, 2006.

Pro start kulturu bylo připraveno 5 ml YEB média s příslušnými antibiotiky (rifampicin o koncentraci 50 ng/ml a spektinomycin o koncentraci 100 ng/ml). Do tohoto roztoku bylo inokulováno 10 µl kultury *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí konstrukty *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a stejně tak pro *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW. Tato kultura byla inkubována na třepačce přes noc při 28 °C a 250 rpm. Další den byly 4 ml start kultury přeneseny do 250 ml YEB média bez antibiotik a kultura byla inkubována přes noc při 28 °C a 110 rpm do OD₆₀₀ 1,3, poté byla kultura přelita do 300 ml kádinky a bylo přidáno 50 µl smáčedla Silwet STAR.

Alespoň hodinu před samotnou transformací byly rostlinám *A. thaliana* ostříhány šešule a opylené květy. Přípravená rostlina byla potom svými květy namočena do tekuté kultury bakterií na 10 sekund. Poté byla obalena do potravinářské fólie pro udržení vlhkého mikroklima a na 24 h uložena do tmy. Po uplynutí 24 h byla rostlina přesunuta na světlo do fytotronu a byla odstraněna fólie. Tento proces byl po týdnu zopakován, aby došlo k transformaci i nových květů, a tím byla zvýšena účinnost.

3. 1. 6. 7 Selekce transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*

Při této metodě se vycházelo z článku Harrison *et al.*, 2006, který byl modifikován.

Dozrálá semena *A. thaliana* po stabilní transformaci byla sesbírána a sterilizována. Ve sterilních podmínkách byla semena vysazena na ½ MS médium obsahující 50 µM fosfinitricin a 1,2 µM tikarcilin v čtvercových Petriho miskách. Fosfinitricin byl v médiu použit pro selekci jako herbicid, na něž nese rezistenci plasmid pB7m34GW. Tikarcilin byl použit jako prevence kontaminace bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* pocházejícími ze stabilní transformace. Vysazená semena byla uchována v horizontální poloze 2 dny v lednici při 4 °C kvůli stratifikaci a poté přenesena na panely fytotronu, kde byla ve svislé poloze kultivována při 21 °C a dlouhé fotoperiodě. Po 7 dnech bylo možno pozorovat prospívající rostliny T1 generace, které měly větší kotyledony i hypokotyl. Tyto vybrané rostliny byly poté přeloženy do nových čtvercových Petriho misek na ½ MS médium obsahující 1,2 µM tikarcilin. Po dalších 7 dnech byly tyto rostliny pozorovány a selektovány pomocí epifluorescenčního mikroskopu. Rostliny, jejichž kořeny vykazovaly fluorescenci ve spektru pro detekci mCherry, byly poté z podmínek *in vitro* přeneseny do půdy. Po dozrání byla sklizena semena těchto rostlin, sterilizována a vysazena na čtvercové Petriho misky s ½ MS médiem a 0,9% phytoagarem bez antibiotik (Tab. 2). Poté byly rostliny skladovány 1 den v lednici v horizontální poloze při 4 °C. Následně byly Petriho misky přeneseny na panely fytotronu a skladovány při 21 °C a dlouhé fotoperiodě ve svislé poloze. Po 7 dnech byly rostliny T2 generace selektovány na epifluorescenčním mikroskopu, část z nich byla přenesena do půdy na dozrání a vybrané rostliny byly tentýž den snímány konfokálním laserovým skenovacím mikroskopem.

Tab. 2 Složení ½ MS média s 0,9% phytoagarem

	Navážka na 1 l média připraveného v dH ₂ O
MS sůl – Basal salt mixture	2,15 g
Phytoagar	9 g
Sacharosa	10 g
pH	5,8 *

* Upraveno pomocí 0,1 mol.l⁻¹ KOH

Takto připravené médium bylo ve skleněných lahvích sterilizováno autoklávováním.

3. 1. 6. 8 Mikroskopická dokumentace *Arabidopsis thaliana* T2 generace

Pro mikroskopickou dokumentaci rostliny byl použit konfokální laserový skenovací mikroskop s nastavenými parametry pro detekci mCherry – excitační laser o vlnové délce 561 nm a emisní filtr propouštěl světlo o vlnové délce 616 nm. Byl připraven preparát tak, že 7 denní semenáček byl uzavřen mezi podložní a krycí skla v tekutém ½ MS médiu (bez phytagelu nebo phytoagaru). Části rostliny byly pozorovány objektivy Plan-Apochromat 20x/0,8 M27 a Plan-Apochromat 40x/1,4 Oil DIC M27.

4. VÝSLEDKY A DISKUZE

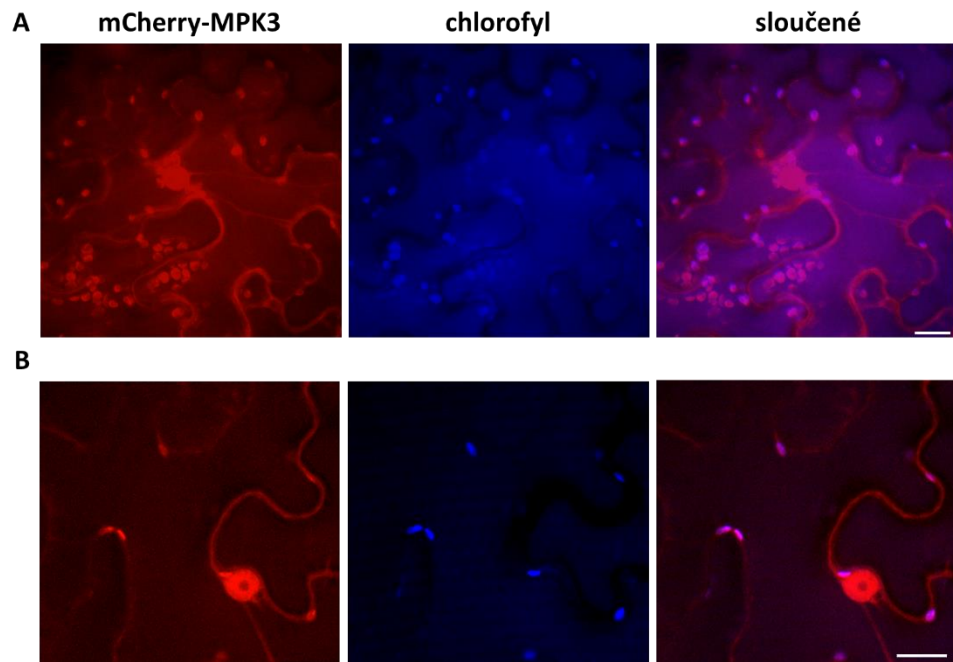
4.1 Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* L. a mikroskopická dokumentace

Transientní transformace listů *Nicotiana benthamiana* sloužila k časově nenáročnému ověření funkčnosti konstruktů *pMPK3::MPK3:mCherry* v pB7m34GW a *pMPK3::mCherry:MPK3* v pB7m34GW. Transformace probíhala pomocí plastové stříkačky, kterou byla kultura *A. tumefaciens* vtačena do listu tabáku skrze průduchy na abaxiální straně. Proto bylo nutné rostlinu před samotnou transformací dostatečně zalít vodou, aby došlo k otevření průduchů. Při správné manipulaci se podařilo kulturu vtlačit do celého mezofylu listu skrze jedno místo, čímž se předešlo většímu poškození listu.

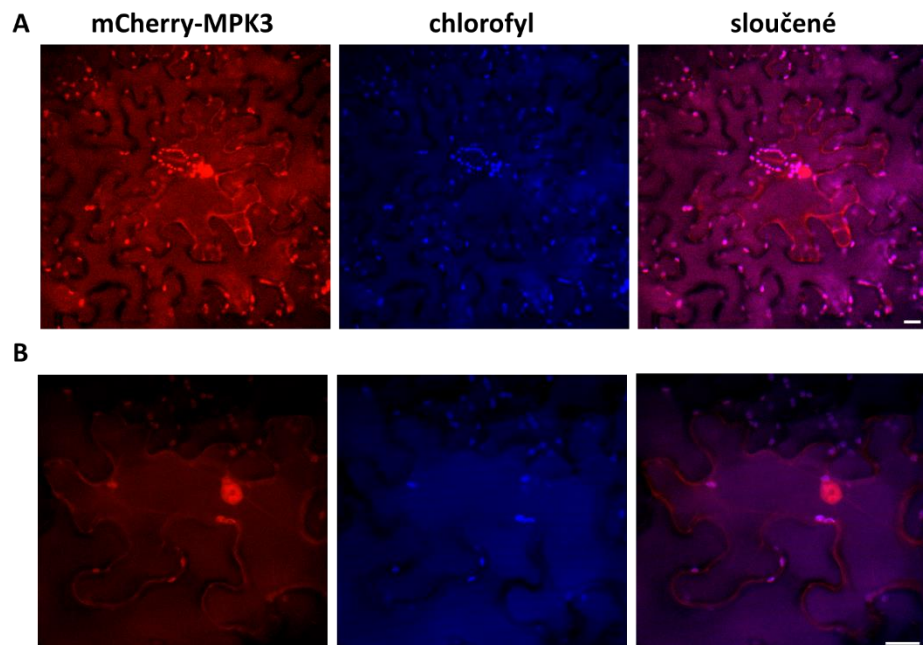
Dokumentace listu třetí den po transformaci byla nejúspěšnější, jelikož detekce fluorescence mCherry byla nejzřetelnější pro N i C-terminální fúzi. Při transientních transformacích totiž nedochází k zabudování T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens* do genomu rostliny (Jones *et al.*, 2009), ale pouze k dočasné expresi transgenů. K transformaci byl využit binární vektor pB7m34GW. Shamloul *et al.*, 2014 potvrzují, že 2. a 3. den od transformace rodu *Nicotiana* binárním vektorem je exprese fluorescenčně značeného proteinu nejvyšší.

Při mikroskopickém pozorování N i C-terminální fúze na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem bylo zřetelné, že podle zvolených parametrů pro detekci mCherry je protein MPK3 v epidermálních buňkách listu abaxiální strany lokalizován v plasmatické membráně, plasmatických pásech a v jádře buňky, což koreluje s již publikovanými výsledky (Pitzschke *et al.*, 2013; Persak a Pitzschke, 2014). V jádru nebyl signál zaznamenán.

Při dokumentaci byly nastaveny navíc i parametry pro detekci fluorescence chlorofylu (Obr. 10, 11).



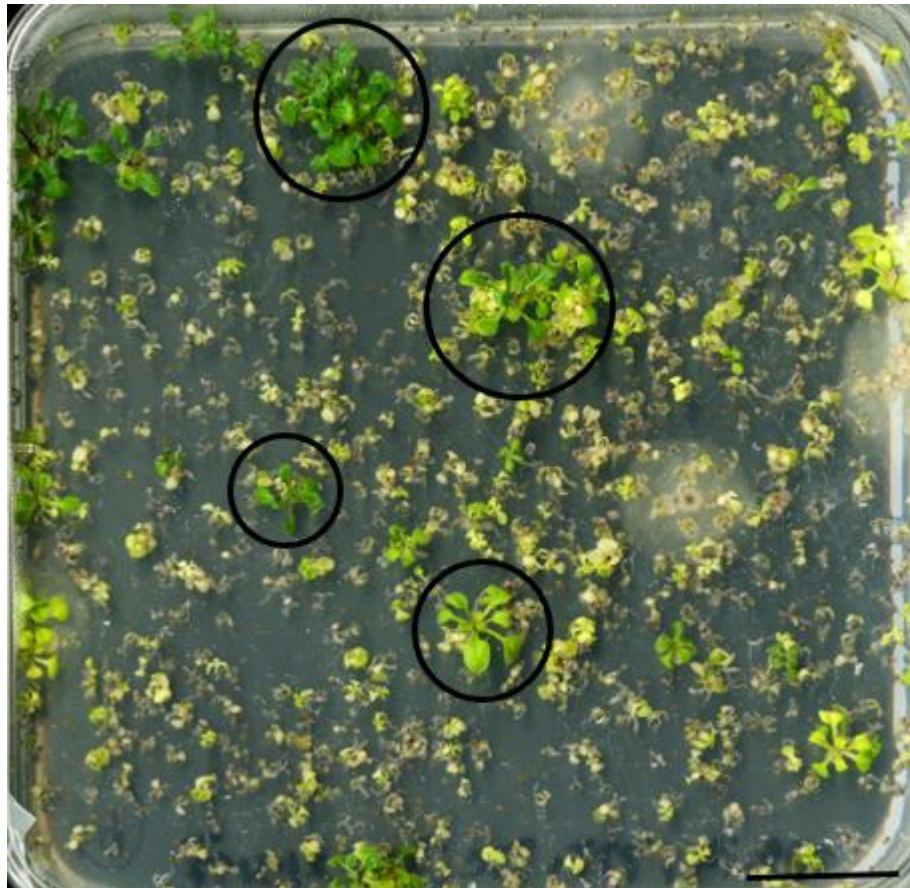
Obr. 10 Mikroskopická analýza fluorescence mCherry-MPK3 proteinu v epidermálních buňkách abaxiální strany listu *Nicotiana benthamiana* po transientní transformaci $pMPK3::mCherry:MPK3$ v pB7m34GW. A) Epidermální buňka abaxiální strany listu. B) Detail epidermální buňky abaxiální strany listu s lokalizací mCherry-MPK3 v plasmatické membráně, plasmatických pásech a v jádře buňky. Pozorováno na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 11 Mikroskopická analýza fluorescence MPK3-mCherry proteinu v epidermálních buňkách abaxiální strany listu *Nicotiana benthamiana* po transientní transformaci $pMPK3::MPK3:mCherry$ v pB7m34GW. A) Celá epidermální buňka abaxiální strany listu. B) Detail epidermální buňky abaxiální strany listu s lokalizací mCherry-MPK3 v plasmatické membráně, plasmatických pásech a v jádře buňky. Pozorováno na konfokálním mikroskopu s rotujícím diskem. Měřítko odpovídá 20 μm .

4. 2 Selektce transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*, T1 generace

Selektce první generace T1 transgenních rostlin Col-0 nesoucí konstrukty *pMPK3::MPK3:mCherry* a *pMPK3::mCherry:MPK3* probíhala podle metody popsané v kapitole 3. 1. 6. 7 Selektce transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana*. Plasmid pB7m34GW obsahoval ve své sekvenci rezistenci vůči fosfinotricinu, což je herbicid, který inhibuje glutaminsyntetázu. Glutaminsyntetáza je klíčovým enzymem při asimilaci dusíku a jeho inhibice způsobuje akumulaci amoniaku, vyčerpání glutaminu a následně buněčnou smrt (Dragičević *et al.*, 2013). Rostliny, které k fosfinotricinu nebyly rezistentní, buďto nevyklíčily anebo obecně neprospívaly, tzn., byly malé, měly světlé nebo nažloutlé kotyledony. Naopak rostliny nesoucí rezistenci měly kotyledony zelené (Obr. 12).



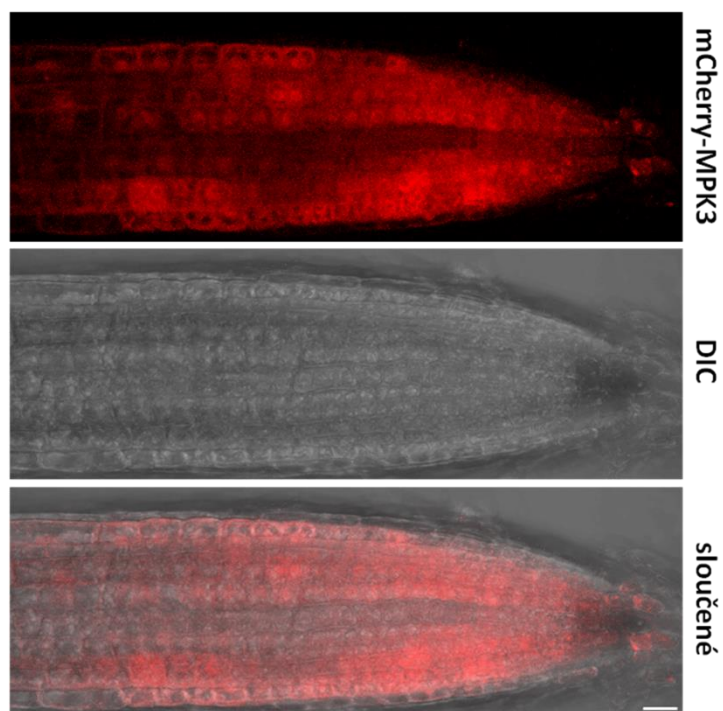
Obr. 12 Scan misek selektovaných transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* Col-0 T1 generace na ½ MS médiu obsahujícím fosfinotricin a tikarcilin. Pozitivní transgenní rostliny nesoucí rezistenci vůči fosfinotricinu jsou označeny černým kruhem. Měřítko odpovídá velikosti 2 cm.

4. 3 Mikroskopická dokumentace *Arabidopsis thaliana* T2 generace

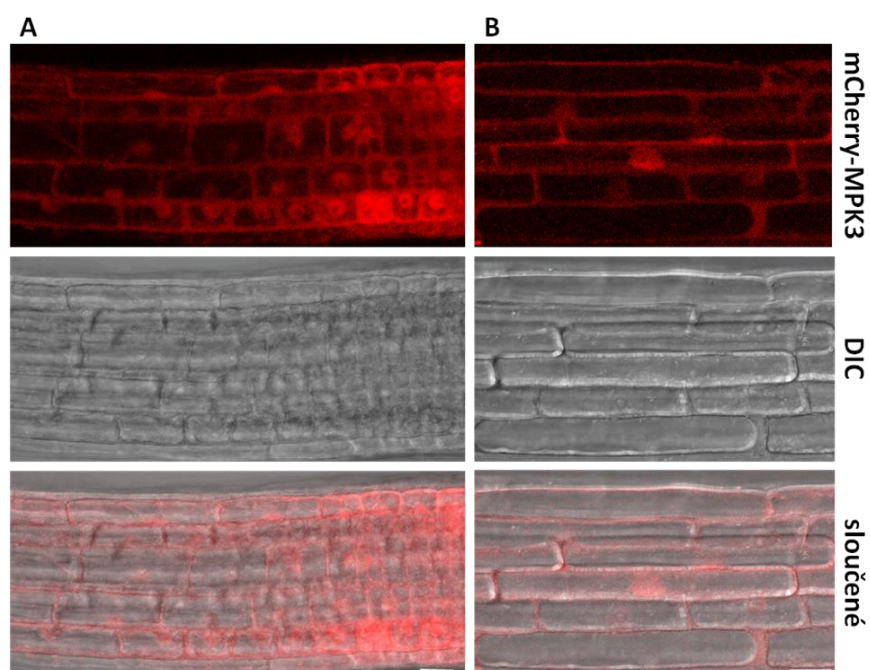
Mikroskopická dokumentace selektovaných transgenních rostlin *A. thaliana* T2 generace probíhala pomocí konfokálního laserového skenovacího mikroskopu. Před samotným pozorováním proběhla rychlá selekce semenáčků v Petriho misce pomocí epifluorescenčního mikroskopu kontrolou fluorescence mCherry. Poté byly vybrané semenáčky z Petriho misky vyjmuty a byl z nich zhotoven preparát. Jako médium bylo použito tekuté ½ MS médium, aby nedošlo k plasmolýze buněk rostliny.

Při nastavených parametrech pro detekci mCherry byl signál opět lokalizován v jádře mimo jádérko a cytoplasmatické membráně, případně cytoplasmatických pásech. U obou rostlin nesoucích konstrukty *pMPK3::mCherry:MPK3* (Obr. 13-17) a *pMPK3::MPK3:mCherry* (Obr. 18-23) byla snímána kořenová špička s dělicí zónou, přechod mezi zónou dělicí a prodlužovací, zóna diferenační, hypokotyl a epidermální buňky děložních lístků z abaxiální strany.

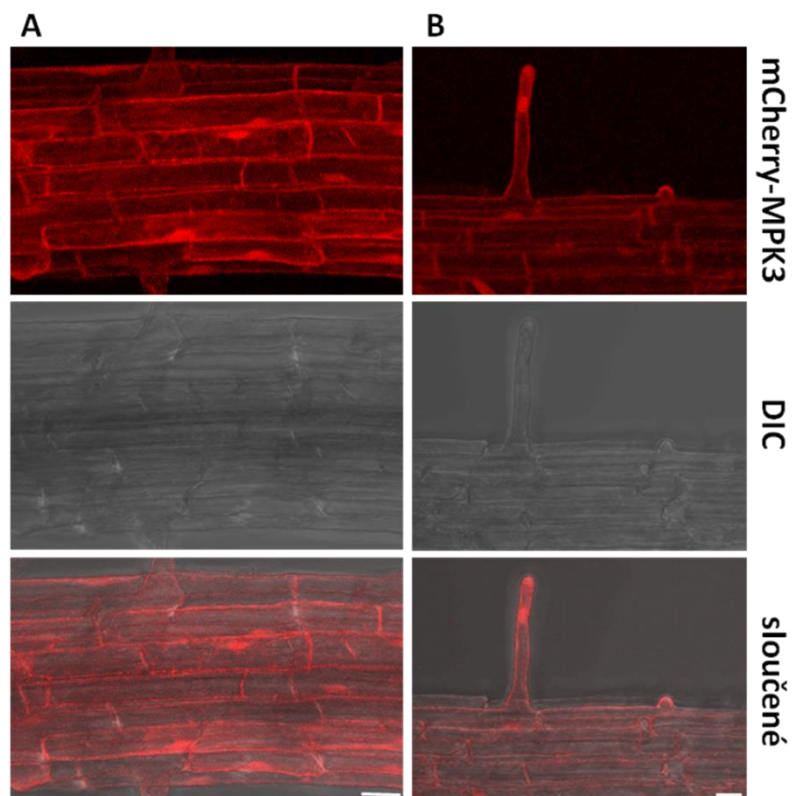
Fúzní protein MPK3 s mCherry byl lokalizován v jádře a cytoplasmatické membráně, což koreluje s již publikovanými výsledky (Pitzschke *et al.*, 2013; Persak a Pitzschke, 2014). Konstrukty *pMPK3::MPK3:mCherry* v pB7m34GW a *pMPK3::mCherry:MPK3* v pB7m34GW byly klonovány pod nativním promotorem. U transgenních rostlin *Arabidopsis thaliana* T2 generace exprimujících *pMPK3::MPK3:mCherry* byla při mikroskopické dokumentaci zaznamenána silnější fluorescence než u transgenních rostlin *A. thaliana* exprimujících *pMPK3::mCherry:MPK3*. Toto mohlo být způsobeno zabudováním většího počtu kopií konstruktů do genomu rostliny. Pro ověření by mohl být využit Southernův přenos, který je možno použít jak pro ověření stabilní transformace transgenu do hostitelského genomu, tak i pro určení, zda byl transgen inzertován do jednoho nebo více lokusů. Počet zabudovaných kopií transgenu může být určen porovnáním množství a intenzity hybridizovaných pásů se standardem (Kato a Lam, 2001; Hong *et al.*, 2016). Taktéž je potřebné ověřit, zda nedochází ke štěpení fúze MPK3 a mCherry proteinu a tudíž potvrdit, že se nejedná pouze o lokalizaci volného mCherry proteinu. To je možné ověřit metodou Westernova přenosu a imunolokalizací buď protilátkou specifickou na MPK3 nebo mCherry protein (Chen *et al.*, 2013).



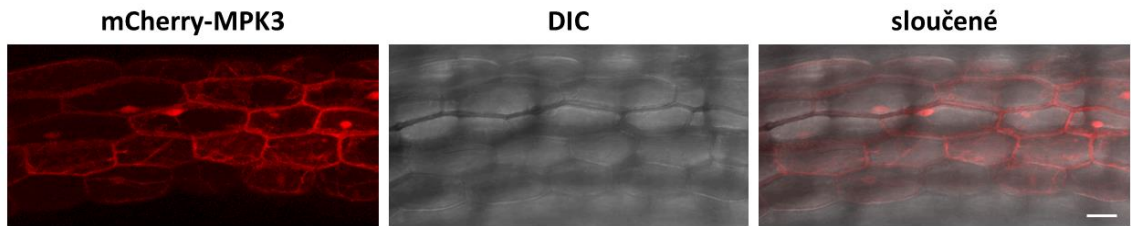
Obr. 13 Kořenová špička s dělicí zónou transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::mCherry:MPK3*. Měřítko odpovídá 20 μm .



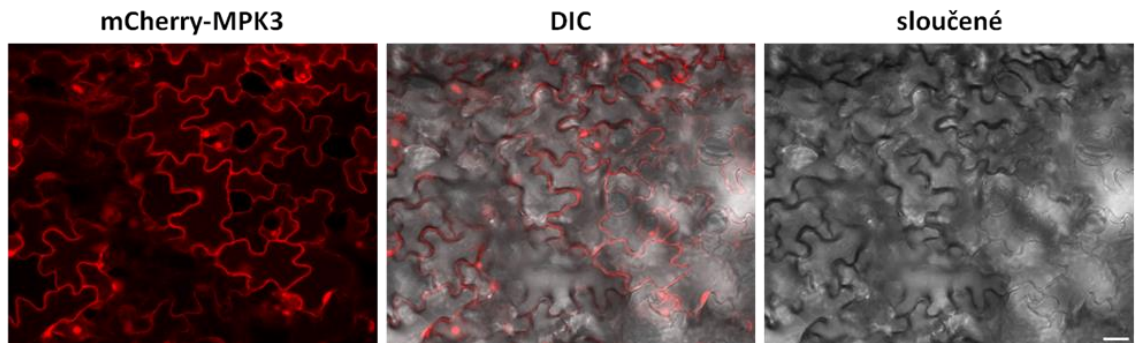
Obr. 14 Buňky přechodné oblasti kořene mezi zónou dělicí a zónou prodlužovací transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::mCherry:MPK3*. A) Buňky oblasti mezi zónou dělicí a zónou prodlužovací. B) Detail buněk prodlužovací zóny. Měřítko odpovídá 20 μm .



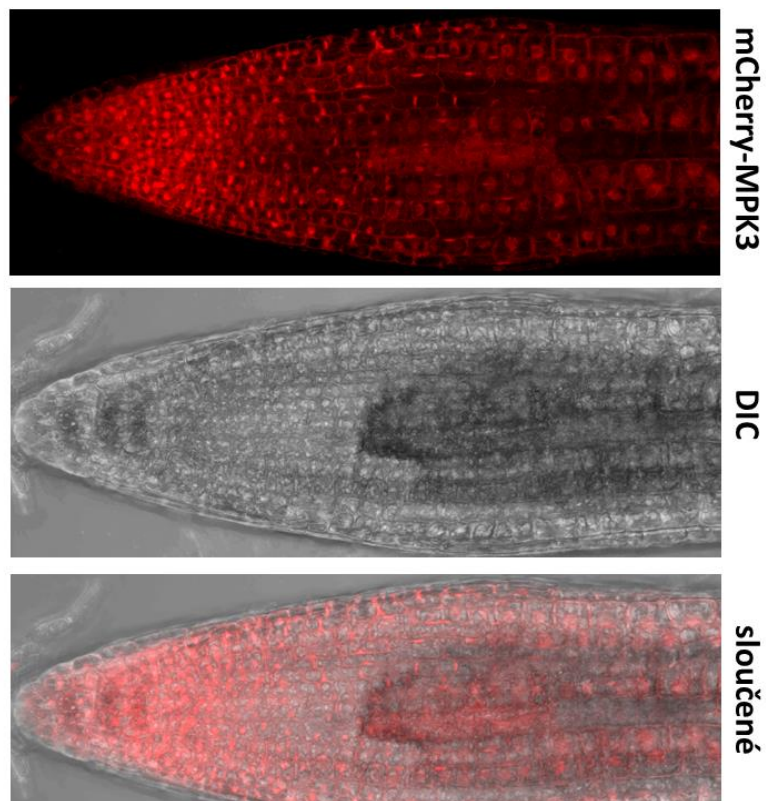
Obr. 15 Buňky diferenciační zóny kořene transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::mCherry:MPK3*. A) Zaznamenaný signál na cytoplasmatické membráně a v jádře buněk diferenciační zóny kořene. B) Kořenový vlásek. Měřítko odpovídá 20 μm .



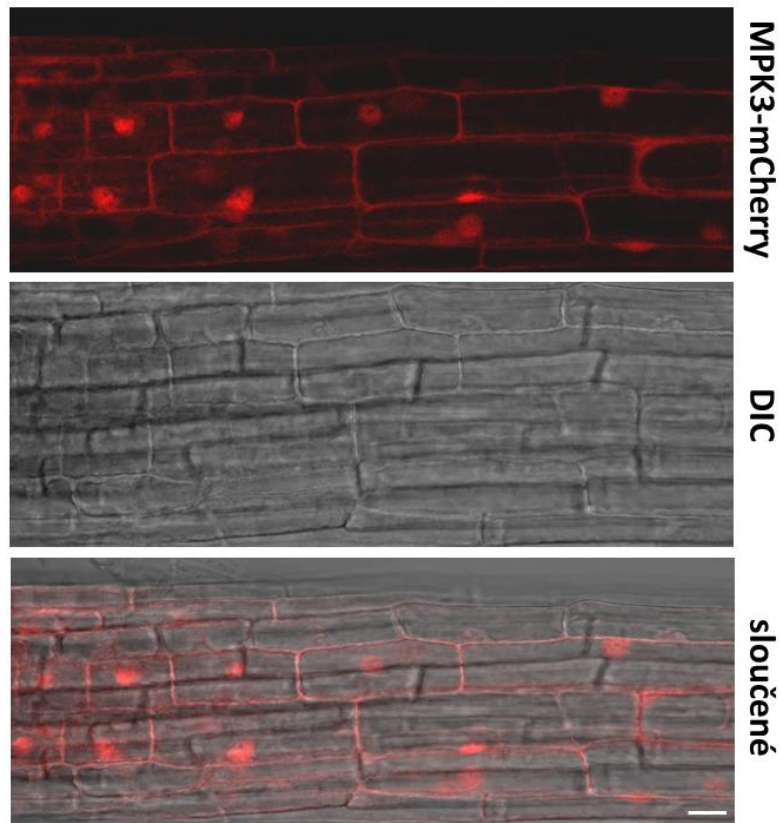
Obr. 16 Buňky hypokotylu transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::mCherry:MPK3*. Měřítka odpovídá 20 μm .



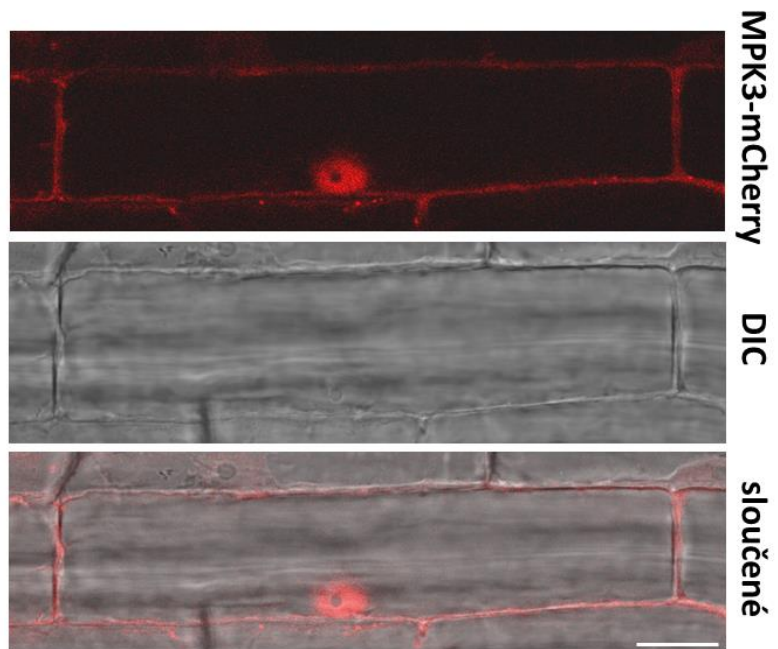
Obr. 17 Epidermální buňky děložního lístku transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::mCherry:MPK3*. Měřítka odpovídá 20 μm .



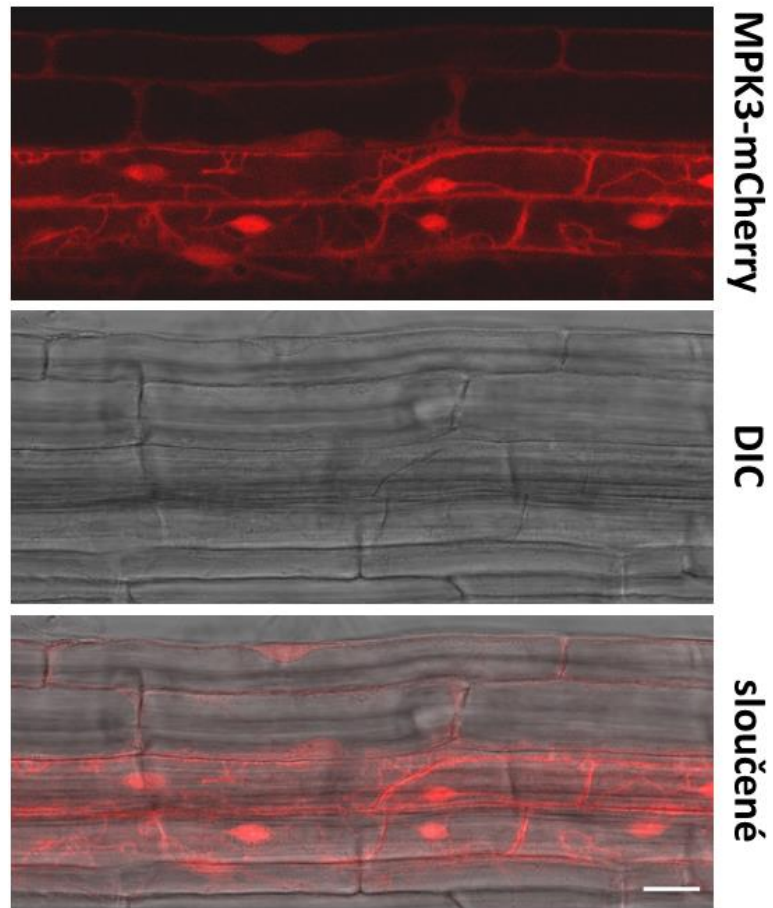
Obr. 18 Kořenová špička s dělicí zónou transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítka odpovídá 20 μm .



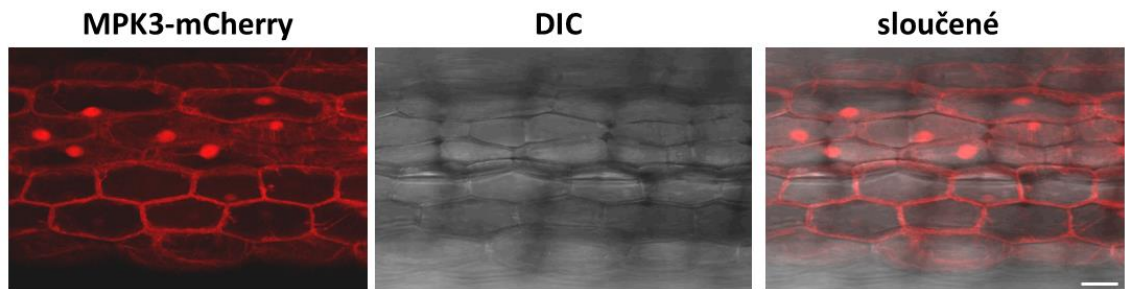
Obr. 19 Buňky přechodné oblasti kořene mezi zónou dělicí a zónou prodlužovací transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítko odpovídá 20 μm .



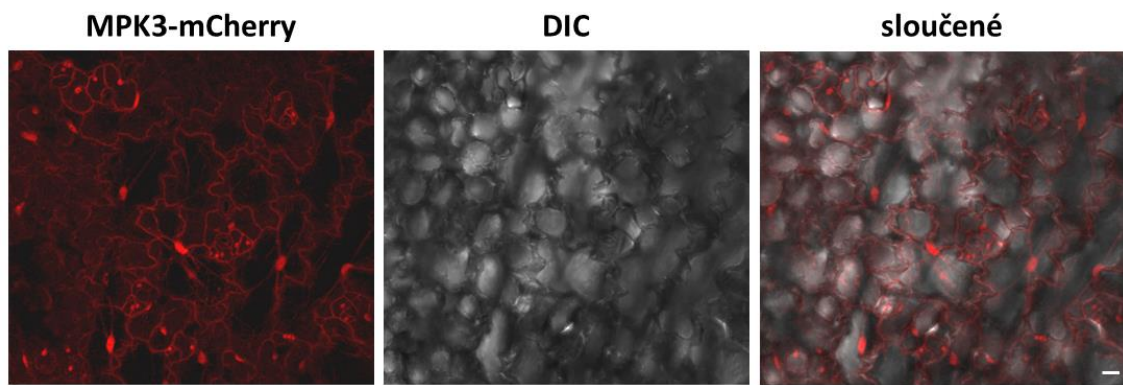
Obr. 20 Epidermální buňka kořene transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 21 Buňky diferenciační zóny kořene transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 22 Buňky hypocotylu transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítko odpovídá 20 μm .



Obr. 23 Epidermální buňky děložního lístku transgenní rostliny *A. thaliana* T2 generace exprimující *pMPK3::MPK3:mCherry*. Měřítko odpovídá 20 μm .

5. ZÁVĚR

V této práci bylo v teoretické části shrnuto, jak funguje přenos a integrace T-DNA z *Agrobacterium tumefaciens* do rostlinné buňky. Také byl popsán historický vývoj *Arabidopsis thaliana* jako modelového organismu a byly popsány výhody jejího využití pro studium požadovaných genů u dvouděložných rostlin. Rovněž tedy z kapitoly o *A. thaliana* vyplývá, proč byla v této práci zvolena právě jako expresní organismus pro MPK3. V další kapitole teoretické části je shrnuta funkce jednotlivých komponent MAPK kaskád a samotná úloha MPK3.

V experimentální části se potom tato práce věnovala transientním transformacím *Nicotiana benthamiana* konstruktem pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW pomocí *Agrobacterium tumefaciens*. Toto sloužilo pro časově nenáročné ověření funkčnosti konstruktů a ověření exprese *MPK3* genu spolu s fúzním proteinem mCherry. Po potvrzení exprese byla provedena stabilní transformace *Arabidopsis thaliana* konstruktem pro C-terminální fúzi *pMPK3::MPK3:mCherry* ve vektoru pB7m34GW a pro N-terminální fúzi *pMPK3::mCherry:MPK3* ve vektoru pB7m34GW pomocí *Agrobacterium tumefaciens* metodou floral dip. Dále po sklizení semen proběhla selekce T1 generace pomocí herbicidu fosfinitricinu, který byl přidán do média. Selektované semenáčky byly přeneseny do půdy a po dozrání byla sklizena semena v generaci T2. Ta byla po vyklíčení předselektována na epifluorescenčním mikroskopu a poté byly zhotoveny snímky na konfokálním laserovém skenovacím mikroskopu rostlin T2 generace nesoucích C-terminální a N-terminální fúzi MPK3 a mCherry proteinu. Tyto rostliny budou poté využity pro další studium.

6. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- Alonso-Blanco C., Andrade J., Becker C., Bemm F., Bergelson J., Borgwardt K. M., Cao J., Chae E., Dezwaan T. M., Ding W., Ecker J. R., Exposito-Alonso M., Farlow A., Fitz J., Gan X., Grimm D. G., Hancock A. M., Henz S. R., Holm S., Horton M., Jarsulic M., Kerstetter R. A., Korte A., Korte P., Lanz Ch., Lee Ch., Meng D., Michael T. P., Mott R., Mulyati N. W., Nägele T., Nagler M., Nizhynska V., Nordborg M., Novikova P. Y., Picó F. X., Platzer A., Rabanal F. A., Rodriguez A., Rowan B. A., Salomé P. A., Schmid K. J., Schmitz R. J., Seren Ü., Sperone F. G., Sudkamp M., Svoldal H., Tanzer M. M., Todd D., Volchenbom S. L., Wang C., Wang G., Wang X., Weckwerth W., Weigel D., Zhou X. (2016): 1,135 Genomes Reveal the Global Pattern of Polymorphism in *Arabidopsis thaliana*. *Cell* **166**, 481-491.
- Anand A., Krichevsky A., Schornack S., Lahaye T., Tzfira T., Tang Y., Citovsky V., Mysore K. S. (2007): *Arabidopsis* VIRE2 INTERACTING PROTEIN2 Is Required for *Agrobacterium* T-DNA Integration in Plants. *Plant Cell* **19**, 1695–1708.
- Anderson L. B., Hertzell A. V., Das A. (1996): *Agrobacterium tumefaciens* VirB7 and VirB9 form a disulfide-linked protein complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 8889-8894.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L., Gómez-Gómez L., Boller T., Ausubel F. M., Sheen J. (2002): MAP kinase signalling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Atmakuri K., Cascales E., Christie P. J. (2004): Energetic components VirD4, VirB11 and VirB4 mediate early DNA transfer reactions required for bacterial type IV secretion. *Molecular Microbiology* **54**, 1199–1211.
- Bako L., Umeda M., Tiburcio A. F., Schell J., Koncz C. (2003): The VirD2 pilot protein of *Agrobacterium*-transferred DNA interacts with the TATA box-binding protein and a nuclear protein kinase in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **100**, 10108-10113.
- Ballas N., Citovsky V. (1997): Nuclear localization signal binding protein from *Arabidopsis* mediates nuclear import of *Agrobacterium* VirD2 protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **94**, 10723–10728.
- Beaupré Ch. E., Bohne J., Dale M. E., Binns A. N. (1996): Interactions between VirB9 and VirB10 Membrane Proteins Involved in Movement of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into Plant Cells. *Journal of Bacteriology* **179**, 78-89.
- Beckers G. J. M., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W. R., He S. Y., Zhang S., Conrath U. (2009): Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 Are Required for Full Priming of Stress Responses in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **21**, 944–953.
- Bechtold N., Pelletier G. (1998): *In planta* *Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods in Molecular Biology* **82**, 259-266.
- Bent A. (2006): *Arabidopsis thaliana* floral dip transformation method. *Methods in Molecular Biology* **343**, 87-103.
- Berger B. R., Christie P. J. (1993): The *Agrobacterium tumefaciens* *virB4* Gene Product Is an Essential Virulence Protein Requiring an Intact Nucleoside Triphosphate-Binding Domain. *Journal of Bacteriology* **175**, 1723-1734.
- Berger B. R., Christie P. J. (1994): Genetic Complementation Analysis of the *Agrobacterium tumefaciens* *virB* Operon: *virB2* through *virB11* Are Essential Virulence Genes. *Journal of Bacteriology* **176**, 3646-3660.
- Bergmann D. C., Lukowitz W., Somerville Ch. R. (2004): Stomatal Development and Pattern Controlled by a MAPKK Kinase. *Science* **304**, 1494-1497.

- Bourras S., Rouxel T., Meyer M. (2015): *Agrobacterium tumefaciens* Gene Transfer: How a Plant Pathogen Hacks the Nuclei of Plant and Nonplant Organisms. *Phytopathology* **105**, 1288-1301.
- Bögre L., Calderinia O., Binarovac P., Mattauch M., Tilla S., Kiegerla S., Jonaka C., Pollascheka Ch., Barker P., Huskisson N. S., Hirta H., Heberle-Borsa E. (1999): A MAP Kinase Is Activated Late in Plant Mitosis and Becomes Localized to the Plane of Cell Division. *The Plant Cell* **11**, 101-113.
- Bradwell L., Thorner J. (1996): A conserved motif at the amino termini of MEKs might mediate high-affinity interaction with the cognate MAPKs. *Trends in Biochemical Sciences* **21**, 373-374.
- Brodersen P., Petersen M., Nielsen H. B., Zhu S., Newman M. A., Shokat K. M., Rietz S., Parker J., Mundy J. (2006): *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid- and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *Plant Journal* **47**, 532-546.
- Brunaud V., Balzergue S., Dubreucq B., Aubourg S., Samson F., Chauvin S., Bechtold N., Cruaud C., DeRose R., Pelletier G., Lepiniec L., Caboche M., Lecharny A. (2002): T-DNA integration into the *Arabidopsis* genome depends on sequences of pre-insertion sites. *EMBO Reports* **3**, 1152-1157.
- Calderini O., Bogre L., Vicente O., Binarova P., Heberle-Bors E., Wilson C. (1998): A cell cycle regulated MAP kinase with a possible role in cytokinesis in tobacco cells. *Journal of Cell Science* **111**, 3091-3100.
- Cardinale F., Meskiene I., Ouaked F., Hirt H. (2002): Convergence and Divergence of Stress-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways at the Level of Two Distinct Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases. *The Plant Cell* **14**, 703-711.
- Cargnello M., Roux P. P. (2011): Activation and Function of the MAPKs and Their Substrates, the MAPK-Activated Protein Kinases. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **75**, 50-83.
- Cascales E., Christie P. J. (2004): Definition of a Bacterial Type IV Secretion Pathway for a DNA Substrate. *Science* **304**, 1170-1173.
- Citovsky V., De Vos G., Zambryski P. (1988): Single-Stranded DNA Binding Protein Encoded by the *virE* Locus of *Agrobacterium tumefaciens*. *Science* **240**, 501-504.
- Citovsky V., Zupan J., Warnick D., Zambryski P. (1992): Nuclear Localization of *Agrobacterium* VirE2 Protein in Plant Cells. *Science* **256**, 1802-1805.
- Close T. J., Tait R. C., Rempel H. C., Hirooka T., Kim L., Kado C. I. (1987): Molecular Characterization of the *virC* Genes of the Ti Plasmid. *Journal of Bacteriology* **169**, 2336-2344.
- Clough S. J., Bent A. F. (1998): Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **16**, 735-743.
- Cuevas B. D., Abell A. N., Johnson G. L. (2007): Role of mitogen-activated protein kinase kinase kinases in signal integration. *Oncogene* **26**, 3159-3171.
- Davis A. M., Hall A., Millar A. J., Darrach Ch., Davis S. J. (2009): Protocol: Streamlined sub-protocols for floral-dip transformation and selection of transformants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Methods* **5**, 1-7.
- De Vos G., Zambryski P. (1989): Expression of *Agrobacterium* nopaline specific VirD1, VirD2, and VirC1 proteins and their requirement for T-strand production of *E. coli*. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **2**, 43-52.
- Deng W., Chen L., Peng W. T., Liang X., Sekiguchi S., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W. (1999): VirE1 is a specific molecular chaperone for the exported single-stranded-DNA-binding protein VirE2 in *Agrobacterium*. *Molecular Microbiology* **31**, 1795-1807.

- Deng W., Chen L., Wood D. W., Metcalfe T., Liang X., Gordon M. P., Comai L., Nester E. W. (1998): *Agrobacterium* VirD2 protein interacts with plant host cyclophilins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 7040-7045.
- Desikan R., Hancock J. T., Ichimura K., Shinozaki K., Neill S. J. (2001): Harpin induces activation of the *Arabidopsis* mitogen-activated protein kinases AtMPK4 and AtMPK6. *Plant Physiology* **126**, 1579–1587.
- Dragičević M., Platiša J., Nikolić R., Todorović S., Bogdanović M., Mitić N., Simonović A. (2013): Herbicide Phosphinothricin Causes Direct Stimulation Hormesis. *Dose Response* **11**, 344–360.
- Droillard M. J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurie're Ch. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. *FEBS Letters* **527**, 43-50.
- Edison A. S., Hall R. D., Junot Ch., Karp P. D., Kurland I. J., Mistrík R., Reed L. K., Saito K., Salek R. M., Steinbeck Ch., Summer L. W., Viant M. R. (2016): The Time Is Right to Focus on Model Organism Metabolomes. *Metabolites* **6**, 8. <http://www.mdpi.com/2218-1989/6/1/8>
- Escobar M. A., Dandekar A. M. (2003): *Agrobacterium tumefaciens* as an agent of disease. *Trends in Plant Science* **8**, 1360-1385.
- Fernandez D., Dang T. A., Spudich G. M., Zhou X. R., Berger B. R., Christie P. J. (1996): The *Agrobacterium tumefaciens* virB7 gene product, a proposed component of the T-complex transport apparatus, is a membrane-associated lipoprotein exposed at the periplasmic surface. *Journal of Bacteriology* **178**, 3156–3167.
- François O., Blum M. G. B., Jakobsson M., Rosenberg N. A. (2008): Demographic History of European Populations of *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* **4(5)**:e1000075. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1000075>
- Gao F., Su Q., Fan Y., Wang L. (2010): Expression pattern and core region analysis of AtMPK3 promoter in response to environmental stresses. *Science China Life Sciences* **53**, 1315–1321.
- Gelvin S. B. (2000): *Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration. *Annual Review of Plant Biology* **51**, 223-256.
- Gómez-Gómez L., Boller T. (2000): FLS2: An LRR Receptor-like Kinase Involved in the Perception of the Bacterial Elicitor Flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **5**, 1003-1011.
- Gudesblat G. E., Iusem N. D., Morris P. C. (2007): Guard cell-specific inhibition of *Arabidopsis* MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* **173**, 713–721.
- Harrison S. J., Mott E. K., Parsley K., Aspinall S., Gray C. J., Cottage A. (2006): A rapid and robust method of identifying transformed *Arabidopsis thaliana* seedlings following floral dip transformation. *Plant Methods* **2**:19. <http://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-2-19>
- Herrera-Estrella A., Chen Z., Van Montagu M., Wang K. (1988): VirD proteins of *Agrobacterium tumefaciens* are required for the formation of a covalent DNA protein complex at the 5' terminus of T-strand molecules. *The EMBO Journal* **7**, 4055-4062.
- Herrera-Estrella A., Van Montagu M., Wang K. (1990): A bacterial peptide acting as a plant nuclear targeting signal: the amino-terminal portion of *Agrobacterium* VirD2 protein directs a beta-galactosidase fusion protein into tobacco nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **87**, 9534–9537.
- Hong S. B., Rashid M. B., Santiago-Vázquez L. Z. (2016): *Methods in Biotechnology*. 1st ed., John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 360 stran.

- Hooykaas P. J. J., den Dulk-Ras H., Ooms G., Schilperoort R. A. (1980): Interactions Between Octopine and Nopaline Plasmids in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **143**, 1295-1306.
- Howard E. A., Zupan J. R., Citovsky V., Zambryski P. C. (1992): The VirD2 protein of *A. tumefaciens* contains a C-terminal bipartite nuclear localization signal: implications for nuclear uptake of DNA in plant cells. *The Cell* **10**, 109-118.
- Chang L., Karin M. (2001): Mammalian MAP kinase signaling cascades. *Nature* **410**, 37-40.
- Chang S. S., Park S. K., Kim B. Ch., Kang B. J., Kim D. U., Nam H. G. (1994): Stable genetic transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium* inoculation in planta. *The Plant Journal* **5**, 551-558.
- Chen X., Zaro J., Shen W. Ch. (2013): Fusion Protein Linkers: Property, Design and Functionality. *Advanced Drug Delivery Reviews* **65**, 1357-1369.
- Cheong Y. H., Moon B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Kim M. C., Kim I. H., Park C. Y., Kim J. C., Park B. O., Koo S. C., Yoon H. W., Chung W. S., Lim C. O., Lee S. Y., Cho M. J. (2003): BWMK1, a rice mitogen-activated protein kinase, locates in the nucleus and mediates pathogenesis-related gene expression by activation of a transcription factor. *Plant Physiology* **132**, 1961-1972.
- Cheong Y. H., Kim M. Ch. (2010): Functions of MAPK Cascade Pathways in Plant Defense Signaling. *Journal of Plant Pathology* **26**, 101-109.
- Chilton M. D., Drummond M. H. (1978): Tumor-inducing (Ti) plasmids of *Agrobacterium* share extensive regions of DNA homology. *Journal of Bacteriology* **136**, 1178-1183.
- Christie P. J. (2004): Type IV secretion: the *Agrobacterium* VirB/D4 and related conjugation systems. *Biochimica et Biophysica Acta* **1694**, 219-234.
- Christie P. J., Vogel J. P. (2000): Bacterial type IV secretion: conjugation systems adapted to deliver effector molecules to host cells. *Trends in Microbiology* **8**, 354-360.
- Christie P. J., Ward J. E., Gordon M. P., Nester E. W. (1989): A gene required for transfer of T-DNA to plants encodes an ATPase with autophosphorylating activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **86**, 9677-9681.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B. E., Morris P. C., Innes R. W., Ecker J. R., Scheel D., Klessig D. F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J. C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Jin S., Roitsch T., Ankenbauer R. G., Gordon M. P., Nester E. W. (1990): The VirA Protein of *Agrobacterium tumefaciens* Is Autophosphorylated and Is Essential for vir Gene Regulation. *Journal of bacteriology* **172**, 525-530.
- Jonak C., Ökrész L., Bögre L., Hirt H. (2002): Complexity, cross talk and integration of plant MAP kinase signalling. *Current Opinion in Plant Biology* **5**, 415-424.
- Jones H. D., Doherty A., Sparks C. A. (2009): Transient Transformation of Plants. *Plant Genomics* **513**, 131-152.
- Kado C. I. (2014): Historical account on gaining insights on the mechanism of crown gall tumorigenesis induced by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Microbiology* **5**:340.
<http://dx.doi.org/10.3389/fmicb.2014.00340>
- Kalogeraki V. S., Winans S. C. (1995): The Octopine-Type Ti Plasmid pTiA6 of *Agrobacterium tumefaciens* Contains a Gene Homologous to the Chromosomal Virulence Gene *acvB*. *Journal of Bacteriology* **177**, 892-897.

- Kato N., Lam E. (2001): Detection of chromosomes tagged with green fluorescent protein in live *Arabidopsis thaliana* plants. *Genome Biology* **2**:research0045.1. <https://genomebiology.biomedcentral.com/articles/10.1186/gb-2001-2-11-research0045>
- Kiegerl S., Cardinale F., Siligan Ch., Gross A., Baudouin E., Liwosz A., Eklöf S., Till S., Bögre L., Hirt H., Meskiene I. (2000): SIMKK, a Mitogen-Activated Protein Kinase (MAPK) Kinase, Is a Specific Activator of the Salt Stress-Induced MAPK, SIMK. *The Plant Cell* **12**, 2247–2258.
- Kinoshita T., Ikeda Y., Ishikawa R. (2008): Genomic imprinting: a balance between antagonistic roles of parental chromosomes. *Seminars in Cell & Developmental Biology* **19**, 574–579.
- Koo S. C., Moo B. C., Kim J. K., Kim C. Y., Sung S. J., Kim M. C., Cho M. J., Cheong Y. H. (2009): OsBWMK1 mediates SA-dependent defense responses by activating the transcription factor OsWRKY33. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **387**, 365-370.
- Krämer U. (2015): The Natural History Of Model Organisms: Planting molecular functions in an ecological context with *Arabidopsis thaliana*. *eLife* **4**:e06100. <https://elifesciences.org/content/4/e06100>
- Koornneef M., Meinke D. (2010): The development of *Arabidopsis* as a model plant. *The Plant Journal* **61**, 909-921.
- Kovtun Y., Chiu W. L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **14**, 2940-2945.
- Kumar K., Rao K. P., Biswas D. K., Sinha A. K. (2011): Rice WNK1 is regulated by abiotic stress and involved in internal circadian rhythm. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 316-320.
- Lacroix B., Citovsky V. (2013): The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. *The International Journal of Developmental Biology* **57**, 467-481.
- Laibach F. (1943): *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. als Object für Genetische und Entwicklungs-Physiologische Untersuchungen. *Botanisches Archiv* **44**, 439–455.
- Langridge J. (1955): Biochemical Mutations in the Crucifer *Arabidopsis thaliana* (L.) Heyhn. *Nature* **176**, 260-261.
- Lasky J. R., des Marais D. L., McKay J. K., Richards J. H., Juenger T. E., Keitt T. H. (2012): Characterizing genomic variation of *Arabidopsis thaliana*: the roles of geography and climate. *Molecular Ecology* **21**, 5512–5529.
- Lee Ch., Efetova M., Engelmann J. C., Kramell R., Wasternack C., Ludwig-Müller J., Hedrich R., Deeken R. (2009): *Agrobacterium tumefaciens* Promotes Tumor Induction by Modulating Pathogen Defense in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **21**, 2948–2962.
- Lessl M., Lanka E. (1994): Common mechanisms in bacterial conjugation and Ti-mediated T-DNA transfer to plant cells. *The Cell* **77**, 321–324.
- Li J., Krichevsky A., Vaidya M., Tzfira T., Citovsky V. (2005): Uncoupling of the functions of the *Arabidopsis* VIP1 protein in transient and stable plant genetic transformation by *Agrobacterium*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 5733–5738.
- Li Y., Rosso M. G., Ülker B., Weisshaar B. (2006): Analysis of T-DNA insertion site distribution patterns in *Arabidopsis thaliana* reveals special features of genes without insertions. *Genomics* **87**, 645–652.

- Marshall C. J. (1994): MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **4**, 82-89.
- Matthysse A. G. (1986): Initial interactions of *Agrobacterium tumefaciens* with plant host cells. *Critical Reviews in Microbiology* **13**, 281-307.
- Matthysse A. G., Thomas D. L., White A. R. (1994): Mechanism of Cellulose Synthesis in *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology* **177**, 1076–1081.
- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK Cascades in Plant Disease Resistance Signaling. *Annual Review of Phytopathology* **51**, 245-266.
- Meyerowitz E. M. (2001): Prehistory and History of *Arabidopsis* Research. *Plant Physiology* **125**, 15-19.
- Mizoguchi T., Irie K., Hirayama T., Hayashida N., Yamaguchi-Shinozaki K., Matsumoto K., Shinozaki K. (1996): A gene encoding a mitogen-activated protein kinase kinase is induced simultaneously with genes for a mitogen-activated protein kinase and an S6 ribosomal protein kinase by touch, cold, and water stress in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 765-769.
- Mossey P., Hudacek A., Das A. (2010): *Agrobacterium tumefaciens* Type IV Secretion Protein VirB3 Is an Inner Membrane Protein and Requires VirB4, VirB7, and VirB8 for Stabilization. *Journal of Bacteriology* **192**, 2830–2838.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* **15**, 473–497.
- Nakagami H., Kiegerl S., Hirt H. (2004): OMTK1, a Novel MAPKKK, Channels Oxidative Stress Signaling through Direct MAPK Interaction. *Journal of Biological Chemistry* **279**, 26959-26966.
- Nie S., Xu H. (2016): Riboflavin-Induced Disease Resistance Requires the Mitogen-Activated Protein Kinases 3 and 6 in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE* **11(4)**: e0153175.
<http://10.1371/journal.pone.0153175>
- Opdenakker K., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. (2012): Mitogen-Activated Protein (MAP) kinases in plant metal stress: regulation and responses in comparison to other biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences* **13**, 7828-7853.
- Qiu J., Zhou L., Yun B., Nielsen H. B., Fiil B. K., Petersen K., MacKinlay J., Loake G. J., Mundy J., Morris P. C. (2008): Arabidopsis Mitogen-Activated Protein Kinase Kinases MKK1 and MKK2 Have Overlapping Functions in Defense Signaling Mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* **148**, 212-222.
- Persak H., Pitzschke A. (2013): Tight Interconnection and Multi-Level Control of Arabidopsis MYB44 in MAPK Cascade Signalling. *PLoS One* **8**:e57547.
<http://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0057547>
- Pitzschke A., Datta S., Persak H. (2014): Salt Stress in *Arabidopsis*: Lipid Transfer Protein AZI1 and Its Control by Mitogen-Activated Protein Kinase MPK3. *Molecular Plant* **7**, 722–738.
- Plotnikov A., Zehorai E., Procaccia S., Seger R. (2011): The MAPK cascades: signaling components, nuclear roles and mechanisms of nuclear translocation. *Biochimica et Biophysica Acta* **1813**, 1619–1633.
- Ranty B., Aldon D., Galaud J. P. (2006): Plant Calmodulins and Calmodulin-Related Proteins. *Plant Signaling & Behavior* **1**, 96–104.
- Rodriguez M. C. S., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated Protein Kinase Signaling in Plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Rossi L., Hohn B., Tinland B. (1996): Integration of complete transferred DNA units is dependent on the activity of virulence E2 protein of *Agrobacterium tumefaciens*.

- Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 126–130.
- Sagulenko V., Sagulenko E., Jakubowki S., Spudich E., Christie P. J. (2001): VirB7 Lipoprotein Is Exocellular and Associates with the *Agrobacterium tumefaciens* T Pilus. *Journal of Bacteriology* **183**, 3642–3651.
- Saravu K., Sekhar S., Pai A., Barkur A. S., Rajesh V., Earla J. R. (2013): Paraquat - A deadly poison: Report of a case and review. *Indian Journal of Critical Care Medicine* **17**, 182-184.
- Schell J., Van Montagu M., De Beuckeleer M., De Block M., Depicker A., De Wilde M., Engler G., Genetello C., Hernalsteens J. P., Holsters M., Seurinck J., Silva B., Van Vliet F., Villarroel R. (1979): *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences* **204**, 251-266.
- Shamloul M., Trusa J., Mett V., Yusibov V. (2014): Optimization and Utilization of *Agrobacterium*-mediated Transient Protein Production in *Nicotiana*. *Journal of Visualized Experiments* **86**:e51204.
<https://www.jove.com/video/51204/optimization-utilization-agrobacterium-mediated-transient-protein>
- Sheng J., Citovsky V. (1996): *Agrobacterium*-Plant Cell DNA Transport: Have Virulence Proteins, Will Travel. *The Plant Cell* **8**, 1699-1710.
- Shurvinton C. E., Hodges L., Ream W. (1992): A nuclear localization signal and the C-terminal omega sequence in the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 endonuclease are important for tumor formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **15**, 11837–11841.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2014): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Stachel S. E., Messens E., M. V. Montagu, Zambryski P. (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**, 624-629.
- Stachel S. E., Timmerman B., Zambryski P. (1986): Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer for *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* **322**, 706-712.
- Sun Y., Wang Ch., Yang B., Wu F., Hao X., Liang W., Niu F., Yan J., Zhang H., Wang B., Deyholos M. K., Jiang Y. (2014): Identification and functional analysis of mitogen-activated protein kinase kinase kinase (MAPKKK) genes in canola (*Brassica napus* L.). *Journal of Experimental Botany* **65(8)**:2171-2188.
<http://jxb.oxfordjournals.org/content/65/8/2171>
- Szabados L., Kovács I., Oberschall A., Ábrahám E., Kerekes I., Zsigmond L., Nagy R., Alvarado M., Krasovskaja I., Gál M., Berente A., Rédei G. P., Haim A. B., Koncz C. (2002): Distribution of 1000 sequenced T-DNA tags in the *Arabidopsis* genome. *The Plant Journal* **32**, 233–242.
- Šamaj J., Baluška F., Hirt H. (2004): From signal to cell polarity: Mitogen-activated protein kinases as sensors and effectors of cytoskeleton dynamicity. *Journal of Experimental Botany* **55**, 189-98.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in plant science* **18**, 140-148.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.

- Takahashi F., Mizoguchi T., Yoshida R., Ichimura K., Shinozaki K. (2011): Calmodulin-Dependent Activation of MAP Kinase for ROS Homeostasis in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **41**, 649-660.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J. L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* **15**, 141–152.
- The Arabidopsis Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**, 796-815.
- Tzfira T., Citovsky V. (2006): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* **17**, 147–154.
- Tzfira T., Vaidya M., Citovsky V. (2001): VIP1, an *Arabidopsis* protein that interacts with *Agrobacterium* VirE2, is involved in VirE2 nuclear import and *Agrobacterium* infectivity. *The EMBO Journal* **20**, 3596–3607.
- van Kregten M., Lindhout B. I., Hooykaas P. J. J., van der Zaal B. J. (2009): *Agrobacterium*-Mediated T-DNA Transfer and Integration by Minimal VirD2 Consisting of the Relaxase Domain and a Type IV Secretion System Translocation Signal. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **22**, 1356-1365.
- van Lijsebettens M., Angenon G. (2013): Thirty years of transgenic research in plants. *The International Journal of Developmental Biology* **57**, 445-447.
- Vergunst A. C., van Lier M. C. M., den Dulk-Ras A., Hooykaas P. J. J. (2003): Recognition of the *Agrobacterium tumefaciens* VirE2 Translocation Signal by the VirB/D4 Transport System Does Not Require VirE1. *Plant Physiology* **133**, 978–988.
- Vriend L. E. M., Krawczyk P. M. (2017): Nick-initiated homologous recombination: Protecting the genome, one strand at a time. *DNA Repair* **50**, 1-13.
- Wallden K., Rivera-Calzada A., Waksman G. (2010): Type IV secretion systems: versatility and diversity in function. *Cell Microbiology* **12**, 1203–1212.
- Winans S. C. (1992): Two-Way Chemical Signaling in *Agrobacterium*-Plant Interactions. *Microbiological reviews* **56**, 12-31.
- Winans S. C., Ebert P. R., Stachel S. E., Gordon M. P., Nester E. W. (1986): A gene essential for *Agrobacterium* virulence is homologous to a family of positive regulatory loci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **83**, 8278–8282.
- Xiong L., Schumaker K. S., Zhu J. K. (2002): Cell Signaling during Cold, Drought, and Salt Stress. *The Plant Cell* **14**, 165-183.
- Ye G. N., Stone D., Pang S. Z., Creely W., Gonzalez K., Hinchee M. (1999): *Arabidopsis* ovule is the target for *Agrobacterium in planta* vacuum infiltration transformation. *The Plant Journal* **19**, 249-257.
- Yuasa T., Ichimura K., Mizoguchi T., Shinozaki K. (2001): Oxidative stress activates ATMPK6, an *Arabidopsis* homologue of MAP kinase. *Plant Cell Physiology* **42**, 1012-1016.
- Zhang X., Henriques S., Lin S., Niu Q., Chua N. (2006): *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nature protocols* **1**, 641-646.
- Zhu J., Oger P. M., Schrammeijer B., Hooykaas P. J. J., Farrand S. K., Winans S. C. (2000): The Bases of Crown Gall Tumorigenesis. *Journal of Bacteriology* **182**, 3885-3895.
- Zhu L., Zhang Y., Su F., Chen L., Huang T., Cai Y. (2016): A Shortest-Path-Based Method for the Analysis and Prediction of Fruit-Related Genes in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One* **11(7)**:e0159519.
<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0159519>

- Ziemięnowicz A., Merkle T., Schoumacher F., Hohn B., Rossi L. (2001): Import of *Agrobacterium* T-DNA into Plant Nuclei: Two Distinct Functions of VirD2 and VirE2 Proteins. *The Cell* **13**, 369–383.
- Ziemięnowicz A., Tzfira T., Hohn B. (2008): Mechanisms of T-DNA integration. In: *Agrobacterium: From Biology to Biotechnology*. (Tzfira T., Citovsky V.), Springer, New York, U.S.A., 395-440.
- Zupan J., Muth T. R., Draper O., Zambryski P. (2000): The transfer of DNA from *Agrobacterium tumefaciens* into plants: a feast of fundamental insights. *The Plant Journal* **23**, 11-28.

7. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

ANP1	<i>Arabidopsis</i> NPK1-like protein kinase
BCK1	bypass of C kinase 1
CaM	kalmmodulin
Col-0	Columbia
CTR1	constitutive triple response 1
dH ₂ O	destilovaná voda
DIC	Nomarského diferenciální interferenční kontrast
EDR1	enhanced disease resistance 1
FLS2	flagellin sensitive 2
MAPK (MPK)	mitogen-aktivovaná proteinkinasa
MAPKK (MAP2K, MKK)	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa
MAPKKK (MAP3K, MEKK)	mitogen-aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
mol.l ⁻¹	mol na litr
MS médium	Murashige and Skoog médium
NLS	jaderný lokalizační signál
NTP	nukleotid trifosfát
OD ₆₀₀	optická hustota měřená při vlnové délce 600 nm
OMTK1	oxidative stress-activated MAP triple-kinase 1
ROS	reaktivní formy kyslíku
rpm	otáčky za minutu (revolutions per minute)
SIMK	salt-stress inducible protein kinase
SIMKK	salt-stress inducible protein kinase kinase
STE11	sterile11
T4CP	typ IV spojovací protein
T4SS	sekreční systém typu IV
T-DNA	transferová DNA
VIP1	VirE2-interacting protein 1
VIP2	VirE2-interacting protein 2
WNK	with no lysine kinase
WRKY33	transkripční faktor 33