

Abstrakt

Pokroky v mikroskopii a citlivosť nových biosenzorov umožnili vývoj nových metód na monitorovanie fytohormónov s nízkou invazívnosťou a relatívne vysokým rozlíšením. Tie tak poskytujú lepšiu náhľad na funkciu fytohormónov v rastlinách. Na pozorovanie cytokinínov, ktoré patria medzi hlavné rastlinné hormóny, sú široko využívané nepriame biosenzory umožňujúce sledovanie dynamických zmien cytokinínových hladín počas vývoja a rastu rastlín. Syntetické promótorov citlivé na cytokiníny, ktoré sa používajú ako cytokinínové biosenzory, sú neustále vylepšované, čo umožňuje lepšie pochopenie funkcie cytokinínov. Reportérové systémy, používané na vizualizáciu, sú založené buď na enzymatickej reakcii produkujúcej farbu, alebo na použití fluorescenčných proteínov. Na vizualizáciu signálnych výstupov rastlinných hormónov sa používajú aj biosenzory založené na luminiscencii, ktoré sú však založené na exogénnom pridávaní luciferínového substrátu. Preto v tejto práci chceme uviesť novú techniku na generovanie senzorov signalizačných výstupov cytokinínov na základe autonómnej bioluminiscencie. Táto autonómna bioluminiscencia predstavuje neinvazívnu techniku, ktorá závisí na expresii celej dráhy autonómnej bioluminiscencie z huby *Neonothopanus nambi*, konkrétne cyklu kyseliny kávovej, ktorá obsahuje hubovou luciferázou. Pomocou modulárneho klonovacieho systému GoldenBraid boli vytvorené konštrukty pre autonómne luminiscenčné cytokinínové senzory. Tieto konštrukty sú založené na syntetických promótoroch regulátora pozitívnej odpovede typu-B TCSv2, na natívnych promótoroch regulátorov negatívnej odpovede typu-A ARR4 a ARR6 a na natívnom promótoru génu *PUP14*, ktorý je kontrolovaný regulátormi odpovede typu-A. Vytvorené konštrukty boli použité na genetickú transformáciu *Arabidopsis thaliana* spolu s konštruktom obsahujúcim gény pre enzýmy cyklu kyseliny kávovej. Takto vytvoreným transformovaným rastlinám bola detekovaná luminiscencia pomocou luminiscenčnej čítačky. Snímaná luminiscencia poskytuje dôkaz o tom, že autonómny luminiscenčný systém by sa mohol použiť vo výskume cytokinínov.