

Univerzita Karlova

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Experimentální biologie rostlin



Bc. Dagmar Králíková

Role adheze plazmatické membrány k buněčné stěně ve vývoji a funkci kořenového systému

The role of adhesion of the plasma membrane to the cell wall in the development and function
of the root system

Diplomová práce

Školitel: RNDr. Edita Tylová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Aleš Soukup, Ph.D.

Praha, 2019

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a 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, 02. 08. 2019

Podpis:

Poděkování

Nejvíce bych chtěla poděkovat své školitelce RNDr. Editě Tylové, Ph.D. za její trpělivé vedení práce a přínosné rady. Stejně tak bych chtěla poděkovat Ing. Yvettě Šefrnové, za její praktické rady v laboratoři, dále RNDr. Aleši Soukupovi Ph.D. za konzultace a cenné rady k experimentům. Za pomoc s konfokální mikroskopií děkuji Mgr. Ondřejovi Šebestovi. A kromě toho všem svým kolegům v laboratoři za podnětné náměty k práci.

Obsah

1	Úvod.....	11
1.1	Cíl práce.....	11
2	Přehled literatury.....	13
2.1	Interakce plasmatické membrány s buněčnou stěnou.....	13
2.2	Arabinogalaktanové proteiny	14
2.2.1	Fasciclin-like proteiny.....	15
2.3	Integrin-like proteiny a RGD proteiny	20
2.4	Další proteiny s možnou rolí v propojení plasmatické membrány a buněčné stěny	24
3	Metodika	25
3.1	Biologický materiál a kultivační podmínky	25
3.2	Linie <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.3	Genotypování linií <i>Arabidopsis thaliana</i>	25
3.3.1	Izolace DNA.....	26
3.3.2	Polymerázová řetězová reakce	27
3.3.3	Agarózová gelová elektroforéza.....	27
3.4	Fenotypová analýza	28
3.4.1	Kultivace rostlin in vitro	28
3.4.2	Kultivační média	28
3.4.3	Digitalizace výsledků fenotypové analýzy.....	29
3.4.4	Statistické vyhodnocení.....	29
3.5	Příprava rostlin nesoucích translační a transkripční fúze	30
3.5.1	Bakteriální materiál	30
3.6	Transformace <i>Arabidopsis thaliana</i>	30
3.7	Design konstruktů a plasmidy použité pro Multisite Gateway®.....	31
3.7.1	Translační fúze FLA proteinů	31

3.7.2	Transkripční fúze FLA proteinů.....	33
3.7.3	Vektory.....	34
3.7.4	Postup přípravy transformací	37
3.8	Mikroskopické pozorování	42
4	Výsledky	43
4.1	Ověření inzerčních linií, zpětné křížení.....	43
4.2	Fenotypová analýza T-DNA inzerčních mutantů.....	44
4.2.1	4.2.1 Fasciclin-like arabinogalaktanový protein FLA9.....	45
4.2.2	Fasciclin-like arabinogalaktanový protein FLA2.....	59
4.2.3	Integrin-like protein At14a.....	61
4.3	Lokalizace proteinu FLA9.....	62
5	Diskuze	73
5.1	Arabinogalaktanový protein FLA9.....	73
5.2	Arabinogalaktanový protein FLA2.....	77
5.3	Role FLA9 a FLA2 v reakci kořenů na salinitu a další stresové faktory	77
5.4	Fenotypová analýza At14a	78
6	Závěr	78
7	Seznam použité literatury.....	80

Abstrakt

Adheze mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou a existence kontinua těchto dvou kompartmentů je důležitá pro přenos signálů, například při napadení patogenem, během expanze buněk a růstu buněčné stěny, či reakce na podmínky okolního prostředí. Tuto adhezi zajišťuje kromě turgoru i fyzické propojení obou kompartmentů. Jeden z nejznámějších příkladů fyzického propojení najdeme v kořenovém systému, v oblasti Casparyho proužku, kde je potřebné pro udržení apoplastické bariéry kořene, a to i za nepříznivých podmínek a následné plazmolýzy. O fyzickém propojení a účastnících se makromolekulách se toho do dnešní doby ví málo, jsou ale vytipováni kandidáti, kteří by se této interakce mohli účastnit.

Tato diplomová práce se zabývá arabinogalaktanovými (AGP) proteiny s fasciclin-like doménou (konkrétně FLA9 a FLA2). Tyto proteiny by mohly hrát roli v adhezi plasmatické membrány a buněčné stěny a zároveň být zapojeny v regulaci růstu a vývoje kořenového systému, vzhledem k jejich relativně silné expresi v kořenech, především v elongační zóně a v primární kůře, včetně endodermis (dle čipových dat). Dále se práce v menší míře věnuje i integrin-like proteinu At14A. Nejzajímavějším výsledkem provedených experimentů je zjištění, že mutantní rostlina se sníženou expresí *FLA9* genu má zhoršený růst kořenového systému díky sníženému počtu postranních kořenů, a také je u ní negativně ovlivněna tvorba semen. Naopak *fla2* mutantní rostliny se v růstu kořenového systému neliší od divokého typu. Lokalizace FLA9 byla pozorována v buněčné stěně buněk kořene (především primární kůry) od elongační zóny, ale i v nadzemní části a reprodukčních orgánech. *At14a* mutantní rostliny naopak vykazují zvýšenou odolnost kořenového systému vůči salinitě.

Klíčová slova: adheze, buněčná stěna, fasciclin-like, arabinogalaktanové proteiny, WAK kinázy, integrin-like, CASP, kořenový systém

Abstract

Adhesion between the plasma membrane and the cell wall and the existence of the continuum of these two compartments is needed for signal transmission, e.g. under pathogen attack, during cell expansion and cell wall growth, or in response to environmental conditions. This adhesion is, in addition to the turgor, provided by physical connection of both compartments. One of the best-known examples of physical connection is found in the root system, in the Caspary strip region, where it is required to maintain apoplastic barriers of the root system, even under adverse conditions and consequent plasmolysis. There is little information about the physical interconnection and the participating macromolecules but there are candidates, which could participate in this interaction.

The diploma thesis deals with arabinogalactan (AGP) proteins with fasciclin-like domain (namely FLA9 and FLA2). These proteins may play a role in the adhesion of plasma membrane and cell wall and may be involved in the growth regulation and development of the root system. Both genes are relatively strongly expressed in the roots, especially in the elongation zone and in the cortex, including the endodermis (according to chip data). Also, to a smaller extent, the thesis deals with integrin-like At14A protein. The most interesting result of the realised experiments is the finding that a mutant plant with lower expression of the FLA9 gene has decreased root system growth due to reduced number of lateral roots and its seed production is negatively affected. On the other hand, the growth of fla2 mutant plants root system doesn't differ from the wild type. Localization of FLA9 has been observed in cell walls of root cells (especially in the cortex) starting from elongation zone, but also in the shoot and reproductive organs. By contrast, at14a mutant plants exhibit increased salinity resistance of the root system.

Key words: adhesion, cell wall, fasciclin-like, arabinogalactan proteins, WAK kinases, integrin-like, CASP, root system

Seznam zkratek

AGP – arabinogalaktanové proteiny

BSA – bovine serum albumin – hovězí sérový albumin

CASP – Casparian strip membrane domain protein – proteiny membránové domény Casparého proužku

CESA – celulóza syntázový komplex

ER – endoplasmatické retikulum

FAS – fasciclinová doména

FLA – fasciclin-like arabinogalaktanové proteiny

FM4-64 – fluorescenční barva detekující membrány

NDR1 – non-race-specific disease resistance gene

rdr6 – RNA dependentní RNA polymeráza 6 mutantní rostlina

RGD – sekvence aminokyselin arginin-glycin-kyselina asparagová

SE – střední chyba průměru

SOS5 – salt overly sensitive 5

WAK – wall associated kinase – transmembránové kinázy

wt – divoký typ rostliny

1 Úvod

Přítomnost buněčné stěny v rostlinných buňkách je nesmírně důležitá pro zajištění mechanické pevnosti, ochrany před patogeny, ale také pro vývoj a diferenciaci buněk. Samotná buněčná stěna není schopna zajišťovat všechny tyto funkce bez propojení s plasmatickou membránou buňky a bez signalizace buňky jako takové. Na úrovni signálních drah jsou známy mnohé proteiny zajišťující přenos signálů do buňky, jednou takovou velkou rodinou genů jsou receptorové kinázy s extracelulární doménou, která získává signál z prostředí a přenáší ho své cytoplasmatické doméně, která šíří signál dál do nitra buňky. Podle extracelulárních oblastí jsou tyto kinázy dále rozdělovány. Jeden z dobře prozkoumaných signálních přenosů je CLAVATA zpětnovazebná smyčka pro tvorbu a diferenciaci apikálního meristému (Tor, Lotze, and Holton 2009) fungující i v kořenovém apikálním meristému s homologními geny. O strukturním fyzickém propojení plasmatické membrány a buněčné stěny se toho ale stále mnoho neví, existuje jen minimum konkrétních makromolekul, jejichž role v adhezi těchto kompartmentů byla prokázána. I přestože není pochyb o tom, že fyzické propojení existuje na základě zdokumentovaných dokladů plazmolyzovaných buněk, např. existence Hechtových provazců či adheze plasmalemy k buněčné stěně v místě Casparyho proužku (I. Lang, Barton, and Overall 2004). V literatuře se objevují kandidáti, kteří by se mohli účastnit strukturního propojení a jednou z několika skupin jsou transmembránové kinázy asociované s buněčnou stěnou (wall-associated kinases, WAK). WAK patří do rodiny již zmíněných receptorových kináz, jejichž transmembránová doména by mohla být nápomocná při propojování buněčné stěny k plasmatické membráně (Verica et al. 2002). Další skupina proteinů, které by se mohly účastnit v této problematice, jsou takzvané integrin-like proteiny s podobností k integrinům živočišných buněk (Langhans et al. 2017). Živočišné integriny jsou dnes již dobře prozkoumány a jejich mechanismus propojování buněk mezi sebou je poměrně dobře znám (Takada, Ye, and Simon 2007), což je výhodné pro zkoumání rostlinných integrin-like. Naposlední skupinou jsou arabinogalaktanové proteiny (AGP) s fasciclin-like doménou objevenou také v živočišných buňkách, kde zajišťuje homofilické interakce a proteiny s touto doménou se účastní adheze mezi buňkami (Johnson et al. 2003).

1.1 Cíl práce

Diplomová práce navazuje na práci bakalářskou, která byla řešena na základě recentních známých informací o adhezi plasmatické membrány k buněčné stěně, a to jak specificky v endodermálních a exodermálních buňkách (Casparyho proužky), tak v ostatních buňkách

rostlin. Cílem je charakterizace inzerčních mutantů *Arabidopsis* ve dvou vybraných arabinogalaktanových proteinech ze skupiny FLA (fasciclin-like), FLA2, FLA9, a to především v kořenech, kde doposud nebyly nijak popsány. Právě v kořenech mají tyto dva geny velice zajímavou expresi v primární kůře. Dále podobným způsobem analyzovat integrin-like protein At14a.

Konkrétními cíli práce jsou:

- Fenotypová analýza rostlin s modulovanou expresí genů *FLA9*, *FLA2*, *At14a* s hlavním zaměřením na:
 - růst kořenového systému
 - reakce na stresové faktory (např. sucho, salinita)
- Lokalizace exprese *FLA9* a lokalizace proteinu FLA9 v rostlině pomocí translační fúze FLA9-mCherry
- Lokalizace proteinu FLA2 v rostlině za pomoci translační fúze FLA2:mCherry

2 Přehled literatury

2.1 Interakce plasmatické membrány s buněčnou stěnou

Buněčná stěna a plasmatická membrána jsou důležitými kompartmenty rostlinné buňky a společně utváří kontinuum zajišťující řadu procesů, mezi kterými je důležitá signalizace či lokalizace membránových proteinů. Neopomenutelnou část tvoří samotná syntéza buněčné stěny, např. celulóza je syntetizována za pomoci CESA (celulózasyntáza) komplexů lokalizovaných na plasmatické membráně (Desprez et al. 2007). Kontakt mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou zajišťuje turgor buňky. Kromě toho ale dochází k přímému propojení, čehož mohou být důkazem tzv. Hechtovy provazce, což jsou provazce cytoplasmy, která je stále propojená s buněčnou stěnou v průběhu plazmolýzy (Buer, Weathers, and Swartzlander 2000).

Doposud nebyly jednoznačně potvrzené makromolekuly, které by s určitostí propojovaly plasmatickou membránu a buněčnou stěnu, avšak existuje několik kandidátních skupin, které by se mohly na této adhezi podílet. Příkladem mohou být specifické CASP (Casparian strip membrane domain protein) proteiny, které nacházíme v endodermálních a exodermálních buňkách kořene v Casparyho prouzcích (Roppolo et al. 2011). Tyto proteiny jsou transmembránové a shlukují se do oblasti, kde bude vytvořen Casparyho proužek, vytvoří zde membránovou doménu, nad kterou se do buněčné stěny následně ukládá lignin a vzniká tak Casparyho proužek (Roppolo et al. 2011). CASP fungují zřejmě jako lešení regulující pozici enzymů zapojených v lignifikaci Casparyho proužku. Zároveň se předpokládá, že zprostředkovávají fyzické propojení plasmatické membrány a buněčné stěny, které se v místě Casparyho proužku vyskytuje a jehož důsledkem je specifický vzorec plazmolýzy (tzv. pásková plazmolýza) (Enstone and Peterson 1997; Liu, Persson, and Sánchez-Rodríguez 2015; Roppolo et al. 2011). Důležitost tohoto fyzického propojení v oblasti endodermis a exodermis kořene je zřejmá. Rostlina si musí udržet apoplastickou bariéru pro příjem látek a vody. Jednoznačné experimentální důkazy potvrzující roli CASP proteinů v této adhezi nicméně nejsou k dispozici. Kromě těchto specifických proteinů je řada dalších kandidátů, jako jsou například arabinogalaktanové proteiny nebo integrin-like proteiny, ale i další proteiny, které budou detailněji probírány v následujících kapitolách. Tyto proteiny by se mohly účastnit fyzického propojení membrány a buněčné stěny v různých částech rostliny a plnit tak regulační a signální role v různých vývojových procesech či v reakci rostliny na podmínky okolního prostředí.

2.2 Arabinogalaktanové proteiny

Arabinogalaktanové proteiny (AGP) patří do velké komplexní skupiny glykoproteinů, jejichž diverzita vychází z různorodé glykosylace (Ellis et al. 2010). Tyto proteiny jsou bohaté především na prolin, hydroxyprolin, alanin a serin, ale typicky obsahují pouze okolo 10% proteinové části a 90% části sacharidové. Sacharidovou část tvoří především arabinóza a galaktóza (Youl, Bacic, and Oxley 1998), základem je řetězec β -(1,3) galaktanů s přerušovaným β -(1,6) galaktopyranózovým řetězcem (Tryfona et al. 2012). Tyto proteiny velice dobře reagují s barvivem β -Yariv (Yariv 1967), které se na ně navazuje a vyváže je. Barvivo β -Yariv je směs fenyglykosidů, které selektivně váží AGP v závislosti na chemické podobě cukerné části (Su and Higashiyama 2018).

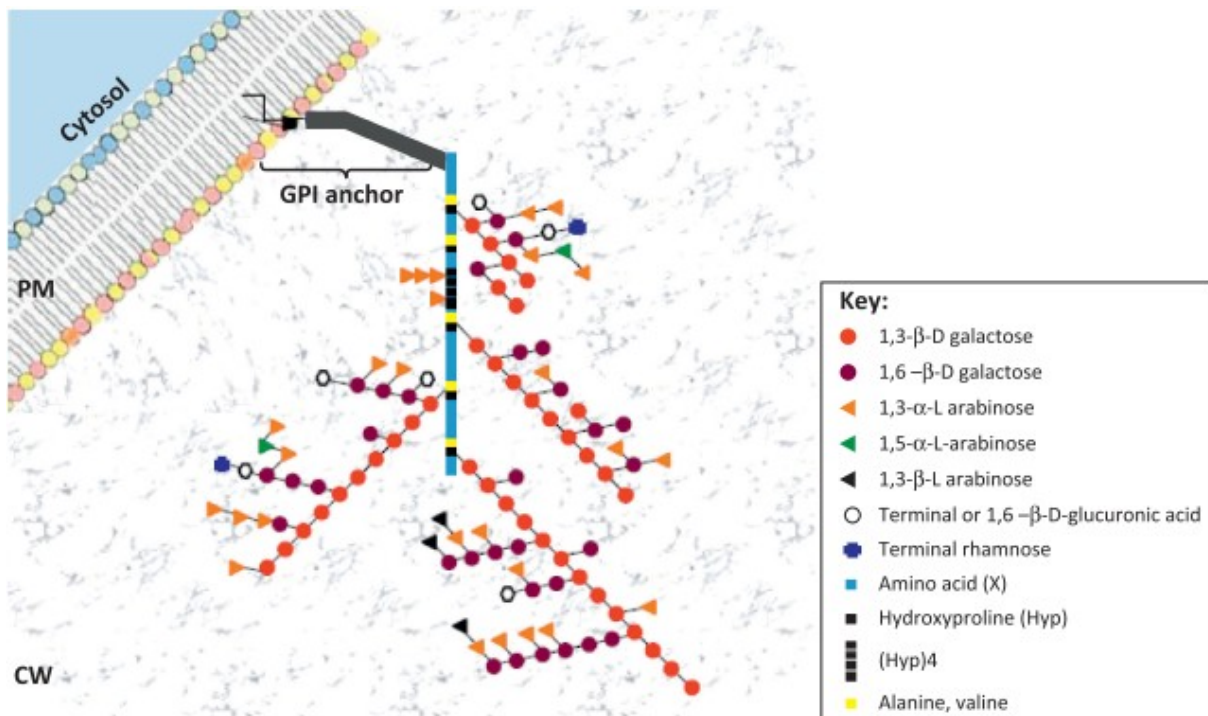
AGP můžeme podle některých autorů rozdělit do čtyř skupin: klasické AGP; proteiny bohaté na lysin, arabinogalaktanové peptidy a fasciclin-like (FLA) proteiny (Pereira 2015); může se ale vyskytovat i jiné členění (He et al. 2019). AGP proteiny nezdědká obsahují N signální sekvenci fungující jako sekreční signál a také C-terminální doménu, která bývá posttranslačně nahrazována glykosylfosfatidylinositolovou (GPI) kotvou, která kotví proteiny v plasmatické membráně (Schultz et al. 1998a) – lokalizace a struktura AGP je naznačeno na obrázku 2.1. GPI kotva je připojována v endoplasmatickém retikulu a proteiny se nejspíše dostávají do extracelulárního prostoru sekretorickou drahou (Y. Gaspar et al. 2001).

Jakožto velká skupina proteinů se účastní mnoha procesů v rostlinném těle, zahrnující například buněčnou komunikaci, programovanou buněčnou smrt nebo embryogenezi (Su and Higashiyama 2018). Mechanismus funkce AGP proteinů ale zatím není zcela jasný. Předpokládá se, že by mohlo docházet ke specifickému odštěpování sacharidové části a uvolněné štěpy by mohly sloužit jako signální molekuly. Druhá možnost je specifické uvolňování celého AGP proteinu od plasmatické membrány štěpením GPI kotvy, opět se signální rolí (Pereira 2015).

Zajímavým proteinem je AGP17, jehož mutant (*rat1* – resistant to *Agrobacterium* transformation) je odolnější vůči transformaci bakterií *Agrobacterium tumefaciens*. Dle experimentů se ukazuje, že se jedná o problém s navazováním *Agrobacterium* ke kořenům rostlin (Y. M. Gaspar et al. 2004), podobný projev se zjistil i u infekce bakteriemi z rodu *Rhizobium* (Vicré et al. 2005). Jiná mutantní rostlina (*galt2galt5*) s dvojitou mutací v enzymech hydroxyprolin-galaktosyltransferázách důležitých pro navazování sacharidů na proteinovou část AGP (O-glykosylace), vykazuje špatný růst kořenů, bobtnání kořenové

čepičky jako odpověď na salinitu či sacharózu a také urychlenou senescenci listů (Showalter and Basu 2016). AGP30 se nejspíše účastní regenerace kořenů a také klíčení semen. Bylo zjištěno, že pro iniciaci kořenů *de novo in vitro* je nutně potřeba exprese *AGP30*. U čerstvých semen *agp30* dochází k rychlejšímu klíčení semen než je tomu u divokého typu (Van Hengel and Roberts 2003). AGP se uplatňují také v generativních orgánech v poměrně velkém zastoupení. *AGP6/11/22/23/24/40* a *FLA3/14* jsou značně exprimovány v samčích orgánech. *FLA1/8/10/16* se nacházejí v samičích generativních orgánech (Su and Higashiyama 2018). Některé ze jmenovaných již byly charakterizovány, u jiných podrobnější data prozatím chybí.

Z důvodu velké početnosti členů v této rodině může docházet ke genové redundanci a ne vždy se ukáže jasný fenotypový projev u mutantních rostlin (Y. Gaspar et al. 2001).



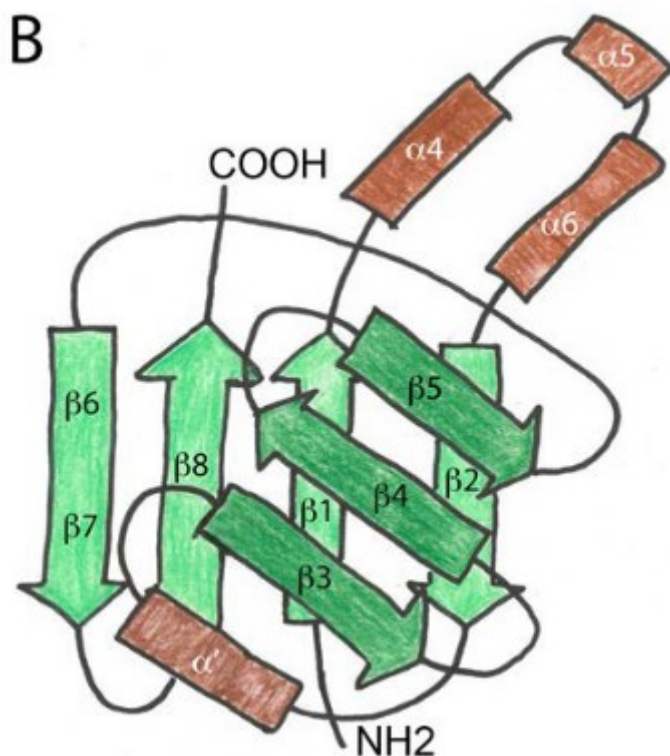
Obrázek 2.1. – struktura AGP proteinů směřující do oblasti buněčné stěny (CW) zakotvených glykosilfosfatidilinositolovou (GPI) kotvou do plasmatické membrány (PM) buňky (Nguema-ona et al. 2013)

2.2.1 Fasciclin-like proteiny

Fasciclin-like (FLA) proteiny jsou specifickou podskupinou AGP proteinů. Byly označeny podle původních fasciclin proteinů známých z živočišné říše - ty byly objeveny u kobyly (Bastiani et al. 1987), ale známé jsou především z octomilky, kde plní funkci adheze mezi buňkami. U *Arabidopsis* byla nalezena skupina 21 těchto fasciclin-like proteinů s jistou sekvenční podobností k živočišným fasciclinům. Existují dvě malé oblasti, které jsou značně

konzervované (Johnson et al. 2003) – jedná se o místa H1 a H2 ve fasciclin-like doméně. FLA můžeme rozdělit do čtyř podskupin podle své struktury - zdali obsahují GPI kotvu a také kolik mají domén (Seifert 2018). Doména je vždy jedna nebo dvě a označují se jako tzv. fasciclinové (FAS), a uvažuje se, že by mohly fungovat v propojování kompartmentu buněčné stěny a plasmatické membrány (Johnson et al. 2011) tak, jako je tomu u živočišných buněk (u *Drosophila* utvářejí homofilické interakce (Elkins et al. 1990)).

Každá z FAS domén obsahuje zhruba 100-150 aminokyselin. Z toho zhruba 10 aminokyselin dlouhé, již zmíněné, oblasti H1 a H2 jsou značně konzervovány (Kawamoto et al. 1998). FAS



Obrázek 2.2 – struktura FAS1 domény (Seifert 2018)

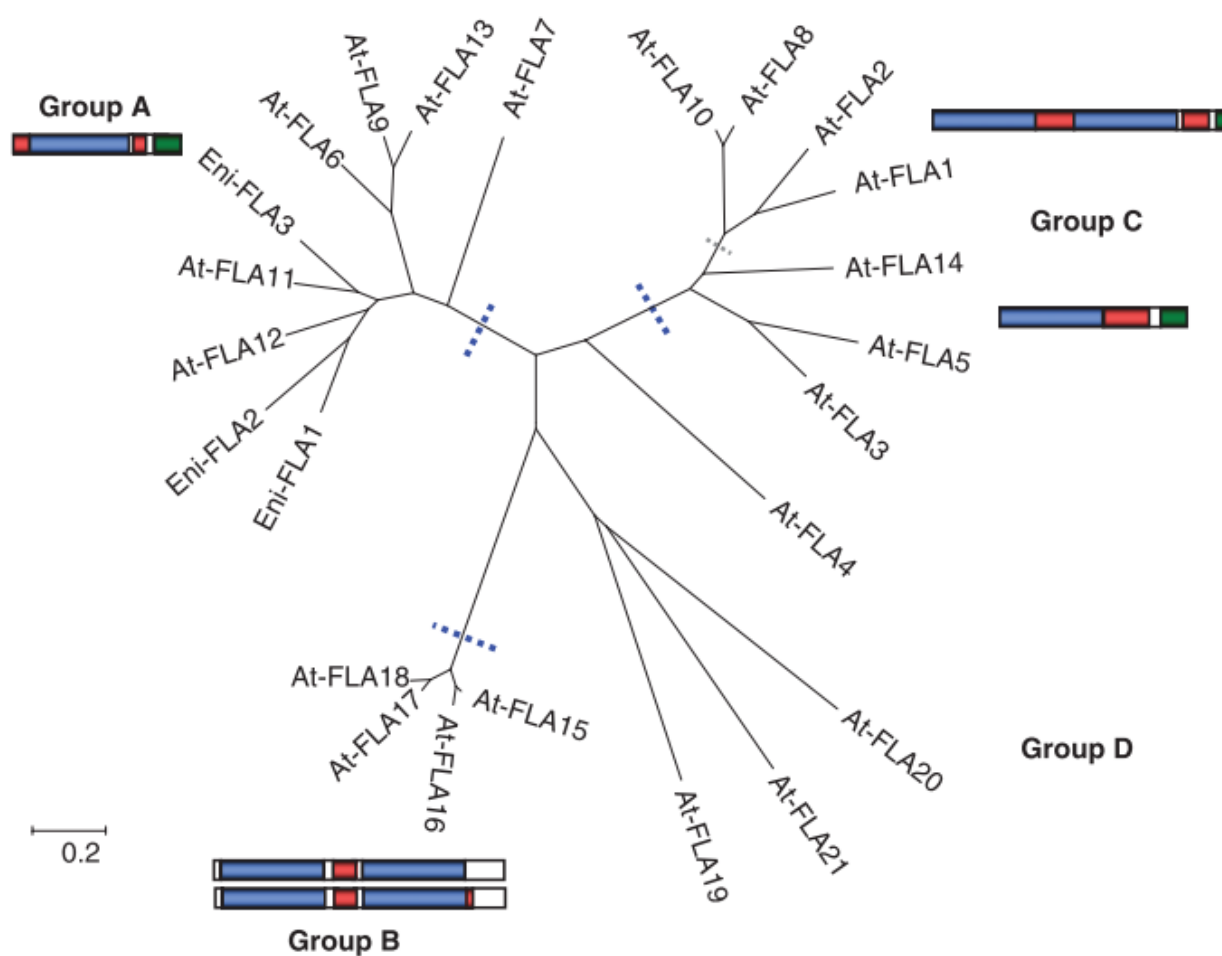
doména je globulární a ve svém středu obsahuje dva β -listy, jak je znázorněno na obrázku 2.2 převzatého ze článku Seifert 2018.

Ukazuje se, že skládání a přidávání GPI kotvy k proteinům je pravděpodobně obdobné jako v živočišných nebo kvasinkových buňkách. V rostlinách byly nalezeny homologní proteiny účastníci se syntézy a remodelace GPI kotvy a mutací některých z nich dochází k narušení dráhy této syntézy (Bundy et al. 2016; Lalanne et al. 2004). Tato membránová kotva je důležitá pro napojení proteinů a jejich uchycení

v plasmatické membráně skrze ethanolaminfosfát. Díky své struktuře bývá také cílem fosfolipáz, které odštěpí protein z GPI kotvy do buněčné stěny, kde může docházet k následným signálním drahám (Showalter 2001). Syntéza GPI začíná na cytoplasmatické straně endoplasmatického retikula (ER), ale dokončena je v lumenu ER a proteiny určené k navázání GPI jsou syntetizovány také do ER (Cheung et al. 2014). Navázané proteiny kotvené do membrány jsou transportovány do Golgiho aparátu a vezikulárním transportem se následně dostávají na plasmatickou membránu, kde buď zůstávají zakotvené, nebo jsou odštěpeny do oblasti buněčné stěny a mohou být signální molekulou stejně tak, jako může být

samotná GPI kotva na membráně důležitá pro intra a extracelulární posly (Bütikofer and Brodbeck 1993; Schultz et al. 1998b).

Dá se konstatovat, že tato velká rodina genů nebyla plně prozkoumána, ale z dosavadních výsledků se dá říct, že se účastní řady procesů na mnoha úrovních v celé rostlině. Na obrázku 2.3 je možné vidět srovnání a zasazení těchto genů do fylogenetického stromu. Z daného obrázku je vidět, že dva geny studované v této diplomové práci (*FLA9* a *FLA2*), patří do různých podskupin a liší se počtem FAS domén. Oba nicméně mají GPI kotvu. *FLA9* je nejpodobnější *FLA13*, jejich podobnost je okolo 85% (Johnson et al. 2003), prozatím ale nebyl ani tento gen zkoumán.



Obrázek 2.3 – fylogenetické srovnání genů rodiny *FLA*, modré označení ukazuje FAS doménu, červené označení hydroxyprolinové oblasti a zelené označení GPI kotvu (MacMillan et al. 2010).

Ačkoliv jsou tyto proteiny poměrně dlouho známy, jejich biologická funkce prozatím nebyla objasněna. Jsou popsány fenotypy některých mutantních rostlin genů *FLA*. Jedním z takových je mutant *sos5/fla4* (salt overly sensitive 5), který má bodovou mutaci ve druhé FAS doméně,

což způsobuje výrazné fenotypové projevy jako je bobtnání kořenové čepičky při salinitě (Shi et al. 2003). Předpokládá se, že SOS5/FLA4 je potřebný pro správnou elongaci buněk a utváření buněčné stěny, protože *sos5/fla4* mutantní rostliny vykazují defekty v uspořádání buněčné stěny a poruchy v elongaci (Shi et al. 2003). Stejný fenotypový projev vykazuje i dvojitý mutant v genech kódujících receptorové kinázy bohaté na leucin – *FEI1*, *FEI2* (pojmenováno podle čínského slova fei, což v češtině znamená tlustý a odkazuje na fenotyp kořenových špiček) - *fei1fei2*. Byl proto vytvořen trojitý mutant *sos5fei1fei2*, který nevykazoval rozdílný fenotypový projev oproti dvojitému mutantu, což vede k hypotéze, že by proteiny SOS5/FLA4, FEI1 a FEI2 mohly být společnými účastníky signální dráhy regulující buněčnou elongaci (Xu et al. 2008).

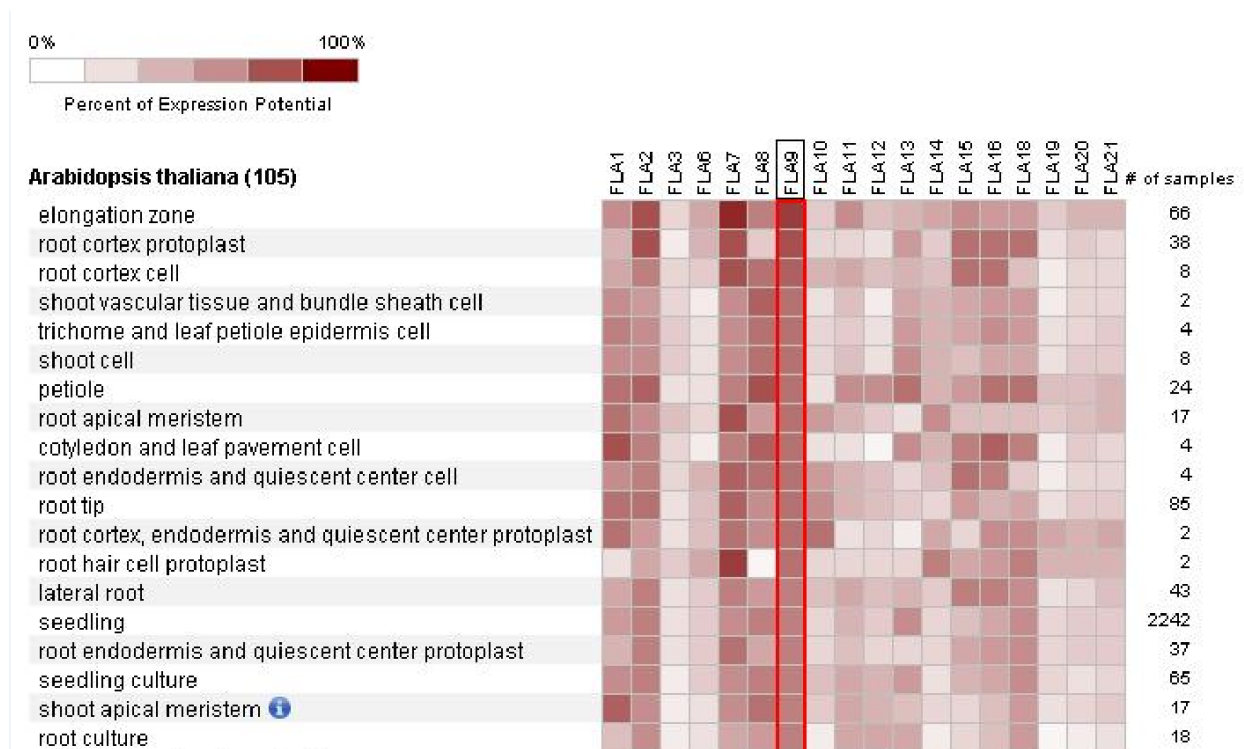
Kromě účasti v regulaci elongace byly popsány i další role FLA proteinů. Např. transkript genu *FLA11* byl objeven ve sklerenchymatických buňkách a ukazuje se, že exprese tohoto genu předchází lignifikaci buněk. K němu homologním genem je *FLA12* (Ito et al. 2005). Vzhledem k potenciální redundanci mezi těmito geny byl vytvořen dvojitý mutant *fla11/fla12*, u kterého již byl nalezen fenotypový projev mutace, na rozdíl od jednoduchých mutantů. Ukázalo se, tento dvojitý mutant má zhruba o 70% nižší pevnost v tahu ve svých stoncích (MacMillan et al. 2010). Na druhou stranu rozdílný fenotypový projev oproti divokému typu se na buněčné úrovni neprokázal – sekundární buněčná stěna, kterou zkoumali obarvováním toluidinovou modří a floroglucinolem pro detekci ligninu, nevykazovala žádný rozdíl v obsahu ligninu nebo ve své tloušťce; neprokázaly se ani změny v buněčném tvaru.

Také protein FLA1 se účastní vývoje stonku a v menší míře zřejmě i kořene, jak ukazují experimenty s kalusy, u kterých se sledovala regenerace kořenů či nadzemních částí rostliny *Arabidopsis* (Johnson et al. 2011). Pro experimenty byly využity kořeny v oblasti kořenových vlásků, které byly nařezány a přeneseny na médium. Po ošetření médiem s vyšším poměrem auxinu ku cytokininu (CIM) po dobu 4 dní a následně přesazení na 14 dní na médium obsahující více cytokininů než auxinu, vykazoval mutant snížený růst prýtu. Následně bylo zkoumáno, jak dlouho musí segmenty maximálně růst na CIM médiu, aby docházelo k rozdílné tvorbě prýtu mezi mutantem a divokým typem. Doba byla stanovena na jeden den, což naznačuje, že se tento FLA1 protein účastní již poměrně raného vývoje prýtu. Dále byl zkoumán mutant *fla1* v zaměření na množství postranních kořenů a vykazoval jejich vyšší množství, a kromě toho také delší hlavní kořeny.

Podobně jako některé další AGP proteiny se i některé FLA zřejmě účastní generativní fáze vývoje. Gen *FLA3* je exprimován v pylu a v pylové láčce a u RNAi-FLA3 (RNA interference)

transgenních rostlin docházelo zhruba u 50% pylu k fenotypovým změnám – konkrétně k jeho vrásčitosti a scvrknutí (Li et al. 2010), což by mohlo vést k hypotéze, že se *FLA3* účastní formace intiny. Kromě pylu byly ovlivněny i šesule, které byly kratší. Problém s tvorbou semen měla také *fla4* mutantní rostlina. Neprokázal se rozdíl ve velikostech semen, pouze bylo zjištěno, že dochází k tvorbě menšího množství semen v šesuli (Shi et al. 2003).

Pro diplomovou práci byly vybrány geny *FLA9* a *FLA2* podle exprese se zaměřením na kořenový systém, jak je vidět na obrázku 2.4, kde nejvyšší expresi měl gen *FLA9*. Tento gen prozatím nebyl dostatečně charakterizován. Jak již bylo zmíněno, informace dokládají 85% similaritu genu *FLA9* s genem *FLA13* (Johnson et al. 2003). Jediná práce zaměřující se na *FLA9* sleduje význam *FLA9* v šesulích a ukazuje, že mutant *fla9* se sníženou expresí tohoto genu má menší schopnost tvorby semen a výrazně sníženou schopnost tvorby semen po expozici sucha (Cagnola et al. 2018). Několik zmínek o *FLA9* je také v další literatuře. Bylo zjištěno, že při deficienci bóru dochází ke snížení exprese *FLA9* (Camacho-Cristobal et al. 2008), další zmínkou bylo, že transkripce *FLA9* byla pozměněna účinkem brassinosteroidů (Lee et al. 2018).

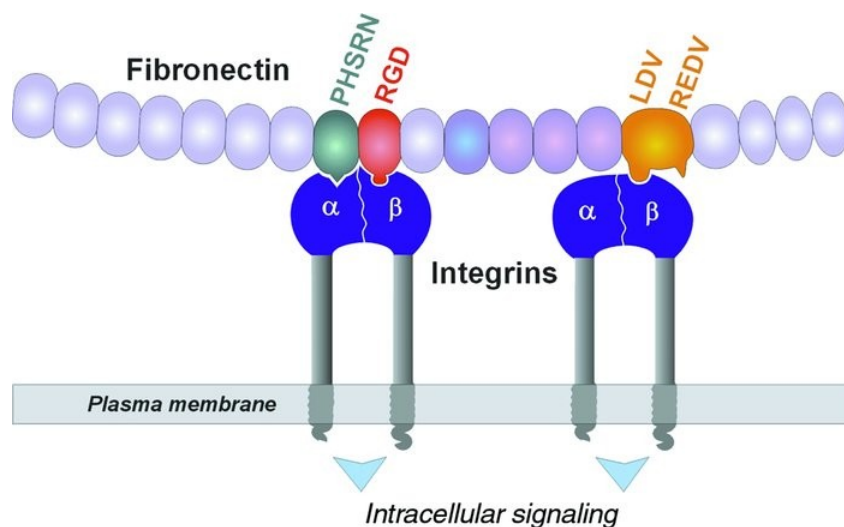


Obrázek 2.4 – exprese genů *FLA* především v kořenovém systému s vyznačením v červeném rámečku gen *FLA9* (data z programu Genevestigator).

2.3 Integrin-like proteiny a RGD proteiny

RGD (sekvence aminokyselin arginin-glycin-kyselina asparagová) proteiny jsou známé především v adhezi mezi buňkami u živočichů, kde se specificky váží s membránovými receptory integriny. Jako první byla tato sekvence objevena v živočišném proteinu fibronektinu, což je glykoprotein nacházející se v extracelulární matrix, který je důležitý pro vývoj obratlovců a ve větším množství se nachází v jejich krvi (Pankov 2002; Ruoslahti 1996).

Integriny patří mezi transmembránové glykoproteiny, které slouží jako receptory pro mezibuněčné interakce. Důležitou funkcí je předávání signálů mezi buňkou a prostředím, což hraje velkou roli nejen ve vývojových procesech. Integriny jsou složeny z α a β podjednotek, které se skládají do 24 $\alpha\beta$ heterodimerů (Barczyk and Carracedo 2010). Obsahují velkou extracelulární a malou cytoplasmatickou doménu (Xiong et al. 2002). Extracelulární doména obsahuje 180 aminokyselin, které jsou důležité pro navázání ligandu. Cytoplasmatická doména se váže na aktinová filamenta skrze β podjednotku integrinu a proteinů talinů, které jsou esenciální pro zprostředkování vazby (Takada, Ye, and Simon 2007). Integriny se rozdělují do několika skupin podle toho, jaké ligandy dané receptory rozeznávají – pouze část z nich je schopna rozeznat konkrétní RGD sekvenci ligandu. Další integriny rozeznávají například laminin nebo kolagen s jinými aminokyselinovými motivy než u zmínovaných RGD ligandů (Barczyk and Carracedo 2010) – příkladem motiv LDV fibronektinu, obsahující aminokyseliny leucin-kyselina asparagová-valin. Obrázek 2.5 znázorňuje navazování a fungování integrinu.

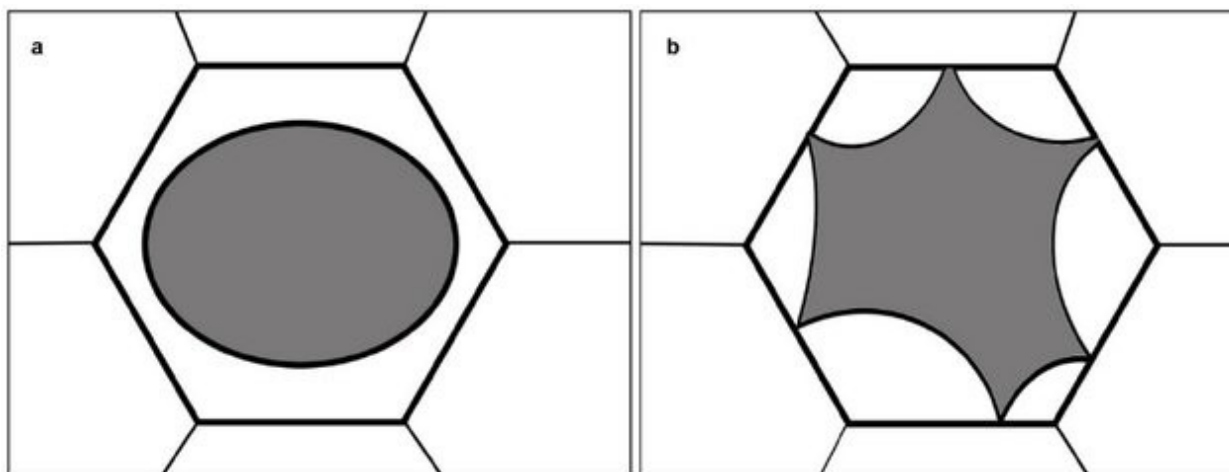


Obrázek 2.5 – znázornění fungování živočišných integrinů (Yamada 2000)

Výše zmíněné informace o integrinech jsou platné pro živočišné a bakteriální buňky, v rostlinných buňkách nebyly tyto konkrétní proteiny zjištěny, nicméně byly nalezeny

proteiny strukturně podobné, a proto se předpokládá, že by mohly mít obdobnou funkci i u rostlin. Tyto integrin-like proteiny mají sekvenční podobnost v jednotlivých doménách, které jsou ale uspořádány v jiném pořadí, než je tomu u živočišných integrinů (Langhans et al. 2017).

V rámci prvotního zkoumání možných rostlinných integrin-like proteinů byly prováděny experimenty se syntetickými RGD peptidy (Zhu et al. 1993). Tyto experimenty ukázaly, že i u rostlinných buněk signalizace pomocí RGD peptidů ovlivňuje interakci mezi buněčnou stěnou a plasmatickou membránou. Konkrétně byl sledován efekt RGD peptidů u tabákových buněk v buněčné kultuře. Sledovány byly celistvé buňky i protoplasty adaptované a neadaptované na vysokou koncentraci NaCl. U adaptovaných buněk byla patrná výraznější adheze plasmatické membrány k buněčné stěně než u neadaptovaných (převažujícím typem plazmolýzy byl konkávní typ, viz obrázek 2.6). Také protoplasty adaptovaných buněk měly tendenci se shlukovat k sobě, což nebylo patrné u neadaptovaných protoplastů.



Obrázek 2.6 – zobrazení plazmolýzy: a – konkávní tvar, b – konvexní tvar (Ingeborg Lang et al. 2014)

Aplikací syntetického RGD peptidu došlo k narušení tohoto spojení protoplastů. Pro ověření byl také použit syntetický RGE peptid, který neměl vliv na rozrušování vazeb mezi buňkami. Autoři proto uzavírají, že i v rostlinných buňkách hrají RGD peptidy roli v regulaci adheze plasmatické membrány a buněčné stěny (Zhu et al. 1993).

V jiném experimentu s buňkami cibule a *Arabidopsis* byla sledována reakce buněk během plazmolýzy na aplikaci syntetických RGD peptidů (Canut 1998). U cibule docházelo ke ztrátám Hechtových provazců a u buněk *Arabidopsis* docházelo ke změnám tvaru plazmolýzy (z konkávní na konvexní – tvary plazmolýzy na obr. 2.5) po aplikaci RGD peptidu. Kromě

toho byly testovány protoplasty buněk *Arabidopsis*, jestli se dokáží shlukovat v přítomnosti syntetického proteinu (ProNectinF) o velikosti 72 kDa s 13 RGD sekvencemi, který byl v koncentraci 4,5 μ M přidán do dispergované suspenze protoplastů. Zde do pěti minut od přidání vzniknul jeden shluk protoplastů propojených před ProNectinF. U kontroly ošetřené proteinem BSA (bovine serum albumin, hovězí sérový albumin), kde nebyl pozorován žádný efekt, což podporuje roli RGD sekvence v adhesi plasmatické membrány u rostlinných buněk (Canut et al. 1998).

V experimentu sledující průduchové buňky tabáku byl zkoumán aktinový cytoskelet v kontextu kontinua plasmatické membrány s buněčnou stěnou. Byly prováděny testy s RGD peptidy a také s latrunkulinem B (inhibitor polymerace aktinového cytoskeletu). V testu aplikujícím manitol bylo vyzorováno, že i ve stavu plazmolýzy dochází k polymeraci aktinu na dlouhá vlákna. Díky těmto experimentům se předpokládá, že se aktinový cytoskelet účastní také plazmolýzy. Cílem aplikace latrunkulinu B bylo otestovat význam aktinového cytoskeletu na udržení kontinua plasmatické membrány a buněčné stěny v pozorování plazmolýz a endocytóz. Přidané RGD peptidy navyšovaly množství průduchových buněk, které byly plazmolýzovány. Průduchové buňky byly ošetřeny 0,5M manitolem s FM4-64 a prokázalo se, že buňky ošetřené manitolem mají vyšší procento endocytóz. U buněk následně ošetřených RGD peptidy docházelo ke zvýšené fluorescenční intenzitě. Využitím latrunkulinu B spolu s RGD peptidy je snížen účinek těchto peptidů na endocytózu a také že v daných buňkách nacházíme více Hechtových provazců než v buňkách ošetřených pouze RGD peptidy. Dané výsledky naznačují, že dynamika aktinu také ovlivňuje propojení plasmatické membrány s buněčnou stěnou (Yu et al. 2018). Ačkoliv byly experimenty rozdílné, ukazují určitý vliv RGD peptidů na buňky, což otevírá diskuzi k tomu, zdali by integrin-like proteiny interagující s peptidy obsahujícím RGD sekvenci opravdu mohly zastávat stejnou nebo podobnou funkci jako u živočichů, protože výsledky jasně ukazují, že proteiny s RGD sekvencí mají vliv na rostlinné buňky.

V rámci rostlinné říše byly objeveny některé kandidátní proteiny, které by mohly fungovat podobně jako integrin a protein vázající se na integrin u živočišných buněk (tedy jako receptor-koreceptor): NDR1/At14a, AGP/At14a, α -ILP/At14a, α -ILP/ITGB1. Předpokládá se, že na základě strukturních možností by mohl interagovat NDR1 se svojí velkou extracelulární doménou a malou intracelulární doménou s At14a, která má naopak dvě intracelulární domény a pouze krátkou extracelulární doménu (Langhans et al. 2017).

At14a je malý protein obsahující 385 aminokyselin, má tři sekvenční domény podobné β doméně integrinů a jeho velikost je asi 43 kDa (Nagpal and Quatrano 1999). Obecně se jedná o velice málo charakterizovaný protein, se kterým bylo prozatím provedeno jen několik málo experimentů pro pochopení jeho funkce. V rámci jednoho zkoumání byly provedeny transformace buněk *Arabidopsis* za účelem lokalizace proteinu At14a s fúzním proteinem GFP a byla zjištěna lokalizace v oblasti plasmatické membrány. Dále byly zkoumány buňky AT14A overexprimované linie v buněčné kultuře a jejich tvar. Srovnávány byly rostliny Col-0 jako kontrolní, overexprimovaná linie AT14A a mutantní linie *at14a*. Kromě rozdílného tvaru buněk byla zjištěna také rozdílná tloušťka buněčné stěny, kdy *at14a* měla tenčí buněčnou stěnu než overexprimovaná linie i než kontrolní rostlina. Tyto výsledky naznačují, že by se protein At14a mohl podílet na formování buněčné stěny. Vzhledem k předpokladu jeho možné interakce s cytoskeletem, byla sledována také mikrofilamenta, kde u mutantní rostliny docházelo k náhodnému uspořádání v porovnání s divokým typem (Bing Lü, Wang, and Zhang 2012). V jiné publikaci je popisován experiment sledující reakci suspendovaných buněk overexprimované linie AT14A na sucho způsobené aplikací polyethylen glykolu (PEG-6000). Gen *At14a* byl výrazně exprimován při expozici suchem a ukázalo se, že buňky AT14A overexprimované linie měly větší schopnost tolerance sucha než divoký typ (Wang et al. 2015). Všechny tyto experimenty byly prováděny na úrovni jednotlivých buněk, prozatím nebyly zkoumány změny fenotypu na úrovni celé rostliny, což by v rámci komplexity organismu mohlo hrát velkou roli ve fungování daného proteinu. Dá se ale předpokládat, že podle zmíněných výsledků protein At14a ovlivňuje kontinuum plasmatické membrány s buněčnou stěnou, reakci rostliny na stresové faktory (sucho), pokud bychom přihlédli k funkcím v živočišné buňce, tak se dá uvažovat i o signalizaci pro mechanosenzitivní funkce. Nedá se ale s jistotou říct, že právě At14a váže ligandy s RGD sekvencí, jelikož nebyly publikovány takové experimenty.

U rostlin byla dále nalezena velmi podobná skupina genů *At14a-like* (*AFL*). Zkoumaný *AFL1* má similaritu ve své doméně s živočišnými integriny, avšak strukturou je značně odlišný. Dle výsledků se ukazuje, že *AFL1* interaguje s clathrinovými váčky na plasmatické membráně. Také bylo zkoumáno, zdali je tento protein transmembránový, vypadá to ale spíše, že s membránou interaguje, ale neprostupuje jí (Kumar, Hsieh, and Verslues 2015).

NDRI (non-race-specific disease resistance gene) je gen kódující protein důležitý při ochraně před patogeny exprimovaný právě při napadení patogenem (McNeece et al. 2017). Obsahuje aminokyselinový motiv NGD, který je podobný motivu RGD. Nachází se na plasmatické

membráně, kde je zachycen GPI kotvou a prochází řadou post-translačních modifikací. Jeho overexpresí dochází ke zvýšené ochraně před patogeny konkrétně rodu *Pseudomonas* (Coppinger et al. 2004). Ukazuje se, že se NDR1 neúčastní pouze interakcí na pomezí buněčné stěny a plazmatické membrány na úrovni adheze, je také negativním regulátorem kvetení. U mutantů v tomto genu byl zkoumán dřívější nástup kvetení a byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi divokým typem a mutantem v daném genu (Dhar et al. 2019).

2.4 Další proteiny s možnou rolí v propojení plazmatické membrány a buněčné stěny

Kromě zmíněné velké skupiny AGP proteinů a proteinů integrin-like existují také další kandidátní proteiny, které by se mohly více či méně účastnit propojení plazmatické membrány a buněčné stěny. Již byly zmíněné receptorové kinázy, které mají podobný fenotypový projev jako *sos5/fla4* mutantní rostlina, což nasvědčuje tomu, že i tyto proteiny je nutné zařadit mezi možné účastníky. Tyto receptorové kinázy patří také mezi velkou rodinu genů s velkým množstvím funkcí a pouze některé se dají považovat za vhodné kandidáty. Jednou skupinou jsou tzv. WAK kinázy (wall-associated-kinase, kinázy asociované s buněčnou stěnou), případně jim velice podobné WAK-like, které disponují serin/threoninovou cytoplasmatickou kinázovou doménou, transmembránovou částí a doménou zasahující do buněčné stěny, kde interagují s pektiny. Právě tato interakce je činí možnými kandidáty na sprostředkovatele fyzického propojení plazmatické membrány a buněčné stěny. Mohou ale zřejmě také vázat pouze pektinové štěpy a účastnit se tak signalizace nikoli přímého propojení (Kohorn and Kohorn 2012) V této genové rodině existuje pět členů s více funkcemi. Například *wak2* mutant má za určitých podmínek problémy s expanzí kořenových buněk (Kohorn and Kohorn 2012).

Dalšími proteiny s pravděpodobnou rolí v propojení plazmatické membrány a buněčné stěny jsou forminy. Forminy jsou konzervované proteiny s účastí na organizaci aktinových filament a mikrotubulů. U *Arabidopsis* se nachází více než 20 genů pro forminy (Martinie et al. 2011).

3 Metodika

3.1 Biologický materiál a kultivační podmínky

Pro veškeré rostlinné experimenty byly využity rostliny huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*), které rostly buď na rašelinových tabletách v kultivační místnosti při teplotě 23 °C a relativní vzdušné vlhkosti 45 %, fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy nebo na agarovém médiu za sterilních podmínek podle potřeby dané kultivace (viz. dále).

3.2 Linie *Arabidopsis thaliana*

V rámci diplomové práce byly zkoumány tyto proteiny: integrin-like At14a (gen At3g28300), arabinogalaktanové proteiny (AGP) fasciclin-like (FLA): FLA2 (gen At4g12730), FLA9 (gen At1g03870). Pro vyjmenované a v tabulce 3.1 označené linie byla objednána semena z The Nottingham Arabidopsis Stock Centre (NASC, <http://arabidopsis.info/BasicForm>) jako homozygotní T-DNA inzerční mutantní linie.

Všechny linie získaných semen bylo třeba vysadit a ověřit přítomnost T-DNA inzerce v cílovém genu metodou genotypování. Po ověření mutantní linie bylo provedeno křížení s divokým typem *Arabidopsis Col-8* (SALK N60000), který je pozadím pro SALK linie. Z potomstva rostlin po tomto křížení byl selektován jak divoký typ, tak mutantní rostliny s vloženou T-DNA inzerací. Tyto rostliny pak byly používány pro všechny růstové experimenty.

Mutantní rostlina *fla9-3* byla dále křížena s *fla2* za vzniku dvojitého mutantu *fla9-3xfla2*.

Typ proteinu	Gen	Kód genu	Název linie	NASC	Označení mutantní rostliny	Inzerce T-DNA
AGP	<i>FLA2</i>	At4g12730	SALK_001056C	N685014	<i>fla2</i>	Exon
AGP	<i>FLA9</i>	At1g03870	SALK_051688C	N668253	<i>fla9-3</i>	3'UTR
AGP	<i>FLA9</i>	At1g03870	SALK_088265.48	N588265	<i>fla9-2</i>	Promotor
AGP	<i>FLA9</i>	At1g03870	SALK_127675.46	N627675	<i>fla9-1</i>	Promotor
Integrin like	<i>At14a</i>	At3g28300	SALK_101761	N665031	<i>at14a1</i>	Exon
Integrin like	<i>At14a</i>	At3g28300	SALK_005316C	N678041	<i>at14a2</i>	Exon

Tabulka 3.1: Linie *Arabidopsis* využité pro diplomovou práci

3.3 Genotypování linií *Arabidopsis thaliana*

Semena jednotlivých linií byla vysazena na rašelinové jiffy, kultivována při standartních kultivačních podmínkách (viz kap. 3.1) a dále následně zpracovávána způsobem uváděným v podkapitolách.

3.3.1 Izolace DNA

Vzorky vysazených rostlin, vždy malý terčík listu, byly odebírány ze zhruba sedmidenních rostlin. Tento terčík listu byl vložen do 2 ml eppendorf zkumavky spolu s nerezovou mlecí kuličkou a následně vhozen do tekutého dusíku pro rychlé zamražení. Zmražené zkumavky byly vloženy do vychlazeného stojánku, který byl následně upevněn do vibračního mlýnu (Retsch) spuštěného na 30 sekund s 30 kmity za sekundu. Rozemleté listy byly následně využity pro izolaci DNA podle protokolu (Edwards, Johnstone, and Thompson 1991), kdy se ke vzorku DNA přidal extrakční pufr (se složením: 200 mM Tris HCl 20 ml, 250 mM NaCl 5 ml, 25 mM EDTA 5 ml, 0,5% SDS 5 ml – doplněno do 100 ml H₂O), se kterým se DNA centrifugovala, a následně byl supernatant přenesen do stejného množství isopropanolu. Společně se opět centrifugovalo. Po tomto kroku byl supernatant odsán a nahrazen 70% ethanolem, se kterým se centrifugoval vzorek 5 minut. Následně byl také odsán a DNA byla rozpuštěna ve vodě a TE (Tris/EDTA) pufru. TE pufr je složen z 1M Tris 1ml a 0,5M EDTA 0,2 ml do 100 ml destilované vody. Izolovaná DNA, uskladněná při 4 °C, byla využita v rámci polymerázové řetězové reakce (PCR), kde bylo využito genotypovacích primerů, které uvádím v tabulce 3.2 níže. Pro detekci kontrolní alely daného genu byla použita kombinace RP a LP primeru (při amplifikaci vzniká produkt o délce cca 1000 bp), pro detekci mutantní alely kombinace RP a LB (při amplifikaci vzniká produkt o délce cca 500 bp).

Primery	Označení	Sekvence
FLA2	RP	CCATTACCTTCGCCGTCACA
FLA2	LP	AATGTGACCCAGACTCAAGC
FLA9	RP	TAAAGACATTGCTCAGGCC
FLA9	LP	TAAACCCGGAACCCTAAACC
FLA9-1	RP	TGGCCAAGTCAATACAAAACG
FLA9-1	LP	TTCCACTTGGATCCTTGTTC
FLA9-2	RP	AGGTAGAGCCACATCACATG
FLA9-2	LP	TAAACACGTGAGAACCACGTG
WAKL15	RP	TAAATCAGATGGTTGAACCGG
WAKL15	LP	GATCTCCTTTGCAGCAACTTG
At14a1	RP	AAGGAGCAAGAATCCCTTCTG
At14a1	LP	TTTGTTACCCAACCTGGTTTG
At14a2	RP	TCCTCTGTTAATTCCACCACG
At14a2	LP	TGTGGAGACCATCCAGAACTC
SALK	LB	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC

Tabulka 3.2: primery pro genotypování vybraných linií T-DNA inzerčních mutantů *Arabidopsis thaliana* (LP a RP – levý a pravý primer nasedající na genomovou DNA, LB – primer nasedající na T-DNA). Design primerů dle SALK Institute Genomic Analysis Laboratory (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>).

3.3.2 Polymerázová řetězová reakce

Tato reakce byla využita pro ověření přítomnosti inserce (T-DNA) či její absence v cílovém genu jednotlivých inserčních mutantních linií a selekci rostlin. Reakce byla připravována do 20 μ l, složení premixu je uvedeno v tabulce 3.3. Pro reakci byl využit termocycler (Biometra) s programem uváděným v tabulce 3.4. Produkty amplifikace byly vizualizovány pomocí agarózové gelové elektroforézy (kap 3.3.3). Výsledky této reakce byly využity pro selekci rostlin a následně jejich semen podle toho, jestli náš sledovaný gen obsahuje inserci či nikoliv.

Chemikálie	Koncentrace	Použité množství (μ l)
Izolovaná DNA	-	1
Taq polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/ μ l	0,04
dNTP	10 mM	0,4
Primer RP	20 μ M	1
Primer LP/LB	20 μ M	1
Taq reakční pufr	10x konc.	2
Destilovaná voda	-	14,56

Tabulka 3.3: PCR reakční směs (premix) pro jednu reakci.

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	94 °C	2:00
Denaturace	94 °C	0:30
Nasedání primerů	52 °C	1:00
Syntetická fáze	72 °C	1:00
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Ochlazení	4 °C	∞

Tabulka 3.4: program PCR pro genotypování – procesy denaturace až syntetická fáze se opakují 25x

3.3.3 Agarózová gelová elektroforéza

Elektroforéza byla připravena za pomoci gelu ze 1,2 % agaru v 0,5 x TAE pufru (tabulka 3.5). Do gelu byla přidána fluorescenční barvička GelRed (GelRed® Nucleic Acid Gel Stain) pro zvýraznění DNA v koncentraci 5 μ l do 100 ml. K amplifikované DNA byla přidána barvička (loading dye) pro nanášení na gel (tab. 3.6.). Napětí zdroje elektroforézy bylo nastaveno v rozmezí 70–120 V.

Komponent	Koncentrace
TRIS	20 mM
EDTA	0,5 mM
Kyselina octová	10 mM
destilovaná voda	Doplnění do žádaného objemu

Tabulka 3.5: složení 0,5 x TAE pufru

Chemikálie	Množství
Tris HCl (100 mM)	5 ml
Bromferolová modř	0,015 g
0,5 M EDTA	6 ml
99 % glycerol	30,24 ml
Destilovaná voda	Do 50 ml objemu

Tabulka 3.6: složení barvy pro nanášení na gel (loading dye)

3.4 Fenotypová analýza

3.4.1 Kultivace rostlin in vitro

Semena rostlin byla sesbírána a roztržena podle velikostí s využitím několika sít. Rozlišovala se semena malá, střední a velká se síty o velikosti otvorů 0,500 mm a 0,350 mm, kdy semena zůstávající na sítu o velikosti 0,500 mm byla zařazena mezi velká semena, ta která zůstala na 0,350 mm sítu, byla označena jako střední a ta, která propadla, byla označena jako malá semena. Pro kultivaci pak byla používána semena stejné velikosti. Před každým vyšetím byla semena sterilizována roztokem chlornanu sodného (20 % SAVO) s 1 % tritonem po dobu 15 minut za sterilních podmínek v laminárním boxu (flow box); následně třikrát oplachována sterilní destilovanou vodou po dobu 1 min. Vysterilizovaná semena byla po dobu tří dní uskladněna v destilované vodě v lednici ve tmě při teplotě 4 °C, aby se zajistila synchronizace klíčení. Po třech dnech byla sázena na pevné kultivační médium (viz kap. 3.4.2) na Petriho miskách – kdy během předpěstování byly rostliny pěstovány ve velkém množství na jedné plotně a následně byly přesazovány tak, aby bylo možné sledovat fenotypový projev, tedy po pěti rostlinách od každého genotypu na jednu misku. Petriho misky byly následně v kultivačních místnostech, kde byly šikmo umístěné ve stojácích držících úhel 45°, při fotoperiodě 16 hodin světla a 8 hodin tmy, za teploty 21 °C.

3.4.2 Kultivační média

Rostliny byly předpěstované na tzv. kontrolním médiu vycházejícím z 0,2xMS (tj. koncentraci živin odpovídající MS – Murashige a Skoog – mediu zředěnému na 1/5) uváděném v tabulce 3.7. Rostliny byly následně přesazeny do jednotlivých variant kultivace, ve kterých byl hodnocen fenotyp rostliny za různých podmínek. Rostliny byly přesazovány ve chvíli, kdy měly 1 cm dlouhý kořen, což odpovídá zhruba pětidenním rostlinám. Přesazením se snížil časový rozdíl v klíčivosti a variabilita růstu kořenů, protože byly přesazovány pouze dobře rostoucí rostliny podobné velikosti. Kontrolní médium bylo dále modifikováno pro navození stresových podmínek. Pro navození podmínek suššího a pevnějšího media byla

využita vyšší koncentrace agaru (1,5 %); pro zjišťování ovlivnění salinitou byly využity dvě koncentrace soli NaCl – v prvním případě 50mM NaCl, v případě druhém 100 mM. Pro zkoumání osmotických stresových podmínek byl využit manitol v koncentraci 200mM (viz tabulka 3.7).

Komponenta	Koncentrace	Kontrolní (MS)	1,5% Agar	Manitol	50 mM NaCl	100 mM NaCl
KNO ₃ (ml/l)	76 g/l	5,03	5,03	5,03	5,03	5,03
KH ₂ PO ₄ (ml/l)	34 g/l	1	1	1	1	1
MgSO ₄ (ml/l)	76 g/l	1	1	1	1	1
CaCl ₂ (ml/l)	88 g/l	1	1	1	1	1
Fe EDTA (ml/l)	*	1	1	1	1	1
Mikroprvky (ml/l)	**	1	1	1	1	1
Agar Kobe (g/l)	-	10	15	10	10	10
Sacharóza (g/l)	-	10	10	10	10	10
Manitol (g/l)	-	-	-	12,14	-	-
NaCl (g/l)	-	-	-	-	2,92	5,84

Tabulka 3.7: složení agarového kultivačního média pro klíčení a také pro kontrolní podmínky a

následně rozlišení stresových médií. Toto označení variant bude používáno i v následujícím textu. * připraveno smícháním 5,57 g/l FeSO₄.7H₂O + 7,452 g/l Na₂EDTA ** připraveno v navážkách g/l: 0,005 CuSO₄.5H₂O + 0,005 CoCl₂.6H₂O + 1,24 H₃BO₄ + 3,38 MnSO₄.xH₂O + 1,72 ZnSO₄.7H₂O + 0,166 KI + 0,05 Na₂MoO₄.2H₂O

3.4.3 Digitalizace výsledků fenotypové analýzy

Rostliny pěstované *in vitro* na Petriho miskách byly skenovány skenerem (Epson V800 Photo) ve vybraných fázích růstu (ihned po přesazení; následující den pro analýzu přírůstku za prvních 24 h po přesazení; a dále v průběhu kultivace až do cca 10. dne, kdy se kořeny téměř dotýkaly spodního okraje misky, což byla maximální velikost kořenového systému, která byla hodnocena). Kořeny byly snímány při vysokém rozlišení (1200 dpi a 48bitové barvy). Mladé kořeny a jejich přírůstky byly měřeny s využitím programu ImageJ a jeho pluginu SmartRoot, starší rostliny s velkým kořenovým systémem byly analyzovány s využitím programu Root Analyzer v Nis Elements (NIS-Elements AR 3.2 64bit).

3.4.4 Statistické vyhodnocení

Pro statistické vyhodnocování byl využit program NCSS 9 Statistical Software (Hintze, J. (2013). NCSS 9. NCSS, LLC. Kaysville, Utah, USA. www.ncss.com). Vliv genotypu, varianty kultivace a interakce mezi těmito faktory byly hodnoceny pomocí dvouvýběrové

GLM (general linear models) ANOVY a Tukey-Kramer Multiple Comparison testu). Rozdíly mezi genotypy (mutantní rostlinou a odpovídající wt rostlinou v dané variantě kultivace) byly dále detailně hodnoceny pomocí Equal-Variance T-Testu. Normalita dat byla předem ověřována a byla splněna.

3.5 Příprava rostlin nesoucích translační a transkripční fúze

3.5.1 Bakteriální materiál

Během experimentů bylo využito metody Multisite Gateway® pro přípravu na transformace rostlin, u které bylo potřeba vložit vektory do bakterií *Escherichia coli* (DH5 α). Tyto bakterie byly kultivovány při 37 °C vždy zhruba 15 hodin. Kultivovány byly na tuhém a tekutém LB médiu, které je uvedeno v tabulce 3. 8 níže a k tomuto médiu bylo přidávané antibiotikum kanamycin v koncentraci 50mg/ml s ředěním 1:1000.

Transformace rostlin byla provedena pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101), které bylo kultivováno na tuhém a tekutém LB médiu (uvedeno v tabulce 3.8) s přídatkem specifických antibiotik v konkrétních poměrech k médiu: rifampicin v koncentraci před ředěním 10 mg/l (1:1000), spectinomycin v koncentraci 50 mg/ml (1:100), gentamycin v koncentraci 10mg/ml (ředění 1:100). Transformující bakterie byly na médiu kultivovány 48-72 hodin při teplotě 28 °C.

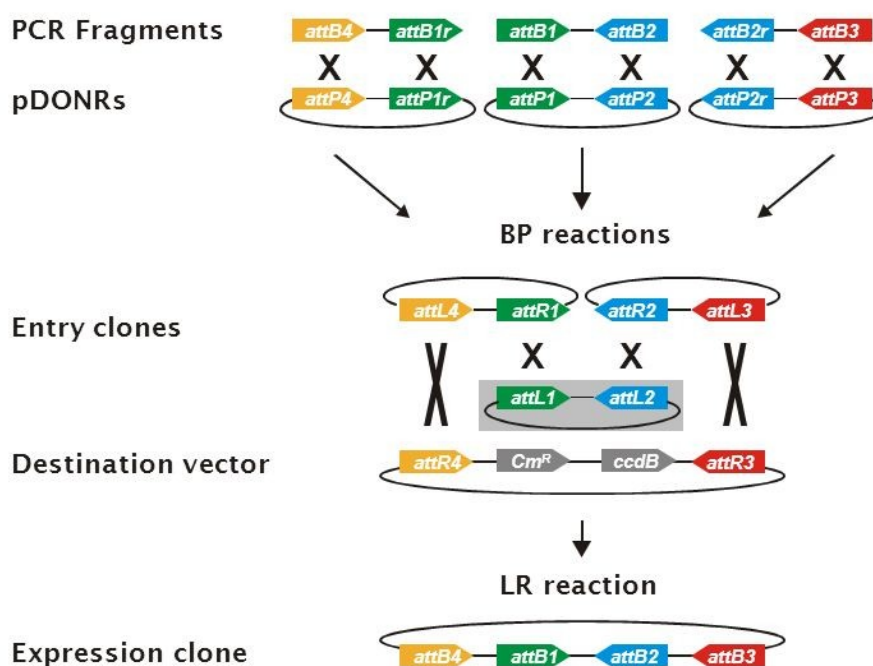
Komponenta	Tuhé LB médium	Tekuté LB médium
Pepton	10 g/l	10 g/l
Kvasničný extrakt	10 g/l	10 g/l
NaCl	10 g/l	10 g/l
Agar	-	15 g/l
Destilovaná voda	Do požadovaného objemu	Do požadovaného objemu

Tabulka 3.8: složení LB média

3.6 Transformace *Arabidopsis thaliana*

Pro transformace byly nejprve připraveny konstrukty *in silico* v programu Geneious 11.0.5 (Biomatters). Bylo využito jak transkripčních, tak translačních fúzí pro gen FLA9 i FLA2. Pro přípravu transformace byla využita již zmíněná technika Multisite Gateway®, která je efektivní metodou vytváření vektorů z několika fragmentů DNA pro transformaci. Tato technologie se skládá ze dvou po sobě následujících částí – BP a LR reakce. V rámci těchto posloupných dějů dochází ke skládání fragmentů se zachováním rekombinačních specifických míst. Skládání fragmentů je možné ze dvou, tří nebo čtyř částí, jak je naznačeno ve schématu výrobce (obr. 3.1). Transkripční fúze i translační fúze byly v případě mých experimentů vytvořeny ze třech fragmentů.

MultiSite Gateway® Three-Fragment Vector Construction Kit



8

Invitrogen
Invitrogen Proprietary & Confidential

Obr. 3.1 – schéma skládání tří fragmentů pomocí Multisite gateway technologie se zachováním specifických rekombinačních míst (<https://www.thermofisher.com>)

3.7 Design konstruktů a plasmidy použité pro Multisite Gateway®

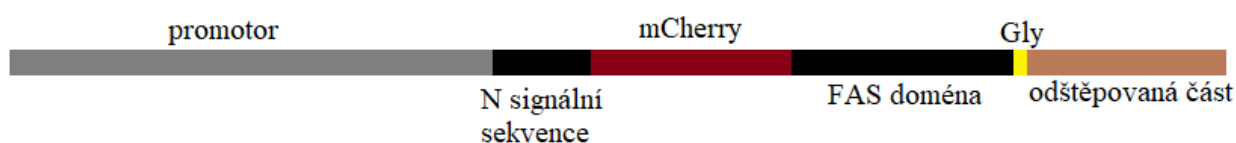
3.7.1 Translační fúze FLA proteinů

Pro translační fúze FLA9 a FLA2 s fluorescenčním proteinem mCherry pod nativním promotorem (*pFLA9:mCherry::FLA9* a *pFLA2:mCherry::FLA2*) byly amplifikovány promotorové sekvence obou genů (spolu se signální sekvencí) a kódující části genů (část za signální sekvencí až po stop kodon) z genomové DNA pomocí PCR (složení premixu a průběh reakce jsou uvedeny v tabulce 3.10 a 3.11). Genomová DNA byla izolována pomocí CTAB za využití modifikovaného protokolu Murray and Thompson 1980. Využité primery jsou uvedeny v tabulce 3.9, včetně att sekvencí nezbytných pro následnou rekombinaci. Nasedací teplota pro primery byla vypočítána podle sekvence primerů nástrojem NEB Calculator (<https://tmcalculator.neb.com/#!/main>).

Na obrázku 3.2 je vidět schéma uspořádání translační fúze. Toto uspořádání umožnilo připojit fluorescenční protein na N konec cílového proteinu, ponechat C konec volný pro GPI kotvu a zároveň nenarušit funkci signální sekvence na N konci. Design byl inspirován publikovanou

translační fúzi pro podobný fasciclin-like arabinogalaktanový protein GhFLA1 (Huang et al. 2013).

Amplifikované úseky DNA byly nejprve zaklonovány do vstupních vektorů Multisite Gateway systému pomocí BP reakce – promotorová sekvence do vektoru pDONR221 P4P1r, kódující sekvence do vektoru pDONR P2P3R. Získané Entry Clone vektory byly namnoženy v *E. coli*, ověřeny pomocí colony PCR, kontrolní restrikce a sekvenace. Ověřené vektory pak byly použity pro LR reakci spolu s vektorem pEN-L1-mCherry-L2 (nesoucí sekvenci pro červený fluorescenční protein mCherry) a destinačním vektorem pB7m34gw obsahující rezistenci pro herbicid BASTA. LR reakcí vznikl expresní vektor nesoucí požadovaný konstrukt. Ten byl opět namnožen v *E. coli* a ověřen stejně jako vektory po BR reakci. Detailní postup přípravy vektorů je rozepsán v následujících podkapitolkách 3.7.4. Schéma jednotlivých vektorů – viz obr. 3.3–3.8 kapitoly 3.7.3.



Obrázek 3.2 – konstrukt translačních fúzí FLA9, kde mezi FAS doménu a N signální sekvenci byla vložena mCherry; toto místo bylo vybráno z důvodu N signální sekvence na jedné straně a odštěpované části pro GPI kotvu na straně druhé

Primer	Sekvence
FLA2 prom přímý (s attB4 sekvencí)	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGCT CAAAGGTCAGGCAAAGGACA
FLA2 prom převrácený (s attB1r sekvencí)	GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGC TGCATTTGAGAGAGAGAGAAAAG
FLA2 ORF přímá (s attB2r sekvencí)	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCT</u> CATAACATAACCCGAATCCTTG
FLA2 ORF převrácená (s attB3 sekvencí)	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAATAAAGTTGCT TCACATAAGCCAAACTCCG
FLA9 prom přímý (s attB4 sekvencí)	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAGAAAAGTTGCT CTGTTGGGCAGTGTAGCC
FLA9 prom převrácený (s attB1r sekvencí)	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAAACTTGC</u> AGCCGTTGCCTT GGTTG
FLA9 ORF přímá (s attB2r sekvencí)	<u>GGGGACAGCTTTCTTGTACAAAGTGGCT</u> GCTCAGCCGGCAG
FLA9 ORF převrácená (s attB3 sekvencí)	<u>GGGGACAAC</u> TTTGTATAATAAAGTTGCT TCAAAGAGAAATTTCAAACATAAGACAATAAG

Tabulka 3.9 – primery využité pro amplifikaci translačních fúzí. Tučně je označena specifická část sekvence primeru, podtržená je sekvence att místa nezbytného pro rekombinaci.

Chemikálie	Koncentrace	Použité množství (μl)
Izolovaná DNA	-	1
Q5 polymeráza (Thermo Scientific)	5 U/μl	0,25
dNTP	10 mM	0,4
Primer	20 μM	0,5
Primer	20 μM	0,5
Betain	5 M	4
Q5 reakční pufr	10x konc.	4
Destilovaná voda	-	9,35

Tabulka 3.10 – premix pro amplifikaci DNA pro translační fúze

Fáze cyklu	Teplota	Čas (min)
Iniciální denaturace	94 °C	2:00
Denaturace	94 °C	0:30
Nasedání primerů	-	1:00
Syntetická fáze	72 °C	2:00
Terminální syntetická fáze	72 °C	10:00
Ochlazení	4 °C	∞

Tabulka 3.11 – PCR program pro amplifikaci DNA fragmentů (teplota nasedání primerů podle specifických sekvencí)

3.7.2 Transkripční fúze FLA proteinů

Pro transkripční fúze s reporterovým genem pro β–glukuronidázu (GUS) byly amplifikovány promotory genů *FLA9* a *FLA2* s primery uvedenými v tabulce 3.12; amplifikace byla prováděna v termocycleru s obdobným nastavením programu, jako je uváděno v kapitole 3.7.1. Amplifikované úseky DNA byly zaklonovány do vstupních vektorů Multisite Gateway systému pomocí BP reakce (stejně jako v translační fúzi) – promotorová sekvence do vektoru pDONR221 P4P1r.

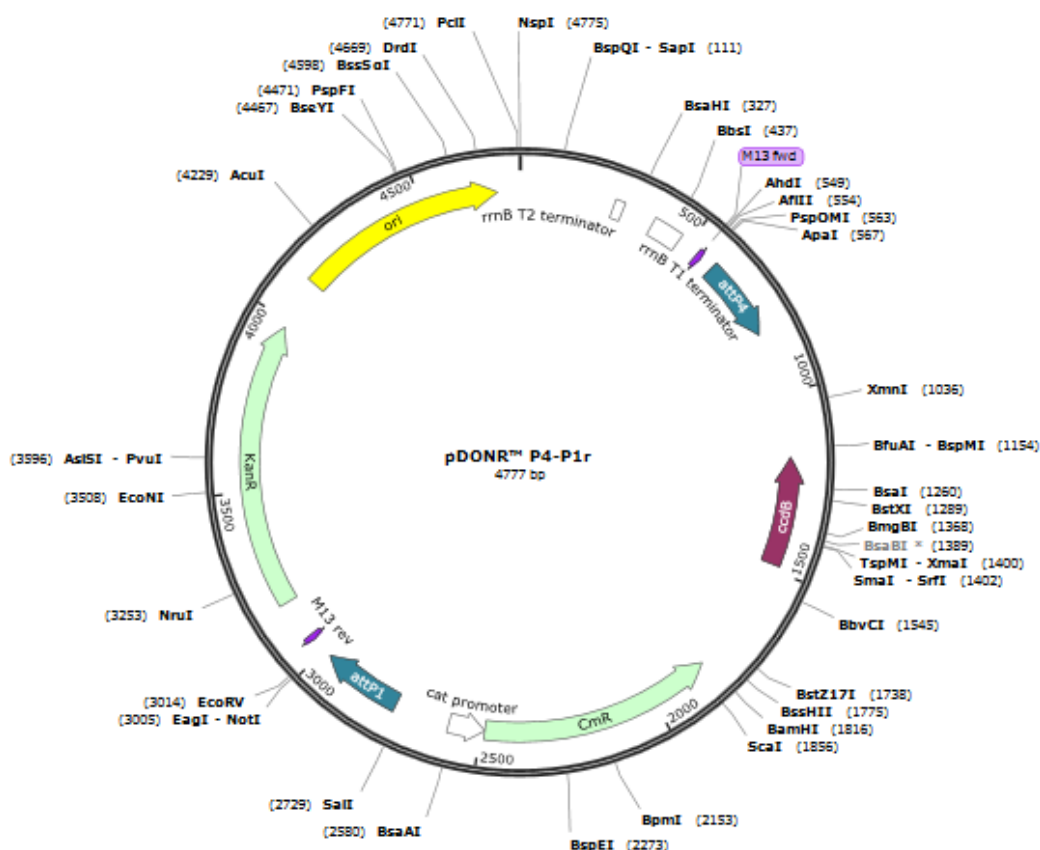
Následně v LR reakci byly použity namnožené Entry clone vektory spolu s vektory pEN-R2-S*-L3 (nesoucí sekvenci genu pro GUS) a pEN-R2-6-L3 (nesoucí 35S terminátor) a s destinačním vektorem obsahující rezistenci pro herbicid BASTA (pBb7m34GW).

Primer	Sekvence
FLA2 prom přímý	<u>GGGGACA</u> ACTTTGTATAGAAAAGTTGCT <u>CAAAGGTCAGGCAAAGGACA</u>
FLA2 prom převrácený	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAA</u> ACTTGC <u>TGCATTTGAGAGAGAGAGAAAG</u>
FLA9 prom přímý	<u>GGGGACA</u> ACTTTGTATAGAAAAGTTGCT <u>CTGTTGGGCAGTGTAGCC</u>
FLA9 prom převrácený	<u>GGGGACTGCTTTTTTGTACAA</u> ACTTGC <u>AGCCGTTGCCTTGGTTG</u>

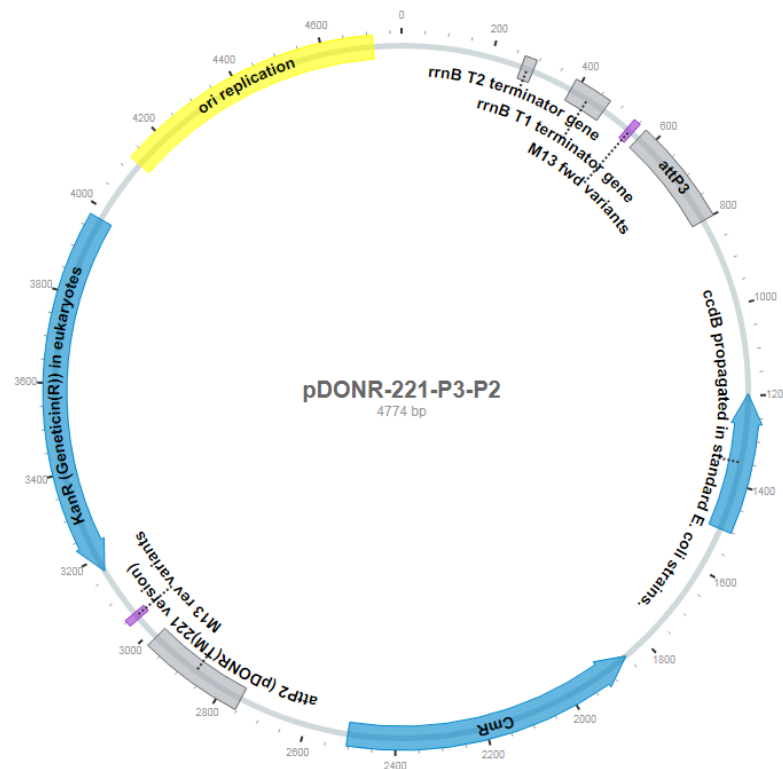
Tabulka 3.12. – primery pro transkripční fúze včetně sekvencí att míst nezbytných pro rekombinaci. Tučně je označena specifická část sekvence primeru, podtržená je sekvence att místa nezbytného pro rekombinaci.

3.7.3 Vektory

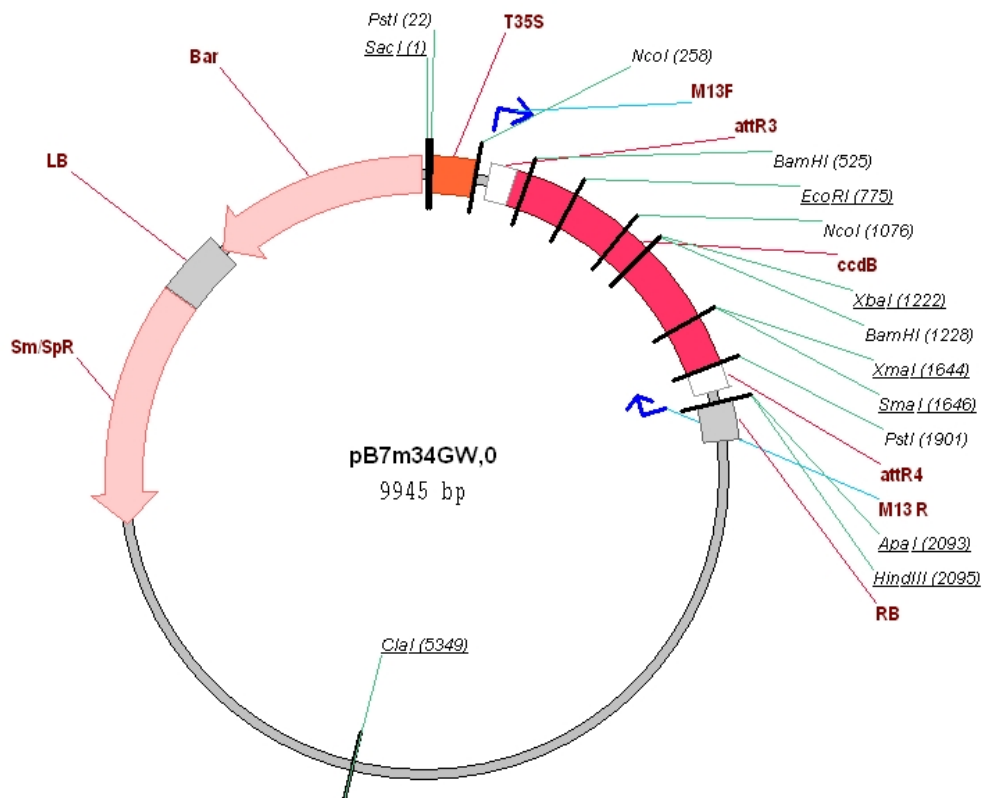
Následující vektory byly použity pro přípravu translačních a transkripčních fúzí (obr. 3.3 - 3.8).



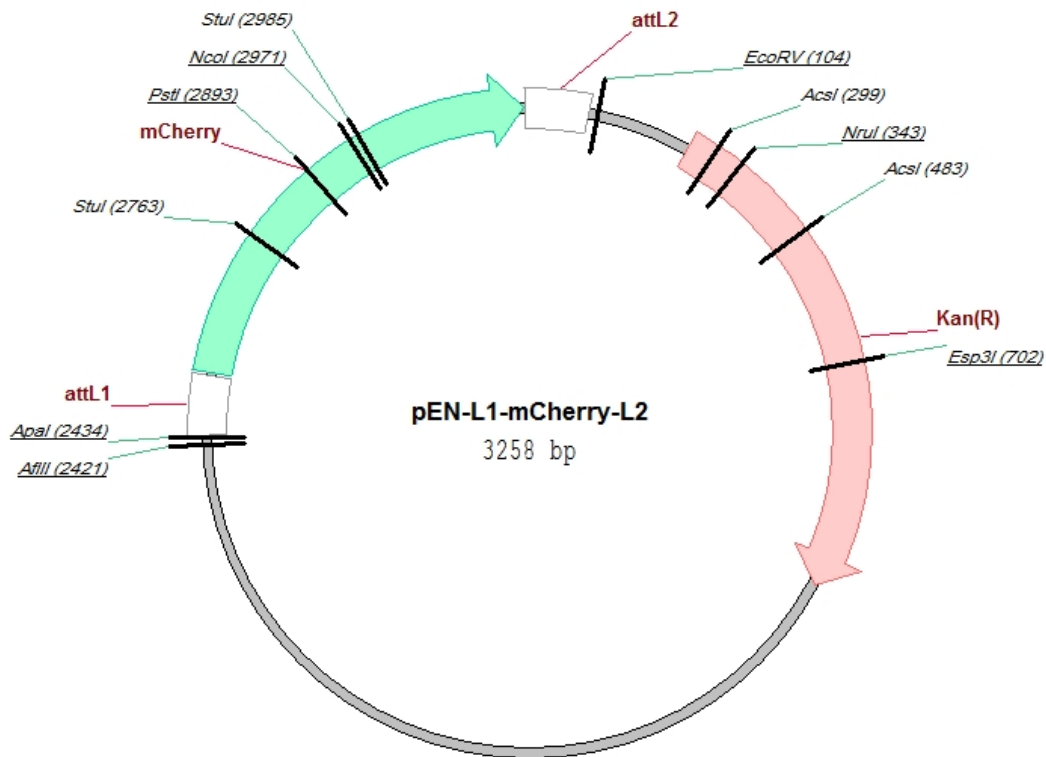
Obrázek 3.3 – vektor pDONR P4-P1r (<https://www.thermofisher.com/cz/en/home/life-science/cloning/gateway-cloning/multisite-gateway-technology.html>)



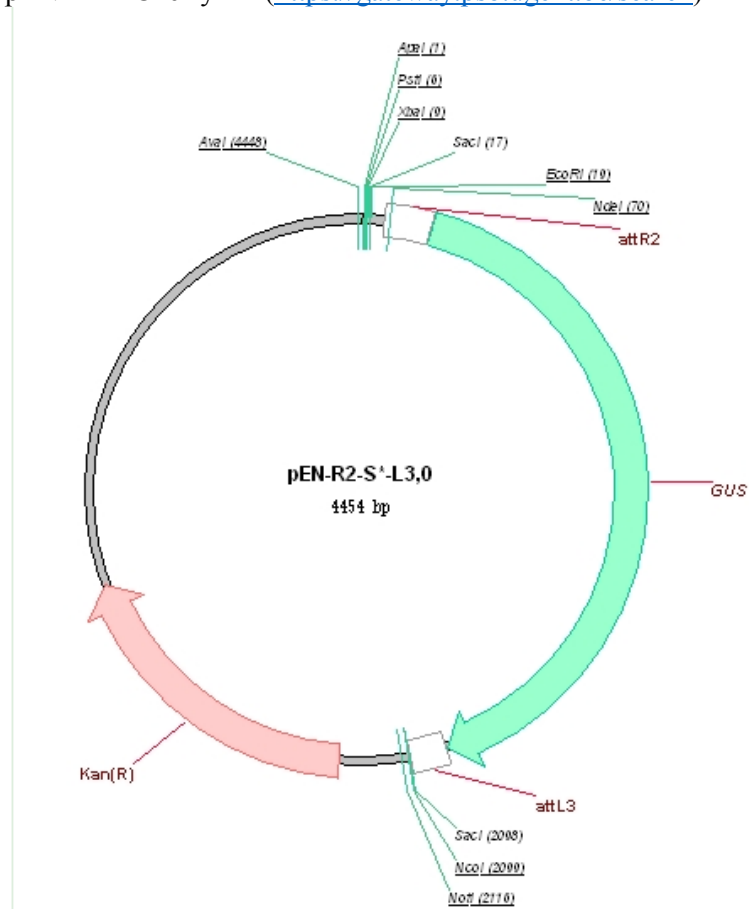
Obrázek 3.4 – vektor pDONR 221 P3-P2 <https://www.novoprolabs.com/vector/V11823>



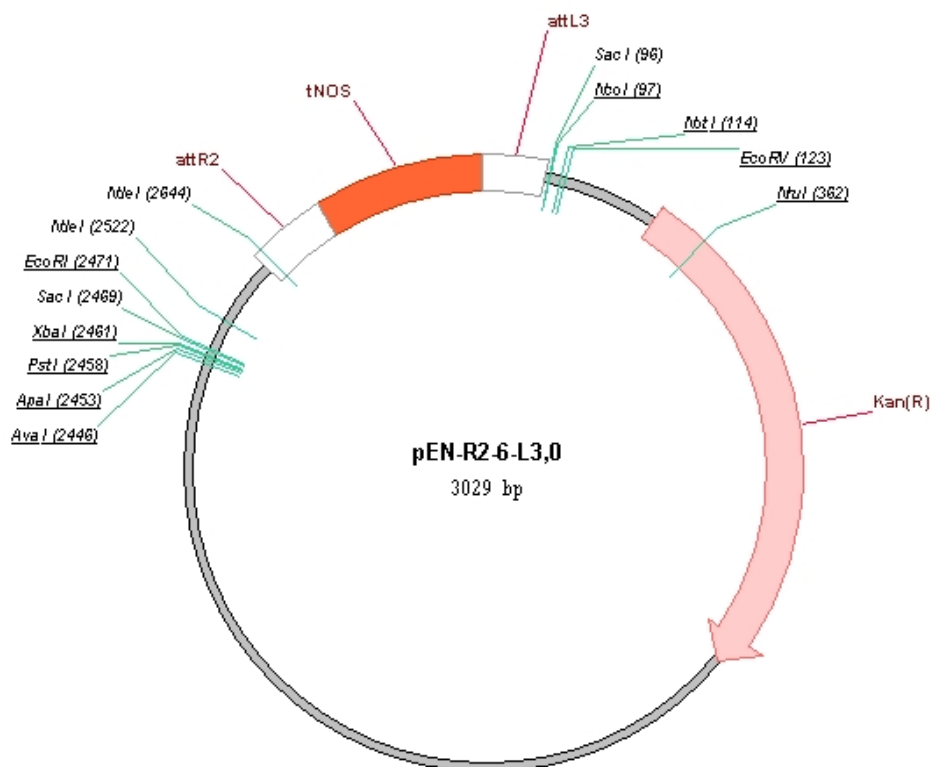
Obrázek 3.5 – vektor pB7m34gw (<https://gateway.psb.ugent.be/search>)



Obrázek 3.6 – vektor pEN-L1-mCherry-L2 (<https://gateway.psb.ugent.be/search>)



Obrázek 3.7 – vektor pEN-R2-S*-L3 (<https://gateway.psb.ugent.be/search>)



Obrázek 3.8 - vektor pEN-R2-6-L3 (<https://gateway.psb.ugent.be/search>)

3.7.4 Postup přípravy transformací

Amplifikace

Prvním krokem úspěšné transformace je amplifikace DNA pomocí PCR pro jednotlivé fúze a její následné vnesení do vektorů (postup amplifikace viz kapitola 3.7.1). Pro samotnou amplifikaci DNA byla využita Q5 polymeráza (Q5® High-Fidelity DNA Polymerase, NEB). Jednotlivé primery pro dané sekvence DNA byly uvedeny v podkapitolách 3.7.1-3.7.2, velikost produktu byla ověřována pomocí agarózové gelové elektroforézy (viz kapitola 3.3.3).

BP reakce

Amplifikovaná DNA byla zaklonována do vstupního vektoru pomocí BP reakce – konkrétní vektor se lišil podle toho, zdali se jednalo o translační nebo transkripční fúzi (viz kapitola 3.7.1-3). Do reakce byl vložen amplifikovaný vzorek DNA v množství 0,5 μ l, vektory napočítané podle jejich aktuální koncentrace, kdy je nutné, aby měly alespoň 150 ng/ μ l a BP klonáza (Gateway® BP Clonase® II enzyme mix – ThermoFischer Scientific) (1 μ l) do 5 μ l reakce podle koncentrace vzorků a vektorů doplněné destilovanou vodou. Takto připravená

reakce se nechala přes noc při pokojové teplotě a po 15 hodinách byla reakce ukončena 1 μ l proteinázy K, která byla přidána ke vzorku a vzorek byl na 15 minut vložen do 37 °C.

Elektroporace

Výsledný produkt (Entry clone vektor) byl vnášen do elektrokompetentních buněk bakterií *Escherichia coli* (DH5 α) napěstovaných podle (Ausubel 2004), kdy byly bakterie elektroporovány spolu s produktem po BP reakci v kyvetě při napětí 2500 V po dobu zhruba 6 ms a ihned poté přeneseny do SOC média (tab. 3.13), ve kterém byly kultivovány po dobu jedné hodiny, v průběhu které byly také třepány pro zajištění lepšího přístupu kyslíku.

Komponenty	pepton	Kvasnicový extrakt	Glukóza	NaCl	KCl	MgCl ₂	MgSO ₄
g/20 ml dH ₂ O	0,4	0,1	0,0721	0,0117	0,0037	0,019	0,0241

Tabulka 1.13 – SOC médium

Narostlé bakterie v SOC médiu obsahující vektor s rezistencí ke kanamycinu byly přeneseny na tuhé LB médium obsahující antibiotikum kanamycin v koncentraci 50 μ g/ml pro selekci bakterií. Bakterie byly kultivovány při 37 °C 16 hodin.

Colony PCR a kontrolní restrikce vektorů

Po nárůstu bakteriálních kolonií bylo ověřováno pomocí Colony PCR, zdali obsahují námi vnesený vektor. Pro ověření byly použity dostupné primery M13 (tab. 3.14) – přímé a převrácené a jako templát malé množství bakteriální biomasy odebrané sterilně přímo z vybrané kolonie na kultivační misce. Tyto primery nasedají na specifická místa Entry clone vektorů. Produkty reakce byly následně vizualizovány agarózovou gelovou elektroforézou. Kolonie bakterií obsahující správnou velikost fragmentu byly dále namnoženy v tekutém LB médiu, kde po nárůstu (po 15 hodinách) byl vytvořen miniprep (ZR Plasmid MiniPrep Classic). Koncentrované množství extrahovaného vektoru bylo využito pro detailnější ověření správnosti vloženého fragmentu pomocí restrikčních enzymů, které byly vybrány pomocí programu Geneious *in silico*, kde byla vytipována vhodná místa štěpení vektoru.

M13 primer přímý	GTAAAACGACGGCCAGT
M13 primer převrácený	CAGGAAACAGCTATGAC

Tabulka 3.14 – obecné M13 primery, nasedající k M13 místům vektorů

Pro promotor *FLA9* v pDONOR221 P4P1R byl využit restriční enzym XbaI s pufrem CutSmart, pro kódující sekvenci *FLA9* v pDONOR P2P3R byly využity enzymy HpaI, Hind III s pufrem CutSmart. Pro transkripční fúzi tohoto genu byl využit také enzym XbaI. Pro translační fúzi genu *FLA2* byl využit enzym HpaI. Restriční reakce (tab. 3.15) byla připravena do 20 μ l a nechala se probíhat při 37 °C přes noc. Výsledek štěpení byl opět vizualizován agarózovou gelovou elektroforézou.

Komponenta	Množství
Pufr dle použitého restričního enzymu	2 μ l
Vektor s fragmentem	2 μ l
Restriční enzym	0,5 μ l
Voda	Doplnit do 20 μ l (závislé na počtu použitých restričních enzymů)

Tabulka 3.15 – směs pro restriční reakci

Vzorky z jednotlivých pozitivně restrihovaných Entry clone vektorů byly následně ještě poslány na sekvenaci (Biogen Praha – GATC), kde bylo potvrzeno správné vložení fragmentu. Ve vzorku byl vždy vzorek z BP reakce (MiniPrep) a k tomu primery (tab 3.9) využité pro amplifikaci DNA daného úseku.

LR reakce

Ve chvíli, kdy bylo ověřeno vložení správného fragmentu v Entry clone vektoru, tak se mohlo přejít k LR reakci. Pro translační fúzi *FLA9* je použit MiniPrep z reakce pro promotor i z reakce pro kódující sekvenci, dále vektor s připraveným mCherry (pDONOR221 P1P2) a destinační vektor obsahující rezistenci pro BASTA (pB7m34GW); k těmto komponentám byla přidána LR klonáza (Gateway® LR Clonase® II enzyme – ThermoFischer Scientific) a reakce se nechávala přes noc při pokojové teplotě – postup provedení reakce je stejný jako již zmíněná BP reakce. Po zhruba 15 hodinách byla reakce ukončena proteinázou K opět stejně jako u BP reakce.

Pro transkripční fúzi byly použity MiniPrepy pro promotorovou oblast a velice podobně jako výše zmíněné schéma spolu s vektory pEN-R2-S*-L3 a pEN-R2-6-L3 a s destinačním vektorem obsahující rezistenci pro herbicid BASTA (pBb7m34GW) se reakce připravila s LR

klonázou přes noc (15 hodin) při pokojové teplotě. Následně byla reakce ukončena proteinázou K.

Elektroporace

Produkt LR reakce byl elektroporován do *E. coli* (Dh5 α). Bakterie byly ponechány narůst v SOC médiu po dobu jedné hodiny na třepačce a poté přenášeny opět na tuhé LB médium, tentokrát s antibiotiky pro selekci se spectinomycinem v koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ (1:1000). Po nárůstu po 15 hodinách na tuhém LB médiu bylo provedeno Colony PCR pro zjištění pozitivních kolonií, podle postupu zmiňovaného výše. Z pozitivních kolonií byly vytvořeny MiniPrepy a ty byly po opětovné kontrole pomocí restrikce a sekvenace (Biogen Praha – GATC) využity pro další postup elektroporace do *Agrobacterium*.

Elektroporace do *Agrobacterium* probíhá při 2000 V a po elektroporaci se přidalo tekuté Yeb Recovery medium (tabulky 3.16-17), se kterým se bakterie třepaly na třepačce dvě hodiny, po kterých byly přeneseny na tuhé LB médium s antibiotiky – rifampicin v koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$, gentamycin v koncentraci 10 $\mu\text{g/l}$, spectinomycin v koncentraci 50 $\mu\text{g/l}$ důležité pro selekci. Na tuhém médiu bakterie rostly dva dny při teplotě 28 °C. Po dvou dnech bylo provedeno Colony PCR pro zjištění pozitivních kolonií se správně vloženým fragmentem. Pozitivní kolonie byly zaočkovány do 3 ml tekutého LB média a nechávaly se opět narůst i s antibiotiky po dobu dvou dnů při teplotě 28 °C. Po nárůstu byly připravovány konzervy a část byla zaočkována do 50 ml tekutého LB média s antibiotiky a pochána narůst zhruba 36 hodin pro transformaci rostlin. Bakteriální konzervy byly připraveny z tekutého LB media s pozitivně testovanými bakteriemi, kdy se bakterie uchovávají s glycerolem v hlubokém mrazu (-80 °C) pro případné namnožení dalších bakterií pro opakovanou transformaci.

Složka	Množství
pepton (1%)	5 g
Kvasničný extrakt (0,1%)	0,5 g
Sacharóza (0,5%)	2,5 g
MgSO ₄ (0,05%)	1 g
Destilovaná voda	650 ml

Tabulka 3.16 – Yeb Recovery médium – vše až na MgSO₄ se rozpustí ve 450 ml vody a dá se klávkovat, zvlášť se smíchá MgSO₄ s 200 ml vody a dá se také klávkovat a následně se vytvoří směs 450 ml Yeb + 50 ml MgSO₄ z této směsi se vytvoří kompletní Yeb Recovery médium za přidání 100 ml Recovery soli do 900 ml směsi (tabulka 3.17).

Složky	Množství
100 mM NaCl	2,922 g
25 mM KCl	93,19 mg
100 mM MgCl ₂	1,0167 g
100 mM MgSO ₄	1,2324 g

Tabulka 3.17 – Recovery soli pro Yeb médium rozpouštěné v 50 ml destilované vody a sterilované filtrací

Transformace rostlin (metodou floral-dip) a selekce transformovaných rostlin

Po nárůstu se suspenze *Agrobacterium* centrifuguje 20 minut při 5 000 g a následně je sediment resuspendována v infiltračním médiu obsahující 5 % sacharózu a 0,005 % Silwet, který funguje jako smáčedlo.

Do Petriho misky se připraví sáček, do něj je nalito připravené médium, ve kterém se nakrátko namočí nadzemní části rostliny *Arabidopsis thaliana* – v této práci byl použit ekotyp Col-0 a *rdr6* mutantní genotyp. *Rdr6* rostliny mají zasaženou RNA dependentní RNA polymerázu 6, která má funkci v RNA interferenci (Boccaro et al. 2014). Rostliny musejí být pro transformaci připravené tak, aby měly kvetoucí stvolky, ale neměly již vytvořené šesule se semeny – v případě, že by šesule byly již narostlé, tak je třeba je odstranit pro správnou transformaci všech tvořených semen. Takto transformované rostliny se uzavřou do plastového sáčku, přes noc se nechají ve tmě; druhý den je sáček sundán a rostliny jsou vneseny do kultivační místnosti, kde se nechají pro následný sběr semen.

Transformované rostliny, které vytvořily semena, byly sklizeny a semena z nich prošla sterilizací plynným chlórem (ten je uvolňován pomocí reakce HCl s přípravkem SAVO obsahujícím chlornan sodný) po dobu čtyř hodin. Následně byla tato semena vyseta na sterilní půdu (sterilizována propařením) a přenesena do kultivační místnosti. Po nárůstu malých semenáčků s prvními pravými listy byl využit herbicid BASTA pro selekci. O týden později byla BASTA nastříkána na rostliny ještě jednou a za další týden potřetí. Tento herbicid vyseletoval rostliny, které neměly vnesený fragment s rezistencí k BASTA, nebo nebyl správně složený. Rostliny, které přežily opakované ošetření herbicidem, byly přesazeny na rašelinové jiffy a nechaly se narůst a z nich byla sesbírána transformovaná semena, která byla následně využita pro další experimenty.

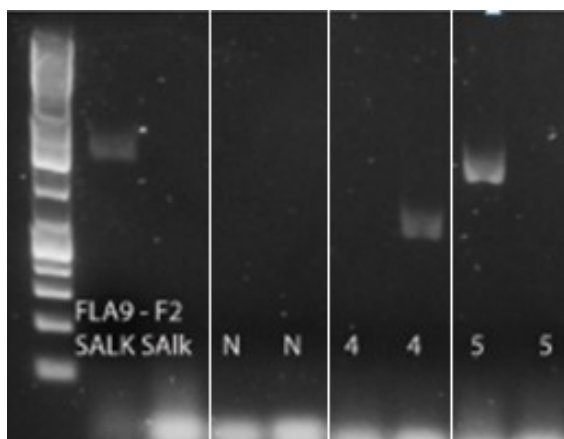
3.8 Mikroskopické pozorování

U transformovaných rostlin byla pozorována lokalizace proteinů translačních fúzí za pomoci mikroskopů – Nikon Eclipse i90 (s kamerou Andor Zyla) a Olympus BX51 (s kamerou Apogee Alta), dále za pomoci konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 v Laboratoři konfokální a fluorescenční mikroskopie PřFUK a také s využitím binokulární lupy SZX7 vybavené fluorescencí. Pro mikroskopické pozorování byly rostliny vkládány do vody, pro sledování lokalizace fúzního proteinu byly rostliny také plazmolyzovány roztokem KNO_3 (76 g/l–M=101,11) po dobu jedné minuty a ihned poté byly pozorovány.

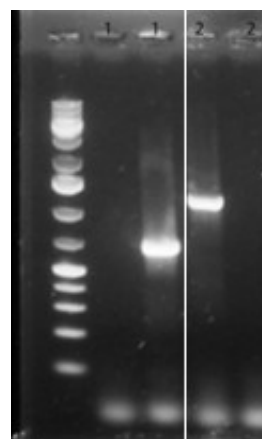
4 Výsledky

4.1 Ověření inzerčních linií, zpětné křížení

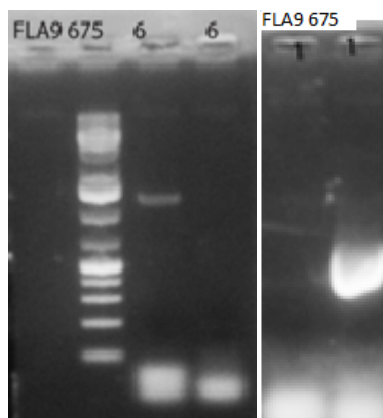
Jak bylo zmíněno již v metodice, z veřejně dostupné kolekce T-DNA inzerčních mutantů *Arabidopsis thaliana* (SALK) byla získána semena homozygotních mutantů několika vybraných linií z The Nottingham Arabidopsis Stock Centre. Následně byla mutantní rostlina křížena s rostlinou divokého typu (wt). Pro křížení byl použit ekotyp Col-8 (SALK N60000), který je pozadím pro SALK linie. Z F2 generace rostlin po křížení byl vybrán homozygotní mutant i divoký typ a jejich semena byla následně používána pro experimenty. Tyto rostliny byly vybrány pomocí genotypování (viz kapitola Metodika). Všechny rostliny byly ověřovány vícekrát, pro zajištění správné selekce bez falešně pozitivních či negativních výsledků z genotypování. Tímto způsobem byli ověřeni mutant i wt rostliny pro geny *FLA9* (tři linie FLA9-1, FLA9-2 a FLA9-3 obrázky 4.1-4.3), *FLA2* a *At14A* (obr. 4.4). Stejným způsobem byl ověřován také vytvořený dvojitý mutant z linie FLA2 a FLA9-3 (obr. 4.5).



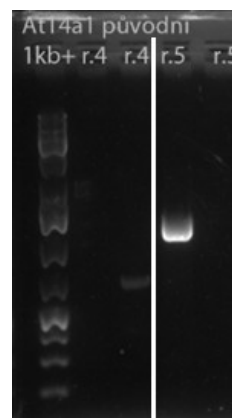
Obrázek 4.1: Ověření linie FLA9-1. Zleva na gelu: DNA žebříček (1 kb+), SALK-pozitivní kontrola pro detekci wt alely (jako templát DNA izolovaná z Col-8 rostliny divokého typu SALK N60000), N – negativní kontrola (voda jako templát), 4 – *fla9-1* homozygotní mutant, 5 – wt (homozygotní rostlina divokého typu). Levý sloupec vždy detekce kontrolní alely, vpravo detekce mutantní alely.



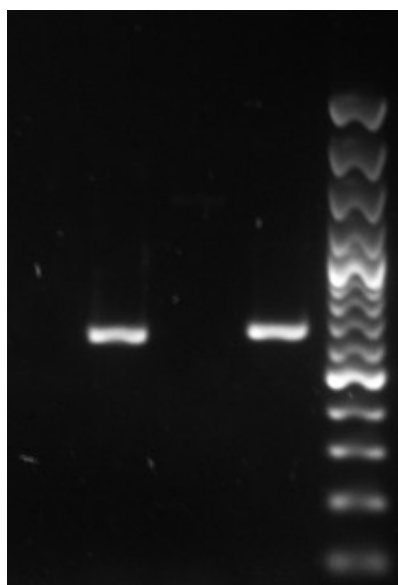
Obrázek 4.2: Ověření linie FLA9-2. Zleva na gelu: DNA žebříček (1 kb+), 1 - *fla9-2* homozygotní mutant, 2 - wt (homozygotní rostlina divokého typu). Levý sloupec vždy detekce kontrolní alely, vpravo detekce mutantní alely.



Obrázek 4.3: Ověření linie FLA9-3: Zleva na gelu: DNA žebříček (1 kb+), 6 - wt (homozygotní rostlina divokého typu), 1 - *fla9-2* homozygotní mutant. Levý sloupec vždy detekce kontrolní alely, vpravo detekce mutantní alely.



Obrázek 4.4: Ověření linie At14a: Zleva na gelu: DNA žebříček (1 kb+), r.4 - *at14a1* homozygotní mutant; r.5 - wt (homozygotní rostlina divokého typu). Levý sloupec vždy detekce kontrolní alely, vpravo detekce mutantní alely.



Obrázek 4.5: Ověření dvojitého mutantu *fla9-3fla2*: Zleva na gelu: detekce kontrolní a mutantní alely pro *fla9-3*, detekce kontrolní a mutantní alely pro *fla2*, DNA žebříček (1 kb+).

4.2 Fenotypová analýza T-DNA inzerčních mutantů

U rostlin s modulovanou expresí genů, kódujících vybrané fasciclin-like arabinogalaktanové proteiny (FLA9 a FLA2) a integrin-like protein At14A byl hodnocen růst kořenového systému u rostlin rostoucích *in vitro* na agarovém mediu za různých podmínek. Kromě kontrolní varianty (MS) byly rostliny vystavovány působení stresových faktorů (sucho, salinita).

4.2.1 4.2.1 Fasciclin-like arabinogalaktanový protein FLA9

Vzhledem k tomu, že pro gen *FLA9* jsou k dispozici pouze inzerční mutanti s inzercí mimo vlastní kódující oblast genu, byly do kultivačních experimentů zahrnuty tři linie (FLA9-1, FLA9-2 a FLA9-3), kde dvě z uváděných linií mají inzerce v promotorové oblasti (FLA9-1, FLA9-2) a třetí linie má inzerce ve 3' nepřekládané oblasti (FLA9-3). Dle článku (Cagnola et al. 2018) promotorová linie FLA9-1 má zvýšenou hladinu exprese až desetinásobně a FLA9-3 má sníženou expresi – v daných experimentech se zaměřovali na tvorbu šesulí.

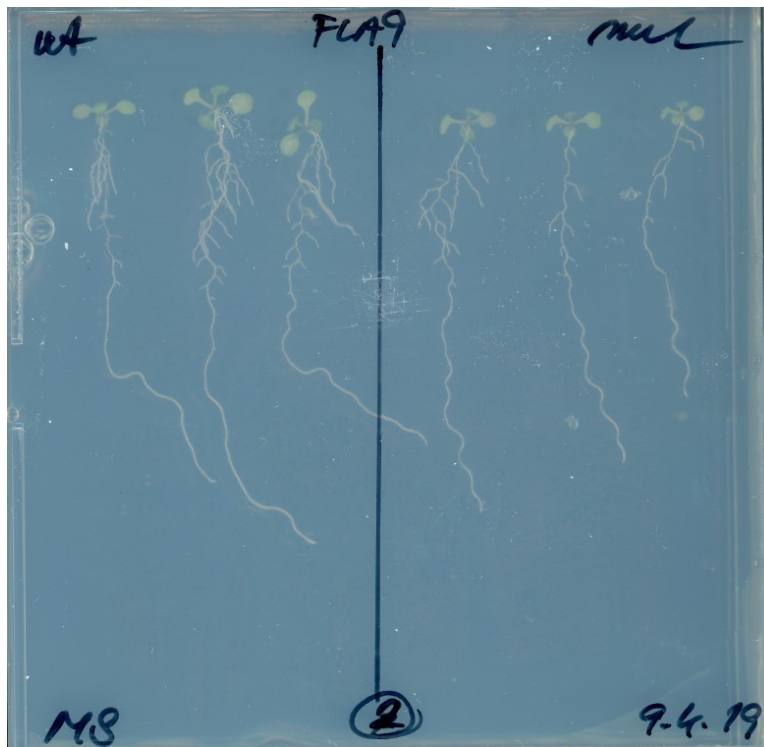
V rámci mých experimentů bylo prováděno více kultivací s liniemi FLA9-1 a FLA9-2 za různých stresových podmínek – rostliny vždy narostly na kultivačním médiu (0,2xMS, tj. kontrolní varianta) uváděném v metodice a následně byly přesazovány na médium obsahující určitou složku navíc pro navození stresových podmínek (viz metodika), případně byly přesazeny na nové kontrolní médium pro porovnání. Následně byl sledován přírůstek hlavního kořene za 24 hodin. Ve stejném uspořádání byl také hodnocen celkový růst kořenového systému (délka, větvení) u rostlin cca 3-5 dní po přesazení. Stejný proces byl proveden u linie FLA9-3, kde bylo ale pouze jedno opakování kultivace, a to z toho důvodu, že tato linie byla získána až později díky problémům s křížením a následně bylo obtížné získat větší množství semen, jelikož tato linie je velice náchylná k suchu, což vede k nižší nebo žádné tvorbě semen po jeho expozici. Tento jev jsem pozorovala v kultivačních místnostech; stejný problém byl navozen i ve chvíli, kdy byla rostlina vystavena škůdcům – mšicím. Mutantní rostlina *fla9-3* rostoucí v kultivační místnosti byla celkově menší, jak ukazuje obrázek 4.6. Horší růst *fla9-3* mutantních rostlin oproti wt byl pozorován také na kultivačních médiích – obrázek 4.7.

Kromě samotného růstu byl u této linie problém s křížením. Ve chvíli, kdy jsem se pokusila o přenesení pylu z mutantní rostliny do divokého typu, tak rostliny vytvořily přijatelné množství semen, ale ve chvíli, kdy jsem využila pyl z Col-8 a pokusila jsem se jím opylit vybranou mutantní rostlinu, tak se šesule ne vždy vytvořily – blizny často do druhého dne seschly, i přestože na sobě měly plastový obal právě jako ochranu před vyschnutím. Pokud se šesule vytvořily, tak obsahovaly málo semen. Po makroskopickém pozorování blizen mutantních rostlin jsem zjistila určité rozdíly mezi genotypy (obr. 4.8 a 4.9), kdy se u mutantních rostlin často objevovaly blizny s delšími papilami a také byly vysunuté z poupěte ještě před jeho samotným otevřením. Křížení se nakonec podařilo pouze přenosem pylu z mutantní rostliny na rostlinu divokého typu.

U linií FLA9-1 a FLA9-2 jsem problémy s růstem rostlin v kultivační místnosti nebo s křížením nezaznamenala.



Obrázek 4.6: Rostliny linie FLA9-3 – vlevo *fla9-3* mutantní rostlina, vpravo FLA9-3 wt rostlina – obrázek dokumentující zhoršený růst mutantní rostliny v kultivační místnosti



Obrázek 4.7: Rostliny linie FLA9-3 – vlevo wt rostlina, vpravo *fla9-3* mutantní rostlina – obrázek dokumentující snížený celkový růst mutantní rostliny a také snížené množství postranních kořenů. Kontrolní (MS) varianta media, rostliny 10 dní staré (5 dní po přesazení).



Obrázek 4.8 – poupata rostliny *fla9-3* s vyčnívající bliznou, která má nezvykle delší papily

Obrázek 4.9 – poupě s vyčnívající bliznou na kontrolní rostlině Col-0

Růst kořenového systému *fla9* mutantních rostlin

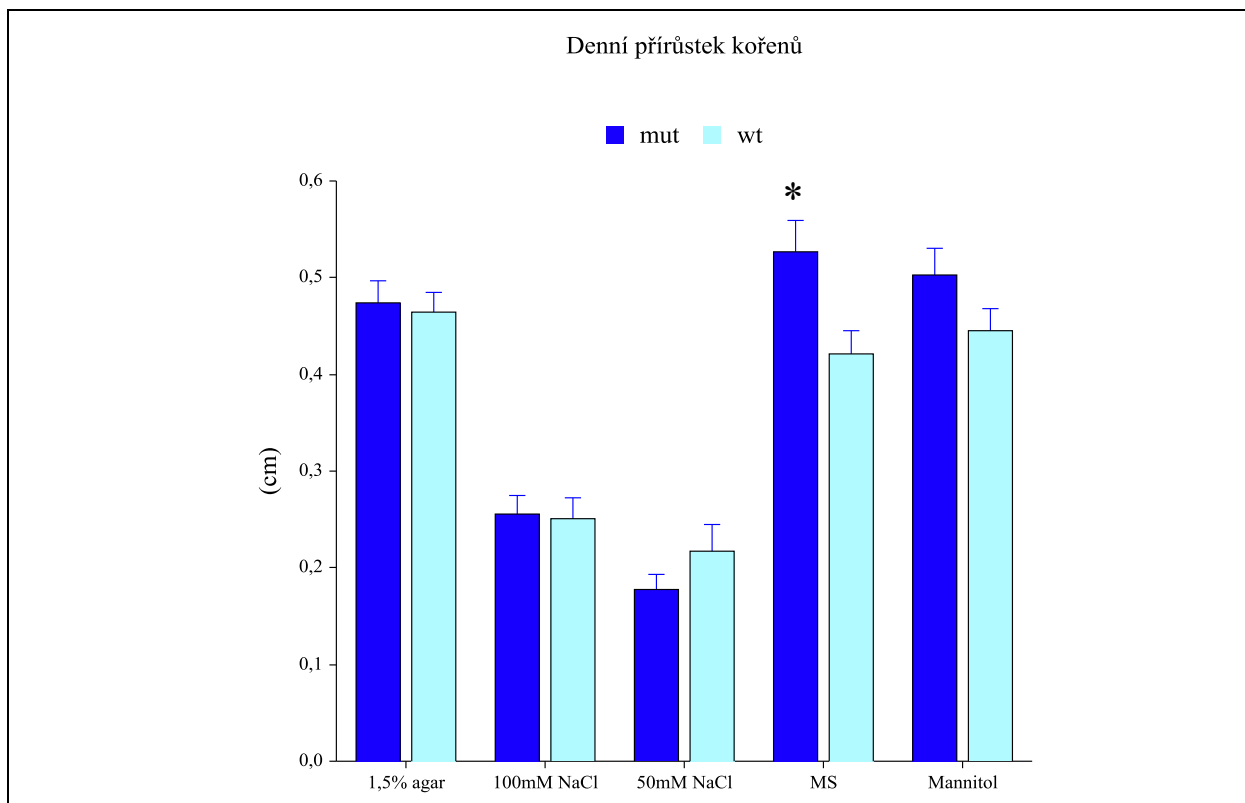
1. Krátkodobý přírůstek hlavního kořene po přesazení do stresových podmínek

Experiment 1

Při tomto uspořádání experimentu byly rostliny předpěstovány na kontrolním mediu (varianta MS; tj. 0,2xMS, 1% agar) po dobu třech dní a následně přesazeny do jednotlivých variant kultivace: kontrolní varianta (MS), varianta s obsahem agaru zvýšeným na 1,5 % (1,5% AGAR), varianty s přidavkem NaCl (50mM NaCl nebo 100mM NaCl) a varianta s 200mM manitolem (Manitol). Pomocí obrazové analýzy byl hodnocen přírůstek hlavní osy kořene za 24 hodin po přesazení. Výsledky tohoto měření ukazují, že u linie FLA9-1 (graf 4.1.) je vysoce signifikantní rozdíl mezi variantami kultivace (GLM ANOVA, $p < 0,001$), kdy ve variantách s přidavkem NaCl byl růst hlavního kořene pomalejší. Přírůstek kořenů se mezi genotypy signifikantně neliší (GLM ANOVA, $p > 0,05$) v důsledku relativně velké variability a také rozdílů v trendech u jednotlivých variant media. Byl však nalezen signifikantní rozdíl

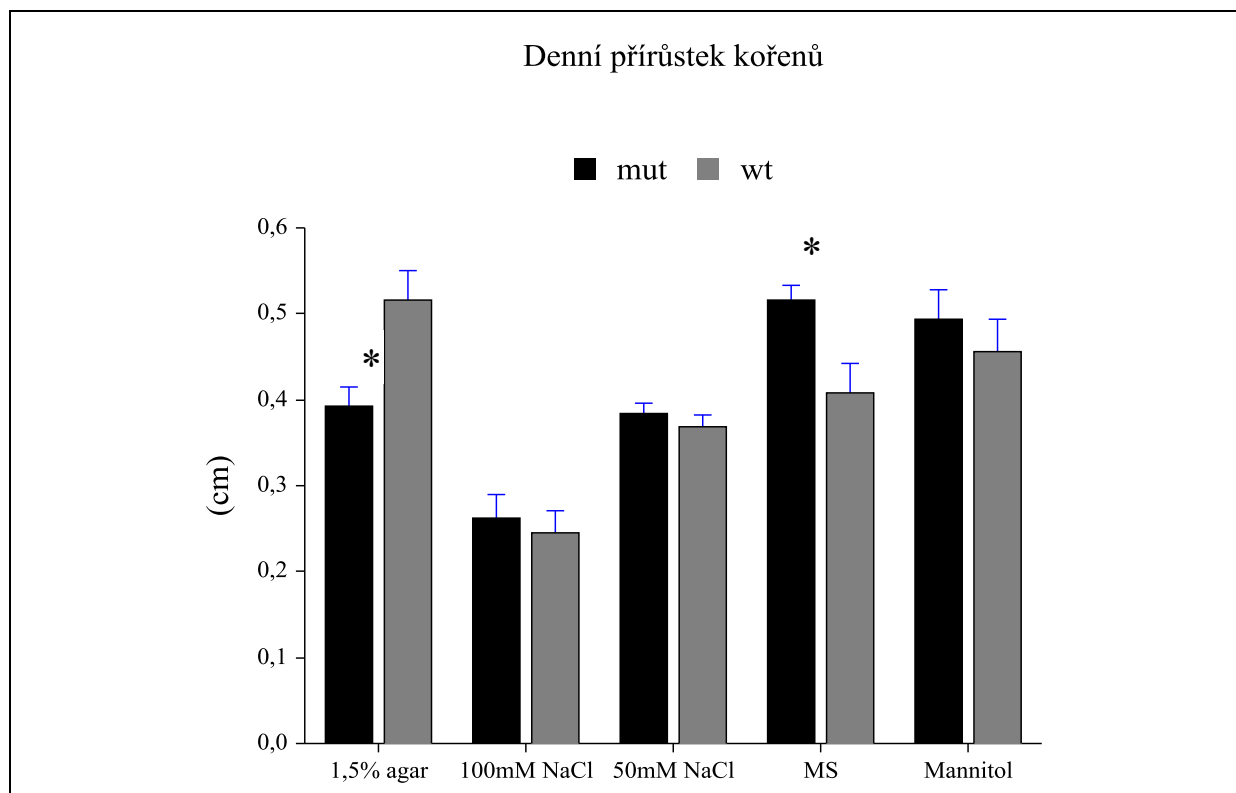
v genotypech na kontrolní variantě média MS (T-Test – $p < 0,05$), kde *fla9-1* mutantní rostliny rostly rychleji.

Výsledkem měření přírůstků kořenů u linie FLA9-2 jsou opět signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace (GLM ANOVA, $p < 0,05$), a to především v 50mM a 100mM NaCl, ve kterých hlavní kořeny rostlin výrazně méně rostly. Signifikantně vychází také interakce ošetření x genotyp (GLM ANOVA, $p < 0,005$), což naznačuje rozdílnou reakci wt a mutantních rostlin na varianty kultivace. V rámci varianty kultivace se zvýšeným množstvím agaru a také ve variantě kontrolní byl signifikantní rozdíl (T-Test, $p < 0,05$) mezi wt a mutantním genotypem, což je v grafu 4.2 označeno *. V kontrolní variantě (MS) rostly *fla9-2* mutantní rostliny signifikantně rychleji, zatímco ve variantě s 1,5% agarem naopak pomaleji než wt rostliny (graf 4.2.).



Graf 4.1 – linie FLA9-1

Krátkodobý přírůstek kořenů za 24 h po přesazení do jednotlivých variant kultivace ($n = 20-30$; průměr \pm SE). Wt – rostliny divokého typu, mut – *fla9-1* mutantní rostliny. Varianta MS je varianta kontrolní. Rozdíly mezi variantami $p < 0,001$ a genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje signifikantní rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace (T-Test).



Graf 4.2 - linie FLA9-2

Krátkodobý přírůstek kořenů za 24 h po přesazení do jednotlivých variant kultivace (n = 20-30; průměr ± SE). Wt – rostliny divokého typu, mut – *fla9-2* mutantní rostliny. Varianta MS je varianta kontrolní. Rozdíly mezi variantami p <0,05 a genotypy p >0,05 (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje signifikantní rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace (T-Test).

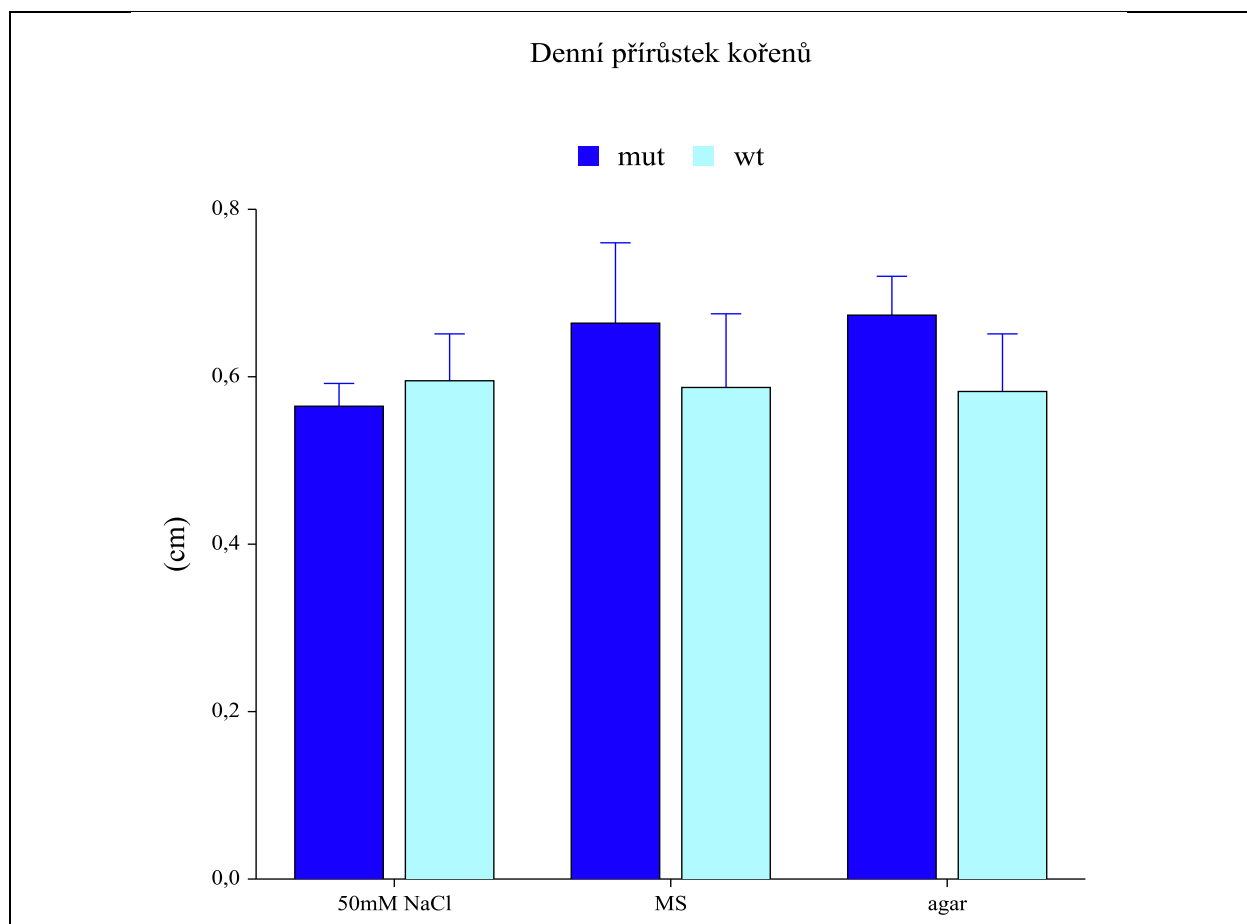
Experiment 2

Stejným způsobem uspořádání byl proveden i druhý experiment, který obsahoval kromě dvou předchozích linií také linii FLA9-3, která byla úspěšně selektována pro fenotypové analýzy o něco později z důvodu problémů s křížením. Opět se nechaly rostliny narůst na kontrolním médiu (MS – označení varianty, jedná se o 0,2xMS s 1% agarem) a tentokrát po pěti dnech byly rostliny přesazeny na nové kontrolní médium a médium obsahující přídatné látky – 1,5 % agar nebo 50mM NaCl.

Linie FLA9-1 vykazovala stejný trend růstu jako v předchozí kultivaci (graf 4.3). *Fla9-1* mutantní rostliny měly mírně vyšší přírůstky oproti odpovídajícím wt rostlinám na kontrolním médiu a médiu s 1,5 % agarem, ale tyto rozdíly bohužel nebyly statisticky signifikantní (GLM ANOVA, p >0,05; T-test ve všech variantách p >0,05). V tomto případě nebyly v důsledku relativně velké variability dat a menšího počtu opakování signifikantní ani rozdíly mezi variantami kultivace (GLM ANOVA, p >0,05).

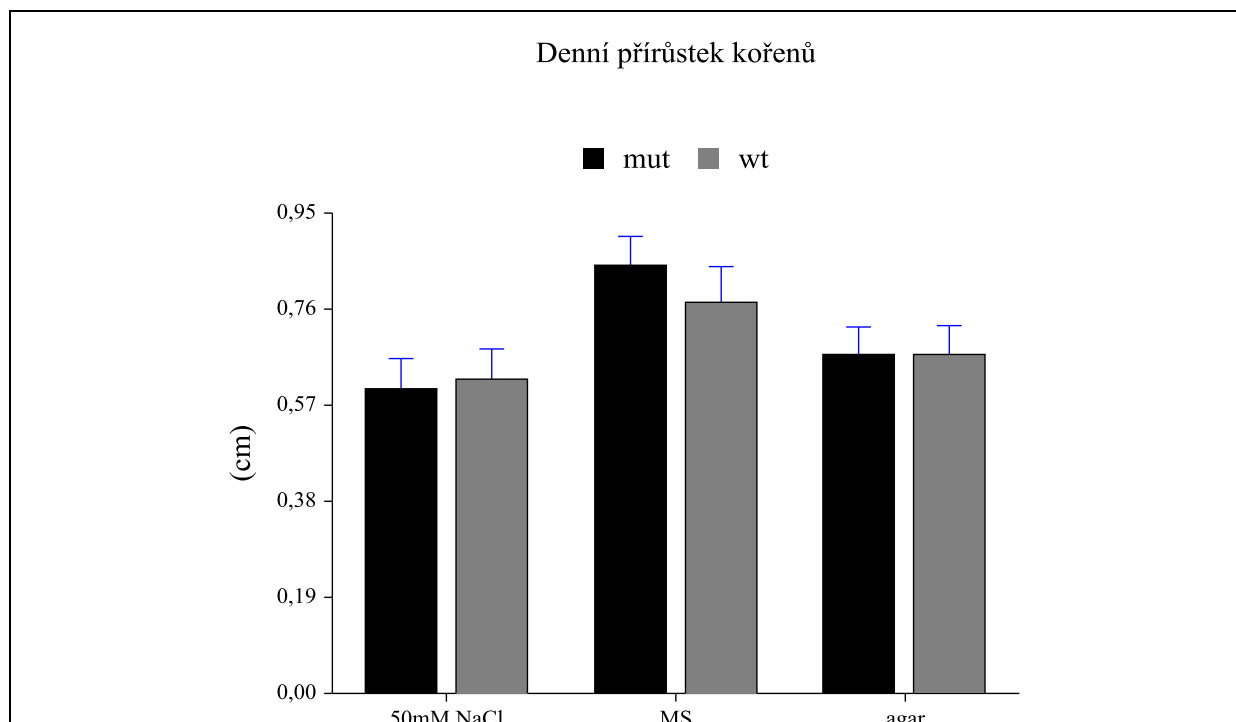
U linie FLA9-2 byly v této kultivaci zjištěny signifikantní rozdíly mezi variantami kultivace (GLM ANOVA, $p < 0,01$) podobně jako v případě prvního experimentu (graf 4.4). Ve variantě s přidavkem 50mM NaCl byl přírůstek kořene za 24 hodin signifikantně menší oproti kontrolní variantě, varianta s 1,5 % agarem se nelišila. Rozdíly v přírůstku mezi *fla9-2* mutantními rostlinami a wt rostlinami nebyly statisticky významné (GLM ANOVA, $p > 0,05$).

Nejzajímavějším výsledkem je linie FLA9-3, u které vyšel signifikantní rozdíl mezi variantami kultivace (GLM ANOVA, $p < 0,001$) a také mezi genotypy (GLM ANOVA, $p < 0,05$). Varianta obsahující 50mM NaCl vykazovala signifikantní snížení růstu u obou genotypů. Na variantě s 1,5 % agarem rostl *fla9-3* mutant signifikantně méně oproti své wt rostlině – v grafu 4.5 označeno * (T-Test, $p < 0,05$). Podobný trend je patrný i v kontrolní variantě, ale není statisticky signifikantní (T-Test, $p > 0,05$).



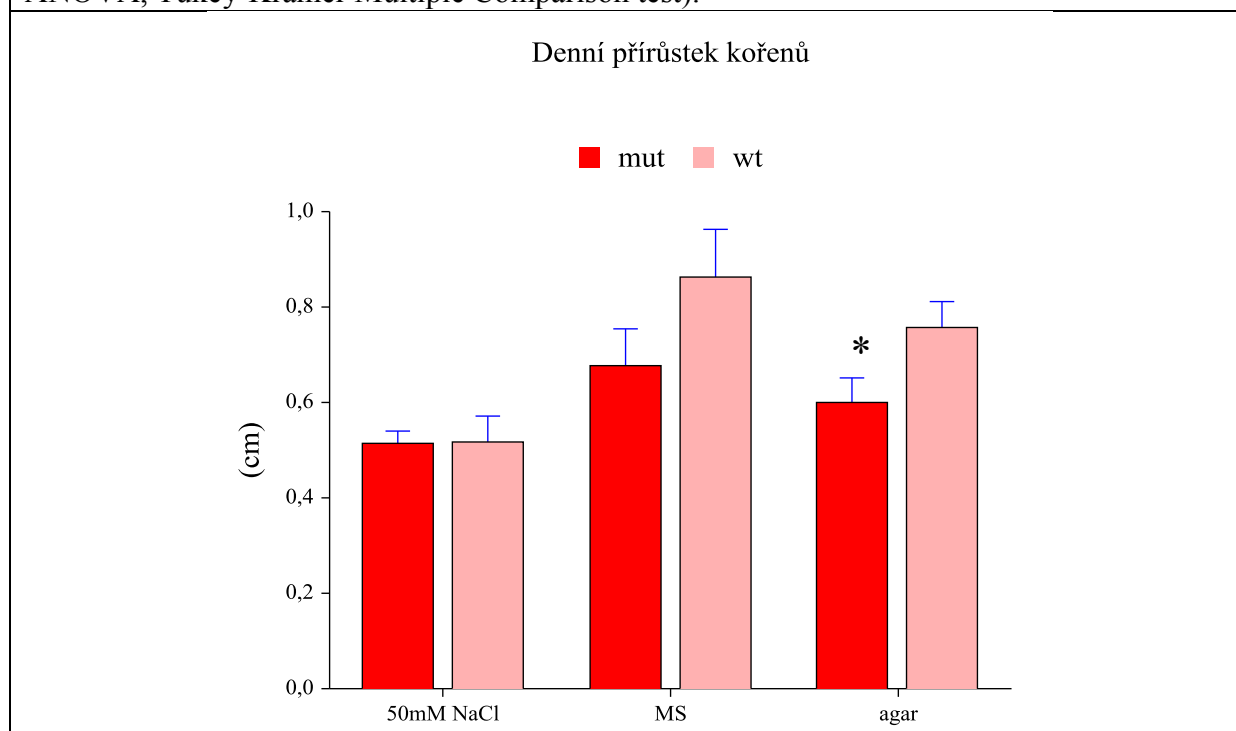
Graf 4.3 – linie FLA9-1

Krátkodobý přírůstek kořenů za 24 h po přesazení do jednotlivých variant kultivace ($n = 10-15$; průměr \pm SE). Wt – rostliny divokého typu, mut – *fla9-1* mutantní rostliny. Varianta MS je varianta kontrolní. Rozdíly mezi variantami i genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test).



Graf 4.4: linie FLA9-2

Krátkodobý přírůstek kořenů za 24 h po přesazení do jednotlivých variant kultivace (n = 10-15; průměr ± SE). Wt – rostliny divokého typu, mut – *fla9-2* mutantní rostliny. Varianta MS je varianta kontrolní. Rozdíl mezi variantami p < 0,05, mezi genotypy p > 0,05 (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test).



Graf 4.5 - linie FLA9-3

Krátkodobý přírůstek kořenů za 24 h po přesazení do jednotlivých variant kultivace (n = 10-12; průměr ± SE). Wt – rostliny divokého typu, mut – *fla9-3* mutantní rostliny. Varianta MS je varianta kontrolní. Rozdíl mezi variantami p < 0,001, mezi genotypy p < 0,05 (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje signifikantní rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace (T-Test)

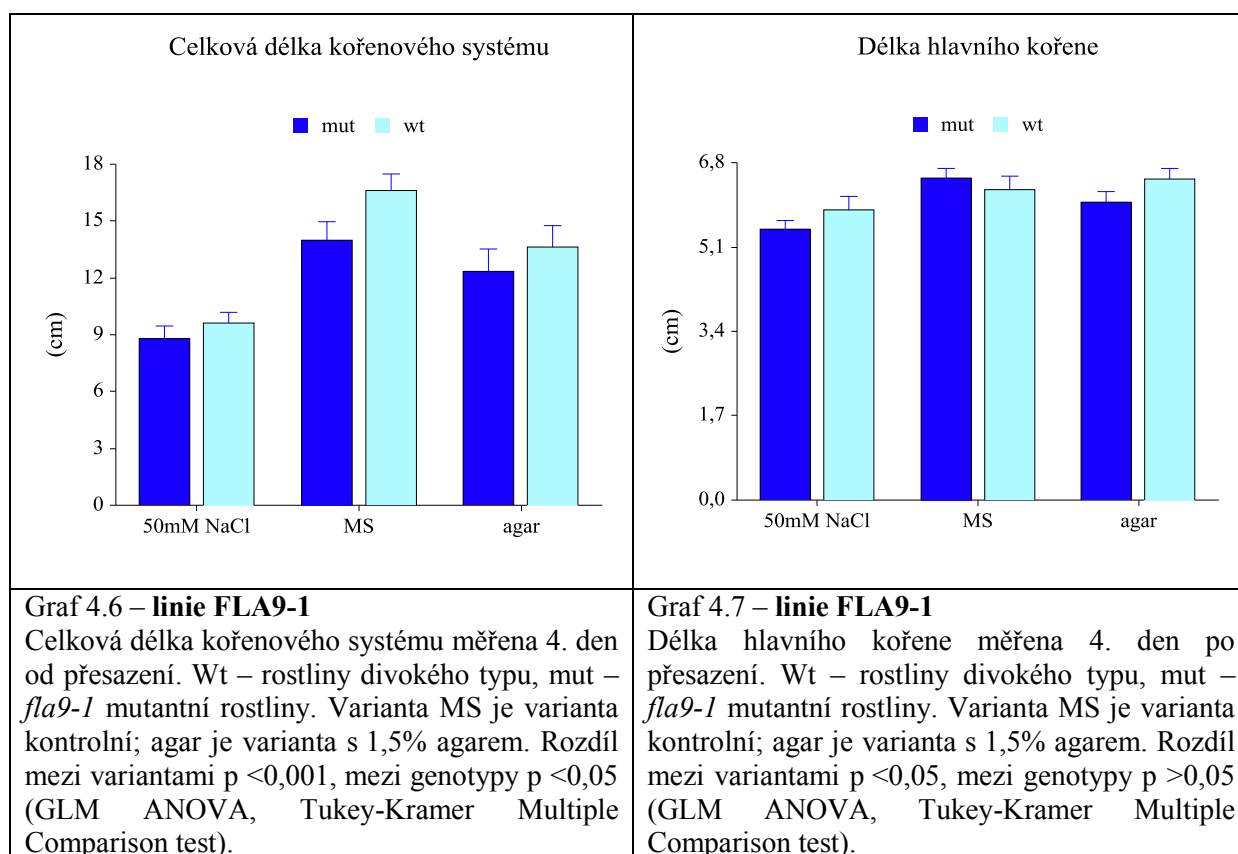
2. Dlouhodobý růst kořenového systému po přesazení do stresových podmínek

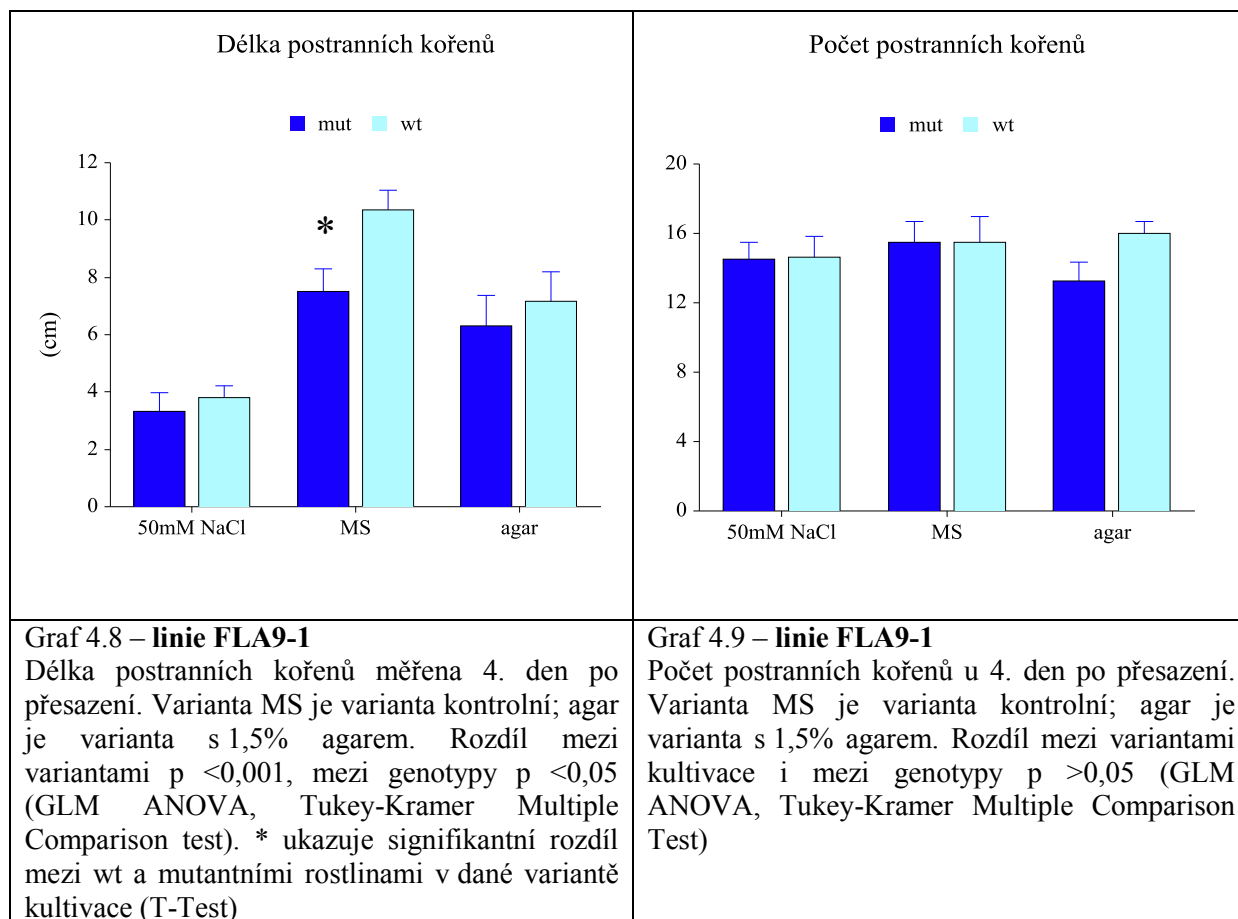
Růst rostlin na mediu s 50mM NaCl nebo 1,5 % agarem

Pro zjištění růstu celého kořenového systému byl připraven experiment navržený obdobně, jako tomu bylo u krátkodobých přírůstků – rostliny byly předpěstovány na MS (kontrolní variantě) a následně byly pětidenní rostliny přeneseny na různé varianty média – 50mM NaCl, 1,5% agar (v grafech označeno jako AGAR) a kontrolní variantu (MS). Pomocí obrazové analýzy byly následně zkoumány rostliny 4. den růstu po svém přesazení. Sledována byla délka celého kořenového systému, délka osy hlavního kořene a také délka a počet postranních kořenů prvního řádu.

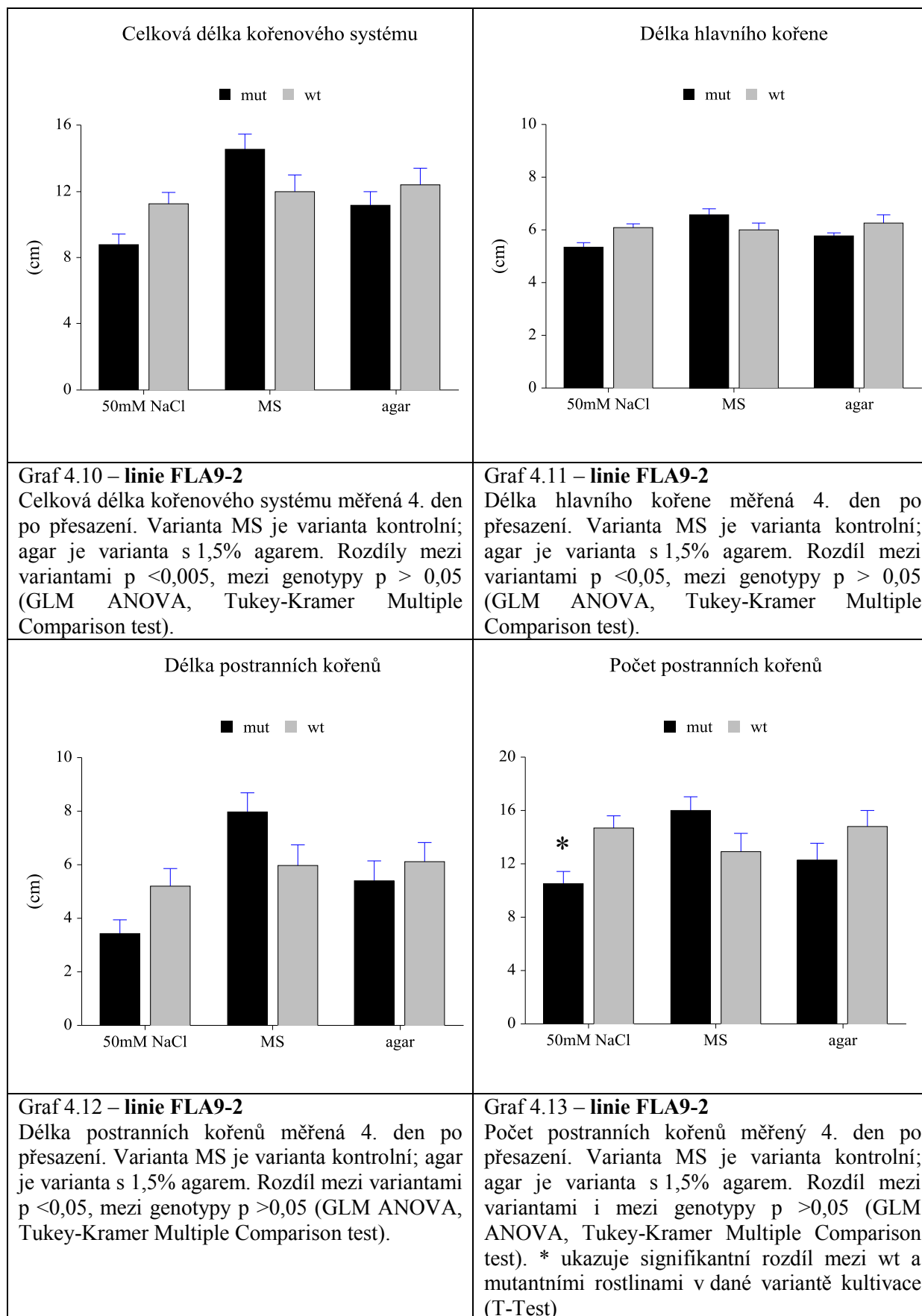
Linie FLA9-1 reagovala statisticky významně rozdílně (GLM ANOVA, $p < 0,001$) na ošetření, a na úrovni celého kořenového systému byl rozdíl i mezi genotypy (GLM ANOVA, $p < 0,05$), tento rozdíl byl dán především délkou postranních kořenů, kde byla hodnota nejvíce signifikantní.

Fla9-1 mutantní rostlina měla vždy kratší celkovou délku postranních kořeny oproti wt. V délce hlavního kořene či počtu postranních kořenů nebyl naměřen žádný rozdíl mezi variantami kultivace nebo genotypy (GLM ANOVA, $p > 0,05$) – grafy 4.6–4.9.



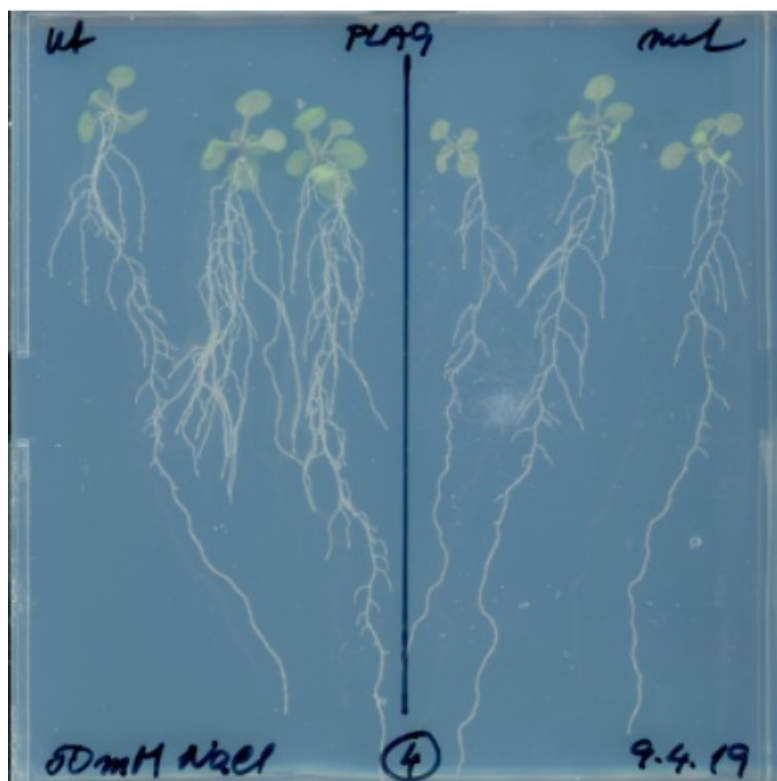


U zkoumané linie FLA9-2 byl pozorován signifikantní rozdíl mezi ošetřeními u všech zkoumaných délek (celková délka kořenového systému, délka hlavního kořene, celková délka postranních kořenů; GLM ANOVA, $p < 0,05$), počty postranních kořenů se však mezi variantami nelišily (GLM ANOVA, $p > 0,05$). Rozdíl mezi genotypy nebyl signifikantní (GLM ANOVA, $p > 0,05$), ale *fla9-2* mutantní rostliny měly signifikantně menší počet postranních kořenů oproti wt rostlinám ve variantě kultivace s 50mM NaCl (T-Test, $p < 0,05$) – grafy 4.10 - 4.13.

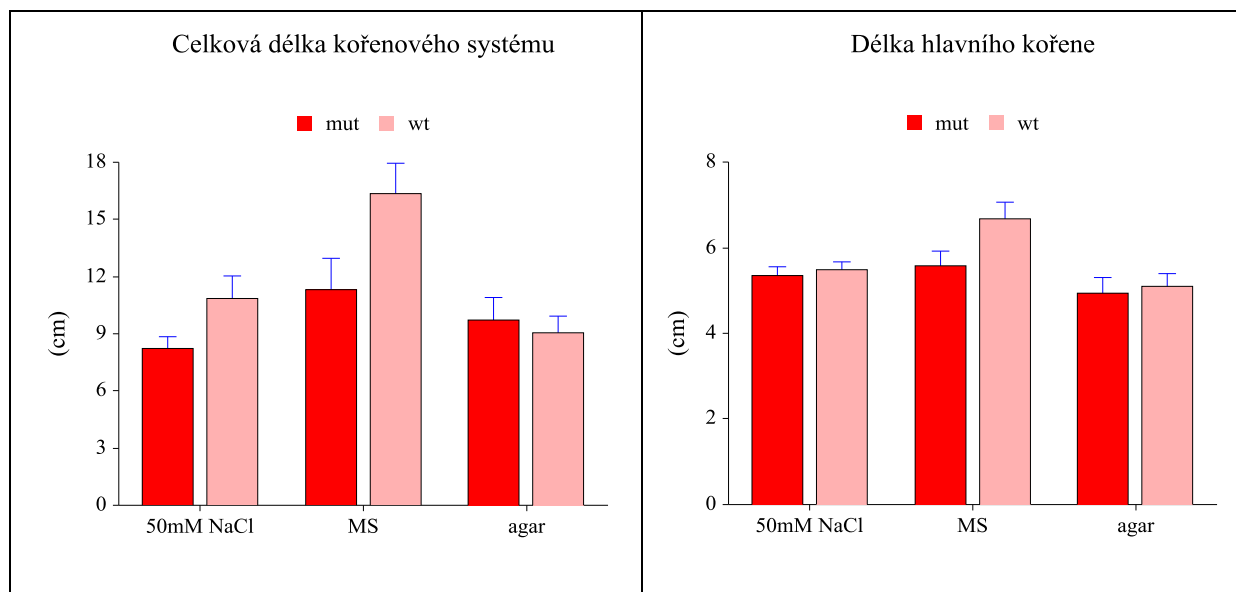


Linie FLA9-3 vykazovala signifikantní rozdíl mezi ošetřeními (GLM ANOVA, $p < 0,05$) i mezi genotypy (GLM ANOVA, $p < 0,05$) v celkové délce kořenového systému. Hlavní kořenová osa nebyla nijak zvlášť ovlivněna ani ošetřením a ani genotypem, ale postranní kořeny reagovaly významně jinak. Mutantní rostliny *fla9-3* měly výrazně menší celkovou délku postranních kořenů ve variantě s 50mM NaCl a v kontrolní variantě (MS) a zároveň těchto kořenů měly méně. Postranních kořenů dané linie bylo v každé variantě kultivace méně, někdy signifikantně (T-Test), někdy z důvodu malého počtu opakování nebylo možné zjistit statisticky významný rozdíl. Celkovou délku kořenového systému tedy nejvíce ovlivnilo množství postranních kořenů – grafy 4.14. - 4.17.

Rozdílný růst na variantě s 50mM NaCl je zdokumentována také na obrázku 4.10, kde je vidět snížený růst mutantních rostlin *fla9-3*.



Obrázek 4.10 – plotna s rostlinami linie FLA9-3 na variantě kultivace s 50 mM NaCl se zdokumentovaným zhoršeným růstem *fla9-3* mutantních rostlin (mut) oproti divokému typu (wt)

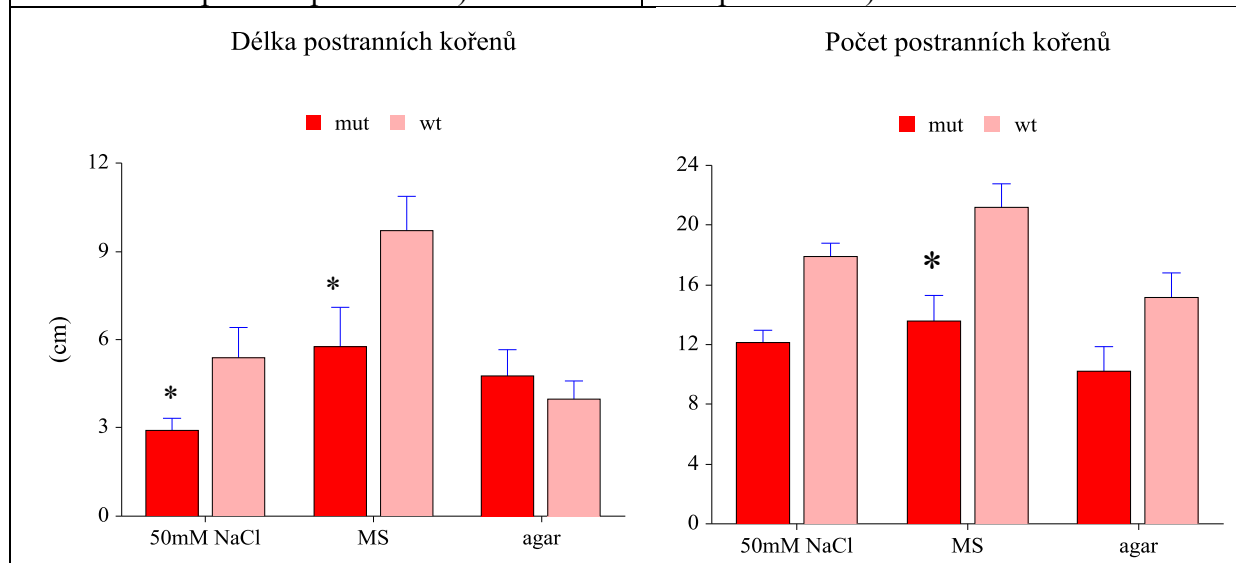


Graf 4.14 - linie FLA9-3

Celková délka kořenového systému měřená 4. den po přesazení. Varianta MS je varianta kontrolní; agar je varianta s 1,5% agarem. Rozdíl mezi variantami $p < 0,005$, mezi genotypy $p < 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test).

Graf 4.15 – linie FLA9-3

Délka hlavního kořene měřená 4. den po přesazení. Varianta MS je varianta kontrolní; agar je varianta s 1,5% agarem. Rozdíl mezi variantami $p < 0,05$, mezi genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test).



Graf 4.16 – linie FLA9-3

Délka postranních kořenů měřená 4. den po přesazení. Varianta MS je varianta kontrolní; agar je varianta s 1,5% agarem. Rozdíl mezi variantami $p < 0,001$, mezi genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje signifikantní rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace (T-Test)

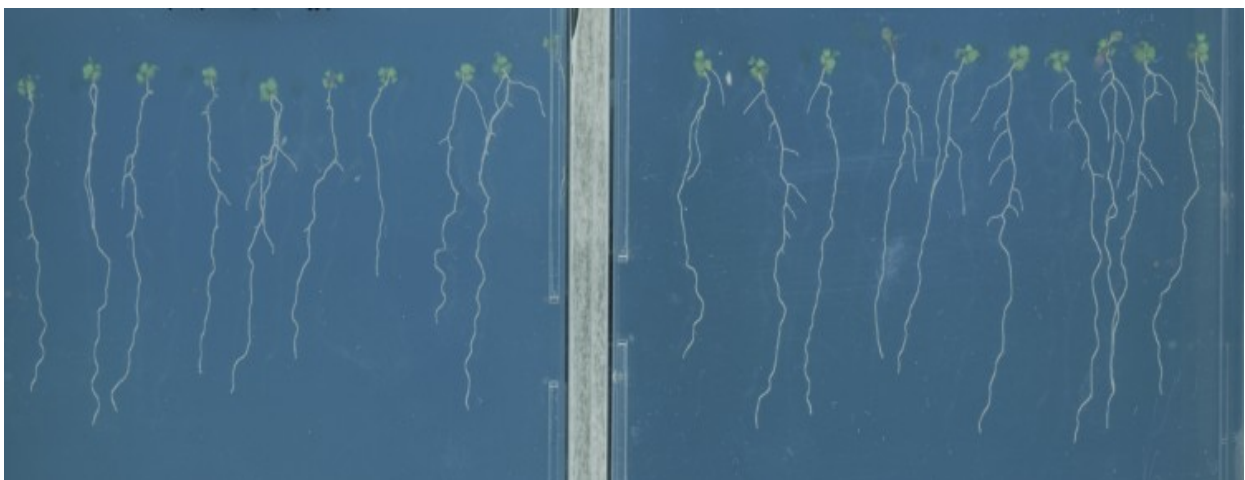
Graf 4.17 – linie FLA9-3

Počet postranních kořenů linie FLA9-3 měřená 4. den po přesazení. Varianta MS je varianta kontrolní; agar je varianta s 1,5% agarem. Rozdíl mezi variantami $p < 0,05$, mezi genotypy $p < 0,001$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje signifikantní rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace (T-Test)

Dlouhodobý růst rostlin na médiu s 200mM manitolem

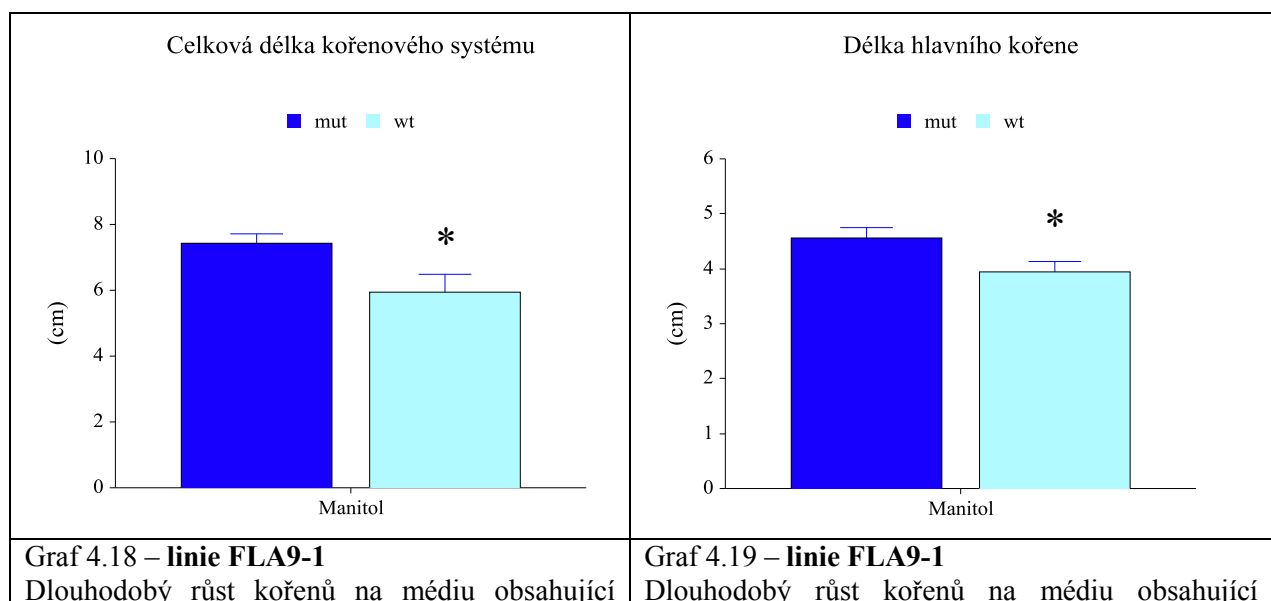
U linie FLA9-1 byla prováděna další kultivace se stejným uspořádáním experimentu – růst na MS médiu po dobu zhruba 3 dní a následným přesazením na kultivační médium obsahující 200mM manitol. V rychlé reakci (24 hodin) na přesazení nebyl žádný rozdíl v růstu mezi genotypy, tento rozdíl se projevil až po dlouhodobějším růstu na kultivačním médiu (grafy 4.18 – 4.21 jsou vytvořené z rostlin rostoucích na médiu 7 dní). Mutantní rostliny *fla9-1* jsou odolnější ke stresovému médiu a ve všech sledovaných parametrech signifikantně lépe rostou (T-test, $p < 0,05$), tento rozdíl je také vidět na obrázku rostlin 4.11 na agarovém médiu.

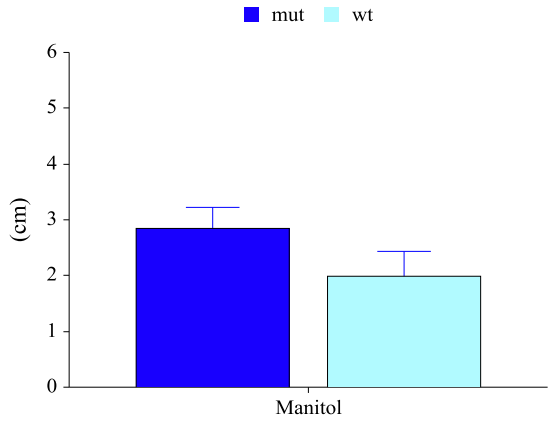
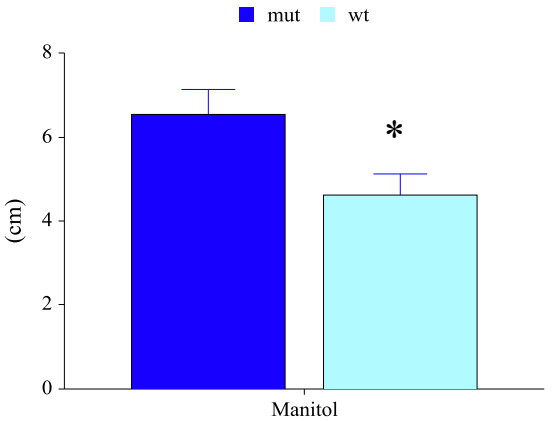
Z časových důvodů (nedostatek semen) nebyla tato kultivace provedena pro linii FLA9-3.



Obr. 4.11: **linie FLA9-1**

Rostliny kultivované ve variantě s 200mM manitolem, fotografie pořizovaná 7. den růstu. Vlevo wt a vpravo *fla9-1* mutantní rostliny dokazující delší kořenový systém a vyšší odolnost při dlouhodobějším růstu na médiu s manitolem



<p>200mM manitol – celková délka kořenového systému – mutantní rostlina se významně odlišuje od divokého typu (T-Test, $p < 0,05$) * ukazuje významný rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace</p>	<p>200mM manitol – délka hlavního kořene – mutantní rostlina se významně odlišuje od divokého typu (T-Test, $p < 0,05$) * ukazuje významný rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace</p>												
<p style="text-align: center;">Délka postranních kořenů</p>  <table border="1" data-bbox="204 488 762 907"> <caption>Data for Graf 4.20</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Length (cm)</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>mut</td> <td>~2.8</td> </tr> <tr> <td>wt</td> <td>~2.0</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Length (cm)	mut	~2.8	wt	~2.0	<p style="text-align: center;">Počet postranních kořenů</p>  <table border="1" data-bbox="833 488 1391 907"> <caption>Data for Graf 4.21</caption> <thead> <tr> <th>Genotype</th> <th>Number of roots</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>mut</td> <td>~6.5</td> </tr> <tr> <td>wt</td> <td>~4.5</td> </tr> </tbody> </table>	Genotype	Number of roots	mut	~6.5	wt	~4.5
Genotype	Length (cm)												
mut	~2.8												
wt	~2.0												
Genotype	Number of roots												
mut	~6.5												
wt	~4.5												
<p>Graf 4.20 – linie FLA9-1 Množství postranních kořenů při dlouhodobém růstu kořenů na médiu obsahující 200mM manitol – dochází k významnému rozdílu mezi mutantní rostlinou a divokým typem ($p < 0,05$ – T-Test)</p>	<p>Graf 4.21 – linie FLA9-1 Celková délka laterálních kořenů při dlouhodobém růstu rostlin na médiu obsahující 200mM manitol – opět významný rozdíl mezi genotypy – $p < 0,05$ – T-Test) * ukazuje významný rozdíl mezi wt a mutantními rostlinami vždy v dané variantě kultivace</p>												

Shrnutí kultivačních experimentů – FLA9

Linie FLA9-1 a FLA9-2 s inzercí v promotorové oblasti

- *fla9-1* mutantní rostliny vykazovaly rychlejší krátkodobý přírůstek hlavního kořene po přesazení (především ve variantě kontrolní, ve stresových variantách rozdíl nebyl patrný nebo byl trend spíše opačný); po delším růstu měly kratší celkovou délku postranních kořenů, jejich počet se ale nelišil. Ze stresových médií měly výrazně větší odolnost vůči manitolu než wt rostliny.
- *fla9-2* mutantní rostliny vykazovaly na kontrolním médiu rychlejší krátkodobý přírůstek hlavního kořene po přesazení i lepší růst kořenového systému při delší

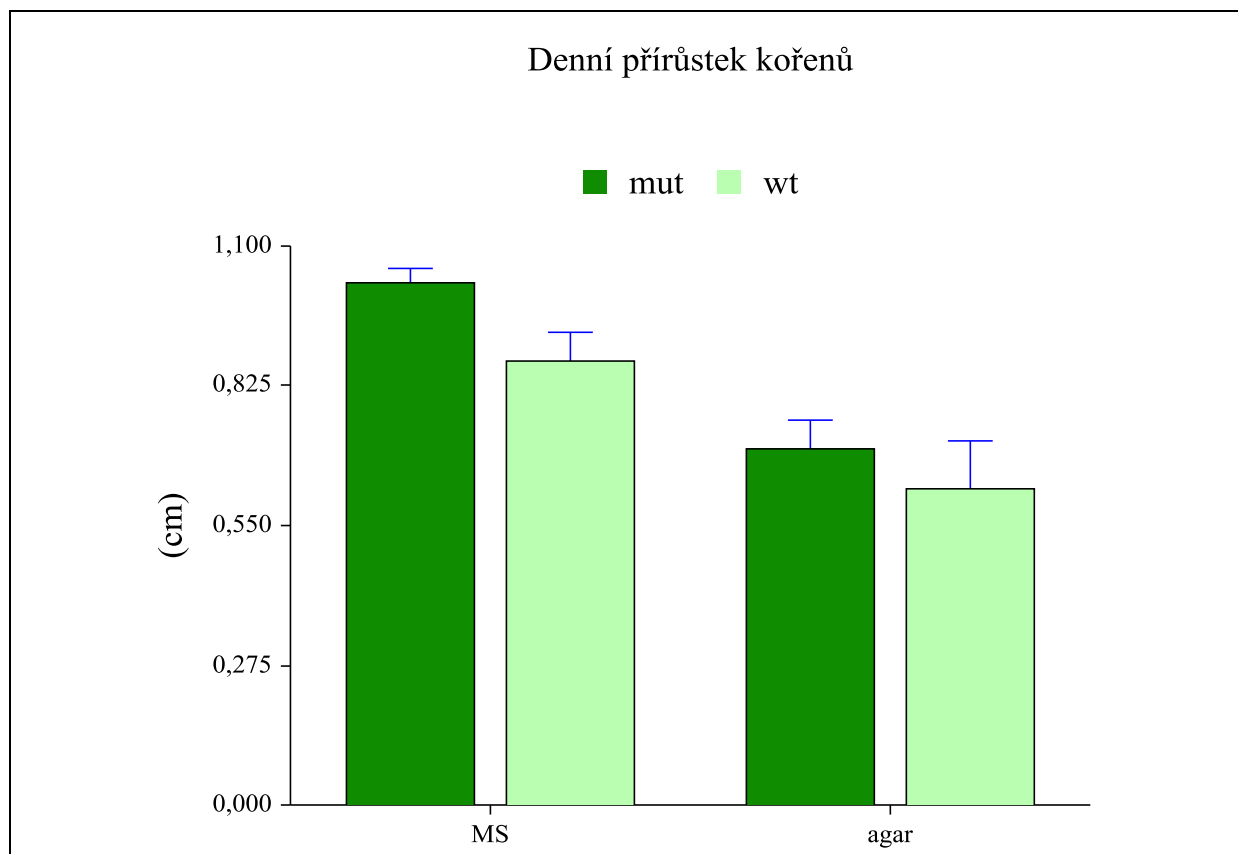
kultivaci. Ve stresových variantách tento trend nebyl patrný nebo byl růst kořenů horší.

Linie FLA9-3 s inzercí v 3'UTR oblasti

- *fla9-3* mutantní rostliny vykazovaly obecně zhoršený růst kořenového systému. Krátkodobý přírůstek hlavního kořene po přesazení byl menší nebo stejný oproti wt, v žádné variantě kultivace nebyl větší. Horší růst kořenového systému byl pozorován i při delší kultivaci, což bylo dáno především sníženým počtem postranních kořenů.

4.2.2 Fasciclin-like arabinogalaktanový protein FLA2

Linie FLA2 má inzerci přímo v oblasti exonu, byla proto využívána pouze jedna linie, se kterou se prováděly experimenty. Na počátku byly rostliny *fla2* kříženy s Col-8 pro získání divokého typu i mutantu z jedné křížené linie, což na rozdíl od popisované rostliny FLA9-3 nebyl problém, křížení se povedlo napoprvé a následně byla selektována semena pro fenotypovou analýzu. Uzpůsobení experimentu bylo velice podobné, jako tomu bylo u linií FLA9, tedy předpěstování na kultivačním médiu po dobu pěti dnů a následně byly semenáčky přeneseny na médium obsahující látky pro navození stresu (v tomto případě pouze 1,5% agar), část rostlin byla přenesena na kontrolní médium pro zajištění kontrolních podmínek pro následné porovnání. V rámci diplomové práce se podařila pouze jedna kultivace s touto linií, u které vychází signifikantní rozdíl v růstu způsobené ošetřením GLM ANOVA, $p < 0,01$). – jak ukazuje graf 4.22, kdy byl pozorován snížený růst na médiu obsahujícím vyšší množství agaru; nebyl ale signifikantní rozdíl mezi genotypy (GLM ANOVA, $p > 0,05$).



Graf 4.22 – linie FLA2

Krátkodobý růst rostlin se sledováním přírůstku za 24 hodin. Varianta MS je varianta kontrolní; agar je varianta s 1,5% agarem. Rozdíl mezi variantami kultivace $p < 0,01$, rozdíl mezi genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test).

Fla2 rostliny byly také kříženy s linií FLA9-3 za vzniku dvojitého mutantu *fla9-3fla2*, který měl obdobné fenotypové projevy jako *fla9-3*, tedy menší množství semen, vyšší citlivost k suchu, snížený růst kořenového systému. Na těchto rostlinách ale nebyla prováděna obrazová analýza z důvodu malého množství rostlin pro adekvátní statistiku (došlo ke kontaminaci ploten v kultivační místnosti).

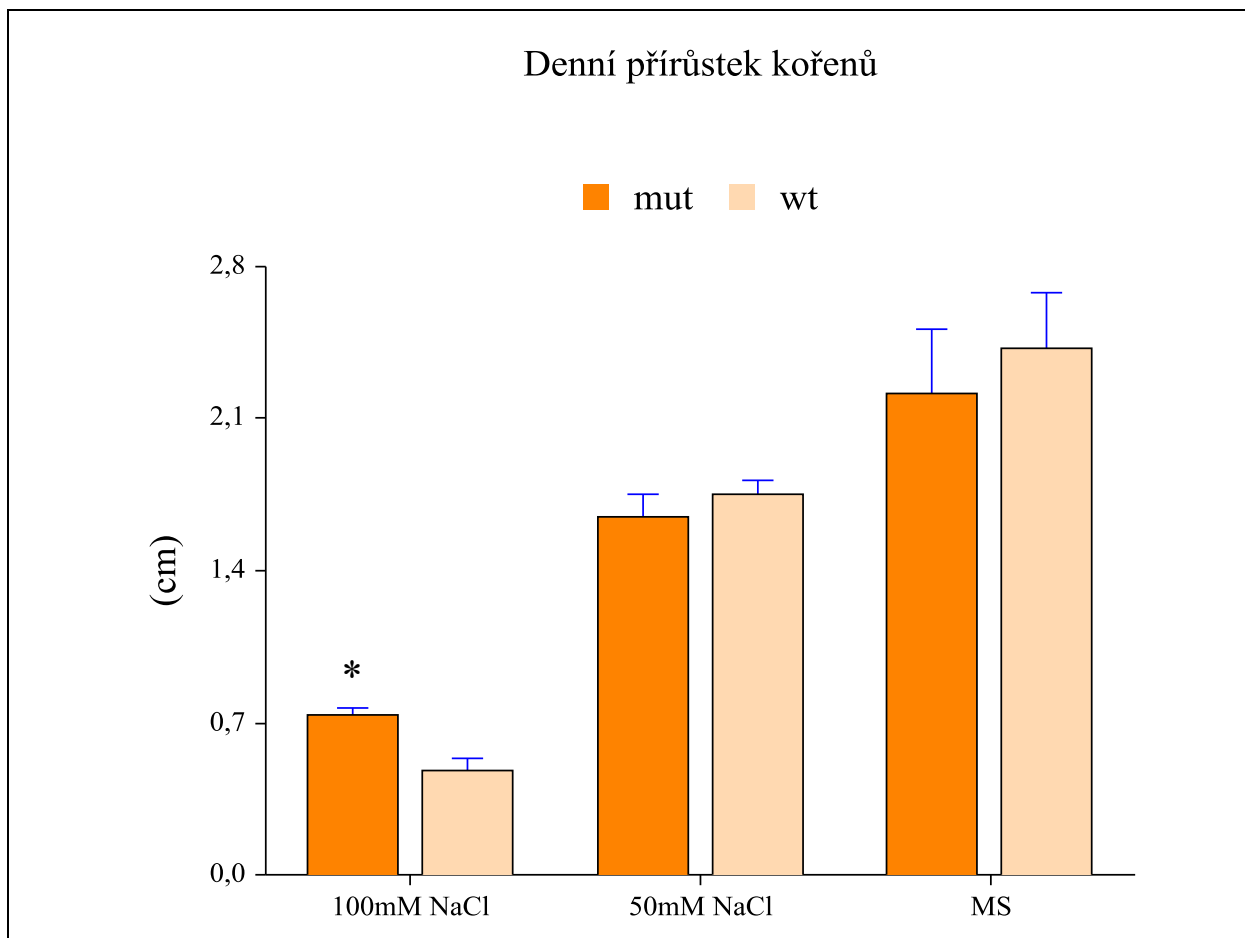
Shrnutí kultivačních experimentů – FLA2

Linie FLA2 s inzercí v exonu

- Mutantní rostliny *fla2* nevykazovaly žádné odlišnosti oproti wt rostlinám v krátkodobých přírůstcích hlavní osy kořene v ani jedné z variant kultivace.

4.2.3 Integrin-like protein At14a

Linie rostlin At14a byly pro experimenty dvě, obě s inzercí v exonu, jedna sloužila jako ověření fenotypu linie první, pro obrazovou analýzu jsem ale použila linii pouze jednu, z časových důvodů nebylo možné zahrnout další experimenty. Zkoumaná linie byla částečně popsána na suspendovaných buňkách v publikaci (Bing Lü, Wang, and Zhang 2012), kde ale nebyly prováděny žádné experimenty s celistvými rostlinami. Uspořádání experimentu bylo opět obdobné jako tomu bylo u rostlin linií FLA. Rostliny byly předpěstovány na kontrolním médiu, ze kterého byly přesázeny po třech dnech svého růstu na média s variantami kultivace a také na kontrolní médium. Tento typ experimentu byl u linie tohoto proteinu prováděn dvakrát se stejným výsledkem uváděným dále. Signifikantně se mezi sebou lišily varianty kultivace (GLM ANOVA, $p < 0,05$), tak jako je to vidět na grafu 4.23, obecně ale nebyl patrný rozdíl mezi genotypy ($p > 0,05$). Pouze ve variantě obsahující 100mM NaCl se je přírůstek kořenů *at14a* mutantních rostlin vysoce signifikantně (T-Test, $p < 0,001$) větší oproti wt rostlinám.



Graf 4.23 - linie At14a-1

Krátkodobý přírůstek rostlin za 27 hodin. Rozdíl mezi variantami $p < 0,001$, rozdíl mezi genotypy $p > 0,05$ (GLM ANOVA, Tukey-Kramer Multiple Comparison test). * ukazuje

Shrnutí kultivačních experimentů – At14a

Linie At14a s inzercí v exonu

- Podle dosažených výsledků se dá konstatovat, že mutanti *at14a* jsou odolnější k vysoké koncentraci NaCl.

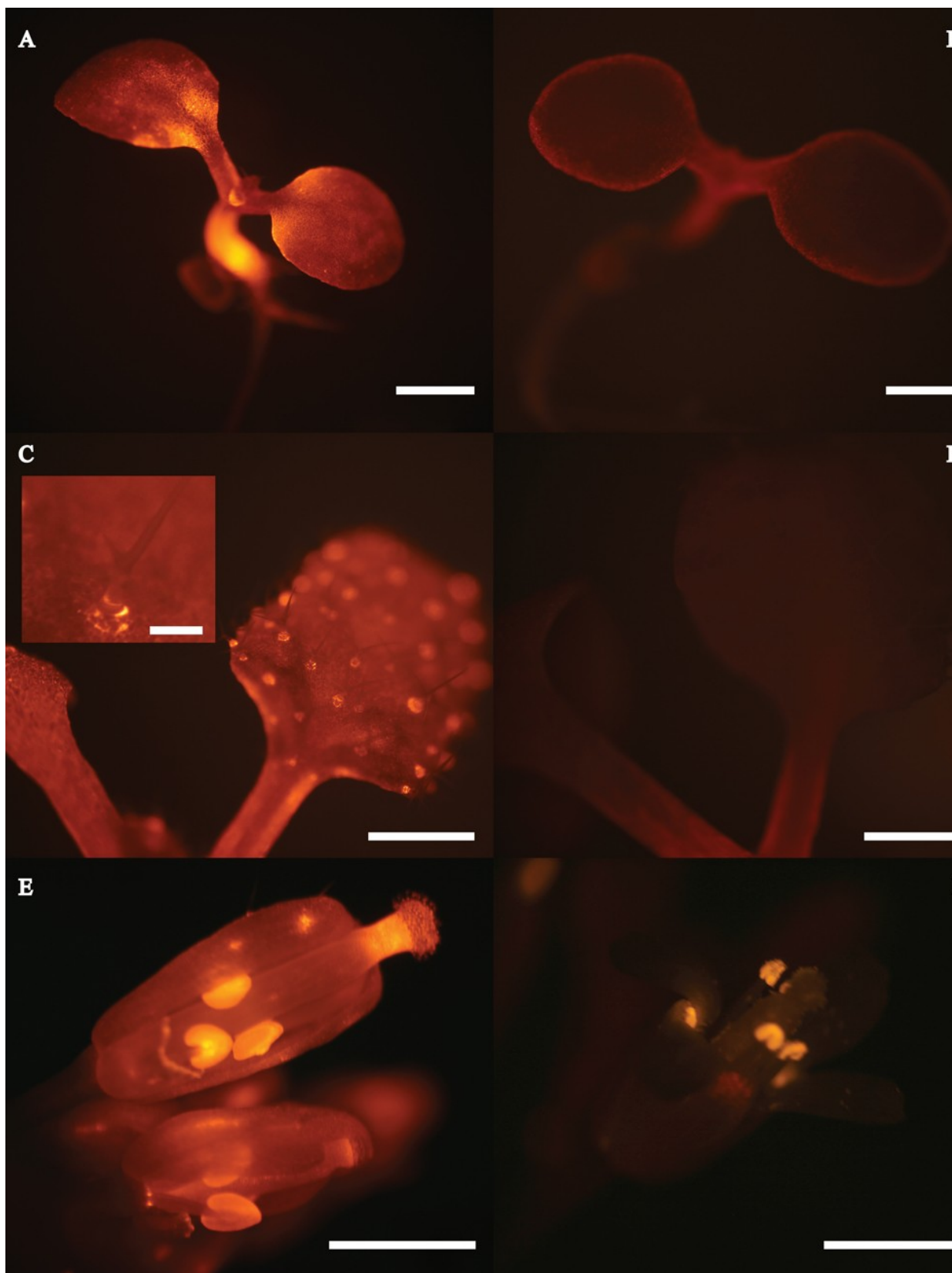
4.3 Lokalizace proteinu FLA9

V rámci experimentů byly vytvořeny translační fúze proteinu FLA9 s mCherry pod nativním promotorem (konstrukt *pFLA9:mCherry::FLA9*). Jak je uvedeno v metodice, fluorescenční protein mCherry byl vložen mezi signální sekvenci na N konci a oblast kódující sekvence tak, aby zůstal volný C-konec pro následné částečné zkrácení a navázání GPI kotvy, N-konec musel zůstat také volný pro správnou funkci signální sekvence (viz obr 3.2. v kapitole Metodika). Výsledný protein tedy nese mCherry na svém N konci a měl by být schopen se vázat GPI kotvou k plazmatické membráně podobně jako nativní protein FLA9. V rámci transformace byl tento konstrukt vnesen do rostlin *Arabidopsis* (ekotyp Col-0 i *rdr6* genotyp) a u obou typů rostlin došlo k selekci rostlin s vneseným vektorem pomocí rezistence vůči herbicidu BASTA. V obou případech bylo selektováno několik nezávisle transformovaných linií pro následné porovnání lokalizace. Transformované rostliny byly detailně pozorovány pro získání představy o lokalizaci proteinu FLA9:mCherry v rostlinách. Pozorování probíhalo makroskopicky pomocí binolupy a mikroskopicky za využití fluorescenčního a konfokálního mikroskopu.

Signál mCherry byl pozorován u *rdr6* i u Col-0; signál v *rdr6* byl o poznání výraznější, nebyl však v kořenech lokalizován do jiných oblastí oproti rostlinám Col-0 (viz dále). V obou případech se v intenzitě signálu (nikoli lokalizaci) lišily jednotlivé nezávisle transformované linie a pro pozorování byly vybrány linie s nejvýraznějším signálem a ty jsou také prezentované ve fotodokumentaci.

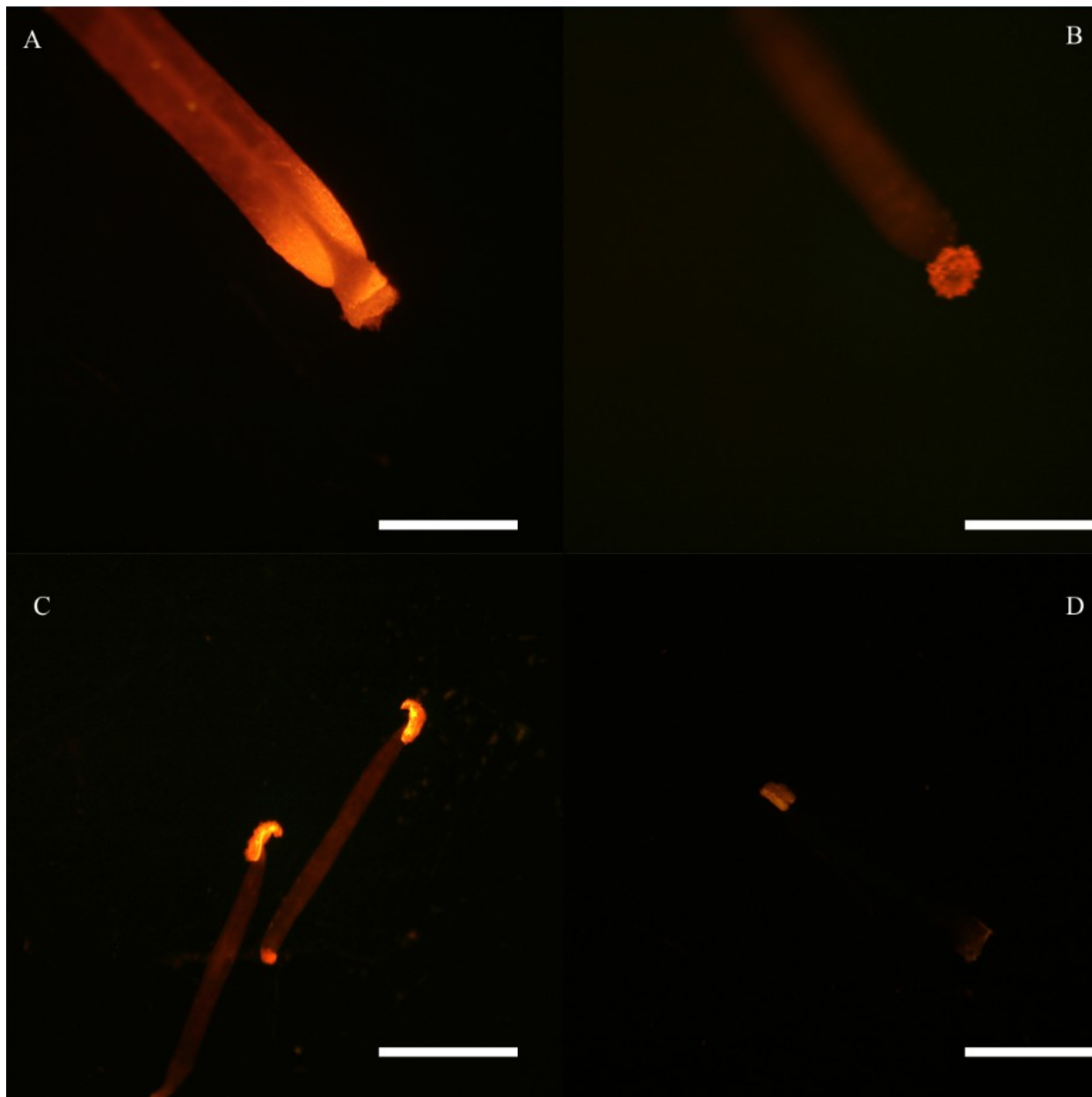
Lokalizace FLA9:mCherry v nadzemní části rostlin

Obr. 4.12 ukazuje lokalizaci FLA9:mCherry v nadzemních částech mladé *pFLA9:mCherry::FLA9 rdr6* rostliny *Arabidopsis thaliana* vždy s porovnáním s kontrolní rostlinou (*rdr6 Arabidopsis*), která nenesla fúzní protein. Výrazná lokalizace byla pozorovatelná v hypokotylu semenáčků, dále na děložním listu směrem k bázi a následně na diferencovaném listu vždy na bázi trichomů (viz detail na obr. 4.12C). Tento signál byl u dvou z pěti pozorovaných nezávisle transformovaných linií natolik výrazný, že byl pozorovatelný makroskopicky s využitím lupy a fluorescenčního osvětlení. U dalších linií byl slabší. Obr. 4.12E a 4.13 zobrazují signál v apikální části čnělky a tvořících se šesulích a v tyčinkách, kde signál nebyl tak výrazný, jako ve zmiňovaných šesulích. U *pFLA9:mCherry::FLA9 Col-0* rostlin *Arabidopsis* nebyl signál u několika pozorovaných rostlin s pomocí binolupy nalezen a bude třeba dalšího detailnějšího pozorování.



Obr. 4.12 – makroskopické pozorování lokalizace proteinu FLA9:mCherry v nadzemní části *pFLA9:mCherry::FLA9* transformované rostliny *rdr6 Arabidopsis*. Obrázek A ukazuje lokalizaci v mladé rostlině, obrázek B ukazuje kontrolní netransformovanou rostlinu *rdr6* – měřítko 2 mm; obrázek C a D ukazují starší listy a signál na bázi trichomů – měřítko 2 mm (detail trichomu v obr. C – měřítko 200 µm), obrázek E a F ukazuje lokalizaci proteinu v

generativních orgánech – měřítko 1 mm. A, C, E - *pFLA9:mCherry::FLA9* v *rdr6 Arabidopsis*; B, D, F – kontrolní netransformované *rdr6 Arabidopsis* pěstované za stejných podmínek. Snímáno s pomocí binolupy s fluorescencí, excitace zeleným světlem.



Obr. 4.13 – makroskopické pozorování lokalizace proteinu FLA9:mCherry v šišulích (A) a v tyčinkách (C) *pFLA9:mCherry::FLA9* transformované rostliny *rdr6 Arabidopsis*, měřítko 1,5 mm; Obrázek A a C – transformované rostliny, obrázek B a D kontrolní rostliny (*rdr6 Arabidopsis* pěstované za stejných podmínek). Snímáno s pomocí binolupy s fluorescencí, excitace zeleným světlem.

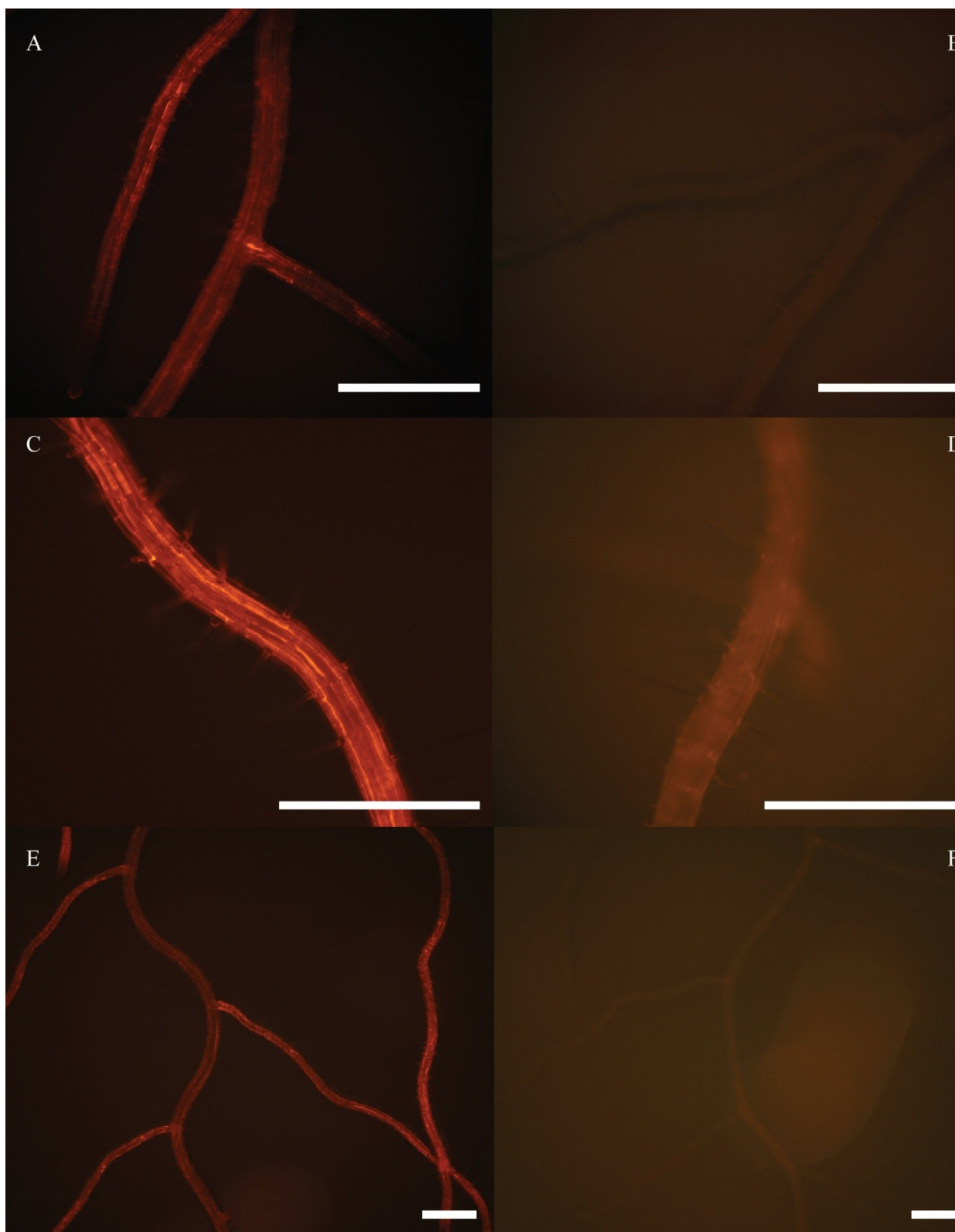
Lokalizace FLA9:mCherry v kořenovém systému rostlin

Na obrázku 4.14 je vidět jasný signál v kořenech *pFLA9:mCherry::FLA9 rdr6 Arabidopsis* pozorovatelný pomocí fluorescenční binolupy (obr. 4.14 A,C,E), naopak u snímaných obrázků kontrolní netransformované *rdr6* rostliny (obr. 4.14 B,D,F) bylo třeba lehce upravit fotografie tak, aby bylo vidět, že se ve snímaném obrázku opravdu nachází objekt, jelikož byly bez signálu, samotné fotografie by byly téměř černé.

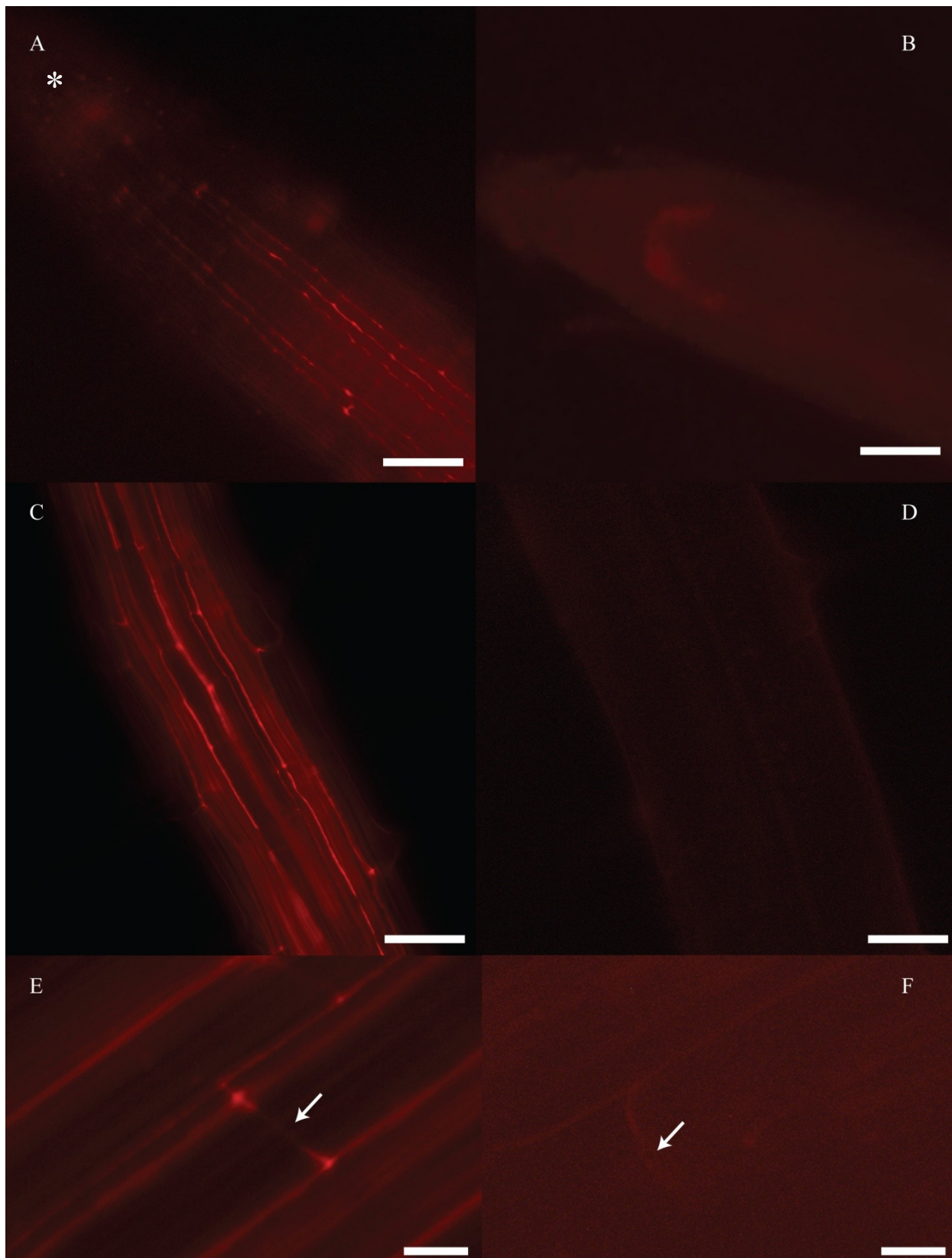
Signál fúzního proteinu byl patrný téměř po celé délce kořene vyjma oblasti apikální části kořene. Apikální část kořene svítila pouze v některých (zřejmě špatně rostoucích) kořenech, tento signál se nepotvrdil u všech zkoumaných kořenů a je možno jej přisuzovat zvýšené autofluorescenci buněčných stěn špatně rostoucích kořenů. V kořenech *pFLA9:mCherry::FLA9 Arabidopsis Col-0* nebylo až na výjimečné případy možno signál pomocí fluorescenční binolupy pozorovat, byl patrný pouze při mikroskopickém pozorování (viz dále).

Na obrázku 4.15 jsou nasnímány kořeny při mikroskopickém pozorování. U transformovaných byl jasný nezaměnitelný signál v buněčných stěnách buněk v oblasti primární kůry a nejvýrazněji v buňkách endodermis (obr. 4.15C), který byl v buňkách výrazně patrný již od elongační zóny kořene (obr. 4.15A). Tento signál byl dále přítomný po celé délce kořene. Na úrovni jednotlivých buněk byl patrný především ve vnějších a méně ve vnitřních tangenciálních stěnách, v menší míře v radiálních stěnách (zejména v rozích buněčných stěn sousedních buněk). Kde signál nebyl úplně zřejmý, tak to byla buněčná stěna pokožkových buněk. V endodermálních buňkách byla patrná téměř úplná absence signálu v radiálních stěnách v místě Casparyho proužku (viz detail Obr. 4.15E).

U *pFLA9:mCherry::FLA9* transformované *Col-0 Arabidopsis* bylo možné pozorovat stejný trend v lokalizaci fúzního proteinu především do oblasti primární kůry a částečně do středního válce, jak ukazuje obrázek 4.16. Na tomto obrázku jsou také vidět prorůstající primordia postranních kořenů, na čemž je zajímavý postupně se vytrácející signál právě v oblasti kolem prorůstajícího primordia (obr. 4.16C-E).

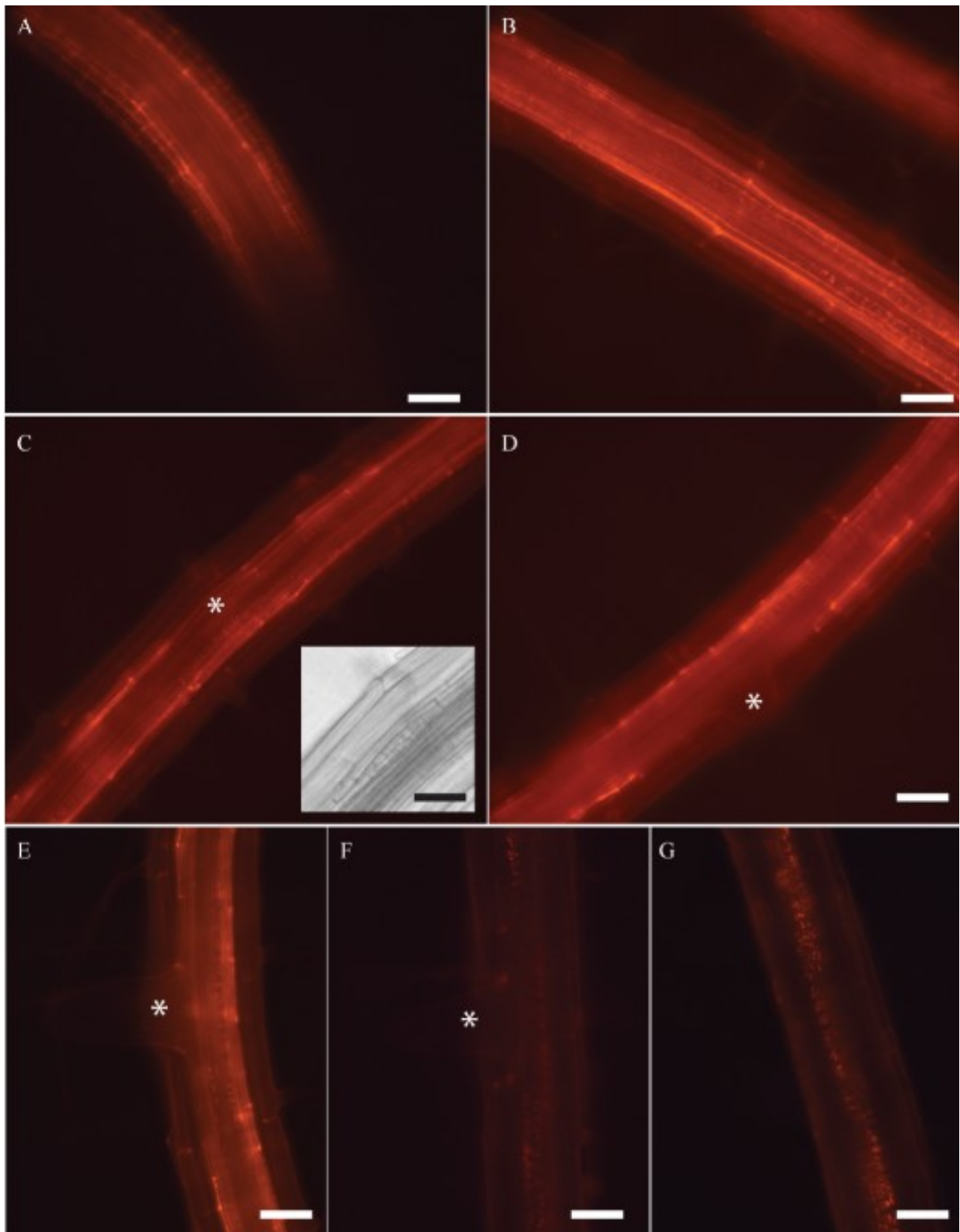


Obr. 4.14 – makroskopické pozorování lokalizace proteinu FLA9:mCherry v kořenech *pFLA9:mCherry::FLA9* transformované rostliny *rdr6 Arabidopsis* (A,C,E), měřítko ve všech snímcích 1mm. Obr. B,D,F – kontrolní netransformovaná *rdr6* rostlina. Snímáno s pomocí binolupy s fluorescencí, excitace zeleným světlem.



Obr. 4.15 – mikroskopické pozorování kořenů *pFLA9:mCherry::FLA9* transformovaných rostlin *rdr6 Arabidopsis* (A,C,E) a kontrolních netrasformovaných *rdr6* rostlin (B,D,F). A-D měřítko 50 μm , E-F 10 μm . Obr. A, B – apikální část kořene (* zobrazuje přibližnou polohu klidového centra mimo rovinu ostrosti), obr. C, D - hlavní osa kořene v místě mezi prvními primordií, obr. E, F – detail endodermální buňky (šipky ukazují pozici Casparyho proužku v radiální stěně endodermální buňky). Snímáno s pomocí mikroskopu s fluorescencí, excitace

zeleným světlem.

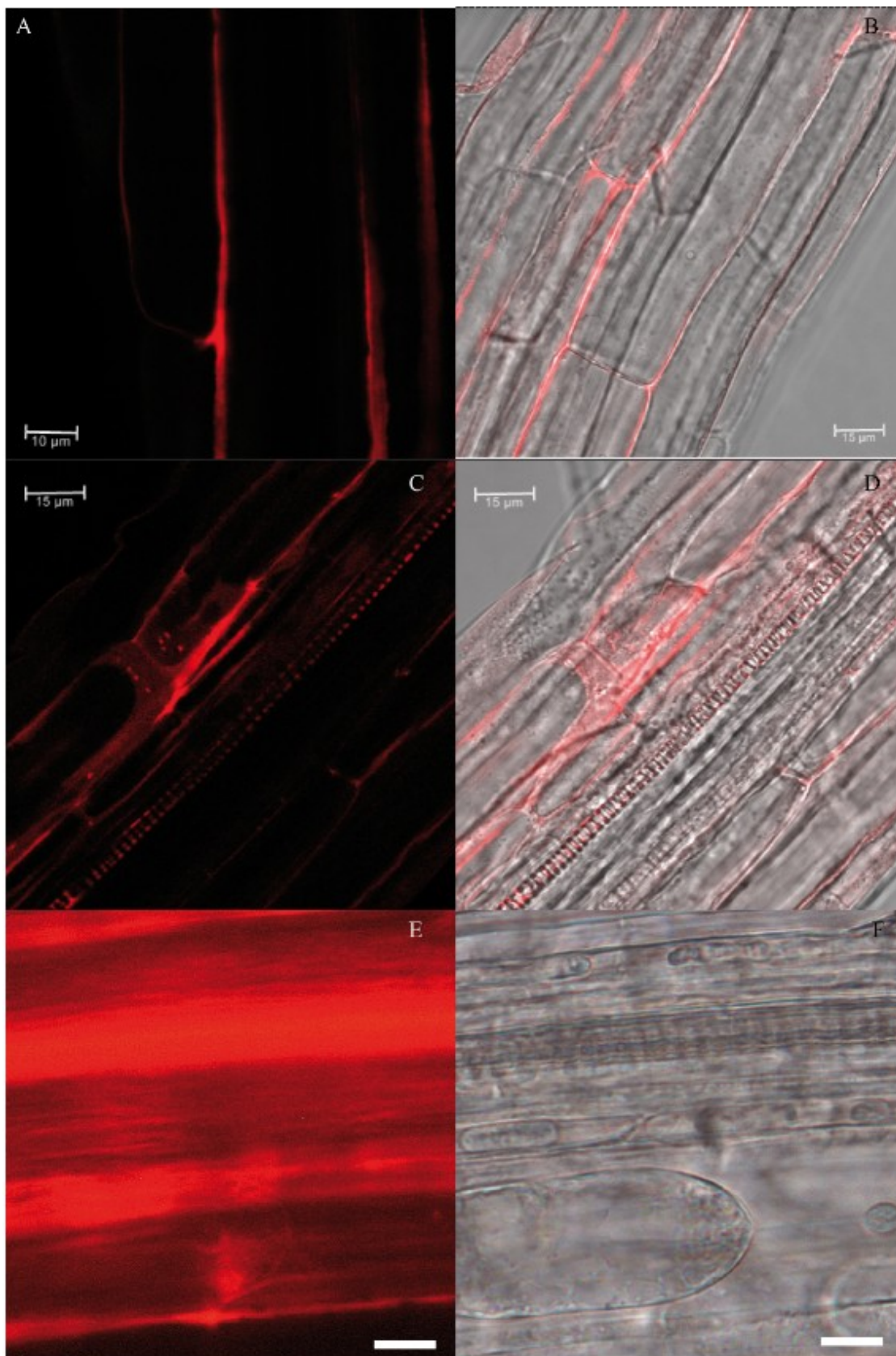


Obr. 4.16: mikroskopické pozorování kořenů *pFLA9:mCherry::FLA9* transformovaných rostlin *Arabidopsis Col-0* pro ověření stejné lokalizace proteinu FLA9:mCherry. Obrázky A a B dokumentují lokalizaci signálu ve špičce kořene (obr. A) a v hlavní ose kořene v oblasti mezi prvními primordii (obr. B). Obrázky C-E ukazují ztrátu signálu v oblasti prorůstajícího

primordia *pFLA9:mCherry::FLA9* rostlin *Arabidopsis* Col-0 (* ukazuje pozici primordia (C, D) nebo mladého postranního kořene (E)). Obrázky F a G jsou kontrolní netransformované rostliny Col0. Obr. F ukazuje oblast s mladým postranním kořenem (* ukazuje pozici mladého postranního kořene), obr. G oblast hlavní osy mezi prvními primordii. Měřítko 20 μ m. Snímáno s pomocí mikroskopu s fluorescencí, excitace zeleným světlem.

Transformované rostliny *pFLA9:mCherry::FLA9* byly také sledovány za pomoci konfokální mikroskopie pro detailnější sledování lokalizace fúzního proteinu. Jak je vidět v obrázku 4.17, tak bylo potvrzeno sledování předchozí, kdy nejvyšší signál byl v oblasti tangenciálních stěn a v oblasti radiálních stěn buněčných stěn byl pouze minimálně. Kromě tohoto byly sledovány navozené plazmolýzy kořenových buněk a následná lokalizace fúzního proteinu.

Po navození plazmolýzy byl nejvýraznější signál v oblasti apoplastu nikoliv na buněčných membránách. Sledování plazmolýz za pomoci konfokální mikroskopie předcházelo pozorování ve fluorescenčním mikroskopu s menším zvětšením, kde ale bylo výhodou rychlejší a snadnější manipulování se vzorkem a možnost okamžitého pozorování plazmolýz. Díky tomu bylo možné nasnímat (obr. 4.17E) plazmolyzující buňku, která má fluorescenční signál v oblasti plasmatické membrány, tento signál se ale velmi rychle vytrácí.



Obr. 4.17 – mikroskopické konfokální pozorování kořenů *pFLA9:mCherry::FLA9* transformovaných rostlin *Arabidopsis rdr6* se sledováním lokalizace v oblasti primární kůry a rhizodermis – obr. A a B, obrázek C a D ukazují plasmolýzu buněk a signál v oblasti buněčné stěny, obrázek E a F jsou snímány za pomoci fluorescenčního mikroskopu se sledováním okamžité plasmolýzy a lokalizace v oblasti plasmatické membrány

Shrnutí výsledků – lokalizace FLA9 v rostlině:

Linie *pFLA9:mCherry::FLA9* v Col0 i *rdr6*

- FLA9-mCherry je v kořenovém systému lokalizován především do oblasti endodermis a primární kůry a tento signál se začíná objevovat od elongační zóny kořene. Nejvíce patrný signál byl na tangenciálních stěnách buněk a pouze méně v radiálních stěnách. Ustupující signál byl vidět v oblasti kolem prorůstajících primordií.
- Kromě kořenového systému byl FLA9-mCherry lokalizován i v nadzemní části, především v listech na bázích trichomů, v hypokotylu a dále v generativních orgánech, konkrétně v blizně a čnělce.

Ostatní transkripční a translační fúze

- Pro linii FLA2 byly vytvořeny translační fúze, bohužel ale nebyly z časových důvodů dokončeny. Postup práce skončil u selekce transformovaných rostlin, které budou následně v rámci dizertační práce sledovány.
- Pro linii FLA9 byla vytvářena transkripční fúze s GUS, která byla ukončena ve fázi LR reakce, kde nebylo možné vyselektovat pozitivní kolonie.

5 Diskuze

5.1 Arabinogalaktanový protein FLA9

Růst kořenového systému *fla9* mutantů a lokalizace FLA9 v kořenech

Arabinogalaktanové proteiny, včetně podskupiny fasciclin-like arabinogalaktanů (FLA), hrají roli ve vývoji rostliny a její adaptaci na prostředí (He et al. 2019). Přes řadu studií, které se recentně objevují, funkce řady členů této skupiny nebyly dosud popsány. Mezi takové proteiny patří i FLA9 a FLA2. Vzhledem k tomu, že geny kódující tyto proteiny mají dle čipových dat (Genevestigator) relativně vysokou expresi v kořenech, a to především v oblasti primární kůry, jsou oba zajímavými kandidáty na proteiny zapojené v regulaci vývoje kořenového systému či jeho reakci na podmínky rhizosféry. Jejich role by mohla souviset s procesy odehrávajícími se v oblasti primární kůry, ať už je to signalizace na úrovni endodermis, klíčové apoplastické bariéry v kořenech, nebo signalizace během prorůstání primordií prostorem primární kůry či role v reakci kořenů na stresové faktory prostředí. Jediná práce zaměřená na FLA9 popisuje pouze sníženou tvorbu semen v podmínkách sucha u *Arabidopsis* i kukuřice se sníženou expresí *FLA9* (Cagnola et al. 2018), o kořenovém systému těchto rostlin není nic známo. Experimenty v této diplomové práci byly proto zaměřeny na růst kořenů *Arabidopsis* s pozměněnou expresí genu *FLA9*. V rámci kultivací byly používány tři inzerční linie v genu *FLA9* – dvě s inzercí v promotorové oblasti (FLA9-1 a FLA9-2) a jedna s inzercí v UTR oblasti (FLA9-3). Se dvěma z těchto tří linií již pracovali Cagnola a spoluautoři (2018) a zjistili, že rostliny *fla9-1* mají přibližně 10x zvýšenou expresi oproti wt, zatímco *fla9-3* mají expresi výrazně sníženou. Právě rostliny *fla9-3* se sníženou expresí měly v mých experimentech výrazný signifikantní fenotypový projev v nejen oblasti kořenového systému.

Dle mých výsledků byly mutantní rostliny *fla9-1* odolnější k dlouhodobému působení manitolu v průběhu růstu kořenového systému, což také odpovídá výsledkům již zmíněné práce, na druhou stranu tyto rostliny nevykazovaly vyšší odolnost k salinitě nebo k médiu obsahujícím vyšší množství agaru. Zřetelně zhoršený růst kořenového systému byl pozorovaný u mutantu *fla9-3*, a to jak v celkové délce kořenového systému a celkové délce postranních kořenů, tak v počtu postranních kořenů. Mutantní rostlina *fla9-2* vykazovala lepší růst na kontrolní variantě než wt a to jak v krátkodobém, tak v dlouhodobém růstu. Vzhledem k inzercí v promotorové oblasti (v pozici velmi blízko jako u linie FLA9-1) se dá usuzovat, že tato linie bude mít také zvýšenou expresi, čemuž by odpovídaly některé varianty kultivace, na

druhou stranu na jiných variantách kultivace se tento vyšší trend růstu neprojevil a pro další zkoumání bude potřeba provést kvantitativní hodnocení exprese (Real-time PCR), a to nejen u této linie, ale u všech zkoumaných linií FLA9.

Dle statistiky byly narostlé postranní kořeny *fla9-3* signifikantně kratší než postranní kořeny divokého typu (měly výrazně menší celkovou délku), tento projev byl způsoben menším počtem nikoliv menší průměrnou délkou kořenů. Průměrné délky *fla9-3* rostlin byly signifikantně delší. Změny v počtu a celkové délce postranních kořenů vedou k otázce, čím mohou být způsobeny – zdali se jedná o chybu v zakládání postranních kořenů, o problematické prorůstání primordií hlavním kořenem, o špatnou elongaci postranních kořenů po vynoření z mateřského kořene, a to buď na úrovni elongace jednotlivých buněk, nebo na úrovni dělení buněk meristému prorůstajícího kořene. Vzhledem k tomu, že mezi AGP byly nalezeny proteiny, které jsou důležité pro elongaci buněk (Van Hengel and Roberts 2002; Willats and Knox 1996), tak bychom neměli vyloučit i tuto možnost v případě FLA9. Prozatím nebyly zaznamenány žádné FLA proteiny účastníci vývoje meristému, neznamená to, že by se tento protein nemohl této dráhy účastnit.

Vzhledem k faktu, že u mutanta *fla9-3* jsem zaznamenala spíše vyšší průměrnou délku jednotlivého postranního kořene (nižší byla v mých kultivačních experimentech celková délka postranních kořenů a jejich počet), předpokládala bych spíše problémy na úrovni vzniku primordia nebo jeho prorůstání primární kůrou kořene, nikoli problémy v elongaci již vytvořeného prorostlého postranního kořene. Ta se naopak jeví rychlejší oproti rostlinám divokého typu, proto je vhodné do budoucna zjistit stav kořenů na mikroskopické úrovni, jestli nemůže být ovlivněna právě elongace na úrovni buňky. Velkým přínosem v tomto směru bude i dokončení GUS transkripční fúze pro sledování transkripce na úrovni kořenového systému. Dle výsledků lokalizace je FLA9 především v endodermálních buňkách a v oblasti primární kůry. Signál se v kořenech začíná objevovat od oblasti elongační zóny a tato data korelují s expresí podle čipových dat, která ukazují expresi především v oblasti elongační zóny. To by mohlo poukazovat na možnou roli FLA9 v růstu buňky, či utváření buněčné stěny, podobně jako u některých dalších FLA proteinů. Např. mutant *sos5/fla4* má při stresových podmínkách pozměněnou buněčnou stěnu, což naznačuje účast tohoto FLA proteinu na expanzi buněk (Shi et al. 2003). Také FLA1 se nejspíše účastní expanze buněk mladého postranního kořene (Johnson et al. 2011), z čehož se dá usuzovat, že by se i další FLA (jako mnou zkoumaný FLA9) proteiny mohly zapojovat do regulace růstu buněk. Dle Camacho-Cristobal a spoluautorů (2008) se snižuje exprese *FLA9* při deficienci bóru, který je

důležitý pro strukturu buněčné stěny a kromě toho tento gen také patří mezi upregulované geny v hypokotylu po přenesení do tmy, kdy se také upreguluje pektimethylesteráza a dochází k nastartování rychlého růstu hypokotylu.

Možností, jak vysvětlit pozorovaný fenotyp nižšího počtu postranních kořenů *fla9-3* mutantů, jsou problémy s prorůstáním primordií primární kůrou kořene. Na základě této domněnky byl v pilotním experimentu zkoumán výskyt „neaktivních“ primordií u *fla9-3* mutantů, tedy primordií, která se sice založila, ale neprorostla mateřským kořenem na povrch a na podélné ose kořene jsou lokalizována směrem k bázi kořene za nejmladším již prorostlým postranním kořenem. Na základě tohoto pozorování bylo zjištěno, že v některých variantách kultivace dochází k problému s vývojem primordií, možná právě s jejich prorůstáním hlavním kořenem (byl nalezen větší počet těch neaktivních), a tím ke snížení počtu postranních kořenů na úrovni kořenového systému. Daná primordia jsme byli schopni pozorovat na mikroskopické úrovni ve stádiu několika málo buněk neprorůstajících endodermis. Toto pozorování je ale potřeba ověřit na větším souboru rostlin a dosavadní výsledky nejsou v práci zahrnuty.

Vzhledem k pozorovaným buňkám zakládajícího se primordia je tedy menší pravděpodobnost, že bude FLA9 ovlivňovat zakládání primordia, spíše bude ovlivňovat jeho prorůstání hlavním kořenem. Chybné prorůstání může být ovlivněno mnoha faktory, z nichž se naskytá jako možná chyba v signalizaci v buněčné stěně v buňkách primární kůry při jejím rozvolňování právě při prorůstání primordií. Rozvolňování buněčné stěny kortikálních buněk je značně koordinovaný buněčný proces, na kterém se podílí velké množství enzymů, mezi nimiž jsou hydrolázy a endoglukanázy (Quiroz-Castañeda and Folch-Mallol 2011). Narušení koordinace tohoto procesu pak může negativně ovlivnit úspěšnost vnošení. Role FLA9 v tomto procesu není vyloučena. Velmi zajímavým výsledkem je v tomto směru pozorování lokalizace FLA9-mCherry proteinu u rostlin Col0, kdy při prorůstání postranního kořene dochází k vytrácení signálu v přilehlých buňkách primární kůry kolem tvořícího se primordia, což může ovlivňovat signální dráhy a remodelaci buněčné stěny v těchto buňkách. Již starší experimenty dokazují, že se AGP podílí na elongaci buněk, a proto nemůžeme vyloučit i účast FLA9 na tomto procesu (McCartney et al. 2003).

Při experimentech provádějících plazmolýzu kořenových buněk jsem byla schopna na několika buňkách pozorovat slabý membránový signál, který se záhy po aplikaci KNO₃ – vedoucí k plazmolýze – vytrácel a byl vidět pouze v prostoru apoplastu, což naznačuje, že by se FLA9 mohl účastnit interakcí na plasmatické membráně, ke které je kotven GPI kotvou. Tato kotva je ale nejspíše slabá pro udržení proteinu v membráně při procesu rychlé

plazmolýzy. Podobný jev byl pozorován také u publikovaných experimentů nejen s FLA, kdy proteiny kotvené GPI kotvou vykazují signál částečně v membráně, ale ve velké míře v oblasti apoplastu, což naznačuje odpojení daného proteinu od GPI kotvy, která zůstává v membráně a fúzní protein je lokalizován mimo protoplast (Li et al. 2010; Xue et al. 2017). Na základě výsledků svých i publikovaných předpokládám, že FLA proteiny se nebudou přímo účastnit adheze mezi plazmatickou membránou a buněčnou stěnou právě z důvodu nedostatečného udržení se v membráně za stresových situací jako je právě plazmolýza.

Role FLA9 v generativních orgánech

V průběhu práce s transformovanými rostlinami *Arabidopsis* byla velká část věnována kořenovému systému, ale pro úplný obrázek o lokalizaci a funkci proteinu FLA9 byly sledovány také generativní orgány, kde byly zjištěny fenotypové rozdíly oproti divokému typu především na blizně, kde byly některé papily značně delší, než je tomu u wt. U FLA9-mCherry transformovaných rostlin byl sice signál v oblasti blizny poměrně malý, ale značný byl v oblasti čnělky ihned za bliznou. V kontextu s opakovaným nezdařeným křížením do mutantní rostliny se dá předpokládat, že FLA9 ovlivňuje samičí generativní orgány. Vzhledem k úspěšnému nakřížení do divokého typu Columbia se dá předpokládat hlavní problém v samičích orgánech spíše než v narušení tvorby pylu nebo pylové láčky tak, jako je tomu například u *fla3* *mutanta*, u kterého byla zjištěna narušená dráha správné tvorby pylu a také jeho intiny (Li et al. 2010). U získávání nových semen z dané mutantní linie docházelo také k velkým problémům, jelikož semena se tvořila jen zřídka – šešule byly často malé a prázdné nebo se vůbec nevytvořily. Nejvíce byla tvorba semen ovlivněna po expozici stresem sucha, kdy nebyla vytvořena žádná semena. Podobný trend byl vyzorován i v již zmíněné publikaci Cagnola et al. 2018, kde byla sledována mimo jiné neoplozená semena. Zajímavým se s tím ukázalo, že u mutantní rostliny dochází k redukci exprese genů ARABIDOPSIS THALIANA PEROXIDASE 2 a CHLOROPHYLL A/B-BINDING PROTEIN 2, které se účastní vývoje semen.

Z výše zmíněného v mém experimentu vyplývá problém na úrovni blizny, kde přichází v úvahu problém v signalizaci zachycení pylu na bliznu nebo problém v prorůstání pylové láčky čnělkou, což se zdá jako odpovídající hypotéza na základě lokalizace daného proteinu ve čnělce a velmi malému množství vytvořených semen. Podobně také *sos5/fla4* vykazuje sníženou schopnost tvorby semen, což ho činí důležitým pro reprodukci (Shi et al. 2003).

Tento gen není jediným genem z rodiny genů *AGP*, například *AGP18* se účastní gametogeneze u *Arabidopsis*, stejně tak důležité jsou proteiny AGP22 a AGP24 pro tvorbu megaspor. *AGP1* je exprimován v blizně (Pereira 2015). Z těchto několika příkladů je zřejmé, že AGP se účastní více či méně reprodukce a tím není vyloučeno, že i FLA9 by se mohl účastnit některých z důležitých procesů reprodukce jako například prorůstání pylové láčky čnělkou, což se zdá být nasnadě vzhledem k lokalizaci fúzního proteinu.

5.2 Arabinogalaktanový protein FLA2

Čipová data (Genevestigator) naznačují, že *FLA2* má podobně jako *FLA9* zřetelnou expresi v kořenovém systému především v primární kůře a jeho funkce je zatím neznámá. Vzhledem k početnosti AGP rodiny i samotné podrodiny FLA je častým problémem možná redundance ve funkci těchto proteinů a fenotypový projev mutace se objevuje až u vícenásobných mutantů (MacMillan et al. 2010; Seifert, Xue, and Acet 2014). Tyto dva důvody vedly k zařazení *FLA2* do experimentů, přestože nepatří do stejného klastru v rámci FLA rodiny a obsahuje na rozdíl od *FLA9* dvě fasciclin-like (FAS) domény, nikoli jednu (MacMillan et al. 2010). V případě *FLA2* je k dispozici linie s inzercí v exonu genu, což situaci zjednodušilo (*FLA9* ani *FLA2* nemají introny). Na základě pozorování růstu kořenů na více variantách kultivací se nicméně nedá zřetelně odlišit fenotypový rozdíl mezi divokým typem a mutantem této linie, dá se tedy předpokládat, že díky této rozsáhlé rodině genů dochází minimálně k částečné redundanci mezi příbuznými geny, a proto zde není zjištěn signifikantní rozdíl. Dalším důvodem může být, že použité podmínky kultivace a použitá úroveň hodnocení (pouze makroskopické hodnocení růstu kořenů) nebylo dostatečné pro odhalení případného mírnějšího fenotypu.

Fla2 mutantní rostlina byla také křížena s *fla9-3* mutantní rostlinou za vzniku dvojitého mutantu, u kterého byla rovněž prováděna makroskopická kořenová analýza, kde byl zjištěn signifikantní rozdíl mezi mutantem a divokým typem rostliny, celkový projev ale odpovídal mutantní rostlině *fla9-3* a neprokázal se žádný vliv samotné *FLA2*. Tyto výsledky naznačují, že *FLA9* je pro růst a vývoj kořenového systému důležitější než *FLA2*.

5.3 Role FLA9 a FLA2 v reakci kořenů na salinitu a další stresové faktory

Na základě charakterizovaných výsledků *FLA4/sos5* byly do experimentů zařazeny stresové faktory jako je salinita. Jak již bylo zmíněno, *sos5* mutantní rostliny reagují na salinitu změnou svého fenotypu (Harpaz-Saad et al. 2011), a proto byly sledovány rostliny *fla9* a *fla2* zdali také vykazují nějaký fenotypový projev. Z důvodu špatné kultivace nebylo možné

dokončit analýzu linie FLA2 při ošetření NaCl, avšak na médiu obsahující zvýšené množství agaru nevykazovaly signifikantní rozdíl. Linie FLA9 taktéž nereagovaly nějakým specifickým projevem růstu, došlo pouze k jeho snížení či zvýšení. Žádná z vybraných variant kultivace nedokázala ovlivnit růst, což může být způsobeno špatnou koncentrací látek navozujících stresové podmínky a nenalezení vhodných látek pro zjištění fenotypového projevu.

5.4 Fenotypová analýza At14a

Integriny v živočišné říši patří mezi rozsáhlou důležitou skupinu genů, které mají funkci v adhezi mezi buňkami, a proto se předpokládá, že by mohly mít podobnou funkci i u rostlin. Nalezený protein At14a byl doposud ve všech publikacích pozorován pouze v buněčných kulturách *Arabidopsis* nebo tabáku, prozatím nebyl nikde popsán na úrovni celé rostliny, kde je určitá pravděpodobnost odlišného chování oproti jednotlivým buňkám v suspenzi. Pro zjištění fenotypové analýzy byly provedeny fenotypové analýzy růstu na několika kultivačních médiích pro zhodnocení kořenového systému mutantních rostlin *at14a* stejné linie, jako byly využívány v experimentech publikovaných prací. Pro porovnání s jednobuněčnými kulturami byly také použity obdobné stresové podmínky – tedy byl přidáván chlorid sodný ve více koncentracích do kultivačního média. Signifikantní rozdíl se ukázal u vyšší koncentrace NaCl (100mM NaCl) kde se mutantní rostlina zdála i přes snížený růst kořenů odolnější než kontrolní rostlina, což ale nekoresponduje s výsledky publikovaných prací, kde se buňky s mutací zdály náchylnější ke stresovým podmínkám. Jednalo se o jednotlivé buňky, ne o celistvý organismus, což mohlo značně ovlivnit vzorec projevu. Buňky mutantní linie byly náchylnější k plazmolýze (B. Lü et al. 2007; Bing Lü, Wang, and Zhang 2012)

6 Závěr

Ve své diplomové práci jsem byla schopna lokalizovat protein FLA9, který nebyl prozatím charakterizován. Podařilo se mi vysledovat rozdílný projev růstu u divokého typu a mutantní rostliny *fla9-3*. Tento rozdílný projev růstu spočívající v menším kořenovém systému otevřel diskuzi o tom, na základě čehož dochází ke změnám růstu dané linie, a proto byly sledovány postranní kořeny, kterých je menší počet, ale překvapivě mají větší průměrnou délku, jejich elongace tedy není negativně narušena. Snížený počet postranních kořenů by mohl souviset se sníženým množstvím prorůstajících primordií, uvažované na základě změny lokalizace fúzního proteinu v buňkách obklopující prorůstající primordium (především

v endodermálních buňkách). Mohl by mít tedy regulační funkci v tomto procesu, na což by bylo zajímavé cílit v dalších experimentech.

Na základě získaných výsledků je nutné konstatovat, že vybrané FLA proteiny se s největší pravděpodobností nebudou účastnit přímé adheze mezi plasmatickou membránou a buněčnou stěnou, spíše budou hrát roli v signálních drahách na pomezí těchto kompartmentů. I přestože jsou dost možná lokalizovány na plasmatické membráně, tak GPI kotva nebude dostatečná pro udržení těchto velkých sacharidových proteinů na membráně při plazmolýze.

7 Seznam použité literatury

- Ausubel, Frederick M. 2004. 171 Analytical Biochemistry *Current Protocols in Molecular Biology*.
- Barczyk, Malgorzata, and Sergio Carracedo. 2010. “Integrins.” *Cell Tissue Research* 339: 269–80.
- Bastiani, Michael J., Allan L. Harrelson, Peter M. Snow, and Corey S. Goodman. 1987. “Expression of Fasciclin I and II Glycoproteins on Subsets of Axon Pathways during Neuronal Development in the Grasshopper.” *Cell*.
- Boccaro, Martine et al. 2014. “The Arabidopsis MiR472-RDR6 Silencing Pathway Modulates PAMP- and Effector-Triggered Immunity through the Post-Transcriptional Control of Disease Resistance Genes.” *PLoS Pathogens* 10(1).
- Buer, C S, P J Weathers, and G a Swartzlander. 2000. “Changes in Hechtian Strands in Cold-Hardened Cells Measured by Optical Microsurgery.” *Plant Physiology* 122(4): 1365–77.
- Bundy, Mark G.R. et al. 2016. “A Mutation in the Catalytic Subunit of the Glycosylphosphatidylinositol Transamidase Disrupts Growth, Fertility and Stomata Formation in Arabidopsis.” *Plant Physiology* 171(June): pp.00339.2016.
- Bütikofer, Peter, and Urs Brodbeck. 1993. “Partial Purification and Characterization of a (Glycosyl) Inositol Phospholipid-Specific Phospholipase C from Peanut.” *Journal of Biological Chemistry* 268(24): 17794–802.
- Cagnola, Juan Ignacio et al. 2018. “Reduced Expression of Selected FASCICLIN-LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN Genes Associates with the Abortion of Kernels in Field Crops of Zea Mays (Maize) and of Arabidopsis Seeds.” *Plant Cell and Environment*.
- Camacho-Cristobal, Juan J et al. 2008. “The Expression of Several Cell Wall-Related Genes in Arabidopsis Roots Is down-Regulated under Boron Deficiency.” *Environmental and Experimental Botany* 63: 351–58.
- Canut, Hervé et al. 1998. “High Affinity RGD-Binding Sites at the Plasma Membrane of Arabidopsis Thaliana Links the Cell Wall.” *Plant Journal* 16(1): 63–71.
- Cheung, A. Y., C. Li, Y.-j. Zou, and H.-M. Wu. 2014. “Glycosylphosphatidylinositol

- Anchoring: Control through Modification.” *Plant Physiology* 166(2): 748–50.
- Coppinger, Peter et al. 2004. “Overexpression of the Plasma Membrane-Localized NDR1 Protein Results in Enhanced Bacterial Disease Resistance in Arabidopsis Thaliana.” *Plant Journal* 40(2): 225–37.
- Desprez, Thierry et al. 2007. “Organization of Cellulose Synthase Complexes Involved in Primary Cell Wall Synthesis in Arabidopsis Thaliana.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104(39): 15572–77.
- Dhar, Nikhilesh et al. 2019. “Arabidopsis Defense Mutant Ndr1-1 Displays Accelerated Development and Early Flowering Mediated by the Hormone Gibberellic Acid.” *Plant Science* 285: 200–213.
- Edwards, K, C Johnstone, and C Thompson. 1991. “A Simple and Rapid Method for the Preparation of Plant Genomic DNA for PCR Analysis.” *Nucleic Acids Research* 19(6): 1349.
- Elkins, Thomas et al. 1990. “Drosophila Fasciclin I Is a Novel Homophilic Adhesion Molecule That along with Fasciclin III Can Mediate Cell Sorting.” *Journal of Cell Biology* 110(5): 1825–32.
- Ellis, Miriam, Jack Egelund, Carolyn J Schultz, and Antony Bacic. 2010. “Arabinogalactan-Proteins (AGPs): Key Regulators at the Cell Surface?” *Plant Physiology* 153(June): 403–19.
- Enstone, Daryl E, and Carol A Peterson. 1997. “Suberin Deposition and Band Plasmolysis in the Corn.” *Canadian Journal of Botany* 75(1968): 1188–99.
- Gaspar, Yolanda et al. 2001. “The Complex Structures of Arabinogalactan-Proteins and the Journey towards Understanding Function.” *Plant Molecular Biology* 47: 2–5.
- Gaspar, Yolanda M et al. 2004. “Characterization of the Arabidopsis Lysine-Rich That Results in a Decreased Efficiency of Agrobacterium Transformation.” *Plant Physiology* 135(August): 2162–71.
- Harpaz-Saad, Smadar et al. 2011. “Cellulose Synthesis via the FEI2 RLK/SOS5 Pathway and CELLULOSE SYNTHASE 5 Is Required for the Structure of Seed Coat Mucilage in Arabidopsis.” *Plant Journal* 68(6): 941–53.

- He, Jiadai et al. 2019. “Evolution Analysis of the Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins in Plants Shows Variable Fasciclin-AGP Domain Constitutions.” *International Journal of Molecular Sciences* 20(8): 1945.
- Van Hengel, Arjon J., and Keith Roberts. 2002. “Fucosylated Arabinogalactan-Proteins Are Required for Full Root Cell Elongation in Arabidopsis.” *Plant Journal* 32(1): 105–13.
- . 2003. “AtAGP30, an Arabinogalactan-Protein in the Cell Walls of the Primary Root, Plays a Role in Root Regeneration and Seed Germination.” *Plant Journal* 36(2): 256–70.
- Huang, G.-Q. et al. 2013. “A Fasciclin-Like Arabinogalactan Protein, GhFLA1, Is Involved in Fiber Initiation and Elongation of Cotton.” *Plant Physiology* 161(3): 1278–90.
- Ito, Shinsaku et al. 2005. “AtFLA11, a Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein, Specifically Localized in Sclerenchyma Cells.” *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 69(10): 1963–69.
- Johnson, Kim L, Brian J Jones, Antony Bacic, and Carolyn J Schultz. 2003. “The Fasciclin-Like Arabinogalactan Proteins of Arabidopsis . A Multigene Family of Putative Cell Adhesion Molecules.” *Plant Physiology* 133(December): 1911–25.
- Johnson, Kim L, Natalie A J Kibble, Antony Bacic, and Carolyn J Schultz. 2011. “A Fasciclin-Like Arabinogalactan-Protein (FLA) Mutant of Arabidopsis Thaliana , Fla1 , Shows Defects in Shoot Regeneration.” *PLoS ONE* 6(9): 1–11.
- Kawamoto, Takeshi et al. 1998. “Structural and Phylogenetic Analyses of RGD-CAP/Big-H3, a Fasciclin- like Adhesion Protein Expressed in Chick Chondrocytes.” *Biochimica et Biophysica Acta - Gene Structure and Expression*.
- Kohorn, Bruce D, and Susan L Kohorn. 2012. “The Cell Wall-Associated Kinases , WAKs , as Pectin Receptors.” *Frontiers in Plant Science* 3(May): 1–5.
- Kumar, M Nagaraj, Yi-Fang Hsieh, and Paul E Verslues. 2015. “At14a-Like1 Participates in Membrane-Associated Mechanisms Promoting Growth during Drought in Arabidopsis Thaliana.” *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112(33): 10545–50.
- Lalanne, Eric et al. 2004. “ SETH1 and SETH2 , Two Components of the Glycosylphosphatidylinositol Anchor Biosynthetic Pathway, Are Required for Pollen Germination and Tube Growth in Arabidopsis .” *The Plant Cell* 16(1): 229–40.

- Lang, I., D. A. Barton, and R. L. Overall. 2004. "Membrane-Wall Attachments in Plasmolysed Plant Cells." *Protoplasma* 224(3–4): 231–43.
- Lang, Ingeborg, Stefan Sassmann, Brigitte Schmidt, and George Komis. 2014. "Plasmolysis: Loss of Turgor and Beyond." *Plants* 3(4): 583–93.
- Langhans, Markus et al. 2017. "The Right Motifs for Plant Cell Adhesion : What Makes an Adhesive Site?" *Protoplasma* 254: 95–108.
- Lee, Jinsu et al. 2018. "Plant Physiology and Biochemistry Genome-Wide Transcriptomic Analysis of BR-de Ficient Micro-Tom Reveals Correlations between Drought Stress Tolerance and Brassinosteroid Signaling in Tomato." *Plant Physiology and Biochemistry* 127(April): 553–60.
- Li, Jun, Miao Yu, Ling Ling Geng, and Jie Zhao. 2010. "The Fasciclin-like Arabinogalactan Protein Gene, FLA3, Is Involved in Microspore Development of Arabidopsis." *Plant Journal* 64(3): 482–97.
- Liu, Zengyu, Staffan Persson, and Clara Sánchez-Rodríguez. 2015. "At the Border: The Plasma Membrane-Cell Wall Continuum." *Journal of Experimental Botany* 66(6): 1553–63.
- Lü, B. et al. 2007. "Intracellular Localization of Integrin-like Protein and Its Roles in Osmotic Stress-Induced Abscisic Acid Biosynthesis in Zea Mays." *Protoplasma* 232(1–2): 35–43.
- Lü, Bing, Juan Wang, and Yu Zhang. 2012. "AT14A Mediates the Cell Wall–Plasma Membrane–Cytoskeleton Continuum in Arabidopsis Thaliana Cells." *Journal of Experimental Botany* 63(2): 695–709.
- MacMillan, Colleen P et al. 2010. "Fasciclin-like Arabinogalactan Proteins : Specialization for Stem Biomechanics and Cell Wall Architecture in Arabidopsis and Eucalyptus." *The Plant Journal* 62: 689–703.
- Martinie, Alexandre et al. 2011. "Building Bridges : Formin1 of Arabidopsis Forms a Connection between the Cell Wall and the Actin Cytoskeleton." *The Plant Journal* 66: 354–65.
- McCartney, Lesley, Clare G. Steele-King, Emillie Jordan, and J. Paul Knox. 2003. "Cell Wall Pectic (1→4)-β-D-Galactan Marks the Acceleration of Cell Elongation in the Arabidopsis Seedling Root Meristem." *Plant Journal* 33(3): 447–54.

- McNeece, Brant T. et al. 2017. "A Glycine Max Homolog of NON-RACE SPECIFIC DISEASE RESISTANCE 1 (NDR1) Alters Defense Gene Expression While Functioning during a Resistance Response to Different Root Pathogens in Different Genetic Backgrounds." *Plant Physiology and Biochemistry* 114: 60–71.
- Murray, M. G., and W. F. Thompson. 1980. "Rapid Isolation of High Molecular Weight Plant DNA." *Nucleic Acids Research* 8(19): 4321–26.
- Nagpal, P., and R. S. Quatrano. 1999. "Isolation and Characterization of a CDNA Clone from Arabidopsis Thaliana with Partial Sequence Similarity to Integrins." *Gene* 230(1): 33–40.
- Nguema-ona, Eric, Maïte Vicré-Gibouin, Marc-antoine Cannesan, and Azeddine Driouich. 2013. "Arabinogalactan Proteins in Root – Microbe Interactions." *Trends in Plant Science* 18(8): 440–49.
- Pankov, R. 2002. "Fibronectin at a Glance." *Journal of Cell Science* 115(20): 3861–63.
- Pereira, Ana Marta. 2015. "Arabinogalactan Proteins : Rising Attention from Plant Biologists." *Plant Reproduction* 28(March): 1–15.
- Quiroz-Castañeda, Rosa E., and Jorge L. Folch-Mallol. 2011. "Plant Cell Wall Degrading and Remodeling Proteins: Current Perspectives." *Biotechnologia Aplicada* 28(4): 194–215.
- Roppolo, Daniele et al. 2011. "A Novel Protein Family Mediates Casparian Strip Formation in the Endodermis." *Nature* 473(7347): 380–83.
- Ruoslahti, Erkki. 1996. "RGD and Other Recognition Sequences for Integrins." *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 12(1): 697–715.
- Schultz, Carolyn et al. 1998a. "GPI-Anchors on Arabinogalactan- Proteins: Implications for Signalling in Plants." *Trends in Plant Science* 3(11): 426–30.
- . 1998b. "GPI-Anchors on Arabinogalactan-Proteins: Implications for Signalling in Plants." *Trends in Plant Science*.
- Seifert, Georg J. 2018. "Fascinating Fasciclins: A Surprisingly Widespread Family of Proteins That Mediate Interactions between the Cell Exterior and the Cell Surface." *International Journal of Molecular Sciences* 1.
- Seifert, Georg J, Hui Xue, and Tuba Acet. 2014. "The Arabidopsis Thaliana FASCICLIN

- LIKE ARABINOGALACTAN PROTEIN 4 Gene Acts Synergistically with Abscisic Acid Signalling to Control Root Growth.” *Annals of Botany*: 1125–33.
- Shi, Huazhong et al. 2003. “The Arabidopsis SOS5 Locus Encodes a Putative Cell Surface Adhesion Protein and Is Required for Normal Cell Expansion.” *The Plant Cell* 15(January): 19–32.
- Showalter, Allan M. 2001. “Arabinogalactan-Proteins : Structure , Expression and Function.” *CMLS Cellular and Molecular Life Sciences* 58: 1399–1417.
- Showalter, Allan M, and Debarati Basu. 2016. “Glycosylation of Arabinogalactan-Proteins Essential for Development in Arabidopsis.” *Communicative & Integrative Biology* 0(0): 1–6.
- Su, Shihao, and Tetsuya Higashiyama. 2018. “Arabinogalactan Proteins and Their Sugar Chains: Functions in Plant Reproduction, Research Methods, and Biosynthesis.” *Plant Reproduction* 31(1): 67–75.
- Takada, Yoshikazu, Xiaojing Ye, and Scott Simon. 2007. “The Integrins.” *Genome Biology* 8(5): 215.1-215.9.
- Tor, Mahmut, Michael T Lotze, and Nicholas Holton. 2009. “Receptor-Mediated Signalling in Plants : Molecular Patterns and Programmes.” *Journal of Experimental Botany* 60(13): 3645–54.
- Tryfona, T. et al. 2012. “Structural Characterization of Arabidopsis Leaf Arabinogalactan Polysaccharides.” *Plant Physiology* 160(2): 653–66.
- Verica, Joseph A et al. 2002. “The Cell Wall-Associated Kinase (WAK) and WAK-like Kinase Gene Family.” *Plant Physiology* 129(2): 455–59.
- Vicré, Maïté, Catherine Santaella, Sandrine Blanchet, and Aurélien Gateau. 2005. “Root Border-Like Cells of Arabidopsis . Microscopical Characterization and Rol ...” *Plant Physiology* 138(June): 998–1008.
- Wang, Lin et al. 2015. “Overexpression of AT14A Confers Tolerance to Drought Stress-Induced Oxidative Damage in Suspension Cultured Cells of Arabidopsis Thaliana.” *Protoplasma* 252(4): 1111–20.
- Willats, William G.T., and J. Paul Knox. 1996. “A Role for Arabinogalactan-Proteins in Plant

- Cell Expansion: Evidence from Studies on the Interaction of Glucosyl Yariv Reagent with Seedlings of *Arabidopsis Thaliana*.” *The Plant Journal* 6: 919–25.
- Xiong, Jian-Ping et al. 2002. “Crystal Structure of the Extracellular Segment of Integrin Alpha Vbeta3 in Complex with an Arg-Gly-Asp Ligand.” *Science* 296(5565): 151–55.
- Xu, S.-L., A. Rahman, T. I. Baskin, and J. J. Kieber. 2008. “Two Leucine-Rich Repeat Receptor Kinases Mediate Signaling, Linking Cell Wall Biosynthesis and ACC Synthase in *Arabidopsis*.” *the Plant Cell Online* 20(11): 3065–79.
- Xue, Hui et al. 2017. “*Arabidopsis Thaliana* FLA4 Functions as a Glycan-Stabilized Soluble Factor via Its Carboxy-Proximal Fasciclin 1 Domain.” *The Plant Journal* (91): 613–30.
- Yamada, Kenneth M. 2000. “Fibronectin Peptides in Cell Migration and Wound Repair.” *Journal of Clinical Investigation* 105(11): 1507–9.
- Yariv, Joseph. 1967. “Precipitation of Arabic Acid and Some Seed Polysaccharides by Glycosylphenylazo Dyes.” *Biochemical Journal* 105(March).
- Youl, J J, a Bacic, and D Oxley. 1998. “Arabinogalactan-Proteins from *Nicotiana Alata* and *Pyrus Communis* Contain Glycosylphosphatidylinositol Membrane Anchors.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95(14): 7921–26.
- Yu, Qin, Jing Jing Ren, Lan Jing Kong, and Xiu Ling Wang. 2018. “Actin Filaments Regulate the Adhesion between the Plasma Membrane and the Cell Wall of Tobacco Guard Cells.” *Protoplasma* 255(1): 235–45.
- Zhu, J K et al. 1993. “Enrichment of Vitronectin-Like and Fibronectin-Like Proteins in NaCl-Adapted Plant-Cells and Evidence for Their Involvement in Plasma-Membrane Cell-Wall Adhesion.” *Plant Journal* 3(5): 637–46.