

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



Úloha kyseliny gama-aminomáselné v rostlinách

Bakalářská práce

Jana Zachovalová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2018

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Podlešáková, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením školitelky Mgr. Kateřiny Podlešákové, Ph.D. za použití citované literatury.

V Olomouci dne 2018

.....

Jana Zachovalová

SOUHRN

Kyselina gama-aminomáselná (GABA) je neproteinogenní aminokyselina běžně se vyskytující u rostlin i živočichů. V rostlinách dochází k její rapidní akumulaci v odpovědi na biotický a abiotický stres a změna její koncentrace ovlivňuje růst rostlin.

GABA vzniká zejména z *L*-glutamátu (Glu) pomocí enzymu glutamát dekarboxyláza (GAD). Genom *Arabidopsis thaliana* zahrnuje pět genů kódujících GAD. GABA je metabolizována pomocí tzv. „GABA shunt“, cyklu zahrnujícího tři enzymy; glutamát dekarboxylázu (GAD), GABA transaminázu (GABA-T) a sukcinát semialdehyd dehydrogenázu (SSADH).

Cílem této bakalářské práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny z vybraných T-DNA inzerčních linií *A. thaliana* s knock-outovanými geny metabolismu GABA. Toho bylo docíleno provedením genotypizace pomocí metody PCR, během které byly vyselektovány homozygotní rostliny, které byly následně třikrát zpětně zkříženy. U heterozygotní rostliny proběhlo samosprášení a z jejího potomstva byla vybrána finální homozygotní rostlina.

Z devíti genů bylo po sérii zpětných křížení dosaženo vyselektování finálních homozygotních rostlin pro geny *GAD1* (linie SALK_082173) a *GABA-T* (linie SALK_007661).

Následující výzkum bude zaměřen na testování vlivu salinitního stresu na fenotyp vyselektovaných knock-outových linií pomocí vysokokapacitní fenotypizační platformy OloPhen s cílem prozkoumat roli GABA za stresových podmínek.

SUMMARY

Gamma-aminobutyric acid (GABA) is a non-proteinogenic amino acid commonly found in plants and animals. It is rapidly accumulating in plants in response to biotic and abiotic stress and its concentration variation affect plant growth.

GABA is mainly produced from *L*-glutamate (Glu) by the enzyme glutamate decarboxylase (GAD). The *Arabidopsis thaliana* genome contains five genes encoding GAD. GABA is metabolized via the GABA shunt, a three enzyme pathway including glutamate decarboxylase (GAD), GABA transaminase (GABA-T) and succinic semialdehyde dehydrogenase (SSADH).

The goal of this bachelor thesis was to select homozygous plants from specific *A. thaliana* T-DNA insertion lines with knockout genes of GABA metabolism. This was achieved by genotyping using the PCR method, during which homozygous plants were selected and then backcrossed three times. The heterozygous plants were left to self-pollinate and then the final homozygous plant was selected.

Out of nine genes, the selection of final homozygous plants for the genes *GAD1* (SALK_082173 line) and *GABA-T* (SALK_007661 line) was achieved after series of backcrossing.

The subsequent research will be focused on testing the effect of salinity stress on the phenotype of selected knockout lines, using the high-throughput phenotyping OloPhen platform, and the role of GABA under stress conditions will be explored.

Děkuji své školitelce, Mgr. Kateřině Podlešákové, Ph.D., za vstřícný přístup a cenné rady v průběhu zpracovávání bakalářské práce. Mé poděkování patří také veškerému personálu Oddělení chemické biologie a genetiky CRH za ochotu kdykoliv poradit.

OBSAH

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK	vii
SEZNAM OBRÁZKŮ	ix
SEZNAM TABULEK.....	x
1 ÚVOD	1
2 CÍLE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Kyselina gama-aminomáselná (GABA)	3
3.2 Metabolismus a biosyntéza GABA	3
3.2.1 Biosyntéza.....	3
3.2.2 Metabolismus.....	4
3.2.2.1 Orgánová specifikace na úrovni metabolismu	6
3.2.3 Transport.....	7
3.3 GABA a vývoj rostliny	7
3.4 GABA a stres	8
3.5 <i>A. thaliana</i> jako modelový organismus.....	10
3.5.1 Morfologie	10
3.5.2 Genom.....	11
3.5.3 Transformace <i>A. thaliana</i>	12
4 MATERIÁL A METODY	13
4.1 Rostlinný materiál	13
4.2 Použité chemikálie a roztoky	13
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	15
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	16
4.4.1 Příprava polovičního MS média	16
4.4.2 Sterilizace semen <i>A. thaliana</i>	16
4.4.3 Výsev semen na MS médium	16
4.4.4 Genotypizace	17
4.4.4.1 Izolace genomové DNA z listů <i>A. thaliana</i>	18
4.4.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR).....	18
4.4.4.3 Elektroforéza v agarózovém gelu.....	23
4.4.5 Zpětné křížení	23

5	VÝSLEDKY	25
5.1	Volba inzerčních linií metabolismu GABA	25
5.2	Testování primerů	27
5.3	Selekce homozygotních linií	30
5.4	Zpětné křížení a následná selekce homozygota	32
6	DISKUSE.....	34
7	ZÁVĚR.....	36
8	LITERATURA	37

SEZNAM SYMBOLŮ A ZKRATEK

AAP	aminokyselinová permeáza
ABRC	<i>Arabidopsis</i> Biological Resource Center
Ala	alanin
α KG	alfa-ketoglutarát
BC	backcross; zpětné křížení
CaM	kalmodulin
CAT	kationtový aminokyselinový transportér
CIA	chloroform:isoamyl alkohol
Col	ekotyp Columbia
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxyribonukleotid trifosfát
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
FST	T-DNA flanking sequence
GABA	kyselina gama-aminomáselná
GABA-T	GABA transamináza
GABA-TK	GABA transamináza využívající alfa-ketoglutarát jako akceptor aminoskupiny
GABA-TP	GABA transamináza využívající pyruvát jako akceptor aminoskupiny
GABP	GABA permeáza
GAD	GABA dekarboxyláza
GAT	GABA transportér
gDNA	genomová DNA
Glu	glutamát
GHB	gama-hydroxybutyrát
GHBDH	gama-hydroxybutyrát dehydrogenáza
GLYR	glyoxylát reduktáza
GOGAT	glutamin-oxoglutarát aminotransferáza
GS	glutamin syntetáza
GSP	genově specifický primer
KO	knock-out
LB	levý okraj transferové DNA

Ler	ekotyp Landsberg
Lsi	transportér křemíku
MES	morfolinethansulfonová kyselina
MS	Murashige & Skoog
NADH	nikotinamidadenindinukleotid
NASC	Nottingham <i>Arabidopsis</i> Stock Center
PCR	polymerázová řetězová reakce
<i>POP2</i>	pollen-pistil 2
ProT	prolinový transportér
RB	pravý okraj transferové DNA
SDS	dodecylsírán sodný
SSA	sukcinát semialdehyd
SSADH	sukcinát semialdehyd dehydrogenáza
SSR	SSA reduktáza
TAE	Tris-acetát-EDTA
TE	Tris/EDTA
TCA	cyklus trikarboxylových kyselin; Krebsův cyklus
T-DNA	transferová DNA
Ws	ekotyp Wassilewskija
WT	wild type; divoký typ

SEZNAM OBRÁZKŮ

- Obr. 1** Subcelulární kompartmentalizace metabolismu GABA
- Obr. 2** Exprese *GABA-T* a pěti homologních *GAD* genů v různých orgánech *A. thaliana*
- Obr. 3** Životní cyklus *A. thaliana*
- Obr. 4** PCR reakce pro genotypizaci T-DNA inzerčních linií
- Obr. 5** PCR produkty s WT a KO primery
- Obr. 6** Markery molekulové hmotnosti
- Obr. 7** Květy *A. thaliana*
- Obr. 8** Schéma křížení
- Obr. 9** Grafické znázornění pozice T-DNA inzercí v genech *GAD1*, *GAD2*, *GAD3*, *GAD4*, *GAD5*, *SSADH*, *GABA-T*, *GLYR1* a *GLYR2*
- Obr. 10** Testy primerů pro geny **(A)** *SSADH*, **(B)** *GAD1*, **(C)** *GAD1* (1–3), *GAD2* (4), *GAD3* (5), *GAD4* (6–7), *GAD5* (8), *SSADH* (9), *GABA-T* (10) a *GLYR1* (11), **(D)** *GAD3*
- Obr. 11** Výsledek elektroforetické separace PCR produktů s primery pro WT alelu (nahore) a KO alelu (dole) při selekci homozygotních rostlin
- Obr. 12** Výsledek elektroforetické separace PCR produktů s primery pro WT alelu (nahore) a KO alelu (dole) při selekci finálních homozygotních rostlin

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Objednané mutantní linie s T-DNA inzercí v genech metabolismu GABA
Tab. 2	Sekvence primerů specifických pro T-DNA
Tab. 3	Složení PCR reakční směsi
Tab. 4	Podmínky PCR reakce
Tab. 5	Použité genové primery u jednotlivých genů
Tab. 6	Kombinace primerů pro gen <i>SSADH</i>
Tab. 7	Kombinace primerů pro gen <i>GAD1</i>
Tab. 8	Kombinace primerů pro geny <i>GAD1–5</i> , <i>SSADH</i> , <i>GABA-T</i> a <i>GLYR1</i>
Tab. 9	Kombinace primerů pro gen <i>GAD3</i>
Tab. 10	Stádium křížení jednotlivých T-DNA inzerčních linií

1 ÚVOD

Rostliny jsou sesilní organismy, které jsou vystaveny nepříznivým podmínkám omezujícím jejich růst a vývoj. Tyto podmínky se obecně označují jako stres. Sucho, horko, UV radiace, zasolení, mechanické poškození či zaplavení představují abiotický stres. Za biotický stres je potom označováno napadení rostliny patogeny (bakteriálními, virovými, houbovými či jinými parazity). Jelikož rostliny nemají možnost vyhnout se těmto stresovým podmínkám přesunem na jiné místo, vyvinuly si mechanismy, jak se se stresem vypořádat. Pochopení těchto mechanismů je v současnosti předmětem intenzivního výzkumu rostlinných biotechnologií.

Jedněmi z nejdůležitějších rostlinných substancí účastnících se rostlinné odpovědi na environmentální stres jsou bezpochyby rostlinné hormony jako např. kyselina abscisová, auxiny, cytokininy, ethylen, jasmonáty, kyselina salicylová, strigolaktony a brassinosteroidy (Wani *et al.*, 2016). Role polyaminů je zejména u abiotického stresu rovněž nepopíratelná (Minocha *et al.*, 2014). V odpovědi na biotický stres hrají důležitou roli zase fenolické látky, fytoalexiny a kumariny (Kulbat, 2016). Rostliny vystavené stresu rovněž vykazují akumulaci prolinu a dalších aminokyselin (Rai, 2002), včetně těch neproteinogenních jako např. kyselina gama-aminomáselná (GABA). GABA se hromadí v rostlinách vlivem celé řady environmentálních stresů. Dnes je již známo její zapojení do metabolismu dusíku a uhlíku, funguje jako osmoregulátor, chrání rostliny proti hmyzu a oxidačnímu stresu, reguluje cytosolické pH a spekuluje se rovněž o její funkci jako signální molekule (Bouché a Fromm, 2004).

Není tedy nijak překvapivé, že role GABA při environmentálním stresu je podrobena rozsáhlému výzkumu. Jedním z přístupů je využití mutantních rostlin s přerušеныmi geny metabolismu GABA, což umožňuje posoudit funkci těchto genů zejména během stresu. Cílem této bakalářské práce je připravit právě takové rostliny pro posouzení role GABA v rámci rostlinného stresu, a to zejména v kontextu s ostatními stresu se účastnícími rostlinnými substancemi.

2 CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracovat literární rešerši na téma role GABA v metabolismu rostlin a při rostlinném stresu v *A. thaliana*

Experimentální část:

- Výběr a objednání vhodných linií semen *A. thaliana* s knock-outovanými geny metabolismu GABA
- Selektce homozygotních knock-outových linií daného genu *A. thaliana*
- Zpětné křížení

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Kyselina gama-aminomáselná (GABA)

Kyselina gama-aminomáselná (dále GABA, z anglického názvu gamma-aminobutyric acid) je čtyřuhlíkatá neproteinogenní aminokyselina běžně se vyskytující v říši rostlinné, živočišné i bakteriální (Steward *et al.*, 1949; Roberts a Frankel, 1950; Reed, 1950). Výskyt GABA byl pozorován nejen napříč rostlinnou říší, ale také v každém zkoumaném rostlinném orgánu, což kontrastuje s distribucí ostatních neproteinogenních aminokyselin (např. gama-methylglutaminem), jejichž výskyt je omezen na jeden druh nebo jen několik blízkce příbuzných druhů (Narayan a Nair, 1990).

Poprvé byla GABA identifikována v hlízách bramboru (*Solanum tuberosum* L.) v roce 1949 (Steward *et al.*, 1949), překvapivě o rok dříve než v mozku obratlovců (Roberts a Frankel, 1950), kde byla následně popsána jako hlavní neurotransmiter v centrální nervové soustavě (Roberts, 1988).

Výzkum se zpočátku zaměřil na roli GABA jako signální molekuly u živočichů a její výskyt byl v rostlinách opomíjen kvůli relativně nízkým hladinám. Zájem rostlinných fyziologů přitáhl až zjištění, že k akumulaci GABA dochází v rostlinách v odpovědi na biotický a abiotický stres (Kinnersley a Turano, 2000). Postupně pak byla popsána role GABA v regulaci dusíkového a uhlíkového metabolismu rostlin (Fait *et al.*, 2008), v signalizaci, a zejména v aklimatizaci rostlin na stres (Kinnersley a Turano, 2000).

3.2 Metabolismus a biosyntéza GABA

3.2.1 Biosyntéza

GABA je syntetizována v cytosolu z *L*-glutamátu za účasti enzymu glutamát dekarboxylázy (GAD) (Breitkreuz a Shelp, 1995). Tento enzym se v *A. thaliana* vyskytuje v 5 izoformách (Shelp *et al.*, 1999). První rostlinná GAD byla identifikována v petúнии (Baum *et al.*, 1993), Turano a Fang (1998) následně charakterizovali enzymy GAD1 a GAD2 v *A. thaliana*. Srovnání sekvencí s databází celogenomové sekvence *A. thaliana* prokázalo existenci dalších tří izoform enzymu GAD (GAD3, GAD4 a GAD5) (Shelp *et al.*, 1999).

GAD má pH optimum v kyselé oblasti a je aktivována zvýšenou koncentrací cytosolických H^+ a Ca^{2+} iontů, které většinou doprovází stres (Shelp *et al.*, 1999; Reddy

et al., 2011). Ca^{2+} ionty vytváří komplex s kalmodulinem (CaM), přičemž tento komplex se poté váže na GAD a aktivuje ji. Při neutrálním pH je aktivita GAD prakticky závislá na přítomnosti Ca^{2+} /CaM komplexu (Snedden *et al.*, 1995; 1996). GAD1, GAD2 a GAD4 obsahují na C-terminálním konci doménu, která je schopná tento komplex vázat (Baum *et al.*, 1993). U proteinů GAD3 a GAD5 bylo pomocí analýzy *in silico* prokázáno, že jsou na CaM nezávislé (Shelp a Zarei, 2017), tato skutečnost byla popsána u GAD rýže (*Oryza sativa* L.) a plodů jabloně (*Malus x domestica* Borkh) (Akama *et al.*, 2001; Trobacher *et al.*, 2013). Naopak u tabáku (*Nicotiana tabacum* L.) nedochází bez této vazebné domény k jeho správnému vývoji (Ferne *et al.*, 2001).

GABA může být syntetizována také alternativní cestou z putrescinu a spermidinu (Shelp *et al.*, 2012a) a pravděpodobně i neenzymatickou reakcí z prolinu za oxidačního stresu (Signorelli *et al.*, 2015).

3.2.2 Metabolismus

Metabolismus GABA se odehrává v cyklu nazývaném „GABA shunt“ (alternativní dráha trikarboxylových kyselin). Jedná se o tříenzymovou dráhu zahrnující glutamát dekarboxylázu (GAD, EC 4.1.1.15), GABA transaminázu (GABA-T neboli POP2 z anglického „pollen-pistil“, EC 2.6.1.19) a sukcinát semialdehyd dehydrogenázu (SSADH, EC 1.2.1.16) (Obr. 1).

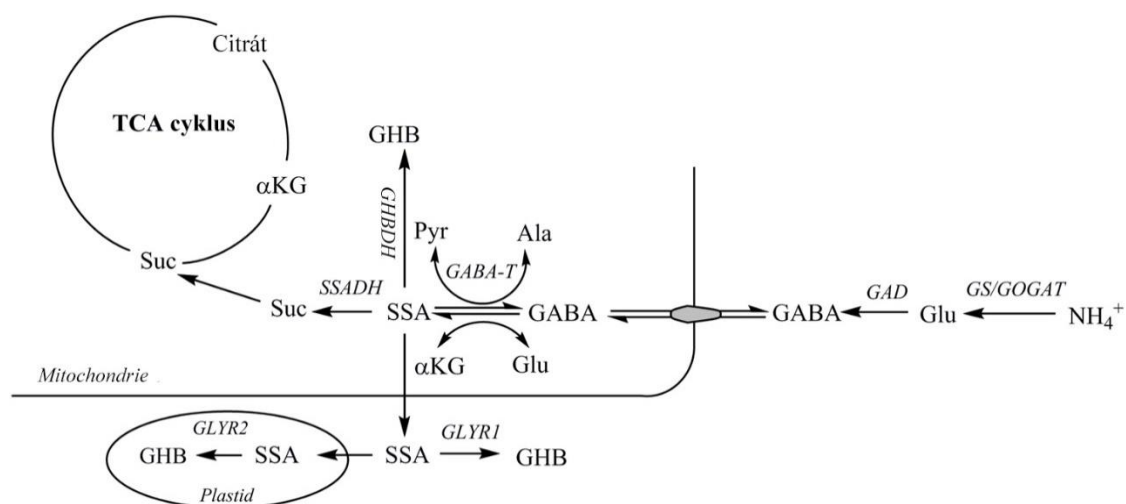
Jak již bylo řečeno, v rostlinách vzniká GABA v cytosolu pomocí GAD a do mitochondrie je transportována za pomoci dlouhou dobu neidentifikovaného transportéru. Teprve nedávno bylo zjištěno, že tuto funkci plní, alespoň částečně, protein AtGABP (GABA permeáza) (Michaeli *et al.*, 2011). V mitochondrii je GABA přeměňována na sukcinát semialdehyd (SSA) pomocí dvou GABA transamináz, které se liší v tom, která sloučenina slouží jako akceptor aminoskupiny. GABA-TK využívá α -ketoglutarát za vzniku glutamátu, zatímco za využití GABA-TP dochází transaminací k produkci alaninu z pyruvátu (Bouché a Fromm, 2004). Doposud byl izolován pouze gen pro GABA-TP (Van Cauwenberghe *et al.*, 2002), byť v rostlinných extraktech byla pozorována aktivita obou transamináz (Shelp *et al.*, 1999). U savců je zřejmě přítomna pouze GABA-TK (Bouché a Fromm, 2004). V některých rostlinách byla prokázána přítomnost GABA-TP, která využívá glyoxylát jako akceptor za vzniku glycinu, a zprostředkovává tak propojení GABA metabolismu s fotorespirací (Clark *et al.*, 2009).

Rostliny s nefunkčním genem *GABA-T* (tzv. *gaba-t* neboli *pop2* mutanti) netvoří enzym GABA-T a je u nich inhibován růst pylové láčky, který je řízen gradientem

GABA. Přítomnost GABA v nízkých koncentracích je pro správný růst pylové láčky nezbytná, ovšem za vysokých koncentrací *in vitro* působí inhibičně (Palanivelu *et al.*, 2003). Bylo také pozorováno zvýšené množství GABA v kořenech i prýtech *gaba-t* mutantů, tato skutečnost je vysvětlována jako inhibice konverze GABA na SSA v důsledku ztráty GABA-T aktivity (Miyashita a Good, 2008).

SSA vzniklý činností GABA-T je toxický intermediát, proto je pro rostlinu nezbytná přítomnost mechanismů pro jeho odstranění. Toho je docíleno následujícím krokem GABA katabolismu, kterým je oxidace SSA na sukcinát pomocí SSADH (Breitkreuz a Shelp, 1995), existuje však i dráha redukce na gama-hydroxybutyrát (GHB) pomocí SSA reduktázy (SSR, EC 1.1.1.B47), známé též pod označením GHB dehydrogenáza (GHBDH) (Breitkreuz *et al.*, 2003). K redukci SSA může v rostlinách docházet také působením NADPH-dependentními glyoxylát reduktázami (GLYR1 a GLYR2, EC 1.1.1.79), i když oba enzymy mají vyšší afinitu ke glyoxylátu než k SSA (250x v případě GLYR1 a 350x v případě GLYR2) (Hoover *et al.*, 2007).

SSADH je považována za důležitý enzym, jehož deficience vede k výraznému fenotypu. *Ssadh* mutanti jsou charakterističtí zakrslým vzrůstem, nekrotickými lézemi, světlými skvrnami na listech a přítomností menšího množství květů v porovnání s rostlinami s funkčním genem *SSADH* (Bouché *et al.*, 2003; Ludewig *et al.*, 2008). Aktivita SSADH je negativně regulovaná ATP a NADH (Bouché a Fromm, 2004).



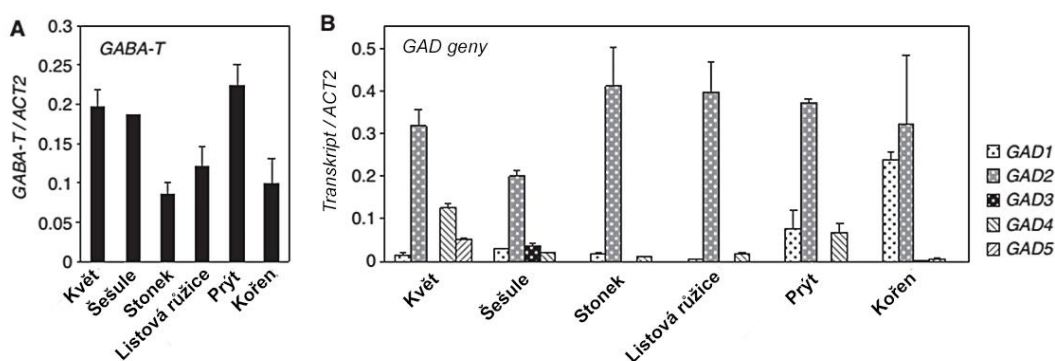
Obr. 1 Subcelulární kompartmentalizace metabolismu GABA. Zkratky: Ala, alanin; αKG, alfa-ketoglutarát; GABA-T, GABA transamináza; GHB, gama-hydroxybutyrát; GHBDH, gama-hydroxybutyrát dehydrogenáza; Glu, glutamát; GLYR1, glyoxylát reduktáza 1; GLYR2, glyoxylát reduktáza 2; GOGAT, glutamin-oxoglutarát aminotransferáza; GS, glutamin syntetáza; Pyr, pyruvát; SSA, sukcinát semialdehyd; Suc, sukcinát; SSADH, sukcinát semialdehyd dehydrogenáza; TCA, trikarboxylové kyseliny. Podlešáková *et al.* (2018), v revizním řízení, upraveno

3.2.2.1 Organová specifikace na úrovni metabolismu

Expres jednotlivých izoform *GAD* *A. thaliana* se značně liší v různých rostlinných orgánech (Obr. 2). Gen *GAD1* je exprimován převážně v kořenech (Bouché a Fromm, 2004). *GAD2* je konstitutivně exprimován ve všech rostlinných orgánech (Turano a Fang, 1998; Zik *et al.*, 1998), i když exprese je nižší v šesulích, zatímco exprese ostatních genů *GAD* je ve všech orgánech spíše nízká, s výjimkou exprese *GAD4* a *GAD5* v květech (Miyashita a Good, 2008). Gen *GAD5* je také exprimován ve spermatických buňkách (Hruz *et al.*, 2008). *GAD3* a *GAD4* jsou přítomny v průměrné míře v mladých listech, kalichu, plodolistech a nezralých šesulích (Shelp *et al.*, 2012b).

Existují dvě izoformy GLYR, které se svou lokalizací v buňce liší. Nedávno bylo potvrzeno, že GLYR1 jabloně a rýže, stejně jako *A. thaliana*, je výhradně lokalizována v cytosolu a GLYR2 v plastidech a mitochondriích (Ching *et al.*, 2012). *GLYR1* a *GLYR2* jsou v *A. thaliana* exprimovány v celé rostlině včetně kořenů a bobtnajících semen, přičemž exprese *GLYR2* je více asociována s přizemní růžicí (Zarei *et al.*, 2017).

Přítomnost SSADH byla prokázána v mitochondriích *A. thaliana* (Busch a Fromm, 1999) a sóji (*Glycine max* L.) (Breitkreuz a Shelp, 1995), stejně tak jako přítomnost GABA-T (Shelp *et al.*, 1999). Transkript *GABA-T* byl detekován ve všech testovaných orgánech, s vyšší expresí v květech, šesulích a prýtech mladých semenáčků (Miyashita a Good, 2008).



Obr. 2 Expres *GABA-T* a pěti homologních *GAD* genů v různých orgánech *A. thaliana*. Množství transkriptu bylo stanoveno pomocí kvantitativní real-time RT-PCR a normalizováno vůči ACT2 (aktin 2). **(A)** značí profil exprese *GABA-T*, **(B)** značí expresi pěti homologních *GAD* genů. Miyashita a Good (2008), upraveno

3.2.3 Transport

Transport GABA byl podroben rozsáhlému výzkumu. Za první dva objevené GABA transportéry se považují aminokyselinová permeáza 3 (AAP3) (Fischer *et al.*, 1995) a prolinový transportér 2 (ProT2) (Rentsch *et al.*, 1996), nicméně afinita těchto transportérů pro aminokyseliny a jejich deriváty, jako např. betain prolinu a glycinu, je výrazně vyšší než pro GABA, tudíž jejich schopnost transportovat GABA *in planta* zůstává otázkou (Breitkreuz *et al.*, 1999; Grallath *et al.*, 2005).

Meyer *et al.* (2006) posléze charakterizovali v *A. thaliana* AtGAT1, doposud jediný identifikovaný transportér, který vykazuje vysokou afinitu pro GABA. Tento transportér je lokalizován v plazmatické membráně a kromě GABA přenáší i omega-mastné kyseliny. Nejvyšší exprese AtGAT1 *in planta* byla pozorována za podmínek zvýšené koncentrace GABA například z důvodu poranění nebo senescence, zatímco u rostlin nevystavených stresu byla exprese vyšší v květech v porovnání s ostatními orgány.

Prostřednictvím kationtového aminokyselinového transportéru 9 (SICAT9) pak dochází k transportu GABA mezi vakuolou a cytosolem výměnou za aspartát či glutamát u rajčete (*Solanum lycopersicum* L.) (Snowden *et al.*, 2015). Který z transportérů z rodiny CAT (kam se řadí právě i SICAT9) lokalizovaných v tonoplastu stojí za transportem v *A. thaliana*, je nutné podrobit dalšímu výzkumu. Nicméně AtCAT9 sdílí s SICAT9 68% identitu v aminokyselinové sekvenci a jeví se tedy jako nejpravděpodobnější kandidát (Shelp a Zarei, 2017).

3.3 GABA a vývoj rostliny

GABA se podílí na většině rostlinných procesů, je akumulována v průběhu senescence listů *A. thaliana* (Diaz *et al.*, 2005), v rýži během senescence dochází k up-regulaci GABA-T (Ansari *et al.*, 2005). Během dozrávání plodů rajčete byla pozorována vysoká enzymatická aktivita GABA-TK a pokles exprese *SIGAD2* a *SIGAD3* (Akihiro *et al.*, 2008). *GAD1* a *GAD3* jsou exprimovány v pylu a pylové láčce, naopak exogenní aplikace GABA způsobuje inhibici GAD v rostoucí pylové láčce, což naznačuje negativní zpětnou vazbu mezi GABA a expresí GAD (Yu *et al.*, 2014).

3.4 GABA a stres

Již v 50. letech 20. století byla pozorována rapidní akumulace GABA jako odpověď na stres (Naylor a Tolbert, 1956). Nárůst koncentrace GABA byl pozorován v odpovědi na téměř všechny stresové faktory. Z reakcí na abiotický stres stojí za zmínku vysoká teplota, zasolení, sucho, oxidační stres či cytosolická acidóza, zatímco biotický stres způsobující akumulaci GABA zahrnuje virální či mikrobiální infekci a škůdce (Kinnersley a Turano, 2000; Bouché a Fromm, 2004). GABA metabolismus také hraje roli v regulaci cytosolického pH a udržování rovnováhy uhlíku a dusíku (Bouché a Fromm, 2004).

Biotický stres

GABA plní u obratlovců a bezobratlých roli neurotransmiteru, proto bylo spekulováno, že by mohla být produkována v rostlině za účelem odradit hmyz od požívání listů (Bouché a Fromm, 2004). Koncentrace GABA je zvýšena mechanickou stimulací či poškozením (Ramputh a Bown, 1996), dokonce i pouhým plazením hmyzu po listech (Bown *et al.*, 2002). Je možné, že pozřená GABA negativně ovlivňuje normální růst a vývoj hmyzu (Shelp *et al.*, 1999). V rýži dochází k up-regulaci exprese *GABA-T* vlivem houbové infekce (Wu *et al.*, 2006).

Abiotický stres

Expresi genů *GAD* se mění v závislosti na podmínkách růstu. Kupříkladu vlivem zasolení, vůči kterému je *A. thaliana* obecně považována za citlivou (Munns a Tester, 2008), dochází ke zvýšení exprese téměř všech genů metabolismu GABA, což potvrzuje důležitou roli GABA v odpovědi na stres. Byl pozorován zejména nárůst v expresi *GAD2* a *GAD4*. Vysoká koncentrace NaCl způsobuje inhibici růstu primárních kořenů *pop2-1* mutanta, navíc v kořenech dochází k akumulaci aminokyselin a také k úbytku uhlovodíků, což naznačuje funkci *GABA-T*, potažmo celého metabolismu GABA v centrálním metabolismu uhlíku a dusíku (Renault *et al.*, 2010). *Pop2-1* mutanti také vykazují defekty buněčné stěny (Renault *et al.*, 2013).

Zvýšená exprese *GAD4* byla rovněž pozorována u *A. thaliana* v důsledku hypoxie (Miyashita a Good, 2008) a sucha (Urano *et al.*, 2009). Hypoxie nemá vliv na expresi *GABA-T*, nicméně v kořenech *gaba-t* mutantů dochází k hromadění menšího množství alaninu než v případě WT (wild type, nemutantní rostlina nacházející se v přírodě) rostlin,

GABA-T se tedy alespoň částečně podílí na akumulaci alaninu během hypoxie (Miyashita a Good, 2008).

Mekonnen *et al.* (2016) pozorovali za sucha u *gad1/2* mutanta *A. thaliana* ovlivnění funkce průduchů a nízkou koncentraci malátu v listech následkem narušené rovnováhy uhlíku a dusíku. Exogenní aplikace GABA způsobila u jetele (*Trifolium repens*) snížení GAD aktivity, zvýšení endogenní koncentrace GABA a tím také zmírnění poškození vlivem sucha (Yong *et al.*, 2017).

V rýži dochází k up-regulaci exprese *GABA-T* vlivem UV radiace (Wu *et al.*, 2006). Stejně tak i *ssadh* mutanti jsou citliví vůči ultrafialovému záření a vysokým teplotám, oba tyto stresy u nich způsobují rychlý nárůst H₂O₂, což vede k urychlení buněčné smrti a vzniku nekrózy listů (Bouche *et al.*, 2003). Fenotyp mutanta může být způsoben nedostatkem některých metabolitů (například NADH nebo sukcinátu, které odcházejí do dýchacího řetězce) nebo nadbytkem metabolitů odvozených z metabolismu GABA s možnými toxickými účinky (SSA, GHB) (Bouché a Fromm, 2004).

Několik studií se také zaměřilo na vliv akumulace těžkých kovů na obsah GABA. Kadmium zapříčinilo u rajčete snížení obsahu GABA v kořenech (Chaffei *et al.*, 2004), zatímco dlouhodobá akumulace GABA vedla ke zvýšení tolerance semenáčků rýže vůči toxicitě způsobené trojmocným arsenem. GABA v tomto případě způsobila snížení exprese genů pro transportéry Lsi1 a Lsi2, prostřednictvím kterých arsen vstupuje do kořenů. V prýtech bylo pozorováno zvýšení exprese *GAD1*, *GAD2* a *GAD3* v porovnání s rostlinou vystavenou pouze účinkům arsenu, podobně jako v kořenech, kde ovšem nedošlo ke zvýšení exprese *GAD3* (Kumar *et al.*, 2017).

Metabolismus GABA je patrně propojený také s metabolismem polyaminů (které zahrnují např. putrescin, spermin či spermidin), neboť za hypoxie vede oxidace putrescinu a spermidinu k syntéze GABA (Shelp *et al.*, 2012a). Za hypoxie jsou role GABA a polyaminů zřejmě obráceny a GABA snižuje vliv krátkodobé hypoxie zvýšením biosyntézy putrescinu, spermidinu a sperminu, jak bylo dokázáno v kořenech melounu (*Cucumis melon* L.) a potvrzeno exogenní aplikací GABA (Wang *et al.*, 2014).

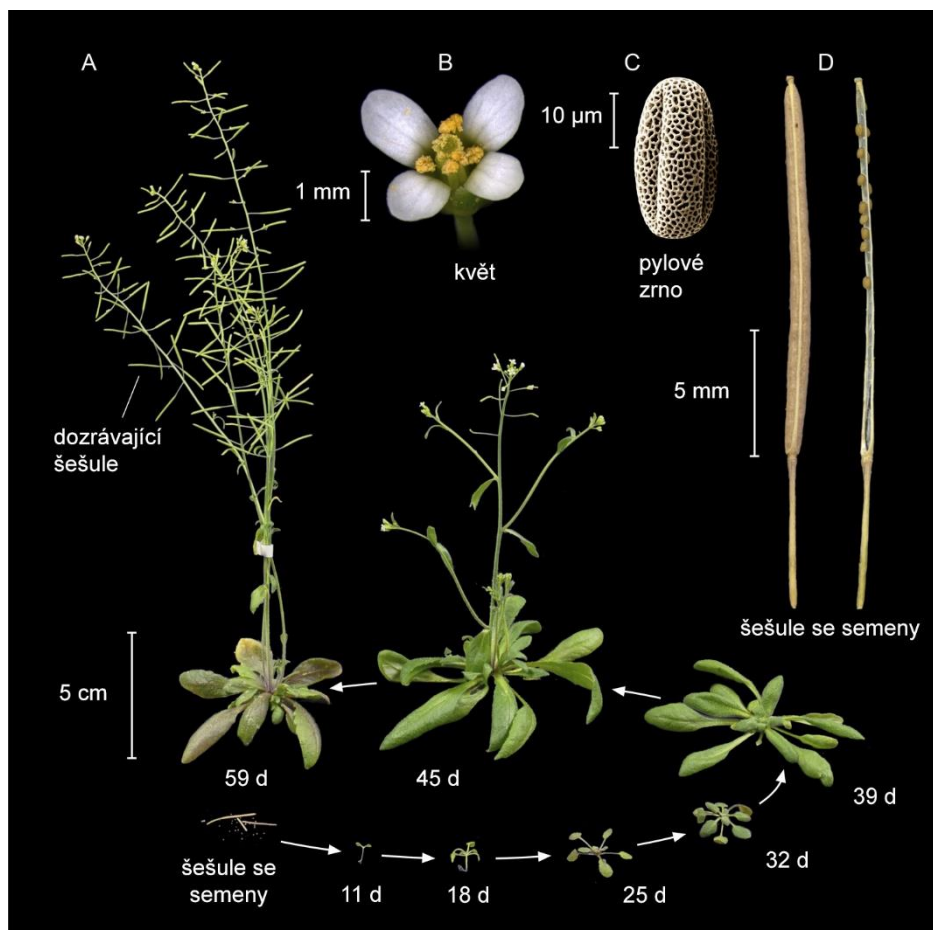
3.5 *A. thaliana* jako modelový organismus

A. thaliana (L.) Heynh., česky huseníček rolní, je jednoletá kvetoucí rostlina široce rozšířená v Evropě, Asii a Severní Americe. Řadí se do čeledi brukvovité (*Brassicaceae*) a díky malé velikosti genomu, nízkému obsahu repetitivních sekvencí, krátké generační době, produkci velkého množství semen, nenáročnosti na prostor a pěstování našla využití jakožto modelový organismus pro genetické, biochemické a fyziologické analýzy.

3.5.1 Morfologie

A. thaliana dosahuje nízkého vzrůstu do 25 cm. Je dostupná v mnoha různých ekotypech, z nichž několik bylo podrobeno rozsáhlému výzkumu a je využíváno v molekulárních studiích, například Columbia (Col), Wassilewskija (Ws) či Landsberg (Ler). Tyto tři ekotypy se mezi sebou značně liší ve fenotypu, a to mimo jiné v morfologii trichomů, květních pupenů či počtu listů v přízemní růžici (Passardi *et al.*, 2007).

Celý životní cyklus od vyklíčení až po tvorbu zralých semen trvá 6 týdnů (Obr. 3). Květy jsou 2 mm dlouhé a je pro ně typická samosprašnost, čehož se využívá během křížení, kdy je na bliznu nanesen pyl jiné rostliny. Zralá semena jsou 0,5 mm dlouhá a jsou produkována v šešulích, kterých mohou být stovky a dohromady mohou dávat až 5 000 semen. Listy pokrývají malé jednobuněčné vlásky (tzv. trichomy), které slouží jako model pro studium morfogeneze a buněčné diferenciace (Meinke *et al.*, 1998).



Obr. 3 Životní cyklus *A. thaliana*. (A) *A. thaliana* ekotypu Columbia (Col) během různých stádií životního cyklu, od semena (dole vlevo) přes semenáčky (11 dní) až po vegetativní (39 dní) a reprodukční fázi (45 dní). Fotografie (B) znázorňuje květ, (C) pylové zrno (rastrovací elektronová mikrofotografie), (D) zralé šišule (pouzdra vlevo uzavřená, vpravo otevřená s několika neuvolněnými semeny) – detail. Zdroj: B a C, Maria Bernal a Peter Huijsen; ostatní fotografie Ines Kubigsteltig a Klaus Hagemann, upraveno

3.5.2 Genom

A. thaliana je diploidní rostlina, jedna sada čítá pět chromozomů, ke kterým jsou k dispozici kompletní genové a fyzické mapy. Sekvence genomu byla dokončena v roce 2000, bylo zjištěno, že genom je relativně malý a s délkou 125 Mb kóduje přibližně 25 500 genů. Napříč chromozomy se vyskytuje 24 velkých duplikací, které dohromady tvoří celých 58 % genomu. Z toho se soudí, že *A. thaliana*, stejně jako kukuřice (*Zea mays* L.), pochází z tetraploidního předka (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000).

Poznatky získané studováním genomu *A. thaliana* lze aplikovat na jiné rostliny či rostlinnou říši obecně, zejména při šlechtění plodin. Znalost genomu umožnila přípravu transgenních rostlin a studium funkce genů.

3.5.3 Transformace *A. thaliana*

Pod pojmem transformace rostlin se rozumí vnesení cizorodého genetického materiálu do rostlinné buňky. Jeden ze způsobů přípravy transgenních rostlin využívá půdní bakterie *Agrobacterium tumefaciens*, která zabudovává svou transferovou DNA (T-DNA) do genomu hostitelské rostliny (Chilton *et al.*, 1977).

T-DNA je ohraničena 25 bp dlouhými přímými repetitivy, které jsou označovány jako levý a pravý okraj (LB, RB) (Gelvin, 2003). Jakákoliv DNA vložená mezi tyto hraniční sekvence může být přenesena a zabudována do jádra rostlinné buňky. Začlenění T-DNA do genomu je však náhodné (Krysan *et al.*, 1999) a může dojít i k začlenění více kopií na různá místa genomu (O'Malley *et al.*, 2015).

Při tzv. inzerční mutagenезi dochází k inserci T-DNA do genomu rostliny. Toho je využíváno při přípravě mutantních rostlin, kdy po vložení T-DNA dochází k posunutí čtecího rámce a vyřazení genu z činnosti, a vzniká tak „knock-out“ (KO) mutant. Nicméně mechanismus selekce místa inserce nebyl detailně objasněn (Rosso *et al.*, 2003) a je zřejmé, že pro identifikaci inserce ve specifickém genu musí být provedeno obrovské množství nezávislých transformací (O'Malley a Ecker, 2010). A co víc, inserce může být provedena v rámci jedné rostliny i na více místech v genomu současně, udává se průměrná hodnota 1,5 insercí na linii (Alonso *et al.*, 2003). Pro eliminaci těchto nežádoucích insercí, které by mohly ovlivňovat výsledný fenotyp rostliny, je nutné po selekci rostliny s insercí v homozygotní konstituci provést opakované zpětné křížení s WT rostlinou (Dinh *et al.*, 2014). Do T-DNA jsou zpravidla začleňovány geny, které umožňují selekci transformovaných rostlin. Mezi takové selekční geny se řadí geny pro rezistenci k antibiotikům (kanamycin, hygromycin) či herbicidům.

Pro *A. thaliana* je vytvořena rozsáhlá kolekce T-DNA inzerčních mutantů, která čítá stovky tisíc linií a pokrývá tak většinu genů. Tyto mutantní linie je možné objednat z biologických center, jako jsou *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC) a The Nottingham *Arabidopsis* Stock Center (NASC).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Rostlinný materiál

Byla použita semena *A. thaliana* ekotypu Columbia (Col-0) a Wassilewskija (Ws). Semena mutantních rostlin s T-DNA inzercí v sekvenci genů pro metabolismus GABA (*GAD1*, *GAD2*, *GAD3*, *GAD4*, *GAD5*, *GABA-T*, *SSADH*, *GLYR1* a *GLYR2*) byla objednána z The Nottingham *Arabidopsis* Stock Centre (NASC, www.arabidopsis.info). Byly vybrány linie z kolekce GABI-Kat (Kleinboelting *et al.*, 2012), SALK (Alonso *et al.*, 2003) a SAIL (Sessions *et al.*, 2002). Použité linie jsou uvedeny v Tab. 1.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (Sigma-Aldrich, kat. č. A9539-500G)
- Destilovaná voda (Sigma-Aldrich, kat. č. W4502)
- dNTP Mix (Promega, kat. č. U1511)
- Chloroform:isoamyl alkohol 24:1 (Sigma-Aldrich, kat. č. C0549)
- Dodecylsírán sodný (SDS) (Lach-Ner, kat.č. 40089-AP0)
- Ethanol, 96% (Lach-Ner, kat. č. 20025-A96)
- Ethidium bromid (neoLab, 1254ML015)
- GeneRuler 1 kb DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, kat. č. SM0312)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (ThermoFisher Scientific, kat. č. SM1331)
- GoTaq® G2 Flexi DNA Polymerase (Promega, kat. č. M7801)
- Kyselina ethylendiamintetraoctová (EDTA) (Penta, kat. č. 18010-30500)
- Kyselina octová (Lach-Ner, kat. č. 10047-A80)
- Monohydrát morfolinethansulfonové kyseliny (MES) (Sigma-Aldrich, kat. č. M8250)
- Murashige & Skoog médium s vitamíny (MS) (Duchefa, kat. č. M0222.0050)
- Phytigel (Sigma-Aldrich, kat. č. P8169)
- Tris báze (AppliChem, kat. č. A1379,1000)
- Triton® X 100 (Carl Roth, kat. č. 3051.4)

Tab. 1 Objednané mutantní linie s T-DNA inzercí v genech metabolismu GABA

NASC ID	Linie	Polymorfismus	Stock	Poznámka	Gen	Lokus
N685359	SALK_017810C	SALK_017810.56.00.X	SALK_017810C	-		
N582173	SALK_082173	gad1-5	SALK_082173	-	GAD1	AT5G17330
N522227	SALK_022227	gad1-6	SALK_022227	-		
N517931	SALK_017931	SALK_017931	SALK_017931	-		
N837609	SAIL_842_A03.V1	SAIL_842_A03.v1	CS837609	-		
N445461	GK-474E05	GK-474E05-019790	CS445461	-	GAD2	AT1G65960
N553172	SALK_053172	SALK_053172.38.45.x	SALK_053172	netestovaná		
N528819	SALK_028819	SALK_028819.56.00.x	SALK_028819	-		
N533307	SALK_033307	SALK_033307	SALK_033307	-		
N506072	SALK_006072	SALK_006072.44.65.x	SALK_006072	-	GAD3	AT2G02000
N874189	SAIL_440_E09	SAIL_440_E09	CS874189	-		
N664262	SALK_146398C	SALK_146398.53.35.x	SALK_146398C	-	GAD4	AT2G02010
N606240	SALK_106240	SALK_106240.17.90.x	SALK_106240	-		
N2048419	GK-546G01.09	-	CS2048419	-	GAD5	AT3G17760
FCZTV65T3	FLAG_460F07	-	-	ekotyp Ws		
N507661	SALK_007661	pop2-8, GABA-T1-1	SALK_007661	-	GABA-T	AT3G22200
N878670	SAIL_1230_C03	SAIL_1230_C03	CS878670	netestovaná		
N503223	SALK_003223	SALK_003223	SALK_003223	-		
N879160	SAIL_1278_B12	SAIL_1278_B12	CS879160	-	SSADH	AT1G79440
N371494	GK-737E05	GK-737E05-023958	CS371494	-		
N557410	SALK_057410	SALK_057410.27.30.x	SALK_057410	-	GLYR1	AT3G25530
N547412	SALK_047412	SALK_047412.34.95.x	SALK_047412	netestovaná	GLYR2	AT1G17650
N2103841	GK-933D03 (CT955036)	GK-933D03-031918	CS2103841	-		

Použité roztoky

- gDNA extrakční pufr: 200 mmol·dm⁻³ Tris-HCl, 250 mmol·dm⁻³ NaCl, 20 mmol·dm⁻³ EDTA, 0,5% SDS
- TE pufr (pH 8): 10 mmol·dm⁻³ Tris-HCl, 1 mmol·dm⁻³ EDTA
- Tris-HCl (pH 8): 60,55 g Tris rozpustit v 400 ml destilované H₂O, upravit pH pomocí HCl, doplnit vodou na 500 ml
- 50x TAE: 2 mol·dm⁻³ Tris, 1 mol·dm⁻³ kyselina octová, 50 mmol·dm⁻³ EDTA
- Agarózový gel: 1% (w/v) agaróza v 1x TAE pufru
- ½ MS médium (pH 5,7): 1,1 g MS s vitamíny, 0,25 g MES, 3 g Phytigel, rozpustit v 400 ml destilované H₂O, upravit pH pomocí KOH, doplnit vodou do 500 ml
- 70% ethanol

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Přístroje

- Autokláv 3870 ELV (Tuttnauer)
- Automatické pipety Eppendorf Research (Eppendorf)
- Centrifuga MPW 15 (MPW MED. INSTRUMENTS)
- Centrifuga ScanSpeed 1730MR (LaboGene)
- Centrifuga s vortexem FVL-2400N (Biosan)
- Dokumentační systém Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad)
- Fytotron EGR Economy Growth Rooms (Weisstechnik)
- Horizontální elektroforetická komora ENDURO Gel XL (Labnet); Mini Gel II (VWR)
- Laminární box MERCI® M - 1200 (MERCI)
- Magnetická míchačka MM4 (Lavatec)
- Oscilační mlýn MM 400 (Retsch)
- pH metr Orion Star™ A111 (ThermoFisher Scientific)
- Stereoskopický mikroskop STM 723 (INTRACO MICRO)
- Termocyklér TC-512 (Techne)
- Váha Scout SKX (OHAUS)

Software

- ImageLab™ Software
- Photoshop CS6
- SnapGene Viewer

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Příprava polovičního MS média

Jako médium pro klíčení semen bylo použito poloviční MS médium. Pro jeho přípravu bylo na digitální váze naváženo 1,1 g MS, 0,25 g MES a 3 g Phytagelu. Láhev se šroubovacím uzávěrem s 400 ml destilované vody byla umístěna na magnetickou míchačku a postupně do ní bylo přidáno navážené množství MS a MES. Po rozpuštění látek bylo přidavkem KOH upraveno pH na hodnotu 5,7. Za stálého míchání byl přidán Phytigel. Na závěr byl objem doplněn na 500 ml a roztok byl promíchán překlápěním. Připravené médium bylo autoklávováno po dobu 20 minut při 121 °C a po vysterilizování bylo v laminárním boxu rozlito po 25 ml na kulaté Petriho misky. Po vychladnutí a ztuhnutí bylo médium připraveno na výsev semen.

4.4.2 Sterilizace semen *A. thaliana*

Do mikrozkupek bylo naváženo přibližně po 2 mg semen. Poté bylo v laminárním boxu k semenům napipetováno 200 µl 70% ethanolu obsahujícího 0,01% Triton X-100. Mikrozkupek byly 10 minut protřepávány na vortexu. Následně byl odpipetován veškerý roztok a promývání ethanolem bylo dvakrát zopakováno. Aby došlo k odstranění veškerého ethanolu, byla semena dvakrát promyta 200 µl vody.

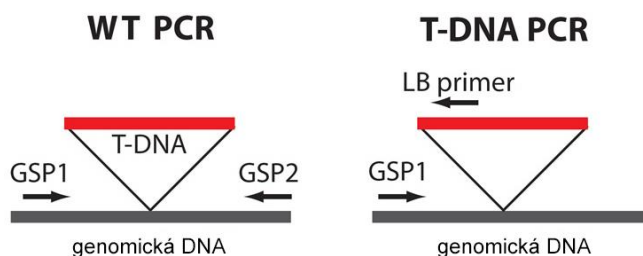
4.4.3 Výsev semen na MS médium

Na Petriho misky s médiem byla v laminárním boxu vyseta sterilizovaná semena *A. thaliana*. Na jednu misku připadlo přibližně 10–15 semen, která byla rovnoměrně rozmístěna po celé misce pomocí sterilního párátko. Misky byly zalepeny z důvodu zamezení kontaminace a pronikání vlhkosti. Aby bylo dosaženo sjednocení klíčení, misky byly umístěny do lednice, kde byly ponechány ve tmě při teplotě 4 °C po dobu tří dnů. Poté byly přemístěny do fytostronu, kde byly klíčky pěstovány přibližně 14 dní za definovaných podmínek (20 °C, 60% vlhkost, 16 hodin světlo, 8 hodin tma). Po nárůstu prvních pravých asimilačních listů byly jednotlivé semenáčky přesazeny pomocí pinzety

do samostatných nádob naplněných substrátem (Substrat 2, Klasmann-Deilmann) a pěstovány dál za identických podmínek.

4.4.4 Genotypizace

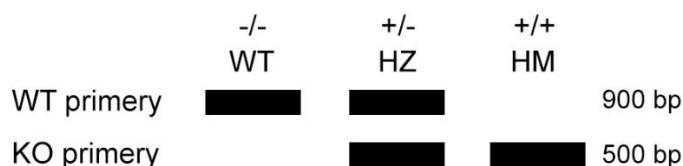
Pro každou linii byly navrženy genově specifické primery (GSP), které zahrnují oblast obsahující předpokládanou inzerci T-DNA. Tato PCR reakce detekuje přítomnost WT (wild type, bez inzerce) alely u WT či heterozygotních rostlin, ovšem nedojde ke vzniku PCR produktu u rostlin homozygotních pro danou inzerci, jelikož velká velikost T-DNA inzertu na obou chromozomech zabraňuje amplifikaci. Knock-outovaná (KO) alela je detekována pomocí kombinace specifického primeru LB (left border, levý okraj) pro T-DNA inzert a správně orientovaného GSP (na opačném vlákně než LB primer). PCR selektivně amplifikuje genomovou DNA s vloženou T-DNA, neboli FST (T-DNA flanking sequence), u heterozygotních a homozygotních rostlin, pouze u WT nevznikne žádný PCR produkt. Princip genotypizace je znázorněn na Obr. 4.



Obr. 4 PCR reakce pro genotypizaci T-DNA inserčních linií. “WT PCR“ amplifikuje úsek genomu přítomný ve WT a heterozygotních liniích, ale ne v liniích homozygotních. “T-DNA PCR” zkoumá přítomnost T-DNA inzerce. GSP, genově specifický primer; LB, levý okraj T-DNA. O'Malley (2015), upraveno

Porovnáním elektroforetické separace PCR produktů vzniklých amplifikací genomové DNA s WT primery a KO primery můžeme vyhodnotit, zda je daná rostlina homozygotní, heterozygotní či WT. V ideálním případě by měly vzniknout produkty o různé velikosti, to ale závisí na konkrétní kombinaci genových primerů pro WT alelu a primerů pro KO alelu.

Na Obr. 5 je uveden ilustrační případ. Pokud vznikne pouze jediný produkt o velikosti 900 bp, značí to, že se jedná o WT rostlinu, která ani na jednom chromozomu neobsahuje T-DNA inzerci (značí se tedy -/-). Homozygotní rostlina se vyznačuje produktem o velikosti 500 bp, na obou chromozomech se vyskytuje inzerce (+/+). Pro heterozygota je charakteristická přítomnost obou produktů (+/-).



Obr. 5 PCR produkty s WT a KO primery. WT, wild-type rostlina; HZ, heterozygot; HM, homozygot

4.4.4.1 Izolace genomové DNA z listů *A. thaliana*

Z přibližně dvoutýdenních semenáčků byl odebrán list o délce cca 0,5 cm, který byl umístěn do 1,5 ml mikrozkušavky (SafeLock, Eppendorf). Poté byla přidána kovová kulička (Tungsten Carbide Beads, 3 mm, QIAGEN, kat. č. 69997), 300 μ l gDNA extrakčního pufru a 120 μ l CIA (chloroform:isoamyl alkohol 24:1). Následně proběhla homogenizace rostlinného materiálu pomocí oscilačního mlýnu (1 min, frekvence 25 Hz). Rozmělněná směs byla centrifugována při 4 °C po dobu 5 min na maximální otáčky (27 000 g). Horní vodná fáze obsahující genomovou DNA byla odebrána do nové mikrozkušavky s 750 μ l 96% ethanolu a byla promíchána. Mikrozkušavky byly ponechány v mrazicím boxu do druhého dne, kdy byly následně centrifugovány po dobu 5–10 minut za stejných podmínek jako v předchozím případě. Následovalo odstranění supernatantu a promytí peletu 70% ethanolem, poté byla opět provedena centrifugace. Vzápětí byl odstraněn veškerý supernatant a pelet byl vysušen v laminárním boxu. Na závěr byl pelet rozpuštěn v 50 μ l TE o pH 8,0.

4.4.4.2 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Genotypizace rostlin byla provedena pomocí metody PCR. Primery byly navrženy v programu SnapGene Viewer za dodržení obecných pravidel pro návrh primerů a objednány ze Sigma-Aldrich. Byly připraveny roztoky o koncentraci 100 μ mol·dm⁻³, a to tak, že lyofilizované primery byly rozpuštěny v DNA-free destilované vodě v množství zadaném výrobcem. Poté byly primery naředěny na finální koncentraci 10 μ mol·dm⁻³.

WT alela jednotlivých genů byla detekována za využití primerů uvedených v Tab. 5, primery pro detekci KO alely (s T-DNA inzercí) jsou uvedeny v Tab. 2.

Tab. 2 Sekvence primerů specifických pro T-DNA

Kolekce	ID primeru	Teplota nasedání primerů [°C]	Sekund. struktura	GC [%]	Sekvence (5'–3')
SALK	LBa1	79,9	velmi silná	65,3	GGTTCACGTAGTGGGCCATCGCCCTG
SAIL	LB2m	60,5	velmi slabá	25	TATTATATCTTCCCAAATTACCAATACA
GABI-Kat	o8760	64,8	střední	52,1	GGGCTACACTGAATTGGTAGCTC

PCR reakční směs byla připravena podle Tab. 3. Byly provedeny dvě oddělené PCR reakce, jedna s primery pro WT alelu (bez inzerce) a druhá s primery pro KO alelu (s inzercí), za následujících podmínek (Tab. 4).

Tab. 3 Složení PCR reakční směsi

Reagencie	Objem [μl]	Koncentrace
Green buffer	3,00	5x
MgCl₂	1,50	25 mmol·dm ⁻³
dNTPs	0,15	10 mmol·dm ⁻³
GoTaq polymeráza	0,05	5 U·μl ⁻¹
PCR voda	7,80	-
Fwd primer	0,75	10 μmol·dm ⁻³
Rev primer	0,75	10 μmol·dm ⁻³
gDNA	1,00	-
Celkový objem	15,00	-

Tab. 4 Podmínky PCR reakce

Proces	Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
Počáteční denaturace	95	3 min	1
Denaturace	95	30 s	
Hybridizace primerů	57	30 s	35
Prodlužování primerů	74	1 min	
Finální prodlužování	72	5 min	1

Tab. 5 Použité genové primery u jednotlivých genů

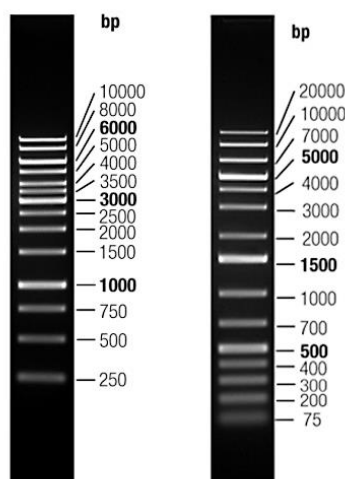
Gen	Název primeru	Teplota nasedání primerů [°C]	Sekundární struktura	GC [%]	Sekvence (5'–3')	Linie
GAD1	GAD1-6_f1480	65,0	slabá	30,3	GGTTATGGTTTGAAATTATTAGATTTCTCG	SALK_022227/ SALK_017810C
	GAD1-6_r2467	67,8	střední	52,3	GCAATGAATCCTCCACTTGCC	SALK_022227
	GAD1_r2219	63,3	střední	45,4	CCATATCAACAGCTTGTTGAGG	SALK_017810C
	GAD1-5_f2646	64,7	žádná	45,8	CCCACCTTTACTCTCAATTTCTCC	SALK_082173
	GAD1-5_r3119	67,3	střední	55,0	GGCCCAATCGGATAAGTTGG	SALK_082173
	GAD1-5_r3335	68,4	velmi slabá	47,8	TTCAAGGAGAAAGCGACAAGTGG	SALK_082173
	GAD1_f2422	68,3	střední	57,1	GGGATACACCAATCCACGTGG	SALK_017931
	GAD1_f2489	69,9	silná	50,0	GGAATGGGACTTTAGACTTCCCTTGG	SALK_017931
	GAD1_r2827	70,4	střední	40,7	CGGTGTCGTTTCCGTATTTTAAAATGG	SALK_017931
GAD2	GK-47405_fw	64,8	slabá	40,0	TCGTTTGTTACGTTTATGACTCTGG	GK-474E05
	GK-47405_rev	63,3	žádná	45,4	CACACACCATTTCATCTTCTTCC	GK-474E05
	SALK_028819_fw	67,1	slabá	50,0	GGAATCGTAAGCGGATATTCGG	SALK_028819
	SALK_028819_rev	64,0	velmi slabá	25,0	GGAATTTTTTTTGAATTTTCTTATATGG	SALK_028819
	SAIL_842_A03.V1_rev	70,9	žádná	42,8	GGTATTCAAAGTTCAAATCAAGTGGGCC	SAIL_842_A03.V1
	SAIL_842_A03.V1_fw	65,7	střední	45,8	CAGAGTGTGACAACTCATCATGG	SAIL_842_A03.V1
GAD3	SALK_f1493	72,4	slabá	61,9	GGGATACGCCGATTCACGTGG	SALK_006072
	SALK_f1617	68,3	střední	61,1	CGGTTTGGTTTACGCCGG	SALK_006072
	SALK_f1665	68,1	velmi slabá	42,3	CGATTTGCCTGATGAACTTATCTTCC	SALK_006072
	SALK_r1859	61,7	velmi slabá	47,8	CGAATCAACTGGTAGTACTGAGC	SALK_006072

Gen	Název primeru	Teplota nasedání primerů [°C]	Sekundární struktura	GC [%]	Sekvence (5'–3')	Linie
GAD3	SALK_r2108	70,4	žádná	55,0	CGCGGCAATTATCCATCACG	SALK_006072
	SALK_r2231	66,9	žádná	64,7	CGAACTCGTTGTGGCGG	SALK_006072
	SAIL_f1705	70,9	žádná	52,0	GGAGCTGATCAACCCACATTTACCC	SAIL_440_E09
	SAIL_f1837	61,7	velmi slabá	47,8	GCTCAGTACTACCAGTTGATTCTG	SAIL_440_E09
	SAIL_r2286	67,9	střední	70,5	GGCATCGTGTAGGCCGG	SAIL_440_E09
	SAIL_r2390	73,4	střední	51,7	CGTGTAGAACCTTCTCGAAATCGGCTACC	SAIL_440_E09
	SAIL_r2421	69,6	střední	75,0	GCGTGAACCCTCGCGG	SAIL_440_E09
	SALK_033307_fw	69,4	žádná	50,0	CCTGACAAAGCGGTTGAAATGG	SALK_033307
	SALK_033307_rev	67,6	střední	66,6	GACCCAACCGATACCGGC	SALK_033307
GAD4	SALK_106240_fw	64,8	slabá	32,3	CAATAGTAACATGTAATGATGTAAACCTTGG	SALK_106240
	SALK_106240_fw2	61,1	slabá	34,6	GTAACATGTAATGATGTAAACCTTGG	SALK_106240
	SALK_106240_rev	64,6	střední	55,0	GGCCTTACGCTTATTCTGCC	SALK_106240
	SALK_146398C_fw	63,7	střední	57,8	CCACTGAGCTTCAGAACCG	SALK_146398C
	SALK_146398C_rev	66,9	střední	47,8	GCTTGTTTTTCTCGACAAGGAGG	SALK_146398C
GAD5	GK-546G01_f1556	66,9	velmi slabá	46,4	GCTAAGAGAAGGAATAGAGATGACAGGG	GK-546G01.09
	GK-546G01_r2046	70,2	slabá	44,0	CCGCCAAATGGTCTAAATCAAAACC	GK-546G01.09
	FLAG_460F07_rev	69,1	slabá	45,8	CTTGCGTTATCCATGCAGTTTTCC	FLAG_460F07
	FLAG_460F07_fw	62,5	velmi slabá	39,1	AAGCAATTGAACGATCTCTTAGC	FLAG_460F07
SSADH	SSADH_f1977	69,3	žádná	63,1	GCTTCTGGATGCACGGTGG	SALK_003223
	SSADH_f2018	63,5	žádná	61,1	GCCCCAACAGCACTTGC	SALK_003223
	SSADH_f2090	63,7	slabá	44,0	GCTTGAACTATACAACCACTAGCG	SALK_003223
	SSADH_r2505	70,3	žádná	50,0	GCAAAGCATCCCCAATTCAGG	SALK_003223

Gen	Název primeru	Teplota nasedání primerů [°C]	Sekundární struktura	GC [%]	Sekvence (5'–3')	Linie
SSADH	SSADH_r2515	70,5	slabá	56,5	GGACTCGTAAGCAAAGCATCCCC	SALK_003223
	SSADH_r2689	69,2	žádná	54,5	GCAGCTGCCATCAACTTCTTCC	SALK_003223
	SAIL_1278_B12_fw	65,4	žádná	47,6	CGATTGAAGTTTGGGAAGTGG	SAIL_1278_B12
	SAIL_1278_B12_rev	66,0	velmi slabá	44,0	GAACTCCTAAGCTTTTCAGAAACGC	SAIL_1278_B12
	GK-737E05_fw	68,6	silná	56,5	GCAGATTGACTGCTGGAGAGAGG	GK-737E05
	GK-737E05_rev	70,2	žádná	63,2	CACGTTTTGCCTCCTCCGC	GK-737E05
GABA-T	SALK_007661_fw	65,4	střední	52,3	GTATGCCACTTGCATGTCTGG	SALK_007661
	SALK_007661_rev	67,9	střední	57,8	CGGCAGAAACAAGCCTTGG	SALK_007661
GLYR1	SALK_057410_fw	61,6	střední	47,8	CTGTATGGAACAGAACACTCTCC	SALK_057410
	SALK_057410_rev	69,2	slabá	44,0	GACATCAAAAGCTGGGATTGATTCC	SALK_057410

4.4.4.3 Elektroforéza v agarózovém gelu

Pro elektroforetickou separaci byl použit 1% agarózový gel v 1x TAE pufru. Přibližně 50 ml roztoku bylo nalito do formy na gel, následně bylo přidáno 12 μ l 0,5% ethidium bromidu. Gel byl promíchán pipetou a následně byl do něj umístěn hřebínek. Po ztuhnutí gelu (cca za 30 minut) byl hřebínek vyjmut a gel byl přenesen do elektroforetické komory. Do jamek bylo nanášeno 6 μ l jednotlivých vzorků amplifikovaných pomocí genově specifických primerů a primerů pro T-DNA inzerce. Mezi obě sady vzorků byl nanášen 1 μ l markeru molekulové hmotnosti. Elektroforetická separace byla nastavena na 30 minut při 100 V. Poté byl gel s rozseparovanými vzorky analyzován pomocí dokumentačního systému Gel Doc EZ Imager (Bio-Rad). Snímek byl pořízen a upraven v programu ImageLab™ Software.



Obr. 6 Markery molekulové hmotnosti. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (vlevo) a GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (vpravo) (ThermoFisher Scientific)

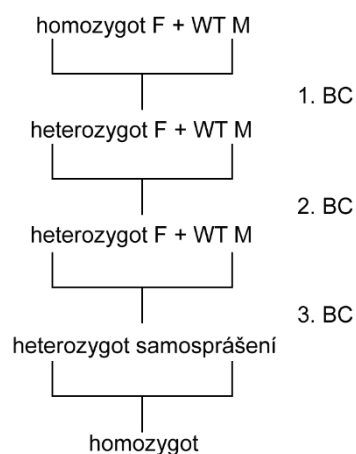
4.4.5 Zpětné křížení

Aby byla vyloučena vícečetná inzerce T-DNA v jiných místech genomu, bylo provedeno zpětné křížení neboli backcross (BC) vyselektovaného homozygota s inzerací v oblasti našeho zájmu. Pylem z homozygotní otcovské rostliny byly pod stereoskopickým mikroskopem opyleny květy WT mateřské rostliny, přitom byly vybírány uzavřené květy s patrnou bliznou, u kterých nemohlo proběhnout přenesení pylu z tyčinek na bliznu – samosprášení (Obr. 7). Opylený květ byl poté označen a přibližně za 2 týdny byly posbírány zralé šesule.



Obr. 7 Květy *A. thaliana*. Šipka označuje květ vhodný ke křížení (Foto: J. Zachovalová)

Potomstvo rostlin, u kterých bylo provedeno první zpětné křížení, podstoupilo genotypizaci za účelem selekce heterozygotních rostlin. Ty byly následně opět kříženy s WT (druhé zpětné křížení). Tento krok byl zopakován i v F2 (druhé filiální, dceřiné) generaci. Poté byl vybrán heterozygot v F3 generaci, u kterého proběhlo samosprášení. Semena byla nasazena a z vyklíčených rostlin byl nakonec vyselektován finální homozygot. Schéma křížení znázorňuje Obr. 8.



Obr. 8 Schéma křížení. BC, zpětné křížení neboli backcross; F, otcovská rostlina; M, mateřská rostlina; WT, wild type

5 VÝSLEDKY

V rámci bakalářské práce byly vybrány mutantní linie s T-DNA inzercí v jednom z devíti genů metabolismu GABA (*GAD1*, *GAD2*, *GAD3*, *GAD4*, *GAD5*, *SSADH*, *GABA-T*, *GLYR1*, *GLYR2*). Vypěstované rostliny byly následně genotypizovány metodou PCR, pomocí které byly vyselektovány homozygotní rostliny knock-outových linií daných genů. Aby byla eliminována případná inserce T-DNA v jiném místě genomu, bylo třikrát provedeno zpětné křížení, přičemž po třetím zpětném křížení u heterozygotních rostlin proběhlo samosprašení. Na závěr byla provedena konečná selekce homozygotní rostliny.

5.1 Volba inzerčních linií metabolismu GABA

Z NASC byly objednány linie s T-DNA inzercí na různých místech (exon, intron, promotor) genů našeho zájmu. Při výběru byly upřednostněny linie, jejichž genotypizace a následná selekce byla již dříve úspěšně provedena (Bouché a Fromm, 2004; Miyashita a Good, 2008).

Pro většinu genů bylo vybráno několik linií. Pouze linie FLAG_460F je ekotypu Ws, všechny ostatní linie jsou ekotypu Col-0.

GAD1: Pro gen *GAD1*, který je lokalizován na lokusu AT5G17330 chromozomu 5, byly vybrány čtyři knock-outové linie. U linií SALK_082173 (*GAD1-5*) a SALK_022227 (*GAD1-6*) je T-DNA inserce umístěna v intronu, zatímco u linie SALK_017810C a SALK_017931 v exonu.

GAD2: Gen *GAD2* je lokalizován na 1. chromozomu v lokusu AT1G65960. Byly objednány čtyři linie, z nichž u dvou byla T-DNA inserce v intronu (SAIL_842_A03.V1, SALK_028819), u jedné v exonu (GK-474E05) a u poslední v promotoru (SALK_053172).

GAD3: Gen *GAD3* je lokalizován na chromozomu 2 na lokusu AT2G02000. U všech zkoumaných linií (SALK_033307, SALK_006072, SAIL_440_E09) byla T-DNA inserce umístěna v intronu.

GAD4: Na lokusu AT2G02010 chromozomu 2 je lokalizován gen *GAD4*. Pro tento gen byli vybráni inzerční mutanti SALK_146398C a SALK_106240. Pozice inserce je u obou linií v exonu.

GAD5: Na chromozomu 3 v lokusu AT3G17760 se nachází gen *GAD5*. Byly objednány dvě linie, FLAG_460F07 a GK-546G01.09, T-DNA inserce je lokalizována v exonu.

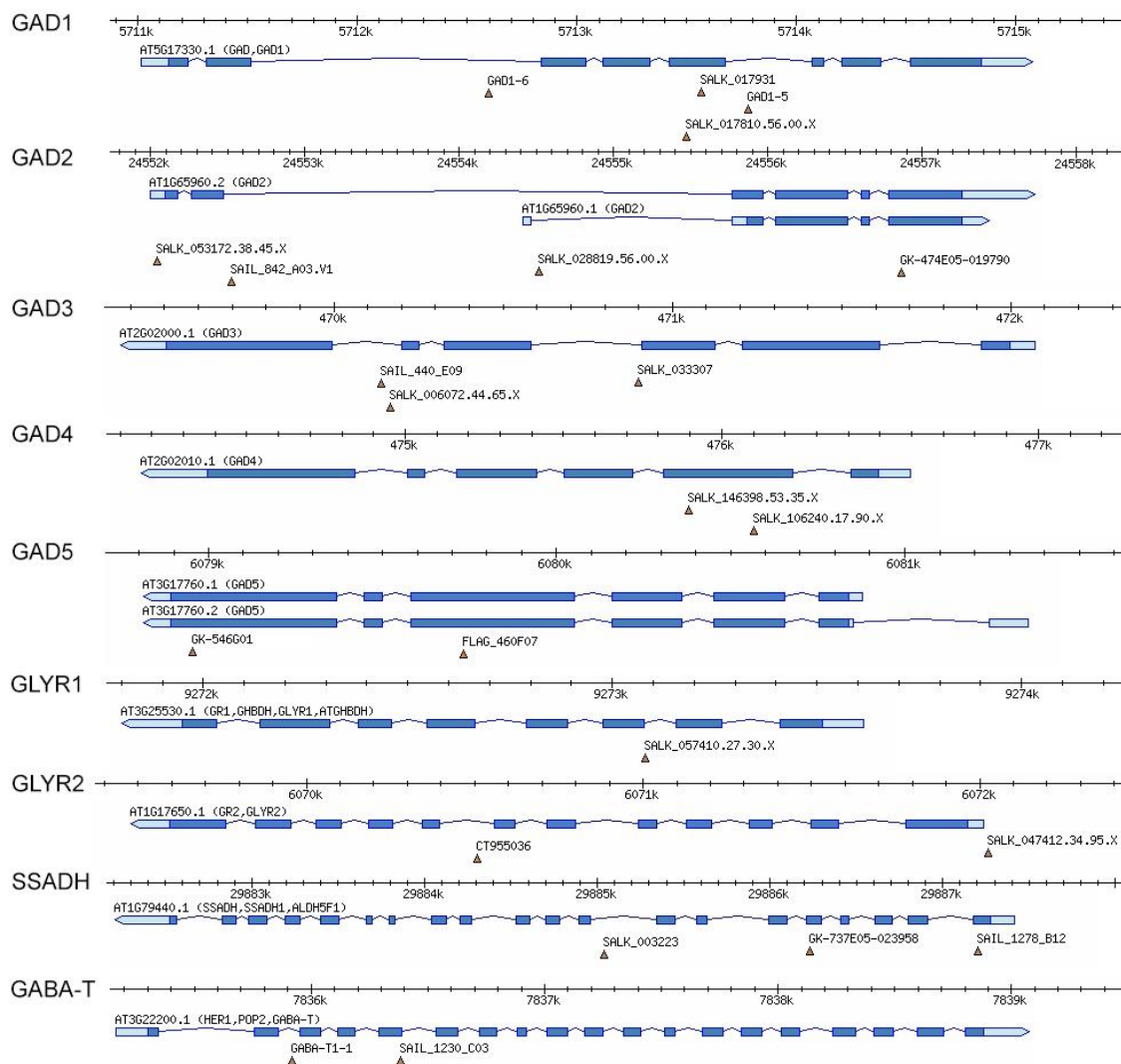
GLYR1: Gen *GLYR1* je lokalizován na 3. chromozomu v lokusu AT3G25530. U zvolené inzerční linie SALK_057410 je inzerce umístěn v intronu.

GLYR2: V případě genu *GLYR2* lokalizovaného v lokusu AT1G17650 chromozomu 1 byla zvolena inzerční linie SALK_047412, která nese inserci na 5' nepřekládané oblasti. Druhá linie GK-933D03 (označována také CT955036) má inserci lokalizovanou v intronu.

SSADH: Gen *SSADH* je lokalizován v lokusu AT1G79440 chromozomu 1. Byly objednány tři linie, SALK_003223 s insercí v intronu, SAIL_1278_B12 s insercí v exonu a GK-737E05 s insercí v exonu.

GABA-T: Posledním genem metabolismu GABA je gen *GABA-T*, který můžeme najít na 3. chromozomu v místě AT3G22200. Byly vybrány linie SALK_007661 (označována též jako pop2-8 či GABA-T1-1) a SAIL_1230_C03, první zmíněná linie obsahuje inserci v intronu, druhá v exonu.

Pozice všech zvolených insercí jednotlivých linií je uvedena na Obr. 9.



Obr. 9 Grafické znázornění pozice T-DNA inzercí v genech *GAD1*, *GAD2*, *GAD3*, *GAD4*, *GAD5*, *SSADH*, *GABA-T*, *GLYR1* a *GLYR2*

5.2 Testování primerů

Před samotným zahájením genotypizace bylo nutné vybrat pro jednotlivé geny nejlepší možné kombinace primerů. To bylo provedeno pomocí PCR, přičemž k primerům byla napipetována genomová DNA WT rostliny.

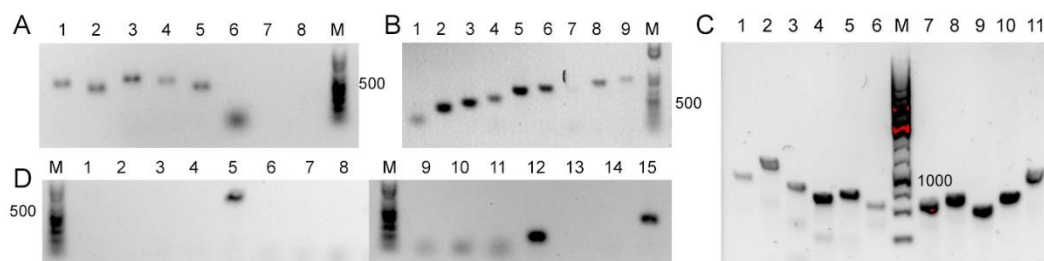
Při testování primerů pro gen *SSADH* vyšel v případě 1, 2, 3, 4 a 5 produkt o odpovídající velikosti. Pro kombinaci 6, 7 a 8 nevyšel žádný či vyšel pouze nespecifický produkt (Obr. 10A). Kombinace jsou uvedeny v Tab. 6.

Pro gen *GAD1* bylo otestováno 9 kombinací (Tab. 7), přičemž jako vhodné se jevíly kombinace 2, 3, 4, 5, a 6. Žádný produkt nevznikl v případě kombinací 1 a 7,

kombinace 8 a 9 dala za vznik velmi slabému produktu, proto jsou pro genotypizaci rovněž nevhodné (Obr. 10B).

Na Obr. 10C je vyobrazeno testování kombinací primerů pro geny *GAD1–5*, *SSADH*, *GABA-T* a *GLYR1* (Tab. 8). Ve všech případech vznikl poměrně silný produkt.

Posledními testovanými kombinacemi byly kombinace pro gen *GAD3* (Tab. 9). Jak je patrné na Obr. 10D, fungující kombinace primerů byly pouze 5, 12 a 15.



Obr. 10 Testy primerů pro geny **(A)** *SSADH*, **(B)** *GAD1*, **(C)** *GAD1* (1–3), *GAD2* (4), *GAD3* (5), *GAD4* (6–7), *GAD5* (8), *SSADH* (9), *GABA-T* (10) a *GLYR1* (11), **(D)** *GAD3*. M, marker molekulové hmotnosti

Tab. 6 Kombinace primerů pro gen *SSADH*

Kombinace	Forward primer	Reverse primer	Délka produktu (bp)
1	SSADH_f2018	SSADH_r2505	488
2	SSADH_f2090	SSADH_r2505	416
3	SSADH_f1977	SSADH_r2505	529
4	SSADH_f2018	SSADH_r2515	498
5	SSADH_f2090	SSADH_r2515	426
6	SSADH_f1977	SSADH_r2515	539
7	SSADH_f2018	SSADH_r2689	672
8	SSADH_f2090	SSADH_r2689	600

Tab. 7 Kombinace primerů pro gen *GAD1*

Kombinace	Forward primer	Reverse primer	Délka produktu (bp)
1	GAD1-5_f2646	GAD1_r2827	182
2	GAD1_f2489	GAD1_r2827	339
3	GAD1_f2422	GAD1_r2827	406
4	GAD1-5_f2646	GAD1-5_r3119	474
5	GAD1_f2489	GAD1-5_r3119	631
6	GAD1_f2422	GAD1-5_r3119	698
7	GAD1-5_f2646	GAD1-5_r3335	690
8	GAD1_f2489	GAD1-5_r3335	847
9	GAD1_f2422	GAD1-5_r3335	914

Tab. 8 Kombinace primerů pro geny *GAD1–5*, *SSADH*, *GABA-T* a *GLYR1*

Kombinace	Gen	Forward primer	Reverse primer	Délka produktu (bp)
1	<i>GAD1</i>	GAD1-6_f1480	GAD1_f2219	740
2	<i>GAD1</i>	GAD1-6_f1480	GAD1-6_r2467	988
3	<i>GAD1</i>	GAD1-5_f2646	GAD1-5_r3335	690
4	<i>GAD2</i>	SAIL_842_A03.V1_fw	SAIL_842_A03.V1_rev	584
5	<i>GAD3</i>	SALK_033307_fw	SALK_033307_rev	621
6	<i>GAD4</i>	SALK_106240_fw2	SALK_106240_rev	492
7	<i>GAD4</i>	SALK_146398C_fw	SALK_146398C_rev	523
8	<i>GAD5</i>	FLAG_460F07_fw	FLAG_460F07_rev	553
9	<i>SSADH</i>	SAIL_1278_B12_fw	SAIL_1278_B12_rev	430
10	<i>GABA-T</i>	SALK_007661_fw	SALK_007661_rev	547
11	<i>GLYR1</i>	SALK_057410	SALK_057410	808

Tab. 9 Kombinace primerů pro gen *GAD3*

Kombinace	Forward primer	Reverse primer	Délka produktu (bp)
1	SAIL_f1705	SAIL_r2390	686
2	SALK_f1617	SAIL_r2390	774
3	SALK_f1665	SAIL_r2390	726
4	SALK_f1493	SAIL_r2390	898
5	SAIL_f1705	SAIL_r2286	582
6	SALK_f1617	SAIL_r2286	670
7	SALK_f1665	SAIL_r2286	622
8	SALK_f1493	SAIL_r2286	794
9	SAIL_f1705	SAIL_r2421	717
10	SALK_f1617	SAIL_r2421	805
11	SALK_f1665	SAIL_r2421	757
12	SALK_f1493	SALK_r1859	367
13	SAIL_f1705	SALK_r1859	155
14	SAIL_f1705	SALK_r2231	527
15	SAIL_f1705	SALK_r2108	404

5.3 Selektce homozygotních linií

Selektce homozygotních linií byla prováděna pomocí metody PCR. Byly provedeny dvě PCR reakce, jedna s genově specifickými primery, druhá s primerem specifickým pro inzert a opačně orientovaným genově specifickým primerem. Na základě výsledku elektroforetické separace bylo možné identifikovat genotyp rostlin, tedy jestli se jednalo o homozygota, heterozygota či WT.

Pro linii SALK_082173 (v literatuře označována jako *gad1-5*) s inzercí v genu *GAD1* byly testovány 4 rostliny, z nichž první byla heterozygotní, třetí homozygotní, pro druhou a čtvrtou nevznikl žádný produkt (Obr. 11B). Byly použity primery GAD1-5_f2646/GAD1-5_r3335 pro WT alelu a GAD1-5_f2646/LBa1 pro KO alelu.

Rostliny inzerční linie GK-474E05, u níž je T-DNA inzerce v genu *GAD2*, byly genotypizovány za využití primerů GK-47405_fw/GK-474E05_rev pro WT alelu a o8760/GK-474E05_rev pro KO alelu. Obě genotypizované rostliny byly homozygotní (Obr. 11E).

Tři rostliny linie SALK_006072 s inzercí v genu *GAD3* byly podrobeny genotypizování, přičemž všechny tři testované rostliny byly vyhodnoceny jako

homozygotní pro danou inzerci. Byly použity primery SAIL_f1705/SALK_r2108 pro WT alelu a SAIL_f1705/LBa1 pro KO alelu (Obr. 11F).

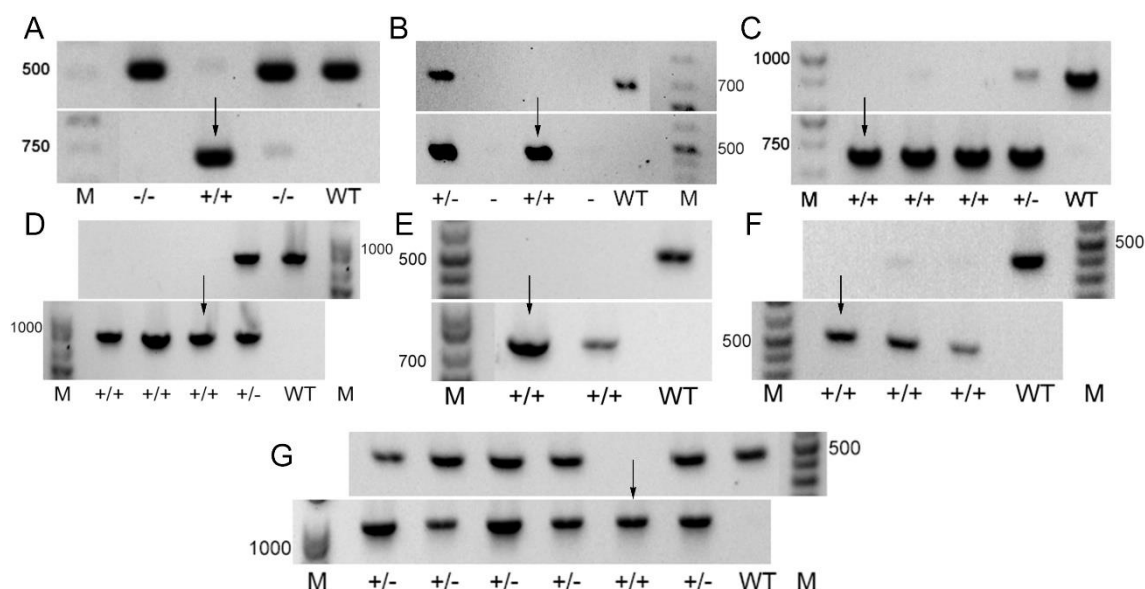
Pro gen *GAD4* byla úspěšná selekce homozygotní rostliny v případě linie SALK_146398C. První tři rostliny byly homozygotní pro inzerci, čtvrtá rostlina byla heterozygotní (Obr. 11C). PCR reakce proběhla za využití kombinace primerů SALK_106240_fw/SALK_146398C_rev pro WT alelu a LBa1/SALK_146398C_rev pro KO alelu.

Pro linii GK-546G01.09 s inzercí v genu *GAD5* bylo nasazeno 6 rostlin, všechny rostliny byly heterozygotní s výjimkou rostliny č. 5, která byla homozygotní (Obr. 11G). Použité primery byly GK-546G01_f1556/GK-546G01_r2046 pro WT alelu a GK-546G01_f1556/o8760 pro KO alelu.

Pro gen *GLYR1* byla selekce úspěšná v případě linie SALK_057410. První tři rostliny byly homozygotní, u čtvrté se jednalo o heterozygota (Obr. 11D). Byly použity primery SALK_057410_fw/SALK_057410_rev pro WT alelu a LBa1/SALK_057410_rev pro KO alelu.

V případě linie SALK_007661 (gen *GABA-T*) bylo provedeno genotypizování tří rostlin. První a třetí rostlina byly vyhodnoceny jako WT, druhá rostlina je homozygotní (Obr. 11A). Byla použita kombinace primerů SALK_007661_fw/SALK_007661_rev pro WT alelu a LBa1/SALK_007661_rev pro KO alelu.

I přes extenzivní genotypizování se nepodařilo nalézt homozygotní rostliny u následujících linií: SALK_017810C, SALK_022227 a SALK_017931 pro gen *GAD1*, SAIL_842_A03.V1 a SALK_028819 pro gen *GAD2*, SALK_033307 a SAIL_440_E09 pro *GAD3*, SALK_106240 pro *GAD4*, pro *SSADH* všechny tři zastoupené linie SALK_003223, SAIL_1278_B12 a GK-737E05 a pro *GLYR2* linie GK-933D03. U linie FLAG_460F07 byl vyselektován homozygot, nicméně z důvodu odlišného ekotypu bylo rozhodnuto v křížení nepokračovat. Linie SALK_053172 (*GAD2*), SAIL_1230_C03 (*GABA-T*) a SALK_047412 (*GLYR2*) nebyly v rámci bakalářské práce testovány.



Obr. 11 Výsledek elektroforetické separace PCR produktů s primery pro WT alelu (nahore) a KO alelu (dole) při selekci homozygotních rostlin. Linie s inzercí v genech **(A)** *GABA-T*, **(B)** *GAD1*, **(C)** *GAD4*, **(D)** *GLYR1*, **(E)** *GAD2*, **(F)** *GAD3*, **(G)** *GAD5*. Šipky značí homozygotní rostliny, u kterých bylo provedeno první zpětné křížení. M, marker molekulové hmotnosti; WT, wild type; -/-, bez inserce, +/-, heterozygot pro inserci; +/+, homozygot pro inserci

5.4 Zpětné křížení a následná selekce homozygota

Homozygotní rostliny byly třikrát kříženy a poté u nich proběhlo samosprášení. V Tab. 10 je uvedeno stádium, do kterého dospěla konkrétní linie.

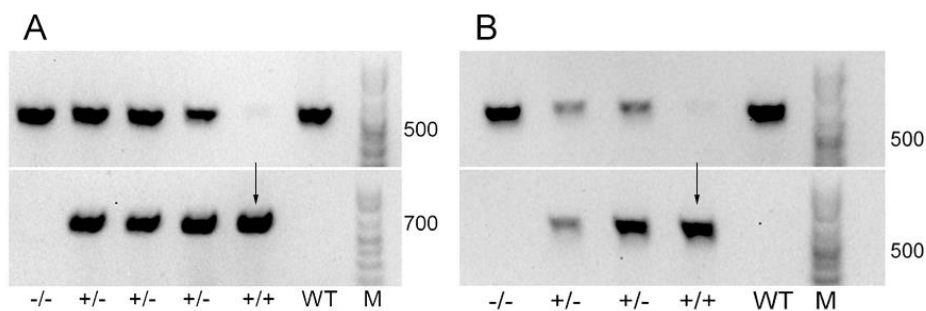
Tab. 10 Stádium křížení jednotlivých T-DNA inserčních linií

Gen	Linie	Stádium
<i>GAD1</i>	SALK_082173	finální homozygot
<i>GAD2</i>	GK-474E05	po 2. zpětném křížení
<i>GAD3</i>	SALK_006072	homozygot
<i>GAD4</i>	SALK_146398C	po samosprášení
<i>GAD5</i>	GK-546G01.09	po 2. zpětném křížení
<i>GABA-T</i>	SALK_007661	finální homozygot
<i>GLYR1</i>	SALK_057410	po 2. zpětném křížení

U dvou linií byla provedena všechna tři zpětná křížení, samosprášení heterozygotních rostlin a finální selekce homozygotních rostlin. Jedná se o linie SALK_007661 (gen *GABA-T*) a SALK_082173 (gen *GAD1*).

SALK_007661 je linie s inzercí v genu *GABA-T*. Bylo provedeno genotypizování čtyř rostlin, z nichž první čtyři byly heterozygoti, pátá byla homozygot (Obr. 12A). Zvolené kombinace primerů byly SALK_007661_fw/SALK_007661_rev pro WT alelu a LBa1/SALK_007661_rev pro KO alelu.

V případě linie SALK_082173 (gen *GAD1*) byla první rostlina vyhodnocena jako WT, druhá a třetí jako heterozygot a čtvrtá jako homozygot (Obr 12B). PCR reakce proběhla za využití kombinací primerů GAD1_f2489/GAD1-5_r3119 pro WT alelu a GAD1_f2489/LBa1 pro KO alelu.



Obr. 12 Výsledek elektroforetické separace PCR produktů s primery pro WT alelu (nahore) a KO alelu (dole) při selekci finálních homozygotních rostlin. Linie s inzercí v genech **(A)** *GABA-T*, **(B)** *GAD1*. Šipky značí finální homozygotní rostliny. M, marker molekulové hmotnosti; WT, wild type; -/-, bez inzerce, +/-, heterozygot pro inzerci; +/+, homozygot pro inzerci

6 DISKUSE

Cílem této bakalářské práce bylo vyselektovat homozygotní rostliny pro T-DNA inserce v genech metabolismu GABA, které budou následně použity pro popsání role GABA během environmentálního stresu. Tento přístup je typický pro tzv. reverzní genetiku, kdy je známá sekvence genu, ale ne jeho přesná úloha. Na téma úloha genů metabolismu GABA byly publikovány četné práce popisující změny jejich exprese v odpovědi na různé stresy (Renault *et al.*, 2010; Renault *et al.*, 2013; Miyashita a Good, 2008; Urano *et al.*, 2009). Jednotlivé práce ovšem vždy popisují vliv jednoho nebo jen několika stresů po různě dlouhou dobu. Stále chybí komplexní práce porovnávající roli GABA během různých stresů za stejných podmínek ve stejných časových intervalech.

Selekce homozygotních rostlin v těchto genech byla provedena již dříve. Mekonnen *et al.* (2016) použili ve své práci T-DNA inzerční linie SALK 017810 (*gad1*) a GK-474E05 (*gad2*), Miyashita a Good (2008) pracovali s liniemi SALK_007661 (*gaba-t1-1*), SALK_022227 (*gad1-6*) a SALK_082173 (*gad1-5*), Allan *et al.* (2012) zvolili linii SALK_047412 (*glyr2*). Na základě těchto publikací byly zmíněné linie vybrány. Pro ostatní geny byla snaha vybrat linie s inzercí v exonu co nejbližší promotoru, právě tak vzniká knock-out s nefunkčním genem. Nicméně i inserce do intronu v kódující sekvenci má za následek vznik knock-outované rostliny, byť může sestřihem intronů dojít k produkci WT transkriptu (Wang, 2008).

Z hlediska výběru linií se nejvíce osvědčila linie SALK_146398C pro *GAD4*, kde „C“ v názvu označuje linii jako tzv. „confirmed“, tedy potvrzenou, a všechna semena této linie skutečně vykazovala homozygotní konstituci pro danou inserci v genu. Naopak špatných výsledků bylo obecně dosaženo s liniemi SAIL (Syngenta *Arabidopsis* Insertion Library) pro geny *GAD2* (SAIL_842_A03.V1), *GAD3* (SAIL_440_E09) a *SSADH* (SAIL_1278_B12), kde se ani přes rozsáhlé genotypizování desítek rostlin nepodařilo vyselektovat jediného homozygota, a to ani po doporučené selekci BASTA herbicidem (negativní výsledky nebyly z důvodu rozsáhlosti prezentovány).

Nebylo dosaženo vyselektování mutantních *ssadh* a *glyr2* rostlin, semena linie GK-933D03 s inzercí v genu *GLYR2* dokonce nevyklíčila. Prioritou je vyzkoušet pro tyto geny další linie, jako vhodní kandidáti se jeví linie GK-656B03-022841 pro gen *SSADH*, u které se inserce nachází v exonu, a SALK_047412 pro gen *GLYR2* s T-DNA inzercí v 5' nepřekládané oblasti, která nebyla kvůli umístění inserce v promotoru v rámci této

bakalářské původně práce testována, nicméně jiná výzkumná skupina byla v selekci homozygotních semen u této linie úspěšná (Allan *et al.*, 2012).

Po inzerci nemusí dojít ke vzniku rostliny s nefunkčním genem, ale může také vzniknout knock-down se sníženou expresí genu (Krysan *et al.*, 1999). Proto je nutné ověřit expresi knock-outovaných genů na úrovni RNA pomocí semikvantitativní PCR. Tento postup je doporučován zejména pokud se jedná o inzerci v intronu, z linií použitých v této práci se to týká SALK_082173 (*GAD1*), SALK_006072 (*GAD3*), SALK_057410 (*GLYR1*) a SALK_007661 (*GABA-T*).

V budoucnosti je plánována příprava dalších homozygotních linií pro veškeré geny, aby bylo možné potvrdit, že inserce na libovolném místě genu má za následek stejný mutantní fenotyp. Homozygotní linie budou mezi sebou kříženy tak, aby vznikli dvojnásobní (double) a trojnásobní (triple) mutanti, kteří budou podrobeni fenotypizační analýze na vysokokapacitní platformě OloPhen za účelem testování odpovědi těchto mutantů na různé druhy environmentálního stresu. V rámci dalšího výzkumu je záměrem použít vyselektované knock-outované rostliny k posouzení metabolismu GABA v kontextu metabolismu polyaminů a rostlinných hormonů, tedy dalších „klíčových hráčů“ v rámci rostlinného stresu.

7 ZÁVĚR

V rámci teoretické části bakalářské práce byl vypracován literární přehled týkající se biosyntézy a metabolismu GABA se zaměřením na její roli během rostlinných stresů, a to zejména v modelovém organismu *A. thaliana*.

Experimentální část bakalářské práce zahrnovala selekci homozygotních rostlin inzerčních linií *A. thaliana* s T-DNA inzercí v genech metabolismu GABA, dále pak jejich zpětné křížení, samosprášení a závěrečnou selekci finální homozygotní rostliny. Z devíti zvolených genů byla úspěšná selekce u sedmi genů, a to u linií SALK_082173 genu *GAD1*, GK-474E05 genu *GAD2*, SALK_006072 genu *GAD3*, SALK_146398C genu *GAD4*, GK-546G01.09 genu *GAD5*, SALK_007661 genu *GABA-T* a SALK_057410 genu *GLYR1*. U zbývajících dvou genů zastoupených inzerčními liniemi GK-933D03 a SALK_047412 v případě genu *GLYR2* a SALK_003223 a SAIL_1278_B12 v případě genu *SSADH* se bohužel nepodařilo vyselektovat homozygotní rostliny. Selektce finální homozygotní rostliny po zpětném křížení a samosprášení bylo dosaženo u linií SALK_082173 genu *GAD1* a SALK_007661 genu *GABA-T*.

V budoucnosti je plánováno dokončení selekce finálních homozygotních rostlin i pro zbývajících uvedených linií. Tyto linie budou využity v následných experimentech.

8 LITERATURA

- Akama K., Akihiro T., Kitagawa M., Takaiwa F. (2001): Rice (*Oryza sativa*) contains a novel isoform of glutamate decarboxylase that lacks an authentic calmodulin-binding domain at the C-terminus. *Biochimica et Biophysica Acta* 1522: 143–50.
- Akihiro T., Koike S., Tani R., Tominaga T., Watanabe S., Iijima Y., Aoki K., Shibata D., Ashihara H., Matsukura C., Akama K., Fujimura T., Ezura H. (2008): Biochemical mechanism on GABA accumulation during fruit development in tomato. *Plant and Cell Physiology* 49: 1378–1389.
- Allan W. L., Breitskreuz K. E., Waller J. C., Simpson J. P., Hoover G. J., Rochon A., Wolyn D. J., Rentsch D., Snedden W. A., Shelp B. J. (2012): Detoxification of succinate semialdehyde in *Arabidopsis* glyoxylate reductase and NAD kinase mutants subjected to submergence stress. *Botany* 90: 51–61.
- Alonso J. M., Stepanova A. N., Leisse T. J., Kim C. J., Chen H., Shinn P., Stevenson D. K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C. C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D. E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W. L., Berry C. C., Ecker J. R. (2003): Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301: 653–657.
- Ansari M. I., Lee R. H., Chen S. C. G. (2005): A novel senescence-associated gene encoding γ -aminobutyric acid (GABA):pyruvate transaminase is upregulated during rice leaf senescence. *Physiologia Plantarum* 123: 1–8.
- Baum G., Chen Y., Arazi T., Takatsuji H., Fromm H. (1993): A plant glutamate decarboxylase containing a calmodulin binding domain. Cloning, sequence, and functional analysis. *Journal of Biological Chemistry* 268: 19610–19617.
- Bouché N., Fait A., Bouchez D., Moller S. G., Fromm H. (2003): Mitochondrial succinic-semialdehyde dehydrogenase of the γ -aminobutyrate shunt is required to restrict levels of reactive oxygen intermediates in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 100: 6843–6848.
- Bouché N., Fromm H. (2004): GABA in plants: just a metabolite? *Trends in Plant Science* 9: 110–115.
- Bown A. W., Hall D. E., MacGregor K. B. (2002): Insect footsteps on leaves stimulate

- the accumulation of 4-aminobutyrate and can be visualized through increased chlorophyll fluorescence and superoxide production. *Plant Physiology* 129: 1430–1434.
- Breitkreuz K. E., Allan W. L., Van Cauwenberghe O. R., Jakobs C., Talibi D., André B., Shelp B. J. (2003): A novel γ -hydroxybutyrate dehydrogenase: identification and expression of an *Arabidopsis* cDNA and potential role under oxygen deficiency. *Journal of Biological Chemistry* 278: 41552–41556.
- Breitkreuz K. E., Shelp B. J. (1995): Subcellular compartmentation of the 4-aminobutyrate shunt in protoplasts from developing soybean cotyledons. *Plant Physiology* 108: 99–103.
- Breitkreuz K. E., Shelp B. J., Fischer W. N., Schwacke R., Rentsch D. (1999): Identification and characterization of GABA, proline and quaternary ammonium compound transporters from *Arabidopsis thaliana*. *FEBS Letters* 450: 280–284.
- Busch K. B., Fromm H. (1999): Plant succinic semialdehyde dehydrogenase. Cloning, purification, localization in mitochondria, and regulation by adenine nucleotides. *Plant Physiology* 121: 589–598.
- Clark S. M., Di Leo R., Dhanoa P. K., Van Cauwenberghe O. R., Mullen R. T., Shelp B. J. (2009): Biochemical characterization, mitochondrial localization, expression, and potential functions for an *Arabidopsis* γ -aminobutyrate transaminase that utilizes both pyruvate and glyoxylate. *Journal of Experimental Botany* 60: 1743–1757.
- Diaz C., Purdy S., Christ A., Morot-Gaudry J. F., Wingler A., Masclaux-Daubresse C. (2005): Characterization of markers to determine the extent and variability of leaf senescence in *Arabidopsis*. A metabolic profiling approach. *Plant Physiology* 138: 898–908.
- Dinh T. T., Luscher E., Li S., Liu X., Won S. Y. (2014): Genetic screens for floral mutants in *Arabidopsis thaliana*: enhancers and suppressors. *Methods in Molecular Biology* 1110: 127–156.
- Fait A., Fromm H., Walter D., Galili G., Fernie A. R. (2008): Highway or byway: the metabolic role of the GABA shunt in plants. *Trends in Plant Science* 13: 14–19.
- Fernie A. R., Roscher A., Ratcliffe R. G., Kruger N. J. (2001): Fructose 2,6-bisphosphate activates pyrophosphate: fructose-6-phosphate 1-phosphotransferase and increases triose phosphate to hexose phosphate cycling in heterotrophic cells. *Planta* 212: 250–263.

- Fischer W. N., Kwart M., Hummel S., Frommer W. B. (1995): Substrate-specificity and expression profile of amino-acid transporters (AAPs) in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 270: 16315–16320.
- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16–37.
- Grallath S., Weimar T., Meyer A., Gummy C., Suter-Grotemeyer M., Neuhaus J. M., Rentsch D. (2005): The AtProT Family. Compatible solute transporters with similar substrate specificity but differential expression patterns. *Plant Physiology* 137: 117–126.
- Hoover G. J., Van Cauwenberghe O. R., Breitkreuz K. E., Clark S. M., Merrill A. R., Shelp B. J. (2007): Characteristics of an *Arabidopsis* glyoxylate reductase: general biochemical properties and substrate specificity for the recombinant protein, and developmental expression and implications for glyoxylate and succinic semialdehyde metabolism *in planta*. *Botany* 85: 883–95.
- Hruz T., Laule O., Szabo G., Wessendorp F., Bleuler S., Oertle L., Widmayer P., Gruissem W., Zimmermann P. (2008): Genevestigator V3: a reference expression database for the meta-analysis of transcriptomes. *Advances in Bioinformatics* 2008: 1–5.
- Chaffei C., Pageau K., Suzuki A., Gouia H., Ghorbel M. H., Masclaux-Daubresse C. (2004): Cadmium toxicity induced changes in nitrogen management in *Lycopersicon esculentum* leading to a metabolic safeguard through an amino acid storage strategy. *Plant & Cell Physiology* 45: 1681–93.
- Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell* 11: 263–271.
- Ching S. L. K., Gidda S. K., Rochon A., Van Cauwenberghe O. R., Shelp B. J., Mullen R. T. (2012): Glyoxylate reductase isoform 1 is localized in the cytosol and not peroxisomes in plant cells. *Journal of Integrative Plant Biology* 54: 152–168.
- Kinnersley A. M., Turano F. J. (2000): Gamma aminobutyric acid (GABA) and plant responses to stress. *Critical Reviews in Plant Sciences* 19: 479–509.
- Kleinboelting N., Huep G., Kloetgen A., Viehoveer P., Weisshaar B. (2012): GABI-Kat SimpleSearch: new features of the *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutant database. *Nucleic Acids Research* 40: 1211–1215.

- Krysan P. J., Young J. C., Sussman M. R. (1999): T-DNA as an insertional mutagen in *Arabidopsis*. *The Plant Cell Online* 11: 2283–2290.
- Kulbat K. (2016): The role of phenolic compounds in plant resistance. *Biotechnology and Food Sciences* 80: 97–108.
- Kumar N., Dubey A. K., Upadhyay A. K., Gautam A., Ranjan R., Srikishna S., Sahu N., Behera S. K., Mallick S. (2017): GABA accretion reduces *Lsi-1* and *Lsi-2* gene expressions and modulates physiological responses in *Oryza sativa* to provide tolerance towards arsenic. *Scientific Reports* 7: 1–11.
- Ludewig F., Hüser A., Fromm H., Beauclair L., Bouché N. (2008): Mutants of GABA transaminase (*POP2*) suppress the severe phenotype of succinic semialdehyde dehydrogenase (*ssadh*) mutants in *Arabidopsis*. *PLoS ONE* 3: e3383.
- Meinke D. W., Cherry J. M., Dean C., Rounsley S. D., Koornneef M. (1998): *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* 282: 662, 679–682.
- Mekonnen D. W., Flügge U. I., Ludewig F. (2016): Gamma-aminobutyric acid depletion affects stomata closure and drought tolerance of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Science* 245: 25–34.
- Meyer A., Eskandari S., Grallath S., Rentsch D. (2006): AtGAT1, a high affinity transporter for γ -aminobutyric acid in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 7197–7204.
- Michaeli S., Fait A., Lagor K., Nunes-Nesi A., Grillich N., Yellin A., Bar D., Khan M., Fernie A. R., Turano F. J., Fromm H. (2011): A mitochondrial GABA permease connects the GABA shunt and the TCA cycle, and is essential for normal carbon metabolism. *Plant Journal* 67: 485–498.
- Minocha R., Majumdar R., Minocha S. C. (2014): Polyamines and abiotic stress in plants: A complex relationship. *Frontiers in Plant Science* 5: 1–17.
- Miyashita Y., Good A. G. (2008): Contribution of the GABA shunt to hypoxia-induced alanine accumulation in roots of *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* 49: 92–102.
- Munns R., Tester M. (2008): Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology* 59: 651–681.
- Narayan V. S., Nair P. M. (1990): Metabolism, enzymology and possible roles of 4-aminobutyrate in higher plants. *Phytochemistry* 29: 367–375.
- Naylor A. W., Tolbert N. E. (1956): Glutamic acid metabolism in green and etiolated barley leaves. *Physiologia Plantarum* 9: 220–229.

- O'Malley R. C., Barragan C. C., Ecker J. R. (2015): A user's guide to the *Arabidopsis* T-DNA insertion mutant collections. *Methods in Molecular Biology* 1284: 323–342.
- O'Malley R. C., Ecker J. R. (2010): Linking genotype to phenotype using the *Arabidopsis* unimutant collection. *Plant Journal* 61: 928–940.
- Palanivelu R., Brass L., Edlund A. F., Preuss D. (2003): Pollen tube growth and guidance is regulated by *POP2*, an *Arabidopsis* gene that controls GABA levels. *Cell* 114: 47–59.
- Passardi F., Dobias J., Valério L., Guimil S., Penel C., Dunand C. (2007): Morphological and physiological traits of three major *Arabidopsis thaliana* accessions. *Journal of Plant Physiology* 164: 980–992.
- Podlešáková K., Ugena L., Spíchal L., Doležal K., De Diego N. (2018): Phytohormones and polyamines regulate plant stress responses by altering GABA pathway. *New Biotechnology*, v revizním řízení.
- Rai V. K. (2002): Role of amino acids in plant responses to stresses. *Biologia Plantarum* 45: 481–487.
- Ramputh A. I., Bown A. W. (1996): Rapid γ -aminobutyric acid synthesis and the inhibition of the growth and development of oblique-banded leaf-roller larvae. *Plant Physiology* 111: 1349–1352.
- Reddy A. S. N., Ali G. S., Celesnik H., Day I. S. (2011): Coping with stresses: roles of calcium- and calcium/calmodulin-regulated gene expression. *The Plant Cell* 23: 2010–2032.
- Reed L. J. (1950): The occurrence of γ -aminobutyric acid in yeast extract: its isolation and identification. *Journal of Biological Chemistry* 183: 451–458.
- Renault H., El Amrani A., Berger A., Mouille G., Soubigou-Taconnat L., Bouchereau A., Deleu C. (2013): γ -Aminobutyric acid transaminase deficiency impairs central carbon metabolism and leads to cell wall defects during salt stress in *Arabidopsis* roots. *Plant, Cell and Environment* 36: 1009–1018.
- Renault H., Roussel V., El Amrani A., Arzel M., Renault D., Bouchereau A., Deleu C. (2010): The *Arabidopsis pop2-1* mutant reveals the involvement of GABA transaminase in salt stress tolerance. *BMC Plant Biology* 10: 1–16.
- Rentsch D., Hirner B., Schmelzer E., Frommer W. B. (1996): Salt stress-induced proline transporters and salt stress-repressed broad specificity amino acid permeases identified by suppression of a yeast amino acid permease-targeting mutant. *Plant Cell* 8: 1437–1446.

- Roberts E. (1988): The establishment of GABA as a neurotransmitter. In: Squires R. F. (ed.): GABA and Benzodiazepine Receptors, pp. 1–21, CRC Press, Boca Raton.
- Roberts E., Frankel S. (1950): γ -aminobutyric acid in brain: its formation from glutamic-acid. *Journal of Biological Chemistry* 187: 55–63.
- Rosso M. G., Li Y., Strizhov N., Reiss B., Dekker K., Weisshaar B. (2003): An *Arabidopsis thaliana* T-DNA mutagenized population (GABI-Kat) for flanking sequence tag-based reverse genetics. *Plant Molecular Biology* 53: 247–259.
- Sessions A., Burke E., Presting G., Aux G., McElver J., Patton D., Dietrich B., Ho P., Bacwaden J., Ko C., Clarke J. D., Cotton D., Bullis D., Snell J., Miguel T., Hutchison D., Kimmerly B., Mitzel T., Katagiri F., Glazebrook J., Law M., Goff S. A. (2002): A high-throughput *Arabidopsis* reverse genetics system. *The Plant Cell* 14: 2985–2994.
- Shelp B. J., Bown A. W., McLean M. D. (1999): Metabolism and functions of gamma-aminobutyric acid. *Trends in Plant Science* 4: 446–452.
- Shelp B. J., Bozzo G. G., Trobacher C. P., Zarei A., Deyman K. L., Brikis C. J. (2012a): Hypothesis/review: contribution of putrescine to 4-aminobutyrate (GABA) production in response to abiotic stress. *Plant Science* 193–194: 130–135.
- Shelp B. J., Bozzo G. G., Zarei A., Simpson J. P., Trobacher C. P., Allan W. L. (2012b): Strategies and tools for studying the metabolism and function of γ -aminobutyrate in plants. II. Integrated analysis. *Botany* 90: 781–793.
- Shelp B. J., Zarei A. (2017): Subcellular compartmentation of 4-aminobutyrate (GABA) metabolism in *Arabidopsis*: an update. *Plant Signaling & Behavior* 12: e1322244
- Signorelli S., Dans P. D., Coitiño E. L., Borsani O., Monza J. (2015): Connecting proline and γ -aminobutyric acid in stressed plants through non-enzymatic reactions. *PLoS ONE* 10: e0115349.
- Snedden W. A., Arazi T., Fromm H., Shelp B. J. (1995): Calcium/calmodulin activation of soybean glutamate decarboxylase. *Plant Physiology* 108: 543–549.
- Snedden W. A., Koutsia N., Baum G., Fromm H. (1996): Activation of a recombinant petunia glutamate decarboxylase by calcium/calmodulin or by a monoclonal antibody which recognizes the calmodulin binding domain. *Biochemistry* 271: 4148–4153.
- Snowden C. J., Thomas B., Baxter C. J., Smith J. A. C., Sweetlove L. J. (2015): A tonoplast Glu/Asp/GABA exchanger that affects tomato fruit amino acid composition. *Plant Journal* 81: 651–660.

- Steward F. C., Thompson J. F., Dent C. E. (1949): γ -aminobutyric acid: a constituent of the potato tuber? *Science* 110: 439–440.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000): Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408: 796–815.
- Trobacher C. P., Zarei A., Liu J., Clark S. M., Bozzo G. G., Shelp B. J. (2013): Calmodulin-dependent and calmodulin-independent glutamate decarboxylases in apple fruit. *BMC Plant Biology* 13: 144.
- Turano F. J., Fang T. K. (1998): Characterization of two glutamate decarboxylase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiology* 117: 1411–1421.
- Urano K., Maruyama K., Ogata Y., Morishita Y., Takeda M., Sakurai N., Suzuki H., Saito K., Shibata D., Kobayashi M., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2009): Characterization of the ABA-regulated global responses to dehydration in *Arabidopsis* by metabolomics. *Plant Journal* 57: 1065–1078.
- Van Cauwenberghe O. R., Makhmoudova A., McLean M. D., Clark S. M., Shelp B. J. (2002): Plant pyruvate-dependent gamma-aminobutyrate transaminase: identification of an *Arabidopsis* cDNA and its expression in *Escherichia coli*. *Canadian Journal of Botany* 80: 933–941.
- Wang C., Fan L., Gao H., Wu X., Li J., Lv G., Gong B. (2014): Polyamine biosynthesis and degradation are modulated by exogenous gamma-aminobutyric acid in root-zone hypoxia-stressed melon roots. *Plant Physiology and Biochemistry* 82: 17–26.
- Wang Y. H. (2008): How effective is T-DNA insertional mutagenesis in *Arabidopsis*? *Journal of Biochemical Technology* 1: 11–20.
- Wani S. H., Kumar V., Shriram V., Sah S. K. (2016): Phytohormones and their metabolic engineering for abiotic stress tolerance in crop plants. *Crop Journal* 4: 162–176.
- Wu C., Zhou S., Zhang Q., Zhao W., Peng Y. (2006): Molecular cloning and differential expression of an γ -aminobutyrate transaminase gene, *OsGABA-T*, in rice (*Oryza sativa*) leaves infected with blast fungus. *Journal of Plant Research* 119: 663–669.
- Yong B., Xie H., Li Z., Li Y. P., Zhang Y., Nie G., Zhang X. Q., Ma X., Huang L. K., Yan Y. H., Peng Y. (2017): Exogenous application of GABA improves PEG-induced drought tolerance positively associated with GABA-shunt, polyamines, and proline metabolism in white clover. *Frontiers in Physiology* 8: 1–15.
- Yu G. H., Zou J., Feng J., Peng X. B., Wu J. Y., Wu Y. L., Palanivelu R., Sun M. X. (2014): Exogenous γ -aminobutyric acid (GABA) affects pollen tube growth via

modulating putative Ca^{2+} -permeable membrane channels and is coupled to negative regulation on glutamate decarboxylase. *Journal of Experimental Botany* 65: 3235–3248.

Zarei A., Brikis C. J., Bajwa V. S., Chiu G. Z., Simpson J. P., DeEll J. R., Bozzo G. G., Shelp B. J. (2017): Plant glyoxylate/succinic semialdehyde reductases: comparative biochemical properties, function during chilling stress, and subcellular localization. *Frontiers in Plant Science* 8: 1–13.

Zik M., Arazi T., Snedden W. A., Fromm H. (1998): Two isoforms of glutamate decarboxylase in *Arabidopsis* are regulated by calcium/calmodulin and differ in organ distribution. *Plant Molecular Biology* 37: 967–975.