

**Univerzita Karlova v Praze**

Přírodovědecká fakulta

Katedra experimentální biologie rostlin

Studijní obor: Biologie - Experimentální biologie rostlin



**Bližší charakterizace gene trap linie MGT180  
a jejích kandidátních genů**

Diplomová práce

**Tereza Šnajdrová**

Školitel: RNDr. Aleš Soukup, Ph. D.

Praha 2015



## **1. Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 14. 8. 2015

Bc. Tereza Šnajdrová



## 2. Poděkování

Na tomto místě bych ráda poděkovala všem, kteří mě během tvorby této práce podporovali. V první řadě mému školiteli, RNDr. Aleši Soukupovi, Ph.D. za vedení mé práce a následnou pomoc s tvorbou tohoto textu. Bez jeho pomoci by tato práce neměla šanci vzniknout. Projevil obrovskou dávku trpělivosti a podržel mě, když to bylo třeba. Dále stále usměvavému RNDr. Lukáši Fischerovi, Ph.D. a celému jeho týmu za poskytnutí laboratorního zázemí, dobrých rad a vskutku velmi příjemného pracovního prostředí. Čerstvé ženatému Mgr. Ivanu Kulichovi, Ph.D. taktéž za dobré rady, pomoc při práci s novými vektory a obrovskou schopnost nadchnout se pro věc, a tuto vědeckou vášeň pak přenášet dál. Pořád dobře naladěné Mgr. Lence Stillerové za dodávání odvahy v mých prvních krůčcích molekulární biologií a trpělivost.

Obrovské poděkování patří také celému týmu Laboratoře fyziologické anatomie rostlin, s nímž jsem mohla sdílet své radosti i strasti. Zejména Bc. Šárce Benešové za úžasnou podporu a přátelství, v laboratoři i mimo ni. Neméně tak RNDr. Evě Peckové, Ph.D. a celé její rodině. Ing. Yvettě Šefrnové, která mi byla skvělou učitelkou, motivátorkou i přítelkyní. Všem přátelům, a samozřejmě své rodině, bez jejíž podpory by tato práce vznikala jen stěží. Konečně pak všem studentům a pedagogům, s nimiž byla radost zde trávit čas.

Vím, že to se mnou nebylo lehké, o to víc si toho všeho vážím. Děkuji.

### 3. Obsah

1. Prohlášení .....	3
2. Poděkování.....	5
4. Abstrakt.....	8
5. Abstract.....	9
6. Seznam použitých zkratek.....	10
7. Úvod.....	11
7.1. Cíle.....	12
8. Přehled literatury.....	13
8.1. Proteiny s AT-hook doménou .....	13
8.1.1. AT-hook proteiny u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
8.1.2. Konkrétní zástupci AHL proteinů u <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	15
8.2. Postranní kořeny .....	20
8.2.1. Lokalizace postranních kořenů .....	20
8.2.2. Vývoj postranních kořenů .....	21
8.2.3. Regulace vývoje postranních kořenů .....	22
9. Materiál a metody.....	28
9.1. Biologický materiál.....	28
9.1.1. Kultivace <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	28
9.1.2. GUS detekce .....	29
9.1.3. Mikroskopická analýza .....	30
9.1.4. Analýza kořenového systému .....	30
9.1.5. Izolace DNA metodou Oxford .....	31
9.1.6. Inerční mutanty a jejich ověřování.....	31
9.1.7. Křížení HM.....	33
9.1.8. Kultivace bakterií <i>Escherichia coli</i> .....	33
9.1.9. Kultivace <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	34
9.1.10. Transformace bakterií elektroporací .....	34
9.1.11. Příprava elektrokompetentních bakterií.....	36
9.1.12. Izolace plasmidové DNA z bakterií.....	37
9.2. Práce s DNA.....	37
9.2.1. Izolace rostlinné DNA metodou CTAB.....	37
9.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR) .....	38

9.2.3.	Primery .....	39
9.2.4.	Plasmidy .....	40
9.2.5.	Restrikční štěpení .....	42
9.2.6.	Zatupení konců.....	43
9.2.7.	Ligace.....	43
9.2.8.	Gelová agarózová elektroforéza .....	44
9.2.9.	Izolace DNA z fragmentu gelu .....	45
9.2.10.	LR reakce .....	46
9.2.11.	Transformace rostlin metodou Floral dip .....	46
9.2.12.	Selekce transformovaných rostlin.....	47
10.	Výsledky .....	48
10.1.	Expresní vzorec MGT180 odpovídá expresi genu AHL18.....	48
10.1.1.	Detekce aktivity GUS u linie MGT180 .....	48
10.1.2.	Klonování promotorů kandidátních genů do vektoru s reportérovým genem <i>GUS</i> 50	
10.1.3.	Detekce aktivity GUS u transformantů .....	54
10.1.4.	Porovnání expresního vzorce linie MGT180 a transformanta <i>ProAHL18:GUS</i> ....	57
10.2.	Srovnání fenotypu na kořenech mutantů <i>ahl18</i> a dalších genů z rodiny <i>AHL</i> .....	58
10.2.1.	Výběr linií dostupných inserčních mutantů .....	58
10.2.2.	Genotypování jednoduchých mutantů, hodnocení kořenové architektury .....	59
10.2.3.	Analýza kořenového systému jednoduchých mutantů.....	60
10.2.4.	Křížení.....	62
10.2.5.	Genotypování dvojitých mutantů, pilotní fenotypování.....	62
10.3.	Translační fúze AHL18 a AHL22 – dodatečný cíl.....	64
11.	Diskuze .....	67
11.1.	Expresní vzorec linie MGT180 odpovídá expresi <i>AHL18</i> .....	67
11.2.	Gen <i>AHL18</i> : Jeden z mnoha.....	67
11.3.	Analýza kořenů jednoduchých mutantů .....	69
11.4.	Dvojití mutanti: Pokus – omyl? .....	70
11.5.	Translační fúze.....	73
11.6.	AHL proteiny: Co dál?.....	74
12.	Závěr.....	75
13.	Použitá literatura.....	76

## 4. Abstrakt

Tvorba postranních kořenů umožňuje rostlinám dobývat půdní prostředí, efektivně získávat vodu a minerální látky či tvořit různé biotické interakce. Vznik postranních kořenů je u *Arabidopsis thaliana* vázán na buňky pericyklu, přiléhající ke xylémovému pólům diarchního cévního svazku. Právě na tyto buňky je vázána exprese gene trap linie MGT180. V této práci bylo prokázáno, že expresnímu vzorci MGT180 odpovídá jaderný protein s AT-hook doménou *AHL18* (At3g60870), transkripční faktor z genové rodiny, čítající 29 členů. Funkčně ještě tento gen nebyl charakterizován, analýza jednoduchého mutantu *ahl18* a několika dalších, příbuzných genů, neprokázala zřetelný fenotypový projev. Byly vytvořeny dvojité mutantní rostliny, z nichž jedna (E15) měla výrazný fenotypový projev, který byl však patrný zejména v nadzemní části rostliny a neshodoval se s žádným dosud popsaným fenotypem mutace *AHL* genů. Mezi některými *AHL* geny již byla popsána redundance, nicméně křížení dvou *AHL* mutantů, *ahl18* a *ahl28*, vedoucí k rostlině E15, odhalilo možnou redundanci těchto dvou proteinů. Translační fúze *AHL18:mRUBY* a *AHL22:mRUBY* pod přirozenými promotory by měla odhalit, kde působí tyto dva příbuzné AHL proteiny a zda je jejich působení buněčně autonomní či nikoliv.

### Klíčová slova

*Arabidopsis thaliana*, postranní kořen, AHL, pericykl



## 5. Abstract

Root branching allows plants to explore rhizosphere, to gain efficiently water, mineral nutrients or enter in various biotic interactions. Initiation of lateral root formation is localized to pericycle cells, flanking the xylem poles of diarch vascular bundle in *Arabidopsis thaliana*. Right in these pericycle cells, there is the expression pattern of the gene trap line MGT180. In this theseis , I have provided the evidence that the expression pattern of MGT180 is related with *AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED18* (*AHL18*; *At3g60870*). *AHL18* belongs to a gene family of 29 transcriptional factors of *Arabidopsis*. *AHL18* has not been functionally characterized yet, the analysis of singlemutant *ahl18* and some others revealed no significant phenotype. However, one of doublemutants, E15, showed a significant phenotype. This phenotype was evident mainly in the aboveground part of plants, and was not corresponding to any phenotype of *AHL* mutation described so far. There is a known redundancy among some *AHL* genes, confirmed by crossing of *ahl18* and *ahl28* leading to E15 plant. Translation phusion *AHL18-mRUBY* and *AHL22-mRUBY* under native promoters should reveal, where these two related proteins act, and if they fiction in autonomous manner or not.

## Key words

*Arabidopsis thaliana*, lateral root, AHL, pericycle

## 6. Seznam použitých zkratek

ABA .....	kyselina abscisová
AHL .....	Jaderný protein, obsahující AT-hook doménu (AT-HOOK MOTIF CONTAINING NUCLEAR LOCALIZED)
CTAB .....	cetrimoniumbromid
dH <sub>2</sub> O .....	destilovaná voda
DIC .....	diferenciální interferenční kontrast
DMSO .....	dimethylsulfoxid
DTP .....	oligonukleotidy
EDTA .	. etylendiamintetraoctová kyselina
FBA .....	fruktóza bisfosfát aldoláza, kódovaná genem <i>At2g01140</i>
GUS .....	glukuronidáza
HM .....	homozygotní mutant
HZ .....	heterozygotní mutant
KRP2 .....	KIP-RELATED PROTEIN2
PCR .....	polymerázová řetězová reakce
PPC .....	doména proteinu, konzervovaná u rostlin a prokaryot (Plants and Procaryot Conserved)
SEC7 .....	v tomto textu protein SEC7-like, kódovaný genem <i>At3g60860</i>
SIGnAL .....	Salk Institute Genomic Analysis Laboratory
WT .....	genotypově neovlivněný jedinec, původní genotyp

## 7. Úvod

Tato diplomová práce byla vypracovávána v laboratoři Fyziologické anatomie rostlin, která své vědecké bádání směřuje ke kořenům nejrůznějších modelových rostlin. Kořen je velmi důležitá, byť obvykle skrytá část rostlinného těla. Díky značné plasticitě a schopnosti aktivně reagovat na vnější podněty kořeny dokáží rostlině zajistit dostatečný příjem minerálních látek a vody, nezbytný pro její růst a vývoj. K tomu si kořen často napomáhá symbiózou s různými druhy půdních organismů. Pro správnou funkci kořene, u *Arabidopsis thaliana* a většiny dalších rostlin, je nezbytné zachování jeho schopnosti růstu a větvení. Za schopnost růstu je zodpovědný apikální meristéum kořene. Za větvení kořenů jsou zodpovědné kompetentní buňky pericyklu – vnější vrstvy středního válce. A právě o ně jsem se v této práci zajímala.

Tento text se zabývá gene trap linií MGT180, jejími kandidátními geny a jejich expresním vzorcem. Linie byla vybrána z kolekce (vytvořil ji Jean Phillipe Caszada) v rámci forward screeningu, který provedl Dr. Aleš Soukup během stáže v IBT UNAM Cuernavaca MX v laboratoři Dr. Josepha Dubrovskeho. Insert, vkládaný do rostlinného genomu, nemá vlastní promotor, proto je transkribován, pouze vloží-li se za aktivní promotor určitého genu, či do jeho intronu. Insert nese reportérový gen pro  $\beta$ -glukuronidázu (GUS, uidA), což znamená, že detekce aktivity tohoto enzymu bude zároveň detekovat aktivitu promotoru, díky níž je gen v rostlině přirozeně exprimován. U MGT180 je exprese vázána na buňky pericyklu, přiléhajících ke xylémovým pólům, v nichž u *Arabidopsis* dochází ke vzniku postranních kořenů. Úkolem práce tedy je dopátrat se, za promotor kterého genu se insert vložil, a pokusit se zjistit, jestli tento gen jakýmkoliv způsobem ovlivňuje vznik kořenových primordií a větvení kořene.

Mgr. Maria Dolores Gutierrez Alanis ve své diplomové práci pro linii MGT180 identifikovala 3 kandidátní geny. První z nich, fruktóza-1,6-bisfosfát aldoláza (*FBA*), kódovaná genem At2g01140, je enzym Calvinova cyklu, který se účastní regenerace ribulóza-1,5-bisfosfátu. Její zvýšená exprese stimuluje růst a produkci biomasy (Hatano-Iwasaki and Ogawa 2012). Produktem druhého kandidátního genu At3g60860 je SEC7-like protein (dále označovaný jako SEC7), fungující jako katalytická podjednotka GEF výměnného faktoru pro ARF-GTPázu (Anders, Nielsen et al. 2008). Třetím a posledním kandidátním genem je *AHL18* (At3g60870), náležící do genové rodiny *AHL*. Tento gen ještě nebyl funkčně charakterizován.

### 7.1.Cíle

- 1. Porovnáním expresního vzorce linie MGT180 a kandidátních genů, pomocí transkripční fúze jejich promotorů s GUS, určit, ke kterému z kandidátních genů se vztahuje expresní vzorec linie MGT180.
- 2. Analýzou dostupných inserčních mutantů se pokusit zjistit, ovlivňuje-li aktivita dotčeného genu tvorbu postranních kořenů a výsledné uspořádání kořenové architektury.
- 3. Pomocí translační fúze s fluorescenčním proteinem se pokusit lokalizovat zasažený protein v buňce a potvrdit jeho přítomnost v pericyklu.

## 8. Přehled literatury

### 8.1. Proteiny s AT-hook doménou

AT-hook je malá, DNA-vazebná doména řady proteinů. Termín AT-hook byl poprvé použit na genové rodině nehistonových, chromozomálních savčích proteinů [High mobility group protein I/Y; HMG-I(Y)], jež jsou exprimovány zejména v nediferenciovaných či aktivně se dělících buňkách, obsahují po třech AT-hook doménách a ovlivňují architekturu chromatinu (Reeves and Nissen 1990). Mohou také fungovat jako kofaktory jiných DNA vazebných proteinů tím, že na DNA vytváří ohyby, díky nimž se jiné proteiny snáze na DNA naváží (Falvo, Thanos et al. 1995). Tyto proteiny jsou dosti konzervované – mezi myším a lidským proteinem je rozdíl pouze v záměně 3 a inserci 11 aminokyselin (Johnson, Lehn et al. 1988). AT-hook doména umožňuje proteinu vázat se do malého žlábků dvouvláknové DNA, bohaté na A a T (u HMGI(Y) je pro vazbu vyžadováno 6 a více A-T párů), a fungovat tak jako regulátor genové exprese. Pro vazbu proteinu na DNA je klíčová konzervovaná sekvence aminokyselin, jež dává AT-hook doméně takovou sekundární strukturu, která umožní její interakci s DNA. Jádrem konzervované aminokyselinové sekvence a vlastní DNA-vazebnou oblastí je aminokyselinová sekvence GRP (glycin – arginin – prolin). Na základě podobnosti sekvencí, obklopujících vlastní DNA-vazebnou doménu, byly rozlišeny 3 typy AT-hook domén u HMG-I(Y) proteinů, lišící se afinitou k DNA (Aravind and Landsman 1998).

Naproti tomu rostlinně specifické proteiny s AT-hook doménou (AT-hook motif containing nuclear localized, AHL), sesterské k savcím HMGI(Y) (Gupta, Webster et al. 1998), byly, díky své vysoké konzervovanosti, identifikovány u všech dosud osekvenovaných suchozemských rostlin, počínaje mechem *Physcomitrella patens* (Nieto-Sotelo, Ichida et al. 1994, Grasser 1995, Aravind and Landsman 1998, Fujimoto, Matsunaga et al. 2004, Zhao, Favero et al. 2014). Evolučně AHL genová rodina, dělí se na dvě skupiny, vznikla v linii semenných rostlin, ještě před oddělením mechu *Physcomitrella* od této vývojové větve. AHL geny vždy obsahují 1 či 2 AT-hook domény(y), zprostředkující vazbu na DNA. Rostlinné AT-hook domény se rozdělují na dva typy, podle sekvencí aminokyselin obklopujících konzervované DNA-vazebné místo (Zhao, Favero et al. 2013). Kromě AT-hook domén(y) obsahují tyto proteiny také PPC (Plants and procaryote conserved) doménu, označovanou též jako DUF296 (Domain of unknown function) na C konci proteinu. Tato doména obsahuje hydrofobní část, zodpovědnou za jadernou lokalizaci proteinu. PPC doména se nachází jako samostatný protein s neznámou funkcí u prokaryot, u živočichů a hub však tato doména přítomna vůbec není (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004). U osekvenovaného fotosyntetizujícího fytoplanktonu *Micromonas pusilla* a *Ostreococcus lucimarinus* ještě PPC doména existuje jako samostatný protein, což ukazuje, že AHL geny, vzniklé fúzí PPC a AT-hook domény, se v evoluci objevily s přechodem rostlin na souš.

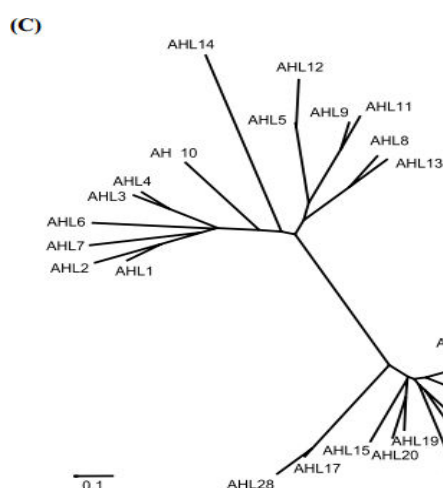
Samostatnou PPC doménu můžeme nalézt ještě u starších zástupců *Viridiplantae* (Zhao, Favero et al. 2014). Na základě krystalických struktur prokaryotických PPC proteinů bylo zjištěno, že zaujímají jednotnou terciární strukturu a tvoří trimery (Lin, Nakano et al. 2007). AHL proteiny spolu v jádře interagují právě díky této PPC doméně, obsahující konzervovanou sekvenci šesti aminokyselin. Díky ní jsou schopny interagovat nejen s ostatními AHL proteiny, ale i s jinými jadernými proteiny (Zhao, Favero et al. 2013). Vysoká konzervovanost umožňuje funkčnost i v jiných, blízcích druzích rostlin (Kim, Kim et al. 2007). Poměrně recentně byla provedena sekvenční analýza AT-hook genů, na jejímž základě byly tyto geny rozděleny na tři typy, spadající do dvou monofyletických větví. Rozdělení proběhlo na základě počtu a typu AT-hook domén a na typu konzervované PPC domény. První větev, A, je exprimována zejména ve vodivých pletivech a v kořeni, větev B je exprimována zejména během vývoje generativních orgánů (Zhao, Favero et al. 2014).

Jak už bylo řečeno, *AHL* geny byly identifikovány u všech dosud osekvenovaných vyšších rostlin. Například u rýže (*Oryza sativa*) aminokyselinová sekvence N-terminální oblasti proteinu vykazuje podobnost se sekvencí histonu H1, což ukazuje na její schopnost vázat se na DNA (Meijer, van Dijk et al. 1996). Morfologické změny byly pozorovány v květenství rýže u rostliny, mutantní v jednom *AHL* genu (Jin, Luo et al. 2011). Jiný rýžový AHL protein interaguje s promotorem fytochromu A u ovsa (*Avena sativa*), a bylo prokázáno, že u tohoto proteinu jsou pro interakci s DNA klíčové AT-hook domény proteinu (Nieto-Sotelo, Ichida et al. 1994). Dnes u rýže známe 20 AHL proteinů (Kim, Park et al. 2011).

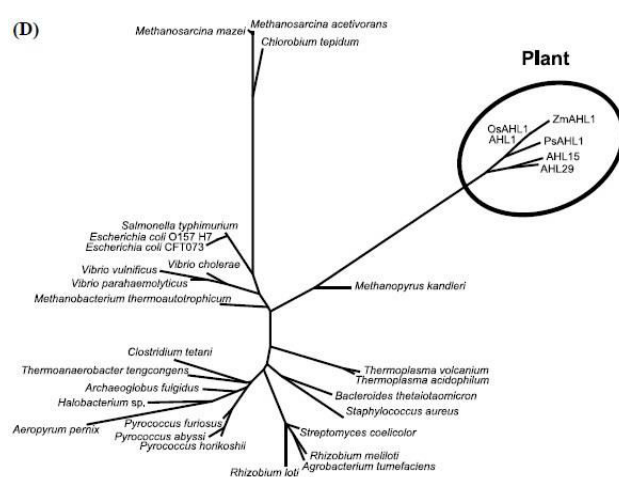
Co se týče dalších rostlin, u kukuřice, jakožto dalšího zástupce jednoděložných rostlin, byl identifikován regulační faktor, ovlivňující vývoj axilárních meristémů vedoucích k tvorbě samičích reprodukčních orgánů, který obsahuje AT-hook doménu, a je schopen tvořit homodimery i heterodimery s jinými zástupci AT-hook proteinů (Gallavotti, Malcomber et al. 2011). U rostliny chilli papriky (*Capsicum annuum*) exprese jednoho *AHL* genu vzrostla vždy po kontaktu s patogenem, výrazněji však po kontaktu s takovým patogenem, který není schopen rostlinu infikovat. Stejně tak exprese tohoto genu stoupla po ošetření kyselinou salicylovou a etylénem. Transgenní rostliny rajčete, s nadexpresí tohoto paprikového *AHL* genu, vykazovaly vyšší rezistenci vůči bakteriálním i houbovým patogenům, což svědčí o zapojení tohoto genu v obraně proti patogenům (Kim, Kim et al. 2007). U bavlníku (*Gossypium* spp.) se jeden AHL protein váže na promotor genu, jehož exprese je nezbytná pro tvorbu trichomu, a vazbou působí jeho represi. Tento AHL protein byl proto exprimován přednostně v pletivech bez trichomů (Delaney, Orford et al. 2007).

### 8.1.1. AT-hook proteiny u *Arabidopsis thaliana*

Podrobněji se následující text bude věnovat AHL proteinům u modelové dvouděložné rostliny *Arabidopsis thaliana*, kde je o těchto proteinech známo trochu více, a na které byla vykonána experimentální část této diplomové práce. U *Arabidopsis* se v genové rodině AHL nachází 29 paralogů, fylogeneticky rozdělených do dvou tříd (Obrázek 1) podle přítomnosti intronů a počtu AT-hook domén (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004). S přibývajícimi znalostmi se však ukazuje, že jejich rozdělení (Zhao, Favero et al. 2013). O konzervovanosti těchto proteinů svědčí i fakt, že nadexprese jednoho AHL proteinu ze sóji (*Glycine max*) u transgenního huseníčku (*Arabidopsis thaliana*) vede ke stejnému fenotypu, jako nadexprese huseníčkového stejného proteinu (Zhao, Favero et al. 2014). Fylogenetický strom PPC u prokaryot a rostlin (kde je součástí AHL genů) je znázorněn na Obrázku 2 (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004).



Obrázek 1: Fylogenetický strom AHL genů (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004)



Obrázek 2: Fylogenetický strom PPC (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004)

### 8.1.2. Konkrétní zástupci AHL proteinů u *Arabidopsis thaliana*

Protein AHL1, popsáný u *Arabidopsis*, se váže na MAR (Matrix-attachment region) (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004). MARS jsou specifické úseky jaderné DNA, bohaté na adenin a tymin, které se váží na jadernou matrix a tím napomáhají organizaci chromatinu. K této vazbě dochází konstitutivně, nezávisle na transkripční aktivaci či deaktivaci dané oblasti jaderné DNA (Cockerill and Garrard 1986). AHL1 protein se váže na MAR díky AT-hook doméně. Během interfáze se protein nachází roztroušeně v nukleoplasmě, během mitózy je však lokalizován na povrchu chromozomů (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004).

Dva z těchto proteinů, *AHL3* a *AHL4*, byly popsány jako regulátory vývoje vodivých pletiv v kořeni *Arabidopsis*. U rostlin s jednoduchou mutací v genu *AHL4*, *ahl4*, byly

v maturační zóně kořene pozorovány přídavné vrstvy protoxylému a metaxylému. U této mutantní linie bylo prokázáno, že markerový gen s expresí specifickou pro xylémové prekurzory, byl exprimován nejen v buňkách, které by se u kontrolních rostlin staly cévními elementy, ale i v přilehlých buňkách prokambia. V těchto buňkách, které se u mutanta staly přídavnými cévními elementy, nebyl exprimován markerový gen, specifický pro buňky prokambia. Experimentálně bylo ověřeno, že promotor genu *AHL4* je specifický pro buňky prokambia. Bylo také prokázáno, že protein působí buněčně neautonomně, a po translaci expanduje do jiných pletiv, konkrétně do endodermis v meristematické zóně kořene a do xylémových prekurzorů. Stejný fenotyp přídavného pásu xylému, jako u *ahl4*, byl pozorován i u jednoduchého mutanta *ahl3*. Tyto geny jsou si fylogeneticky velmi příbuzné. Dvojitý mutant *ahl3ahl4* nevykazoval fenotyp přídavných xylémových elementů. Protein AHL3 je v meristematické oblasti přítomen v buňkách prokambia i xylémových prekurzorů, avšak jeho exprese probíhá v endodermis v prodlužovací a maturační zóně kořene, z čehož je patrné, že se protein kořenem pohybuje. Bylo prokázáno, že se protein pohybuje, pouze pokud jsou v rostlině exprimovány oba proteiny, AHL3 i AHL4. Tyto dva proteiny spolu *in vivo* interagují a fungují jako heterokomplex, nezbytný pro správné vytvoření hranice mezi prokambiem a xylémem (Zhou, Wang et al. 2013).

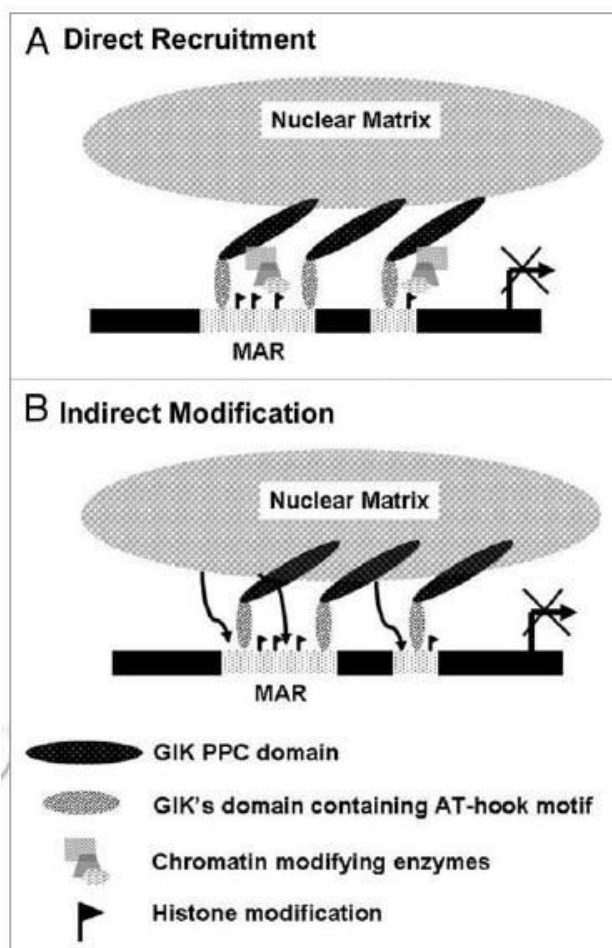
Protein AHL18 je velmi blízce příbuzný s proteinem AHL22, a v této práci má klíčovou roli. Rostliny se zvýšenou expresí genu *AHL18* měly stejný fenotyp, jako ty se zvýšenou expresí *AHL22*, kvetly později a měly zkrácený hypokotyl, jak je uvedeno níže (Xiao, Chen et al. 2009). Nikdo se však zatím genem *AHL18* výrazněji nezabýval.

Protein AHL19 byl identifikován pomocí mutantní rostliny v rámci studie rezistence *Arabidopsis thaliana* k houbovému patogenu *Verticillium*, v níž měl tento mutant zvýšenou expresi genu *AHL19* díky náhodnému vložení aktivační sekvence do genomu. Tento mutant se vyznačoval i pozměněným fenotypem v podobě zvětšené listové plochy a opožděným kvetením a senescencí v porovnání s kontrolou. *Verticillium* do rostliny vniká kořeny, kde kolonizuje xylémové elementy, ale analýza kořenové architektury neprokázala žádné signifikantní anatomické změny u mutanta, čímž byla vyvrácena možnost, že zvýšená rezistence vůči patogenu je způsobena mechanickou zábranou vstupu houby do rostliny. Poměrně překvapivé bylo zjištění, že u kontrolních rostlin *Arabidopsis thaliana* byla exprese genu *AHL19* nízká, přesto však v kořenech vyšší než v nadzemní části. U mutanta však exprese vzrostla v kořenech jen mírně, v nadzemní části míra exprese vzrostla silně. Pět minut po inokulaci patogenem vzrostla exprese genu *AHL19* u mutanta na desetinásobek, po 14 dnech se úroveň exprese vrátila na bazální úroveň, což svědčí o zapojení tohoto proteinu v počátečních fázích infekce. Ještě zajímavější je ovšem fakt, že při zvýšené expresi genu *AHL19* nedochází u infikovaných rostlin ke zvýšení exprese markerového genu kyseliny salicylové, tudíž jako by



nedocházelo ke kolonizaci patogenem. Podobně tomu bylo i u markeru kyseliny jasmonové, kde však bazální hladina exprese markerů u neinfikovaných rostlin byla vyšší než u kontroly. Z toho vyplývá, že rostlina se zvýšenou hladinou tohoto AT-hook proteinu v případě inokulace má xylém kolonizovaný houbovým patogenem, který se tak dostává do nadzemní části rostliny, kde je exprese genu *AHL19* vyšší. Inzerční mutant *ahl19* vykazoval vyšší citlivost k inokulaci houbou *Verticilium*, což svědčí o jeho zapojení v rezistenci. Jak konkrétně ovšem související mechanismus rezistence funguje, je zatím otázkou (Yadeta, Hanemian et al. 2011).

Protein AHL20 je rovněž spojován s rostlinnou imunitou. Exprese proteinu glycerolkinázy, kódované u *Arabidopsis* genem *NHO1*, je spjata s imunitní odpovědí rostliny na bakteriální patogeny (Lu, Tang et al. 2001). Právě protein AHL20 je negativním regulátorem exprese genu *NHO1*, tudíž negativním regulátorem rostlinné imunitní reakce na bakteriální patogeny. Tento efekt byl pozorován u rostlin se zvýšenou expresí genu *AHL20* (Weigel, Ahn et al. 2000, Lu, Zou et al. 2010).



Obrázek 3: Dva modely negativní regulace genové exprese pomocí proteinu AHL21. A) PPC doména proteinu AHL21 interaguje s chromatin-modifikujícími enzymy. B) Protein AHL21 zprostředkuje pevnou vazbu mezi MAR DNA a jadernou matrix, která znemožní transkripci cílového genu (Ng and Ito 2010).

Transkripční faktor AGAMOUS je jeden z hlavních regulátorů vývoje květů u *Arabidopsis* (Bowman, Smyth et al. 1989). Jeden z jeho cílových genů je i *AHL21*, označovaný též jako *GIANT KILLER* (*GIK*), jehož zvýšená exprese vede ke snížení exprese dalších genů, regulujících vývoj květu (Ng, Yu et al. 2009), což ve výsledku vede k defektům v květu. *AHL21* transkript byl detekován v kořenech, květech i listech. U rostlin se zvýšenou expresí tohoto genu byla prokázána snížená fertilita, spojená s vývojovými defekty generativních orgánů. Hladina exprese *AHL21*, snížená pomocí RNAi, vedla, u poměrně malé části rostlin, také k vývojovým defektům v květu. Protein *GIANT KILLER* totiž, mimo jiné, negativně ovlivňuje expresi DNA-vazebného faktoru, zprostředkovávajícího odpověď na auxin, *ETTIN* (Pekker, Alvarez et al.

2005, Ng, Yu et al. 2009). AHL21 je transkripčním represorem AUXIN RESPONSE FACTOR3, jehož exprese je důležitá při vývoji květu. Byly vytvořeny dva modely, jak AHL21 negativně reguluje expresi jiných genů. První předpokládá účast chromatin – modifikujících proteinů a vede k dimethylaci histonu H3K9, a tím k umlčení transkripce příslušných genů. Druhý model uvažuje pevné navázání cílové sekvence DNA na jadernou matrix, vedoucí opět k umlčení exprese, jak ukazuje Obrázek 3 (Ng and Ito 2010).

S načasováním květu je spojen protein AHL22, jeho zvýšená exprese totiž u huseničku působí snížení transkripce genu *FLOWERING LOCUS T*. Naopak fenotyp velmi časného kvetení byl pozorován u rostliny, umlčující hned čtyři *AHL* geny – *AHL22*, *AHL18*, *AHL27* a *AHL29*, protože mutant *ahl22* nevykazoval fenotyp odlišný od kontroly (Yun, Kim et al. 2012). Protein AHL22 totiž interaguje s několika histonovými deacetylázami a methyltransferázami, čímž redukuje acetylaci histonu H3 a zvyšuje i jeho methylyaci (H3K9me2) v intragenové, AT bohaté oblasti *FLOWERING LOCUS T*. Mutant se zvýšenou expresí tohoto genu vykazoval, krom pozdního kvetení, i malé a pokroucené listy v přízemní růžici (Yun, Kim et al. 2012). Konstitutivně zvýšená exprese, zajištěná zařazením *AHL22* genu za promotor viru tabákové mozaiky 35S, měla za následek rostliny, které vykvetly až po 150 dnech a byly sterilní, jak ukazuje Obrázek 4. Lodyhy těchto rostlin byly velmi silně větvené, rostliny byly senzitivní k fotoperiodě. Semenačky rostlin se zvýšenou expresí *AHL22* měly kratší hypokotylu, otevřené dělohy a měly otevřený apikální háček, a tento fenotyp vykazovaly dokonce i při skotomorfogenním vývoji (Xiao, Chen et al. 2009).



Obrázek 4: Silně větvená rostlina *Arabidopsis thaliana* s vysokou expresí *AHL22*, která vykvetla až po 150 dnech (Xiao, Chen et al. 2009).

*AHL25* byl popsán jako regulátor biosyntézy giberelinů, který se uplatňuje ve zpětnovazebné smyčce jejich syntézy jako transkripční aktivátor (Matsushita, Furumoto et al. 2007). Rostliny se zvýšenou expresí *AHL25* měly v dospělosti větší plochu orgánů, listů a květů, podobně jako je tomu u rostlin se zvýšenou expresí blízkých genů *AHL27* a *AHL29* (Jiang, Heard et al. 2004).

Zvýšená exprese genu *AHL29* (*SUPPRESSOR OF PhyB*, *SOB3*) u *Arabidopsis* vedla k fenotypu zkráceného hypokotylu a pomalejšího vývoje listové růžice, listy i květy však po čtyřech týdnech růstu byly větší než u kontroly. Toto bylo způsobeno zpomaleným, ale déletrvajícím růstem buněk, nikoliv jejich zvýšenou proliferací. *AHL29* nereguluje růst rostliny přímo, ale ovlivňuje růstové reakce rostliny na světlo. Při dlouhém dni rostliny s vyšší expresí *AHL29* vykvetly přibližně o týden dříve než

rostliny původního genotypu, a díky pomalejšímu růstu měly opožděnou senescenci (Street, Shah et al. 2008).

Dvojitý mutant v genu *AHL27* a *AHL29*, *ahl27ahl29*, za standardních podmínek nevykazoval pozměněný fenotyp proti kontrole, při sníženém osvětlení však semenáčky vykazovaly fenotyp prodlouženého hypokotylu. Co se týče načasování květu, tento dvojitý mutant nevykazoval rozdílný fenotyp v porovnání s kontrolou. Tyto dva geny jsou blízce příbuzné a v negativní regulaci růstu hypokotylu na světle jsou redundantní (Street, Shah et al. 2008).

Velká část *AHL* genů u *Arabidopsis thaliana* byla popsána u rostlin se zvýšenou expresí daného genu, nebo u násobných mutantů, protože jednoduchý mutant nevykazoval změnu ve fenotypu, což svědčí o jejich redundanci. Rostlinně specifické AHL proteiny jsou tedy zapojeny v široké škále procesů jejich růstu a vývoje, kde fungují jako transkripční faktory, vážící se na A-T bohaté oblasti DNA. Převážná většina experimentů byla prováděna na modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Některé z AHL proteinů ještě nebyly funkčně charakterizovány, nebo jsou informace o jejich fungování neúplné. Každopádně tato skupina proteinů poskytuje značné možnosti jejich dalšího studia.

## 8.2. Postranní kořeny

Kořenový systém rostlin, jak ho známe, je velmi dynamická struktura. Kořeny, jakožto větvičí se struktury, odlišné od prýtu, se prvně objevily ve svrchním devonu, asi 400 milionů let zpět. Až v době před 375 miliony lety ale pronikly do substrátu, a tím umožnily přísun vody a minerálních látek (Raven and Edwards 2001). I dnes je hlavním úkolem kořenového systému příjem vody a dalších látek, potřebných pro rostlinu (Malamy and Benfey 1997). Postranní kořeny a kořenové vlásky zvětšují absorpční plochu kořenového systému. Některé rostlinné druhy, v rámci maximalizace absorpční plochy, dovedou tvořit nahloučené postranní kořeny (Shane and Lambers 2005). Porozumění vzniku, vývoje a regulace této dynamické struktury rostlinného těla může být aplikováno v zemědělství, při snaze o zvyšování výnosů úrody.

Vznik postranních orgánů stonku vychází ze stonkového apikálního meristému. Naproti tomu, postranní kořeny vznikají z pletiv mimo kořenový apikální meristéum. Tato pletiva však, pochopitelně, mají původ v apikálním meristéumu kořene. U většiny dvouděložných, včetně *Arabidopsis thaliana*, vznikají kořeny endogenně, z buněk pericyklu, přiléhajícím k protoxylémové části cévních svazků (McCully 1975). U jiných rostlin existují i jiné možnosti vzniku bočních kořenů (McCully 1975, Dubrovsky, Doerner et al. 2000), tento text se však bude věnovat zejména modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*.

Buňky pericyklu, přiléhající ke xylémovému pólu cévního svazku jsou, u *Arabidopsis*, dvakrát delší a téměř dvakrát širší v porovnání s buňkami pericyklu, přiléhajících k floémovým pólům (Laskowski, Williams et al. 1995). Liší se i strukturní charakteristiky buněk pericyklu u protoxylémových a protofloémových pólů. Buňky pericyklu u protoxylému, kompetentní ke vzniku postranních kořenů, obsahují více vakuol, více elektrodenzních ribozomů a větší jádro. Naproti tomu buňky pericyklu u floému obsahují jednu centrální vakuolu a méně ribozomů, mají tudíž charakter plně diferenciované buňky. Zde je patrné, že ne jen buněčný typ, ale i poziční informace má veliký vliv na chování a kompetence dané buňky (Parizot, Laplaze et al. 2008).

### 8.2.1. Lokalizace postranních kořenů

Vzhledem ke struktuře diarchního radiálního cévního svazku v kořeni *Arabidopsis* vznikají postranní kořeny proti sobě, při pěstování rostlin na agarových plotnách pak můžeme jejich orientaci říkat vpravo-vlevo (Laskowski, Grieneisen et al. 2008). Primární kořen se přirozeně vlní a stáčí, čímž zajišťuje rovnoměrné prostorové uspořádání postranních kořenů (De Smet, Tetsumura et al. 2007). Auxinové maximum v kompetentní oblasti je instruktivní a dostatečné pro iniciaci vzniku postranního kořene (Dubrovsky, Rost et al. 2001). Vznik takového maxima je prostorově regulované a souvisí s tvarem mateřského kořene, vzniká zpravidla na vnější straně jeho ohybu (Fortin, Pierce et al. 1989). Toto bylo prokázáno i cíleným ohýbáním primárního kořene.

V diferenciační zóně je nejvyšší hladina auxinu v diferenciovaných vodivých pletivech na vnější straně ohybu, neboť je zde nižší exprese *PIN* přenašečů (Laskowski, Grieneisen et al. 2008). Pro tuto determinaci místa vzniku je využít nejen auxin, transportovaný z nadzemní části rostliny, nýbrž i auxin, syntetizovaný v meristematické oblasti kořene (Ljung, Hull et al. 2005).

### 8.2.2. Vývoj postranních kořenů

Pro iniciaci vzniku primordia postranního kořene je třeba aktivovat buňky pericyklu, kompetentní k jeho tvorbě. Výběr konkrétních zakladatelských buněk, které dají vzniknout primordiu, zajišťuje auxin, jak bude vysvětleno později. Sérií antiklinálních a periklinálních dělení pak vzniká primordium postranního kořene, které prorůstá pletivou kořene mateřského. Dojde k vytvoření apikálního meristému postranního kořene, který pak, jako plnohodnotný kořen, může dát vznik postranním kořenům vyšších řádů. Iniciály meristému postranního kořene tedy, na rozdíl od iniciál meristému primárního kořene, vznikají postembryonálně. Sled událostí, vedoucích ke vzniku postranního kořene, byl autory Malamy a Benfey rozdělen na 8 stádií. Toto dělení se používá dodnes (Malamy and Benfey 1997).

Stádium I je první detekovatelná fáze vývoje primordia. Dochází k asymetrickému, antiklinálnímu dělení buněk pericyklu, přiléhajících k protoxylémové části cévního svazku. Organogeneze postranního kořene u *Arabidopsis* může vycházet z jedné nebo ze dvou longitudinálních řad buněk pericyklu (Dubrovsky, Rost et al. 2001). K iniciaci tvorby primordia postranního kořene dochází ve vzdálenosti 3 – 8 mm od špičky primárního kořene. Tímto asymetrickým dělením zakladatelských buněk pericyklu vznikají nápadně kratší buňky, které budou dále tvořit primordium (Malamy and Benfey 1997, Dubrovsky, Doerner et al. 2000) a delší buňky se schopností antiklinálního dělení (Benková and Bielach 2010). Asymetrickému rozdělení buněk předchází migrace jader zakladatelských buněk, která je řízena auxinem (Goh, Joi et al. 2012). Minimální počet buněk pericyklu, nezbytný pro iniciaci tvorby primordia, jsou tři (Dubrovsky, Rost et al. 2001). Nelze předem říci, které z buněk pericyklu, přiléhající k protoxylému, dají vznik primordiu postranního kořene (Laskowski, Williams et al. 1995). Produktem prvního vývojového stádia je 8 až 10 kratších buněk (Malamy and Benfey 1997).

Typickým znakem II. stádia je periklinální dělení, které rozděluje primordium do dvou vrstev – vnější a vnitřní. Periklinálně se však dělí jen buňky zakladatelské, buňky na periferii vznikajícího primordia toto periklinální dělení nepodstupují. Primordium začíná dostávat vypouklý tvar (Malamy and Benfey 1997). Tyto počáteční fáze vývoje primordia postranního kořene jsou zcela závislé na přísunu růstových regulátorů z mateřského kořene. Pokud je primordium v I. či II. stádiu, spolu se segmentem mateřského kořene, přesunuto na médium bez přidaných fytohormonů, primordium

nepokračuje ve vývoji. Ve vývoji v těchto podmínkách pokračovala pouze primordia, tvořená nejméně třemi vrstvami buněk, která již získávají v tomto směru větší autonomii (Laskowski, Williams et al. 1995).

Ve III. stádiu vývoje primordia postranního kořene pokračuje vnější vrstva buněk primordia v periklinálním dělení, primordium má tedy již tři vrstvy a jeho vypouklý tvar je již jasně zřetelný. Buňky na periférii primordia tvoří nyní jedno- až dvouvrstevnou strukturu (Malamy and Benfey 1997).

IV. stádium je charakterizováno periklinálním dělením vnitřní vrstvy buněk primordia. Čtyřvrstevné primordium má tedy 2 vnější a 2 vnitřní vrstvy. Primordium proráží endodermis (Malamy and Benfey 1997).

Během V. stádia se antiklinálně dělí centrální buňky obou vnějších vrstev primordia. Buňky vnitřní vrstvy se zvětšují a dělí, čímž vyvíjí na vnější vrstvy buněk primordia tlak, díky němuž primordium prostupuje primární kůrou mateřského kořene (Malamy and Benfey 1997).

VI. stádium zahrnuje několik událostí. Periklinálně se dělí vnější vrstva primordia, primordium prostupuje primární kůrou k rhizodermis. Buňky vnitřní vrstvy primordia se prodlužují, aby daly základ vodivým pletivům. V radiálním uspořádání v tomto vývojovém stádiu je již pozorovatelný základ stéle, obklopený vrstvami endodermis, primární kůry a rhizodermis. Je patrná vznikající kořenová čepička (Malamy and Benfey 1997).

V VII. stádiu buňky primordia pokračují v antiklinálních děleních. Primordium je připraveno vynořit se z mateřského kořene. Vynoření v VIII. stádiu je umožněno primárně objemovým růstem buněk. K dělení buněk dochází zejména v apikální části primordia (Malamy and Benfey 1997). V okamžiku vynoření má postranní kořen 8 – 10 vrstev buněk (Laskowski, Williams et al. 1995).

Další dělení buněk je vázáno na apikální část primordia, kde dochází ke vzniku iniciál, a tudíž meristému postranního kořene. Od tohoto okamžiku se již nemluví o primordiu, nýbrž o postranním kořeni (Malamy and Benfey 1997). Marta Laskowski však prokázala, že již primordium, skládající se z alespoň ze tří vrstev buněk, je schopné pokračovat ve vývoji i bez vnější stimulace fytohormony, a v tomto případě mluví o formování autonomního meristému již v dřívějším stádiu vývoje (Laskowski, Williams et al. 1995).

### **8.2.3. Regulace vývoje postranních kořenů**

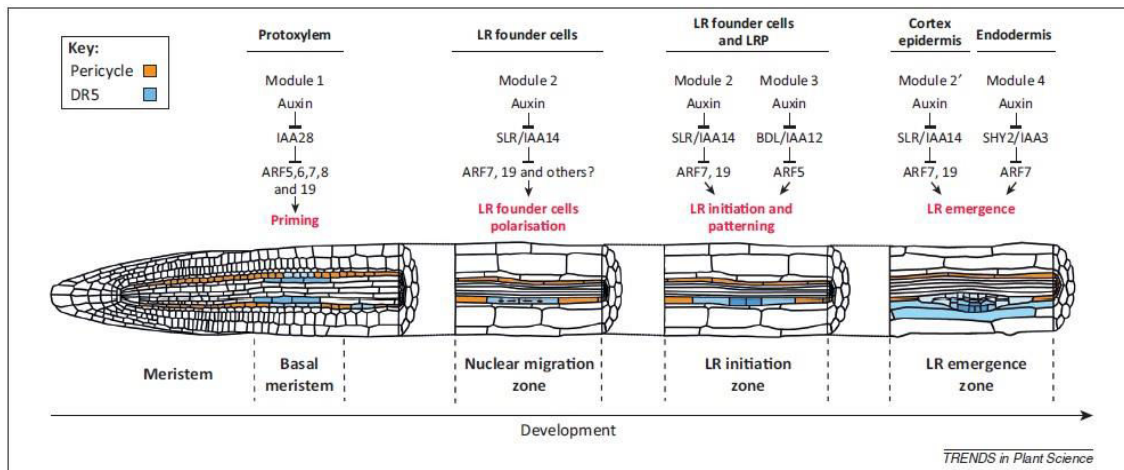
Kořenový systém je velmi dynamickou strukturou, jejíž uspořádání je ovlivňováno geneticky i environmentálně. Veškeré reakce rostliny musí být regulovány, aby byl

poměr cena/užitek pro rostlinu udržitelný. Regulačních mechanismů, ovlivňujících kořenovou architekturu, je celá řada. Tento text se bude věnovat fytohormonální regulaci vývoje postranních kořenů, která má k experimentální části práce nejbližší.

### **Auxin**

Auxin, jehož primární zdroj se v rostlině nalézá ve vyvíjejících se listových primordiích stonkového apikálního meristému, hraje klíčovou roli v mnoha procesech, mimo jiné i při zakládání postranních kořenů (Benková, Michniewicz et al. 2003). Auxin je z místa syntézy transportován akropetálně středním válcem do kořenů, kde je jeho tok v bazálním meristému kořene otočen (Blilou, Xu et al. 2005). Pro příjem auxinu do buněk slouží proteinové rodiny AUX a LAX, pro výdej auxinu z buněk rodina proteinů PIN. V buňkách kořenové čepičky jsou membránové proteiny AUX1 rozmístěny poměrně homogenně a zprostředkovávají otáčení auxinového transportu z akropetálního na bazipetální. Naproti tomu PIN proteiny, vyznačující se polární buněčnou lokalizací, určují směr bazipetálního transportu. Právě modifikací bazipetálního transportu auxinu pomocí proteinů PIN2 a AUX1 reguluje *Arabidopsis* gravitropickou reakci (Marchant, Kargul et al. 1999, Swarup, Friml et al. 2001).

Mechanismus odpovědi buňky na auxin je založen na degradaci transkripčních represorů, čímž dojde ke změně genové exprese (Zenser, Ellsmore et al. 2001). Tato signální dráha zahrnuje několik komponent. První komponentou je auxinový receptor TIR1, který je součástí komplexu ubiquitinové ligázy SCF. Dále jsou zde zapojeny transkripční faktory, zprostředkovávající odpověď na auxin (ARF), a jejich transkripční represory (AUX/IAA) (Kepinski and Leyser 2005). Při nízké hladině auxinu v buňce proteiny AUX/IAA brání transkripci ARF proteinů. ARF proteiny jsou transkripčními faktory pro cílové geny, zapojené v odpovědi na auxin. Pokud hladina auxinu v buňce vzroste, auxin zprostředkuje navázání AUX/IAA proteinů na ubiquitinovou ligázu. Tím spustí jejich degradaci a uvolní z represe transkripci příslušných ARF genů, čímž dojde k aktivaci exprese určitých cílových genů odpovědi na auxin. U *Arabidopsis* je známa celá řada proteinů AUX/IAA a ARF. Ty, které jsou významné při utváření postranních kořenů, jsou ukázány na Obrázku 5 (Lavenus, Goh et al. 2013). Nejvíce je známo o vlivu SOLITARY-ROOT/IAA14, jehož mutace zcela blokuje transkripci jemu specifických ARF proteinů a tím i iniciaci postranních kořenů (Fukaki 2001). Mezi cílové geny ARF transkripčních faktorů patří i LATERAL ORGAN BOUNDARIES-DOMAIN/ASYMMETRIC LEAVES (LBD/ASL), zapojené v regulaci prvního, asymetrického buněčného dělení zakladatelských buněk (Goh, Joi et al. 2012).



Obrázek 5 shrnuje zapojení různých modulů odpovědi na auxin během komplexního procesu vzniku postranního kořene (Lavenus, Goh et al. 2013).

Pro iniciaci vývoje primordia postranního kořene, ale i pro jeho další vývoj, je auxin klíčovým regulačním faktorem. V bazálním meristému dochází k endogenní oscilaci hladiny auxinu, která koreluje s určením místa vzniku postranního kořene (Moreno-Risueno, Van Norman et al. 2010). Vznik auxinového maxima na vnější straně ohybu kořene mateřského je způsoben zvětšením (zejména protažením) buněk na vnější straně ohybu, však při zachování počtu PIN přenašečů na buňku a zvýšením počtu AUX1 přenašečů (Laskowski, Grieneisen et al. 2008). K iniciaci vzniku primordia postranního kořene dochází v diferenciací zóně, kde jsou již buňky elongovány (Dubrovsky, Rost et al. 2001), diferenciací zóna primárního kořene se liší parametry auxinového toku od zóny elongační i meristematické. V meristematické zóně dochází k otáčení auxinového toku, od vodivých pletiv k vnějším pletivům kořene. Část auxinu se recyklací vrací k vodivým pletivům, čímž je zajištěno auxinové maximum v klidovém centru. Elongační zóna se vyznačuje silnou expresí *PIN* přenašečů, což vede k transportu auxinu do vodivých pletiv a tudíž ke snížení jeho hladiny v epidermis a primární kůře. Na přechodu elongační a diferenciací zóny dochází ke snižování exprese *PIN* proteinů. Auxin v diferenciací zóně cykluje mezi vnějšími pletivy a pletivy vodivými (Laskowski, Grieneisen et al. 2008).

Mezi auxinovým maximem v protoxylému v bazálním meristému a iniciací vzniku postranního kořene bývá konstantní časový úsek, i vzdálenosti mezi jednotlivými postranními kořeny je relativně konstantní (De Smet, Tetsumura et al. 2007). Auxinové maximum je instruktivní pro osud kompetentních buněk pericyklu a indukuje první asymetrické dělení (Dubrovsky, Sauer et al. 2008), ke vzniku maxima dochází díky rozdílné expresi *PIN* přenašečů v diferenciací zóně mateřského kořene (Laskowski, Grieneisen et al. 2008). Pro iniciaci vzniku primordia je klíčový bazipetální auxinový tok. Při inhibici polárního auxinového transportu, pomocí N-1-naftylftalamové kyseliny, dochází k výraznému snížení počtu vznikajících postranních kořenů, neboť k akumulaci



auxinu dochází pouze v apikální zóně kořene (Casimiro, Marchant et al. 2001). Buňky pericyklu, kompetentní k iniciaci postranních kořenů setrvávají v G2 fázi buněčného cyklu, v níž jsou drženy inhibitory cyklin-dependentních kináz, konkrétně KIP-RELATED PROTEIN2 (KRP2). Tento protein zajišťuje jadernou lokalizaci příslušné cyklin-dependentní kinázy CYCD2;1 (Sanz, Dewitte et al. 2011). Transkripce proteinu KRP2 je v buňkách pericyklu, nekompetentních k tvorbě postranních kořenů, vysoká a zabraňuje zde aktivaci buněčného cyklu (Himanen, Boucheron et al. 2002). V kompetentních buňkách pericyklu je exprese KRP2 snižována auxinem. (Himanen, Boucheron et al. 2002).

Expese AUX1, auxinového přenašeče, zajišťujícího vstup auxinu do buněk, je vázána na všechny buňky, zapojené v tvorbě primordia postranního kořene. V mladém kořeni je pak expese AUX1 detekovatelná ve špičce a na bázi postranního kořene, a také slabě v jeho vodivých pletivech, kde auxin zprostředkovává napojení na vodivá pletiva kořene mateřského (Marchant, Bhalerao et al. 2002).

Akropetální transport auxinu, směřující z nadzemní části rostliny do kořene, je klíčový pro koordinované pronikání postranního kořene kořenem mateřským (Reed, Brady et al. 1998, Casimiro, Marchant et al. 2001). Při odstranění nadzemní části semenáčku *Arabidopsis*, tudíž i listových primordií jakožto zdroje auxinu pro akropetální transport, dochází k inhibici pronikání postranních kořenů, jejich iniciace ale není narušena (Bhalerao, Eklöf et al. 2002). Pronikání také napomáhá aktivita LAX3, auxinového importérového přenašeče, který přenáší auxin z primordia do buněk nadložních vrstev mateřského kořene. Expese LAX3 je indukována auxin-responzivními transkripčními faktory ARF, tudíž je stimulována v buňkách, překrývajících pronikající primordium. Auxin zde, přes degradaci represorových proteinů, spouští tvorbu enzymů pro remodelaci buněčné stěny, čímž usnadňuje separaci buněk nadložních vrstev a tím snadný průchod postranního kořene (Swarup, Benková et al. 2008). Pokožkové buňky kořene, které leží nad pronikajícím primordiem, nejsou jeho tlakem roztrhány, jen odtlačeny a stanou. To svědčí o degradaci pektinů ve středních lamelách pokožkových buněk. Pektiny buněčných stěn a středních lamel primordia jsou metylovány, tudíž chráněny před účinky těchto enzymů (Laskowski, Biller et al. 2006). Auxin také moduluje expresi aquaporinů v kořenovém primordiu, kde snižuje hydraulickou konduktivitu a tím optimálně zpomaluje pronikání (Péret, Li et al. 2012). Výsledný tvar primordia je ovlivňován, spíše než koordinovaným dělením, odporem nadložních pletiv, jak bylo dokázáno na matematických modelech (Lucas, Kenobi et al. 2013).

### **Cytokinin**

O opačném efektu auxinu a cytokininu na vznik a vývoj postranních kořenů je známo již poměrně dlouho (Goodwin and Morris 1979). Nízké koncentrace cytokininů, přidávaných do média, měly poměrně mírný efekt na délku primárního kořene, ale silný efekt na

hustotu kořenů postranních, která poklesla na čtvrtinu. Inhibiční efekt cytokininů na prodlužování primárního kořene a hypokotypu lze zvrátit inhibitorem syntézy etylénu (Cary, Liu et al. 1995), na rozdíl od inhibičního efektu cytokininu na postranní kořeny. Efekt cytokininů na primární kořen je tedy, na rozdíl od efektu na boční kořeny, závislý na etylénu (Laplaze, Benkova et al. 2007). Cytokininové ovlivňují expresi PIN proteinů, (Bielach, Podlešáková et al. 2012) a jejich fosforylaci, ovlivňující jejich polární buněčnou lokalizaci (Marhavý, Duclercq et al. 2014), čímž narušují formování auxinového maxima. Cytokininové inhibují první asymetrické dělení buněk pericyklu, neboť zastavují buněčný cyklus v G2 fázi. Naproti tomu stimuluje přechod G1 – S fází buněčného cyklu, čímž pozitivně regulují prodlužování již se vyvíjejících primordií postranních kořenů (Li, Mo et al. 2006). Exogenní aplikace narušuje organizaci buněčných dělení ve vznikajícím primordiu (Laplaze, Benkova et al. 2007, Bielach, Podlešáková et al. 2012).

Nejvyšší obsah cytokininů je v zóně iniciace vzniku postranních kořenů (Lohar, Schaff et al. 2004), neboť kořenový apikální meristéum je hlavním místem jejich vzniku. V bazálním meristému a v oblasti iniciace primordia postranního kořene je však cytokininová signalizace reprimována. K cytokininům jsou citlivé buňky pericyklu, přiléhající k protoxylému (Laplaze, Benkova et al. 2007), což předchází iniciaci nového primordia v přílišné blízkosti toho vyvíjejícího se. Koncentrace cytokininů ve vyvíjejících se primordiích je velmi nízká, stoupá v VI. vývojovém stádiu primordia, kde je spjata s vývojem vodivých pletiv (Bielach, Podlešáková et al. 2012).

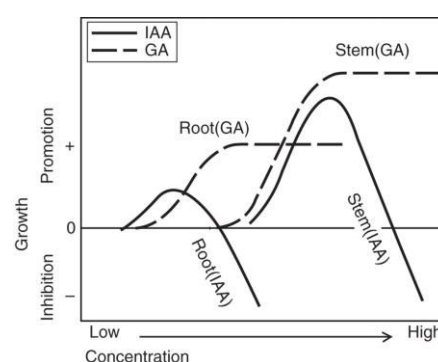
#### ***Ostatní fytohormony, zapojené v regulaci kořenné architektury***

Abcisová kyselina (ABA) prokazatelně ovlivňuje signalizaci a zvyšuje syntézu etylénu (Cracker and Abeles 1969, Luo, Chen et al. 2014). ABA inhibuje, prostřednictvím produkce etylénu, délku kořene u *Arabidopsis* (Luo, Chen et al. 2014) a inhibuje vývoj primordií postranních kořenů, která pak nejsou schopna aktivovat vlastní meristéum (Casimiro, Beeckman et al. 2003). K této reverzibilní inhibici dochází po vynoření postranního kořene z pletiv mateřského, ale ještě před aktivací jeho meristému. ABA totiž snižuje expresi cyklinu D3 a cyklin-dependentní kinázy B1 (De Smet, Signora et al. 2003).

Etylén stimuluje produkci auxinu a jeho následný bazipetální transport v kořenovém systému *Arabidopsis* (Stepanova, Hoyt et al. 2005) zvýšenou expresí *AUX1*, *PIN3* a *PIN7*. V místech iniciace postranních kořenů zvýšený auxinový transport zabraňuje vzniku auxinového maxima (Lewis, Negi et al. 2011). V kořenovém apexu etylén stimuluje auxin-responzivní genovou expresi degradací AUX/IAA represorů (Růžička, Ljung et al. 2007). Mutant v auxinovém receptoru, *tir1*, byl insenzitivní k auxinu, nikoliv však k etylénu, což ukazuje na nezávislost těchto signálních drah (Lewis, Negi et al. 2011). Mutací stabilizované negativní regulátory odpovědi na auxin, *AXR2/IAA7* a

AXR3/IAA17, vyvolaly auxin- i etylén-insenzitivní fenotyp (Růžička, Ljung et al. 2007). Co se týče ovlivnění větvení kořene, u etylénu závisí na jeho koncentraci. Velmi nízká koncentrace etylénu stimuluje vznik postranních kořenů, vyšší ho však silně inhibují díky rušení auxinového maxima vlivem zvýšeného transportu auxinu (Lewis, Negi et al. 2011). Vždy však platí, že citlivost na etylén je patrná pouze u té části primárního kořene, která byla na médiu s etylénem, respektive jeho prekurzorem, kultivována. Etylén podporuje pronikání primordií mateřským kořenem, ale pouze při přísunu auxinu z nadzemní části rostliny. Děje se tak díky zvýšení počtu dělení specifických buněk v primordiu, což pronikání urychluje. Při vysoké koncentraci etylénu byl prokázán jeho efekt na reorganizaci kořenového systému – jeho vlivem přijal postranní kořen úlohu kořene primárního. Etylén také silně inhibuje prodlužování buněk pericyklu, přiléhajících ke xylému (Ivanchenko, Muday et al. 2008).

Odpověď na gibereliny je, u *Arabidopsis*, regulována auxinem (Fu and Harberd 2003). Gibereliny stimulují polární transport auxinu (Li, Zhu et al. 2015), na rozdíl od auxinu však gibereliny ve vyšších koncentracích nevykazují inhibiční efekt (Tanimoto 2012), Obrázek 6. Auxin stimuluje giberelinovou signalizaci i biosyntézu (Fu and Harberd 2003). Jejich úloha ve větvení kořene zatím není jasná.



Obrázek 6: Rozdíl v reakci kořene na různé koncentrace giberelinu a auxinu (Tanimoto 2012).

Efekt brasinosteroidů na růst kořenů je závislý na koncentraci. Při nízké koncentraci je jejich vliv na prodlužování kořenů pozitivní, při vysoké koncentraci inhibiční (Müssig, Shin et al. 2003). Brasinosteroidy pozitivně ovlivňují iniciaci vzniku primordií postranních kořenů, také stimulují akropetální auxinový transport. Při nízkých koncentracích mají auxin a brasinosteroidy synergický efekt (Bao, Shen et al. 2004).

Strigolaktony negativně ovlivňují přechod z V. do VI. fáze vývoje primordia (Ruyter-Spira, Kohlen et al. 2011) a stimulují dloužení kořenových vlásků (Kapulnik, Delaux et al. 2011). Jejich účinky na formování postranních kořenů závisí na dostupnosti fosfátu – při jeho dostatku větvení kořenů inhibují, při jeho nedostatku naopak stimulují. Stimulují růst primárního kořene (Ruyter-Spira, Kohlen et al. 2011), díky zvětšení meristematické a přechodové zóny. Signalizace strigolaktony vede k indukci syntézy etylénu, jehož signalizace vede ke stimulaci syntézy a transportu auxinu (Koltai 2011).

Jak je patrné, fytohormonální ovlivnění kořenové architektury je velmi komplexní proces. Fytohormonální regulace je velmi důležitou, nikoliv však jedinou možností regulace větvení kořenů. Velmi důležitá je i environmentální regulace vývoje postranních kořenů, která však, v souvislosti s tématem tohoto textu, nebude diskutována.

## 9. Materiál a metody

### 9.1. Biologický materiál

Jako rostlinný modelový organismus pro experimentální část této diplomové práce byly použity rostliny huseníčku Thalova *Arabidopsis thaliana*, ekotyp Columbia-0 a její veřejně dostupné inzerční mutanty (<http://signal.salk.edu>).

V této práci byly také využity dva modelové mikroorganismy. Prvním z nich je *Escherichia coli*, kmen DH5 $\alpha$  a kmen DBB3.1, nesoucí rezistenci k ccdB kazetě. Druhým pak *Agrobacterium tumefaciens*, kmen GV3101, nesoucí gentamycinovou a rifampicinovou rezistenci.

#### 9.1.1. Kultivace *Arabidopsis thaliana*

Rostliny *Arabidopsis thaliana* byly před každým výsevem vernalizovány po dobu 3 dnů při 4°C, až poté byly vysety na příslušné kultivační médium či peletu.

Rostliny, určené pro křížení, produkci semen či transformaci, byly pěstovány na rašelinových peletách v minipařeništích v kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8, vlhkostí 40% a zářivkovým osvětlením 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ .

Rostliny, určené pro izolaci DNA metodou CTAB, detekci aktivity glukuronidázy (GUS) a analýzu kořenové architektury byly pěstovány sterilně na hranatých či kulatých Petriho miskách s pevným 0,2 MS médiem (Murashige and Skoog 1962) s 1% agarem a sacharózou. Složení kultivačního média ukazuje Tabulka 1. Médium bylo sterilizováno v autoklávu 2540EK (Tuttnauer) při 121°C, 0144MPa po dobu 20 minut a naléváno sterilně ve flow-boxu. Semena pro tento typ výsevu byla, ještě před vernalizací, sterilizována 15 minut desinfekčním chlornanovým roztokem (20% roztok SAVO s 1% Tritonu) a posléze ve flow-boxu třikrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Plotny (misky) s médiem, poseté vernalizovanými semeny, byly přeneseny do kultivační místnosti s fotoperiodou 16/8, vlhkostí 40% a zářivkovým osvětlením 100 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ , zde byly uloženy pod úhlem 45° vůči zdroji světla. Pro kultivace, hodnotící kořenovou architekturu, byly plotny po výšku semen zabaleny do tmavé, neprůsvitné textílie, pro omezení průniku světla ke kořenům.

Složky	MS	Agar	Sacharóza	dH <sub>2</sub> O
Navážka	0,43g	5,0g	5,0g	500ml

Tabulka 1: Složení pevného kultivačního média.

### 9.1.2. GUS detekce

$\beta$ -glukuronidáza je enzym, který je schopen metabolizovat bezbarvý substrát (X-gluc) na modrou, nerozpustnou sraženinu. Detekce byla prováděna na fixovaném rostlinném materiálu.

Rostliny byly kultivovány 7 či 14 dní na plotně s pevným médiem (Kapitola 9.1.1.) Šestijamkové destičky (multiplate) byly vychlazeny na ledu, do každé jamky byly odpipetovány 3ml 90% acetonu, vychlazeného na  $-20^{\circ}\text{C}$ . Za pomoci pinzety byly celé rostliny opatrně přeneseny do jamek na destičce k vychlazenému acetonu, do každé jamky 1-2 rostliny. Fixace probíhala 30 minut v  $-20^{\circ}\text{C}$ . Po ukončení fixace byl z jamek odstraněn aceton a jamky byly dvakrát promyty vychlazeným promývacím pufr (Tabulka 3), po 3ml/jamka. Vzorky byly alespoň 60 minut odvzdušňovány v exsikátoru za pomoci vakuové pumpy (tlak byl snížen pod 10kPa), poté byl promývací pufr nahrazen pufr barvicím (Tabulka 3) v objemu 2ml/jamka. Barvení probíhalo přes noc ve vodní lázni, temperované na  $37^{\circ}\text{C}$  ve tmě.

Ráno byl barvicí roztok v jamkách nahrazen 15% glycerolem se 2% dimethylsulfoxidu (DMSO) v dávce 2ml/jamka, nechal se působit 30 minut. Po uplynutí inkubace byl tento roztok glycerolu nahrazen koncentrovanějším, 30% glycerolem se 2% DMSO, 2ml na jamku, a opět se nechal 30 minut působit. Stejným postupem byl tento nahrazen 50% glycerolem s 0,1% tritonu, po 30 minutách působení byl nahrazen 65% glycerolem se 2% DMSO (Tabulka 4). I tento se nechal 30 minut působit, již se ale neodsával. Z něj byly rostliny opatrně přesouvány rovnou na podložní sklíčko s projasňovacím roztokem, kde byly rostliny překryty krycím sklíčkem. Pro zabránění rozmáčknutí fixovaných pletiv rostlin byly mezi podložní a krycí sklíčko umístěny proužky parafilmu. Takto připravené preparáty se nechaly minimálně přes noc projasnit při  $4^{\circ}\text{C}$ .

Projasňovací roztok byl připravován rozpuštěním 0,04g thiosíranu sodného ve 20ml 65% glycerolu. Po rozpuštění bylo přidáno 17g jodidu sodného a 0,4ml DMSO.

Zásobní roztok	Příprava	Skladování
50mM ferrokyanid	rozpustit 1,055g v 50ml dH <sub>2</sub> O	v lednici
50mM ferrikyanid	rozpustit 0,825g v 50ml dH <sub>2</sub> O	v lednici
X-gluc alikvot	rozpustit 30mg X-gluc v 1,5ml DMSO, rozalikvotovat po 500μl	v mrazáku -20°C
0,2M kyselý dihydrát dihydrogenfosforečnanu sodného	15,6g doplnit do 500ml dH <sub>2</sub> O	v lednici
0,2M střední dodekahydrát hydrogenfosforečnanu sodného	35,8g doplnit do 500ml dH <sub>2</sub> O	v lednici
0,1M fosforečnanový pufr, pH 7,0	39ml 0,2M kyselého a 61ml 0,2M středního fosforečnanu sodného doplnit do 200ml dH <sub>2</sub> O	v lednici

Tabulka 2: Příprava a skladování zásobních roztoků pro GUS detekci

Pufr	50mM ferrokyanid	50mM ferrikyanid	0,1M fosforečnanový pufr	X-gluc
Promývací pufr 50ml	500μl	500μl	49ml	-
Barvicí pufr 20ml	200μl	200μl	19,3ml	300μl

Tabulka 3: Složení pufrů, využívaných při detekci GUS. Pufry se připravují přímo před upotřebením, neskladují se.

### 9.1.3. Mikroskopická analýza

Pletivově specifický expresní vzorec, získaný při detekci GUS, byl analyzován mikroskopicky, za použití diferenciálního interferenčního kontrastu (DIC). Pozorovány byly celé projasněné rostliny (wholemout). K pozorování byl použit mikroskop Olympus BX51 a monochromatická kamera U4000 Digital Camera (Apogee Instruments) s LCD RGB filtrem, pro snímání a digitální zpracování byl použit program MicroCCD.

### 9.1.4. Analýza kořenového systému

Rostliny, u nichž měla být provedena kořenová analýza, byly pěstovány sterilně na plotnách (Kapitola 9.1.1.) Tyto plotny byly skenovány na skeneru Perfection V750 Pro (Epson) v rozlišení 1200dpi. Skeny pak byly analyzovány v programu NIS Elements pomocí modulu kořenového analyzátoru. Výstupy pak byly statisticky zpracovány.

### 9.1.5. Izolace DNA metodou Oxford

V případě této práce byla DNA, vyizolovaná metodou Oxford, využívána pouze jako templát pro genotypovací PCR, jak bude vysvětleno v Kapitole 9.1.6. Při izolaci byl používán upravený protokol (Edwards, Johnstone et al. 1991).

Odebírány byly jeden až dva nejmladší listy každé rostliny, které byly zamrazeny v tekutém dusíku ve 2ml zkumavce s nerezovou mlecí koulí. K homogenizaci vzorku byl použit mlýn Retsch MM301, homogenizace probíhala 30s při 23 kmitech/s. K ještě zmrzlému homogenizátu bylo přidáno 200 $\mu$ l extrakčního pufru (Tabulka 4), po krátkém vortexování na přístroji MS2 Minishaker (IKA<sup>®</sup>) byly ze vzorků vyndány mlecí koule. Suspenze byla centrifugována 2 minuty při 14000rpm na centrifuze MiniSpin Plus (Eppendorf). Supernatant byl přenesen do čisté 1,5ml zkumavky (180 $\mu$ l) a byl k němu připipetován stejný objem isopropanolu, směs byla promíchána a 2 minuty nechána odstát. Následovala 4minutová centrifugace při 14000rpm, při níž se vytvořil pelet. Supernatant byl odstraněn pomocí vodní vývěvy a pelet byl promyt 1ml 70% ethanolu, následovala centrifugace 5min při 14100rpm. Po odsátí supernatantu byl pelet několik minut vysoušen v laboratorní teplotě. Nakonec k němu bylo přidáno 45 $\mu$ l sterilní dH<sub>2</sub>O a 5 $\mu$ l sterilního 10xTE pufru. DNA je obsažena v kapalně fázi nad peletem.

Složky etrakčního pufru	Koncentrace zásobních roztoků	Koncentrace v extrakčním pufru	Objem ve 100ml extrakčního pufru	Skladování
Tris HCl, pH 7,5	1M	200mM	20ml	v laboratorní teplotě
Roztok NaCl	5M	250mM	5ml	v laboratorní teplotě
EDTA, pH 8,0	0,5M	25mM	5ml	v laboratorní teplotě
SDS	10%	0,5%	5ml	v laboratorní teplotě
dH <sub>2</sub> O			65ml	v laboratorní teplotě

Tabulka 4: Složení extrakčního pufru. Extrakční pufr se sterilizuje klávkováním.

### 9.1.6. Inserční mutanty a jejich ověřování

Po objednání semen T-DNA inserčních mutantů ze Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL), <http://signal.salk.edu/isect.2.html>, bylo třeba najít v liniích homozygotní jedince. K tomuto ověření byla použita genotypovací polymerázová řetězová reakce (PCR), jedinci jsou testováni na přítomnost a nepřítomnost insertu. PCR je metoda, při níž dochází k amplifikaci určitého úseku DNA, ohraničeného primery. Amplifikace je zprostředkována termostabilní DNA-dependentní DNA polymerázou Taq (Fermentas). PCR se skládá z několika navazujících fází, které jsou odděleny

teplotně (teplota určuje děj v reakci) a časově (čas určuje délku dané fáze reakce a tudíž i její výsledek). PCR probíhá v cyklech. Tabulka 5 ukazuje schéma genotypovací PCR.

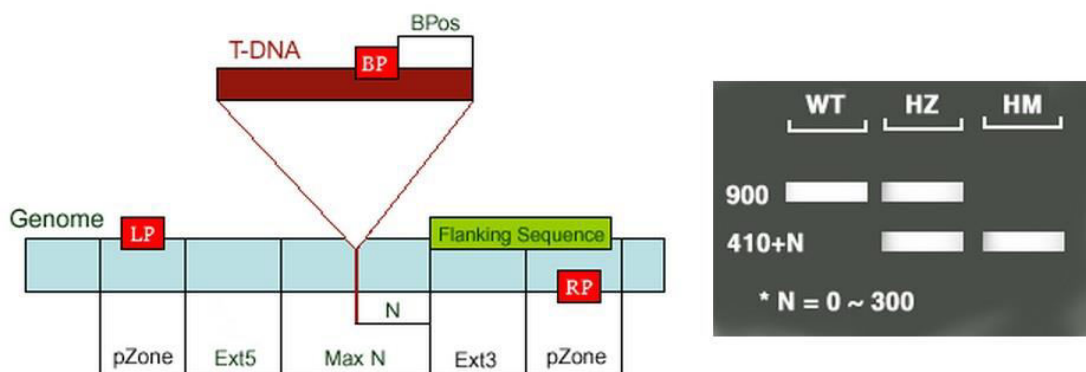
Krok v cyklu	Teplota	Doba trvání
Počáteční denaturace	94°C	120s
Denaturace	94°C	30s
Nasedání primerů	57°C	60s
Syntetická fáze	72°C	60s
Dosyntetizování	72°C	600s

←  
Opakování 25 krát

Tabulka 5: Schéma cyklu genotypovací PCR

Pro ověření vložení insertu v obou alelách genu se používají tři primery (Obrázek 7), umožňující rozeznat homozygotního mutantu (HM), heterozygotního (HZ) a neovlivněnou rostlinu (WT). Složení reakční směsi pro genotypovací PCR je vyznačeno v Tabulce 6. PCR byla prováděna v cycleru T100<sup>TM</sup> Thermal Cycler (Bio Rad).

### 1. Protocol for SALK T-DNA primer design



Obrázek 6: Princip genotypování. Vlevo je znázorněno rozložení tří primerů, používaných pro testování pomocí PCR. Vpravo pak vysvětlivka, jak z výsledku agaróзовé elektroforézy poznat počet mutovaných alel u konkrétního jedince. Převzato z <http://signal.salk.edu/tdnprimers.2.html>.

Reagencie	dH <sub>2</sub> O	Pufir 10xTaq	MgCl <sub>2</sub>	dNTP	Primer RP	Primer LP (WT)/BP (mutant)	Taq polymeráza (Fermentas)	DNA (Oxford)
Objem	9,75μl	2μl	1,6μl	0,4μl	2μl	2μl	0,25μl	2μl

Tabulka 6: Složení reakční směsi pro genotypovací PCR. V jedné reakci byly vždy dva primery. Celkový objem



### 9.1.7. Křížení HM

Pro vytváření dvojitých mutantů bylo použito křížení. HM rostliny byly nejprve kultivovány na rašelinových peletách, ke křížení se přistupovalo v době, kdy měly rostliny několik málo květních stvolů s dostatkem mladých poupat. Jedna z rostlin byla určena jako mateřská (♀), na níž se budou vyvíjet semena, druhá jako otcovská (♂), která poskytne pyl.

Mateřské rostlině byly ostříhány všechny doposud vyvinuté šesule, květy a nakvetlá poupata, pod binokulární lupou Olympus SZX7 byla vybrána tři největší poupata, všechna ostatní byla pinzetou opatrně odstraněna. Poupatům byly opatrně odstraňovány květní obaly a nezralé tyčinky, aby byl odhalen samotný pestík. Na zbylá poupata, resp. pestíky, byl pod lupou přenesen pyl z otcovské rostliny. Takto opylený pestík byl uzavřen do PE sáčku s ustříženými rohy, aby se předešlo vysychání a kontaminaci cizím pylem. Sáček byl podepřen špejlí a označen. Sundán byl po 2 dnech, kdy již začal být patrný vývoj šesule.

Nakřížené šesule byly po uzrání a zaschnutí sklizeny a vysety na rašelinové pelety. F1 generace je uniformní, testování proto probíhalo až v F2 generaci. Vzhledem ke štěpnému poměru a pravděpodobnosti výskytu HM dvojitého mutantu (1 ze 16 rostlin) bylo vyseto 30 rostlin F2 generace, které byly testovány genotypováním na mateřskou a otcovskou rostlinu stejným postupem, jako v kapitole 9.1.6.

### 9.1.8. Kultivace bakterií *Escherichia coli*

*Escherichia coli* byla v této práci využívána k pomnožení plasmidů. Kultivace *E. coli* probíhala za aerobních podmínek při 37°C přes noc, na pevném nebo tekutém LB médiu (Tabulka 8). Kultivace na pevném médiu probíhala na plastových, sterilních Petriho miskách o průměru 9cm v termostatu (Heraeus Instruments), kultivace v kapalném médiu probíhala na třepačce Ceromat® H Biotech International při 180rpm ve sterilních zkumavkách se 3ml média. Podle potřeby byla do média přidávána příslušná antibiotika v závislosti na genech rezistence plasmidů, jimiž byly bakterie transformovány. Média byla sterilizována klávováním, práce s bakteriemi byla prováděna sterilně ve flow-boxu. Krátkodobě se plotny s bakteriemi uchovávaly v lednici, pro dlouhodobější uchování byla zvolena forma konzervy – ke 400µl bakteriální suspenze v tekutém médiu bylo přidáno 100µl sterilního 50% glycerolu. Směs byla promíchána a zamražena v tekutém dusíku a uchovávána v -80°C.

Chemikálie	Pepton (tripton)	Kvasnicový extrakt	NaCl	Agar
Navážka	10g	5g	5g	15g

Tabulka 7: Rozpis chemikálií pro přípravu 1l pevného LB média. Antibiotika jsou do média přidávána až po jeho zchlazení nanejvýše 60°C, pracuje se sterilně. Tekuté médium se připravuje stejně, jen bez agaru. Obě formy se

### 9.1.9. Kultivace *Agrobacterium tumefaciens*

*Agrobacterium tumefaciens*, jakožto druhý modelový mikroorganismus, využívaný v této práci, byl využíván pro transformaci rostlin, jak bude popsáno níže. Kultivace *Agrobacteria* probíhala aerobně, na pevném či tekutém LB médiu (Tabulka 7) s příslušnými antibiotiky při 28°C. Kultivace na pevném médiu probíhala na plastových, sterilních Petriho miskách o průměru 9cm v termostatu Mini Incubator (Labnet), kultivace v kapalném médiu probíhala na třepačce Ceromat® H Biotech International při 180rpm ve sterilních zkumavkách či Erlenmayerových baňkách. Pravidla pro práci a krátkodobé i dlouhodobé uchovávání *Agrobacteria* odpovídají těm pro *E. coli* (kapitola 9.1.8.).

### 9.1.10. Transformace bakterií elektroporací

Elektroporace je metoda transformace mikroorganismů plasmidovou DNA, využívající schopnosti elektrického šoku vytvořit v bakterii póry. Plasmidová DNA nese geny pro selekční markery.

K elektrokompetentním buňkám (kapitola 9.1.11) byly na ledu připipetovány 2μl odsolené ligační směsi (Kapitola 9.2.7), LR reakce (Kapitola 9.2.20) nebo jiné plasmidové DNA, celá směs byla promíchána špičkou pipety a nechána na ledu 1 minutu. Směs byla pipetou převedena do vychlazené elektroporační kyvety, sklepnuta na dno a kyveta byla zvenku osušena. Elektroporace probíhala v elektroporátoru Eporator electroporator (Eppendorf), nastaveného na 2400 – 2600V pro *E. coli* a 1900 – 2100V pro *A. tumefaciens*. Ihned po aplikaci šoku byl k bakteriím přidán 1ml sterilního živného média, SOC1 pro *E. coli* a YEB recovery pro *A. tumefaciens* (Tabulka 8 a 9), bakterie v médiu byly převedeny do sterilní zkumavky v ní byly kultivovány ve své kultivační teplotě 1 hodinu v případě *E. coli*, 3 hodiny v případě *A. tumefaciens*, vždy aerobně na třepačce. Po uplynutí této inkubace byly bakterie centrifugovány 10s při 10000rpm za vytvoření peletu, který byl resuspendován ve 100μl SOC1 či YEB recovery média a vyset na plotnu s pevným LB médiem s příslušnými selekčními antibiotiky (Tabulka10).

Otestování narostlých kolonií probíhalo pomocí kontrolní PCR (Kapitola 9.2.2). Templátem byl stěr z přečárkované kolonie (přečárkování je nezbytný krok k eliminaci falešně pozitivních výsledků), primery byly použity stejné, jako pro amplifikaci sekvence z genomové DNA. Délka syntetické fáze s Taq polymerázou se odvíjela od délky insertu (60s/1kbp), teplota nasedání primerů byla počítána pomocí on-line Tm kalkulátoru.

Chemikálie	Navážka
Pepton	1,00g
Kvasnicový extrakt	0,25g
Glukóza	0,1802g
NaCl	0,0292g
KCl	0,0093g
MgCl <sub>2</sub>	0,1016g
MgSO <sub>4</sub>	0,1232g

Tabulka 8: Chemikálie pro přípravu 50ml SOC1 média. Médium bylo sterilizováno filtrací přes 0,22 $\mu$ m jednorázový filtr Naglene pomocí injekční stříkačky. Krátkodobě bylo uchováno v lednici, dlouhodobě v mrazáku při -20°C.

Chemikálie	Navážka
Pepton	10g
Kvasnicový extrakt	1g
Sachaóza	5g
MgSO <sub>4</sub>	0,5g
NaCl	0,58g
KCl	0,19g
MgCl <sub>2</sub>	0,95g

Tabulka 9: Chemikálie pro přípravu 1l YEB recovery média. Médium bylo sterilizováno filtrací přes 0,22 $\mu$ m jednorázový filtr Naglene pomocí injekční stříkačky. Uchováno bylo v lednici.

Antibiotikum	Zásobní roztok	Rozpouštědlo	Koncentrace v médiu	Ředění	Skladování
Kanamycin	50mg/ml	dH <sub>2</sub> O	50mg/l	1000x	v lednici
Hygromycin	25mg/ml	dH <sub>2</sub> O	25mg/l	1000x	v mrazáku - 20°C
Spectinomycin	100mg/ml	dH <sub>2</sub> O	100mg/l	1000x	v mrazáku - 20°C
Rifampicin	10mg/ml	methanol	100mg/l	100x	v mrazáku - 20°C
Gentamycin	100mg/ml	dH <sub>2</sub> O	100mg/l	1000x	v mrazáku - 20°C

Tabulka 10: Používaná antibiotika. Pro práci s *E. coli* byl použit kanamycin a hygromycin, pro práci s *Agrobacterium* byl používán rifampicin a gentamycin pro udržení virulence, dále hygromycin a spektinomycin. Pro práci s rostlinami byl používán hygromycin.

### 9.1.11. Příprava elektrokompetentních bakterií

Bakterie *E. coli* byly kultivovány přes noc na pevném LB médiu bez antibiotik, bakteriální stěr z plotny byl kultivován opět přes noc v 50ml tekutého LB média v Erlenmayerově baňce na třepačce (kultivace Kapitola 9.1.8.). 5ml této buněčné suspenze bylo zaočkováno do 500ml tekutého LB média ve 2l Erlenmayerově baňce (čím větší, tím lepší, kvůli provzdušnění). Kultivace v třepačce trvala přibližně 2 až 3 hodiny, do dosažení určité optické denzity 0,500 – 0,600 při vlnové délce 600nm, optická denzita byla měřena v 1ml vzorku. Při dosažení správné denzity byly bakterie ihned zchlazeny na ledu na 30 minut, posléze rozalivkovány do šestnácti 50ml sterilních falkon. Veškerá další práce již byla prováděna na ledu, manipulace s otevřenými bakteriemi či médii probíhala sterilně ve flow-boxu. Falkony byly centrifugovány na chlazené centrifuze Universal 32R (Hettlich Zentrifugen) při 4°C, 4500rpm 15 minut. Supernatant byl slit, bakterie byly resuspendovány v malém objemu sterilní dH<sub>2</sub>O a suspenze byla doplněna sterilní dH<sub>2</sub>O do 50 ml. Opakovala se centrifugace se stejnými parametry, následovaná odstraněním supernatantu a resuspendací v malém objemu vody. Vždy dvě falkony byly slity do jedné, která byla opět doplněna dH<sub>2</sub>O do 50 ml. Znovu proběhla 15 minutová centrifugace a odstranění supernatantu. V tomto kroku byly bakterie resuspendovány ve 2ml sterilního 10% glycerolu, obsahy všech 8 falkon bylo slito do jedné a doplněno sterilním 10% glycerolem do 20ml. Optická denzita byla měřena na spektrofotometru Bio Mate5 (Thermo Spectronic), měřen byl 50xředěný vzorek (proto blank byla dH<sub>2</sub>O, nikoliv 10% glycerol). Suspenze byla centrifugována, pelet byl resuspendován v 10% glycerolu. Suspenze byla rozalivkována po 50μl do 0,2ml zkumavek a ihned zamrazena v tekutém dusíku. Kompetentní buňky byly skladovány při -80°C. Objem 10% glycerolu pro resuspendaci se vypočítal z optické denzity 50x ředěného vzorku:

Optická denzita  $\lambda=600\text{nm}$  0,1 odpovídá  $10^8$  buněk/ml. Vzorek je však 50x ředěný, a ve falkoně je tohoto vzorku 20 ml. Ve finálním produktu je třeba mít minimálně  $3 \times 10^{10}$  buněk/ml. V mém případě byly bakterie resuspendovány v 10ml sterilního 10% glycerolu, neboť naměřená optická denzita ředěného vzorku byla 0,603, v 1ml mých kompetentních buněk bylo tedy  $6 \times 10^{10}$  buněk.

Při prvním měření optické denzity jsem však nezvládla odhadnout správný okamžik, Optická denzita  $\lambda=600\text{nm}$  byla 0,634, což se podepsalo na celkově nižší, ale ještě stále ucházející účinnosti -  $10^6$  kolonií/1μg DNA.

Elektrokompetentní buňky *Agrobacterium tumefaciens* jsem sama nepřipravovala, použila jsem buňky, připravené Mgr. Lenkou Stillerovou a Mgr. Ivanem Kulichem, Ph. D. dle standardního protokolu.

### 9.1.12. Izolace plasmidové DNA z bakterií

Pro izolaci DNA byly pozitivně otestované kolonie zaočkovány do sterilní zkumavky se 3ml tekutého, provzdušňovaného LB média s příslušnými antibiotiky, jak je uvedeno v Kapitole 9.1.8. Izolace byla prováděna pomocí kitu Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) přesně podle přiloženého návodu.

## 9.2. Práce s DNA

### 9.2.1. Izolace rostlinné DNA metodou CTAB

Pro izolaci rostlinné DNA, která má sloužit k dalšímu molekulárně-biologickému využití, byla použita metoda izolace pomocí cetrimonium bromidu (CTAB). Byl používán upravený protokol rychlé izolace vysokomolekulární rostlinné DNA (Murray and Thompson 1980).

Do 2ml zkumavky se 2 mlecími koulemi bylo přidáno 3 až 6 listů *Arabidopsis thaliana*, ekotypu Col-0, pěstované sterilně na plotnách s pevným médiem. Zkumavka byla zamrazena v tekutém dusíku a její obsah byl homogenizován ve vibračním mlýnu Retsch MM301, homogenizace probíhala 30s při 23 kmitech/s. K homogenizátu bylo připipetováno 500µl 2xCTAB (Tabulka 11), byly vyjmuty nerezové mlecí koule a vzorky byly inkubovány 30 minut v 65°C při 300 kmitech/min na termomixeru Thermomixer komfort (Eppendorf). Po vychladnutí bylo v digestoři připipetováno 1000µl směsi chloroformu a isoamylalkoholu (v poměru 24:1) a obsah zkumavky byl promíchán. Následovala centrifugace 5 minut při 14000rpm. Horní fáze byla přenesena do čisté zkumavky, kde k ní bylo přidáno 1000µl čistého ethanolu. Směs byla ručně promíchána a uložena na 30 minut do lednice pro lepší vysrážení DNA. Následovala centrifugace, opět 5min při 14000rpm, za vytvoření peletu na dně. Supernatant byl odstraněn za pomoci vodní vývěvy, pelet byl promyt 1000µl 70% ethanolu. Následovalo 10 minut odstředování při 14000rpm, odsátí supernatantu a vysoušení pelety několik minut při 37°C. Nakonec bylo přidáno 40µl dH<sub>2</sub>O a 10µl 10xTE pufru a peleta se nechala rozpouštět 30 minut při 37°C a 300 kmitech/min.

Chemikálie	Požadovaná koncentrace	Navážka
TRIS (TRIZMA hydrochlorid)	100mM	2,40g; titrovat na pH 8
CTAB	2%	4,00g
EDTA	20mM	1,42g
NaCl	1,4M	16,40g
Polyvinylpyrrolidon	2%	4,00g

Tabulka 11: Rozpis chemikálií pro přípravu 200ml

### 9.2.2. Polymerázová řetězová reakce (PCR)

PCR byla využívána k amplifikaci úseků DNA, s nimiž bylo dále pracováno. Použitým primerům se věnuje kapitola 9.2.3.

Pro amplifikaci promotorů, potřebných pro transkripční fúzi, byla používána Taq DNA dependentní DNA polymeráza. Pro amplifikaci delších úseků, konkrétně promotoru i s genem, využívanou při translační fúzi, byla používána Phusion polymeráza s proofreadingovou aktivitou. Tyto dvě používané termostabilní polymerázy se liší ve schématu PCR cyklu (Tabulka 12), i ve složení reakční směsi (Tabulka 13). Pro výpočet teploty nasedání primerů, která vychází z teploty tání ( $T_m$ ) u primerů byl využit  $T_m$  kalkulátor na webových stránkách výrobce, Thermo Scientific pro Taq polymerázu, New England BioLabs pro Phusion polymerázu. Obvykle bývá přibližně o 3 až 6°C nižší než vypočtená  $T_m$ . Při počáteční optimalizaci PCR byly reakce míchány v objemu 20 $\mu$ l, pro amplifikaci za účelem získání většího množství amplifikované sekvence DNA byly používány reakce o objemu 50 $\mu$ l, vždy v 0,2ml PCR zkumavkách. Reakce byly vždy míchány na ledu.

Polymeráza	Taq polymeráza		Phusion polymeráza	
	Teplota	Čas	Teplota	Čas
Denaturace I	94°C	120s	94°C	120s
Denaturace II	94°C	30s	94°C	30s
Nasedání primerů	$T_m$ Calculator	60s	$T_m$ Calculator	30s
Syntetická fáze	94°C	60s/1000bp	94°C	35s/1000bp
Dosyntetizování	94°C	600s	94°C	600s

30x

Tabulka 12 ukazuje rozdíly ve schématu PCR cyklu mezi dvěma používanými polymerázami.

Polymeráza	Taq polymeráza		Phusion polymeráza	
	Složka	Objem	Složka	Objem
Pro 20 $\mu$ l reakční směs				
	dH <sub>2</sub> O	14,15 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O	13,1 $\mu$ l
	Pufř 10xTaq	2 $\mu$ l	Pufř 5xPhusion	4 $\mu$ l
	MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1,2 $\mu$ l	-	-
	Přímý primer (Fwd) (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	Přímý primer (Fwd) (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
	Zpětný primer (Rev) (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l	Zpětný primer (Rev) (20 $\mu$ M)	0,5 $\mu$ l
	dNTP (10mM)	0,4 $\mu$ l	DTP (10mM)	0,4 $\mu$ l
	DNA	1 $\mu$ l	DNA	1 $\mu$ l
	Polymeráza (5U/ $\mu$ l)	0,25 $\mu$ l	Polymeráza (2U/ $\mu$ l)	0,5 $\mu$ l

Tabulka 13 ukazuje složení 20 $\mu$ l reakce u dvou používaných polymeráz. U Phusion polymerázy je již hořčičk součástí pufru.

### 9.2.3. Primery

Návrh primerů pro účely této práce probíhal manuálně v textovém editoru MS Word, kde byla hledána příhodná sekvence s nízkým opakováním nukleotidů a zároveň s možností umístění palindromického restrikčního místa s co nejnižším počtem nekomplementárních míst. Pro většinu amplifikovaných sekvencí bylo třeba primery několikrát přepracovat, aby reakce uspokojivě běžela. Zde uvedené primery jsou ty správně fungující, jejich výrobu prováděla firma Geneti Biotech. Vstupní sekvence pro navrhování primerů byly staženy z <http://signal.salk.edu/isect.2.html>. V tabulce 14 je seznam primerů, použitých při experimentální části této práce.

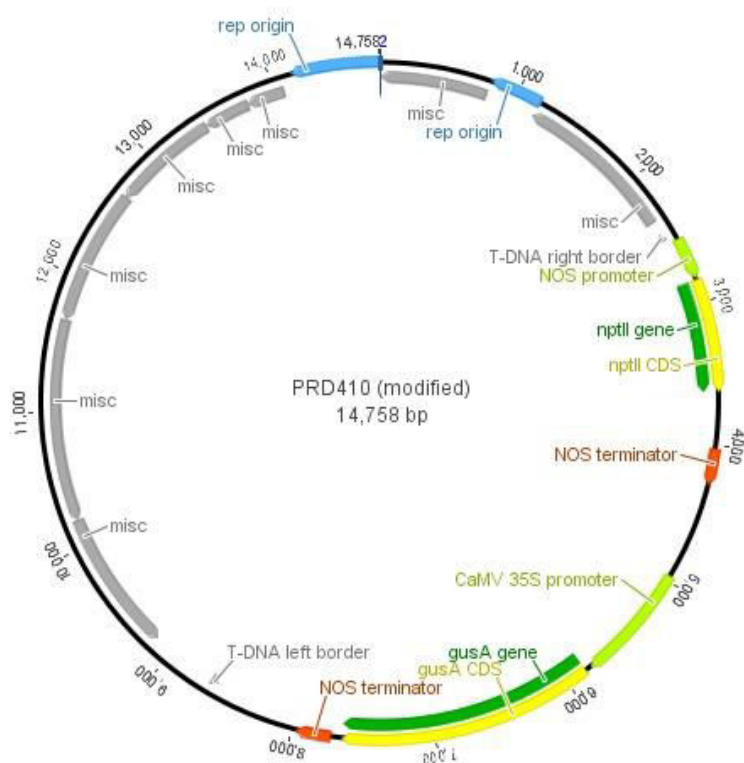
Cílový vektor	Amplifikovaný úsek	Název primeru	Sekvence primeru	Přidané restrikční místo pro enzym
pRD410	Promotor <i>FBA</i>	FBA_FWD	CTGCAGTCACATAGCTAGCAGACGATCG	<i>Pst</i> I
		FBA_REV	GGATCCAGTGATGGTGATCAATCTCTC	<i>Bam</i> HI
	Promotor <i>AHL18</i>	AHL18_FWD	CTGCAGATGACACAGATGCAAG	<i>Pst</i> I
		AHL18_REV	GGATCCATTCCTCTTCTGATTCGCTA	<i>Bam</i> HI
	Promotor <i>SEC7</i>	SEC7_FWD	CTGCAGCCACCGGTAACGAAT	<i>Pst</i> I
		SEC7_REV	GGATCCGAGCTCAGCGACTCA	<i>Bam</i> HI
pEntr1A	Promotor <i>AHL18</i>	AHL18_FWD	CTGGTACCTCTGATGCTAAGTGCCG	<i>Kpn</i> I
		AHL18_REV	TCGTCGACTCCTCTTCTGATTCGC	<i>Sal</i> I
	Promotor <i>SEC7</i>	SEC7_FWD	CGAGGTACCGGCTTACCTCACCG	<i>Kpn</i> I
		SEC7_REV	CAGTCGACACGGCGAGCTCAG	<i>Sal</i> I
TagmRUBY	Promotor+gen <i>AHL18</i>	AHL18_FWD	CAACATCTGCAGACCTCAGCTTTCAGCGA	<i>Pst</i> I
		AHL18_REV	TTAGGATCCAAAGACGGTCGTTGCGTTCC	<i>Bam</i> HI
	Promotor+gen <i>AHL22</i>	AHL22_FWD	CGGCTGCAGGTGCGAGTGTGAGCTGG	<i>Pst</i> I
		AHL22_REV	GCGGGATCCAAAGATGGTCTCGGAGTTCC	<i>Bam</i> HI
Linie	Mutovaný gen	Primer LP	Primer RP	
SALK_022937	<i>AHL28</i>	AGTTTCTTTGCTCTTCCTCCG	GTCACCACTGCTTACGAAAGC	
SALK_065839	<i>AHL28</i>	TGAGAAACCATTGATGGAGATG	TTTTTGGGATCTTTCTGGGTC	
SALK_143279	<i>AHL22</i>	ACTCTTCAGCCGAAAAGATC	CTGCTAGTCAACGAAAACAC	
SALK_151047	<i>AHL29</i>	CAGCATGTTTCTCCATCTCC	TGGAGACTCCTCTTCCTCTCC	
SALK_018866	<i>AHL22</i>	GAAAAGACTCGTGAAGTGTTC	AAGACGGTGACACTTTCATG	
SALK_120768	<i>AHL2</i>	AAGAGGTCCCACCACTGAAG	TTAATTTCCCATCGGATTC	
SAIL_646_A02	<i>AHL28</i>	CACAAATTTCAAAGGCTCACG	TTCCGTGGAAGTAATGGTTG	
SALK_085216	<i>AHL29</i>	CAGCATGTTTCTCCATCTCC	TGGAGACTCCTCTTCCTCTCC	
SAIL_346_C06	<i>AHL18</i>	TATCGTTGGGATGCTCTTAG	ACGTCATGGAGATAACCAACG	

Tabulka 14: Seznam primerů. V horní části jsou primery, které byly použity pro klonování. Ve spodní části tabulky se nachází primery pro genotypování.

#### 9.2.4. Plasmidy

Plasmid je cyklická molekula DNA, kterou je schopen příslušný modelový mikroorganismus replikovat a exprimovat její geny, tedy i selekční a reportérové markery. Při klonování dochází k vkládání sekvence DNA, získané amplifikací pomocí PCR, do předem definovaného místa plasmidu (vektoru). *Agrobacterium tumefaciens* má schopnost definovanou část binárního plasmidu přenést, v podobě T-DNA, do genomu modelové rostliny, kde pak probíhá studium daného genu.

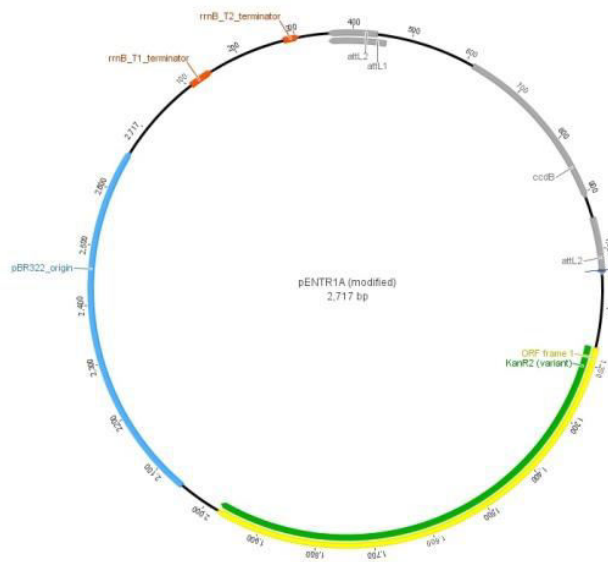
Zde uvedené plasmidy byly použity v experimentální části této práce.



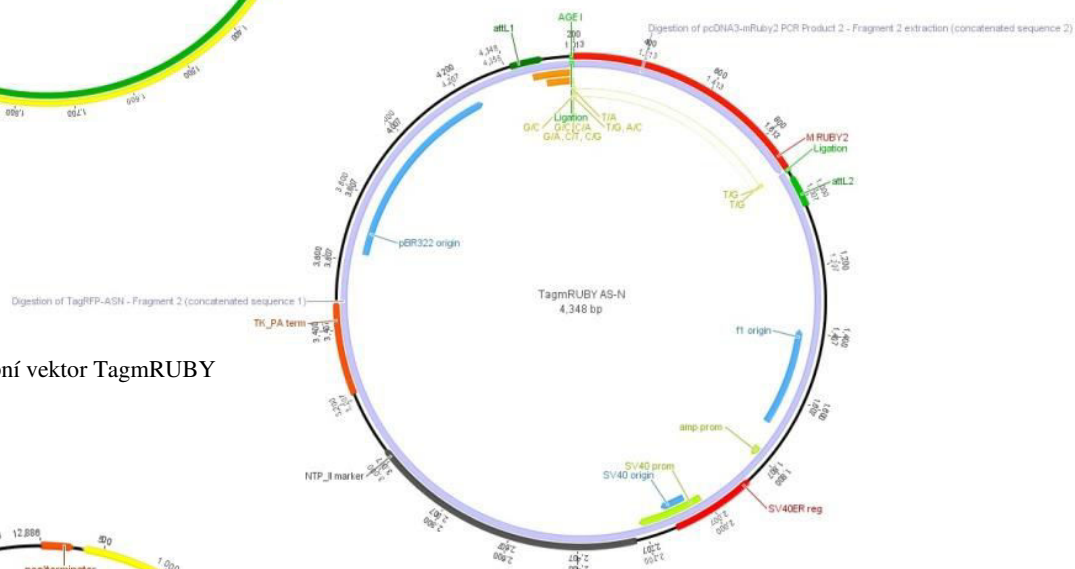
Obrázek 6: Binární vektor pRD410

Binární vektor pRD410 (Obrázek 6) byl zpočátku používán pro zaklonování promotorů kandidátních genů – FBA, AHL18 a SEC7. Díky jeho značné velikosti, nízkému počtu kopií v bakteriích a ne zrovna ideálnímu rozložení restrikčních bylo po roce neúspěšné práce od tohoto vektoru ustoupeno.

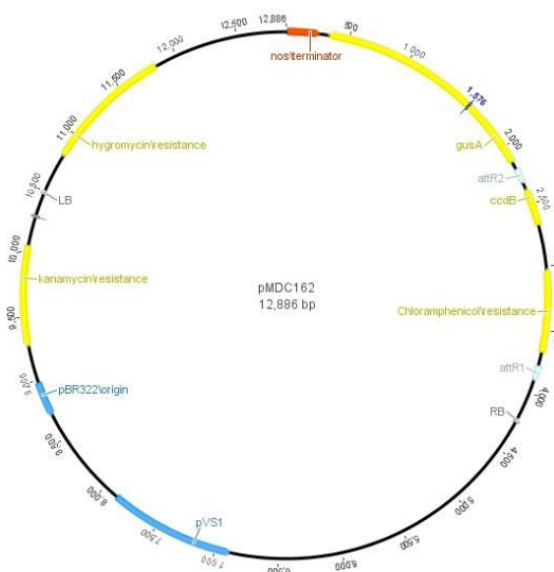




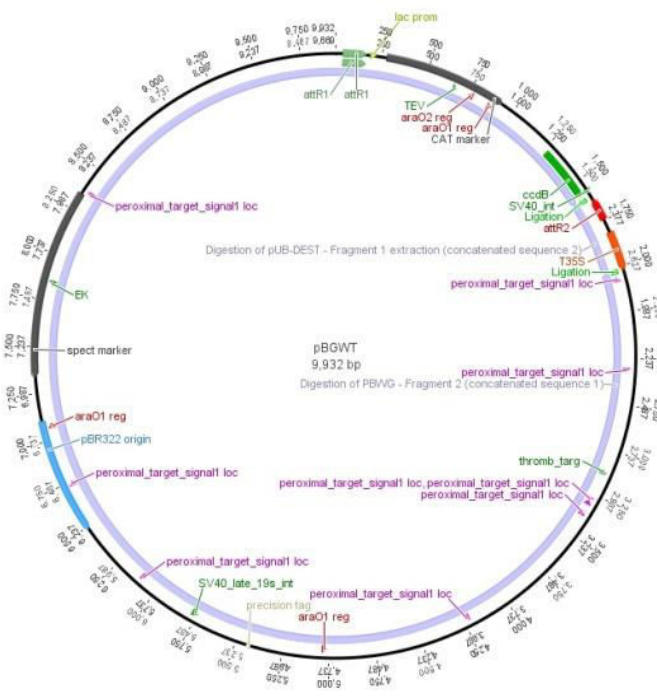
Obrázek 7: Vstupní vektor pENTR1A



Obrázek 8: Vstupní vektor TagmRUBY



Obrázek 9: Cílový vektor pMDC162



Obrázek 10: Cílový vektor pBGWT

Pro další, úspěšnější postup byl zvolen GATEWAY™ systém, v němž byly používány dva typy vektorů. Menší vstupní vektory (Obrázek 7 a 8), které se v bakteriích geny pro příslušné rezistence a slouží k pomnožení plasmidu v *E. coli*. S těmito vektory byla, díky jejich malé velikosti, poměrně snadná manipulace. Ze vstupního vektoru byla nejprve restrikcí vyštěpena *ccdB* kazeta, která byla nahrazena insertem. V případě, že se do bakterie *E. coli* kmene DH5 $\alpha$  dostal vektor s *ccdB* kazetou, bakterie byla zahubena. Pomocí LR reakce (Kapitola 9.2.10) byl insert, pomocí rekombinačních míst *attL/attR*, přenesen do většího, cílového vektoru (Obrázek 9 a 10), který, krom selekčních markerů, nese i příslušný reportérový gen. Tento vektor je již binární, tudíž kompetentní k transformaci rostlin prostřednictvím *A. tumefaciens*.

### 9.2.5. Restrikční štěpení

Restrikční endonukleázy jsou enzymy, které jsou schopny štípat specifické sekvence DNA. Restrikční místa byla do sekvence přidávána jako součást primerů. Použité enzymy při štípání DNA zanechávaly na vlákně přesahy (lepivé konce), které byly využity dále při ligaci. V této práci bylo často používáno dvojité štěpení – sekvence DNA byla restrihována dvěma různými enzymy, na začátku a konci sekvence. Příslušné fragmenty byly od sebe odděleny, vyříznuty a vyčištěny za využití agarové elektroforézy (Kapitola 9.2.8 a 9.2.9). Restrikce byla také používána pro kontrolu plasmidů, vyizolovaných z bakterií (Kapitola 9.1.3).

Restrikční reakce byla míchána na ledu, vlastní restrikce pak probíhala přes noc při 37°C. Použité restrikční enzymy (Thermo Scientific/New England Biolabs), byly, na základě online nástroje Double Digest Finder/Calculator na stránkách výrobce, kombinovány s příslušnými pufrů. Ukázkové schéma restrikční reakce je v Tabulce 15.

Výrobce	Thermo Scientific		New England Biolabs	
	Složky reakce	Objem	Složky reakce	Objem
	dH <sub>2</sub> O	8 $\mu$ l	dH <sub>2</sub> O	12 $\mu$ l
Pufr	Pufr BamHI	2 $\mu$ l	Pufr 3.1	2 $\mu$ l
Substrát enzymů	Plasmid pENTR1A	9 $\mu$ l	Plasmid TaqmRUBBY AS-N	4 $\mu$ l
Enzymy	<i>XhoI</i>	0,5 $\mu$ l	<i>PstI</i>	1 $\mu$ l
	<i>KpnI</i>	0,5 $\mu$ l	<i>BamHI</i>	1 $\mu$ l

Tabulka 15: Ukázkové příklady restrikce vektorů pomocí dvou enzymů. V obou případech zde vznikly lepivé konce, které byly využity při ligaci.

### 9.2.6. Zatupení konců

Zatupení konců bylo používáno při práci s vektorem pRD410, kde musely být použity jiné restriční enzymy na vektor a jiné na insert. Výsledkem byly sekvence otevřeného plasmidu a insetru s lepivými konci, které ale nebyly kompatibilní. Zatupení je proces, při němž dojde k dosyntetizování, a tím k odstranění přesahu na jedné či obou stranách sekvence, díky čemuž vektor a insert přestanou být nekompatibilní. Zatupení ale snižuje účinnost ligace.

V případě této práce byl vektor nejprve naštěpen prvním enzymem ve 30 $\mu$ l reakci, restrikce byla tepelně inaktivována. Zatupení probíhalo přidáním 3 $\mu$ l 1mM nukleotidů a 0,2 $\mu$ l T4 DNA polymerázy, po dobu 20 minut při 11°C. Po teplotní inaktivaci enzymu (75°C, 10 minut) následovala restrikce druhým enzymem. Všechna práce byla prováděna na ledu.

### 9.2.7. Ligace

Ligace je metoda, při níž jsou, pomocí enzymu T4 ligázy (Thermo Scientific), spojeny fragmenty DNA – v tomto případě vektor a insert. Díky přítomnosti lepivých konců je dána orientace insertu vůči vektoru. Při výpočtu složek ligační směsi je třeba dbát koncentrace DNA výchozích látek [ta byla zjišťována buď agarózovou elektroforézou nebo pomocí přístroje NanoDrop2000 Spectrophotometer (Thermo Scientific)] a stechiometrických poměrů. Pro případné zahušťování roztoku byl využit Concentrator Plus (Eppendorf). Insert je třeba dát v nadbytku – aby se zvýšila pravděpodobnost, že se s vektorem potkají ve správné orientaci.

Reakční směs pro ligaci byla míchána na ledu. Příklad ligační směsi, která vedla k pozitivním bakteriálním koloniím, je uveden v Tabulce 16. Ligace běžela přes noc při 15°C, následně byla teplotně inaktivována (65°C, 10 minut).

Složky ligační směsi	Objem
Insert – AHL18; 2,6kbp	4 $\mu$ l
Vektor – pENTR1A; 2,3kbp	6 $\mu$ l
10xT4 pufr	1,5 $\mu$ l
dH <sub>2</sub> O	3 $\mu$ l
T4 ligáza	0,5 $\mu$ l

Tabulka 16: Příklad ligace, kdy koncentrace rozstříženého vektoru byla přibližně 5x menší než koncentrace insertu po restrikci. Celkový objem reakce byl 15 $\mu$ l.

Po tepelné inaktivaci je třeba ligační směs odsolit, aby neměla vysokou vodivost. (Kapitola 9.1.10). K odsolení byly použity odsolovací komůrky, které byly připraveny rozvařením odsolovací směsi (Tabulka 17), která byla rozalikvotována do 1,5ml

zkumavek. Zkumavky byly se stojánku přelepeny klávodací páskou, do které byla vpíchnuta žlutá špička, jejíž hrot sahal asi do 1/3 výšky odsolovací směsi ve zkumavce. Směs se nechala ztuhnout, špičky byly vyňaty a komůrky se skladovaly v lednici, obalené parafinem. Pro odsolení bylo 10 $\mu$ l ligační směsi napipetováno do komůrky do otvoru po žluté špičce a nechalo se odpolovat 90 minut v lednici.

Složky směsi	Koncentrace	Navážka
dH <sub>2</sub> O	-	30,03g
Glukóza	100mM	0,5945g
Agaróza	1%	0,3g

Tabulka 17: Složení odsolovacího roztoku. Tři setiny gramu vody navíc jsou počítány na odpar. Počítáno na 30ml odsolovacího roztoku, což je asi 20 odsolovacích komůrek.

### 9.2.8. Gelová agarózová elektroforéza

Gelová elektroforéza je metoda, využívající negativního náboje DNA. Je založená na rozdělávání DNA podle její schopnosti procházet porézním gelem, tudíž podle velikosti, případně terciární struktury. Hnací sílu pro transport DNA gelem poskytuje stejnosměrný elektrický proud, tvořící pole o napětí 5 - 10V/cm, v závislosti na zvoleném napětí.

Agarózové gely byly připravovány nalitím rozvařeného média (Tabulka 21) do forem s hřebenem, do vzniklých jamek pak byly po utužení gelu nanášeny vzorky. Před nanesením na gel byly vzorky smíchány s loadovacím pufrem (Tabulka 20) v poměru 5:1. Vzorky byly nanášeny do jamek gelu, umístěného v elektroforézní vaně s 0,5xTAE pufrem (připravovaným z koncentráту 50xTAE, jak uvádí Tabulka 19), v němž byl gel celý ponořen. Do jamky vedle vzorků byl nanášen srovnávací standard pro určení délky a koncentrace fragmentů DNA – marker 1kbp GeneRuler pro klonování, 100pb GeneRuler pro genotypování (oboje Thermo Scientific, Obrázek 11. Pro focení gelů byl využíván G:BOX s UV transiluminátorem (SynGene) a k němu kompatibilní software GeneSnap. V případě vyřezávání určitého bandu DNA byla použita UV lampa TCX-20.M (Vilber Lourmat).

Složky	Množství
TRIS base	121g
Kyselina octová, vychlazená	28,5ml
EDTA	50ml
dH <sub>2</sub> O	421,5ml

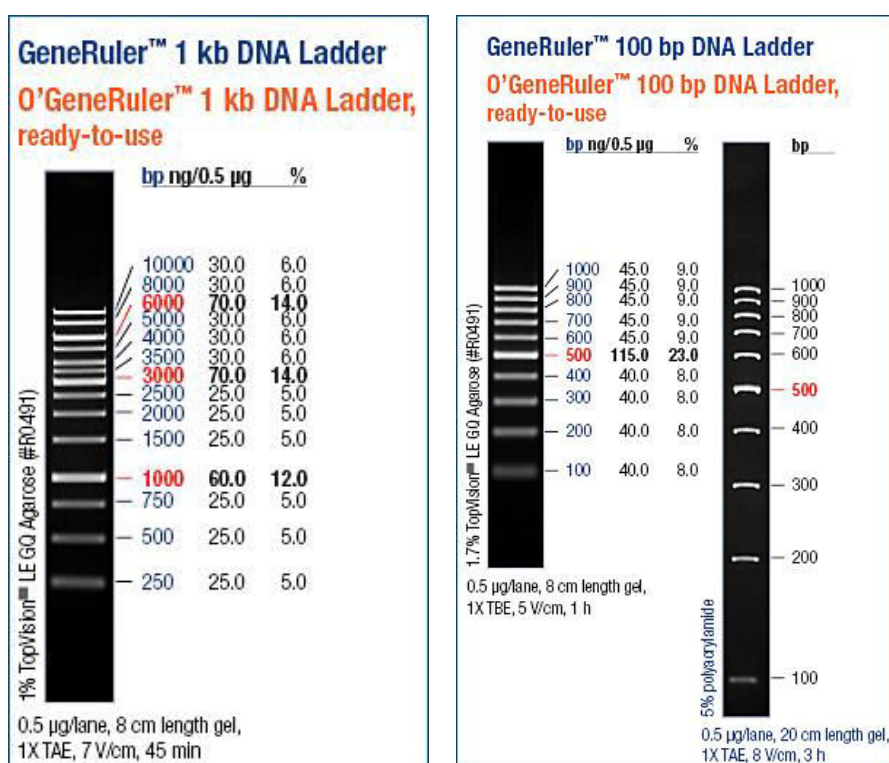
Tabulka 19: Složení roztoku 50xTAE

Složky	Koncentrace v roztoku	Objem
Bromfenolová modř	0,03%	0,015g
Glycerol (čistý, 99,2%)	60%	30,24ml
TRIS HCl (100mM, pH 7,6)	10mM	5ml
EDTA (0,5M, pH 8,0)	60mM	6ml
dH <sub>2</sub> O	Doplnit do 50ml	8,76ml

Tabulka 20: Složení 50ml 6xloadovacího pufru pro nanášení vzorků do jamek gelu

Složky	Koncentrace v roztoku	Množství
Agaróza	1,2%	3,6g
0,5xTAE	-	300ml
GelRed™	0,01%	30μl

Tabulka 21: Složení 300ml média pro agarózovou elektroforétu. TAE pufr s agarózou byl rozvařen v mikrovlnné troubě, po mírném zchlazení byl přidán GelRed™ (Biotium) a médium bylo rozlito do forem s hřebeny.



Obrázek 11: 1Kb a 100pb markery sloužily jako standardy pro určování délky a koncentrace fragmentu DNA na gelu.

### 9.2.9. Izolace DNA z fragmentu gelu

Izolace DNA z fragmentu gelu byla využívána vždy, když byl, pomocí agarózové gelové elektroforézy, oddělen a vyříznut požadovaný fragment DNA, zejména produkt restrikce. Hranolek gelu byl vyříznut do předvážené zkumavky. Pro lepší rozpouštění byla zkumavka s gelem umístěna na několik minut do mrazáku. Pro izolaci DNA byl používán High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), bylo postupováno podle návodu výrobce. Kit sloužil i pro přečištění PCR produktu v kapalně fázi, kde byla výtěžnost izolace vyšší.

### 9.2.10. LR reakce

LR reakce je homologní rekombinace, která je využívána v GATEWAY® systému. LR reakce slouží k přenosu insertu ze vstupního vektoru (entry) do vektoru cílového (destination), bez nutnosti insert vyštěpovat a opět ligovat.

Nejprve byly změřeny koncentrace vstupního klonu (donoru) a cílového vektoru (akceptoru). Za pokojové teploty byly plasmidy smíchány (Tabulka 22), reakce byla doplněna do 4 $\mu$ l TE pufrém. Rekombinační enzym LR Clonase™II enzyme mix byl po dobu 2 minut inkubován na ledu s občasným zamícháním. K 4 $\mu$ l směsi plasmidů byl přidán 1 $\mu$ l LR Clonase™II enzyme mix, směs byla zamíchána a krátce stočena. Reakce byla inkubována přes noc při 22°C. K ukončení reakce byl použit 1 $\mu$ l Proteinasy K a vzorek byl inkubován 10 minut při 37°C. Tento „kanibalský“ enzym není nutné inaktivovat. Produkt LR reakce nebyl odsolován, k elektroporaci do *E.coli* DH5 $\alpha$  byl využit 1 $\mu$ l produktu. Následný postup odpovídal Kapitole 9.1.10 a následujícím.

Složka	Pokyn výrobce	Použito pro transkripční fúzi pAHL18::GUS
Donorový klon	50 – 150ng (1 - 7 $\mu$ l)	2,5 $\mu$ l (koncentrace 30ng/ $\mu$ l)
Akceptorový plasmid	150ng (1 $\mu$ l)	1 $\mu$ l (koncentrace 200ng/ $\mu$ l)
TE pufr (pH 8,0)	Do 8 $\mu$ l	0,5 $\mu$ l

Tabulka 22: LR reakce – pokyn výrobce a příklad úspěšné LR reakce, prováděné při experimentální části této práce. Výrobce uvádí celkový objem reakce 8 $\mu$ l s přidáním 2 $\mu$ l Proteinasy K, v této práci byla reakce prováděná v polovičním objemu. Koncentrace plasmidů byly měřeny přístrojem NanoDrop.

### 9.2.11. Transformace rostlin metodou Floral dip

Stabilní transformace rostlin byla prováděna metodou Floral dip, za využití bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Po elektroporaci (Kapitola 9.1.10) a otestování přečárkovaných kolonií (Kapitola 9.1.12) byly pozitivní kolonie sterilně zaočkovány do sterilní zkumavky se 3ml tekutého LB média s příslušnými antibiotiky, kde se nechaly růst 2 dny na třepačce při 28°C. Suspenze byla sterilně převedena do 50ml tekutého selekčního média ve 100ml Erenmayerově baňce, suspenze byla za stejných podmínek kultivována do zakalení, přibližně 24 hodin. Kultura byla přelita do 50ml falkony a v ní centrifugována 20 minut při 4500rpm za vytvoření peletu bakterií. Po slití supernatantu byl pelet resuspendován ve 20ml infiltračního média (Tabulka 23), a tato suspenze byla použita k vlastní transformaci.

Transformovány byly rostliny *Arabidopsis thaliana* Col-0. Před vlastní transformací jim byly odstříhány všechny již vytvořené šesule a květy, zbyly tudíž jen květní stvoly s množinou zavírajících pupat. Bakterie v infiltračním roztoku byly nality do malého igelitového sáčku, do něž byla postupně máčena všechna poupata. Každé poupě bylo v roztoku drženo přibližně 3 sekundy, pomocí jemné manipulace se sáčkem byl roztok

aplikován na všechna poupata ze všech stran. Po smočení všech poupat byla rostlina umístěna na 12 hodin do temna, a byla obalena igelitovým sáčkem, aby se zamezilo vysychání rostliny i bakterií.

Složky	Koncentrace	Množství
Sacharóza	5%	2,0g
Silwet L-77 (500 $\mu$ l/l)	0,05%	20 $\mu$ l
Voda	-	40ml

Tabulka 23: Složení infiltračního média. Počítáno na 40ml, tudíž na dvě transformace.

### 9.2.12. Selekce transformovaných rostlin

Po transformaci bylo z rostliny sklizeno značné množství semen, z nichž však jen zlomek nese inserci. Pro selekci transformovaných semen byla semena nejprve vysterilizována v otevřených 1,5ml zkumavkách plynným chlórem v exsikátoru. Vývoj plynného chlóru byl zajištěn přidáním 1,5ml koncentrované HCl do 50ml Sava. Exsikátor byl umístěn v digestoři. Sterilizace probíhala přibližně 5 hodin, pak byl exsikátor přenesen do flow-boxu a semena byla sterilně vyseta na plotnu se selekčním 0,2 MS médiem. Jako selekční marker byl využíván produkt genu příslušné resistance v T-DNA, která byla do rostliny vpravena bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Rostliny, schopné přežít na selekční plotně, byly úspěšnými transformanty.

Úspěšnost selekce byla ověřena přítomností reportérového genu, v případě transkripční fúze se jednalo o gen pro GUS, pomocí PCR s primery pro GUS. Následná úspěšná detekce aktivity GUS na F1 rostlinách také úspěšnost transformace potvrdila.

## 10. Výsledky

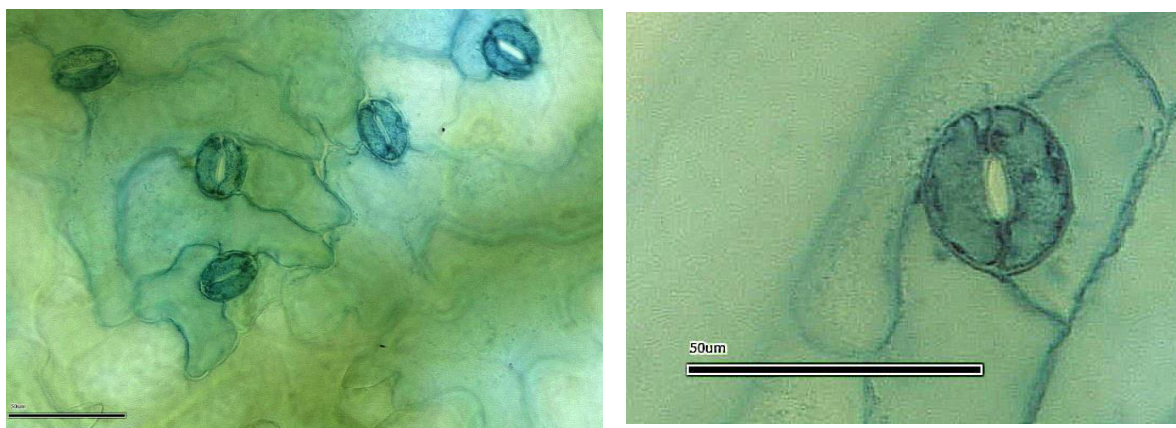
### 10.1. Expresní vzorec MGT180 odpovídá expresi genu AHL18

#### 10.1.1. Detekce aktivity GUS u linie MGT180

Semena linie MGT180 byla vyseta na agarovou plotnu s 02 MS médiem a 7 dní po vyklíčení byla na semenáčcích provedena detekce aktivity GUS. Při fixaci formaldehydem, který snižuje aktivitu enzymu, bylo modré zbarvení, indukující aktivitu GUS, velmi slabé, mnohá pletiva nebyla obarvena vůbec. Byla proto používána acetonová fixace.

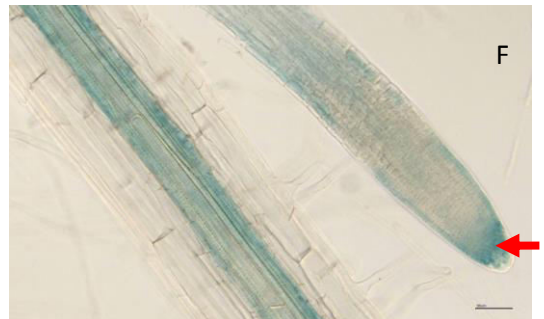
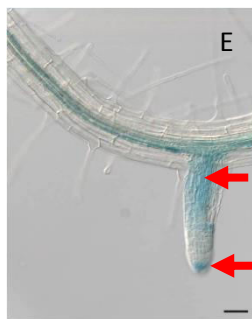
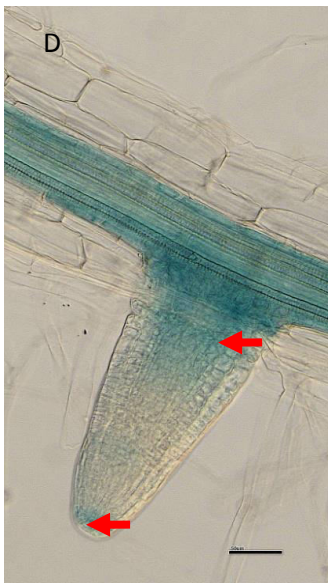
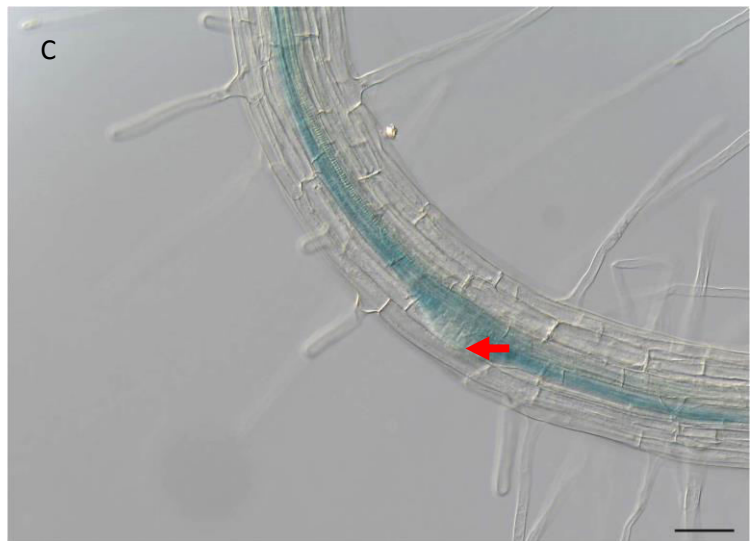
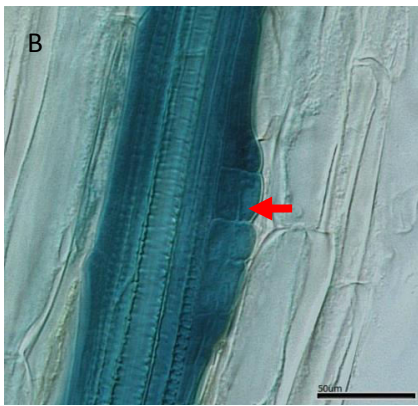
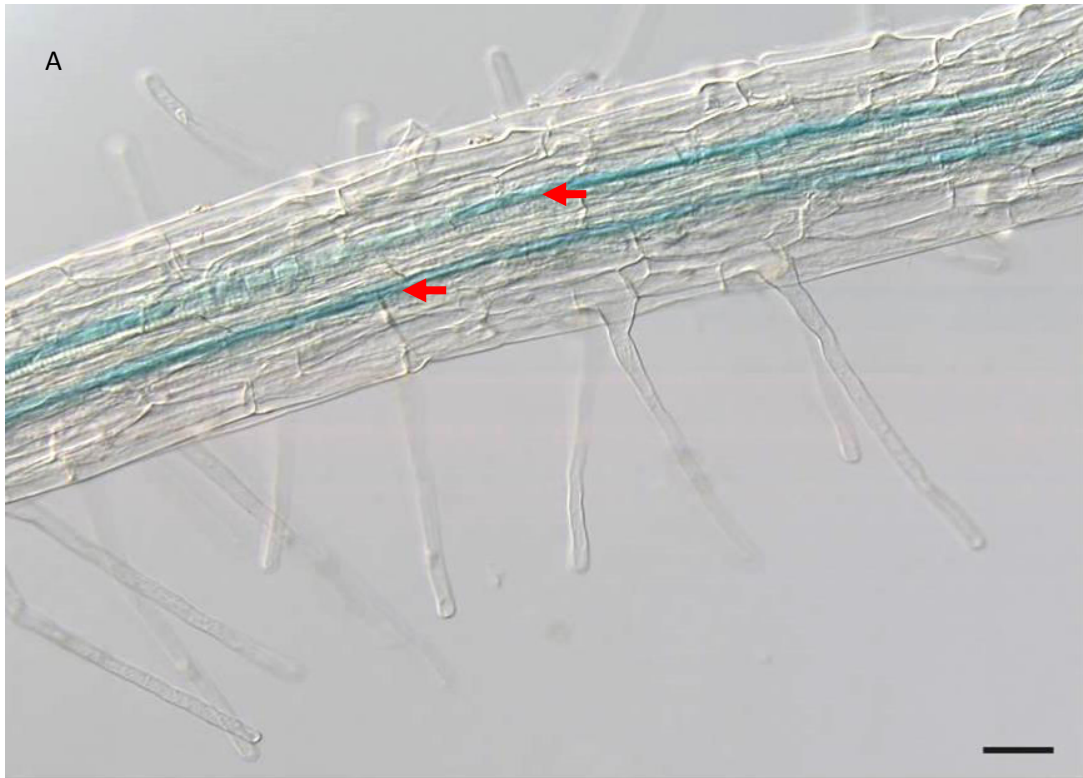
V nadzemní části rostlin byla aktivita GUS vázána na vodivá pletiva – modré zbarvení bylo patrné ve vodivých pletivech hypokotylu a řapíků, v hlavních listových žilkách a v některých svěracích buňkách průduchů (Obrázky 12).

V kořeni byla aktivita promotoru lokalizována do buněk pericyklu, přiléhajícím ke xylémovým pólům, což bylo dobře patrné při proostření buněk pericyklu a spirálovitě ztloustlých cévních elementů protoxylému. U mladých kořenových primordií byla exprese pozorována v celém objemu primordia, s postupným prorůstáním se omezila na bazální oblast primordia. Po vyoření byla ustanovena expresní doména v kořenové čepičce, zde byla exprese viditelná u primárního i postranních kořenů (Obrázky 13).



Obrázky 12: Lokalizace aktivity GUS v linii MGT180 ve svěracích buňkách průduchů. Kalibrační úsečka = 100µm.



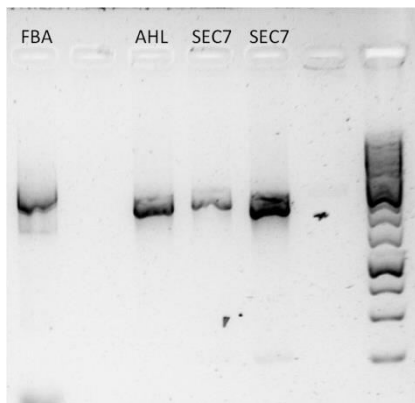


Obrázky 13 shrnují lokalizaci aktivity GUS u linie MGT180. **A** v primárním kořeni, **B** a **C** v prorůstajících primordiích, **D** a **E** v mladých postranních kořenech a **F** v kořenové čepičce postranního kořene. Červené šipky ukazují na lokalizaci zbarvení v různých vývojových stádiích kořenů. Kalibrační úsečka = 100 $\mu$ m.

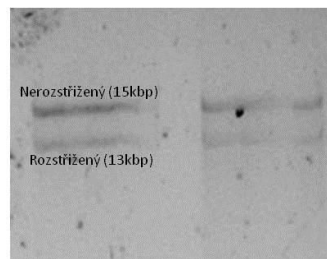
### 10.1.2. Klonování promotorů kandidátních genů do vektoru s reportérovým genem *GUS*

Pro potvrzení expresního vzorce a určení, kterému z kandidátních genů linie MGT180 odpovídá, byla provedena transkripční fúze promotorů s *GUS*. Zde je shrnut postup klonování:

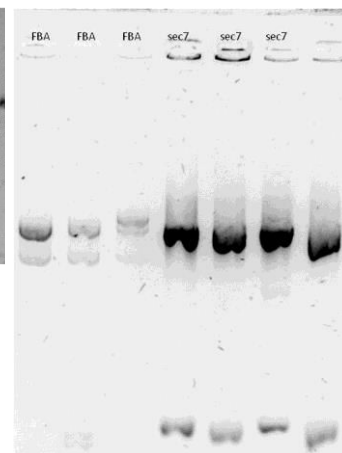
Nejprve jsem se snažila zaklonovat promotory všech tří kandidátních genů do binárního vektoru pRD410. Jako promotor byla brána genomová nukleotidová sekvence 2 – 2,5kbp před začátkem kódující sekvence. Na Obrázku 14 jsou vidět PCR produkty, Obrázek 15 ukazuje restrikci plasmidu. Ligace však nebyla nikdy úspěšná, vždy se mi objevovaly jen falešně pozitivní kolonie bakterií (Obrázek 16) v důsledku zbytku ligační směsi na povrchu setřené kolonie. Ligace probíhala na polotupo, z důvodu nekompatibility restrikčních míst plasmidu a amplifikované sekvence. Kontrolní restrikce identifikovala vždy pouze prázdný plazmid.



Obrázek 14: PCR produkty = promotory všech tří kandidátních genů. Na gel dávkováno 2 $\mu$ l reakce a 1 $\mu$ l 1kbp markeru (vpravo).



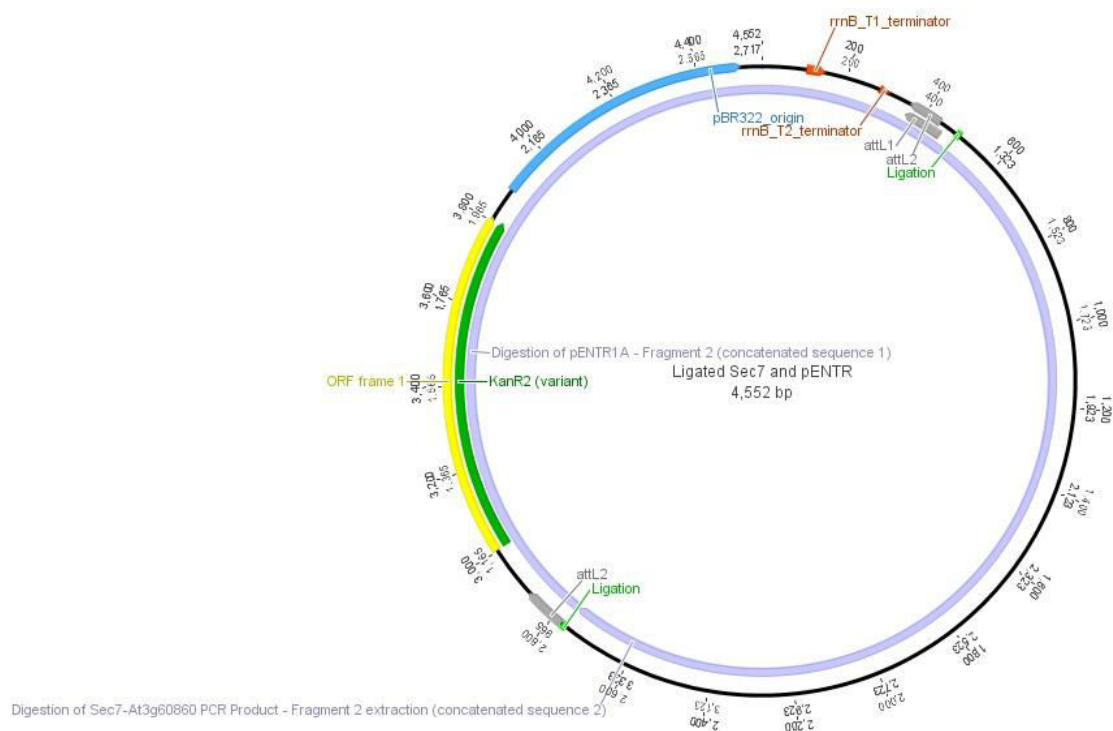
Obrázek 15: Produkt restrikce plasmidu pRD410. Na gel nanášeny 2 $\mu$ l restrikční směsi.



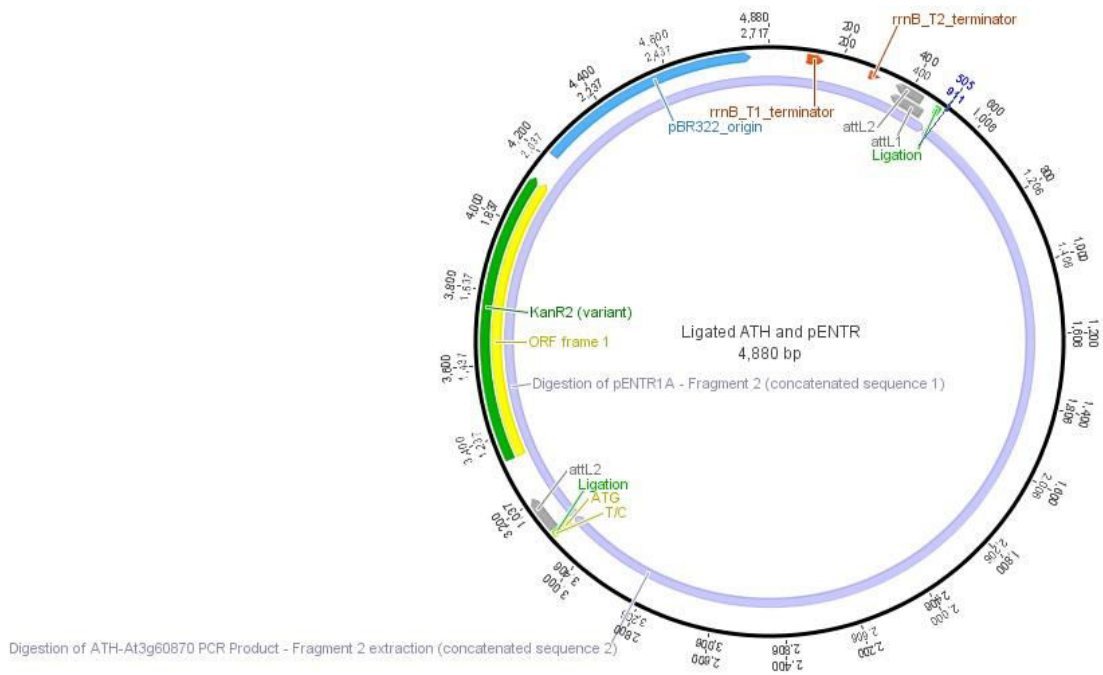
Obrázek 16: Falešně pozitivní PCR nepřechárkovaných narostlých bakteriálních kolonií *E. coli*.

Po neúspěchu s vektorem pRD410 jsem hledala jiný vektor, do kterého bych zkusila promotory nyní jen dvou kandidátních genů, *SEC7* a *AHL18*, zaklonovat. Pro vyšší efektivitu byl zvolen GATEWAY™ systém, v němž lze inserty mezi jednotlivými vektory přesouvat pomocí homologní rekombinace. Pro zaligování se používaly malé vektory, vzniklé plasmidy bylo možno velmi efektivně pomnožit v *E. coli*. Originální vektory v rámci systému GATEWAY™ obsahují *ccdB* (Kill) kazetu, která znemožňuje jejich pomnožení v bakterii *E. coli* kmene DH5α, a je třeba je pomnožovat pomocí kmene DBB3.1, který je k *ccdB* kazetě rezistentní. Při ligaci do vstupního vektoru vždy bylo nezbytné nejprve *ccdB* kazetu pomocí restričních endonukleáz vyštěpit, místo ní byl pak zaligován zvolený insert. Během rekombinační výměny mezi plasmidy docházelo k výměně insertu za *ccdB* kazetu.

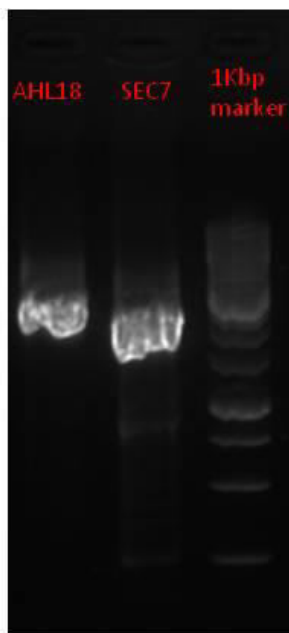
Promotory dvou kandidátních genů byly klonovány do vektoru pENTR1A, jako selekční marker byl použit kamamycin. Obrázky 17 a 18 ukazují mapu plastidů po zaklonování, tyto mapy byly vytvořeny pomocí programu Geneious. Na dalších Obrázcích je pak shrnut postup klonování.



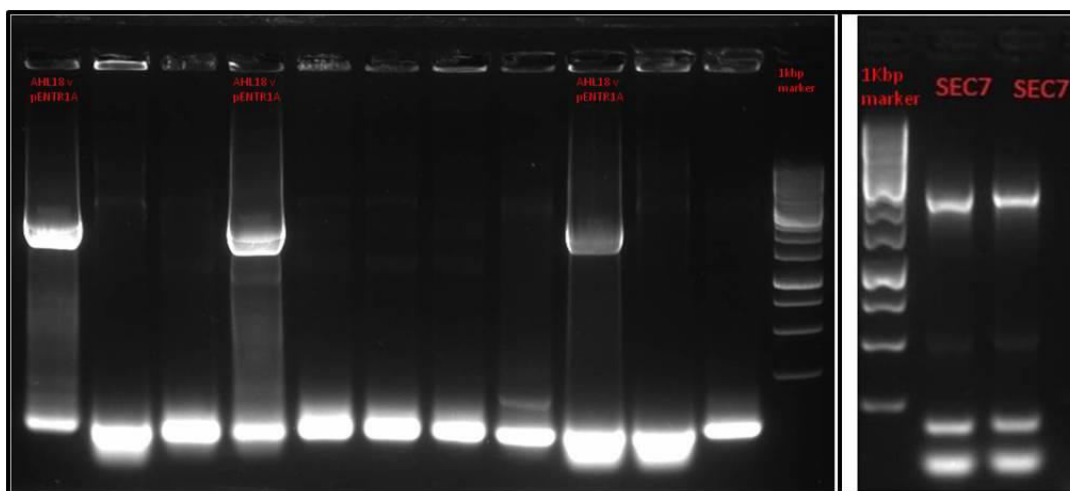
Obrázek 17: Mapa konstruktů promotoru *SEC7* ve vektoru pENTR1A. Insert je znázorněn v pravé a spodní části šedě. attL jsou rekombinační místa na okraji insertu. Zeleně je gen pro kanamycinovou rezistenci.



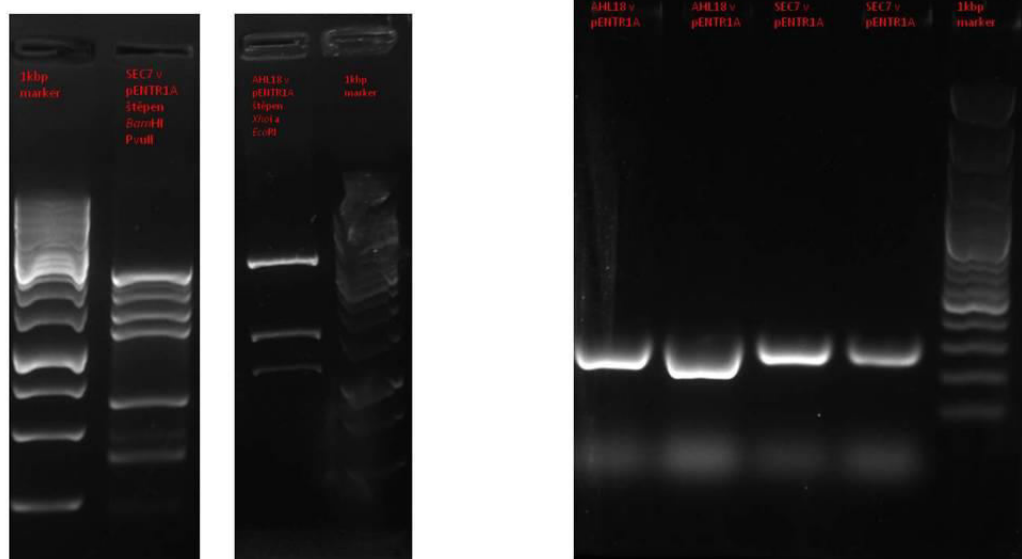
Obrázek 18: Mapa konstruktů promotoru AHL18 ve vektoru pENTR1A. Insert je znázorněn v pravé a spodní části šedě. attL jsou rekombinační místa na okraji insertu. Zeleně je gen pro kanamycinovou rezistenci.



Obrázek 20 ukazuje amplifikaci promotorů AHL18 a SEC7 pomocí Taq polymerázy. Na gel byly dávkovány 2 $\mu$ l PCR produktu.



Na Obrázku 21 (nahore) lze vidět produkt PCR přečárkových kolonií bakterií, transformovaných konstruktem AHL18 (vlevo) a SEC7 (vpravo) v pENTRu. Plasmidy byly z bakterií vyizolovány a kontrolně restrihovány, jak ukazují obrázky 22 a 23 (dole).



Obrázek 24 ukazuje produkt PCR reakce, kde byla jako templát využita DNA transformovaných rostlin, s použitím primerů pro GUS. Tímto bylo ověřeno, že obě linie transformovaných rostlin nesou gen pro GUS.

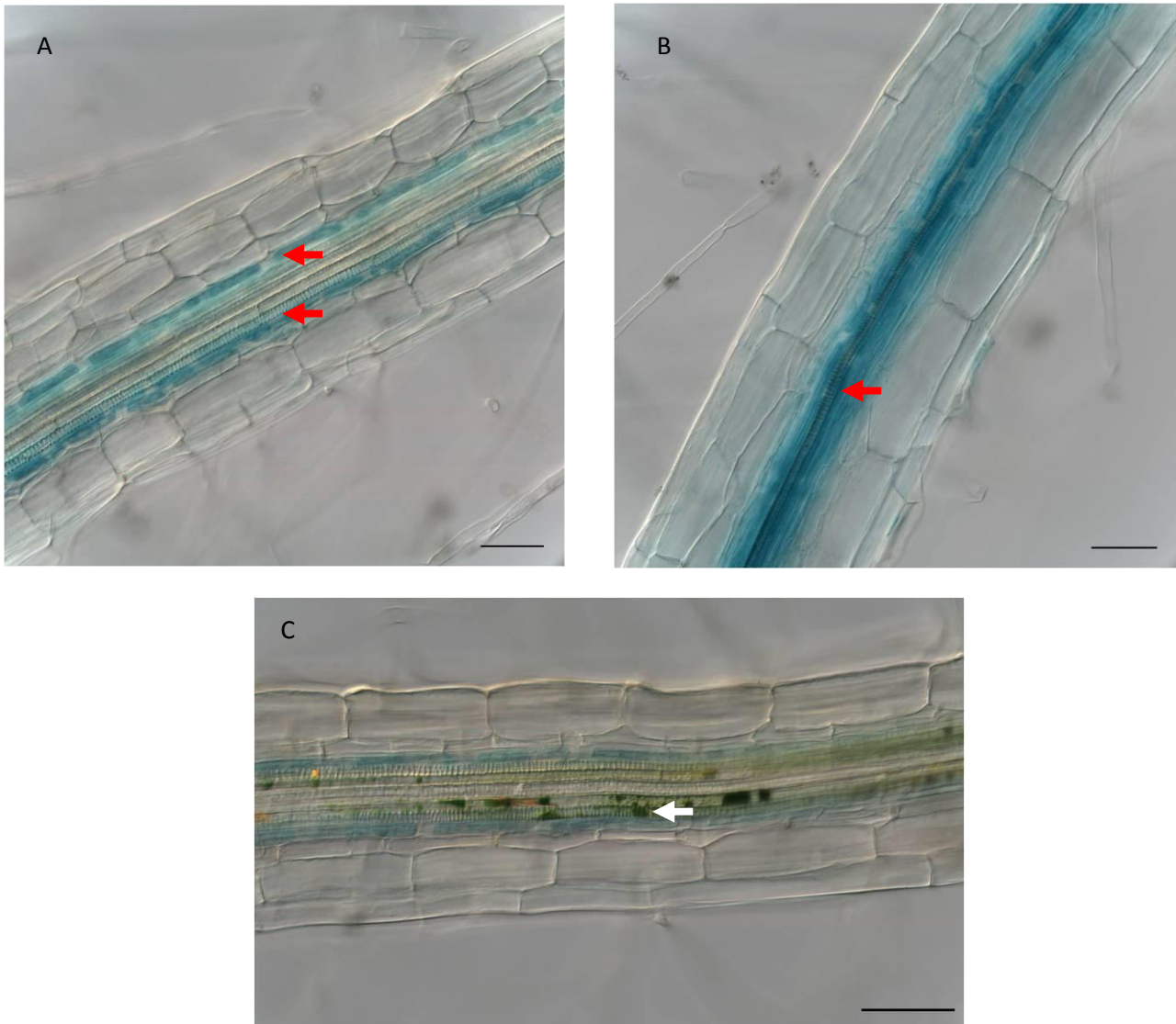
Po úspěšném zaklonování promotorů obou kandidátních genů byla provedena LR reakce, čímž byl insert rekombinací přesunut do binárního vektoru pMDC162, kterým byly, po jeho pomnožení, transformovány bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Pozitivně PCR otestované kolonie byly použity k transformaci rostlin metodou Floral dip. Získaná semena byla sterilizována suchou cestou (plynným chlorem), a vyseta na plotny s 0,2 MS médiem, jako selekce byl použit hygromycin. Přeživší jedinci byli z plotny přeneseni na rašelinové pelety. Metodou Oxford jim byla vyizolována DNA, která sloužila jako templát pro kontrolní PCR s použitím primerů pro amplifikaci části sekvence, kódující *Uida*. Tímto bylo ověřeno, že tito jedinci vskutku jsou úspěšnými transformanty. Byly takto získány 4 linie rostlin *pAHL18:GUS* (tzn. ze 4 vyselektovaných rostlin) a 3 linie *pSEC7:GUS*. Nebyl mezi nimi pozorován rozdíl ve fenotypu.

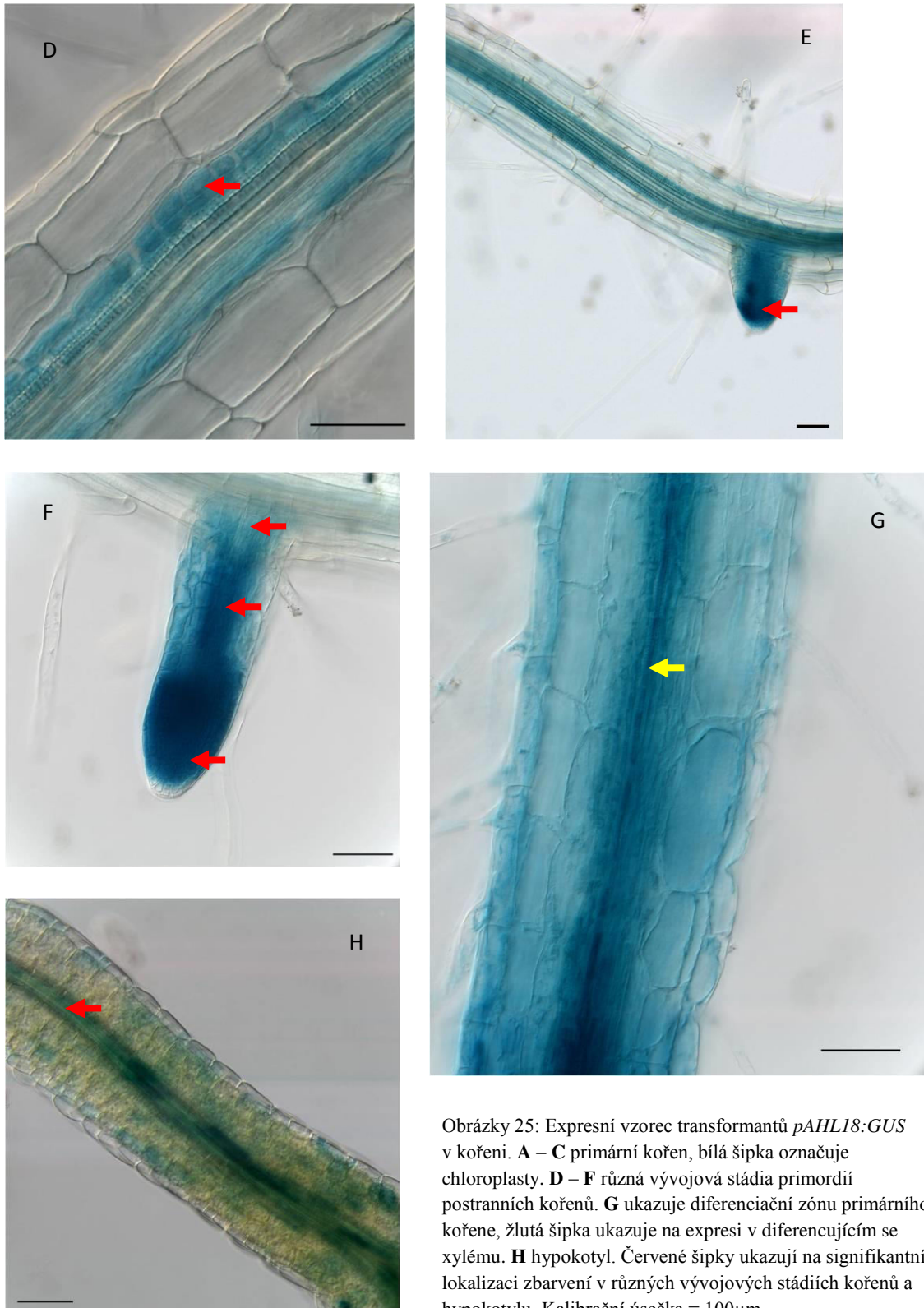
### 10.1.3. Detekce aktivity GUS u transformantů

Použita byla F1 semena transformantů. Ta byla vyseta na pevné 0,2 MS médium, sklizena byla 7 dní po vyklíčení, a byla na nich provedena detekce aktivity GUS.

Linie rostlin, majících gen pro GUS zařazen za promotor genu pro SEC7, byla po detekci celá modrá, promotor SEC7 je tedy aktivní v celé rostlině, zasaženému genu v linii MGT180 neodpovídá.

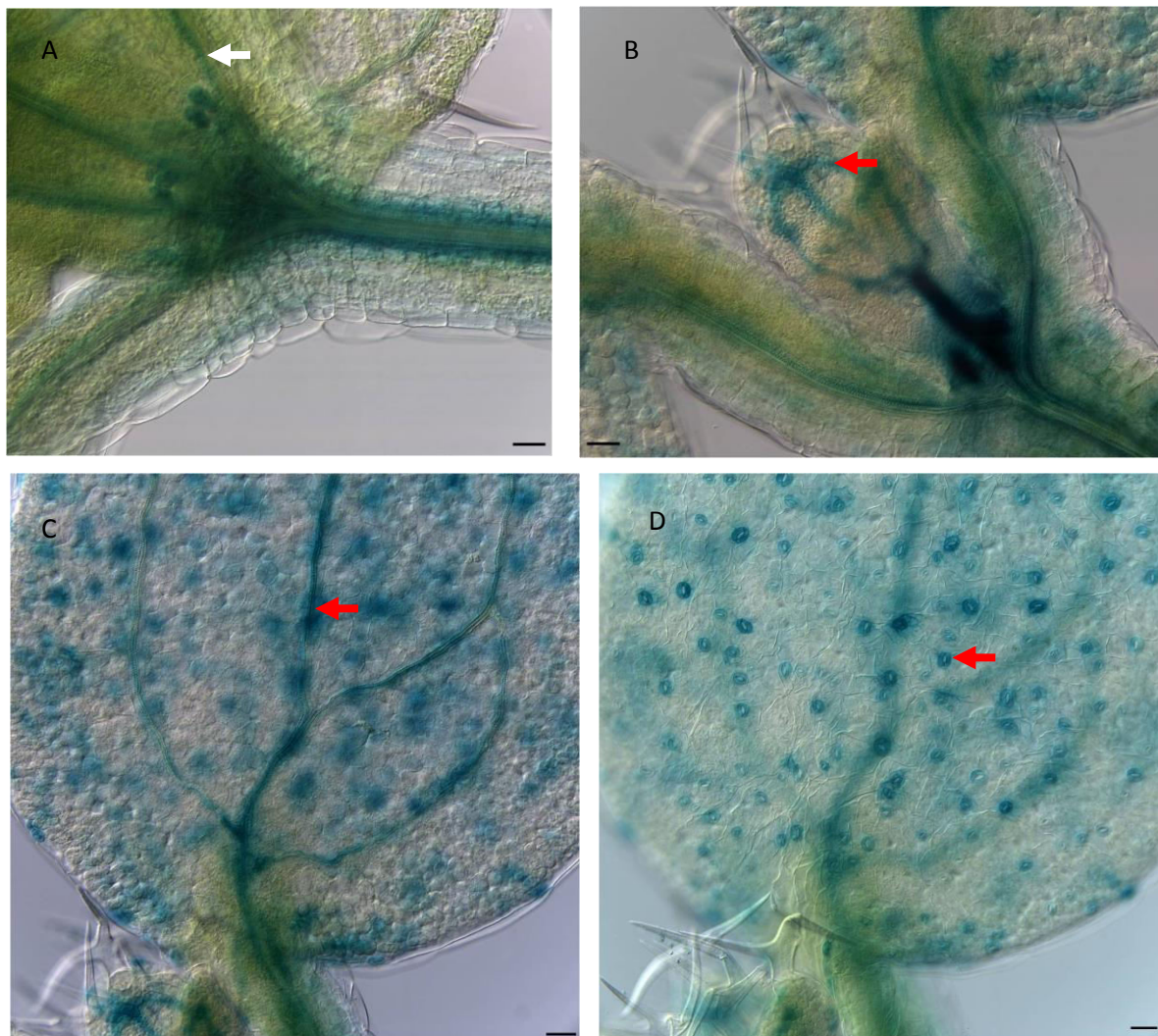
Druhá linie transformovaných rostlin, mající gen pro GUS zařazený za promotor *AHL18*, ve většině kritérií linii MGT180 expresně odpovídala. Expres u této linie byla celkově nápadně silnější, než u linie MGT180. V kořeni byla vázána na buňky pericyklu, přiléhající ke xylémovým pólům. Modré zbarvení indikovalo expresi i v celých mladých kořenových primordiích a zdá se, že u vyvíjejících se primordií dochází k soustředění aktivity GUS do oblasti vodivých pletiv (Obrázky 25).





Obrázky 25: Expresní vzorec transformantů *pAHL18:GUS* v kořeni. **A – C** primární kořen, bílá šipka označuje chloroplasty. **D – F** různá vývojová stádia primordií postranních kořenů. **G** ukazuje diferenciační zónu primárního kořene, žlutá šipka ukazuje na expresi v diferencujícím se xylému. **H** hypokotyl. Červené šipky ukazují na signifikantní lokalizaci zbarvení v různých vývojových stádiích kořenů a hypokotylu. Kalibrační úsečka = 100 $\mu$ m.

Obrázky 26 ukazují aktivitu GUS v listech.



Obrázky 26: Expresní vzorec transformantů *pAHL18:GUS* v listech. **A** přechod hypokotyly ve stonk se zkrácenými internodií, bílá šipka značí řapíky listů. **B** exprese v prokambálních provazcích vyvíjejícího se listu. **C** čepel listu, prostřená na vodivá pletiva. **D** Tatáž listová čepel, proostřená na spodní pokožku s průduchy. Kalibrační úsečka = 100 $\mu$ m.



#### 10.1.4. Porovnání expresního vzorce linie MGT180 a transformanta ProAHL18:GUS

Byly srovnávány semenáčky 7 dní, po vyklíčení, fixované v acetonu a barvené 14 hodin v temnu při 37°C. Semenáčky byly před vlastním pozorováním projasněny.

Na první pohled je patrné, že intenzita modrého zbarvení je vyšší u transformantů (než u linie MGT180) při zachování stejných podmínek barvení. Nejvíce je to patrné u kořenových špiček, které jsou u transformantů zbarveny tak sytě, že nelze rozeznat jednotlivé buňky, dále pak u svěracích buněk průduchů, kde se u linie MGT180 zbarvil sem tam nějaký průduch, u transformantů *AHL18* byla zbarvena podstatná část průduchů. Dalším parametrem v kořeni, ovlivňujícím intenzitu zbarvení, je jeho stáří – u MGT180 se barvily nejvíce starší části kořene, naopak u transformantů byly nejintenzivněji zbarveny mladé části. V konečném zhodnocení lokalizace exprese na úrovni pletiv se u linie MGT180 a u *AHL18* transformantů shoduje, liší se ale intenzita zbarvení, což může být způsobeno místem vložení inzertu do genomu. Konkrétně toto srovnání shrnuje Tabulka 24. Těmito experimenty bylo dokázáno, že expresní vzorec linie MGT180 odpovídá, s drobnými nuancemi, genu *AHL18*.

		MGT180	AHL18
	Celkový habitus	Zbarvení slabší	Zbarvení sytější, zejména v nejmladších částech kořene
Nadzemní část	Listy	Místo je zbarvení patrné v listových žilkách a ve svěracích buňkách průduchů, není zde však žádná pravidelnost.	Zbarvení lokalizováno nepravidelně ve svěracích buňkách průduchů a v listových žilkách. U vyvíjejících se listů i v prokambiólních provazcích.
	Hypokotyl	Zbarvení lokalizováno ve vodivých pletivech, ale vzhledem k tloušťce hypokotyly nebylo možné poříditi ostrou fotografii.	Zbarvení lokalizováno ve vodivých pletivech, ale vzhledem k tloušťce hypokotyly nebylo možné poříditi ostrou fotografii.
Kořen	Primární kořen	Expresse lokalizovaná v buňkách pericyklu, přiléhajících ke xylému. Často je patrné "rozmytí" zbarvení vlivem difuze meziproductů barvicí reakce. Nejsilnější je zbarvení ve starších částech kořene.	Expresse lokalizovaná v buňkách pericyklu, přiléhajících ke xylému, i zde je patrné "rozmytí" barvy. Intenzita zbarvení se zvyšuje v mladších částech kořene a graduje v kořenové špičce. Expresse patrná během diferenciaci xylému.
	Primordium	V rostlině jsou vidět primordia zbarvená (především rané fáze vývoje) i nezbarvená. Po proniknutí je zbarvení viditelné zejména v kořenové čepičce, na bázi a ve stélce.	Většina primordií je zbarvených, a to tím více, čím je primordium blíže ke špičce kořene. I zde je později exprese viditelná zejména v čepičce a středním válci.
	Postranní kořen	U delších postranních kořenů je pozorovatelné zbarvení v pericyklu, přiléhajícímu ke xylému. Zbarvení bývá však poměrně slabé.	U delších postranních kořenů je rovněž pozorováno zbarvení buněk pericyklu u xylémových pólů. Intenzita zbarvení roste směrem ke špičce postranního kořene, v nejmladších částech kořene je exprese v celém středním válci.
	Kořenová špička	U všech primárních a některých postranních kořenů je zbarvena i kořenová čepička, zbarvení pak přechází do pokožkových vrstev, kde se ztrácí.	Kořenové špičky jsou velmi intenzivně zbarveny u primárních i postranních kořenů, a to tak sytě, že od sebe nelze rozeznat jednotlivé buňky. Sytost zbarvení v kořeni vždy roste směrem ke kořenové špičce, kde je maximální.

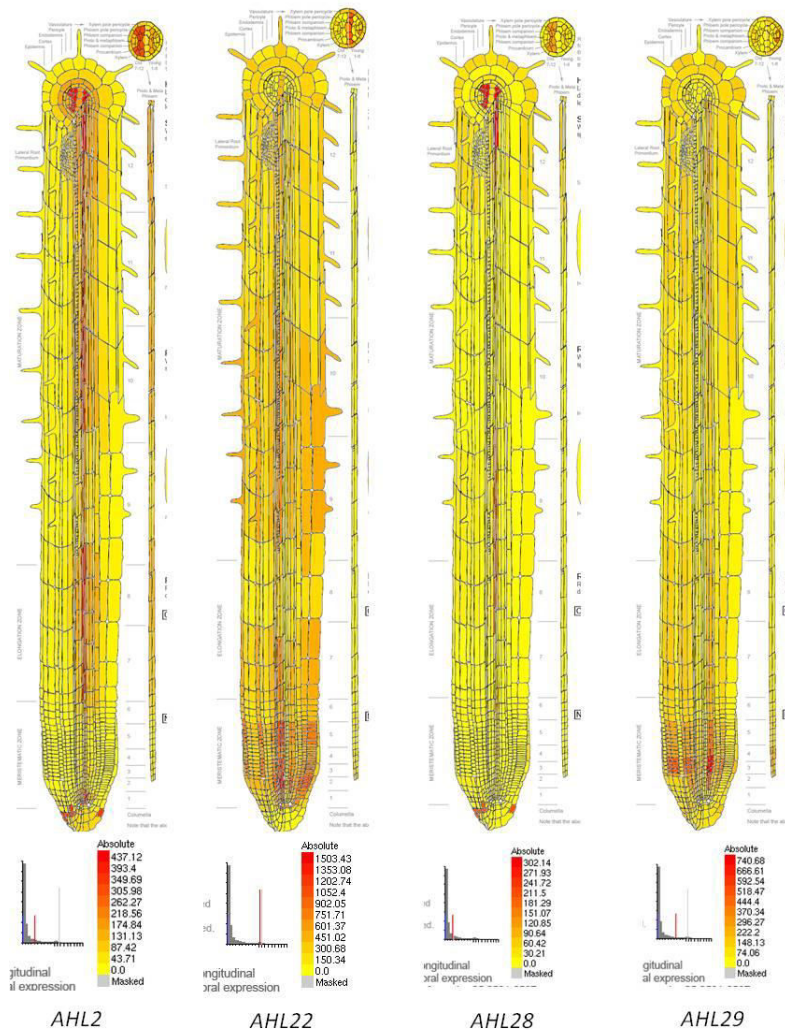
Tabulka 24 shrnuje rozdíly a podobnosti v expresním vzorci mezi linií MGT180 a *AHL18*.

## 10.2. Srovnání fenotypu na kořenech mutanta *ahl18* a dalších genů z rodiny *AHL*

### 10.2.1. Výběr linií dostupných inserčních mutantů

Genová rodina *AHL* genů u *Arabidopsis thaliana* čítá 29 členů, a ne všechny z nich již byly popsány. Jedním z ještě nepopsaných je i gen *AHL18*. Díky předpokládané funkční redundanci nebylo očekáváno, že by jednoduchý mutant měl fenotyp odlišný od kontroly.

Při výběru konkrétních inserčních mutantů jsem vycházela z expresních dat čipových experimentů, dostupných na eFP Browseru (<http://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), a byly vybírány geny, jejichž exprese je detekovatelná v kořeni. Genová rodina *AHL* se dělí na 2 třídy (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004), primárně byly vybírány geny ze třídy A, kam náleží i *AHL18* (Tabulka 25 a Obrázek 27), a podle stránky <http://signal.salk.edu/isects.html> k nim byly objednány příslušné genotypovací primery (Tabulka 14).



Obrázek 27: Tyto geny splnily výše uvedená kritéria – pochází z genové rodiny *AHL*, jejich exprese je vázána na určitá pletiva kořene a tři ze čtyř jsou zařazeny ve stejné třídě jako *AHL18*.

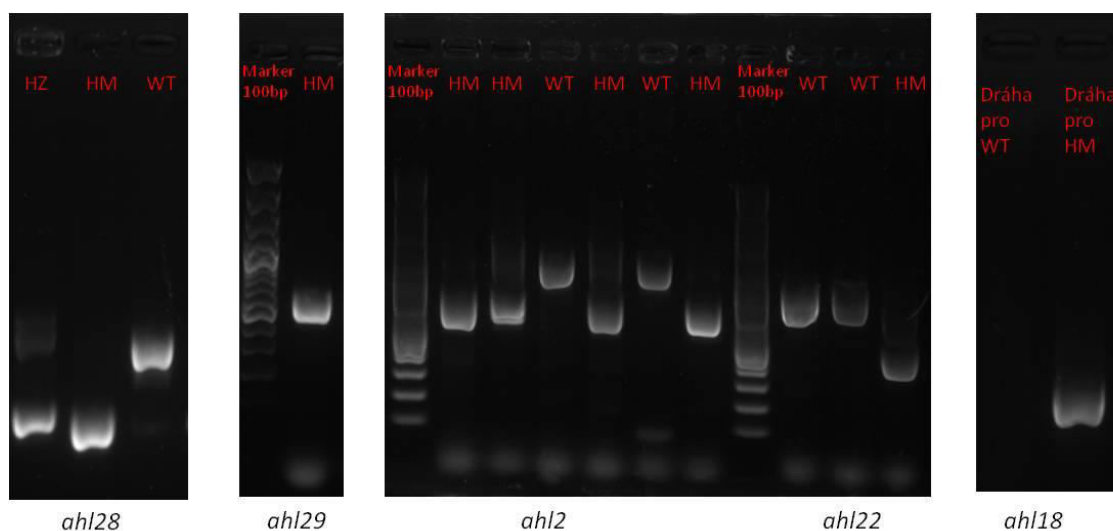
### 10.2.2. Genotypování jednoduchých mutantů, hodnocení kořenové architektury

Pro následující práci bylo objednáno několik linií inserčních mutantů. Pro inserční mutanty v genech, kde to bylo možné, byly objednány linie dvě. Soupis objednaných linií je v Tabulce 25.

Linie	Postižený gen
SALK_065839	<i>ahl2</i>
SALK_120768	<i>ahl2</i>
SAIL_346_C06	<i>ahl18</i>
SALK_018866	<i>ahl22</i>
SALK_143279	<i>ahl22</i>
SAIL_646_A02	<i>ahl28</i>
SALK_022937	<i>ahl28</i>
SALK_151047C	<i>ahl29</i>
SALK_085216C	<i>ahl29</i>

Tabulka 25 ukazuje seznam objednaných linií inserčních mutantů. S červeně označenými liniemi bylo dále pracováno.

Po ogenotypování (Obrázky 28), byly u všech používaných linií nalezeny homozygotně mutantní rostliny. S jejich F1 generací byla následně prováděna analýza kořenového systému. Na Obrázku 28 je výsledek genotypování inserčních linií. PCR byla prováděna, vyjma linie *ahl18*, duplexně, v každé reakci probíhalo testování zároveň na inserci i WT. Popis dráhy odpovídá genotypu testované rostliny.



Obrázky 28: Nalezení homozygotních jednoduchých mutantů od všech dále používaných linií.

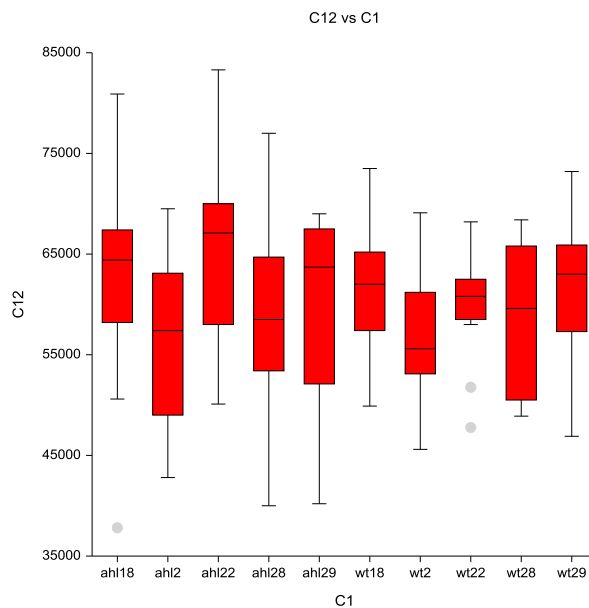
### 10.2.3. Analýza kořenového systému jednoduchých mutantů

Pro analýzu kořenového systému byly rostliny kultivovány na pevném 0,2 MS médiu na hranatých plotnách o hraně 10cm. Každá z ploten byla vertikálně rozdělená, jedna polovina plotny byla oseta semeny mutantů a druhá semeny kontrolními, aby se tak předešlo vlivu případné variability mezi jednotlivými miskami. Jako kontrola byli použiti jedinci, jejichž rodiče byli vyštěpeni jako WT, pro SALK linie byla jako kontrola používán WT od linie *ahl22* (SALK\_143279), pro SAIL linie byl použit WT od linie *ahl18* (SAIL\_346\_C06). Na každé plotně bylo osm semen, semena byla vysévána do horní třetiny plotny, aby měly kořeny dost místa. Při kultivaci byly spodní 2/3 misky zabalené v neprůhledné tmavé látce, aby se zamezilo průniku světla ke kořenům. Bylo totiž prokázáno, že fototropin, jakožto receptor modrého světla, je silně exprimován v elongační zóně postranních kořenů. Zde svou lokalizací kopíruje akumulaci auxinu, zároveň je jeho exprese negativně regulována světlem. Fototropin negativně ovlivňuje délku postranních kořenů přes signální dráhu auxinu. (Moni, Lee et al. 2015). Přístup světla ke kořenům také ovlivňuje transformaci nefotosyntetizujících plastidů na chloroplasty, jak ukazuje Obrázek 25C. Analyzovány byly semenáčky 14 dní po vyklíčení, 15 až 20 jedinců od každé linie. Kořeny se často sbíhaly a křížily, což znemožnilo analýzu postranních kořenů vyšších řádů. Z hodnocení byly vynechány rostliny, jejichž kořeny zarostly do média, zdejší hypoxie je jistě ovlivnila více než genetické pozadí. Plotny byly skenovány v rozlišení 1200dpi. Obrázek 29 ukazuje příklady skenu plotny.

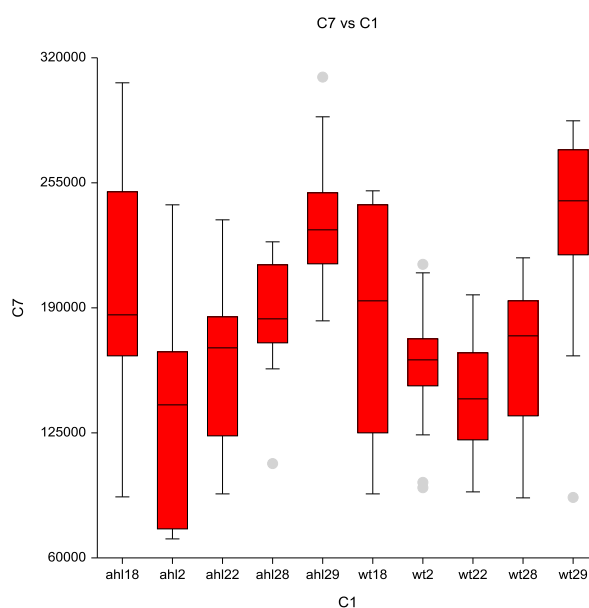


Obrázek 29: Ukázkový sken plotny, který byl použit pro analýzu kořenů.

Výsledky kořenové analýzy byly zpracovány v programu NCSS 9.0 testem ANOVA. Hodnocené byly tyto parametry: Průměrná tloušťka kořene, celková délka kořenového systému, počet kořenových špiček, tloušťka primárního kořene, délka primárního kořene, délka primárního kořene od apikálního meristému k prvnímu postrannímu kořeni, celková délka postranních kořenů a celkový počet postranních kořenů. U žádného z hodnocených parametrů nevyšel statisticky signifikantní výsledek ( $P \leq 0,05$ ,  $n \geq 12$ ). Variabilita se spíše odvíjela od podmínek kultivace na každé plotně (Graf 2), než od genetického pozadí rostlin, což demonstruje význam standardizace a optimalizace kultivačních podmínek. Možnou příčinou variability je rozdílné množství média na jednotlivých plotnách, jeho nedostatečné promíchání či rozdílná teplota při nalévání. Na Grafu 1 jsou vidět délky primárního kořene jednotlivých linií.



Graf 1 ukazuje srovnání délky primárních kořenů u mutantů (*ahl*) v porovnání s kontrolou (*wt*). Není zde vidět žádný signifikantní rozdíl. Chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.



Graf 2: Statisticky signifikantní rozdíly jsou vždy mezi jednotlivými kultivacemi. *ahlX* označuje mutovaný gen (*x*), *wtX* pak značí kontroly, pěstované na plotnách spolu s *ahlX*. Chybové úsečky udávají směrodatnou odchylku.

#### 10.2.4. Křížení

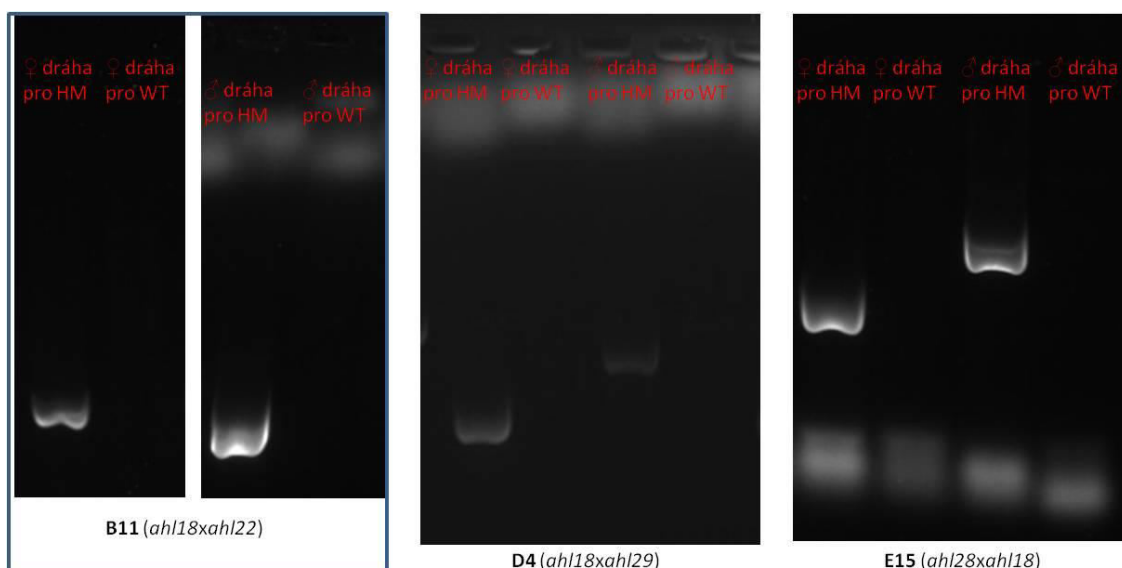
Díky absenci pozorovatelných fenotypových rozdílů mezi kontrolou a jednoduchými mutanty jsem se rozhodla je vzájemně nakřížit. Jelikož mým cílovým genem byl *AHL18*, provedla jsem křížení *ahl18* s ostatními liniemi. Tabulka 26 ukazuje provedená křížení a označení kříženců (Kapitola 9.1.7). Pro zjednodušení následného testování byla vždy rostlina *ahl18* brána jako rostlina otcovská (♂), druhý mutant jako rostlina mateřská (♀).

Mateřská rostlina (♀)	Otcovská rostlina (♂)	Označení křížení
<i>ahl2</i>	<i>ahl18</i>	C
<i>ahl22</i>	<i>ahl18</i>	B
<i>ahl28</i>	<i>ahl18</i>	E
<i>ahl29</i>	<i>ahl18</i>	D

Tabulka 26: Označení linií, vzniklých křížením mateřské rostliny s *ahl18*.

#### 10.2.5. Genotypování dvojitých mutantů, pilotní fenotypování

První nakřížená generace, F1, je uniformní. Testování proto probíhalo až v F2 generaci. Bylo vyseto 30 semen od každé linie křížení, rostlinám byla metodou Oxford vyizolována DNA a testována pomocí genotypovací PCR. U každé rostliny bylo zaznamenáno, kdy se jí začaly prodlužovat internodia, vedoucí k tvorbě generativních orgánů, ty s nejdřívějším nástupem generativní fáze byly testovány jako první. Obrázky 29 shrnují výsledky genotypování kříženců, nejprve vždy kombinace na ♀, pak na ♂. U linie kříženců C (*ahl2xahl18*) byly mou chybou zaměněny vzorky, díky čemuž byl nalezen pouze HZ, nikoliv však HM dvojitý mutant.



Obrázky 29 ukazují genotypování dvojitých mutantů.

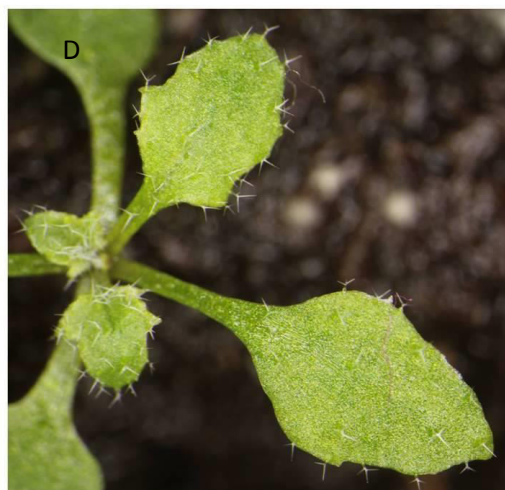
Již při odebrání lístků F2 generace dvojitéch mutantů byla rostlina, následně ogenotypovaná jako dvojitý HM mutant E15, nápadně odlišná od ostatních svým tvarem listů. Tento fenotyp se projevil i v následující generaci, jak ukazují Obrázky 30. Krom jiných listů vykazovala rostlina E15 i fenotyp brzkého kvetení (u E15 se květní stvol objevil po 22 dnech, WT až po více než měsíci), což je v souladu s dostupnými informacemi o *AHL* genech, jak je popisováno v literárním přehledu, Kapitola 8.1.2. U ostatních identifikovaných dvojitéch mutantů se brzké kvetení neprojevovalo.



A  
E15 v F2 generaci (při odběru lístků pro izolaci DNA)



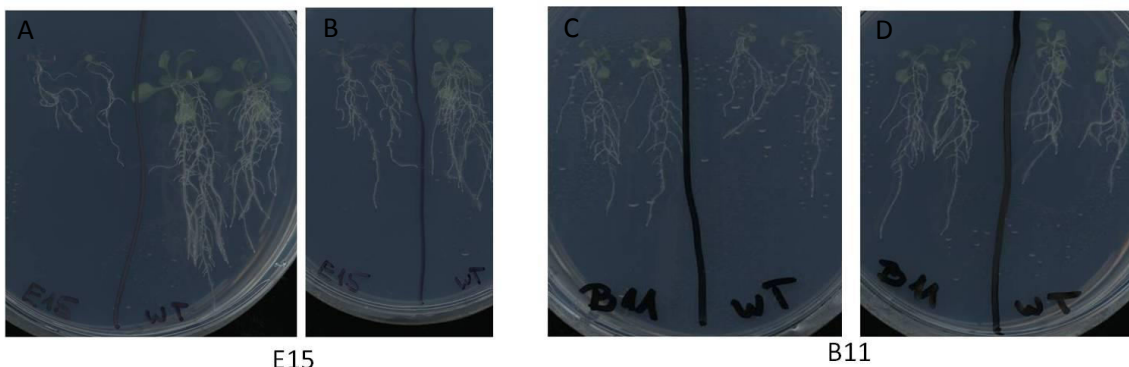
C  
14-denní E15, F3 generace





Obrázky 30 ukazují odlišný fenotyp rostlin E15. **A** Fotografie F2 generace, pořízená při odběru listků pro izolaci DNA. **B – D** F3 generace E15 14 dní po vyklíčení. **E a F** WT 12 dní po vyklíčení pro srovnání. **G** Fenotyp brzkého kvetení E15 (26 dní po vyklíčení) je, v porovnání s WT (24 dní po vyklíčení), zřetelný.

Těsně před napsáním této práce byla provedena zkusná kultivace dvojitych mutantů, opět na plotnách s pevným 0,2 MS médiem, pro „okometrické“ zhodnocení fenotypu dvojitych mutantů (Obrázky 31). Kultivace byla provedena jen na malém počtu jedinců, pro vytvoření spolehlivých závěrů bude potřeba dalších experimentů.



Obrázek 31 ukazuje pilotní kultivaci dvojitych mutantů. **A a B** E15, **C a D** B11. Na plotně je vždy vpravo WT, vlevo dvojitý mutant.

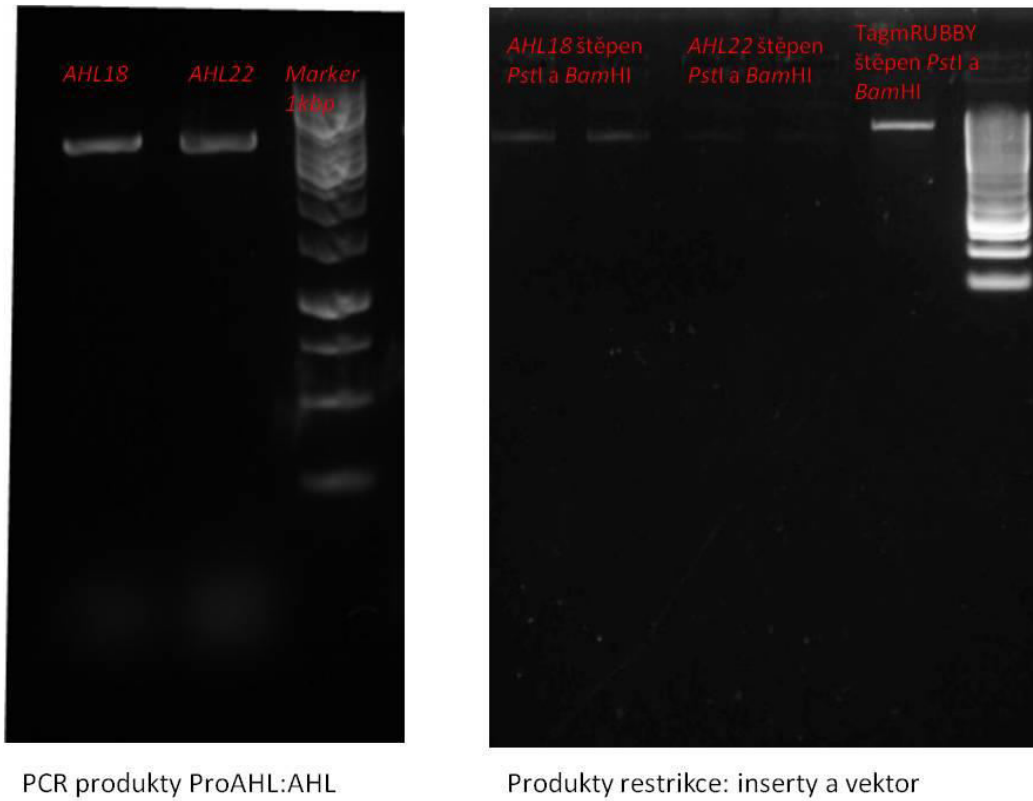
### 10.3. Translační fúze AHL18 a AHL22 – dodatečný cíl

Po bližším zaměření se na *AHL* geny, konkrétně *AHL18*, byl stanoven další cíl – pokusit se lokalizovat produkt genu *AHL18* a jeho nejbližšího paralogu *AHL22* (Obrázek 1). AHL proteiny jsou proteiny jaderné, proto byla jejich lokalizace zamýšlena v úrovni pletiv. Inspirací byl článek (Zhou, Wang et al. 2013) o buněčně neautonomním působení dvou blízce příbuzných AHL proteinů.

Pro klonování byl opět využit systém vektorů GATEWAY™. Jako vstupní vektor byl použit modifikovaný vektor TagmRUBY (Obrázek 8), o jehož modifikaci se postaral



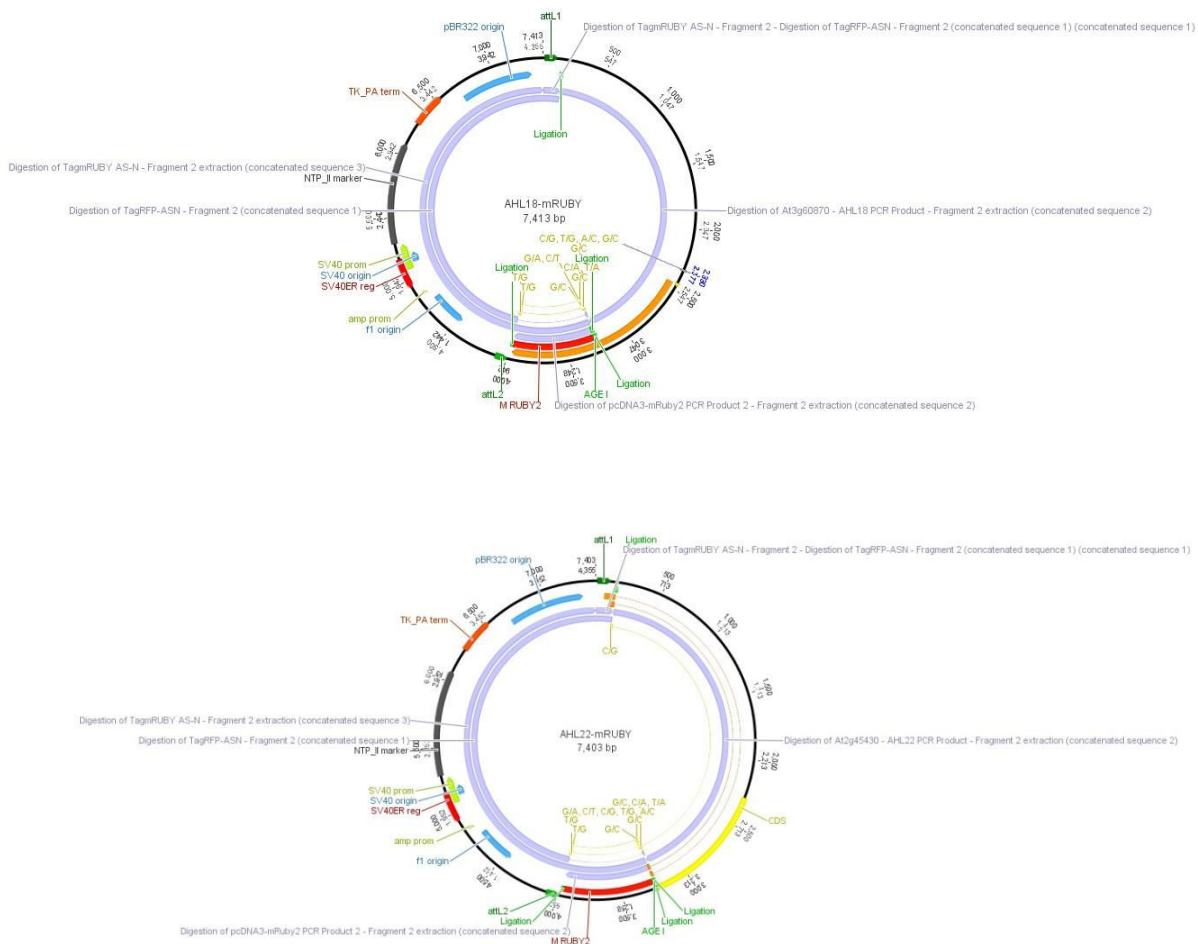
Mgr. Ivan Kulich, Ph. D., jako cílový binární vektor byl použit pBGWT (Obrázek 10), do něhož byl konstrukt přenesen LR reakcí. Invert (sekvence promotoru i s genem) byl amplifikován pomocí Phusion polymerázy, použité primery jsou v Tabulce 14. Obrázky 32 shrnují postup klonování. Výsledné donorové plazmidy byly osekvenovány a zkontrolovány.



PCR produkty ProAHL:AHL

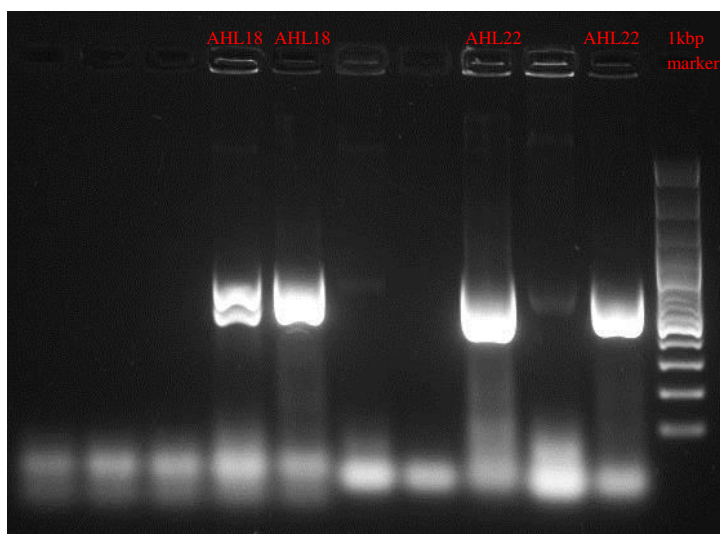
Produkty restrikce: inserty a vektor

Obrázek 32: Produkty PCR a restrikce (po pročištění). Restrihované fragmenty byly zahuštěny a použity k ligaci.



Obrázky 33: Konstrukty *AHL18* (nahore) a *AHL22* (dole) v TagmRUBBY. Vytvořeno v programu Geneious

Na Obrázcích 33 jsou vidět mapy vstupních vektorů TagmRUBBY se zaklonovanými inserty. Obrázek 34 ukazuje pozitivně tetované bakteriální kolonie.



Obrázek 34: Testovací PCR bakteriálních kolonií, transformovaných *pAHL18:AHL18-mRUBY*, respektive *pAHL22:AHL22-mRUBY*.

Po jejich převedení do binárního vektoru pBGWT (LR reakcí) a pomnožení konstruktu jím byly transformovány bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Byl proveden Floral dip, potenciálně transformovaná semena byla, v době odevzdání této práce, vyseta na selekční médium.

## 11. Diskuze

### 11.1. Expresní vzorec linie MGT180 odpovídá expresi *AHL18*

Na linii MGT180 bylo od počátku cíleno díky lokalizaci aktivity zasaženého promotoru. Promotor je totiž aktivní v buňkách pericyklu, přiléhajících ke xylémovým pólům, které dávají, v případě modelové rostliny *Arabidopsis thaliana*, vzniknout postranním kořenům (McCully 1975). V této práci bylo prokázáno, že genem, za jehož promotor se zařadil insert s reportérovým genem v linii MGT180, je *AHL18* (At3g60870), transkripční faktor s dosud nepopsanou funkcí. Ve výše zmíněné diplomové práci Mgr. Maria Dolores Gutierrez Alanis bylo, pro kandidátní gen *AHL18*, identifikováno místo inserce v jeho promotoru, přibližně 500bp před počátkem translace (ATG). Potvrzení inserce bylo provedeno na rostlinách *pAHL18:GUS*, jejichž expresní vzorec se shoduje s expresním vzorcem MGT180, alespoň co se týče pletivové specifity. Byly porovnávány rostliny 7 dní po vyklíčení, detekce enzymatické aktivity GUS u linie MGT180 a *pAHL18:GUS* byla, pro účely srovnání, prováděna současně a u obou linií byl použit totožný postup. Ve výsledku se mezi liniemi poměrně výrazně lišila intenzita aktivity GUS, což ale může být vysvětleno snížením aktivity promotoru v linii MGT180 vlivem inserce. Místo vložení T-DNA do genomu *Arabidopsis thaliana* ve vytvořené linii nebylo zjišťováno.

Na počátku práce jsem pro linii MGT180 měla tři kandidátní geny, které identifikovala Mgr. Marie Dolores Gutierrez Alanisové pomocí TAIL PCR ve své diplomové práci jako inserce Ds elementu použitého při konstrukci knihovny do genomu. První z nich, *FBA* (At2g01140), jedna z plastidových aldoláz, zapojených v Calvinově cyklu a plastidové glykolýze (Hatano-Iwasaki and Ogawa 2012, Minino, Brugière et al. 2012), byla z kandidátních genů vyloučena úvahou, že gen, jehož produkt se účastní fotosyntézy, bude mít výraznou expresi v nadzemní části rostliny. U linie MGT180 však převládá exprese v kořeni. S dalšími dvěma kandidátními geny, *SEC7-like* (At3g60860) a *AHL18*, bylo dále pracováno, za vytvoření transformovaných rostlin *pAHL18:GUS*, respektive *pSEC7:GUS*. Gen *AHL18* byl považován za hlavního kandidáta. Po detekci aktivity GUS u těchto dvou typů transformantů byla jasně prokázána shoda MGT180 s *AHL18*.

### 11.2. Gen *AHL18*: Jeden z mnoha

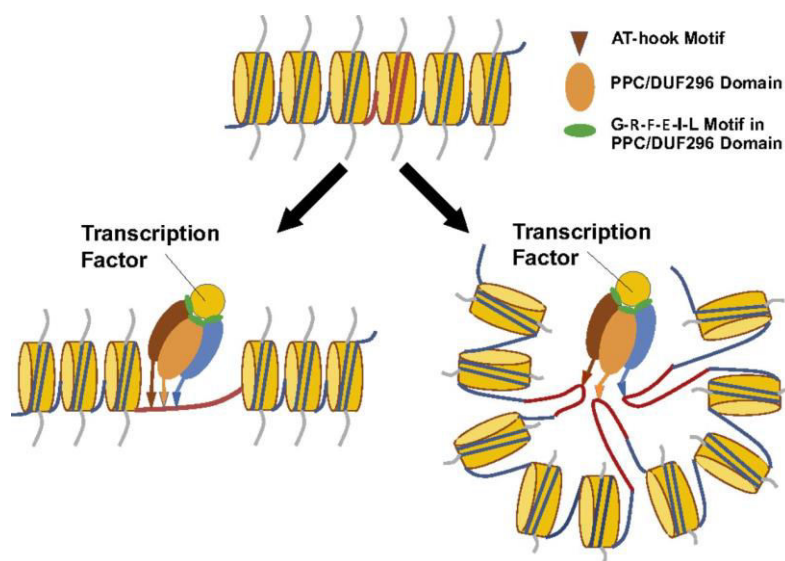
*AHL18* patří do genové rodiny AHL, čítající u *Arabidopsis thaliana* 29 členů. Každý AHL protein obsahuje dva typy domén – AT-hook, která zajišťuje jeho vazbu do malého žlábků AT bohatých sekvencí DNA, a PPC (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004). Právě tato PPC doména jim umožňuje interakce s dalšími proteiny, ať už s jinými AHL proteiny a transkripčními faktory za vzniku homo- či heterokomplexů (Zhao, Favero et al. 2013), jak ukazuje Obrázek 35, či například s histonovými deacetylázami a metyltransferázami, což jim dává schopnost epigenetických modifikací histonů (Yun,

Kim et al. 2012). Přes PPC doménu se mohou AHL proteiny navázat na jadernou matrix (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004), a hydrofobní část PPC domény je zodpovědná za jadernou lokalizaci AHL proteinů. Dosud charakterizované AHL proteiny jsou zapojeny v různých aspektech vývoje rostlin, od fytohormonové regulace a signalizace v případě AHL21 a AHL25 (Matsushita, Furumoto et al. 2007, Ng, Yu et al. 2009), rostlinné imunitě a obranné odpovědi u proteinů AHL15, AHL19, AHL20 a AHL27 (Lu, Zou et al. 2010) či vývoje xylému kořene u AHL3 a AHL4 (Zhou, Wang et al. 2013). Právě posledně jmenovaná práce je zatím jedinou, která se týká zapojení AHL proteinů ve vývoji kořene, konkrétně v regulaci vývoje vodivých pletiv. Zde bylo také poprvé popsáno jejich buněčně neautonomní působení.

Vzhledem k počtu genů *AHL* rodiny je velmi pravděpodobné, že budou značně redundantní. Většina rostlin, které v experimentech vykazovaly změny fenotypu, měla buď uměle zvýšenou expresi určitého *AHL* genu, nebo byly násobnými mutanty, jako *AHL27* a *29* (Zhao, Favero et al. 2013) či měly sníženou expresi několika *AHL* genů pomocí RNA interference, jako v případě *AHL18*, *22*, *27* a *29* (Xiao, Chen et al. 2009). Zvýšená exprese byla zajišťována buď pomocí promotoru 35S, jako tomu bylo v případě *AHL20* (Lu, Zou et al. 2010), *AHL21* (Ng, Yu et al. 2009) a *AHL22* (Yun, Kim et al. 2012) nebo pomocí activation tag linií, jako v případě *AHL19* (Yadeta, Hanemian et al. 2011). Na funkční redundanci může ukazovat i absence zřetelného fenotypu u jednoduchých mutantů v této práci. Zároveň jsou však tyto geny u rostlin velmi konzervované, lze tudíž předpokládat, že budou významné pro určité aspekty růstu a vývoje rostliny. Proto byl, pro sledování funkce genu *AHL18*, jeho inzerční mutant *ahl18* nakřížen s jemu sekvenčně nejpříbuznějším *ahl22* a s dalšími třemi mutanty, z nichž dva náleží do skupiny A (Zhao, Favero et al. 2014), které mají, podle eFP browseru, expresi v kořeni (Obrázek 27). Jediným doposud známým fenotypem rostliny *p35S:AHL18* je fenotyp totožný s *p35S:AHL22*, tudíž fenotyp zpožděného kvetení. U rostliny se zvýšenou expresí *AHL22* je tento fenotyp způsobený negativní regulací exprese genu *FLOWERING LOCUS T*. Dalším fenotypovým znakem je zkrácený hypokotyl (Xiao, Chen et al. 2009, Yun, Kim et al. 2012). Opačný fenotypový projev, tudíž brzké kvetení, však vykazovala až rostlina, umlčující 4 *AHL* geny (Xiao, Chen et al. 2009). Krom vlivu *AHL3* a *AHL4* na vývoj vodivých pletiv (Zhou, Wang et al. 2013), se však žádný článek o *AHL* genech nezabýval jejich úlohou při vývoji kořenového systému.

Transkripční fúze *pAHL18:GUS* poodhalila možné zapojení genu *AHL18* ve vzniku postranních kořenů díky expresi v kompetentních buňkách pericyklu, jak dokazuje obrázek 25A. Na Obrázku 25G je vidět, že je jeho exprese vázána na diferencující se buňky xylémových elementů, a Obrázek 26B ukazuje expresi tohoto genu

v prokambióálních provazcích vyvíjejícího se listu. Tyto výsledky naznačují možnou komplexní úlohu proteinu AHL18 v diferenciaci buněk či celých orgánů.



Obrázek 35 ukazuje interakci heteromeru AHL genů, navázaných v malém žlábků AT bohatého úseku DNA (červeně), s transkripčním faktorem (Zhao, Favero et al. 2013)

### 11.3. Analýza kořenů jednoduchých mutantů

Statistické vyhodnocení kořenové analýzy jednoduchých mutantů dopadlo více méně podle očekávání, žádný z jednoduchých mutantů nevykazoval signifikantní fenotypový projev. V naprosté většině článků, které byly o *AHL* genech doposud napsány, totiž byl jednoduchý mutant bez fenotypové odlišnosti. Jedinou výjimkou je práce o *AHL4*, kde jednoduchý inzerční mutant *ahl4* vykazoval fenotyp přídavné vrstvy xylémových elementů v kořeni (Zhou, Wang et al. 2013).

Výsledky z kultivace jednoduchých mutantů byly statisticky nesignifikantní a vykazovaly silný vliv podmínek jednotlivých ploten. Pro dosažení co nejideálnějších podmínek kultivace by bylo vhodné zajistit, aby byl na každou plotnu nalit shodný objem média. Po sterilizaci v autoklávu je třeba médium pečlivě zamíchat, aby se řádně rozpustily všechny pevné složky. Ač byla média, čekající na nalití na plotny, ponechána v ještě horkém autoklávu, je zřejmé, že poslední nalévané médium bylo nejchladnější, tudíž i nejviskóznější ze všech, což mohlo zhoršit schopnost rozpouštění a difuze látek v médiu.

#### 11.4. Dvojití mutanti: Pokus – omyl?

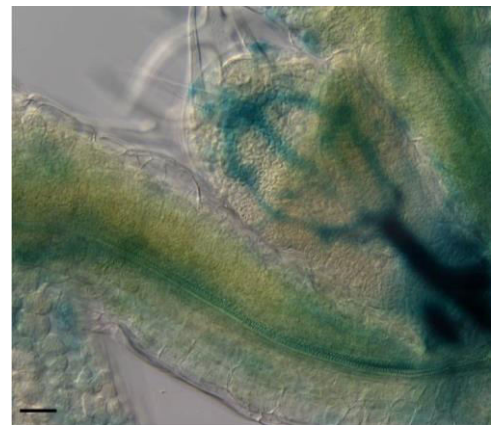
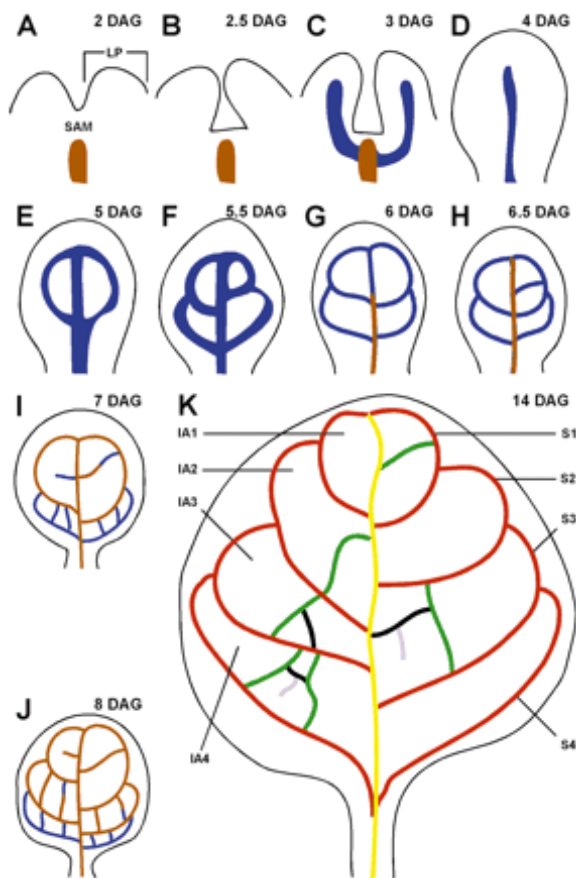
Rostliny s mutací je v jednom AHL genu, podle předpokladů, neměly pozorovatelný fenotypový projev odlišný od kontroly. Proto byl mutant *ahl18* křížen s ostatními jednoduchými mutanty, použitými v této práci. Největší očekávání bylo vkládáno do dvojitěho mutantu *ahl18ahl22*, díky blízké příbuznosti genů *AHL18* a *AHL22*. Bohužel není mnoho známo o vzájemných interakcích mezi různými AHL proteiny a nelze je tak dobře odhadovat, proto byla tato metoda křížení vybraných jednoduchých mutantů vlastně náhodnou zkouškou jejich interakcí.

Hledání dvojitých homozygotních mutantů bylo prováděno v F2 generaci nakřížených rostlin. V průběhu jejich růstu byl zaznamenáván den, kdy se začala prodlužovat internodia lodyhy, patrná jako růst květního stvolu z přízemní listové růžice. Rostliny, u nichž byl přechod z vegetativní do generativní fáze urychlen, byly testovány jako první. Ze všech nakřížených linií, pouze u linie E bylo brzké kvetení spojeno s nalezením dvojitěho homozygotního mutantu, což ukazuje, že toto urychlení může být jen výsledkem přirozené variability. Navíc, rostlina E15, identifikovaná jako dvojitý homozygotní mutant, vykazovala změny ve tvaru listů, jak ukazuje Obrázek 30. Tyto změny byly pozorovány i v F3 generaci, tudíž jsou vázány na genetické pozadí rostliny.

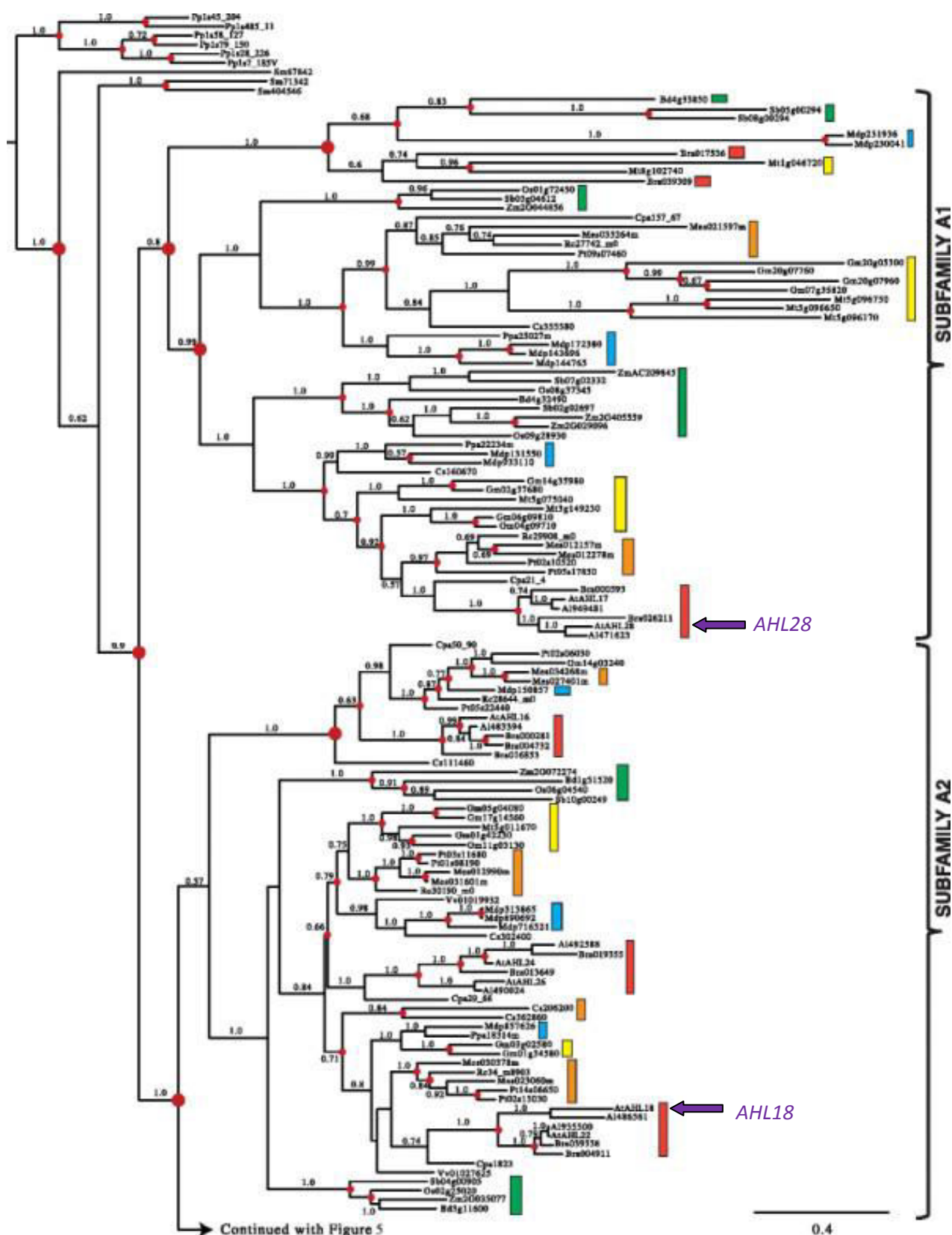
Kromě linie C byly u všech nakřížených linií nalezeny homozygotní dvojití mutanti. Neúspěch linie C jsem zapříčinila vlastní nepozorností. Nedlouho před dopsáním této práce jsem vyzkoušela kultivaci dvojitých mutantů linie B a E na plotnách s agarovým médiem. Kultivace byla prováděna na již dříve připravených plotnách s 0,2 MS médiem a 1% agaru, což mohlo ovlivnit celkový habitus kultivovaných rostlin. Kultivace byla prováděna na malém počtu rostlin (10 pro každou linii kříženců). Závěry z této kultivace proto nemohou být brány jako směrodatné výsledky, jen jako možný námět pro vytvoření hypotézy. Podle té, rostliny linie B mají, v porovnání s kontrolou, delší primární kořen. Rostliny linie E vykazovaly fenotyp brzkého kvetení, jiného tvaru listů (Obrázek 30) a jejich květní stvol byl celkově méně pevný, květní stvoly rostlin linie E spíše polehávaly, než stály. Na plotnách se rostliny E jevily celkově spíše menší.

O důvodech rozdílného fenotypu rostliny E15 se zatím dá jen polemizovat. E15 je křížencem *ahl18* a *ahl28*, z nichž ani jeden z těchto genů ještě nebyl funkčně charakterizován. Podle fylogenetického stromu patří oba geny do stejné skupiny (Fujimoto, Matsunaga et al. 2004), Obrázek 1. Recentní podrobnější analýza ukázala, že geny *AHL18* a *AHL28* patří do skupiny „A“, ale každý do jiného oddílu, jak ukazuje Obrázek 37 (Zhao, Favero et al. 2014). Nejbližší příbuzný *AHL28* je gen *AHL17*, ani ten však ještě nebyl funkčně ocharakterizován. Zvláštní fenotyp linie E15 ukazuje na pravděpodobně velmi komplexní interakce mezi AHL proteiny. Bude potřeba ještě řada dalších experimentů, aby byly interakce, vedoucí k fenotypu zubatých listů,

rozklíčovány. Ve skupině „A“ AHL genů, do níž náleží *AHL18* a *AHL28*, se nachází většina doposud popsanych *AHL* genů – *AHL15*, *AHL19* a *AHL27*, regulující obranné reakce rostlin či *AHL25*, zapojený v giberelinové a *AHL21* v auxinové regulaci. Zejména protein *AHL21*, který je zapojen, přes protein *ETTIN*, v signální transdukci auxinu. Byl prokázán jeho vliv na vývoj a diferenciaci generativních orgánů (Ng, Yu et al. 2009), což nasvědčuje možné spojitosti s ovlivněním diferenciaci listů u dvojitého mutantu *E15*. S diferenciací tvaru listů však může souviset i protein *AHL18*, jak ukazuje Obrázek 26B, na základě jeho exprese v prokambiólních provazcích vyvíjejícího se listu, jak dokazuje Obrázek 36 (Scarpella, Francis et al. 2004).



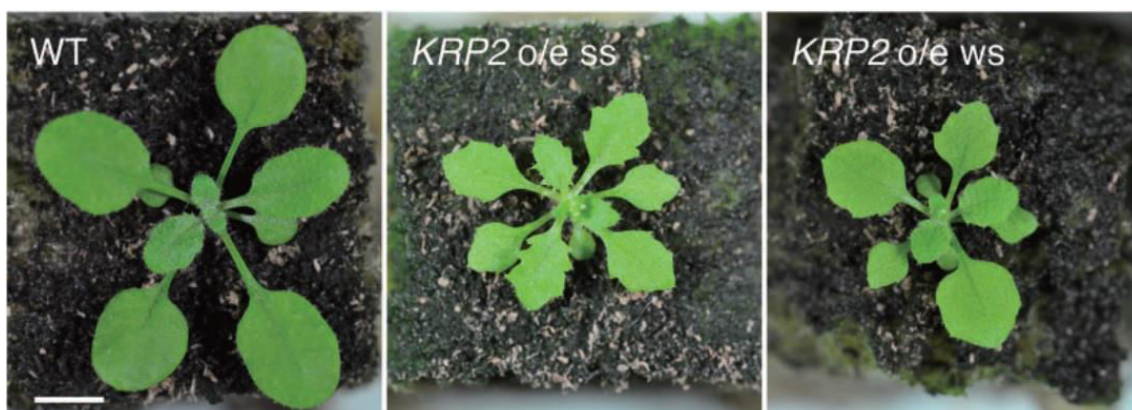
Obrázek 36: Schéma ukazuje vývoj listového prokambia (modře) a xylému (hnědě). Vpravo je výřez z obrázku 26B, shodný s přechodem stádií E až F ze schématu. To dokazuje, že *AHL18* je vskutku exprimován v prokambiólních provazcích (Scarpella, Francis et al. 2004).



Obrázek 37: Postavení genů AHL18 a AHL28 ve fylogenetickém stromu AT-hook genů skupiny A (Zhao, Favero et al. 2014). Fialové šipky ukazují na postavení těchto genů.



Fenotyp zubatých listů u *Arabidopsis thaliana* byl prokázán u rostlin se zvýšenou expresí *KRP2*, které měly dvakrát větší buňky. Exprese proteinu *KRP2* je negativně ovlivňována auxinem (Sanz, Dewitte et al. 2011), což vede k úvaze, že dvojitý mutant E15 by mohl mít narušenou auxinovou akumulaci či signalizaci. Jde však pouze o čistou spekulaci, byť poměrně atraktivní, protože *KRP2* je důležitým regulátorem vývoje pericyklu v kořenech. Fenotyp zubatých listů, nápadně podobný fenotypu E15, je na Obrázku 38 (Ferjani, Ishikawa et al. 2013).



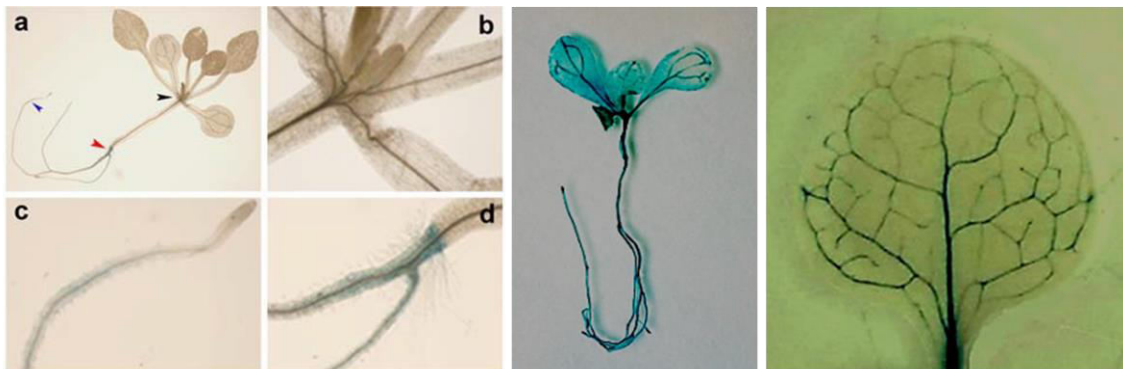
Obrázek 38: Fenotypový projev mutantů se zvýšenou expresí *KRP2* je nápadně podobný fenotypu rostlin E15.

Protein AHL25 ovlivňuje syntézu giberelinů (Matsushita, Furumoto et al. 2007), a gibereliny jsou u *Arabidopsis thaliana* spojovány s načasováním květu (Blázquez, Green et al. 1998). Tento aspekt, spolu s prokázanou rolí proteinu AHL22 jakožto nejbližšího příbuzného AHL18, mohou být zapojeny do ovlivnění času kvetení u dvojitého mutantu E15. Společným jmenovatelem jim jsou nejspíše deacetylase a metylace histonů, které se odráží ve změně exprese cílových genů (Ng and Ito 2010, Yun, Kim et al. 2012).

### 11.5. Translační fúze

Transkripční fúzi bylo ukázáno, kde je gen *AHL18* exprimován. Místo exprese ale nemusí být shodné s místem fungování proteinu, jak bylo dokázáno u proteinů AHL3 a AHL4 (Zhou, Wang et al. 2013), které si jsou fylogeneticky blízce příbuzné. Na základě této informace byl další postup směřován k lokalizaci proteinu AHL18 a AHL22 pomocí translační fúze. Transkripční fúze *pAHL22:GUS* ukázala, že protein je exprimován i v kořeni (Obrázek 39) (Yun, Kim et al. 2012). V téže publikaci provedli i translační fúzi *p35S:GFP:AHL22*, která prokázala přítomnost AHL22 v oblasti kořenového apikálního meristému. Lokalizace proteinu byla ale detekována u linie se zvýšenou expresí proteinu, navíc byla hodnocena jen kořenová špička. Proto jsem se rozhodla pokusit se,

pomocí translační fúze s fluorescenčním proteinem mRUBY, lokalizovat proteiny AHL18 a AHL22 a ověřit, jestli spolu kolokalizují, tudíž jestli spolu mohou potenciálně interagovat. V době psaní této práce byly rostliny *Arabidopsis thaliana* Col-0 teprve sklizeny po transformaci, a proto výsledky translační fúze ještě nemohu prezentovat. V každém případě ještě bude potřeba mnoho bádání, abychom poznali proteinové interakce AHL18, jeho vliv na regulační mechanismy a případně jimi zprostředkované ovlivnění větvení kořenů.



Čtrnáctidenní transformované rostliny *ProAHL22:GUS* dokazují expresi *AHL22* v kořeni, však bez detailů na úrovni buněk.

Čtyřtýdenní transformované rostliny *ProAHL22:GUS* ukazují expresní doménu *AHL22*. Rostliny byly pěstovány v půdě.

Obrázek 39 ukazuje expresní vzorec *AHL22*, vlevo na 14 - denních rostlinách pěstovaných na plotnách s médiem (Xiao, Chen et al. 2009), vpravo u 4 - týdenních rostlin, pěstovaných v půdě (Yun, Kim et al. 2012).

### 11.6. AHL proteiny: Co dál?

V nejbližší době bude třeba vyselektovat transformované rostliny v rámci translační fúze *pAHL18:AHL18:mRUBY* a *pAHL22:AHL22:mRUBY* a zjistit, je-li možné, že spolu tyto dva proteiny interagují. Srovnání lokalizací promotorové aktivity *AHL18* a produktu tohoto genu by mělo odpovědět, zda je jeho působení buněčně autonomní. Jistě by bylo zajímavé zkusit, pomocí kvasinkového dvojhybridního systému, které z dalších AHL proteinů interagují s *AHL18*. Další pozornost si jistě zaslouhuje i dvojitý mutant *E15*. Jeho zkřížení s rostlinou *DR5:GUS* by mohlo napovědět, je-li u této rostliny narušena akumulace auxinu a odpověď jeho signalizační dráhy, která by mohla být příčinou fenotypu zubatých listů. Zvýšení exprese *AHL18*, jeho zařazením za 35S promotor, by také mohlo přinést zajímavé výsledky, zejména na kořenovém systému. Pravděpodobně by rostlina též kvetla později, jak již bylo prokázáno (Xiao, Chen et al. 2009).

*AHL* geny skýtají široké pole působnosti pro další výzkum. Jejich vysoká konzervovanost svědčí o jejich vysokém významu v životě rostliny. Z 29 paralogů *AHL* jich doposud pouze 10 bylo funkčně charakterizováno. Z toho však pouze dva, *AHL3* a *AHL4*, byly zkoumány v souvislosti s kořenovým systémem.

## 12. Závěr

Primární cíl této práce, identifikace genu, jehož promotor byl zasažen insertem v linii MGT180, byl splněn. Zasažen byl promotor genu *AHL18*, jak bylo dokázáno transkripční fúzí *ProAHL18:GUS*. *AHL18* patří, spolu s dalšími 28 *AHL* geny, do genové rodiny transkripčních faktorů, které jsou zapojeny zejména ve vývoji rostliny a v reakci na stres. Analýza jednoduchých *AHL* mutantů neprokázala viditelný efekt mutace na uspořádání kořenového systému rostliny *Arabidopsis thaliana*. U dvojitých mutantů ještě bude třeba další práce, aby mohl být statisticky prokázán jejich případný vliv na větvení kořene. Zvláštní pozornost si pak zaslouží dvojitý mutant E15, *ahl18ahl28*, jehož fenotyp je již na první pohled rozeznatelný od WT. Translační fúze, která má prokázat buněčně autonomní či neautonomní působení proteinů *AHL18* a *AHL22*, teprve čeká na své dokončení a vyhodnocení.

*AHL* proteiny jsou konzervované u všech vyšších rostlin, což napovídá jejich klíčové roli v určitých vývojových procesech rostlin. Jejich další studium je proto aktuální tématikou. *AHL18* je exprimován v buňkách pericyklu, přiléhajících ke xylémovým pólům, což ho určuje jako možného kandidáta pro ovlivňování větvení kořene. V této práci bylo také ukázáno, že je exprimován v raných fázích vývoje prokambióálních provazců v listu a xylémových elementů v kořeni. Struktura kořenového systému je klíčová pro pěstování zemědělských plodin, proto každý pokrok, který se v tomto směru ve výzkumu učiní, může být malým krokem pro vědce, ale velkým skokem pro lidstvo.

### 13. Použitá literatura

Anders, N., et al. (2008). "Membrane association of the Arabidopsis ARF exchange factor GNOM involves interaction of conserved domains." The Plant Cell **20**(1): 142-151.

Aravind, L. and D. Landsman (1998). "AT-hook motifs identified in a wide variety of DNA-binding proteins." Nucleic acids research **26**(19): 4413-4421.

Bao, F., et al. (2004). "Brassinosteroids interact with auxin to promote lateral root development in Arabidopsis." Plant Physiology **134**(4): 1624-1631.

Benková, E. and A. Bielach (2010). "Lateral root organogenesis—from cell to organ." Current opinion in plant biology **13**(6): 677-683.

Benková, E., et al. (2003). "Local, efflux-dependent auxin gradients as a common module for plant organ formation." Cell **115**(5): 591-602.

Bhalerao, R. P., et al. (2002). "Shoot-derived auxin is essential for early lateral root emergence in Arabidopsis seedlings." The Plant Journal **29**(3): 325-332.

Bielach, A., et al. (2012). "Spatiotemporal regulation of lateral root organogenesis in Arabidopsis by cytokinin." The Plant Cell **24**(10): 3967-3981.

Blázquez, M. A., et al. (1998). "Gibberellins promote flowering of Arabidopsis by activating the LEAFY promoter." The Plant Cell **10**(5): 791-800.

Blilou, I., et al. (2005). "The PIN auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in Arabidopsis roots." Nature **433**(7021): 39-44.

Bowman, J. L., et al. (1989). "Genes directing flower development in Arabidopsis." The Plant Cell **1**(1): 37-52.

Cary, A. J., et al. (1995). "Cytokinin action is coupled to ethylene in its effects on the inhibition of root and hypocotyl elongation in Arabidopsis thaliana seedlings." Plant Physiology **107**(4): 1075-1082.

Casimiro, I., et al. (2003). "Dissecting Arabidopsis lateral root development." Trends in plant science **8**(4): 165-171.

Casimiro, I., et al. (2001). "Auxin transport promotes Arabidopsis lateral root initiation." The Plant Cell **13**(4): 843-852.

Cockerill, P. N. and W. T. Garrard (1986). "Chromosomal loop anchorage of the kappa immunoglobulin gene occurs next to the enhancer in a region containing topoisomerase II sites." Cell **44**(2): 273-282.

Cracker, L. and F. B. Abeles (1969). "Abscission: role of abscisic acid." Plant Physiology **44**(8): 1144-1149.

De Smet, I., et al. (2003). "An abscisic acid-sensitive checkpoint in lateral root development of Arabidopsis." The Plant Journal **33**(3): 543-555.

- De Smet, I., et al. (2007). "Auxin-dependent regulation of lateral root positioning in the basal meristem of Arabidopsis." Development **134**(4): 681-690.
- Delaney, S. K., et al. (2007). "The fiber specificity of the cotton FSltp4 gene promoter is regulated by an AT-rich promoter region and the AT-hook transcription factor GhAT1." Plant and cell physiology **48**(10): 1426-1437.
- Dubrovsky, J. G., et al. (2000). "Pericycle cell proliferation and lateral root initiation in Arabidopsis." Plant Physiology **124**(4): 1648-1657.
- Dubrovsky, J. G., et al. (2001). "Early primordium morphogenesis during lateral root initiation in Arabidopsis thaliana." Planta **214**(1): 30-36.
- Dubrovsky, J. G., et al. (2008). "Auxin acts as a local morphogenetic trigger to specify lateral root founder cells." Proceedings of the National Academy of Sciences **105**(25): 8790-8794.
- Edwards, K., et al. (1991). "A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis." Nucleic acids research **19**(6): 1349.
- Falvo, J. V., et al. (1995). "Reversal of intrinsic DNA bends in the IFN $\beta$  gene enhancer by transcription factors and the architectural protein HMG I (Y)." Cell **83**(7): 1101-1111.
- Ferjani, A., et al. (2013). "Enhanced cell expansion in a KRP2 overexpressor is mediated by increased V-ATPase activity." Plant and Cell Physiology: pct138.
- Fortin, M. C., et al. (1989). "The pattern of secondary root formation in curving roots of Arabidopsis thaliana (L.) Heynh." Plant, cell & environment **12**(3): 337-339.
- Fu, X. and N. P. Harberd (2003). "Auxin promotes Arabidopsis root growth by modulating gibberellin response." Nature **421**(6924): 740-743.
- Fujimoto, S., et al. (2004). "Identification of a novel plant MAR DNA binding protein localized on chromosomal surfaces." Plant molecular biology **56**(2): 225-239.
- Gallavotti, A., et al. (2011). "BARREN STALK FASTIGIATE1 is an AT-hook protein required for the formation of maize ears." The Plant Cell Online **23**(5): 1756-1771.
- Goh, T., et al. (2012). "The establishment of asymmetry in Arabidopsis lateral root founder cells is regulated by LBD16/ASL18 and related LBD/ASL proteins." Development **139**(5): 883-893.
- Goodwin, P. and S. Morris (1979). "Application of phytohormones to pea roots after removal of the apex: effect on lateral root production." Functional Plant Biology **6**(2): 195-200.
- Grasser, K. D. (1995). "Plant chromosomal high mobility group (HMG) proteins." The Plant Journal **7**(2): 185-192.
- Gupta, R., et al. (1998). "Characterisation and promoter analysis of the Arabidopsis gene encoding high-mobility-group protein HMG-I/Y." Plant molecular biology **36**(6): 897-907.

- Hatano-Iwasaki, A. and K. i. Ogawa (2012). "Biomass production is promoted by increasing an aldolase undergoing glutathionylation in Arabidopsis thaliana." Int. J. Plant Dev. Biol **6**: 1-8.
- Himanen, K., et al. (2002). "Auxin-mediated cell cycle activation during early lateral root initiation." The Plant Cell **14**(10): 2339-2351.
- Ivanchenko, M. G., et al. (2008). "Ethylene–auxin interactions regulate lateral root initiation and emergence in Arabidopsis thaliana." The Plant Journal **55**(2): 335-347.
- Jiang, C.-z., et al. (2004). Methods for modifying plant biomass and abiotic stress, US Patent 20,040,128,712.
- Jin, Y., et al. (2011). "An AT-hook gene is required for palea formation and floral organ number control in rice." Developmental biology **359**(2): 277-288.
- Johnson, K. R., et al. (1988). "Complete murine cDNA sequence, genomic structure, and tissue expression of the high mobility group protein HMG-I (Y)." Journal of Biological Chemistry **263**(34): 18338-18342.
- Kapulnik, Y., et al. (2011). "Strigolactones affect lateral root formation and root-hair elongation in Arabidopsis." Planta **233**(1): 209-216.
- Kepinski, S. and O. Leyser (2005). "The Arabidopsis F-box protein TIR1 is an auxin receptor." Nature **435**(7041): 446-451.
- Kim, H. B., et al. (2011). "Comprehensive analysis of AHL homologous genes encoding AT-hook motif nuclear localized protein in rice." Biochemistry and Molecular Biology Reports **44**(10): 680-685.
- Kim, S. Y., et al. (2007). "The chili pepper CaATL1: an AT-hook motif-containing transcription factor implicated in defence responses against pathogens." Molecular plant pathology **8**(6): 761-771.
- Koltai, H. (2011). "Strigolactones are regulators of root development." New Phytologist **190**(3): 545-549.
- Laplaze, L., et al. (2007). "Cytokinins act directly on lateral root founder cells to inhibit root initiation." The Plant Cell **19**(12): 3889-3900.
- Laskowski, M., et al. (2006). "Expression profiling of auxin-treated Arabidopsis roots: toward a molecular analysis of lateral root emergence." Plant and cell physiology **47**(6): 788-792.
- Laskowski, M., et al. (2008). "Root system architecture from coupling cell shape to auxin transport."
- Laskowski, M. J., et al. (1995). "Formation of lateral root meristems is a two-stage process." Development **121**(10): 3303-3310.
- Lavenus, J., et al. (2013). "Lateral root development in Arabidopsis: fifty shades of auxin." Trends in plant science **18**(8): 450-458.

- Lewis, D. R., et al. (2011). "Ethylene inhibits lateral root development, increases IAA transport and expression of PIN3 and PIN7 auxin efflux carriers." Development **138**(16): 3485-3495.
- Li, G., et al. (2015). "GA3 enhances root responsiveness to exogenous IAA by modulating auxin transport and signalling in Arabidopsis." Plant cell reports **34**(3): 483-494.
- Li, X., et al. (2006). "Cytokinin-mediated cell cycling arrest of pericycle founder cells in lateral root initiation of Arabidopsis." Plant and cell physiology **47**(8): 1112-1123.
- Lin, L., et al. (2007). "Crystal structure of Pyrococcus horikoshii PPC protein at 1.60 Å resolution." Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics **67**(2): 505-507.
- Ljung, K., et al. (2005). "Sites and regulation of auxin biosynthesis in Arabidopsis roots." The Plant Cell **17**(4): 1090-1104.
- Lohar, D. P., et al. (2004). "Cytokinins play opposite roles in lateral root formation, and nematode and Rhizobial symbioses." The Plant Journal **38**(2): 203-214.
- Lu, H., et al. (2010). "Overexpression of AHL20 negatively regulates defenses in Arabidopsis." Journal of integrative plant biology **52**(9): 801-808.
- Lu, M., et al. (2001). "Arabidopsis NHO1 is required for general resistance against Pseudomonas bacteria." The Plant Cell Online **13**(2): 437-447.
- Lucas, M., et al. (2013). "Lateral root morphogenesis is dependent on the mechanical properties of the overlaying tissues." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(13): 5229-5234.
- Luo, X., et al. (2014). "Abscisic acid inhibits root growth in Arabidopsis through ethylene biosynthesis." The Plant Journal **79**(1): 44-55.
- Malamy, J. E. and P. N. Benfey (1997). "Organization and cell differentiation in lateral roots of Arabidopsis thaliana." Development **124**(1): 33-44.
- Marhavý, P., et al. (2014). "Cytokinin controls polarity of PIN1-dependent auxin transport during lateral root organogenesis." Current Biology **24**(9): 1031-1037.
- Marchant, A., et al. (2002). "AUX1 promotes lateral root formation by facilitating indole-3-acetic acid distribution between sink and source tissues in the Arabidopsis seedling." The Plant Cell **14**(3): 589-597.
- Marchant, A., et al. (1999). "AUX1 regulates root gravitropism in Arabidopsis by facilitating auxin uptake within root apical tissues." The EMBO journal **18**(8): 2066-2073.
- Matsushita, A., et al. (2007). "AGF1, an AT-hook protein, is necessary for the negative feedback of AtGA3ox1 encoding GA 3-oxidase." Plant Physiology **143**(3): 1152-1162.
- McCully, M. E. (1975). The development of lateral roots, Torrey, J, G., Clarkson, D, T ed (s). The development and function of roots Academic Press.

Meijer, A. H., et al. (1996). "Novel members of a family of AT hook-containing DNA-binding proteins from rice are identified through their *in vitro* interaction with consensus target sites of plant and animal homeodomain proteins." Plant molecular biology **31**(3): 607-618.

Mininno, M., et al. (2012). "Characterization of chloroplastic fructose 1, 6-bisphosphate aldolases as lysine-methylated proteins in plants." Journal of Biological Chemistry **287**(25): 21034-21044.

Moni, A., et al. (2015). "The blue light receptor Phototropin 1 suppresses lateral root growth by controlling cell elongation." Plant Biology **17**(1): 34-40.

Moreno-Risueno, M. A., et al. (2010). "Oscillating gene expression determines competence for periodic Arabidopsis root branching." Science **329**(5997): 1306-1311.

Murashige, T. and F. Skoog (1962). "A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures." Physiologia plantarum **15**(3): 473-497.

Murray, M. and W. F. Thompson (1980). "Rapid isolation of high molecular weight plant DNA." Nucleic acids research **8**(19): 4321-4326.

Müssig, C., et al. (2003). "Brassinosteroids promote root growth in Arabidopsis." Plant Physiology **133**(3): 1261-1271.

Ng, K.-H. and T. Ito (2010). "Shedding light on the role of AT-hook/PPC domain protein in Arabidopsis thaliana." Plant signaling & behavior **5**(2): 200-201.

Ng, K.-H., et al. (2009). "AGAMOUS controls GIANT KILLER, a multifunctional chromatin modifier in reproductive organ patterning and differentiation."

Nieto-Sotelo, J., et al. (1994). "PF1: an AT hook-containing DNA binding protein from rice that interacts with a functionally defined d (AT)-rich element in the oat phytochrome A3 gene promoter." The Plant Cell Online **6**(2): 287-301.

Parizot, B., et al. (2008). "Diarch symmetry of the vascular bundle in Arabidopsis root encompasses the pericycle and is reflected in distich lateral root initiation." Plant Physiology **146**(1): 140-148.

Pekker, I., et al. (2005). "Auxin response factors mediate Arabidopsis organ asymmetry via modulation of KANADI activity." The Plant Cell **17**(11): 2899-2910.

Péret, B., et al. (2012). "Auxin regulates aquaporin function to facilitate lateral root emergence." Nature cell biology **14**(10): 991-998.

Raven, J. and D. Edwards (2001). "Roots: evolutionary origins and biogeochemical significance." Journal of Experimental Botany **52**(suppl 1): 381-401.

Reed, R. C., et al. (1998). "Inhibition of auxin movement from the shoot into the root inhibits lateral root development in Arabidopsis." Plant Physiology **118**(4): 1369-1378.



- Reeves, R. and M. S. Nissen (1990). "The AT-DNA-binding domain of mammalian high mobility group I chromosomal proteins. A novel peptide motif for recognizing DNA structure." Journal of Biological Chemistry **265**(15): 8573-8582.
- Ruyter-Spira, C., et al. (2011). "Physiological effects of the synthetic strigolactone analog GR24 on root system architecture in Arabidopsis: another belowground role for strigolactones?" Plant physiology **155**(2): 721-734.
- Růžicka, K., et al. (2007). "Ethylene regulates root growth through effects on auxin biosynthesis and transport-dependent auxin distribution." The Plant Cell **19**(7): 2197-2212.
- Sanz, L., et al. (2011). "The Arabidopsis D-type cyclin CYCD2; 1 and the inhibitor ICK2/KRP2 modulate auxin-induced lateral root formation." The Plant Cell **23**(2): 641-660.
- Scarpella, E., et al. (2004). "Stage-specific markers define early steps of procambium development in Arabidopsis leaves and correlate termination of vein formation with mesophyll differentiation." Development **131**(14): 3445-3455.
- Shane, M. W. and H. Lambers (2005). "Cluster roots: a curiosity in context." Plant and Soil **274**(1-2): 101-125.
- Stepanova, A. N., et al. (2005). "A link between ethylene and auxin uncovered by the characterization of two root-specific ethylene-insensitive mutants in Arabidopsis." The Plant Cell **17**(8): 2230-2242.
- Street, I. H., et al. (2008). "The AT-hook-containing proteins SOB3/AHL29 and ESC/AHL27 are negative modulators of hypocotyl growth in Arabidopsis." The Plant Journal **54**(1): 1-14.
- Swarup, K., et al. (2008). "The auxin influx carrier LAX3 promotes lateral root emergence." Nature cell biology **10**(8): 946-954.
- Swarup, R., et al. (2001). "Localization of the auxin permease AUX1 suggests two functionally distinct hormone transport pathways operate in the Arabidopsis root apex." Genes & development **15**(20): 2648-2653.
- Tanimoto, E. (2012). "Tall or short? Slender or thick? A plant strategy for regulating elongation growth of roots by low concentrations of gibberellin." Annals of Botany **110**(2): 373-381.
- Weigel, D., et al. (2000). "Activation tagging in Arabidopsis." Plant Physiology **122**(4): 1003-1014.
- Xiao, C., et al. (2009). "Over-expression of an AT-hook gene, AHL22, delays flowering and inhibits the elongation of the hypocotyl in Arabidopsis thaliana." Plant molecular biology **71**(1-2): 39-50.
- Yadeta, K. A., et al. (2011). "The Arabidopsis thaliana DNA-binding protein AHL19 mediates Verticillium wilt resistance." Molecular Plant-Microbe Interactions **24**(12): 1582-1591.
- Yun, J., et al. (2012). "The AT-hook motif-containing protein AHL22 regulates flowering initiation by modifying FLOWERING LOCUS T chromatin in Arabidopsis." Journal of Biological Chemistry **287**(19): 15307-15316.

Zenser, N., et al. (2001). "Auxin modulates the degradation rate of Aux/IAA proteins." Proceedings of the National Academy of Sciences **98**(20): 11795-11800.

Zhao, J., et al. (2013). "Arabidopsis thaliana AHL family modulates hypocotyl growth redundantly by interacting with each other via the PPC/DUF296 domain." Proceedings of the National Academy of Sciences **110**(48): E4688-E4697.

Zhao, J., et al. (2014). "Insights into the evolution and diversification of the AT-hook Motif Nuclear Localized gene family in land plants." BMC plant biology **14**(1): 266.

Zhou, J., et al. (2013). "Cell-to-cell movement of two interacting AT-hook factors in Arabidopsis root vascular tissue patterning." The Plant Cell **25**(1): 187-201.