

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Molekulární a fenotypová charakterizace transgenních
linií ječmene s modifikovanou expresí mitogenem
aktivované protein kinasy MPK4**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor: **Elizaveta Chubar**
Studijní program: B1406 Biochemie
Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia: Prezenční
Vedoucí práce: **Pavel Křenek, Ing. Ph.D.**
Rok: 2018

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce Ing. Pavlu Křenkovi Ph.D. za neocenitelnou pomoc při zpracování této práce, pochopení a trpělivost a také všem členům Oddělení buněčné biologie CRH za poskytnutou pomoc. Dále bych chtěla také poděkovat mé rodině za podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Elizaveta Chubar
Název práce	Molekulární a fenotypová charakterizace transgenních linií ječmene s modifikovanou expresí mitogenem aktivované protein kinasy MPK4
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Centrum regionu Haná
Vedoucí práce	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018

Abstrakt

Pomocí molekulárních a fyziologických metod byly charakterizovány transgenní linie ječmene s umlčením genu *HvMPK4* (RNAi) a transgenní linie ječmene s nadprodukcí genu *HvMPK4* (nadprodukční). PCR genotypování prokázalo přítomnost kompletních T-DNA kazet u celkem osmi nezávislých transgenních RNAi linií a u celkem jedenácti transgenních nadprodukčních linií. V práci byla také ověřena spolehlivost rychlého a jednoduchého genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Pomocí Multiplex TaqMan qPCR byli v T2 generaci RNAi linií a v T1 generaci nadprodukčních linií identifikovány rostliny potenciálně homozygotní v T-DNA inzercích. Spolehlivost predikce genotypů těchto jedinců byla potvrzena prokázáním uniformity jejich potomstva v hygromycinové rezistenci pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Analýza exprese pomocí RT-qPCR ukázala, že potomci pěti nezávislých RNAi linií měli v T3 generaci minimálně čtyřikrát nižší množství mRNA *HvMPK4* než kontrolní rostliny a, že potomci osmi nezávislých nadprodukčních linií měli v T2 generaci čtyřikrát až osmkrát větší množství mRNA *HvMPK4* než kontrolní rostliny. Nebyl pozorován žádný rozdíl v dynamice vadnutí nadzemní části rostliny u potomků vybraných RNAi, nadprodukčních a kontrolních linií v průběhu působení sucha.

Klíčová slova	transgenóze, <i>Hordeum vulgare</i> , <i>HvMPK4</i> , hygromycinová rezistence, Multiplex TaqMan qPCR, sucho
Počet stran	61
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname Elizaveta Chubar

Title Molecular and phenotypic characterization of transgenic barley lines with modified expression of mitogen-activated protein kinase MPK4

Type of thesis Bachelor

Department Centrum of the Region Haná

Supervisor Ing. Pavel Křenek, Ph.D.

The year of presentation 2018

Abstract

Molecular and physiological methods were used for the characterization of transgenic barley lines bearing silenced *HvMPK4* gene (RNAi) and of transgenic barley lines overexpressing *HvMPK4* gene (overexpression). PCR genotyping confirmed presence of complete T-DNA insertions in eight independent transgenic RNAi lines and in eleven transgenic overexpression lines. In addition, reliability of the fast and easy *in vitro* hygromycine resistance assay for the genotyping of transgenic barley plants was confirmed. Plants potentially homozygous in T-DNA insertions were identified in T2 generation of RNAi lines as well as in T1 generation of overexpression lines by means of Multiplex TaqMan qPCR. Reliability of the genotype prediction of these individuals was confirmed by resistance of all their progenies to hygromycine as determined with *in vitro* hygromycine resistance assay. The RT-qPCR expression analysis showed that T3 generation progenies of five independent RNAi lines contained at minimal four times less *HvMPK4* mRNA than control plants, whereas T2 generation progenies of eight independent overexpression lines contained four to eight times more *HvMPK4* mRNA than control plants. No difference was observed in the shoot wilting dynamics among progenies of selected RNAi, overexpression and control lines during exposure to drought stress.

Keywords transgenesis, *Hordeum vulgare*, *HvMPK4*, hygromycine resistance, Multiplex TaqMan qPCR, drought

Number of pages 61

Language Czech

OBSAH

1 ÚVOD	8
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	9
2.1 Mitogenem aktivované protein kinasy jednoděložných a dvouděložných rostlin	9
2.1.1 Úvod	9
2.1.2 Struktura a funkce MAPK kaskád	10
2.1.3 MAP kinasy dvouděložných rostlin na příkladu <i>Arabidopsis thaliana</i> a <i>Nicotiana tabacum</i>	12
2.1.4 MAP kinasy jednoděložných rostlin	14
2.2 Příprava transgenních rostlin a molekulárně genetické metody využívané pro jejich charakterizaci	15
2.2.1 Příprava transgenních rostlin ječmene pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	15
2.2.1.1 Proces RNA interference proti cílovému genu.	17
2.2.1.2 Transgenní rostliny se zvýšenou expresí (overexprese) cílového genu	19
2.2.1.3 Metody využívané pro identifikaci transgenních rostlin	21
2.2.1.4 Metody využívané pro detekci počtu kopií a pro kvantifikaci exprese transgenů v transgenních rostlinách	22
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	24
3.1 Materiály a metody	24
3.1.1 Chemikálie a nástroje	24
3.1.2 Rostlinný materiál	25
3.1.3 Roztoky	26
3.1.3 Izolace genomické DNA z listů ječmene	28
3.1.4 Izolace celkové RNA z listů ječmene	29
3.1.5 Syntéza cDNA	29
3.1.6 Genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)	30
3.1.7 Kvantitativní Real-Time PCR (qRT-PCR) a multiplex TaqMan qPCR	31
3.1.8 Gelová elektroforéza	32
3.1.9 Hydromycinový test	33
3.1.10 Experiment evaluace dynamiky vadnutí transgenních rostlin ječmene	33
4 VÝSLEDKY A DISKUSE	34
4.1 Molekulární charakterizace transgenních linií ječmene	34
4.1.1 Molekulární charakterizace T1 generace rostlin s umlčeným genem <i>HvMPK4</i>	34
4.1.2 Molekulární charakterizace T2 generace rostlin s umlčeným genem <i>HvMPK4</i>	34
4.2.1 Molekulární charakterizace T1 generace rostlin s nadprodukcí <i>HvMPK4</i> genu	41
4.2.2 Molekulární charakterizace T2 generace rostlin s nadprodukcí <i>HvMPK4</i> genu	44
4.2. Sledování dynamiky vadnutí transgenních rostlin ječmene s modifikovanou expresí <i>HvMPK4</i> v podmínkách působení sucha	49
5 ZÁVĚR	54
6 LITERATURA	55
7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	61

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- 1) Příprava literární rešerše na téma mitogenem aktivované protein kinasy jednoděložných a dvouděložných rostlin a molekulárně genetická charakterizace transgenních rostlin.

Experimentální část:

- 1) Preselekcce transgenních linií ječmene odrůdy Golden Promise se zvýšenou expresí *HvMPK4* genu a s umlčeným *HvMPK4* genem (RNAi) pro vlastní experimenty na základě genotypování rostlin, stanovení počtu kopií transgenů a stanovení úrovně exprese *HvMPK4* genu.
- 2) Kondicionální fenotypování vybraných transgenních linií ječmene v podmínkách působení vodního stresu.

1 ÚVOD

Rostliny hrají důležitou roli v lidském životě. A jednou z nejdůležitějších je ječmen. Jedná se o významnou zemědělskou plodinu a jednu z nejstarších kultivovaných rostlin v lidských dějinách (Saltini, 1996).

Rostliny jsou nepohyblivé organizmy, a proto mají řadu specifických vlastností. Vytvořily si specifické mechanismy pro přizpůsobení měnícím se podmínkám životního prostředí a odolnost vůči působení vnějších stresových faktorů, které mohou být jak biotické (poškození hmyzem, choroby) tak i abiotické (např. mechanické poškození, působení tepla, chladu, sucha a těžkých kovů).

Jeden z těchto mechanismů představují mitogenem aktivované signalizační kaskády, jejichž složkami jsou protein kinasy aktivované mitogeny (MAPK) (Nakagami *et al.*, 2005). MAPK kaskády jsou jedním z nejvíce studovaných signalizačních mechanismů v rostlinách (Danquah *et al.*, 2014). Principem fungování těchto kaskád je postupná fosforylace (tj. uchycení fosfátových skupin) proteinů kaskády, čímž je zabezpečen přenos signálů z buněčného povrchu do jádra buňky nebo na jiné intracelulární složky, které následně vyvolají společnou reakci buněk.

Pochopení molekulárních principů fungování MAPK kaskád, které jsou základem odolnosti vůči stresu, je důležité pro zlepšení produktivity zemědělství.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Mitogenem aktivované protein kinasy jednoděložných a dvouděložných rostlin

2.1.1 Úvod

Rostliny, stejně jako všechny živé organismy koexistují v interakci s vnějším prostředím, kde jsou vystaveny různým biotickým a abiotickým stresům. Nicméně kvůli tomu, že rostliny jsou nepohyblivé organismy, nemohou uniknout pryč od zdroje stresu. Proto, aby mohly v prostředí působení stresových faktorů rostliny účinně přežívat, vyvinuly určité mechanismy pro rychlou detekci signálů přicházejících z prostředí a reakce na ně. Jedním z takových mechanismů představují mitogenem aktivované signální kaskády, složené z mitogenem aktivovaných protein kinas (MAPK) (Yang *et al.*, 2013). Tento systém, nazývaný také dráhy signální transdukce, určuje posloupnost přenosu určitých signálů z membránových receptorů až do změny funkce buňky (Yang *et al.*, 2013).

První MAP kinasy byly objeveny na počátku 80. let během aktivního hledání tyrosinkinasy substrátů (Sturgill a Ray, 1986). Samotný název MAP kinasy byl odvozen podle proteinů, které byly ověřeny jako substráty MAP kinas: myelinový bazický protein (MBP), a protein asociovaný s mikrotubuly (MAP2) (Sturgill a Ray, 1986). V budoucnosti název MAPK zůstal, význam však byl změněn na mitogenem aktivované protein kinasy, aby byla zdůrazněna skutečnost, že kinasy byly poprvé objeveny jako mitogenem stimulované tyrosinové fosfoproteiny, které se aktivují během mitózy (Pearson *et al.*, 2001).

Nejčastěji komponenty MAPK kaskád jsou pojmenovány v souladu s podmínkami, látkami, které je aktivují, jako například WIPK (wound-induced protein kinase–protein kinasa aktivovaná poraněním) a SIPK (salt-induced protein kinases –protein kinasa aktivovaná solným stresem) nebo druhem organismu, ve kterém byly nalezeny, například, OsMSRMK2 (MAPK rýže) (Zhang a Klessig, 2001; Agrawal *et al.*, 2002).

Výskyt MAPK kaskád byl prokázán také v rostlinách (McCarty a Chory, 2000). Nejpodrobněji jsou MAP kinasy a jejich kaskády prostudovány u modelové dvouděložné rostliny *Arabidopsis thaliana* (Asai *et al.*, 2002). MAPK kaskády jsou však intenzivně studovány také v modelových jednoděložných rostlinách, jako je například rýže (Agrawal *et al.*, 2002). Doposud málo je známo o funkcích MAP kinas v jednoděložných plodinách s velkým komplexním genomem jako je například ječmen.

2.1.2 Struktura a funkce MAPK kaskád

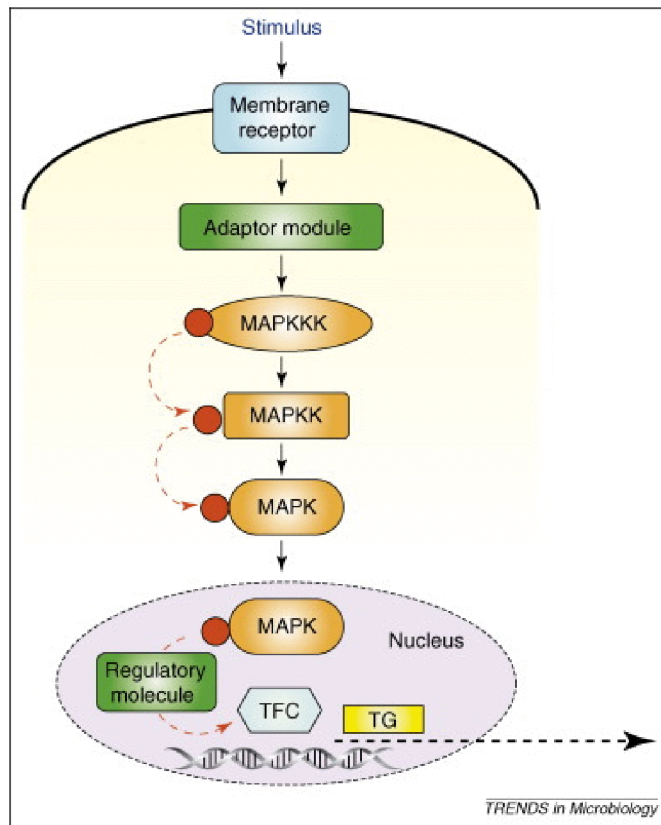
Signální dráhy MAPK jsou evolučně staré a proto mají vyšší rostliny velké množství sestav MAPK modulů z nichž konkrétní kaskádový modul je sestaven pro každou konkrétní událost (Jones a Dangl, 2006). Nejčastěji se však MAP kinasový signalizační systém skládá z mitogenem aktivovaných protein kinas serinthreoninového typu (Sells a Chernoff, 1997). MAP kinasova signální kaskáda je klasickým příkladem modulárního, intracelulárního, transdukcionního mechanismu, který je evolučně konzervován mezi eukaryoty (Hirt, 1997; Kultz, 1998). Tvorba a integrita konkrétní MAPK kaskády může být zabezpečena scaffold proteiny (tzv. proteinovým lešením) nebo běžnými proteinovými doménami (Whitmarsh a Davis, 1998). Komplexnost modulů MAPK kaskád je dána skutečností, že modul musí být připraven přijmout všechny signály, které mohou působit současně (Sinha *et al.*, 2011).

Přenos signálu MAPK modulem je zabezpečen následujícím způsobem. Exogenní signály z prostředí jsou vnímány receptory, které pak, přímo nebo prostřednictvím dalších signálních složek, jako jsou například G-proteiny, které představují specifické signalizační molekuly mající GTPasovou aktivitu, iniciují MAPK kaskádu (Dzhamyeyev, 2015). Po aktivaci MAPK kinasy kinasy (MAPKKK), MAPKKK fosoryluje MAPK kinasu (MAPKK), které následně fosoryluje a tím aktivuje MAPK (Nishida a Gotoh, 1993; Rodriguez *et al.*, 2010). Vzhledem k tomu, že fosorylace je enzymatickou reakcí, jedna MAPKK může fosorylovat několik molekul MAPK (Šamajová *et al.*, 2013). Vysílaný signál je tak zesílen. Pak se aktivovaná MAPK může přemístit do jiné části buňky a fosorylovat transdukční složky, jako jsou jiné kinasy, metabolické enzymy, cytoskeletární proteiny a transkripční faktory a regulovat tak jejich aktivitu (Hirt, 1997) (Obr. 1). Transkripční faktory jsou speciální proteiny, které regulují expresi genů vazbou na specifické oblasti DNA (Latchman, 1997).

Pro poměr MAPKKK, MAPK a MAPKK existuje určitý vzor aktivace, tzv. vzor „přesýpacích hodin“. Podle tohoto vzoru MAPKKK aktivují mnohem méně MAPKK, a ty zase aktivují poněkud větší množství MAPK (Pitzschke *et al.*, 2009).

Hlavní funkce mitogenem aktivovaných protein kinas jsou reakce na stres a regulace vývoje, což se projevuje jako změny v genové expresi a metabolismu.

K aktivaci MAP kinasových kaskád dochází při různých druzích stresu, a to jak, abiotických jako je dehydratace, hypoosmotický stres, působení nízké teploty,



Obr. 1 Mitogenem aktivovaná proteinkinasová kaskáda (Román *et al.*, 2007). Signály z prostředí vnímané pomocí receptoru iniciují kaskádu MAPK. Po aktivaci MAPK kinasa kinasa (MAPKKK) fosforyluje MAPK kinasu (MAPKK), která fosforyluje MAPK. Aktivovaná MAPK dále fosforyluje své substráty, tzv.transdukční komponenty.

mechanické poškození rostlinných pletiv, oxidativní stres, tak i biotických, jako je působení patogenů a jejich elicitorů (harpiny, kriptogeiny, oligosacharidy) (He *et al.*, 1999; Mahajan a Tuteja, 2005; Golldack *et al.*, 2014). MAPK kaskády jsou také aktivovány působením stresových hormonů: jasmonát, salicylát, systemin, ethylen (Wilson *et al.*, 1998; Brodersen *et al.*, 2006; Danquah *et al.*, 2014; Xu a Zhang , 2015). V rámci regulace vývoje se MAPK například podílí na regulaci mitotického dělení (Beck *et al.*, 2011).

S hlediska substrátové specifity mají MAPK teoreticky neomezené možnosti, neboť mohou interagovat s jakýmkoliv typem proteinu, který je kolokalizován s MAP kinasami v určitém bodě. MAPK fosforylují substráty na zbytcích serinu (S), threoninu (T), nebo tyrosinu (Y) a k nim přiléhajícímu prolinu (P). A jak serylprolinové tak i threonylprolinové dipeptidy se vyskytují ve většině bílkovin alespoň jedenkrát. Rychlá a jednoznačná predikce MAPK substrátu je tak velmi obtížná (Pitzschke, 2014).

Aktivace signalizačních systémů MAPK kaskád je dočasná, což znamená, že musí existovat účinné mechanismy pro jejich samočinnou inhibici. Primárně je inaktivace MAPK kaskád zabezpečena defosforylací MAPK pomocí fosfatasy (Chu *et al.*, 1996; Bartels *et al.*, 2010). Všechny fosfatázy spojené s MAPK signálními kaskádami jsou rozděleny do třech skupin: enzymy s dvojitou specifitou, které defosforylují tyrosinové a threoninové zbytky v MAP kinasách, tyrosinové proteinfosfatasy a serintreoninové proteinfosfatasy (Tarchevskij, 2002).

2.1.3 MAP kinasy dvouděložných rostlin na příkladu *Arabidopsis thaliana* a *Nicotiana tabacum*

Nejpodrobněji byly zatím kaskády MAP kinas prostudovány v dvouděložných rostlinách a to především v huseníčku (*Arabidopsis thaliana*), modelovém diploidním rostlinném organismu, jehož malý genom kóduje 60-80 MAPKK, 20 MAPK a 10 MAPK (Ichimura *et al.*, 2002). Tento zdánlivě malý počet MAP kinas může teoreticky vytvořit tisíce kombinací MAPK modulů (Ichimura *et al.*, 2002).

Dobrym příkladem odlišné signalizace prostřednictvím sítě kaskád MAPK je reakce na bakteriální flagelin u *Arabidopsis thaliana*. Flagelin je hlavní strukturální protein bičičku bakterií. Rostliny rozpoznávají pomocí receptoru flagellin sensing 2 (FLS2) specifický epitop flagellinu flg22, peptid z 22 aminokyselinových zbytků na nejkonzervativnějším úseku N konce flagellinu, a tím zpouští obranné mechanismy vůči bakteriálním patogenům (Felix *et al.*, 1999; Chinchilla *et al.*, 2006). Percepce flg22 receptorem FLS2 vede ke zvýšení aktivity alespoň tří MAPK *Arabidopsis* a to konkrétně MPK4 a částečně homologních MPK3/MPK6 (Asai *et al.*, 2002; Meszaros *et al.*, 2006). Flg22 indukovaná aktivace vede k interakci těchto tří MAPK s širokým spektrem substrátů, což rezultuje různými obrannými mechanismy asociovanými s PTI – PatternTriggeredImmunity, tzv. imunita spouštěná vzorci (Bigeard *et al.*, 2015). Například MPK3 v odpovědi na bakteriální patogen *Pseudomonas syringae* ale také oxidativní stres a mechanické poškození fosforyluje a aktivuje transkripční faktor VIP1, což způsobuje translokaci VIP1 z cytoplazmy do jádra, kde se tento TF váže na promotory genů *Trxh8* a *MYB44*, což vede k jejich posílené exprese (Pitzschke *et al.*, 2009).

Neaktivní MPK4 existuje v buňce jako jaderný komplex s transkripčním faktorem WRKY33 (Andreasson *et al.*, 2005). Tento komplex je závislý na MAP kinase substrate 1 (MKS1) substrátu MPK4. Biotický stres, nejčastěji pak působení flg22, vede k

aktivaci MPK4 a k fosforylaci MKS1, což následně vede k translokaci WRKY33 do jádra a k syntéze antimikrobiální látky kamalexinu (Qiu *et al.*, 2008).

MPK6 fosforyluje ACS6 (1-aminocyklopropan-1-karboxylát synthasa), enzym, který katalyzuje syntézu prekursoru ethylenu (Schellingen *et al.*, 2014). Fosforylace stabilizuje ACS6, což vede ke zvýšení produkce ethylenu (Liu a Zhang, 2004). MPK6 dobře ilustruje stupeň konvergence signálu prostřednictvím MAPK kaskád. Kromě aktivace pomocí flg22, aktivace MPK6 byly zaznamenána také v reakci na působení peroxidu vodíku, ozónu, chladu, doteku, poranění, kyseliny jasmonové (JA) a kyseliny abscisové (ABA) (Ichimura *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2010). S ohledem na tato pozorování může MPK6 funkčně interagovat s alespoň pěti substráty (Beckers *et al.*, 2009).

MAPK mohou být nejen substrátově specifické, ale mohou se také v substrátové specifitě alespoň částečně duplikovat (Pearson *et al.*, 2001). Například MPK3 a MPK6. Funkce a substrátové preference těchto dvou homologních proteinů se většinou prolínají, což znamená podobnost v rozpoznání substrátu a jeho vazby (Pecher *et al.*, 2014). Mutanti s vyřazeným *MPK3* genem vykazují stejně jako mutanti s vyřazeným *MPK6* genem normální vývoj, zatímco dvojnásobní mutanti v genech *MPK3* a *MPK6* *mpk3/mpk6* hynou v embryonální fázi vývoje (Menke *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007). Tato pozorování naznačují, že MPK6 a MPK3 jsou alespoň parciálně funkčně redundantní a zároveň klíčovými regulátory vývoje rostlin (Beckers *et al.*, 2009; Xu *et al.*, 2016). Tyto studie také podaly jasný důkaz pro význam dobře vyvážené aktivace MPK3 a MPK6 pro vývoj rostlin a jejich reakce na vnější prostředí (Pitzschke, 2014).

Podle Spoel *et al.* (2012) jsou MPK6 a MPK3 využívány nejen k okamžité reakci na stres, ale také se podílejí na vytváření dlouhodobé imunity. U rostlin spočívá princip imunitní paměti v tom, že během primárního útoku patogenu se v buňce zvyšuje exprese řady látek včetně MPK6 a MPK3 (jak mRNA, tak proteinu). Tyto látky se akumulují a udržují v neaktivním stavu v buňce, dokud nedojde k sekundární infekci (Beckers *et al.*, 2009; Netea *et al.*, 2011). Výsledkem je, že organismus může reagovat rychleji, a tím déle a účinněji odolávat vůči sekundárnímu útoku patogenu.

Výše uvedené ukazuje, že interakce mezi MAPK kaskádami umožňuje buňkám integrovat informace, které dostávají, a přizpůsobit tak jejich reakce jednotlivým okolnostem. Například v tabáku (*Nicotiana tabacum*) MAPK WIPK (homologní k *Arabidopsis* MPK3) a SIPK (homologní k MPK6) aktivuje řadu obranných mechanismů v reakci na poranění, hormony a patogeny (Seo *et al.*, 1999; Samuel *et al.*, 2005).

Transkripce genu WIPK je stimulována aktivitou SIPK, která vede k akumulaci proteinu WIPK a zvýšené aktivitě WIPK (Seo *et al.*, 2007). Proto signalizace pomocí kaskády MAPK může mít zpětnou vazbu, aby modelovala strukturu sítě a poskytovala buňce mechanismus pro budování signalizace spojené s ochranou (Seo *et al.*, 2007).

2.1.4 MAP kinasy jednoděložných rostlin

Ve srovnání s dvouděložnými rostlinami byly MAP kinasy v jednoděložných rostlinách studovány v menší míře. Tento trend se však vyvíjí, protože mnoho významných plodin patří mezi jednoděložné rostliny jako například pšenice, žito, kukuřice, rýže, ječmen a cukrová třtina.

V rámci jednoděložných rostlin jsou MAP kinasy nejlépe prostudovány u rýže (*Oryza sativa*), jejíž genom obsahuje geny kódující 17 fylogenetické příbuzných MAP kinas (Huang *et al.*, 2002; Agrawal *et al.*, 2003b; Reynaa Yang, 2006).

Agrawal *et al.* (2002) ve studiu MAP kinasy OsMSRMK2 (někdy označována jako OsMAP1) pomocí metody listových segmentů zjistili, že při normálních podmínkách neexistuje žádná exprese genu *OsMSRMK2*. Nicméně, za 30 minut po působení těžkými kovy (Hg, Cu, Cd), vysokým obsahem solí či sacharózy byla dosažena maximální exprese genu, která se snížila do normy po 60 minutách od začátku působení stresů. K akumulaci mRNA *OsMSRMK2* došlo také po působení ultrafialovým světlem a suchem *in vitro* a ozónem, vysokými a nízkými teplotami *in vivo* (Agrawal *et al.*, 2002).

Další MAP kinasa rýže je OsBWMK1. Zkoumání hladiny mRNA *OsBWMK1* po působení stejných typů stresu, jako u *OsMSRMK2* (těžké kovy, vysoký obsah solí či sacharózy) ukázalo, že *OsBWMK1* a *OsMSRMK2* vykazují několik rozdílů v transkripční aktivitě. Jmenovitě mRNA *OsBWMK1* se akumuluje a její hladina se nesníží na původní za dobu 60 minut od začátku působení stresu a transkripční aktivace *OsBWMK1* není citlivá na UV záření (Agrawal *et al.*, 2003c).

Dále byly studovány další dvě MAP kinasy rýže OsMSRMK3 a OsWJUMK1. OsMSRMK3, stejně jako OsMSRMK2 a OsBWMK1 reaguje na mnoho různých stresových podnětů i když vykazuje některé rozdíly, jako například to, že neposkytuje silnou a stabilní odolnost vůči suchu jako OsMSRMK2. OsWJUMK1 je více specifická kinasa, u které se hladina exprese zvyšuje v reakci na chlad a nezvyšuje se v reakci na mechanické poškození a kyselinu jasmonovou (Agrawal *et al.*, 2003a).

MAP kinasy pšenice (*Triticum aestivum*) byly studovány v menší míře. Lian *et al.* (2012) provedli analýzu jejich fylogeneze. Tato studie ukázala, že MAP-kinasy pšenice

jsou homologní k MAP-kinasám rýže a huseníčku. TaMAPK3 a TaMAPK4 vykazují určitý stupeň homologie k šesti MPK *A. thaliana* (AtMPK3, AtMPK4, AtMPK5, AtMPK11, AtMPK12 a AtMPK13) a ke dvěma MPK *O. sativa* (OsMPK2 a OsMPK6). TaMAPK1 a TaMAPK2 mají vysokou stupeň homologie s OsMAPK1 a OsMAPK5 a TaMAPK5 a TaMAPK6 jsou vysoce homologní s AtMPK6, OsMPK3 a OsMPK4.

Rudd *et al.*, (2008) studovali TaMPK3 a TaMPK6 a jejich aktivaci houbou *Mycosphaerella graminicola*, která způsobuje chorobu pšenice označovanou jako braničnatka pšeničná. Kompatibilní interakce houby *M. graminicola* s *T. aestivum* vedla k silné transkripční aktivaci *TaMPK3* těsně před programovanou smrtí buněk (apoptóza) a rozvojem příznaků onemocnění. Také TaMPK3 protein se akumuloval v buňkách a následně posttranslačně aktivoval paralelně s apoptózou. Naopak u TaMPK6 nebylo pozorováno žádné zvýšení úrovně exprese genu, úrovně proteinu nebo posttranslační aktivace v jakémkoli stádiu jak kompatibilních, tak i nekompatibilních interakcí. Nicméně jakmile je zahájena akumulace proteinu TaMPK3 úroveň proteinu TaMPK6 se snižuje. To odlišuje tyto MAPK jednoděložné pšenice od homologních kinas dvouděložných rostlin, např. tabáku, kde se WIPK/SIPK aktivují současně a fungují společně (Yang *et al.*, 2001).

MAP kinasa ječmene setého (*Hordeum vulgare*), jmenovitě HvMPK4 byla sledována ve studii Abass a Morris (2013). Bylo zjištěno, že tato MAP kinasa je regulátorem jak biotického, tak i abiotického stresu. Snížení hladiny exprese *HvMPK4* genu RNA interferencí vede ke zvýšení hladiny kyseliny salicylové po houbové infekce *Magnaporthe grisea*, a tím se zvyšuje odolnost proti patogenu. Nadměrná exprese *HvMPK4* vede k trvalému zvýšení hladiny kyseliny jasmínové (JA) a ethylenu v rostlině. JA a ethylen se podílí na obraně rostlin proti patogenům, nicméně v této studii nebyl nalezen žádný rozdíl v úrovni projevů symptomů infekce *M. grisea* mezi liniemi s divokým a nadexpresním fenotypem. U nadprodukčních linií však byla zjištěna zvýšená tolerance vůči abiotickému stresu, zejména soli.

2.2 Příprava transgenních rostlin a molekulárně genetické metody využívané pro jejich charakterizaci

2.2.1 Příprava transgenních rostlin ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Pro usnadnění studie úlohy MAP kinas jsou rostliny ječmene podrobovány genetickým změnám. Tento způsob studia zahrnuje několik technik. Jednou z nich je technika modifikace genomu ječmen pomocí bakterie *Agrobacterium tumefaciens*. Základem této

technologie je přirozená možnost začlenění DNA bakterie do jádra hostitelské rostliny. *Agrobacterium tumefaciens* je gramnegativní, obligátně aerobní tyčinková půdní bakterie rodu *Agrobacterium*. Jedná se o fytopatogena, který v rámci své životní strategie přeměňuje genetickou informaci rostlinné buňky pomocí speciálního plazmidu (Mishra, 2010). *A. tumefaciens* obsahuje dva plazmidy: At-plasmid a Ti-plasmid (Goodner *et al.*, 2001). Ti-plasmid (z angl. tumor-inducing) je zodpovědný za patogenitu *A. tumefaciens* a jeho část označovaná jako T-DNA je integrována pomocí rekombinace do genomu hostitelské rostliny (Tsuda *et al.*, 2012; Uga *et al.*, 2013; Cho *et al.*, 2014). T-DNA nese geny pro syntézu rostlinných fytohormonů a opinů. Plazmid Ti také obsahuje geny, které jsou zodpovědné za virulenci, konjugaci (con) a vlastní replikaci (ori) (Wei *et al.*, 2000). Při řízených genetických transformacích rostlin je využívána T-DNA, která má geny pro syntézu fytohormonu a opinů nahrazeny vlastním genem/geny zájmu.

Genetická transformace prostřednictvím *A. tumefaciens*, je vícestupňový proces, který začíná rozpoznáním poranění hostitelských pletiv bakterií a končí expresí introdukovaných genů v genomu rostlinných buněk (Karami *et al.*, 2009).

Poranění rostlinných buněk hraje klíčovou roli v transformaci, protože vede k uvolnění fenolu podobné sloučenině označované jako acetosyringon, která působí jako chemoatraktant pro *A. tumefaciens* (Stachel *et al.*, 1985; Ashby *et al.*, 1987; Sheikholeslam a Weeks, 1987). Vzhledem k potřebě signální molekuly - acetosyringonu pro vytvoření úspěšné interakce mezi rostlinnými buňkami a bakteriemi, se po dlouhou dobu předpokládalo, že pouze dvouděložné rostliny mohou být transformovány pomocí *A. tumefaciens*. Úspěšná transformace *Asparagus officinalis* pomocí *A. tumefaciens* však otevřela nové možnosti transformace jednoděložných rostlin (Bytebier *et al.*, 1987). První práce na transformaci ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens* byla provedena Tingay *et al.* (1997). Metoda je založena na infekci nezralých embryí ječmene pomocí *A. tumefaciens*. Na začátku úspěšnost transformace nezralých embryí ječmene byla 0,5%, později byl protokol vylepšen až na 6,3% (Patel *et al.*, 2000; Fang *et al.*, 2002).

Transformační protokol ječmene obvykle zahrnuje několik kroků, jako je například: kokultivace embryí a bakterií, klidová fáze, selekce pro specifickou proliferaci transformovaných buněk, fáze regenerace a fáze zakořenění. Pro kultivaci embryí a regenerantů se nejčastěji používá MS medium (Murashige a Skoog, 1962). Do základního média se přidávají různé přísady. Jednou z těchto přísad jsou fytohormony.

Nejčastěji se jedná o 2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina, $C_8H_6Cl_2O_3$), která je obecně nejvyužívanějším auxinem na podporu dělení buněk, čímž udržuje růst kalusové kultury. Přidávány jsou i chemické látky nehormonální povahy, jako jsou například dicamba (3,6-dichlor-2-methoxybenzoová kyselina, $C_8H_6Cl_2O_3$) a picloram (4-amino-3,5,6-trichlor-2-pyridinkarboxylová kyselina, $C_6H_3Cl_3N_2O_2$). Tyto látky také iniciují tvorbu kalusů, ale jsou méně toxické než 2,4-D (Hiei *et al.*, 2014). Dále mohou být k médiu přidány minerální ionty, jako jsou Cu^{2+} a Ag^+ , které mohou zvýšit účinnost transformace (Ishida *et al.*, 2003). Důležitý je také druh a koncentrace používaných cukrů (Bartlett *et al.*, 2008).

Jedním z hlavních problémů spojených s transformací je odstranění bakterií po infekci. Protože účel se používají antibiotika jako je cefotaxim, karbenicilin a timentin (Jones *et al.*, 2005).

V současné době jeden z nejvíce využívaných protokolů pro transformaci ječmene je ten, který navrhli Bartlett *et al.* (2008). Tento protokol má několik základních kroků:

- 1) Pěstování donorových rostlin a izolace nezralých embryí ječmene setého (*H. vulgare*) odrůdy Golden Promise.
- 2) Zavedení připravených vektorů do *A. tumefaciens* pomocí elektroporace.
- 3) Kultivace embryí s kulturou *A. tumefaciens*.
- 4) Regenerace transformantů na selektivním médiu.
- 5) Další analýza transformantů pomocí polymerasové řetězové reakce (PCR), kvantitativní polymerasové řetězové reakce (Real-time PCR nebo qPCR) a Southernovu přenosu.

2.2.1.1 Proces RNA interference proti cílovému genu.

RNA interference (angl. RNA interference, RNAi) je proces potlačení genové exprese na úrovni transkripce, translace, deadenylace nebo degradace mRNA pomocí malých molekul RNA (Hannon, 2002). RNAi systém hraje důležitou roli v regulaci vývoje, diferenciaci a exprese genů v organismu a ochranou před virovými infekcemi (transpozómy) (Cullen, 2002; Girard a Hannon, 2008).

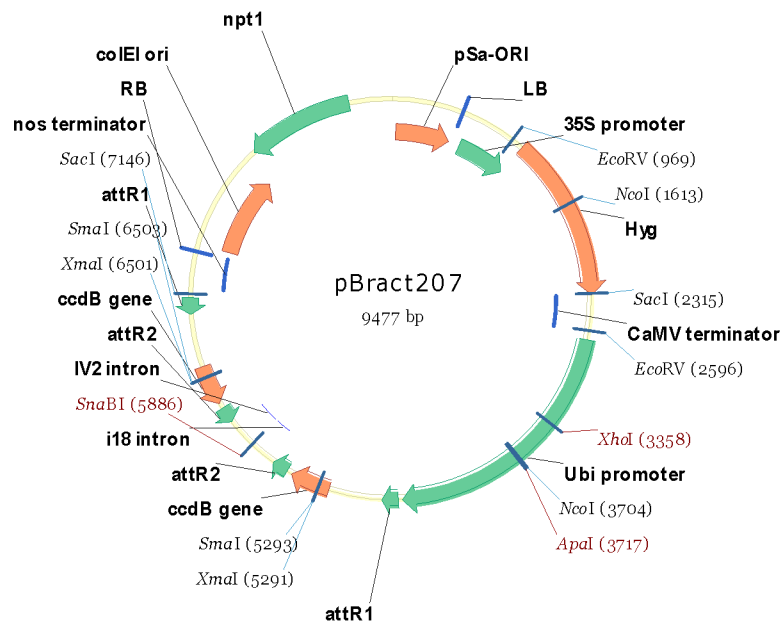
Proces RNAi začíná působením enzymu Dicer, který patří do rodiny RNAs typu III, který štěpí dlouhé dvouvláknové molekuly RNA (dsRNA) na krátké fragmenty o velikosti 21 až 25 nukleotidů, tzv. siRNA (angl. small interfering RNA) (Carthewa a Sontheimer, 2009). Jeden ze dvou řetězců každého fragmentu se nazývá „vodící“. Tato jednořetězcová RNA iniciuje tvorbu RISC (angl. RNA-induced silencing

complex). Výsledkem aktivity RISC je, že jednořetězcová vodící RNA se váže na komplementární sekvence molekuly mRNA a zprostředkuje nalámání mRNA proteinem Argonaute nebo inhibici translace a/nebo mRNA deadenylace. Tyto události vedou k potlačení exprese (tlumení) příslušného genu. Díky selektivní povaze je RNA interference technologicky využívána pro potlačení exprese genů (knockdown) v buňkách (Castel *et al.*, 2013).

Ještě před objevem RNA-interference u rostlin byla popsána inhibici transkripce pomocí antisense RNA (Ecker a Davis, 1986). Například, v rostlinách byla popsána inhibice transkripce antisense RNA v experimentu který provedli Napoli *et al.* (1990) s květy petúnie (*Petunia hybrida*). Pro změnu barvy byly do rostlin zavedeny dodatečné kopie genu pro enzym chalkonsyntasa. Předpokládalo se, že v důsledku introdukce genů dojde ke zvýšení intenzity růžových a purpurových pigmentů. Výsledkem však bylo, že se květy staly bledými a dokonce částečně bílými. To znamená, že zavedení dodatečných kopií genů pro enzym chalconsyntasa nezvyšuje ale naopak v důsledku antisense RNA snižuje produkci pigmentů.

RNA interference (RNAi) byla využita například pro boj proti *Botrytis cinerea*, patogenní houbě, která způsobuje šedou hnilobu, a *Candidatus liberibacter*, což je bakteriální fytopatogen brambor a rajčat způsobující nemoc „zebra chips“ (Weiberg *et al.*, 2013; Wuriyangan a Falk, 2013)

Vektory pro RNA interferenci mají specifickou strukturu. Pro RNAi interferenci v jednoděložných rostlinách včetně ječmene je například využíván destinační vektor pBract207 (9477 bp) (Obr.2). Tento vektor je derivátem vektoru pGreen, což je malý binární vektor a využívá GATEWAY (Invitrogen) technologii (Hellens *et al.*, 2000). Vektor pBract207 obsahuje dva počátky replikace, pSa-ORI (začátek: 27- konec: 510) pro replikaci v *A. tumefaciens* a colEI ori (začátek: 7527- konec: 8250) pro replikaci v *E. coli*. Dále pak gen *Hyg* pod kontrolou 35S promotoru z mozaikového viru kvěťáku a CaMV terminátoru, který řídí rezistenci transformovaných rostlin vůči antibiotiku hygromycinu a gen *nptI* bakteriální rezistence vůči antibiotiku kanamycinu. Tvorba vlásenkové struktury RNA je zabezpečena dvěma páry reverzně komplementárních attR1 a attR2 míst pod kontrolou kukuřičného ubiquitinového promotoru Ubi a Nos terminátoru. Mezi dvěma attR kazetami se nachází nekomplementární introny i18 a IV2, které po expresi cílového mRNA fragmentu vytváří smyčku na konci RNA vlásenky. Pro tvorbu pBract207 konstruktů je zapotřebí rekombinace pBract207 destinačního vektoru s entry klonem, který obsahuje mezi attL1 a attL2 místy jeden



Obr. 2 Mapa vektoru pBract207 (<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018).

fragment DNA odpovídající cílovému fragmentu mRNA.
(<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018).

2.2.1.2 Transgenní rostliny se zvýšenou expresí (overexpresse) cílového genu

Zvýšená exprese (angl. overexpression) je významné zvýšení úrovně exprese genu nebo více genů nad běžnou úroveň exprese v organismech, do kterých jsou pomocí speciálního vektoru začleněny dodatečné kopie cílového genu/genů pod kontrolou silného promotoru (Prelich, 2012). Alternativně může být dosaženo zvýšení exprese cílového genu/genů pomocí změny úrovně exprese transkripčních faktorů (Prelich, 2012). Pro účely zvýšené exprese se cílový gen nejprve izoluje z DNA/cDNA rostlin a posléze je zaklonován do vektoru. Po transformaci příslušných buňek/ organismu dochází k nadměrné transkripci transgenua posléze k nadměrné translaci mRNA transgenu, což vede ke zvýšené produkci cílového proteinu (Prelich, 2012).

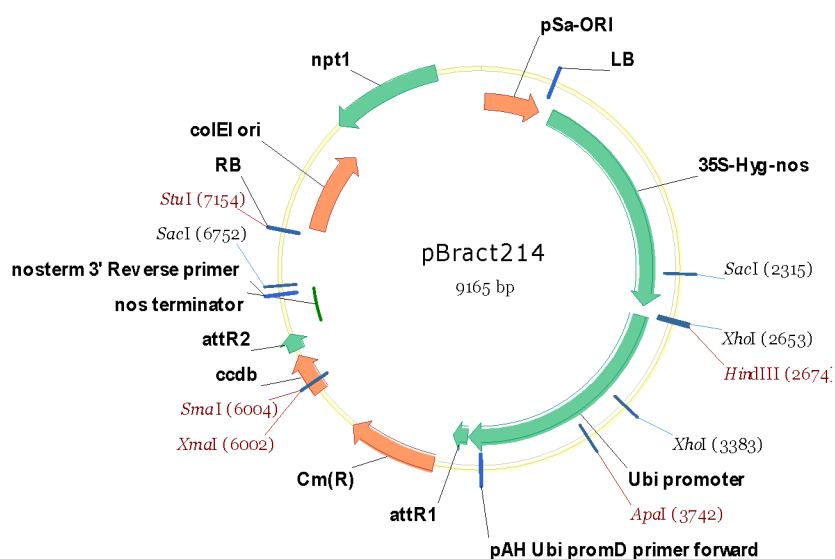
Někdy pouze tlumení exprese (knock-down) nebo vyřazení funkce určitého genu, nemůže stačit pro kompletní analýzu funkce genu a jeho produktů. Zvýšená exprese je alternativní a/nebo komplementární technika pro studium genů. Zvláště, když knock-down nebo knock-out rostliny nevykazují jednoznačný fenotyp. U rostlin je několik příkladů, kdy funkce genů byla určena pouze tehdy, když byly geny analyzovány pomocí zvýšené exprese (Baima *et al.*, 2001; Fana Dong, 2002). Ale i v

případě, že knock-down nebo knock-out rostliny poskytnou jasnou informaci o fenotypu, zvýšená exprese může být stále užitečná pro získání doplňujících informací o funkci genů (Schellmann *et al.*, 2002).

Navzdory výhodám strategie zvýšené exprese a jejího úspěchu, má tato strategie i nevýhody (Green *et al.*, 2002). Zvýšená exprese genu může vést ke dvěma typům základních fenotypů: hypermorfní fenotyp (kvantitativní zvýšení) a neomorfní fenotyp (kvalitativní změna). V případě hypermorfního fenotypu vnesený gen poskytuje stejnou funkci jako základní gen, ale s vyšší aktivitou. V případě neomorfního fenotypu získá protein novou funkci, která není přítomna ve volné přírodě (Zhang, 2003; Senturk a Bellen, 2017). Nežádoucí jsou pak především neomorfní změny způsobené nadexpresí.

Technika zvýšené exprese se nejčastěji používá ke zvýšení odolnosti vůči abiotickým stresům jak v jednoděložných, tak i v dvouděložných rostlinách. Jako příklad lze uvést zvýšení odolnosti vůči suchu pomocí zvýšení exprese genu *AtRNP1* v *A. thaliana* nebo zvýšení odolnosti vůči zasolení a suchu u rýže zvýšením úrovně exprese genu *OsHAP2E* (Alam *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2016).

Pro tvorbu jednoděložných rostlin s nadexpresí genu jsou využívány např. vektory série pBract zahrnující mj. vektor pBract214 (Obr. 3). Vektor pBract214 také využívá GATEWAY (Invitrogen) technologii a obsahuje dva počátky replikace pSa-ORI (začátek: 27- konec: 510) pro replikaci v *A. tumefaciens* a *colEI* ori (začátek: 7215- konec: 7938) pro replikaci v *E. coli*. Cílový gen je klonován do gateway kazety *attR1* a



Obr. 3 Mapa vektoru pBract214 (<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018).

attR2 a následně exprimován pod kontrolou kukuřičného Ubi promotoru a nopalinsyntasového Nos terminátoru. Dále pak vektor pBRACT214 obsahuje stejně jako vektor pBRACT207 gen *Hyg* pod kontrolou 35S promotoru z mozaikového viru květáku a CaMV terminátoru a gen *nptI* bakteriální rezistence vůči antibiotiku kanamycinu. (<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018).

2.2.1.3 Metody využívané pro identifikaci transgenních rostlin

Pro identifikaci transgenních rostlin především využíváme polymerasovou řetězovou reakci (PCR, angl. Polymerase Chain Reaction).

PCR je experimentální metoda molekulární biologie, která umožňuje dosáhnout významného zvýšení malých koncentrací určitých fragmentů DNA v biologickém materiálu (vzorek) (Powledge, 2004)

Komponenty pro provádění PCR reakce jsou:

- 1) DNA templát obsahující část DNA, která má být amplifikována.
- 2) Dva primery komplementární k protilehlým koncům různých řetězců cílového fragmentu DNA.
- 3) Termostabilní DNA polymerasa. Enzym, který katalyzuje DNA polymerační reakci.
- 4) Deoxyribonukleosidtrifosfáty (dATP, dGTP, dCTP, dTTP).
- 5) Ionty Mg^{2+} které slouží jako kofaktory polymerasy.
- 6) Pufř, který zajišťuje nezbytné reakční podmínky, pH a iontovou sílu.

PCR se provádí v termocykleru, což je zařízení, které zajišťuje periodické chlazení a ohřívání vzorků, obvykle s přesností nejméně 0,5°C. Zpočátku měla PCR metoda nevýhodu a to chybějící teplotně stabilní DNA polymerasu. Tento problém byl vyřešen, když z bakterie *Thermus aquaticus* byla izolovaná polymerasa s reakčním optimem 70—80 °C, která byla následně pojmenována jako *Taq* polymerasa (Saiki *et al.*, 1988). Tento enzym však nemá mechanismus pro korekci chyb (3'→5' exonukleázová aktivita) Tento nedostatek byl změněn např. díky izolaci *Pfu* polymerasy z archeí *Pyrococcus furiosus*, která má 3'→5' exonukleázovou aktivitu (Cline *et al.*, 1996).

Důležitou částí metody jsou primery, které jsou specifické krátké syntetické oligonukleotidy o délce 18 až 30 bází. Jsou komplementární k cílové oblasti DNA a slouží jako počáteční místa pro *in vitro* replikaci DNA.

Samotná metoda je založena na vícenásobném selektivním kopírování specifické oblasti DNA nukleové kyseliny polymerasou *in vitro*.

Teplotní a časový průběh amplifikace má následující tři kroky:

1) Denaturace: dvouřetězcový DNA templát se zahřívá na teplotu 94 až 96°C po dobu 0,5 až 2 min, aby se řetězce DNA templátu i primery oddělily. Obvykle se před prvním cyklem prodlouží.

2) Nasednutí primerů: teplota se sníží na přibližně 60°C po dobu 30 sekund, aby mohly primery nasednou na jednořetězcovou DNA.

3) Syntéza DNA (polymerizace): DNA polymerasa replikuje templátový řetězec za použití primeru. Polymerasa zahajuje syntézu druhého řetězce od 3'konce primeru, který se naváže na matrici, a pohybuje se podél matrice a syntetizuje nový řetězec ve směru od 5' k 3'konci. Teplota prodloužení závisí na polymerase. Doba prodloužení závisí jak na typu DNA polymerasy, tak na délce amplifikovaného fragmentu a obvykle se rovná jedné minutě na každých tisíc párů bází.

Množství specifického reakčního produktu se teoreticky zvyšuje podle vztahu $2^n - 2n$, kde n je počet reakčních cyklů (Kalendar a Sivolap, 1995). Avšak exponenciální nárůst koncentrace požadovaného produktu je především v pozdějších cyklech reakce limitován spotřebovanými reakčními činidly, přítomností inhibitorů a tvorbou vedlejších produktů.

2.2.1.4 Metody využívané pro detekci počtu kopií a pro kvantifikaci exprese transgenů v transgenních rostlinách

Metody využitelné pro tyto účely představují kvantitativní polymerázová řetězová reakce v reálném čase nebo kvantitativní polymerasová řetězová reakce (angl. Real-time PCR nebo qPCR) a Southernův přenos (angl. Southern blot nebo Southern blotting).

qPCR zahrnuje současnou detekci a kvantifikaci specifické sekvence DNA ve vzorku (Van Guilder *et al.*, 2008).

Podle Bubnera a Baldwina (2004) je principem metody měření fluorescence vzorku v každém cyklu. V počátečních fázích amplifikace je fluorescence slabá, protože produktu ještě není příliš, takže je obtížné ho rozlišit od pozadí. Jak se produkt hromadí, signál nejprve narůstá exponenciálně a pak přechází nejprve do lineární a nakonec do plateau fáze. Při standardní PCR reakci jsou PCR produkty obvykle analyzovány v lineární až plateau fázi amplifikace kdy již všechny vzorky poskytují přibližně stejné množství PCR produktu. Na základě konečného množství PCR produktu tak není možné získat informaci o počátečním množství cílové DNA ve zkoumaném vzorku. Na druhou stranu, v exponenciální fázi qPCR, která je proporcionální vstupnímu množství

DNA, lze pro jednotlivé vzorky vysledovat rozdíly v množství generovaného PCR produktu. Rozdílný počáteční počet molekul DNA ovlivní počet cyklů nezbytných pro dosažení statisticky významného zvýšení hladiny fluorescence nad úroveň bazální fluorescence – tzv. fluorescenčního prahu. Počet cyklů nezbytných k tomu, aby fluorescence dosáhla fluorescenčního prahu se nazývá Ct-hodnotou. Prahová úroveň není striktně definovaná hodnota, nachází se však v exponenciální fázi amplifikace.

Southernův přenos je metoda, kterou je používána v molekulární biologii pro detekci specifické sekvence DNA ve vzorku. Metoda Southern blotting kombinuje elektroforézu v agarózovém gelu s metodami přenosu DNA na membránový filtr pro hybridizaci se specifickou sondou komplementární k cílovému genu (Southern, 1975). Pro určení počtu kopií genů v genomu je zapotřebí genomovou DNA nejprve ošetřit restričními endonukleasami, pak následuje separace DNA na agarosovém gelu, přenos na membránu a následně hybridizace se specifickou sondou. Vzorek, který hybridizuje pouze s jediným fragmentem DNA, který nebyl štěpen restričním enzymem, bude poskytovat jedinou zónu, zatímco výskyt více zón ukazuje, že sonda je hybridizována s vícero identickými/ homologními sekvencemi. Pomocí změny hybridizačních podmínek (zvýšení teploty, změny koncentrace soli) lze zvýšit specifičnost a tím snížit hybridizace s homologními, ale nenikoli však identickými sekvencemi.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie a nástroje

Izolace DNA z listů ječmene

AppliChem: CTAB (Cetyltrimethylamoniumbromid), disiřičitan sodný($\text{Na}_2\text{O}_5\text{S}_2$)

Eppendorf: pipety

Penta: isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

Promega 22: RNAsa

Retsch: kuličkový mlýnek MM 200/400

Thermo Fisher Scientific: EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)

Sigma-Aldrich: chlorid sodný (NaCl), chloroform-isoamyl alkohol (24/1), kyselina chlorovodíková (HCl), sarkosyl, sorbitol, Tris-base

Izolace RNA z listů ječmene

Eppendorf: pipety

Molecular Research Center: BCP (1-bromo-3-chloropropan)

Penta: isopropanol ($\text{C}_3\text{H}_8\text{O}$), ethanol ($\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$)

Retsch: kuličkový mlýnek MM 200/400

Savo: Savo originál

Sigma-Aldrich: chloroform-isoamyl alkohol (24/1), TRI Reagent

Syntéza cDNA

Bio-rad: Thermal Cycler T100TM

Eppendorf: pipety

Promega 22: Deoxynucleotide mix (dNTPs), Deoxynukleotidový mix, DNAsa (dNTPs), DNAsa, M-MLV Reversní Transkriptáza, M-MLV Reversní Transcriptasa, 5× reakční pufr, RNasin ® Plus RNase inhibitor, 100 μM PAGE přečištěné 18 bp oligo dT primers

Thermo Fisher Scientific: EDTA, pufr pro Dnasu I, NanoDropTM Lite Spectrophotometer

Polymerázová řetězová reakce

Bioline: ImmoMixTM

Bio-rad: Thermal Cycler T100™, My Cycler™ Thermal cycler

Eppendorf: pipety

Life Technologies: 96 jamková destička

Sigma-Aldrich: špičky, špičky s filtrem

Thermo Fisher Scientific: ABGene Absolute QPCR Rox Mix, Deoxynucleotide mix (dNTPs), Deoxynukleotidový mix (dNTPs), Power SYBR® Green PCR Master Mix, StepOnePlusRealTimePCR Systems

Penta: isopropanol (C₃H₈O), ethanol (C₂H₅OH)

V. B. C Biotech: primery

Gelová elektroforéza

Advance DNA StainGenetics: Midori Green (barvení gelů)

Bio-Rad:PowerPac™ Basic, Gel Doc™ EZ Imager

Eppendorf: pipety

Sigma-Aldrich: agaróza

Thermo Fisher Scientific: EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), 1 kb Gene Ruler (standard), 6x loadingdye (barvení vzorků)

Sigma-Aldrich: kyselina octová(CH₃COOH), Tris-base

Hydromycinový test

Eppendorf: Multipette plus, dávkovací pipety

VWR: Tissue Culture plates-96 jamková destička

Roche: Hydromycin B

Xiomi: telefon Xiomi redmi 3.

3.1.2 Rostlinný materiál

Pro vlastní experimenty byly používány rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise. Celkem byly analyzovány dva typy transgenních linií ječmene. Transgenní linie s označením K4IR1, které byly připraveny pomocí konstruktů plazmidu pBract207 (<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018) s cílem umlčení *HvMPK4* genu a transgenní linie s označením K4/3, které byly připraveny pomocí konstruktů plazmidu pBract214 (<https://www.jic.ac.uk/technologies/genomic-services/bract/constructs/>, 1.3.2018) s

cílem nadprodukce *HvMPK4* genu. Jako kontrolní rostliny byly pestovány negativní sesterské rostliny transgenních rostlin. Byly postupně vypěstovány tři generace transgenních rostlin: T1 až T2 pro K4/3 linie a T1, T2 až T3 pro K4IR1. Pro účely genotypování byly rostliny ječmene pěstovány ve velkých platech (rozměr 88x34x5,5 cm) ve skleníku při relativní vlhkostí vzduchu 70% s fotoperiodou 16 hodin světlo při teplotě 20°C a 8 hodin tma při teplotě 14°C. Jako pěstební substrát byla využita směs gramoflor/zahradnický substrát v poměru 3:1 s přídavkem perlitu.

3.1.3 Roztoky

1) 70% Ethanol

70 ml Ethanol

30 ml ddH₂O

2) 75% Ethanol

75 ml Ethanol

25 ml ddH₂O

3) 96% Ethanol

96 ml Ethanol

4 ml ddH₂O

4) Lýzační pufr, pH 7,5

0,2 M Tris-HCl (pH 7,5)

0,05 M EDTA (pH 8,0)

2 M NaCl

2% CTAB

5) Extrakční pufr, pH 7,5

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

5 mM EDTA (pH 8,0)

0,35 M Sorbitol

6) 5% Sarkosyl

95 ml ddH₂O

5 ml Sarkosyl

7) Pufr pro izolace DNA (na jeden vzorek)

0,415 µl Lyzační pufr, pH 7,5

0,415 µl Extrakční pufr, pH 7,5

0,165 µl 5% Sarkosyl

4 mg Disiřičitan sodný

8) Premix s DNAsou (na jeden vzorek)

2 µl pufr pro DNasu I

6 µl ddH₂O

2 µl DNasa

9) Premix pro reverzní transkripci (na jeden vzorek)

4,2 µl ddH₂O

0,4 µl M-MLV Reverzní transkriptasa

4 µl M-MLV Reverse Transcriptase 5× reakční pufr

0,4 µl dNTP (10mM)

0,4 µl inhibitor RNasin.

10) Pufr pro PCR (na jeden vzorek)

7,5 µl 2x ImmoMix

0,045µl Forward primer

0,045µl Reverse primer

5,41µl ddH₂O

11) Premix pro qPCR kvantifikaci exprese genů (na jeden vzorek)

2,5 µl premix primerů (0,3 µM každý)

5µl Power SYBR®Green PCR Master Mix

12) Premix pro Multiplex TaqMan qPCR analýzu počtu kopii transgenů (na jeden vzorek)

2,5 µl premix primerů a sond (0,2µM každá)

5µl ABGene Absolute QPCR RoxMix

13) 50x Tris-acetátový pufr (TAE)

24,22 g Tris

1,862 g EDTA

8,96 ml Kyselina octová

73,3 ml H₂O

14) 1x Tris-acetátový pufr (TAE)

20 ml 50x TAE

950 ml H₂O

15) 250 µg/l roztok hydromycinu na jednu 96 jamkovou destičku

144 µl Hydromycin B (50mg/l)

28.656 ml ddH₂O

3.1.3 Izolace genomické DNA z listů ječmene

Pro analýzu byly používány 1-2 měsíce staré rostliny. Jejich listy byly odebrány do 2ml sterilních zkumavek, do kterých byly předem přidány dvě kovové kuličky a zkumavky s listy byly okamžitě zmrazeny v tekutém dusíku (N₂, -196°C).

Dále byl, při konstantním udržování teploty, pomocí kulového mlýnku MM 200/400 biomateriál rozdrčen do prášku. Poté bylo ke každému vzorku přidáno 800 µl pufru pro izolaci DNA. Dále byl vzorek inkubován v inkubátoru za občasného míchání při teplotě 65°C po dobu 75 minut.

Další postup je shrnut v následujících krocích:

- 1) Přidání 800 µl chloroform-isoamyl alkoholu (24/1) ke každému vzorku. Extrakce po dobu 4 minuty. Centrifugace 15 minut při teplotě 4°C a 12000 rpm (angl. revolutions per minute, otáčky za minutu). Odběr 480 µl supernatantu do nových zkumavek.
- 2) Přidání 336 µl isopropanolu ke každému vzorku. Promísení roztoků a extrakce 4 minuty do vizualizace shluků genomické DNA. Centrifugace po dobu 9 minut při 20°C a 12000 rpm pro vytvoření pelety DNA. Odebrání isopropanolu.
- 3) Přidání k peletě genomické DNA do zkumavek 1 ml 70% ethanolu. Centrifugace po dobu 5 minut při 20°C a 6500 rpm. Odběr 480 µl supernatantu do nových zkumavek. Aspirace ethanolu. Sušení pelety.
- 4) Přidání 50 µl vody obsahující RNasu.

5) Rozpuštění genomické DNA po dobu 24 hodiny při laboratorní teplotě. Hotové vzorky byly uchovány při -20°C stupňů.

3.1.4 Izolace celkové RNA z listů ječmene

Během izolace byly v pracovním prostředí udržovány semisterilní podmínky pomocí Sava a 96% ethanolu. Homogenizovaný zmrazený prášek z listu ječmene byl získán stejným způsobem jako při izolaci DNA.

Izolace RNA zahrnovala následující kroky:

- 1) Přidání 1 ml TRI Reagentu k nadrcenému listovému segmentu, homogenizace suspenze a uchování vzorků na ledu. Centrifugace po dobu 10 minut při 4°C a 12000 rpm, s cílem sedimentace buněčných zbytků.
- 2) Přidání 100 µl BCP (brom-chlor-propan) do druhé sady zkumavek. Přenos 1 ml supernatantu do druhých zkumavek. Rychle protřepávání směsi po dobu 15 s a extrakce 4 minuty. Centrifugace po dobu 15 minut při 4°C a 12000 rpm.
- 3) Přidání 390 µl chloroformu do třetí sady 2 ml zkumavek. Transfer 390 µl vodné fáze z druhých do třetích zkumavek. Rychle protřepávání směsi po dobu 15 s a extrakce 3 minuty. Centrifugace po dobu 15 minut při 4°C a 12000 rpm.
- 4) Přidání 140 µl isopropanolu do čtvrté sady zkumavek. Přenos 200 µl vodné fáze do čtvrtých zkumavek. Rychle protřepání 20 krát a extrakce 10 minut. Centrifugace po dobu 9 minut při 4°C a 12000 rpm.
- 5) Aspirace isopropanolu a přidání 1 ml 75% ethanolu k peletám RNA. Centrifugace po dobu 5 minut při 4°C a 6500 rpm. Aspirace ethanolu. Vysoušení RNA pelety.
- 6) Přidání 35-45 µl vody, v závislosti na velikosti pelety.

Vzorky RNA byly uchovávány v mrazničce při -80°C.

3.1.5 Syntéza cDNA

Během přípravy cDNA bylo pracovní prostředí udržováno v semisterilních podmínkách pomocí Sava a 70% ethanolu.

Nejprve byla v PCR stripech smíchána ddH₂O a RNA tak, aby všechny vzorky měly stejnou koncentraci 2000ng v objemu 15 µl. Ve druhém kroku bylo k směsi RNA a vody přidáno 5µl premixu s DNasou I a pufrem DNasy I. Dále, po centrifugaci, byly stripy se vzorky inkubovány v termocykleru při teplotě 37°C (víčko 40°C) 40 minut. Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 2 µl EDTA s cílem tepelné inaktivace DNasy I. Inaktivace DNasy I probíhala při teplotě 70°C po dobu 8 minut v termocykleru.

Dále bylo v nových PCR stripech smícháno 4,5 µl ddH₂O, 0,5 µl oligo-dT primeru a 5,5µl RNA (500ng RNA). Směs byla 3 minuty inkubovaná a pak k ní bylo přidáno 10 µl premixu pro reverzní transkripci. Dále po centrifugaci byly stripy se vzorky inkubovány v termocykleru po dobu 2 hodin při teplotě 42°C (víčko 44°C) pro syntézu cDNA a následně 10 minut při teplotě 70°C (víčko 72°C) pro inaktivaci reverzní transkriptasy. Na závěr byla cDNA naředěna přidáním 60 µl ddH₂O. Vzorky cDNA byly uchovány při -80°C.

3.1.6 Genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR)

Pro genotypování transgenních rostlin ječmene s umlčenou expresí *HvMPK4* byly použity hyg, K4_IRas, K4_IR a PCR markery. Pro genotypování transgenních rostlin ječmene s nadexpresí *HvMPK4* byly použity hyg a K4over PCR markery (Tab. 1). Nejprve byla genomická DNA naředěna 18 krát pomocí přídavku ddH₂O. Do každé jamky 96 jamkové desky bylo přidáno 13 µl premixu pro PCR a 2 µl vzorku ředěné DNA. Celkový objem reakce tak byl 15µl. Dále byla PCR destička uzavřena pomocí fólie a inkubovaná v termocykleru za specifických teplotních a časových cyklických podmínek (Tab. 2).

Tab. 1 PCR markery použité pro genotypování

Název markeru	Název primeru	Forward F Reverse (R) primer	Sekvence	Velikost PCR produktu
hyg	hF/hR	F	ACTCACCGCGACGTCTGT	917 bp
		R	GCGCGTCTGCTGCTCCAT	
K4_IRas	gUBI_F2/genjK4_IR1	F	GTGTTACTTCGCCCAGCTTC	179 bp
		R	GAGATGGCTTGTATTATACCGGTTG	
K4_IRa	genjK4_IR1/NOS_R3	F	GAGATGGCTTGTATTATACCGGTTG	170 bp
		R	CGAGCTCGCCCAATTCAC	
K4over	K4F1/K4R1	F	AAGATACATGAAGCAATTACCACAG	291 bp
		R	GGATCAGGGTTAAATGCTAAAGTT	

Tab. 2 Program pro PCR amplifikaci

Název PCR kroku	Teplota	Čas (min:sec)	Počet cyklů
Předeřtání	95°C	10:00	1
Denaturace	95°C	00:05	32
Nasednutí primerů	60°C	00:25	32
Syntéza DNA	72°C	01:00	32
Uchovávání	8°C	Pauza	1

3.1.7 Kvantitativní Real-Time PCR (qRT-PCR) a multiplex TaqMan qPCR

Nejprve byla genomická DNA zředěna pomocí ddH₂O 18 krát, vzorky cDNA pak byly ředěny 4 krát. Pro analýzu počtu kopií transgenu u rostlin ječmene byly použity markery p35S a HvCon2 s příslušnými TaqMan sondami v multiplex formátu (Tab. 3). Pro kvantifikaci exprese *HvMPK4* genu u transgenních rostlin ječmene byly použity primery pro geny *HvMPK4* a referenční gen *HvMPK14* (Tab. 4). Do jamek 96 jamkové PCR destičky bylo přidáno 2,5 µl vzorku (cDNA nebo genomická DNA), a 7,5 µl směsi reagentů podle typu analýzy. Celkový objem vzorku byl 10 µl. Každý vzorek byl realizován ve dvou technických replikátech. Dále byla PCR destička uzavřena pomocí transparentní fólie a inkubována v termocykleru. Teplotní a časový průběh amplifikace pro stanovení počtu kopií je uveden v Tab. 5 a pro stanovení exprese *HvMPK4* v Tab 6. Data byla analyzována pomocí StepOne software. Finální výsledky byly v případě

Tab. 3 Použité PCR markery pro analýzu počtu kopií transgenu

Název markeru	Druh	Název	Přední F Zadní R	Sekvence
p35S	primery	p35SF/p35SR	F	CGTCTCAAAGCAAGTG GATTG
			R	TCTTGCGAAGGATAGTG GGATT
	proba	p35S		6FAM- TCTCCACTGACGTAAGG GATGACGCA-TAMRA
HvCon2	primery	HvCon2F1/HvCon2R1	F	TGCTAACCGTGTGGCAT CAC
			R	GGTACATAGTGCTGCTG CATCTG
	proba	HvCon2P		VIC- CATGAGCGTGTGCGTGT CTGCG-TAMRA

Tab. 4 Použité qPCRprimery pro kvantifikaci exprese *HvMPK4* genu

Název genu	Přední F Zadní R	Sekvence
<i>HvMPK4</i>	F	CACAGTACCCAAGGCAGGA
	R	GATCAACTGCACCATCAGACA
<i>HvMPK14</i>	F	CACAAAAGCCACGCAGAGA
	R	CCGAACCAACCACTTTACCA

Tab. 5 Program stanovení počtu kopií T-DNA

qRT-PCR kroky	Teplota	Čas (min:sec)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95°C	15:00	1
	95°C	00:15	40
	60°C	01:00	40

Tab. 6 Program pro stanovení exprese *HvMPK4*

qRT-PCR kroky	Teplota	Čas (min:sec)	Počet cyklů
Aktivace enzymu	95°C	10:00	1
	95°C	00:15	40
	60°C	01:00	40
	Postupné zvyšování teploty o 0,3°C z 60°C na 95°C.	45:00	1

expresní analýzy normalizovány vůči expresi *HvMPK14* a vyjádřeny jako relativní vůči expresi *HvMPK4* v rostlinách divokého typu, v případě odhadu počtu kopií pak byly výsledky normalizovány vůči hypotetické rostlině s jednou kopií T-DNA. Normalizace výsledků byla provedena pomocí 2 $\Delta\Delta$ CT metody (Livak a Schmittgen, 2001).

3.1.8 Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla provedena pro vizualizace PCR produktů.

Gel pro elektroforézu byl připraven následujícím způsobem: do 200 ml kádinky bylo přidáno 100 ml 1% TAE a 1g agarózy. Směs byla promíchaná a zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Dále bylo do roztoku přidáno barvivo Midori Green v poměru 7,5 μ l na 100 ml. Pak byl roztok přelit do elektroforetické vany s hřebínkem a ponechán polymerizovat. Po ztuhnutí gelu bylo do první jamky každého

řádku přidáno 4 µl hmotnostního standardu (1 kb Gene Ruleru) a do ostatních směs barviva 6x loading dye 1,5 µl a PCR vzorku 6 µl, celkem tedy 7,5 µl. Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena po dobu 45 minut při napětí v 80 V pomocí zdroje PowerPacTM Basic. Vizualizace výsledků byla provedena pomocí přístroje Gel DocTM EZ Imager v softwaru Image labVersion 5.1.

3.1.9 Hydromycinový test

Test je určen pro genotypování rostlin. Princip spočívá v tom, že malé části listů rostlin (listové disky, špičky) jsou testovány na odolnost proti antibiotiku hydromycinu, protože gen rezistence k němu je selekčním markerem vektorů série pBract. Do každé jamky 96 jamkové desky bylo přidáno 300 µl roztoku Hydromycinu B a listový disk nebo špička prvního listu týden staré rostliny ječmene. Dále byla destička omotaná z boku transparentní páskou, aby roztok hydromycin neevaporoval. Výsledky byly fotograficky dokumentovány za 5-7 dnů inkubace pomocí Xiaomi Redmi 3.

3.1.10 Experiment evaluace dynamiky vadnutí transgenních rostlin ječmene

Rostliny byly pěstovány ve fytotronu při relativní vlhkosti vzduchu 70% s fotoperiodou 16/8 hodin světlo/tma při teplotě 15°C/12°C. Rostliny byly vysety do hlubokých květináčů – truhlíků (rozměr 40x30x10 cm) do šesti řádků po šesti rostlinách, přičemž do každého řádku byla vyseta jedna transgenní nebo kontrolní linie. Vzdálenosti mezi jednotlivými rostlinami byly tyto: 5,5 cm v řádku a 4,5 cm mezi řádky. Byly použity 4 varianty výsevu transgenních a kontrolních linií ječmene, každá ve dvou opakováních v rámci květináče a zároveň byl každý květináč připraven ve dvou replikách. Celkem bylo tedy použito osm experimentálních květináčů.

Kombinace linií byly následující:

- 1) K4IR1 1-1-7-3, K4IR1(WT) 9-3-4-1(1), K4/3 2-2-11 (dvakrát).
- 2) K4IR1 6-1-4-5, K4/3(WT) 5-1-9(1), K4/3 11-1-2 (dvakrát).
- 3) K4IR1 4-2-4-6, K4IR1(WT) 10-4-2-2, K4/3 10-1Z-3 (dvakrát).
- 4) K4IR1 1-1-7-3, K4/3 2-2-11, K4IR1 4-2-4-6, K4/3 10-1Z-3, K4IR1 6-1-4-5, K4/3 11-1-2.

Fotografická dokumentace byla provedena na začátku pokusu, 17. a 30. den po posledním zalévání rostlin pomocí Xiaomi Redmi 3.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Molekulární charakterizace transgenních linií ječmene

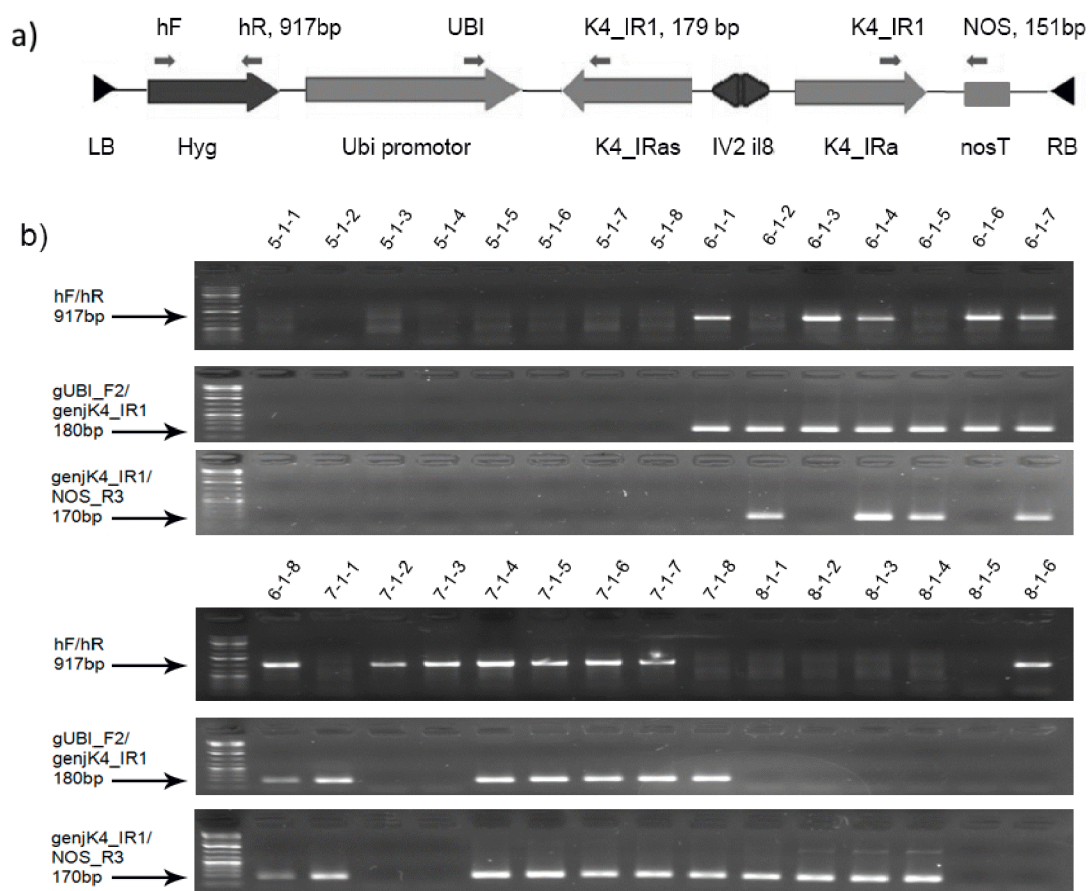
V práci je pro označování transgenních linií a jejich potomků využíván číselný systém. První číslo je číslem transgenní linie (např. 1 a 3 jsou dvě nezávislé transgenní linie číslo 1 a číslo 3), druhé číslo je číslem rostliny T0 generace (např. 1-3 a 1-5 jsou dvě rostliny T0 generace ze stejné linie číslo 1), třetí číslo je číslem rostliny T1 generace (např. 1-3-5 a 1-3-8 jsou dva různí T1 potomci identické T0 rostliny 1-3), čtvrté číslo je číslem rostliny T2 generace (např. 1-3-5-4) atd. V některých případech je u čísel rostlin T0 generace uvedeno také písmeno (např. 1-3N-2 je označením rostliny T1 generace číslo 2, která je potomkem rostliny T0 generace 1-3N).

4.1.1 Molekulární charakterizace T1 generace rostlin s umlčeným genem *HvMPK4*

Rostliny T1 generace transgenních linií ječmene s umlčeným genem *HvMPK4* byly genotypovány pomocí PCR na přítomnost T-DNA kazety pro umlčení *HvMPK4* (Obr. 4). Pro genotypování byly použity tři páry primerů cílené na detekci různých částí T-DNA kazety (Obr. 4a). Pro jednotlivé páry primerů a transgenní rostliny byly získány PCR produkty o očekávané velikosti, v některých případech však byly detekovány nekompletní T-DNA inserce – absence jednoho až dvou PCR produktů pro daného jedince (Obr. 4b). Celkem bylo genotypováno pomocí PCR se třemi páry primerů 84 rostlin T1 generace deseti nezávislých transgenních linií (Tab. 7). U T1 potomstev T0 rostlin 5-1, 11-2, 12-2 a 13-1 třech nezávislých linií byla zjištěna absence T-DNA inzercí. Mateřské T0 rostliny těchto potomstev tak mohly být tzv. „escapes“-netransgenní regeneranti odolní vůči hygromycinu. Nekompletní T-DNA inserce (Obr. 4b) byly detekovány u T1 potomstev T0 linií 4-2, 6-1, 7-1, 8-1 a 10-4 (Tab. 7). Pouze u T1 potomstva T0 rostliny 8-1 však nebyl identifikován žádný jedinec s kompletní T-DNA inzercí (přítomnost všech tří PCR produktů). Vybraní potomci T0 rostlin 4-2, 6-1, 7-1, 9-3 a 10-4 pěti nezávislých linií, kteří vykazovali přítomnost kompletních T-DNA inzercí, pak byli kultivováni do další generace.

4.1.2 Molekulární charakterizace T2 generace rostlin s umlčeným genem *HvMPK4*

V T2 generaci bylo genotypováno potomstvo vybraných T1 rostlin 4-2-4, 6-1-4, 7-1-4, 9-3-4 a 10-4-2 pěti nezávislých transgenních linií, které v T1 generaci obsahovaly kompletní T-DNA inserce. Zároveň bylo genotypováno potomstvo T1 rostlin 1-1-7, 1-



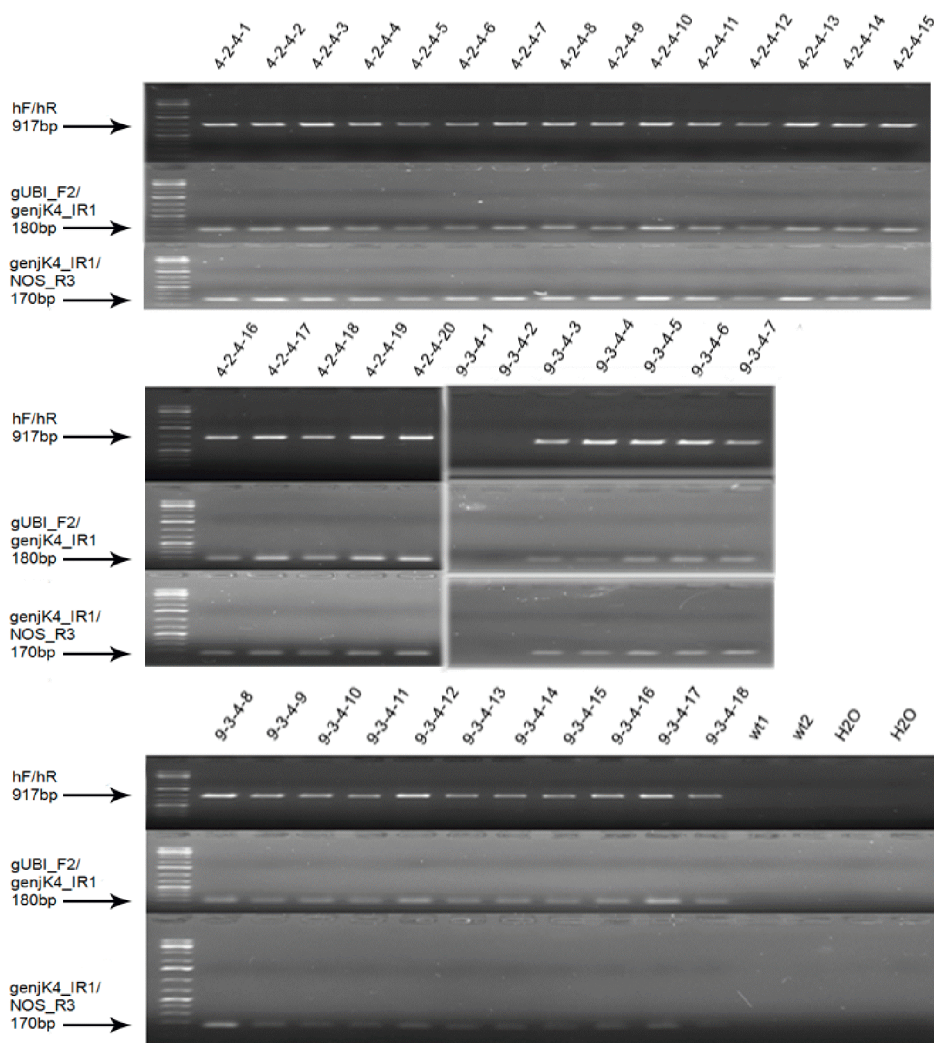
Obr. 4 Genotypování T1 generace potomků transgenních linií s umlčenou expresí *HvMPK4* genu. a) Schéma T-DNA kazety pro umlčení *HvMPK4* genu. LB a RB – leva a pravá hranice T-DNA, hyg – hygromycinový selekční marker, Ubi promotor- kukuřičný ubiquitinový promotor, K4_IRas – levá strana DNA vlásenky pro umlčení *HvMPK4*, K4_IRa – pravá strana DNA vlásenky pro umlčení *HvMPK4*, nosT – NOS terminátor. Šípky označují polohu párů primerů vůči T-DNA, které byly využity po genotypování transgenních rostlin. Za označeními primerů je uvedena velikost očekávaného PCR produktu b) Vzorové elektroforeogramy výsledků genotypování transgenních rostlin pomocí třech párů primerů. Šípky označují velikosti PCR produktů.

1-9, 1-1-10, 2-1-3, 2-1-4, 2-1-5, 3-1-7, 3-1-9 a 3-1-16 tři nezávislých linií, které nebyly charakterizovány v T1 generaci (Obr. 5, Tab. 8). V T2 potomstvech rostlin 4-2-4, 6-1-4, 7-1-4, 9-3-4 a 10-4-2 se vyskytly pouze transgenní rostliny s kompletní T-DNA inzercí – přítomnost všech tří PCR produktů (Tab. 8), byl tak potvrzen přenos kompletních T-DNA inzercí z vybraných T1 rostlin na další generaci. Kompletní T-DNA inzerce byly nalezeny také v T2 potomstvu T0 rostlin 1-1, 2-1 a 3-1, pouze u T2 potomstva T1 rostliny 3-1-7 a 3-1-16 byly detekovány také nekompletní T-DNA inzerty (Tab. 8).

V práci byla také testována využitelnost metody Multiplex TaqMan qPCR pro odhad genotypu transgenních rostlin, tj. určení zda se jedná o homozygoty nebo heterozygoty

Tab. 7 Souhrnné výsledky genotypování T1 generace potomků transgenních linií ječmene s umlčeným genem *HvMPK4*.

Rostlina T0	Celkový počet rostlin	Četnost PCR markerů			Počet rostlin se třemi PCR markery	Počet rostlin divokéh o typu
		hF/hR	gUBI_F2/ genjK4_IR1	genjK4_IR1/ NOS_R3		
4-2	8	6	7	7	5	0
5-1	16	0	0	0	0	16
6-1	8	6	8	5	3	0
7-1	8	6	5	5	4	0
8-1	6	1	0	4	0	1
9-3	8	7	7	7	6	0
10-4	8	4	5	5	4	3
11-2	6	0	0	0	0	6
12-2	8	0	0	0	0	8
13-1	8	0	0	0	0	8



Obr. 5 Genotypování T2 generace potomků transgenních linií s umlčenou expresí *HvMPK4* genu. Vzorové elektroforeogramy výsledků genotypování transgenních rostlin pomocí třech párů primerů. Šipky označují velikosti PCR produktů.

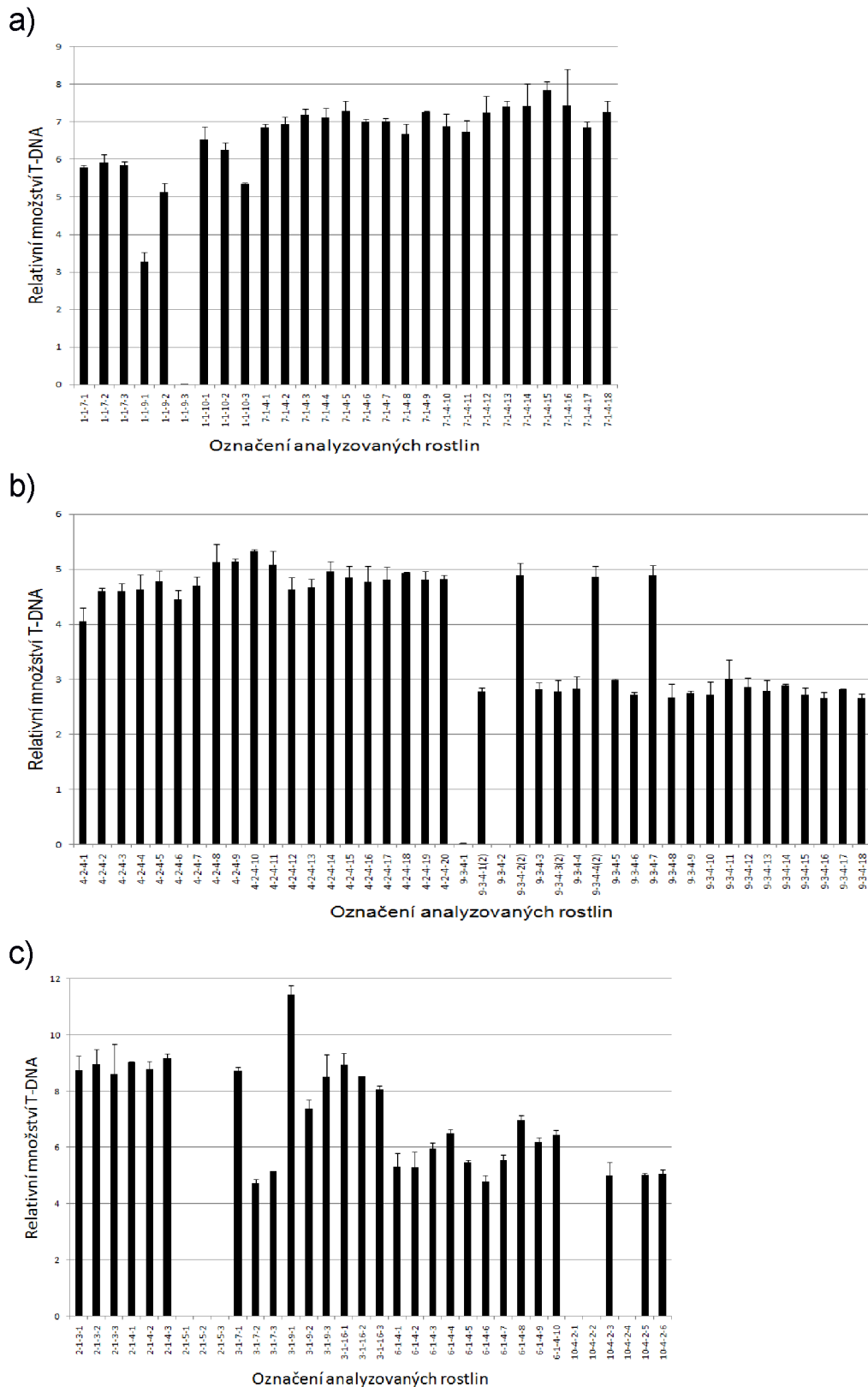
v T-DNA inzerci. Metoda bohužel nemohla být využita pro přesnější odhad počtu kopií

Tab. 8 Genotypování rostlin T2 generace transgenních linií ječmene s umlčenou *HvMPK4*.

Rostlina	Celkový počet rostlin	Počet markerů			Počet rostlin se všemi markery	Počet rostlin divokého typu
		hF/hR	gUBI_F2/ genjK4_IR1	genjK4_IR1/ NOS_R3		
1-1-7	6	6	6	6	6	0
1-1-9	3	2	2	2	2	1
1-1-10	3	3	3	3	3	0
2-1-3	6	3	3	3	3	3
2-1-4	3	3	3	3	3	0
2-1-5	3	0	0	0	0	3
3-1-7	3	3	3	0	0	0
3-1-9	3	3	3	3	3	0
3-1-16	3	3	3	0	0	0
4-2-4	23	23	23	23	23	0
6-1-4	13	13	13	13	13	0
7-1-4	21	21	21	21	21	0
9-3-4	26	26	26	26	23	3
10-4-2	6	3	3	3	3	3

inzerované T-DNA, protože nebyla k dispozici kontrolní rostlina s jednou T-DNA inzercí v heterozygotní nebo homozygotní sestavě potvrzená Southernovým blotováním. Výsledky analýz se lišily mezi jednotlivými „runy“ (destičkami). Pro stejné vzorky se rozdíl v diferenci mezi Ct referenčního genu p35S a *HvCon2* ($\Delta Ct = Ct \text{ p35S} - Ct \text{ HvCon2}$) lišil i o několik cyklů mezi jednotlivými „runy“. Pokud by byla k dispozici zmíněná kontrolní rostlina, bylo by možné jednotlivé „runy“ vůči ní normalizovat. Pro predikci genotypu však metodu bylo možné využít, protože násobek relativního množství T-DNA u potenciálních homozygotů vůči potenciálním heterozygotům v rámci potomstva jedné transgenní rostliny zůstal mezi jednotlivými runy přibližně stejný.

Výsledky odhadu genotypu T2 generace transgenních rostlin s umlčenou expresí *HvMPK4* jsou uvedeny na Obr. 6. V rámci potomstva T1 rostlin 4-2-4 a 9-3-4 byl analyzován velký počet jedinců (stejní jedinci byli také genotypováni obr. 5), celkem 20, respektive 22 jedinců. Všech 20 potomků rostliny 4-2-4 je transgenních a obsahuje přibližně stejné relativní množství T-DNA, zatímco mezi 22 potomky rostliny 9-3-4 vstěpily dvě kategorie relativního množství T-DNA a také dva negativní jedinci (Obr. 5 a Obr. 6b). U tří jedinců (9-3-4-2(2), 9-3-4-4(2) a 9-3-4-7) bylo pozorováno množství



Obr. 6 Odhad genotypu rostlin T2 generace transgenických linií ječmene s umlčením *HvMPK4*.

T-DNA, které zhruba odpovídá množství T-DNA u potomků rostliny 4-2-4, zatímco u 17 jedinců bylo pozorováno přibližně poloviční množství T-DNA (Obr. 6b). Souhrnně tyto výsledky naznačují, že rostlina 4-2-4 je homozygotní v T-DNA inzerci/inzercích,

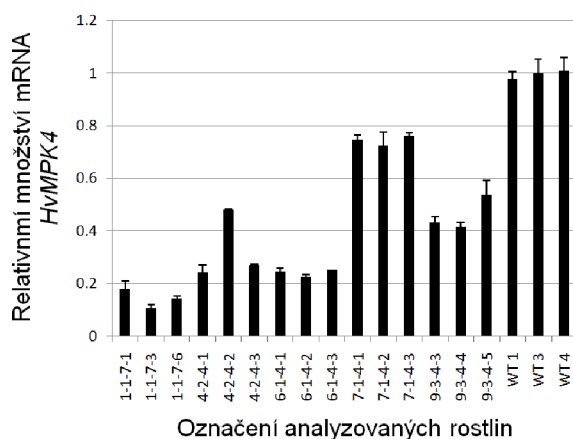
zatímco rostlina 9-3-4 je heterozygotní v T-DNA inserci/inzercích. Jedinci 9-3-4-2(2), 9-3-4-4(2) a 9-3-4-7 pak mohou být homozygoty v T-DNA inzercích. Pokud by v potomstvu rostliny 9-3-4 segregovalo více kategorií množství T-DNA než dvě, bylo by možné předpokládat, že dochází k segregaci dvou a více T-DNA insercí. To však i při velkém množství analyzovaných jedinců nebylo zjištěno. Je tedy možné, že v potomstvu rostliny 9-3-4 segreguje jedna T-DNA inserce/případně tandemové T-DNA inserce. Obdobně, pokud by rostlina 4-2-4 byla heterozygotní, docházelo by u jejího potomstva k segregaci minimálně dvou kategorií množství T-DNA. Za homozygotní lze na základě analýzy potomstva označit také rostlinu 7-1-4 (Obr. 6a) a pravděpodobně také 6-1-4 (Obr. 6c). U potomstva rostlin 1-1, 2-1, 3-1 a 10-4 byl analyzován malý počet jedinců pro spolehlivou realizaci odhadu genotypu rodičů v T2 generaci.

Výsledky dosažené pomocí Multiplex TaqMan qPCR byly potvrzeny analýzou T3 potomstva vybraných jedinců T2 generace pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence (Tab. 9). Ověření spolehlivosti této rychlé a jednoduché metody pro detekci transgenních rostlin s hygromycinovým selekčním markerem je uvedeno v části 4.2.2. Například všech 112 analyzovaných T3 potomků T2 rostliny 4-2-4-6 je rezistentních vůči hygromycinu, což potvrzuje predikci všech T2 potomků T1 rostliny 4-2-4 jako homozygotních v T-DNA inserci pomocí Multiplex TaqMan qPCR (Tab. 9, Obr. 6b). Obdobně potomstvo rostliny 6-1-4-5 (105 analyzovaných jedinců) a 1-1-7-3 (81 analyzovaných jedinců) je kompletně odolné vůči hygromycinu. Tyto rostliny jsou tedy i v souladu s predikcí genotypu homozygotní (Tab. 9, Obr. 6a, c)

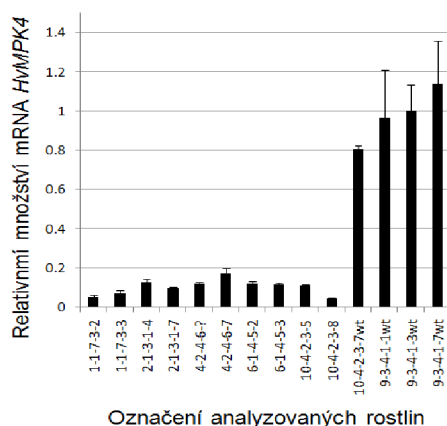
Tab. 9 Genotypování rostlin T3 generace transgenních linií ječmene s umlčenou expresí *HvMPK4* pomocí hydromycinového testu.

Rostlina	Celkový počet analyzovaných potomků	Počet rostlin s výskytem hygromycinové rezistence	Počet rostlin divokého typu
1-1-7-2	12	12	0
1-1-7-3	81	81	0
2-1-3-1	35	35	0
3-1-9-3	22	21	1
4-2-4-6	112	112	0
6-1-4-5	105	105	0
9-3-4-8	12	12	0
9-3-4-11(1)	12	12	0
10-4-2-3	8	7	1

U vybraných transgenních potomků T1 rostlin 1-1-7, 4-2-4, 6-1-4, 7-3-4 a 9-3-4 pěti nezávislých linií bylo stanoveno relativní množství mRNA *HvMPK4* pomocí kvantitativní řetězové polymerázové reakce s reverzní transkripcí (RT-qPCR) (Obr. 7). Pro analýzu byla využity listová báze 2. listu 14 dní starých klíčnicích rostlin ječmene. S výsledku je patrné, že relativní množství mRNA *HvMPK4* se lišilo, pravděpodobně v důsledku pozičního efektu a/nebo množství T-DNA inzercí, mezi jednotlivými transgenními liniemi. Ve srovnání s kontrolními wt rostlinami měli potomci linie 7 zhruba 80% relativního množství mRNA *HvMPK4*, potomci linie 9 přibližně 50%, potomci linií 4 a 6 přibližně 25% a potomci linie 1 přibližně 18% (Obr. 7). Obdobně byla provedena stanovení relativního množství mRNA *HvMPK4* v T3 generaci pomocí RT-qPCR (Obr. 8). Pro analýzu byly použity listové báze prvních listů 9 dní starých rostlin. Potomci linií 4 a 6 měli v tomto případě cca 12% relativního množství mRNA



Obr. 7 Relativní množství *HvMPK4* v rostlinách T2 generace transgenních linií s umlčeným genem *HvMPK4*.

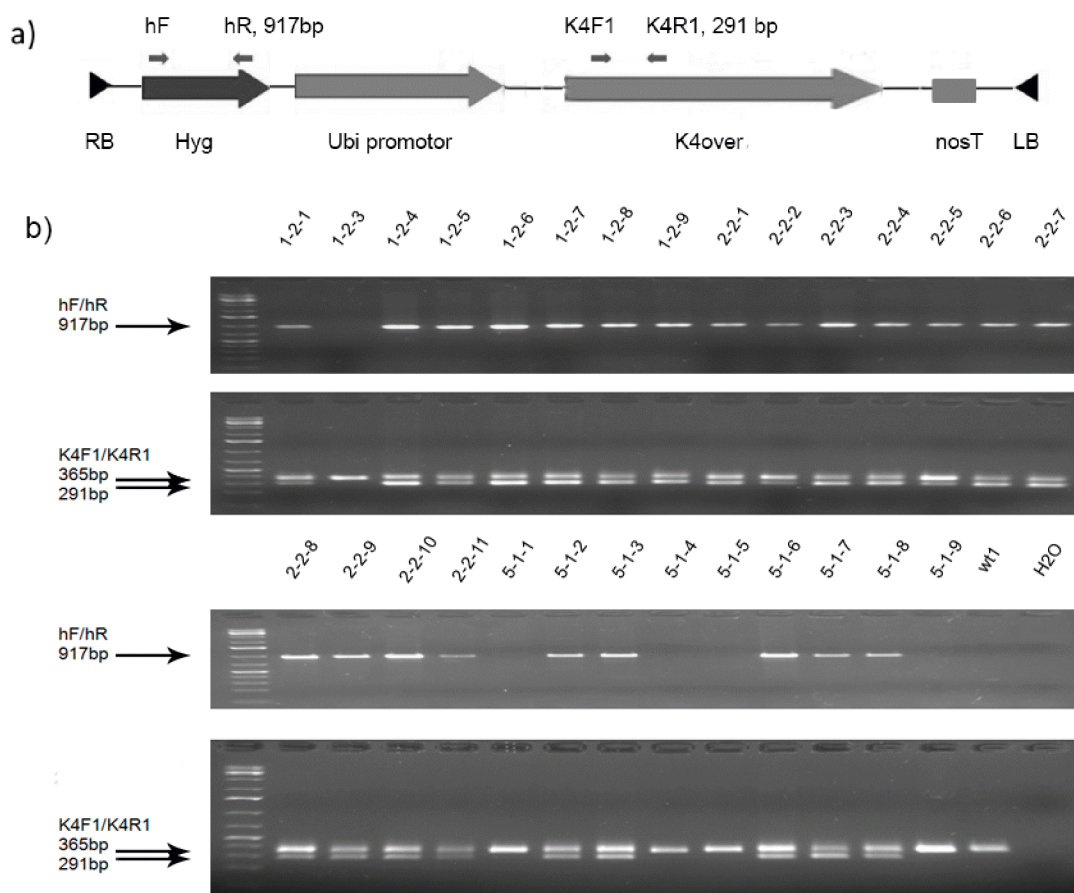


Obr. 8 Relativní množství mRNA *HvMPK4* v rostlinách T2 generace transgenních linií s umlčeným genem *HvMPK4*.

HvMPK4 ve srovnání s kontrolními wt rostlinami a potomci linie 1 cca 6%. U potomstva dosud necharakterizovaných linií 2 a 10 byla hladina mRNA *HvMPK4* stanovena na cca 12% relativního množství u kontrolních wt rostlin. Je možné, že rozdíl v relativním množství mRNA *HvMPK4* u stejných linií (1, 4 a 6) analyzovaných v T2 a T3 generaci je způsoben rozdílným rostlinným materiálem použitým pro analýzy (Obr. 7 a 8).

4.2.1 Molekulární charakterizace T1 generace rostlin s nadprodukcí *HvMPK4* genu

Rostliny T1 generace transgenních linií ječmene s nadprodukcí genu *HvMPK4* byly genotypovány pomocí PCR na přítomnost T-DNA kazety pro nadprodukcí *HvMPK4* (Obr. 9). Pro genotypování byly použity dva páry primerů cílené na detekci různých částí T-DNA kazety (Obr. 9a). *HvMPK4* transgen byl připraven jako syntetický gen, jehož sekvence odpovídá cDNA nativního *HvMPK4* genu. Pro detekci transgenu *HvMPK4* jsou využívány primery K4F1/K4R1, které jsou komplementární k oblastem lemujícím první intron wt *HvMPK4* genu. V případě přítomnosti transgenu *HvMPK4* poskytují tyto primery PCR produkt o velikosti 291 bp (absence prvního wt intronu) (Obr. 9a). Pro nativní genomickou sekvenci *HvMPK4* genu pak poskytují PCR produkt o velikosti 365 bp (přítomnost prvního wt intronu). Pro transgenní rostliny je tak charakteristická přítomnost obou PCR produktů o velikosti 291 bp (transgen) a 365 bp (wt gen), zatímco pro wt rostliny (pouze wt gen) je charakteristická přítomnost výhradně 365 bp produktu (Obr. 9b). Pro jednotlivé páry primerů a transgenní rostliny byly získány PCR produkty o očekávané velikosti a nebyly detekovány nekompletní T-DNA inserce (Obr. 9b). Celkem bylo genotypováno pomocí PCR se dvěma páry primerů 66 rostlin T1 generace devíti nezávislých transgenních linií (Tab. 10). U analyzovaných potomstev všech devíti nezávislých linií byly detekovány kompletní T-DNA inserce. V další fázi analýz byl proveden odhad genotypu transgenních rostlin pomocí Multiplex TaqMan qPCR (Obr. 10). Pokud je na jednom platu analyzováno větší množství transgenních linií je možné orientačně porovnat relativní množství T-DNA v těchto liniích (Obr. 10 a). Z výsledku je patrné, že nejmenší množství T-DNA bylo obsaženo v T1 potomstvu T0 rostliny 5-1. Zhruba trojnásobné množství T-DNA bylo obsaženo v T1 potomstvu T0 rostlin 1-5, 2-1F a 3-1N tří nezávislých linií. U potomstva těchto rostlin se také vyskytla pouze jedna kategorie množství T-DNA, bylo však analyzováno jen menší množství jedinců. V T1 potomstvu T0 rostlin 1-2 a 2-2



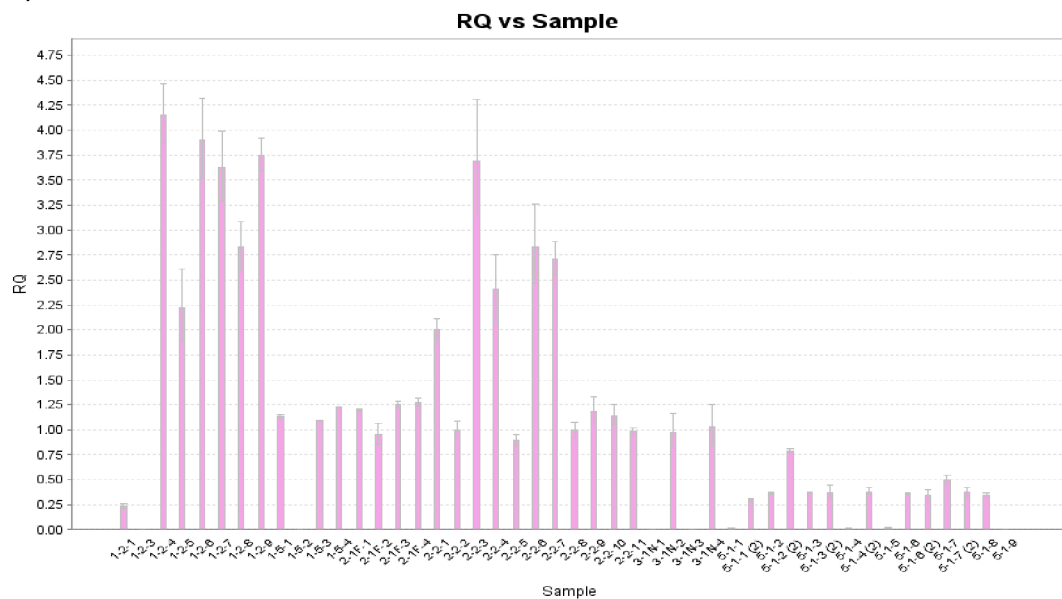
Obr. 9 Genotypování T1 generace potomků transgenických linií s nadexpresí *HvMPK4* genu. a) Schéma T-DNA kazety pro nadexpresi *HvMPK4* genu. LB a RB – leva a pravá hranice T-DNA, hyg – hygromycinový selekční marker, Ubi promotor- kukuřičný ubiquitinový promotor, K4over – syntetický transgen cDNA *HvMPK4*, nosT – NOS terminátor. Šipky označují polohu párů primerů vůči T-DNA, které byly využity po genotypování transgenických rostlin. Za označeními primerů je uvedena velikost očekávaného PCR produktu. b) Vzorové elektroforeogramy výsledků genotypování transgenických rostlin pomocí dvou párů primerů. Šipky označují velikosti PCR produktů.

Tab. 10 Souhrnné výsledky genotypování rostlin T1 generace transgenických linií ječmene s nadexpresí *HvMPK4*.

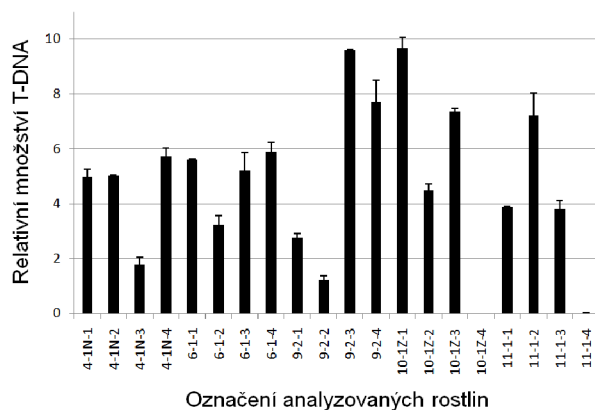
Rostlina	Celkový počet rostlin	Počet markerů		Počet rostlin se všemi markery	Počet rostlin divokého typu
		hF/hR	K4F1/K4R1		
1-2	8	7	7	7	1
1-5	4	3	3	3	1
2-1F	4	3	3	3	1
2-2	10	10	10	10	0
3-1N	4	3	3	3	1
4-1N	4	3	3	3	1
5-1	16	11	11	11	5
6-1F	4	4	4	4	0
9-2	4	4	4	4	0
10-1Z	4	3	3	3	1
11-1	4	3	3	3	1

bylo obsaženo největší množství T-DNA – až 16 x více než u jedinců potomstva

a)



b)



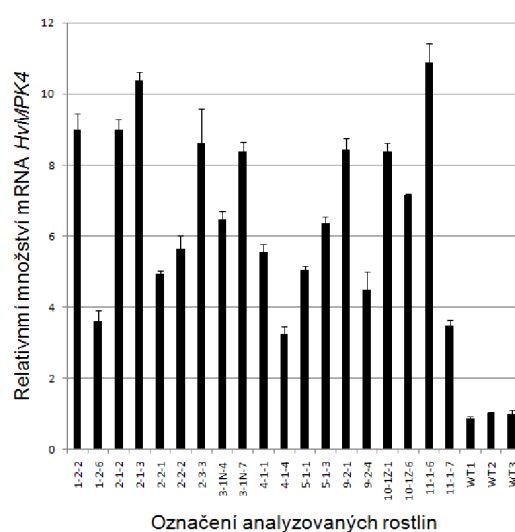
Obr. 10 Odhad genotypu transgenních rostlin ječmene T1 generace s nadexpresí *HvMPK4* genu. a) Originalní data byly bohužel smazány před spracováním a uvedené je softwarový výstup .

rostliny 5-1. Docházelo zde také k segregaci různých kategorií množství T-DNA (až 5 kategorií v případě potomstva T0 rostliny 1-2). Zajímavé je, že potomstva sesterských T0 rostlin (různé rostliny odebrané z identického kalusu) 1-2 a 1-5, 2-1F a 2-2 se lišily v relativním množství T-DNA, což znamená, že tyto sesterské rostliny pravděpodobně pocházely z nezávislých transformačních událostí a představovaly tak nezávislé transgenní linie. U T1 potomstev T0 rostlin 4-1N, 6-1, 9-2, 10-1Z a 11-1 byl analyzován jen malý počet jedinců a bylo tak obtížné odhadnout charakter segregace T-DNA (Obr. 10 b). Obecně lze shrnout, že naprostá většina jedenácti analyzovaných nezávislých linií s nadprodukcí *HvMPK4* pravděpodobně obsahuje několik T-DNA inzercí a nebyly, snad kromě linie 5, identifikovány transgenní linie s jednokopiovými T-DNA inzercemi. U vybraných transgenních potomků T1 rostlin 1-2, 2-1F, 2-2, 2-3, 3-1N, 4-1, 5-1, 9-2,

10-1Z a 11-1 osmi nezávislých linií bylo stanoveno relativní množství mRNA *HvMPK4* pomocí RT-qPCR (Obr. 11). Pro analýzu byla využita listová báze 1. listu 7 dní starých klíčících rostlin ječmene. Ve srovnání s kontrolními wt rostlinami obsahovali potomci transgenních linií zhruba 4x až 10 x více mRNA *HvMPK4*.

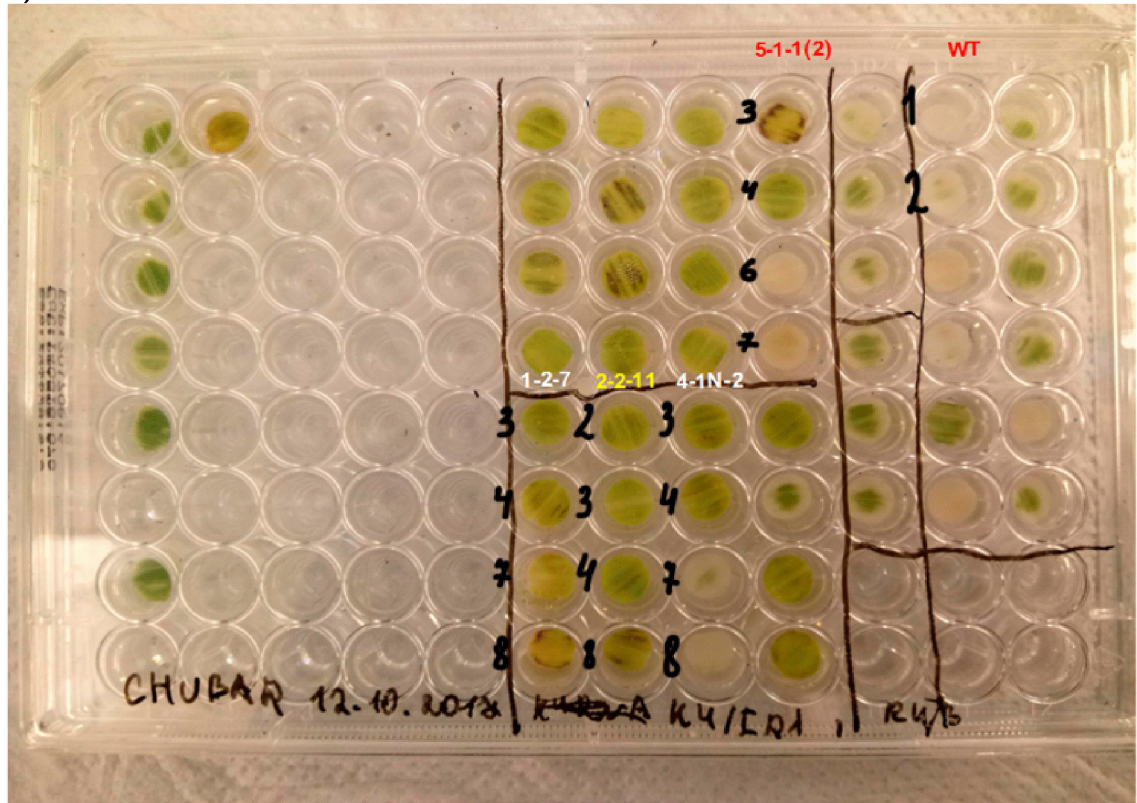
4.2.2 Molekulární charakterizace T2 generace rostlin s nadprodukcí *HvMPK4* genu

V práci byla verifikována spolehlivost metody *in vitro* testu hygromycinové rezistence pro genotypování transgenních rostlin ječmene s modifikovanou expresí *HvMPK4* (Obr. 12). Celkem byla verifikována spolehlivost metody pro 16 rostlin T2 generace potomstva čtyř nezávislých linií s nadexpresí *HvMPK4* a dvě kontrolní rostliny (Obr. 12a). Stejně rostliny byly pro ověření spolehlivosti metody genotypovány pomocí primerů pro detekci hygromycinového genu a transgenu *HvMPK4* (Obr. 12b). Byla pozorována 100% korelace výsledků obou metod. Listové disky z rostlin, které na základě genotypování pomocí PCR obsahovaly T-DNA kazetu pro nadprodukcí *HvMPK4*, byly rezistentní vůči hygromycinu a po 7 dnech inkubace na roztoku hygromycinu měly žlutozelenou až žlutou barvu, případně částečně nekrotizovaly. Listové disky z rostlin s absencí T-DNA kazety pak byly působením hygromycinu vyběleny. Metoda je rychlá a pracovně nenáročná a umožňuje genotypování velkého počtu vzorků.

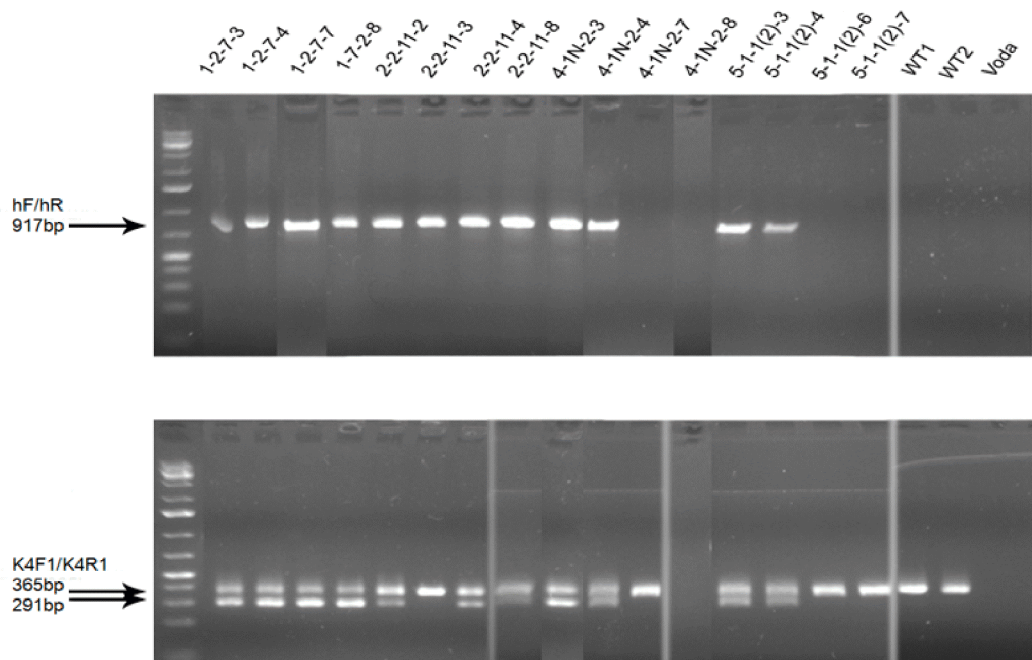


Obr. 11 Relativní množství mRNA *HvMPK4* v rostlinách T1 generace transgenních linií s nadprodukcí genu *HvMPK4*.

a)



b)



Obr. 12 Genotypování rostlin T2 generace transgenních linií ječmene s nadexpresí *HvMPK4* pomocí a) *in vitro* hydromycinového testu a b) PCR s primery hF/Hr a s primery K4F1/K4R1.

Metodu *in vitro* testu hygromycinové rezistence pak byla využita pro genotypování

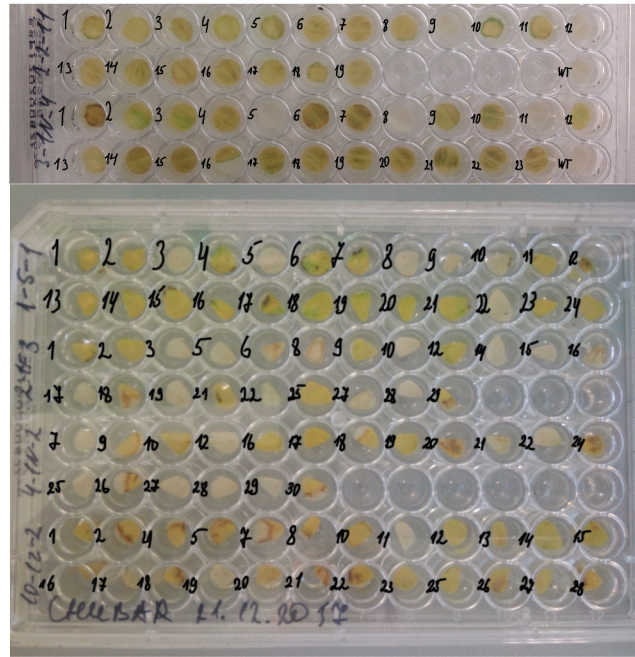
T2 potomstva vybraných jedinců T1 generace s cílem verifikace predikce jejich genotypů pomocí Multiplex Taq Man qPCR (Obr. 10, Tab. 11). Na homozygotní genotyp bylo na základě predikce počtu kopií například možné usuzovat u jedinců 6-1-4, 10-1Z-3 a 11-1-2, kteří obsahovali přibližně dvojnásobné množství T-DNA než jejich sesterské rostliny 6-1-2, 10-1Z-2 a 11-1-2 (Obr. 10b). Všichni T2 potomci jedinců 6-1-4, 10-1Z-3 a 11-1-2 byli rezistentní vůči hygromycinu, zatímco všichni potomci jedinců 6-1-2, 10-1Z-2 a 11-1-2 vyštepili v poměru rezistentní ku náchylným, který se blížil mendelistickému štěpnému poměru 3:1 (Tab. 11). Predikce genotypu tak u těchto jedinců korelovala se segregací hygromycinové rezistence v potomstvu. Predikování homozygoté měli v souladu s očekáváním všechny potomky rezistentní vůči hygromycinu, zatímco potomci jejich sesterských rostlin, kteří byli predikováni jako heterozygoté segregovali v rezistenci vůči hygromycinu.

U T2 potomstev T1 rostlin 1-5-1, 2-1F-3, 2-2-11, 3-1N-4, 4-1N-2 a 5-1-1 (2) došlo k vyštěpení náchylných a rezistentních rostlin (Tab. 11). Tyto T1 rostliny byly pro analýzy vybrány, protože obsahovaly nejméně T-DNA v rámci dané linie s velkým počtem T-DNA inzercí (2-2-11) a existovala tak šance, že budou do další generace přenášet pouze jednu či málo kopií T-DNA, dále pak protože existovala v rámci dané transgenní linie pouze jedna kategorie množství T-DNA (1-5-1, 2-1F-3 a 3-1N-4) a náhodně s cílem potvrzení predikovaného genotypu (4-1N-2 a 5-1-1 (2)) (Obr. 10). Dílčím cílem práce pak bylo identifikovat u T2 potomstva těchto T1 rostlin

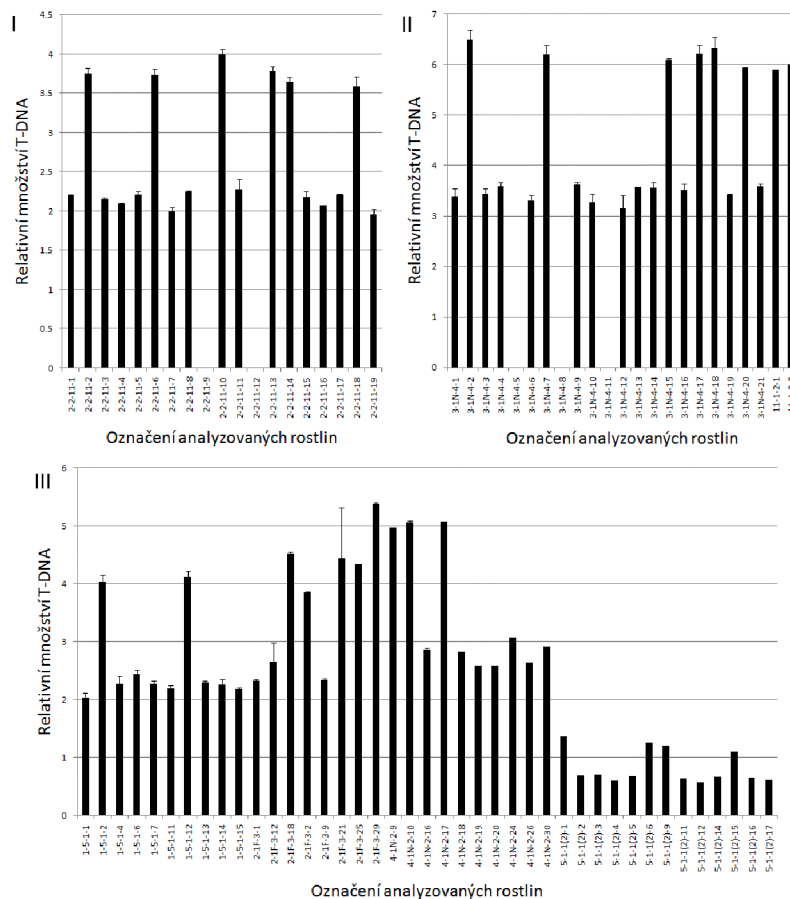
Tab. 11 Genotypování rostlin T2 generace transgenních linií ječmene s nadexpresí *HvMPK4* pomocí hygromycinového testu.

Rostlina	Celkový počet rostlin	Počet rostlin s výskytem hygromycinové rezistence	Počet rostlin divokého typu
1-2-7	12	12	0
1-5-1	55	41	14
2-1F-3	20	8	12
2-2-11	46	41	5
3-1N-4	62	49	13
4-1N-2	58	42	16
5-1-1(2)	132	97	35
6-1-2	19	15	4
6-1-4	20	20	0
10-1Z-2	45	38	7
10-1Z-3	30	30	0
11-1-1	46	32	14
11-1-2	68	68	0

a)



b)

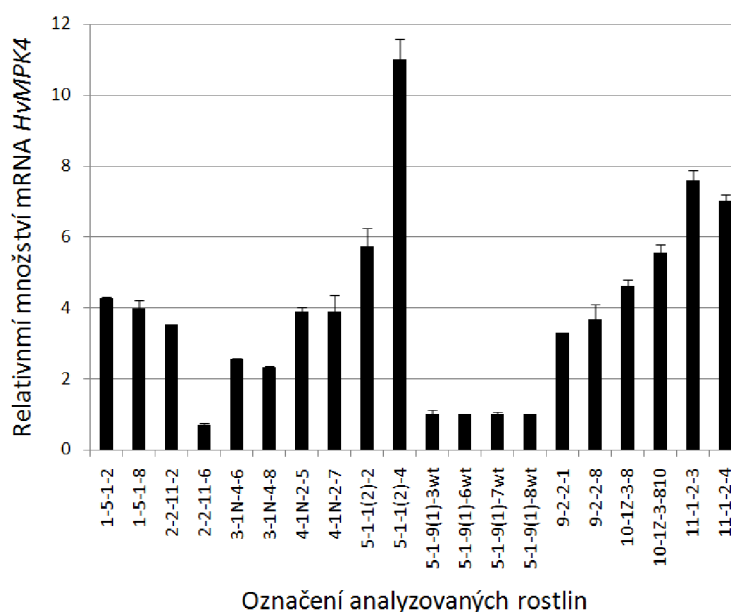


Obr. 13 a) Genotypování rostlin T2 generace transgenních linií ječmene s nadexpresí *HvMPK4* pomocí hydromycínového testu. b) Odhad genotypu transgenních rostlin ječmene T2 generace s nadexpresí *HvMPK4* genu.

homozygotní genotypy pomocí Multiplex TaqMan qPCR a získat tak homozygotní

genotypy z dalších šesti nezávislých linií (Obr. 13). Na obrázku 13 a jsou pro názornost uvedeny výsledky *in vitro* testu hygromycinové rezistence pro vybrané jedince potomstva rostlin 2-2-11, 3-1N-4, 1-5-1, 2-1F-3 a 4-1N-2. Výsledky hygromycinového testu 100% korelují s přítomností T-DNA zjištěné u těchto rostlin pomocí Multiplex TaqMan qPCR (Obr. 13 bI, bII a bIII). Vyjma potomků linie 2-1F-3, došlo u všech potomstev k vyštěpení dvou kategorií množství T-DNA, jejichž poměr se v rámci T-DNA pozitivních jedinců blížil k mendelistickému štěpnému poměru 1 (dominantní homozygoté) ku 2 (heterozygoté), přičemž jedinci se základním množstvím T-DNA (heterozygoté) byli početnější než homozygoté (přibližně dvojnásobné množství T-DNA) (Obr. 13 bI, bII a bIII). Jedince s dvojnásobným množstvím T-DNA je tak možné považovat za homozygoty, je třeba však mít na zřeteli skutečnost, že v porovnání s potomstvem rostliny 5-1-1 (2) měli potomci rostlin 1-5-1 a 4-1N-2 zhruba 4 x větší relativní množství T-DNA (Obr.13 bIII). To může znamenat, že obsahují tandemově inzerované kopie T-DNA, které, v důsledku absence crossing-overu, segregují mendelisticky.

U vybraných transgenních potomků T2 generace rostlin osmi nezávislých transgenních linií s nadexpresí *HvMPK4* bylo stanoveno relativní množství mRNA *HvMPK4* pomocí RT-qPCR (Obr. 14). Pro analýzu byla využity listová báze 2. listu 30 dní starých klíčnic rostlin ječmene. Ve srovnání s kontrolními wt rostlinami obsahovali potomci transgenních linií zhruba 4x až 10 x více mRNA *HvMPK4*.



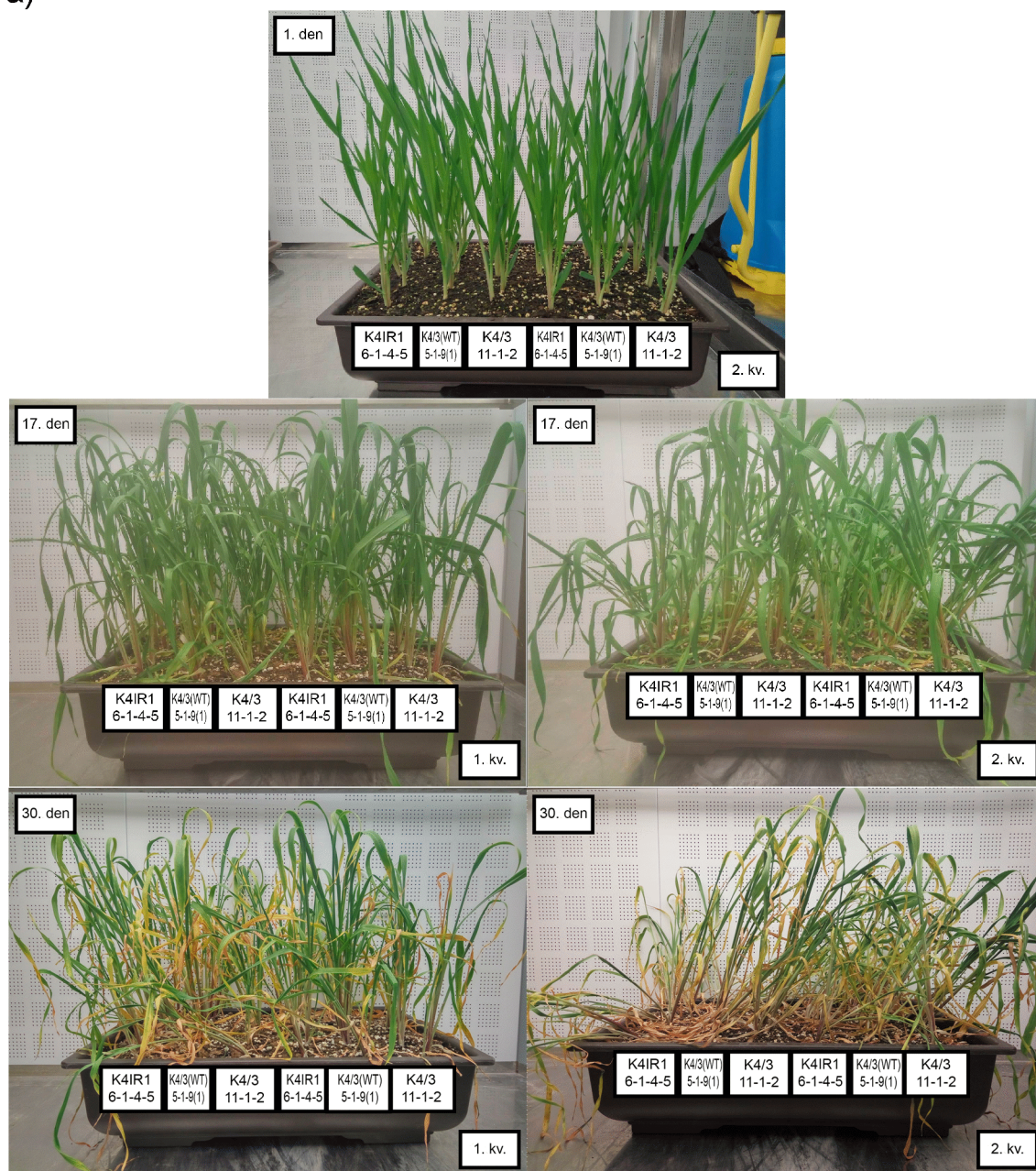
Obr. 14 Relativní exprese *HvMPK4* v transgenních rostlinách T2 generace s nadexpresí genu *HvMPK4*.

4.2. Sledování dynamiky vadnutí transgenních rostlin ječmene s modifikovanou expresí *HvMPK4* v podmínkách působení sucha

Na základě výsledků genotypování, odhadu genotypu a stanovení relativního množství mRNA *HvMPK4* byly pro vlastní experimenty vybrány T3 semena homozygotních mateřských rostlin T2 generace s umlčenou expresí *HvMPK4* genu 1-1-7-3, 4-2-4-6 a 6-1-4-5 tři nezávislých linií. Relativní množství mRNA *HvMPK4* bylo u těchto mateřských rostlin minimálně čtyřikrát nižší než u kontrolních rostlin (Obr. 8). Dále pak T2 semena homozygotních (10-1Z-3 a 11-1-2) a heterozygotních mateřských rostlin (2-2-11) T1 generace s nadprodukcí *HvMPK4* genu tři nezávislých linií a také semena negativních sesterských rostlin transgenních linií – negativní kontroly. Relativní množství mRNA *HvMPK4* bylo u nadprodukčních mateřských rostlin minimálně čtyřikrát až osmkrát vyšší než u kontrolních rostlin (Obr. 14). V rámci experimentu bylo vyseto celkem 8 truhlíků (Obr. 15). V rámci každého truhlíku byli potomci jednotlivých rostlin vyseti do jednotlivých řádků a řádky, celkem šest, se v květináčích střídaly podle schématu (RNAi linie, negativní kontrola, nadprodukční linie) x 2 (Obr. 15 a, b, c). Vyjimku tvořila kombinace všech transgenních linií v jednom květináči (Obr. 15 d). Každá kombinace linií byla pěstována ve dvou replikátech (dvou květináčích). Před zahájením experimentu byly všechny pokusné rostliny genotypovány pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence pro ověření očekávané přítomnosti (transgenní rostliny)/ absence (kontrolní rostliny) T-DNA (výsledky nejsou prezentovány)

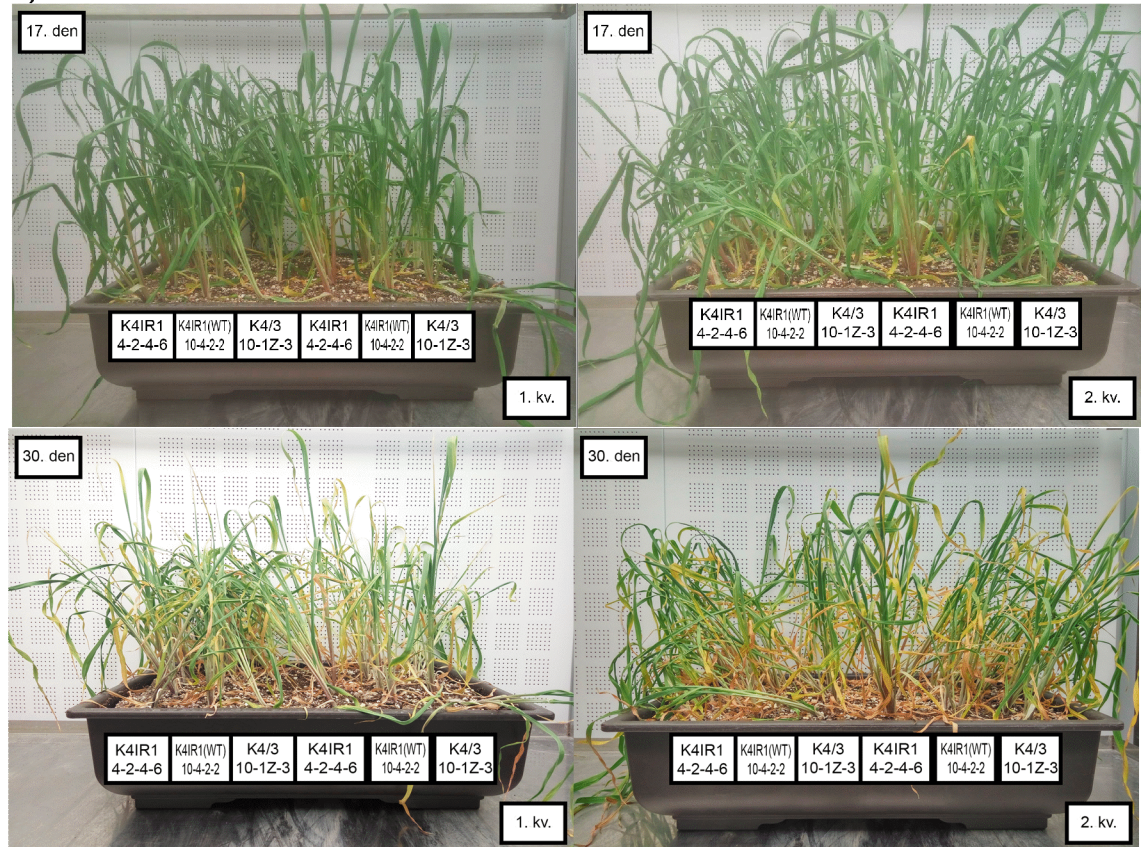
První známky vadnutí byly u rostlin zaznamenány 12 dní od okamžiku kdy bylo ukončeno zavlažování rostlin (data nejsou prezentována). Po 17 dnech od ukončení zalévání měly rostliny zvadlé všechny listy a po třiceti dnech již rostliny žloutly a usychaly (Obr 15). V průběhu experimentu, který byl kontrolován každý den od počátku vadnutí prvních listů, však nebyly pozorovány žádné rozdíly v dynamice vadnutí transgenních a kontrolních rostlin.

a)



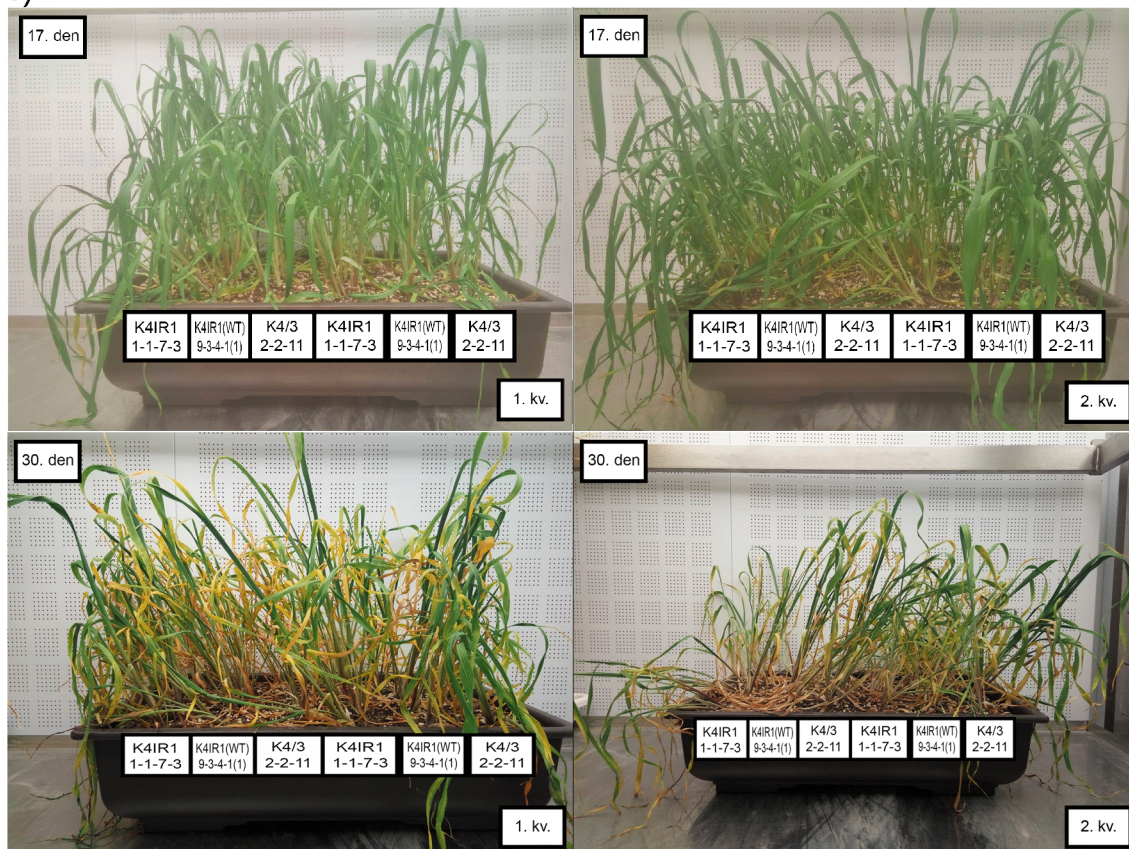
Obr. 15 a) Potomstvo T2 rostliny 6-1-4-5 linie K4IR1, potomstvo T1 negativní sesterské rostliny 5-1-9(1) linie K4/3(WT) a potomstvo T1 rostliny 11-1-2 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. b) Potomstvo T2 rostliny 4-2-4-6 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 10-4-2-2 linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 10-1Z-3 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. c) Potomstvo T2 rostliny 1-1-7-3 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 9-3-4-1 (1) linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 2-2-11 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. d) kombinace potomstev všech transgenních rostlin v jednom květináč (dvakrát).

b)



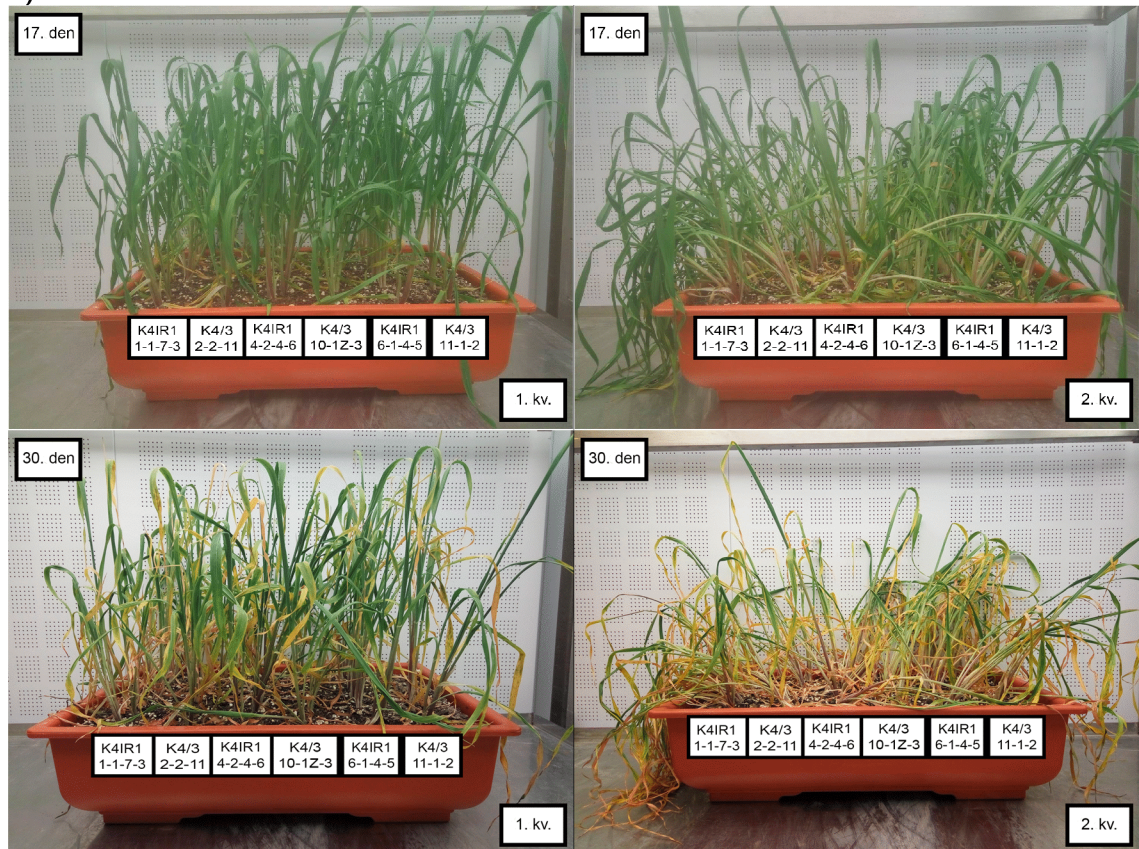
Obr. 15 a) Potomstvo T2 rostliny 6-1-4-5 linie K4IR1, potomstvo T1 negativní sesterské rostliny 5-1-9(1) linie K4/3(WT) a potomstvo T1 rostliny 11-1-2 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. b) Potomstvo T2 rostliny 4-2-4-6 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 10-4-2-2 linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 10-1Z-3 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. c) Potomstvo T2 rostliny 1-1-7-3 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 9-3-4-1 (1) linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 2-2-11 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. d) kombinace potomstev všech transgenních rostlin v jednom květináči (dvakrát) (*pokračování*).

c)



Obr. 15 a) Potomstvo T2 rostliny 6-1-4-5 linie K4IR1, potomstvo T1 negativní sesterské rostliny 5-1-9(1) linie K4/3(WT) a potomstvo T1 rostliny 11-1-2 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. b) Potomstvo T2 rostliny 4-2-4-6 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 10-4-2-2 linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 10-1Z-3 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. c) Potomstvo T2 rostliny 1-1-7-3 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 9-3-4-1 (1) linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 2-2-11 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. d) kombinace potomstev všech transgenních rostlin v jednom květináči (dvakrát) (*pokračování*).

d)



Obr. 15 a) Potomstvo T2 rostliny 6-1-4-5 linie K4IR1, potomstvo T1 negativní sesterské rostliny 5-1-9(1) linie K4/3(WT) a potomstvo T1 rostliny 11-1-2 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. b) Potomstvo T2 rostliny 4-2-4-6 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 10-4-2-2 linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 10-1Z-3 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. c) Potomstvo T2 rostliny 1-1-7-3 linie K4IR1, potomstvo T2 negativní sesterské rostliny 9-3-4-1 (1) linie K4IR1 (wt) a potomstvo T1 rostliny 2-2-11 linie K4/3 (dvakrát), první a druhý květináč. Fotografováno 1. Den, 17. den a 30. den po ukončení zalévání. d) kombinace potomstev všech transgenních rostlin v jednom květináči (dvakrát) (*pokračování*).

5 ZÁVĚR

- 1) Byly identifikovány transgenní linie ječmene s kompletními T-DNA kazetami pro umlčení *HvMPK4* genu. Vybrané rostliny s kompletními T-DNA inzercemi z celkem osmi nezávislých transgenních linií byly kultivovány do T3 generace a u vybraných jedinců T3 generace pěti nezávislých linií bylo determinováno relativní množství mRNA *HvMPK4*, které bylo minimálně čtyřikrát nižší než u kontrolních rostlin. Pomocí MultiplexTaqManqPCR metody byli identifikováni jedinci homozygotní v T-DNA inzerci/inzerci a spolehlivost predikce homozygotních genotypů byla potvrzena nezávislou metodou – *in vitro* testem hygromycinové rezistence.
- 2) Byly identifikovány transgenní linie ječmene s kompletními T-DNA kazetami pro nadexpresi *HvMPK4* genu. Vybrané rostliny s kompletními T-DNA inzercemi z celkem jedenácti nezávislých transgenních linií byly kultivovány do T2 generace a u vybraných jedinců T2 generace osmi nezávislých linií bylo determinováno relativní množství mRNA *HvMPK4*, které bylo čtyřikrát až osmkrát vyšší než u kontrolních rostlin. Pomocí MultiplexTaqManqPCR metody byli identifikováni jedinci homozygotní v T-DNA inzerci/inzerci a spolehlivost predikce homozygotních genotypů byla potvrzena nezávislou metodou – *in vitro* testem hygromycinové rezistence.
- 3) Byla analyzována dynamika vadnutí potomstva kontrolních, vybraných homozygotních transgenních rostlin s umlčeným genem *HvMPK4* a vybraných homozygotních a heterozygotních transgenních rostlin s nadprodukcí *HvMPK4*. Po 17 dnech od ukončení zalévání pokusných truhlíků byly zvadlé všechny listy u 46 starých rostlin, po 30 dnech pak rostliny žloutly a usychaly. Nebyly však pozorovány žádné rozdíly v dynamice vadnutí transgenních a kontrolních rostlin.

6 LITERATURA

- Abass M., Morris P.C. (2013): The *Hordeum vulgare* signalling protein MAP kinase 4 is a regulator of biotic and abiotic stress responses. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1353-1359.
- Agrawal G.K., Rakwal R., Iwahashi H. (2002): Isolation of novel rice (*Oryza sativa* L.) multiple stress responsive MAP kinase gene, OsMSRMK2, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **294**, 1009-1016.
- Agrawal G.K., Agrawal S.K., Shibato J., Iwahashi H., Rakwal R. (2003a): Novel rice MAP kinases *OsMSRMK3* and *OsWJUMK1* involved in encountering diverse environmental stresses and developmental regulation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **300**, 775-783.
- Agrawal G.K., Iwahashi H., Rakwal R. (2003b): Rice MAPKs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 171-180.
- Agrawal G.K., Tamogami S., Iwahashi H., Agrawal V.P., Rakwal R. (2003c): Transient regulation of jasmonic acid-inducible rice MAP kinase gene (*OsBWMK1*) by diverse biotic and abiotic stresses. *Plant Physiology and Biochemistry* **41**, 355-361.
- Alam M., Tanaka T., Nakamura H., Ichikawa H., Kobayashi K., Yaeno T., Yamaoka N., Shimomoto K., Takayama K., Nishina H., Nishiguchi M. (2015): Overexpression of a rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. *Plant biotechnology journal* **13**, 85-96.
- Andreasson E., Jenkins T., Brodersen P., Thorgrimsen S., Petersen N., Zhu S., Qiu J.L., Micheelsen P., Rocher A., Petersen M., Newman M.A., Nielsen H.B., Hirt H., Somssich I., Mattsson O., Mundy J. (2005) The MAP kinase substrate MKS1 is a regulator of plant defense responses. *The EMBO Journal* **24**, 2579-2589.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Ashby A.M., Watson M.D., Shaw C.H. (1987): A Ti-plasmid determined function is responsible for chemotaxis towards the plant wound product acetosyringone. *FEMS Microbiology Letters* **41**, 189.
- Baima S., Possenti M., Matteucci A., Wisman E., Altamura M.M., Ruberti I., Morelli G. (2001): The *Arabidopsis* ATHB-8 HD-Zip protein acts as a differentiation-promoting transcription factor of the vascular meristems. *Plant Physiology* **126**, 643-655.
- Bartels S., González Besteiro M.A., Lang D., Ulm R. (2010): Emerging functions for plant MAP kinase phosphatases. *Trends in Plant Science* **15**, 322-329.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood W.A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* **4**, 22.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Samaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **189**, 1069-1083.
- Beckers, G.J.M., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W.R., He S.Y., Zhang S., Conrath U. (2009): Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* **21**, 944-953.
- Bigéard J., Colcombet J., Hirt H. (2015): Signaling mechanisms in pattern-triggered immunity (PTI). *Molecular Plant* **8**, 521-539.
- Biotechnology resources for arable crop transformation (bract): <https://www.jic.ac.uk> (2. 2.2018).
- Brodersen P., Petersen M., Bjorn Nielsen H., Zhu S., Newman M.A., Shokat K.M., Rietz S., Parker J., Mundy J. (2006): *Arabidopsis* MAP kinase 4 regulates salicylic acid and jasmonic acid/ethylene-dependent responses via EDS1 and PAD4. *The Plant Journal* **47**, 532-546.
- Bytebier B., Deboeck F., De Greve H., Van Montagu M., Hernalsteens J.P. (1987): T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **84**, 5345-5349.

- Bubner B., Baldwin I.T. (2004): Use of real-time PCR for determining copy number and zygosity in transgenic plants. *Plant Cell Reports* **23**, 263-71.
- Carthew R.W., Sontheimer E.J. (2009): Origins and mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* **136**, 642-655.
- Castel S. E., Martienssen, R.A. (2013): RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nature Reviews Genetics* **14**, 100-112.
- Cho M.J., Wu E., Kwan J., Yu M., Banh J., Linn W., Anand A., Li Z., TeRonde S., Register J.C. III, Jones T.J., Zhao Z.Y. (2014): *Agrobacterium*-mediated high-frequency transformation of an elite commercial maize (*Zea mays* L.) inbred line. *Plant Cell Reports* **33**, 1767-1777.
- Cline J., Braman J., Hogrefe H. (1996): PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other DNA polymerases. *Nucleic Acids Research* **24**, 3546-3551.
- Cullen B.R. (2002): RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nature Immunology* **3**, 597-599.
- Chu Y., Solski P.A., Khosravi-Far R., Der C.J., Kelly K. (1996): The mitogen-activated protein kinase phosphatases PAC1, MKP-1, and MKP-2 have unique substrate specificities and reduced activity *in vivo* toward the ERK2 *sevenmaker* mutation. *The Journal of Biological Chemistry* **271**, 6497-6501.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. (2006): The *Arabidopsis* receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *Plant Cell* **18**, 465-476.
- Danquah A., Zelicourt A., Colcombet J., Hirt, H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32**, 40-52.
- Dzhamyeyev V. U. (2015): *Внутриклеточный сигналинг у растений: учебное пособие*. 1st ed., ACCA, Charkov, Ukraine, 224 stran.
- Ecker J.R., Davis R.W. (1986): Inhibition of gene expression in plant cells by expression of antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **83**, 5372-5376.
- Fan W., Dong X. (2002): *In vivo* interaction between NPR1 and transcription factor TGA2 leads to salicylic acid-mediated gene activation in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **14** 1377-1389.
- Fang, Y.D., Akula C., Altpeter F. (2002): *Agrobacterium*-mediated barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using green fluorescent protein as a visual marker and sequence analysis of the T-DNA barley genomic DNA junctions. *Journal of Plant Physiology* **156**, 1-8.
- Felix G., Duran J.D., Volko S., Boller T. (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**, 265-276.
- Girard A., Hannon G.J. (2008): Conserved themes in small-RNA-mediated transposon control. *Trends in Cell Biology* **18**, 136-148.
- Green R.M., Tingay S., Wang Z.Y., Tobin E.M. (2002): Circadian rhythms confer a higher level of fitness to *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* **129**, 576-584.
- Golldack D., Li C., Mohan H., Probst N. (2014): Tolerance to drought and salt stress in plants: unraveling the signaling networks. *Frontiers in Plant Science* **5**, 151.
- Goodner B., Hinkle G., Gattung S., Miller N., Blanchard M., Quorollo B., Goldman B.S., Cao Y., Askenazi M., Halling C., Mullin L., Houmiel K., Gordon J., Vaudin M., Iartchouk O., Epp A., Liu F., Wollam C., Allinger M., Doughty D., Scott C., Lappas C., Markelz B., Flanagan C., Crowell C., Gurson J., Lomo C., Sear C., Strub G., Cielo C., Slater S. (2001): Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* **294**, 2323-2328.
- Hannon G.J. (2002): RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- He C., Fong S.H., Yang D., Wang G.L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **12**, 1064-1073.
- Hiei Y., Ishida Y., Komari T. (2014): Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Frontiers in Plant Science* **5**, 628.
- Hirt H. (1997): Multiple roles of MAP kinases in plant signal transduction. *Trends in Plant Science* **2**, 11-15.

- Huang H.J., Fu S.F., Tai Y.H., Chou W.C., Huang D.D. (2002): Expression of *Oryza sativa* MAP kinase gene is developmentally regulated and stress-responsive. *Plant Physiology* **114**, 572-580.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases AtMAPK4 and AtMPK6. *The Plant Journal* **24**, 655-665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Ishida Y., Saito H., Hiei Y., Komari T. (2003): Improved protocol for transformation of maize (*Zea mays* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal* **20**, 57-66.
- Jones J.D.G., Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *Nature* **444**, 323-329.
- Karami O., Esna-Ashari M., Kurdistani G., Aghavaisi B. (2009): *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: The role of host. *Biologia Plantarum* **53**, 201-212.
- Kalendar R.N., Sivolap U.M. (1995): Полимеразная цепная реакция с произвольными праймерами. *Биополимеры и клетка* **11**, 55-65.
- Kultz D. (1998): Phylogenetic and functional classification of mitogen and stress-activated protein kinases. *Journal of Molecular Evolution* **46**, 571-588.
- Latchman D.S. (1997): Transcription factors: an overview. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **29**, 1305-1312.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lian W.W., Tang Y.M., Gao S.Q., Zhang Z., Zhao X., Zhao C.P. (2012): Phylogenetic analysis and expression patterns of the MAPK gene family in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Journal of Integrative Agriculture* **11**, 1227-1235.
- Liu Y., Zhang S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 3386-3399.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-158.
- MAPK Group (2002): Mitogen-activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- McCarty D.R., Chory J. (2000): Conservation and innovation in plant signaling pathways. *Cell* **103**, 201-209.
- Menke F.L., van Pelt J.A., Pieterse C.M., Klessig D.F. (2004): Silencing of the mitogen-activated protein kinase MPK6 compromises disease resistance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **16**, 897-907.
- Meszaros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy L., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006): The *Arabidopsis* MAP kinase kinase MKK1 participates in defense responses to the bacterial elicitor flagellin. *The Plant Journal* **48**, 485-498.
- Mishra R. C. (2010): *Plant Biotechnology*. 1st ed., Jaipur, India, 300 stran.
- Murashige T., Skoog F. (1962): A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Plant Physiology* **15**, 473 - 479.
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signaling. *Trends in Plant Sciences* **10**, 339-346.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Netea M. G., Quintin J., van der Meer J.W.M. (2011): Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell Host & Microbe* **9**, 355-361.
- Nishida E., Gotoh Y. (1993): The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 128-131.

- Patel M., Johnson J.S., Brettell R.I.S., Jacobsen J., Xue G.P. (2000): Transgenic barley expressing a fungal xylanase gene in the endosperm of the developing grains. *Molecular Breeding* **6**, 113-123.
- Prelich G. (2012): Gene overexpression: uses, mechanisms, and interpretation. *Genetics* **190**, 841-854.
- Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B.E., Karandikar M., Berman K., Cobb M.H. (2001): Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* **22**, 153- 183.
- Pitzschke A., Schikora A., Hirt H. (2009): MAPK cascade signalling networks in plant defence. *Current Opinion in Plant Biology* **12**, 421-426.
- Pitzschke A. (2014): Modes of MAPK substrate recognition and control. *Trends in Plant Science* In press. DOI: 10.1016/j.tplants.2014.09.006 .
- Pitzschke A., Djamei A., Teige M., Hirt H. (2009): VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18414-18419.
- Pecher P., Eschen-Lippold L., Herklotz S., Kuhle K., Naumann K., Bethke G., Uhrig J., Weyhe M., Scheel D., Lee J. (2014): The Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinases MPK3 and MPK6 target a subclass of ‘VQ-motif’-containing proteins to regulate immune responses.
- Powledge T.M. (2004); The polymerase chain reaction. *Advances in Physiology Education* **28**, 44–50.
- Qiu J.L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen S., Palma K., Suarez-Rodriguez M.C., Sandbech-Clausen S., Lichota J., Brodersen P., Grasser K.D., Mattsson O., Glazebrook J., Mundy J., Petersen M. (2008): Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO Journal* **27**, 2214-21.
- Reyna N.S., Yang Y. (2006): Molecular analysis of the rice MAP kinase gene family in relation to *Magnaporthe grisea* infection. *Molecular Plant-Microbe Interactions Journal* **19**, 530-540. *New Phytologist* **203**, 592-606.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Román E., Arana D.M., Nombela C., Alonso-Monge R., Pla J. (2007): MAP kinase pathways as regulators of fungal virulence. *Trends in Microbiology* **15**, 181-190.
- Rudd J.J., Keon J., Hammond-Kosack K.E. (2008): The wheat mitogen-activated protein kinases TaMPK3 and TaMPK6 are differentially regulated at multiple levels during compatible disease interactions with *Mycosphaerella graminicola*. *Plant Physiology* **147**, 802-815.
- Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S. J., Higuchi R., Horn G. T., Mullis K. B., Erlich H. A. (1988): Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science* **239**, 487—491.
- Saltini A. (1996): *I semi della civiltà: frumento, riso e mais nella storia delle società umane*. 1st ed., Avenue Media, Bologna, Italy, 182 stran.
- Samuel M.A., Hall H., Krzymowska M., Drzewiecka K., Hennig J., Ellis B.E. (2005): SIPK signaling controls multiple components of harpin-induced cell death in tobacco. *The Plant Journal* **42**, 406-416.
- Schellingen K., Der Straeten D.V., Vandenbussche F., Prinsen E., Remans T., Vangronsveld J., Cuypers A. (2014): Cadmium-induced ethylene production and responses in *Arabidopsis thaliana* rely on *ACS2* and *ACS6* gene expression. *BMC Plant Biology* **14**, 214.
- Schellmann S., Schnittger A., Kirik V., Wada T., Okada K., Beermann A., Thumfahrt J., Jürgens G, Hülkamp M. (2002): *TRIPTYCHON* and *CAPRICE* mediate lateral inhibition during trichome and root hair patterning in *Arabidopsis*. *The EMBO Journal* **21**, 5036-5046.
- Sells M.A., Chernoff J. (1997): Emerging from the Pak: the p21-activated protein kinase family. *Trends in Cell Biology* **7**, 162-167.
- Senturk M., Bellen H.J. (2017): Genetic strategies to tackle neurological diseases in fruit flies.

- Current Opinion in Neurobiology* **50**, 24-32.
- Seo S., Katou S., Seto H., Gomi K., Ohashi Y. (2007): The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *The Plant Journal* **49**, 899-909.
- Seo S., Sano H., Ohashi Y. (1999): Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* **11**, 289-298.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 196-203.
- Sheikholeslam S.N., Weeks D.P. (1987): Acetosyringone promotes high efficiency transformation of *Arabidopsis thaliana* explants by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* **8**, 291-298.
- Southern E. M. (1975): Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *Journal of Molecular Biology* **98**, 503-517.
- Spoel S.H., Dong X. (2012): How do plants achieve immunity? Defence without specialized immune cells. *Nature Reviews Immunology* **12**, 89-100.
- Stachel S.E., Messens E., Van Montagu M., Zambryski P. (1985): Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* **318**, 624-629.
- Sturgill T.W., Ray L.B. (1986): Muscle proteins related to microtubule associated protein-2 are substrates for an insulin-stimulatable kinase. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **134**, 565-571.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Tarchevskij I. (2002): *Plant Cell Signaling Systems*. 1st ed., Nauka, Russia, 294 stran.
- Tingay S., Mcelroy D., Kalla R., Fieg S., Wang M., Thornton S., Brettell R. (1997): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation. *The Plant Journal* **11**, 1369-1376.
- Tsuda K., Qi Y., Nguyen le V., Bethke G., Tsuda Y., Glazebrook J., Katagiri F. (2012): An efficient *Agrobacterium*-mediated transient transformation of *Arabidopsis*. *The Plant Journal* **69**, 713-719.
- Uga, Y., Sugimoto, K., Ogawa, S., Rane, J., Ishitani, M., Hara, N., Kitomi Y., Inukai Y., Ono K., Kanno N., Inoue H., Takehisa H., Motoyama R., Nagamura Y., Wu J., Matsumoto T., Takai T., Okuno K., Yano M. (2013): Control of root system architecture by DEEPER ROOTING 1 increases rice yield under drought conditions. *Nature Genetics* **45**, 1097-1102.
- VanGuilder H.D., Vrana K.E., Freeman W.M. (2008): Twenty-five years of quantitative PCR for gene expression analysis. *Biotechniques* **44**, 619-626.
- Wang P., Du Y., Li Y., Ren D., Song C.P. (2010): Hydrogen peroxide-mediated activation of MAP kinase 6 modulates nitric oxide biosynthesis and signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **22**, 2981-98.
- Wang H., Ngwenyama N., Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **19**, 63-73.
- Wang Z., Zhao X., Wang B., Liu E., Chen N., Zhang W., Liu H. (2016): Overexpression of an *Arabidopsis* heterogeneous nuclear ribonucleoprotein gene, *AtRNPI*, affects plant growth and reduces plant tolerance to drought and salt stresses. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **472**, 353-359.
- Wei L., Guangqin G., Guochang Z. (2000): *Agrobacterium*-mediated transformation, state of the art and future prospect. *Chinese Science Bulletin* **45**, 1537-1546.
- Weiberg A., Wang M., Lin F.M., Zhao H., Zhang Z., Kaloshian I., Huang H.D., Jin H. (2013): Fungal small RNAs suppress plant immunity by hijacking host RNA interference pathways. *Science*, **342**, 118-123.
- Whitmarsh A.J., Davis R.J. (1998): Structural organization of MAP-kinase signaling modules by scaffold proteins in yeast and mammals. *Trends in Biochemical Sciences* **23**, 481-485.

- Wilson C., Pfosser M., Jonak C., Hirt H., Heberle-bors E., Vicente O. (1998): Evidence for the activation of a MAP kinase upon phosphate-induced cell cycle re-entry in tobacco cells. *Physiologia Plantarum* **102**, 532-538.
- Wuriyangan H., Falk B.W. (2013): RNA interference towards the potato psyllid, *Bactericera cockerelli*, is induced in plants infected with recombinant tobacco mosaic virus (TMV). *PLOS One*, **8**, e66050.
- Xu J., Meng J., Meng X., Zhao Y., Liu J., Sun T., Liu Y., Wang Q., Zhang S. (2016): Pathogen-responsive MPK3 and MPK6 reprogram the biosynthesis of indole glucosinolates and their derivatives in Arabidopsis immunity. *Plant Cell* **28**, 1144-1162.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56-64.
- Yang K.Y., Liu Y., Zhang S. (2001): Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **98**, 741-746.
- Yang S.H., Sharrocks A.D., Whitmarsh A.J. (2013): MAP kinase signalling cascades and transcriptional regulation. *Gene* **513**, 1-13.
- Zhang J.Z. (2003): Overexpression analysis of plant transcription factors. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 430-440.
- Zhang, S., Klessig D.F. (2001): MAPK cascades in plant defense signaling. *Trends in Plant Science* **6**, 520-527.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

- ABA - kyselina abscisová
- BCP - 1-bromo-3-chloropropan
- CaMV - terminátor viru kvěťákové mozaiky
- CTAB - cetyltrimetylamoniombromid
- ddH₂O - dvakrát destilovaná voda
- DNA - deoxyribonukleová kyselina
- dNTPs - deoxynukleotidový mix
- EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová
- F- přední primer
- Hyg - hygromicinový gen - marker pro fyziologickou selekci transgenních rostlin
- JA - kyselin jasmonová
- LB – levá hranice T-DNA
- MAPK - mitogenem-aktivované protein kinasa
- MBP - myelinový bazický protein
- NOS - nopalinsyntázový terminátor
- PCR – polymerázová řetězová reakce
- qRT-PCR - kvantitativní polymerázové řetězové reakce
- R - zadní primer
- RB – pravá hranice T-DNA
- RNA - ribonukleová kyselina
- SA - kyselina salicylová
- SIMK - protein kinasa aktivovaná solným stresem
- TAE - TRIS-acetátový pufr
- TF - transkripční faktor
- TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan
- Ubi - kukuřičný ubikvitinový promotor
- WIPK - protein kinasa aktivovaná poraněním
- WT – rostlina divokého typu