

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Genotypizace a fenotypizace transgenních linií
jarního ječmene osm**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor: **Bc. Barbora Klčová**

Studijní program: B1406 Biochemie

Studijní obor: Biotechnologie a genové inženýrství

Forma studia: Prezenční

Vedoucí práce: **Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.**

Rok: 2019

Prehlasujem, že som diplomovú prácu vypracovala samostatne s vyznačením všetkých použitých prameňov a spoluautorstiev. Súhlasím so zverejnením diplomovej práce podľa zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, v znení neskorších predpisov. Bola som zoznámená s tým, že sa na moju prácu vzťahujú práva a povinnosti vyplývajúce zo zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, v znení neskorších predpisov.

V Olomouci dňa

.....

podpis diplomanta

Pod'akovanie

Ďakujem Ing. Ludmile Ohnoutkovéj, Ph.D., vedúcej diplomovej práce, za jej cenné rady, odborné vedenie a čas, ktorý mi venovala. Rada by som poďakovala Mgr. Tomášovi Vlčkovi, že mi bol vždy ochotný poradiť s experimentami. Ďalej chcem poďakovať Mgr. Alexandre Husičkovej, Ph.D., Mgr. Lukášovi Spíchalovi, Ph.D. a Mgr. Nuria De Diego, Ph.D. za pomoc s experimentami a poskytnutie priestorov pre ich realizáciu. Chcem tiež poďakovať svojim kolegyniam Bc. Barbore Macúchovej a Bc. Markéte Trajerovej za pomoc pri práci a za vytvorenie príjemnej atmosféry v laboratóriu.

Bibliografická identifikácia

Meno a priezvisko autora	Barbora Klčová
Názov práce	Genotypizácia a fenotypizácia transgénnych línií jarného jačmeňa osm
Typ práce	Diplomová
Pracovisko	Centrum regiónu Haná pre biotechnologický a poľnohospodársky výskum, Oddelenie chemickej biológie a genetiky
Vedúci práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2019
Abstrakt	Metódou androgenézy boli získané dihaploidné a haploidné transgénne rastliny jarného jačmeňa s nadexpresiou génu osmotin. Z transgénnych dihaploidných rastlín bola získaná transgénna homozygotná dihaploidná línia a na jej potomstve bol testovaný vplyv NaCl, manitolu a polyetylénglykolu (PEG) na klíčenie a vývoj rastlín. Bola stanovená miera expresie génu osmotin v pôvodných transformovaných rastlinách T ₀ generácie, v dihaploidných a haploidných transgénnych rastlinách. Miera expresie génu osmotin bola tiež stanovená v transgénnych homozygotných dihaploidných rastlinách, ktoré boli vystavené pôsobeniu NaCl a PEG.
Kľúčové slová	Osmotin, jarný jačmeň, sucho, soľný stres, <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
Počet strán	77
Počet príloh	2
Jazyk	Slovenský

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Barbora Klčová
Title	Genotyping and phenotyping of spring barley transgenic lines osm
Type of thesis	Diploma
Department	Centrum of region Hanná for biotechnological and agricultural research, Department of chemic biology and genetics
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentation	2019
Abstract	Transgenic dihaploid and haploid plants of spring barley overexpressing osmotin gene were obtained by using androgenesis method. From transgenic dihaploid plants, transgenic homozygous dihaploid line was obtained and the effect of NaCl, mannitol and polyethylenglycol (PEG) on germination and growth was tested on its offspring. In transgenic plants of spring barley of T ₀ generation, dihaploid and haploid transgenic plants rate of osmotin gene expression was defined. Rate of osmotin expression was also detected in transgenic homozygous dihaploid plants exposed to effect of NaCl and PEG.
Keywords	Osmotin, spring barley, drought, salt stress, <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>
Number of pages	77
Number of appendices	2
Language	Slovak

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY	2
2.1 Jačmeň – charakteristika	2
2.1.2 Genetické transformácie jačmeňa.....	3
2.2 Rastlinný stres	6
2.2.1 Abiotický stres	7
2.2.1.1 Stres rastlín vyvolaný suchom	8
2.2.1.2 Zvýšená rezistencia rastlín na soľný stres.....	9
2.2.2 Biotický stres	10
2.2.2.1 Hubové patogény	11
2.3 S patogenézou súvisiace (PR) proteíny	14
2.3.1 PR-5 proteíny.....	14
2.3.1.1 Osmotin.....	15
3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ	16
3.1 Materiál	16
3.1.1 Rastlinný materiál	16
3.1.2 Použité chemikálie a roztoky.....	16
3.1.3 Použité antibiotiká	18
3.1.4 Použité prístroje	18
3.2 Metódy	19
3.2.1. Izolácia nezrelých embryí.....	19
3.2.2. Detekcia génu osm.....	21
3.2.3 Stanovenie ploidie rastlín regenerovaných z peľníc.....	22
3.2.3.1 Stanovenie ploidie.....	22
3.2.4 Izolácia RNA	23
3.2.5 Prepis RNA do cDNA.....	24

3.2.6 Stanovenie expresie génu <i>osm</i>	25
3.2.7 Vplyv abiotického stresu na klíčenie semien jačmeňa	27
3.2.7.1 Testovanie klíčenia semien jačmeňa.....	27
3.2.8 Vplyv abiotického stresu na dĺžku koreňa a nadzemnej časti jačmeňa.....	28
3.2.9 Test rezistencie jačmeňa voči <i>Blumeria graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>	29
3.2.10 Vplyv NaCl a PEG na klíčenie a vývoj jačmeňa.....	29
3.2.10.1 Analýza chlorofylu.....	31
3.2.10.2 Analýza osmolytických látok.....	32
4 VÝSLEDKY	33
4.1 Selekcia transgénnych rastlín T₁ generácie.....	33
4.2 Detekcia génu <i>osm</i> v rastlinách regenerovaných z peľníc	35
4.3 Analýza ploidie transgénnych rastlín regenerovaných z peľníc	36
4.4 Overenie prítomnosti transgénu v potomstve dihaploidnej rastliny 3C1 10 ..	38
4.5 Výsledky expresie génu <i>osm</i>	39
4.6 Vplyv NaCl a manitolu na klíčenie semien	45
4.7 Vplyv NaCl a manitolu na dĺžku nadzemnej časti a koreňov rastlín	48
4.8 Test odolnosti rastlín voči <i>B. graminis</i> f. sp. <i>hordei</i>.....	50
4.9 Vplyv NaCl a PEG na klíčenie rastlín	51
4.10 Vplyv NaCl a PEG na dĺžku a hmotnosť nadzemnej časti rastlín.....	53
4.11 Vplyv NaCl a PEG na expresiu génu <i>osm</i>.....	56
4.12 Vplyv NaCl a PEG na obsah chlorofylu.....	60
4.13 Vplyv NaCl a PEG na veľkosť osmotického potenciálu.....	61
5 Diskusia	62
6 Záver.....	66
7 Literatúra.....	68
8 Zoznam použitých symbolov a skratiek.....	75
9 Prílohy	76

Ciele práce:**Teoretické ciele:**

- Vypracovať literárnu rešerš na tému PR proteíny.

Praktické ciele:

- Selekcia homozygotných línií jarného jačmeňa obsahujúcich transgén.
- Stanovenie prítomnosti záujmového génu na úrovni DNA a RNA.
- Určenie počtu kópií inkorporovaného transgénu.
- Hodnotenie fenotypu vybraných línií, sledovanie zvýšenej rezistencie transgénnych rastlín k stresu.

1 ÚVOD

Extrémne výkyvy počasia ako dlhodobé sucha, teplotné vlny a nepravidelné zrážky sa stávajú prirodzenými javmi. Klimatické zmeny ovplyvnia svetové poľnohospodárstvo. Zvyšujúce sa teploty v tropických regiónoch budú škodlivé pre produkciu obilnín iných hospodársky významných plodín. V krajných prípadoch, v oblasti Južnej Ázie a sub-Saharskej časti Afriky produkcia obilnín nebude naďalej možná z dôvodu nadmerného tepla a sucha (Lawas et al., 2018).

Priemerný výnos dôležitých hospodárskych plodín sa pohybuje v rozmedzí iba 20 – 50 % z celkového výnosu. Tieto straty sú zväčša spôsobené suchom a vysokým obsahom soli v pôde, teda podmienkami prostredia, ktoré sa budú ešte viac zhoršovať v dôsledku globálnych klimatických zmien (Shrivastava a Kumar, 2015).

Hľadajú sa možnosti a rýchly spôsob ako vylepšiť hospodársky významné plodiny. Bolo objavených niekoľko užitočných nástrojov a techník, ktoré možno použiť na manipuláciu rastlinných mechanizmov s cieľom získať rastliny s požadovanými vylepšenými vlastnosťami. Medzi takéto nástroje sa zaraďujú napríklad synteticky vyrobené promótory, represory a aktivátory pre reguláciu expresie génov. Niektoré techniky ako transformácia rastlín cudzím génom či umelo vytvorenými chromozómami nadobúdajú stále dôležitejšiu úlohu pri modifikácii rastlín. Vedecké technológie sú perspektívnym nástrojom pre zlepšovanie kvality rastlín a zároveň udržanie dostatočnej produkcie hospodársky významných plodín, ktoré sú hlavným zdrojom potravy ľuďstva (Fatima, 2018).

2 SÚČASNÝ STAV RIEŠENEJ PROBLEMATIKY

2.1 Jačmeň – charakteristika

Jačmene predstavujú z botanického hľadiska samostatný rod z čeľade lipnicovité (Poaceae). Tradičná taxonómia ich od ostatných zástupcov čeľade odlišuje jednokvetým klasom, ktorý vyrastá na vretene klasu vždy po trojiciach. Rod *Hordeum* pôvodne zahŕňal 150 druhov. S rozvojom molekulárnych a genetických poznatkov sa počet samostatných druhov znížil na 32 druhov, vo výsledku 45 taxónov (Von Bothmer et al., 2003).

Jačmeň patrí do ekonomicky významnej skupiny rastlín, kmeňa Triticeae. Radia sa sem hlavné obilniny mierneho pásma: pšenica (*Triticum*), žito (*Secale cereale*), jačmeň (*Hordeum vulgare*) a tritikale (*Triticosecale*), umelo vytvorený hybrid žita a pšenice. Všetky druhy rastlín v kmeni Triticeae disponujú klasmi (nepohyblivým kvetenstvom), základným chromozómovým číslom $x = 7$ a veľkými chromozómami. Tento kmeň je celosvetovo distribuovaný na všetkých kontinentoch, objavuje sa aj v najchladnejších a najteplejších oblastiach (Graner et al., 2011).

Genóm jačmeňa o veľkosti 5,3 Gbp obsahuje viac ako 39000 génov. Štruktúra genómu je komplexná a obsahuje veľké množstvo opakujúcich sa sekvencií DNA. Tieto transpozómy tvoria približne 80,8 % sekvencie genómu (Graner et al., 2011).

Jačmeň je jednoročná plodina, ktorá sa vyskytuje v jarnej a ozimnej variante. Na základe počtu chromozómov rozdeľujeme jačmeň na diploidný ($2n = 2x = 14$), tetraploidný ($2n = 4x = 28$) a hexaploidný ($2n = 6x = 42$). Kultúrny jačmeň je diploidný, podľa usporiadania klasu dvojradový alebo šesťradový (Von Bothmer et al., 2003).

Jačmeň je tiež vhodným modelovým organizmom pre genetické štúdie a biotechnologické aplikácie. Disponuje diploidným genómom s nízkym počtom chromozómov ($2n = 2x = 14$), je nenáročný na pestovanie v rôznych environmentálnych podmienkach a má rozsiahle genetické zdroje. V biotechnologickom výskume možno jačmeň využiť napríklad na transformácie rôznych konštruktov vzhľadom na jeho dostatočne vysokú efektivitu transformácie (Harwood, 2018).

Odroda jarného jačmeňa „Golden Promise“ je jeden z najpoužívanejších jačmenných kultivarov na transformácie. Táto mutantná odroda bola oficiálne registrovaná v roku 1966 vo Veľkej Británii. Vznikla pôsobením gama-žiarenia na odrodu „Maythorpe“ v roku 1956, ktorá bola citlivá na soľný stres. Odroda Golden Promise je charakterizovaná krátkym tvrdým stebлом, dobrým výnosom a dobrou sladovníckou kvalitou. Rastliny odrody Golden Promise sú polotrpasličieho vzrastu, tolerantné voči

slanému stresu, ale náchylné na múčnatku (*Blumeria graminis*). V roku 1967 bola odroda Golden Promise pestovaná v Anglicku a Škótsku a výrazne prispela k zvýšeniu produkcie jačmeňa na trhu Veľkej Británie. Bola a v súčasnej dobe je odrodou, ktorá sa používa v hybridizačných programoch v mnohých genetických štúdiách (Ohnoutková, 2019a).

2.1.2 Genetické transformácie jačmeňa

Transformácia je jednou z najdôležitejších biotechnologických aplikácií v oblasti štúdia funkčnej genomiky jačmeňa. Úspešnosť transformácie jarného jačmeňa je stále závislá na genotype a na miere rekalcitrancie nových hospodársky významných kultivarov. K transformácii sa aj v súčasnej dobe najviac využíva odroda Golden Promise (Harwood, 2018).

Existujú dve najčastejšie metódy pre transformáciu jačmeňa: biolistická metóda (Wann a Lemaux, 1994) a transformácia pomocou baktérie *Agrobacterium tumefaciens* (Bartlett et al., 2008). V súčasnej dobe je transformácia pomocou *A. tumefaciens* považovaná za vysoko-efektívnu metódu, ktorá umožňuje získať transgénne jedince s nízkym počtom kópií transgénu (Travella et al., 2005).

Dôležitým faktorom pre dosiahnutie účinného výsledku transformácie je výber cieľového pletiva. Bolo testované široké spektrum pletív jačmeňa. Najpoužívanejšími explantátmi pre transformáciu jačmeňa sú nezrelé zygotické embryá. Zygotické embryá získané z donorovej rastliny jarného jačmeňa Golden Promise poskytujú embryonálny kalus s dobrou schopnosťou regenerácie (Hinchliffe a Harwood, 2018). Prvýkrát boli nezrelé zygotické embryá použité pri transformácii jačmeňa v roku 1986 (Goldstein a Kronstad, 1986) a postupne sa stali najpoužívanejším typom explantátov. Štítok embrya je pôvodcom tvorby regenerujúceho kalusu. Regenerácia rastlín z kalusu pochádzajúceho zo zygotických embryí je ovplyvnená genotypom, vekom embryí, zložením média, podmienkami kultivácie a ďalšími faktormi. (Lü et al., 2015).

Transformácie jačmeňa možno rozdeliť do troch vývojových časových etáp. Prvá etapa bola zameraná na transformáciu selekčných a reportérových génov. Druhá etapa bola rozšírená o funkčnú analýzu kandidátnych génov použitím baktérie *A. tumefaciens* ako hlavného nástroja pre transformáciu. V dnešnej dobe sa transgénny jačmeň nachádza v tretej vývojovej časovej etape nazývanej tiež nová éra, ktorá sa sústreďuje na sekvencie celého genómu a celkový transkriptóm jačmeňa. Najväčšími prioritami transformácie

jačmeňa sú z globálneho hľadiska funkčná genomika a produkcia jačmeňa so zlepšenými vlastnosťami, vhodného pre moderné poľnohospodárstvo (Lü et al., 2015).

Prvá vývojová časová etapa je zameraná na rozvoj a optimalizáciu transformačných protokolov, kde hlavnú roľu hrajú selekčné a reportérove gény. Najčastejšie používané sú selekčné gény, ktoré udeľujú rastline rezistenciu na antibiotikum ako chloramfenikol acetyltransferáza (CAT) (Lee et al., 1991), neomycin fosfotransferáza (NPTII) (Nobre et al., 2000; Gürel a Gözükmizi, 2000) a hygromycin fosfotransferáza (HPT) (Shrawat et al., 2007). Ďalšiu dôležitú roľu v transformácii jačmeňa hrajú gény udeľujúce rastline rezistenciu na herbicidy ako fosfinotricin acetyltransferáza (PAT) (Travella et al., 2005; Shrawat et al., 2007). Výborným pomocníkom pri transformácii sú viditeľné reportérove gény. Takýmito reportérovými génmi sú gén pre β -glukoronidázu (GUS) (Kumlehn et al., 2006; Shrawat et al., 2007), gén kódujúci enzým luciferázu (LUC) (Harwood et al., 2002) a gén pre zelený fluorescenčný proteín (GFP) (Murray et al., 2004). Prvá generácia transgénneho jačmeňa siaha od prvého pokusu v roku 1987 (Junker et al., 1987) do roku 2008, kedy bola uvedená do praxe transformácia pomocou *A. tumefaciens* (Bartlett et al., 2008; Hensel et al., 2008).

V druhej vývojovej časovej etape sa pozornosť prenáša na vylepšovanie produktov génov a ich funkcie. Veľká časť štúdií je zameraná na výskum biotického a abiotického stresu, kvalitu zrna a bioreaktory. V prípade jačmeňa sú vážnym problémom vírusové a hubové patogény, ktoré môžu spôsobiť rapídne zníženie výnosu. Príkladom je vírus žltej zakrpatenosti jačmeňa (BDYV), ktorý je kontrolovaný vďaka expresii génu pre obalový proteín vírusu BDYV v jačmeni, čo vedie k zvýšenej rezistencii na tento vírus (McGrath et al., 1997). Ďalším účinným nástrojom je využitie RNA technológie odvodená od BDYV vírusu, ktorá udeľuje jačmeňu extrémnu rezistenciu na daný vírus (Wang et al., 2000). Ďalšími patogénmi, ktoré ohrozujú jačmeň sú hubové patogény. Genetickými modifikáciami endogénnych génov jačmeňa bola dosiahnutá zvýšená rezistencia proti fuzarióze (*Fusarium graminearum*) (Hückelhoven et al., 2003), pruhovitosti listov (*Pyrenophora graminea*) (Bulgarelli et al., 2010), múčnatke trávovej (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*) (Eichmann et al., 2010) a hrdzi trávnej (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) (Horvath et al., 2003).

Jedným z hlavných cieľov jačmenných biotechnológií je modifikácia enzýmov, ktoré sú významné pre pivovarnícky priemysel. Transkripčný faktor GAMYB aktivuje expresiu génov regulovaných giberilínmi (GA) v aleurónových bunkách jačmeňa (Gubler

et al., 1995). Murray et al. (2006) zvýšením expície génu GAMYB v jačmeni zlepšil akumuláciu α -amylázy a (1,3;1,4)- β -D-glukan endohydrolázy čím zlepšil jeho sladovnícke vlastnosti. Ďalším dôležitým cieľom pre zlepšenie pivovarnického procesu bola modifikácia enzýmu β -glukanázy. Teplu odolná β -glukanáza zostáva aktívna aj počas procesu rmutovania pri pôsobení vysokej teploty (Nuutila et al., 1999). Veľká pozornosť je tiež venovaná enzýmom, ktoré ovplyvňujú kvalitu látok obsiahnutých v jačmennom zrne. V čeľadi Poaceae gény podobné celulóza syntáze, CslF gény, hrajú úlohu v biosyntéze bunkovej steny obsahujúcej (1,3;1,4)- β -D-glukány, ktoré sú vhodnou súčasťou ľudskej stravy. Genetickou manipuláciou s génmi CslF4 a CslF6 došlo k zmene obsahu (1,3;1,4)- β -D-glukánu v zrne a listoch transgénneho jačmeňa (Burton et al., 2011). Pomocou transformačných technológií je možné získavať jačmenné zrno s vysokým obsahom amylázy (Carciofi et al., 2012), lyzínu (Ohnoutkova et al., 2012) a tiež zinku a železa (Tiong et al., 2014).

Prvé dve etapy transformácií jačmeňa sa rozvíjali súčasne. Druhá etapa sa stále posúva vpred a nachádza nové technické vylepšenia a aplikácie. V dnešnej dobe vedecká komunita zaoberajúca sa kmeňom Triticeae čelí výzve analyzovať celý genóm jačmeňa z funkčného hľadiska, hlavne v prípade diploidných jedincov (Lü et al., 2015).

Technológie geneticky modifikovaných organizmov by mali hlavne prispievať k zlepšovaniu schopností plodín čeliť environmentálnym zmenám, zvyšovaniu výnosu a zlepšovaniu kvality produktu (Harwood, 2012).

2.2 Rastlinný stres

Rastliny sú ohrozované rôznymi faktormi, ktoré vyvolávajú stres. Podľa druhu faktorov rozdeľujeme stres na abiotický a biotický. Faktory spôsobujúce abiotický stres sú sucho, slaná pôda, vysoké a nízke teploty, UV žiarenie a podobne. Biotický stres spôsobujú rastlinné patogény ako napríklad vírusy, baktérie, huby, hád'atka, ale aj iné rastliny a vyššie živočíchy (Pandey et al., 2017).

Stres pôsobiaci na rastliny je jednou z najdôležitejších tém v rastlinnej biológii a predmetom veľkého množstva publikácií, diskusií v rámci konferencií a intenzívnych výmen názorov medzi vedcami a poľnohospodármi. Stres nie je presne definovaný (Jansen a Potters et al., 2017). Wang et al.(2003) vo svojej práci tvrdí, že abiotický stres je hlavnou príčinou celosvetovej straty výnosu plodín, ktorá činí viac než 50 % z celkového výnosu.

Problém je, že v prípade absencie všeobecne akceptovateľnej definície stresu sú takéto údaje považované za nepatrné až zbytočné (Jansen a Potters, 2017).

Mnohé publikácie predstavujú rôzne definície rastlinného stresu. Napríklad Smith et al.(2010) opisuje stresové prostredie ako prostredie, ktoré je menej než optimálne pre rastlinný vývoj. Buchanan et al.(2000) definuje stres ako externé podmienky, ktoré nepriaznivo ovplyvňujú rast, vývoj alebo produktivitu rastlín. Taiz a Zeiger (2002) za stres považuje vonkajšie biotické a abiotické faktory ako sú infekcia, teplo, voda a dostupnosť kyslíka. Títo autori sa v definíciách zhodujú na tom, že stres znižuje rastlinnú produkciu. Ďalším spoločným aspektom sú environmentálne faktory ako je príčina stresu. Toto tvrdenie nie je všeobecne akceptovateľné. Je potrebné priradiť konkrétny faktor ku konkrétnemu druhu organizmu. Optimálne prostredie pre jeden organizmus môže predstavovať stresové podmienky pre iný organizmus (Jansen a Potters, 2017). Latcher (1980) popisuje stres ako fyziologické zmeny objavujúce sa v prípade, že je určitý druh organizmu vystavený mimoriadne nevhodným podmienkam. Ďalšiu definíciu stresu predstavil Leclerc (2003), ktorý opisuje stres ako odchýlky od priemerných podmienok pre rastlinný organizmus. Environmentálny faktor zodpovedný za stres nadobúda v neskorších konceptoch rôzne názvy ako „vonkajší nátlak“, „stresový faktor“ alebo „stresor“. Analogicky je pomenovaný stav, kedy je organizmus vystavovaný stresu ako „stresové štádium“, „odpoveď na stres“, či jednoducho „stres“. Toto štádium sa môže vzťahovať k molekulárnym, bunkovým, pletivovým aspektom alebo k aspektom celých organizmov rastlinnej fyziológie.

2.2.1 Abiotický stres

Abiotický stres je termín, ktorý označuje nevhodné environmentálne podmienky nepriaznivo pôsobiace na rast a vývoj rastlín. Príkladmi abiotického stresu, ktorým rastliny čelia sú pokles dostupnosti vody (kvôli suchu alebo osmotickému stresu), slaná pôda (soľný stres), alebo extrémne teploty. Tieto druhy abiotického stresu patria medzi environmentálne podmienky najviac ohrozujúce výnos plodín. Aby sa rastliny boli schopné vyrovnáť so škodlivými efektami stresu vyvinuli si rôzne adaptačné stratégie na bunkovej a metabolickej úrovni, ktoré aktivujú už na začiatku pôsobenia stresu (Marco et al., 2015).

Jeden z prvých procesov, ktoré prebiehajú v rastline pri pôsobení stresových faktorov je snímanie. Snímanie abiotického stresu je komplexná záležitosť, kedy neexistuje samostatný snímací mechanizmus spoločný pre všetky druhy stresu. V prípade ak stresová situácia zahŕňa chemického činiteľa (napríklad stres spôsobený ťažkými kovmi alebo poklesom živín) je predpokladané, že dochádza k spúšťaniu mechanizmu, ktorý pracuje podľa modelu ligand-receptor. Tento model, však, nemôže byť aplikovaný v prípade, ak je stres vytváraný zmenami fyzikálnych parametrov. Mechanizmus snímania aktivuje vo vnútri buniek komplikovaný sled signálnych kaskád, ktoré signál prenášajú, amplifikujú a nakoniec spúšťajú bunkové odpovede vedúce k obranným reakciám proti škodlivým efektom. V posledných rokoch pribudlo veľa informácií o stresových signálnych mechanizmoch. Signálne dráhy pozostávajú z mnohých aktívnych komponentov vrátane sekundárnych poslov, fytohormónov a fosfoproteínových kaskád (Marco et al., 2015).

Sekundárni poslovia sú malé vnútroubunkové signálne molekuly alebo ióny, prirodzene sa vyskytujúce v cytoplazme buniek, ktorých level sa mení pri reakcii na signál prijatý membránovými senzormi bunky. Šíria sa difúziou a regulujú aktivitu proteínov, čím pomáhajú distribuovať a množiť prijatý signál. Sekundárni poslovia sú súčasťou stresových signálnych dráh vrátane signálnej dráhy vápnika (Ca^+) (Tuteja a Mahajan, 2007), reaktívnych foriem kyslíka (ROS) (Suzuki et al., 2011), cyklických nukleotidov, polyfosfoinozítidov a ďalších (Tuteja a Sopory, 2008).

Fytohormóny, aktivujú signálne dráhy, ktoré pôsobia samostatne alebo v spolupráci s inými signálnymi dráhami. Jedným z najviac preštudovaných fytohormónov je kyselina abscisová (ABA), ktorá zohráva hlavnú úlohu v odpovedi na stres. Ostatné rastlinné hormóny alebo signálne molekuly ako cytokiníny, salicylová kyselina, etylén, jasmónová

kyselina, oxid dusnatý, cukry a polyamíny sú tiež súčasťou rastlinných odpovedí na stres (Tuteja a Sopory, 2008).

Signálne dráhy sú koordinované pomocou proteín kináz a fosfatáz, ktoré kontrolujú fosforylačný status ich cieľových proteínov tým, že ich fosforylujú. Aj odpovede na stres zahŕňajú fosfoproteínové kaskády, ktoré sú rozdelené do niekoľkých kategórií podľa ich štruktúrnych a funkčných charakteristík. Najznámejšie rodiny signálnych kaskád zahrnutých v odpovediach na stres sú mitogén aktivované proteín kinázy (MAPK), cyklín-dependentné proteín kinázy (CDK), Ca⁺-dependentné proteín kinázy (CPK) a kalcineurin „B-like“ interagujúce proteín kinázy (CIPK) (Boudsocq a Lauriere, 2005; Boudsocq a Sheen, 2013).

Všetky vyššie spomínané elementy interagujú aj medzi sebou navzájom, čím vytvárajú komplexnú sieť, ktorej výsledkom je modifikácia cieľových proteínov, vedúca k rýchlym fyziologickým odpovediam bunky. Alternatívne môžu signálne dráhy viesť k produkcii proteínov ovplyvňovaním aktivity transkripčných faktorov, ktoré sa viažu na špecifické sekvencie DNA v promótorovej oblasti a menia expresiu génov. Medzi transkripčné faktory aktívne počas stresových situácií patria členovia APETALA2/ etylén – reagujúce faktory (AP2/ERF), hélix-slučka-hélix (HLH), leucínové zipsy (LZ), faktory odvodené od myelomatózy (MYC) a ďalšie (Lindemose et al., 2013). Okrem transkripčných faktorov môže byť expresia génov ovplyvnená inými mechanizmami počas odpovedi na stresové podmienky, ako epigenetickými procesmi, ktoré zahŕňajú metyláciu DNA alebo modifikáciu jadrových histónov (Kim et al., 2010).

2.2.1.1 Stres rastlín vyvolaný suchom

Abnormálne suché obdobie, ktoré sa objavuje v oblastiach s nízkou frekvenciou zrážok sa nazýva sucho. Podľa Dai (2011) sa sucho rozdeľuje do troch kategórií:

1. Hospodárske sucho
2. Meteorologické sucho
3. Hydrologické sucho

Sucho predstavuje obdobie s podpriemernými zrážkami či nadpriemerným vyparovaním vody, ktorého výsledkom je pokles rastlinnej produkcie. Meteorologické sucho je perióda s menej ako priemernými zrážkami a je zvyčajne spojená s nadpriemernými teplotami. Takéto sucho je spôsobené konštantnými zmenami atmosférických štruktúr ako napríklad vysokým tlakom. V prípade, že dôjde k dlhodobému poklesu prívodu vody alebo hladín

riek a iných zásobární vody, ako jazier a rezervoárov, hovoríme o hydrologickom suchu. K vzniku sucha prispievajú aj ostatné faktory vrátane vysokých teplôt, nedostatku vlhky a erózie pôdy.

Na všetkých svetových kontinentoch už viac ako 10 rokov dochádza k poklesu rastlinnej produkcie v dôsledku sucha (Zhao a Running, 2010). Bouman et al., (2005) publikoval, že sucho spôsobilo pokles svetovej produkcie ryže až o 50 %. Sucho ovplyvňuje aj produkciu kukurice, pričom straty sa ročne môžu vyšplhať až na 10 miliónov ton zrn (Edmeades, 2008). Okrem sociálne-ekonomických dôsledkov, nedostatok vody ovplyvňuje skoro každý fyziologický proces v rastline, či už priamo, alebo nepriamo. Rast bunky závisí od úrovne bunkového turgoru, fotosyntéza je priamo inhibovaná nedostatkom vody a prieduchmi kontrolovaný príjem a výdaj CO₂ je závislí na obsahu vody v bunkách prieduchov (Gimenez et al., 2005).

Kľúčovým faktorom pre zlepšovanie tolerancie rastlín voči suchu je pochopiť mechanizmus rezistencie voči suchu. Mechanizmus rezistenciu voči suchu môže byť podľa Taiz a Zeiger (2002) rozdelený do troch kategórií:

1. Odklad vysychania (schopnosť zadržiavať vodu v pletive alebo tolerancia na suchu pri vysokom vodnom potenciály),
2. tolerovanie vysychania (schopnosť rastliny fungovať v dehydrovanom stave alebo tolerancia na suchu pri nízkom vodnom potenciály),
3. únik pred suchom, kedy sa rastliny vyhýbajú suchu dokončením životného cyklu ešte pred obdobím sucha, aby boli schopné sa reprodukovať.

Tieto mechanizmy rezistencie voči suchu sa odlišujú vzhľadom na typ pôdy a klimatické podmienky. Napríklad rastliny adaptované na púštne podnebie ako *Craterostigma plantagineum* (Bartels et al., 1990) alebo *Tortula ruralis* (Oliver a Bewley, 1997) tolerujú extrémne suché podmienky ako 0% vlhkosť, vďaka schopnosti obmedziť svoje metabolické funkcie. Takéto podmienky sú však veľmi nepriaznivé pre hospodárske plodiny, ktoré nedokážu tolerovať menej ako 85% vlhkosť počas vegetatívneho obdobia (Bartels a Salamini, 2001).

2.2.1.2 Zvýšená rezistencia rastlín na soľný stres

Soľný stres vzniká pri nadmernej koncentrácii solí, hlavne chloridu sodného (NaCl), v pôde (Hossain a Dietz, 2016). V prípade rastlín vznikajú dva typy situácií:

1. Osmotický stres

2. Iónová nerovnováha (Hossain a Dietz, 2016)

Osmotický stres navodzuje podmienky podobné nedostatku vody a spúšťa reakcie podobné odpovediam na suchý stres ako uzatváranie prieduchov, pokles fixácie CO₂, redukciiu elektrónového transportného reťazca (ETC) a stimuláciu fotorespirácie, ktoré môžu viesť k produkcii radikálnych foriem kyslíka (ROS) (Abogadallah, 2010). Napríklad v listoch kukurice, soľný stres zvyšuje hladiny apoplastického spermidínu a spermínu. Procesom oxidácie týchto polyamínov apoplastickou polyamínoxidázou dochádza k produkcii 1,3-diaminopropánu a H₂O₂ (Rodriguez et al., 2009). Tieto ROS môžu poškodzovať fotosyntetický aparát, nukleové kyseliny a membrány buniek.

Dlhodobé pôsobenie soľného stresu vedie k iónovej toxicite v rastlinnom organizme. Odpoveď rastlín na silný soľný stres je druhovo špecifická. Niektoré rastliny kontrolujú príjem sodných iónov (Na⁺) uprednostňovaním draselných iónov (K⁺), iné prevenciou akumulácie Na⁺ v cytoplazme ukladaním týchto iónov do vakuoly, a tak chránia fotosyntetické a metabolické procesy (Munns et al., 2006; Chaves et al., 2009).

Ďalšou dôležitou obrannou reakciou rastlín proti soľnému stresu je akumulácia aminokyselín v cytoplazme, najčastejšie prolínu. Prolín funguje ako osmolyt, zachytávač ROS, redoxný pufor a molekulárny čaperón, ktorý napomáha stabilizovať proteíny a membrány, čím predchádza poškodeniu buniek spôsobenému stresom (Hossain a Dietz, 2016). Táto aminokyselina navyše predstavuje zdroj dusíka počas fáze obnovy fyziologických procesov po strese (Gupta a Huang 2014). Prolín vzniká počas syntézy glutamátu, pričom jeden mol prolínu vyžaduje dve molekuly nikotínamidadenín-dinukleotidfosfátu (NADPH), a teda odčerpáva elektróny z chloroplastov a udržiava tak redoxnú homeostázu v bunke. Produkcia prolínu v listoch po pôsobení soľného stresu poskytuje rastline zdroj uhlíka a redukuje fotoinhibíciu a tvorbu ROS (Hossain a Dietz, 2016).

2.2.2 Biotický stres

Rastliny sa počas svojho života musia chrániť pred útokmi biotických činiteľov, medzi ktorých patria baktérie, vírusy, viroidy, huby, hmyz a aj ostatné rastliny. Biotický stres je proces pôsobenia biotických činiteľov na hostiteľskú rastlinu, pričom hostiteľská rastlina predstavuje pre daný organizmus zdroj živín a prostredie na rozmnožovanie. Takýto proces je označovaný aj ako parazitizmus a činitele, ktoré ho spôsobujú sú označované ako rastlinné parazity. V prípade ak je organizmus schopný v hostiteľskej

rastline svojou činnosťou vyvolať chorobu ide o patogenézu. Úspešná patogenéza zahŕňa vniknutie patogénneho organizmu do hostiteľskej rastliny, čerpanie živín z hostiteľa, potlačenie obrannej reakcie hostiteľa a reprodukciu patogénu (Strange, 2003).

Patogény si vyvinuli špecifické spôsoby ako vniknúť do hostiteľa. Niektoré vnikajú cez epidermálne vrstvy použitím mechanického tlaku alebo enzýmov, iné pomocou prirodzene prítomných otvorov, ako sú prieduchy, alebo cez poranené pletivo. Po vniknutí patogénu do hostiteľskej rastliny začína proces infekcie (Dickinson, 2003).

Patogén môže na rastline parazitovať ako nekrotrof, kedy zabíja rastlinné bunky a následne čerpá živiny z odumretého pletiva. Ďalším spôsobom parazitizmu je biotrofia, kedy organizmus čerpá živiny zo živých rastlinných buniek, alebo hemibiotrofia, kedy patogén čerpá živiny zo živých buniek, ale v neskoršom štádiu infekcie bunky usmrcuje. Medzi štyri hlavné skupiny rastlinných patogénov patria huby, vírusy, nematódy a baktérie. Huby sú označované ako patogény najčastejšie napádajúce rastliny (Agrios, 2005).

2.2.2.1 Hubové patogény

Huby sa radia medzi heterotrofné organizmy a ich zdrojom dusíka sú rastliny alebo organické zlúčeniny. Niektoré huby ako hrdze a múčnatky sú obligátne parazity alebo biotrofy, ktoré môžu rásť a rozmnožovať sa iba v žijúcom pletive rastlín. Mnohé huby sú tiež fakultatívne parazity, žijúce ako saprofyty, do momentu, kedy nájdu vhodnú hostiteľskú rastlinu a prechádzajú do parazitického spôsobu života (Agrios, 2005).

Po prieniku hubového patogénu do rastliny patogén produkuje degradačné enzýmy a toxíny, ktoré narúšajú bunkovú stenu a ostatné bunkové komponenty, čím sú malé molekuly sprístupnené pre absorpciu hubovým patogénom (Dickinson, 2003).

Huby tvoria vláknité hýfy a mycélium a reprodujú sa pomocou spór. Prenikajú do rastlinného hostiteľa prirodzenými otvormi ako sú prieduchy. Väčšina hubových patogénov napádajúcich jačmeň napáda listy, avšak niektoré sa zameriavajú na podzemnú časť rastliny ako korene, zasadené semená a spodnú časť stonky (Strange, 2003).

Dean et al. (2012) vypracoval rebríček 10 najvýznamnejších hubových rastlinných patogénov. Medzi najvýznamnejšie hubové patogény sa radia: 1. *Magnaporthe oryzae*, 2. *Botrytis cinerea*, 3. *Puccinia* spp., 4. *Fusarium graminearum*, 5. *Fusarium oxysporum*,

6. *Blumeria graminis*, 7. *Mycosphaerella graminicola*, 8. *Colletotrichum* spp., 9. *Ustilago maydis*, 10. *Melampsora lini*.

Blumeria graminis f. sp. *hordei* je členom rodiny Erysiphaceae, patrí medzi skupinu húb askomycety a spôsobuje ochorenie nazývané múčnatka na rastline jačmeňa. Všetky patogény spôsobujúce múčnatku sú obligátne biotrofy a sú striktne závislé od živého rastlinného hostiteľa (Braun et al., 2002).

Všeobecne sa *B. graminis* rozdeľuje na poddruhy, *formae speciales*, ktoré sú schopné napádať jednotlivé druhy tráv. *B. graminis* f. sp. *hordei* a *B. graminis* f. sp. *tritici* napádajú jačmeň a pšenicu a preto sú hospodársky významné. Najštudovanejším druhom tejto skupiny je práve *B. graminis* f. sp. *hordei* a slúži ako modelový organizmus pre štúdium ochorenia múčnatka. Symptómy tohto ochorenia sa prejavujú ako biely múčny povlak na povrchu listov rastliny (Both a Spanu, 2004).

Jačmeň obsahuje gény mlo, vďaka ktorým je rezistentný voči múčnatke. Ak sa alely génu nachádzajú v recesívnej forme, rastlina efektívne predchádza penetrácii hubového patogénu cez epidermálne bunky a tým bráni tvorbe haustória a infekcie. V prípade, že má jačmeň dominantné alely mlo génu je náchylný a dochádza k rozvoju infekcie (Lyngkjaer et al., 2000).

Mlo gén, pochádzajúci z divého typu kóduje proteín, ktorý pozostáva zo siedmich transmembránových domén a interaguje s proteínom kalmodulín, čím negatívne ovplyvňuje obranyschopnosť rastliny a činí rastlinu náchylnú voči hubám spôsobujúcim múčnatku (Kim et al., 2002; Consonni et al., 2006). Mutácia génu mlo spôsobila stratu funkcie MLO proteínu a širokospektrálnu rezistenciu k múčnatke. Táto mutácia poskytuje rezistenciu jačmeňa voči *B. graminis* f. sp. *hordei* už približne 40 rokov (Piffanelli et al., 2002).

V poľnohospodárstve sú najviac využívané alely mlo-11 pôvodom z domestikovaného etiópskeho jačmeňa, ktoré sa využívajú v polovici európskych kultivaroch jarného jačmeňa. Výsledkom mutácie mlo-11 génu je nadmerná transkripcia, čím dochádza k redukcii hladiny proteínu MLO (Piffanelli et al., 2004).

B. graminis f. sp. *hordei* sa rozmnožuje pohlavne a nepohlavne. Výsledkom pohlavného cyklu je tvorba kleistotécií, ktoré sú schopné prežívať v nepriaznivých podmienkach prostredia, alebo tvorba askospór v prípade, že sú podmienky prostredia priaznivé. Tieto pohlavné štruktúry umožňujú genetické rekombinácie a zrýchľujú tak evolučný vývin húb. Z toho vyplýva schopnosť *B. graminis* f. sp. *hordei* rýchlo sa

prispôbiť selekčnému tlaku spôsobenému hostiteľskými monokultúrami jačmeňa, obsahujúcimi špecifické gény rezistencie proti múčnatke a potreba používať rozsiahle spektrum fungicídov (Kinane a Oliver, 2003).

Počas nepohlavného cyklu organizmus veľmi rýchlo a úspešne vniká do hostiteľa a následne produkuje konídiá, v ktorých sa tvoria spóry. Spóry sú následne uvoľnené do prostredia, čoho výsledkom je veľmi efektívne šírenie ochorenia v krátkom časovom intervale (Wright et al., 2002).

Nepohlavný životný cyklus začína v momente pristátia konídií na povrchu listu rastlinného hostiteľa. V priebehu nasledujúcich sekúnd sa konídiá pripevnia k listu uvoľnením extracelulárnej matrix. (Wright et al., 2002). Po dvoch hodinách sa z konídií na povrchu listov vytvárajú klíčiace vlákna, ktorých dĺžka zvyčajne nepresahuje niekoľko mikrometrov. Primárne klíčiace vlákno zodpovedá za príjem vody a signálov z hostiteľa v mieste spojenia hubového organizmu a kutikuly listu. Následne z opačného konca konídie vyrastá tzv. apresoriálne klíčiace vlákno, ktoré sa predlžuje a štyri hodiny po inokulácii sa z neho začína vytvárať apresórium, ktoré finálne dozrieva 8 až 12 hodín od prvotného kontaktu (Edwards, 2002).

Na spodnej strane apresória vyrastá penetračný hrot, ktorý preniká cez kutikulu a bunkovú stenu pomocou kombinácie fyzického tlaku a enzymatického rozkladu kutínu a celulózy (Pryce-Jones a Gurr, 1999). Z penetračného vlákna sa vo vnútri hostiteľskej bunky tvorí haustórium, ktoré však nenarúša plazmatickú membránu. Haustórium je vysoko špecializovaný komplexný útvar, zodpovedný za absorpciu veľkého podielu živín. Extrahaustoriálna membrána, ktorá obklopuje haustórium, je kontinuálne spojená s plazmatickou membránou epidermálnych buniek hostiteľa. Následne z haustória vyrastá sekundárne vlákno na povrch listu, kde vytvára vonkajšie mycélium, z ktorého vyrastajú ďalšie penetračné vlákna na tvorbu nových haustórií (Both a Spanu, 2004).

Štyri dni po inokulácii sa vonkajšie mycélium diferencuje na konidiofóry, v ktorých sa vytvára veľké množstvo konídií. Tie sú následne rozptýlené vetrom do okolitého prostredia. Nie je presne známe čo všetko konídie obsahujú, avšak Roberts et al. (1996) cytochemickými technikami zistil, že v prípade *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* cytoplazma konídií obsahuje hlavne glykoproteíny.

2.3 S patogenézou súvisiace (PR) proteíny

Proteíny, ktoré sú produkované hosťiteľskou rastlinou počas patogenézy alebo v súvisiacich podmienkach, sa nazývajú s patogenézou súvisiace proteíny, inak „pathogenesis-related“ (PR) proteíny. PR proteíny sa delia do niekoľkých skupín, tzv. rodín, na základe vzájomnej sekvenčnej homológie. Tieto proteíny tiež môžu byť rozdelené do rôznych tried podľa migrácie v natívnej polyakrylamidovej elektroforéze, reakcie so špecifickým antisérom a mRNA próbami. Ďalej sú PR proteíny klasifikované na základe biologickej aktivity. Všeobecne bolo identifikovaných 17 rozličných rodín PR proteínov (Sudisha et al., 2012).

Indukcia PR proteínov v hosťiteľskej rastline je spúšťaná baktériami, hubami, vírusmi a hlísticami v okamžiku ich vstupu do hosťiteľa. Rôzne molekuly, ktorými patogény disponujú môžu slúžiť ako elicitory expresie PR génov. V širokom spektre rastlín bolo objavených množstvo PR génov, ktoré kódujú PR proteíny. V zdravých rastlinách, ktoré nie sú vystavené podmienkam patogenézy sa PR gény vyskytujú v umlčanej forme. Expresia PR génov spustená patogénom sa vždy objaví na úrovni transkripcie. Skutočnosť, že existuje veľa PR proteínových rodín a proteíny sú lokalizované ako v apoplaste, tak vo vakuolách, predstavuje dôležitú úlohu PR proteínov v obranných reakciách rastlín, nie len v prípade patogenézy (Garcion et al., 2007).

Produkcia PR proteínov môže byť spustená izolovanými elicitormi ako sú glykoproteíny, proteíny, peptidy, cukry, celulázy, xylanázy a mastné kyseliny. Medzi látky schopné indukovať syntézu PR proteínov sa zaraďujú aj abiotické komponenty ako ťažké kovy a toxické chemikálie (Naranjo et al., 2003; Oostendorp et al., 2001).

2.3.1 PR-5 proteíny

PR-5 proteíny sa inak nazývajú aj ako proteíny podobné taumatínu, pretože ich aminokyselinová sekvencia vykazuje vysoký stupeň homológie so sekvenciou aminokyselín daného proteínu. Taumatín je proteín, ktorý sa prirodzene vyskytuje v africkej rastline *Thaumatococcus daniellii*. Molekulová hmotnosť PR-5 proteínov bez hydrofóbneho N-koncového úseku, ktorý pravdepodobne slúži ako signálny peptid, je približne 24 kDa. V rastline tabaku sa nachádzajú dva proteíny z tejto skupiny (Dzhavakhiya et al., 2007).

2.3.1.1 Osmotin

Singh et al. (1985) prvýkrát izoloval proteín osmotin a jeho gén z rastliny tabaku (*Nicotiana tabacum* var. Wiskonsin 38), ktorá bola kultivovaná niekoľko generácií na kultivačnom médiu s vysokou koncentráciou NaCl. Osmotin je bázičný proteín s molekulovou hmotnosťou 24 kDa, ktorý sa akumuluje v bunkách tabaku, čím sú bunky schopné sa adaptovať na osmotický stres. Ide o kompatibilný osmolyt, ktorý znižuje osmotický potenciál buniek (Abdin et al., 2011).

Min et al. (2004) opísal štruktúru proteínu osmotin. Tento proteín je tvorený tromi doménami. Prvá doména pozostáva z 11-vláknového plochého β -sendviču, ktorý tvorí jadro molekuly. Druhá doména obsahuje niekoľko slučiek vybiehajúcich z prvej domény, ktoré sú stabilizované štyrmi disulfidovými väzbami. Tretia doména pozostáva z malej slučky s dvoma disulfidovými väzbami. Osmotin má výraznú štrbinu tvorenú prvou a druhou doménou.

Barthakur et al. (2001) experimentálne dokázal, že nadexpresia proteínu osmotin spúšťa akumuláciu aminokyseliny prolín a transgéennej rastline tabaku udeľuje toleranciu k osmotickému stresu. Nadexpresia génu osmotin v rajčiaku (*Solanum lycopersicum*) udelila rastlinám toleranciu na soľný a suchý stres (Goel et al., 2010). Analýza transgénnych línií rajčiaku ukázala, že transgéenne rastliny v porovnaní s kontrolnými rastlinami disponujú vyšším relatívnym obsahom vody, chlorofylu a prolínu. Osmotin tiež chráni prirodzenú štruktúru proteínov počas pôsobenia stresu a pomáha obnovovať denaturované proteíny. Nie len vďaka tejto funkcii jeho nadexpresia v zemiaku (*Solanum tuberosum*) udelila rastlinám toleranciu na slaný stres (Evers et al., 1999).

Osmotin je tiež radený medzi antifungálne cytotoxíny, ktoré usmrcujú alebo zabraňujú množeniu hubových patogénov. Kupchak et al. (2008) opísal proteín Izh2p, ktorý sa vyskytuje v kvasinke (*Saccharomyces cerevisiae*) a funguje ako receptor pre proteín osmotin. Reakciou osmotinu s týmto receptorom dôjde k spusteniu signálnej dráhy v kvasinke a následnému usmrteniu organizmu.

3. EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

3.1 Materiál

3.1.1 Rastlinný materiál

Ako rastlinný materiál na experimentálne úkony bol použitý jarný jačmeň (*Hordeum vulgare*, L.), odroda Golden Promise a jarný jačmeň (*Hordeum vulgare*, L.), odroda Golden Promise, obsahujúci gén osmotin, pripravený v rámci bakalárskej práce (Klcova, 2017).

3.1.2 Použité chemikálie a roztoky

- 2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (2,4-D) (Sigma, kat. č. D7299)
- Agaróza (SERVA, kat. č. 11404)
- Biotín (Sigma, kat. č. B4639)
- Bórová kyselina (H_3BO_3) (Sigma-Aldrich, kat. č. 10043-35-3)
- Destilovaná voda
- Dicamba (Sigma, kat. č. D5417)
- Dihydrát chloridu vápenatého ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7783-20-2)
- Dusičnan amónny (NH_4NO_3) (Lachema)
- Etanol (Selico)
- Etídium bromid (Invitrogen, kat. č. 15585-011)
- Etyléndiamín tetraoctová kyselina (Fe EDTA) (Serva, kat. č. 11280.01)
- Glukóza (Sigma, kat. č. 158968)
- Glycin (SAFC, kat. č. 6000-43-7)
- Go Taq DNA polymeráza (Promega, kat. č. 608-274-4330)
- Dihydrogenfosforečnan draselný (KH_2PO_4) (Sigma)
- Dusičnan draselný (KNO_3) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7757-79-1)
- Heptahydrát síranu horečnatého ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7783-20-2)
- Heptahydrát síranu zinočnatého ($ZnSO_4 \cdot 7H_2O$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7446-20-0)
- Hydrát síranu manganatého ($MnSO_4 \cdot xH_2O$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 10034-96-5)
- Hydroxid sodný (Lachema)
- HyperLadder II (BIOLINE, kat. č. BIO-33039)

- Chlórnan sodný (NaClO) 10 % (Fluka)
- Chlorid draselný (KCl) (Sigma, kat. č. P5405)
- Izopropanol (Lach-Ner)
- Jodid draselný (KI) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7681-11-0)
- Kazeín hydrolyzát (Duchefa)
- Kinetín (Sigma, kat. č. NIST200B)
- Kyselina octová (Pluta)
- L-glutamová kyselina (Sigma, kat. č. G5667)
- Maltóza (Duchefa)
- Mannitol (Sigma, kat. č. M1902)
- Murashige and Skoog plant salt base (Duscheffa, kat. č. M0221.0025)
- Murashige and Skoog plant salt base + vitamins (Duscheffa, kat. č. M0222.0050)
- Myo-inositol (Sigma, kat. č. I7508)
- Naftalénoctová kyselina (NAA) (Sigma-Aldrich, kat. č. 86-87-3)
- Niacin (Sigma-Aldrich, kat. č. 59-67-6)
- Oligo(dT) (Invitrogen, kat. č. 18418012)
- PCR H₂O (Sigma, kat. č. W4502)
- Phytigel (Sigma, kat. č. P8169)
- Primery (Generi Biotech)
- Prolín (Sigma, kat. č. P8865)
- Pyridoxin HCL (Supelco, kat. č. 58-56-0)
- REDTaq Ready Mix (Sigma-Aldrich, kat. č. R2648)
- Síran amónny ((NH₄)₂SO₄) (Sigma-Aldrich, kat. č. 7783-20-2)
- Síran meďnatý (CuSO₄ · 5H₂O) 5mM (Sigma)
- Sterilná voda DNA/RNA free (Sigma, kat. č. W4502)
- substrát (Substrat 2, Klassmann Deilmann, Geeste, Nemecko)
- SuperScript™ IV VILO™ Master Mix with ezDNase™ Enzyme (Thermo Fisher, kat. č. 11766500)
- SYBR Green (SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix, Biorad, kat. č. #1725271)
- Tetrahydrát dusičnanu vápenatého (Ca(NO₃)₂ · 4H₂O) (Sigma-Aldrich, kat. č. 13477-34-4)

- Tiamin HCl (Sigma, kat. č. T1270)
- Voda (DNA/RNA free, Thermo Fisher, kat. č. AM9916)

3.1.3 Použité antibiotiká

- Hygromycín, (zásobný roztok 50 mg/ml) (Roche, kat. č. 10843555001)

3.1.4 Použité přístroje

- Autokláv (PS20A, BMT)
- Binokulárna lupa (PZO, Warszawa)
- Centrifúga (BR4, Jouan)
- Digitálne váhy (A200S, Sartorius)
- Fenotypizačná komora Plant Screen™ XYZ
- Horizontálna trepačka (Vortex, Heidolph)
- Kultivačná komora (Adaptis 1000)
- Laminárny box (Thermo Scientific)
- LED svietidlo (cool-white, Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika)
- LED svietidlo (farred, Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika)
- Magnetická miešačka (Variomag)
- meracie nádoby Plant Screen™ (Photon Systems Instruments, Brno, Česká republika)
- Minicentrifúga (centrifuge 5418, Eppendorf)
- osmometer 3320 Single-Sample Micro (GM MERC Biotech)
- pH meter (pH526, WTV)
- plošina (Olo Phen)
- Termocykler (PTC-200, MS Research)
- Termocycler MyGo-Mini S (Labmark, kat. č. 6321)
- Termocycler CFX 96 C1000 Touch (Biorad)
- Termostat (BT120, Laboratorní přístroje Praha)
- Vodný kúpeľ (SUB6, Grant)
- UV transiluminátor (G:BOX, SYNGENE)
- Zdroj napätia na elektroforézu (BioRad)

3.2 Metódy

V rámci experimentu diplomovej práce boli metódou *in vitro* izolované nezrelé zygotické embryá z 9 donorových rastlín jarného jačmeňa odrody Golden Promise obsahujúcich transgén *osm* (osm) pre urýchlenie vegetačného štádia. Zo selektovaných regenerovaných rastlín T₁ generácie bola izolovaná genómová DNA podľa protokolu (Edwards et al. 1991) a metódou polymarázovej reťazovej reakcie (PCR) bol detegovaný gén *osm*. Zo 4 regenerovaných transgénnych rastlín T₁ generácie boli izolované peľnice podľa protokolu (Ohnoutkova et al., 2019b) a pomocou androgenézy boli získané dihaploidné a haploidné rastliny. V transgénnych rastlinách regenerovaných z peľníc bola stanovená ploidia pomocou metódy prietokovej cytometrie. Pomocou metódy PCR bola overená prítomnosť transgénu *osm* v rastlinách DH línie, regenerovaných z peľníc.

Transgénné haploidné a dihaploidné rastliny T₁DH₀ generácie, transgénná rastlina T₀ generácie a kontrolná netransgénná rastlina bez obsahu génu *osm*, bola použitá na analýzu relatívnej expície génu *osm* pomocou metódy „real-time“ kvantitatívnej PCR (qRT-PCR).

Z rastlín DH línie boli metódou *in vitro* izolované nezrelé zygotické embryá pre rýchle získanie potomstva. Boli získané homozygotné rastliny línie 3C1 10. Pomocou metódy PCR bola overená prítomnosť transgénu *osm* v rastlinách línie 3C1 10. Homozygotné rastliny línie 3C1 10 boli presadené do zeminy a dopestované v skleníku.

Semená rastlín homozygotnej dihaploidnej transgéennej línie 3C1 10 boli použité na testovanie vplyvu abiotického stresu na klíčenie a životaschopnosť rastlín a na rezistenciu voči patogénu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

3.2.1. Izolácia nezrelých embryí

1. Semená T₁ generácie boli sterilizované 70% etanolom 3 minúty.
2. Následne boli semená premývané sterilnou vodou 5 minút.
3. Semená boli sterilizované 7% chlórnanom sodným 7 minút a trikrát premývané sterilnou vodou, 5 minút. Počas sterilizácie boli semená umiestnené v Erlenmayerovej banke na trepačke, v laminárnom boxe.
4. Z vysterilizovaných semien za aseptických podmienok boli pomocou sterilnej pinzety, skalpelu a stereomikroskopu izolované nezrelé embryá.
5. Embryá boli uložené po tridsiatich na ½ MS médium (Tab. 1) v Petriho miskách.

6. Petriho misky s embryami boli kultivované v kultivačnej komore pri teplote 22°C a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma.

Tab. 1: Zloženie ½ MS média

Chemikálie	Množstvo na 1 l
Murashige and Skoog plant salt base + vitamins	2,2 g
Sacharóza	20 g
Phytigel	3 g

3.2.2. Detekcia génu osm

Pre detekciu génu osm v rastlinách metódou PCR boli použité tri páry primerov produkujúce amplikony danej veľkosti (Tab. 2). V reakčnej zmesi bol použitý komerčne dostupný REDTaq Ready Mix. Objem reakcie bol 10 μ l (Tab. 3).

Tab. 2: Prehľad použitých primerov pre gén osmotin.

Názov primeru	Sekvencia	Veľkosť amplikonu [bp]
OSM opt F 1	5'-CTC CTC GAC GGC TTC AAC AT-3'	341
OSM opt R 1	5'-TCG AGT GGG AAG TTT GGG TG-3'	
OSM opt F 2	5'-GCC CTG CCT TCA TAC GCT AT-3'	222
OSM opt R 2	5'-TAC GGG CAG TTG TTC CTC AC-3'	
OSM opt RT F 3*	5'-TCA GGT CCA GCT TCG TGT TC-3'	85
OSM opt RT R 3*	5'-TAC GGG CAG TTG TTC CTC AC-3'	

*Primárne navrhnuté pre RT-PCR.

Tab. 3: Priebeh PCR reakcie pre gén osmotin

Názov procesu	Teplota	Počet cyklov	Čas
Aktivačná denaturácia	95°C	1	4 minúty
Denaturácia	95°C		30 sekúnd
Nasadenie primerov	55°C	37	30 sekúnd
Extenzia	72°C		40 sekúnd
Záverečná extenzia	72°C	1	2 minúty

3.2.3 Stanovenie ploidie rastlín regenerovaných z peľníc

Transgénnne rastliny regenerované z peľníc boli analyzované metódou prietokovej cytometrie pre určenie ploidie. Ako štandard bola použitá vzorka listu jarného jačmeňa odrody Golden Promise s diploidným genómom. Bola meraná intenzita fluorescencie farbiva DAPI a počet izolovaných jadier z listov analyzovaných rastlín. Relatívny objem DNA v jadrách všetkých analyzovaných vzoriek bol porovnávaný s objemom DNA v jadrách štandardu. Na analýzu ploidie bol použitý prístroj Partec PAS.

3.2.3.1 Stanovenie ploidie

1. Z rastlín boli odobrané 3 cm dlhé listy, ktoré boli v Petriho miske s obsahom 1 ml Otto I pufru pomocou žiletky nasekané na malé kúsky, aby došlo k uvoľneniu jadier (Tab. 4).
2. Obsah v Petriho miske bol pomocou pipety prefiltrovaný cez 50 μ m filter do mikroskúmavky, do ktorej bol pridaný 1 ml Otto II pufru s obsahom fluorescenčného farbiva DAPI s koncentráciou 2 μ g . ml⁻¹ (Tab. 5).
3. Suspenzia jadier bola analyzovaná pomocou prietokového cytometru, ktorý zaznamenával intenzitu fluorescencie jadier pri vlnovej dĺžke 461 nm po ožiarení jadier laserom s vlnovou dĺžkou 358 nm (Doležel a Göhde, 1995).

Tab. 4 Zloženie Otto I pufru

Chemikálie	Koncentrácia v 100 ml
Kyselina citrónová	100 mM
Tween 20	0,5 % (v/v)

Výsledné pH roztoku bolo v rozmedzí 2-3.

Tab. 5 Zloženie Otto II pufru

Chemikálie	Koncentrácia v 100 ml
Na ₂ HPO ₄ .12H ₂ O	400 mM

Výsledné pH roztoku bolo v rozmedzí 8-9.

3.2.4 Izolácia RNA

Z detegovaných haploidných a dihaploidných transgénnych rastlín, z transgénnej rastliny T₀ generácie a kontrolnej rastliny jarného jačmeňa odrody Golden Promise, bez obsahu génu osm, bola izolovaná RNA podľa nasledujúceho protokolu:

1. Pomocou tekutého dusíka bola vymrzená sterilná trecia miska s tĺčikom.
2. Z mladej rastliny jarného jačmeňa bol odstrihnutý list s veľkosťou približne 3 cm.
3. Do tretej misky bol pridaný tekutý dusík a list. Pomocou tĺčika bol list homogenizovaný.
4. Homogenát bol prenesený do vymrzenej 1,5ml mikroskúmavky.
5. Do mikroskúmavky bol pridaný 1 ml Trizolu a zmes bola inkubovaná pri teplote 60°C 5 minút vo vodnom kúpeli.
6. Do mikroskúmavky bolo pridaných 200 µl chloroformu.
7. Zmes bola premiešavaná 15 sekúnd pomocou horizontálnej trepačky a ponechaná pri laboratórnej teplote 5 minút.
8. Ďalej bola zmes centrifugovaná pri 12000 g pri teplote 4°C 10 minút.
9. Vrchná vrstva supernatantu, v ktorej sa nachádza RNA, bola pomocou pipety prenesená do novej 2ml mikroskúmavky.
10. K supernatantu bolo pridaných 400 µl izopropanolu a zmes bola premiešaná na horizontálnej trepačke.
11. Zmes bola ponechaná pri laboratórnej teplote 10 minút a následne bola centrifugovaná pri 20000 g, pri teplote 4°C 20 minút.
12. Izopropanol bol odstránený pomocou pipety.
13. Do mikroskúmavky bol pridaný 1 ml 70% etanolu a zmes bola centrifugovaná pri 20000 g, pri teplote 4°C 10 minút.
14. Etanol bol odstránený pomocou pipety a mikroskúmavky boli ponechané otvorené v laminárnom boxe 15 minút.
15. Po vyparení zvyškov etanolu bolo do mikroskúmviek pridaných 50 µl sterilne vody, ktorá mala laboratórnu teplotu. Pomocou nasávania a vypúšťania vody z pipety bol vo vode rozpustený vzniknutý pelet.
16. Následne bola vo vzorkách zmeraná koncentrácia RNA pomocou Nanodropu.

3.2.5 Prepis RNA do cDNA

1. Koncentrácia vzoriek RNA bola nariedená na výslednú koncentráciu $1500 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$.
2. Do mikroskúmavky bola pridaná komerčná zmes látok Mix 1 pre odstránenie DNA (Tab. 6).
3. Do mikroskúmavky s Mix 1 bola pridaná vzorka RNA a celá zmes bola inkubovaná pri teplote 37°C 2 minúty vo vodnom kúpeli. Počas tohto procesu došlo k degradácii DNA v zmesi.
4. Všetky mikroskúmavky boli prenesené na ľad.
5. Do mikroskúmavky bola následne pridaná komerčná zmes Mix 2 a vzorky boli inkubované pri laboratórnej teplote 10 minút, kedy prebehol proces nasadenia primerov (Tab. 7).
6. Následne boli vzorky prenesené do vodného kúpeľa, kde boli inkubované pri teplote 50°C 10 minút. Počas tohto procesu bol vykonaný prepis RNA do cDNA pomocou enzýmu reverznej transkriptázy.
7. Vzorky boli inkubované v ohrevnom hniezde pri teplote 85°C 5 minút, aby došlo k inaktivácii enzýmov.

Tab. 6 Zloženie Mix 1

Chemikálie	Množstvo
DNáza pufor 10x	1 μl
DNáza enzým	1 μl
Templát RNA	podľa výslednej koncentrácie
Voda (nuclease-free)	doplniť do 10 μl

Tab. 7 Zloženie Mix 2

Chemikálie	Množstvo (reakcia prepisu)	Množstvo (kontrolná reakcia)
SuperScript TM IV VILO TM Master mix	4 μl	-
SuperScript TM IV VILO TM No RT Control	-	4 μl
Voda (nuclease-free)	6 μl	6 μl

3.2.6 Stanovenie expresie génu *osm*

Vzorky cDNA transgéennej rastliny T_0 generácie, 2 haploidných a 2 dihaploidných transgénnych rastlín a kontrolnej rastliny bez prítomnosti génu *osm*, boli použité na analýzu expresie génu *osm* metódou qRT-PCR. Vzorky cDNA boli 10-krát riedené a analyzované v troch technických opakovaniach. Nariedené vzorky boli pridané do predpripravenej reakčnej zmesi a analyzované metódou qRT-PCR podľa programu (Tab. 8, Tab. 9). Na analýzu boli použité primery OSM opt RT 3 (Tab. 2). Rovnako boli vzorky použité na analýzu expresie génu pre *elongačný* faktor 1 (*efl*), ktorý bol použitý ako referenčný gén, za rovnakých podmienok reakcie (Tab. 9). Pre gén *efl* boli použité primery EF1 opt (Tab. 10).

Boli pripravené štandardy PCR produktov génov *osm* a *efl* z genómovej DNA transgéennej rastliny. Podmienky PCR reakcie pre gén *osm* a *efl* sú uvedené v Tab. 3 a Tab 11. PCR produkty boli prečistené cez kolónky s použitím komerčne dostupného NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up podľa protokolu výrobcu. Prečistené produkty génov *osm* a *efl* s výslednou koncentráciou $30 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $50 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ boli nariedené 2-, 4-, 8-, 16- a 32-krát na koncentrácie $15 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $7,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $3,75 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $1,87 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $0,94 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $12,5 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $6,25 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$, $3,12 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a $1,56 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ pre prípravu kalibračných kriviek. Kalibračné krivky boli použité na výpočet hodnôt sklonu kriviek, ktoré boli ďalej použité pre výpočet efektivity amplifikácie (*E*).

Po prebehnutí qRT-PCR reakcií bola vykonaná analýza teploty topenia produktov pre overenie špecificity produktov. Analýza teploty topenia produktu trvala 1,5 minúty v rozmedzí teplôt 65°C - 95°C , pri čom každých 5 sekúnd sa teplota reakcie zvyšovala o $0,5^\circ\text{C}$.

Na základe získaných dát z qPCR analýzy bola vypočítaná expresia génu *osm* v príslušných vzorkách podľa vzorca:

$$\frac{T_i}{T_{norm}} = \frac{(1 + E_{norm})^{Ct_{norm}}}{(1 + E_i)^{Ct_i}}$$

kde T_i je hodnota expresie záujmového génu (T_i), T_{norm} je expresia referenčného génu, E_i je hodnota PCR efektivity pre analyzovaný záujmový gén a jeho príslušné primery, E_{norm} je hodnota PCR efektivity pre analyzovaný referenčný gén a jeho príslušné primery, Ct_i je hodnota cyklu prahu pre analyzovaný záujmový gén, Ct_{norm} je hodnota cyklu prahu pre analyzovaný referenčný gén.

Zistené hodnoty expresie v dihaploidných a haploidných rastlinách boli spriemerované a boli určené smerodajné odchýlky daných hodnôt.

Tab. 8 Zloženie reakčnej zmesi pre qRT-PCR

Chemikálie	Množstvo pre 1 vzorku (μl)
SYBR® Green 5x	5
F primer	0,4
R primer	0,4
Vzorka	1
Voda	3,2

Tab. 9 Priebeh qRT-PCR reakcie

Názov procesu	Teplota	Počet cyklov	Čas
Aktivačná denaturácia	95°C	1	3 minúty
Denaturácia	95°C		15 sekúnd
Nasadenie primerov a amplifikácia produktu	62°C	40	1 minúta

Tab. 10 Primery pre amplifikáciu génu efl

Názov primeru	Sekvencia	Veľkosť amplikonu [bp]
EF1 opt F 1	5'-GAA GAT TCC CAC CAA GC-3'	107
EF1 opt R 1	5'-TGA CAC CAA CAG CCA CAG TT-3'	

Tab. 11 Priebeh PCR reakcie génu efl

Názov procesu	Teplota	Počet cyklov	Čas
Aktivačná denaturácia	95°C	1	4 minúty
Denaturácia	94°C		20 sekúnd
Nasadenie primerov	55°C	37	25 sekúnd
Extenzia	72°C		40 sekúnd
Záverečná extenzia	72°C	1	5 minút

3.2.7 Vplyv abiotického stresu na klíčenie semien jačmeňa

Bola testovaná klíčivosť semien transgéennej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 a semien jarného jačmeňa Golden Promise, kontrolnej línie bez obsahu transgénu, v prítomnosti destilovanej vody, rôznych koncentrácií NaCl (150, 250 a 400 mM) a rôznych koncentrácií manitolu (150, 200 a 400 mM) podľa protokolu (Daszkowska-Golec et al., 2018). Boli pripravené dva zásobné roztoky NaCl a manitolu s objemom 1 liter a koncentráciou 1 M. Na prípravu zásobných roztokov bola použitá deionizovaná voda. V prípade NaCl bolo 58,44 g rozpustených v 800 ml vody za stáleho miešania. Objem bol doplnený vodou na 1 liter. Zásobný roztok bol sterilizovaný v sterilizačnom zariadení. V prípade manitolu bolo 182,17 g rozpustených v 800 ml vody za stáleho miešania a zahrievania, kvôli zhoršenej rozpustnosti manitolu. Objem roztoku bol doplnený vodou na 1 liter. Roztok bol následne sterilizovaný v sterilizačnom zariadení.

3.2.7.1 Testovanie klíčenia semien jačmeňa

1. Semená jačmeňa boli sterilizované v kadičke s obsahom 3% chlórnanu sodného 15 minút za stáleho miešania na trepačke v laminárnom boxe.
2. Následne boli semená 5-krát premyté sterilnou vodou.
3. Do Petriho misiek boli uložené 2 filtračné papiere, na ktoré bolo aplikovaných 5 ml vody alebo roztoku NaCl či manitolu s rôznou koncentráciou.
4. Do Petriho misiek bolo uložených 30 semien, vždy po troch opakovaníach (Obr. 1).
5. Petriho misky so semenami boli uložené 3 dni v tme pri teplote 4°C.
6. Následne boli Petriho misky uložené do kultivačnej komory na 5 dní pri teplote 22°C a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma.
7. Každý deň počas piatich dní boli sčítavané semená, v prípade ktorých došlo k prieniku koleoptily cez osemenie.



Obr. 1 Rozloženie semien jačmeňa v Petriho miskách počas testovania vplyvu abiotického stresu na klíčenie.

3.2.8 Vplyv abiotického stresu na dĺžku koreňa a nadzemnej časti jačmeňa

Semená línie 3C1 10 a odrody Golden Promise boli použité na testovanie vplyvu rôznych koncentrácií NaCl a manitolu na vývoj a rast rastlín. Experiment bol vykonaný podľa protokolu (Daszkowska-Golec et al., 2018).

Do oblasti hrdla sklenených skúmaviek bola vložená sterilná vata s veľkosťou približne 1 cm². Semená boli sterilizované a po jednom vložené do skúmaviek medzi vatu a sklo skúmavky. Na vatu boli pomocou pipety aplikované 3 ml sterilnej vody. Skúmavka bola uzavretá druhou sterilnou skúmavkou a spoj skúmaviek bol obalený Parafilmom. Stojan, do ktorého boli následne uložené skúmavky, bol obalený alobalom, aby sa zabránilo prieniku svetla k semenám. Semená boli kultivované v aeropónnych podmienkach v kultivačnej komore 5 dní pri teplote 22°C a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma.

5 dní staré rastliny línie 3C1 10 a kontrolnej línie boli pestované v hydroponných podmienkach v kontrolnom ½ MS médiu a v stresových podmienkach v ½ MS médiu s rôznymi koncentraciami NaCl (100, 300 a 600 mM) a manitolu (200 a 500 mM). Boli vytvorené zásobné roztoky NaCl a manitolu s objemom 1 liter a koncentraciou 1 M. V 800 ml ½ MS média bolo rozpustených 58,44 g NaCl za stáleho miešania. Roztok bol doplnený ½ MS médiom na objem 1 l a následne prefiltrovaný. V prípade manitolu bolo v 800 ml ½ MS média rozpustených 182,17 g manitolu za stáleho miešania a zahrievania. Objem roztoku bol doplnený ½ MS médiom na 1 liter. Zásobný roztok bol prefiltrovaný sterilným vakuovým systémom 0,2 µm.

Skúmavky s 5 dní starými rastlinami jačmeňa boli za sterilných podmienok v laminárnom boxe znovu otvorené a do skúmaviek bolo pridané tekuté médium tak, aby bol koreň ponorený do média. Následne boli skúmavky opäť uzavreté a obalené Parafilmom. Znova boli skúmavky vložené do stojanu obaleného alobalom, aby sa zabránilo prístupu svetla ku koreňovej časti. Skúmavky boli kultivované v kultivačnej komore 7 dní pri teplote 22°C a fotoperióde 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma.

Po 7 dňoch boli rastliny vyfotografované a pomocou programu ImageJ bola vyhodnotená dĺžka ich koreňa a nadzemnej časti.

3.2.9 Test rezistencie jačmeňa voči *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*

Transgénne rastliny línie 3C1 10 a netransgénne rastliny odrody Golden Promise boli v skleníku inkubované s 54 rasami hubového patogénu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* a testované na rezistenciu voči tomuto patogénu, pod vedením Doc. Ing. Antonína Dreiseitla, CSc., v Poľnohospodárskom výskumnom ústave Kroměříž, s.r.o.

Rasy patogénu boli namnožené a uchovávané na listoch jačmeňa uložených v Petriho miskách na agarovom médiu. Konídie patogénov boli aplikované na jačmeň vo vývojovom štádiu druhého listu. Najskôr boli konídie pomocou špičky prenesené do inokulačnej veže, z ktorej boli nanesené na segmenty testovacích listov. Vždy boli použité 3 segmenty testovacích listov pre jednu rasu patogéna. Experiment bol vyhodnotený po 8 dňoch na základe miery sporulácie konídií jednotlivých rás patogéna na povrchu segmentov testovacích listov.

3.2.10 Vplyv NaCl a PEG na klíčenie a vývoj jačmeňa

Vo fenotypizačnej komore bol sledovaný vplyv rôznych koncentrácií NaCl a polyetylénglykolu (PEG) na klíčenie a vývoj rastlín odrody Golden Promise, kontrolnej línie, a línie 3C1 10. Semená jačmeňa boli máčané v destilovanej vode pri teplote 4°C, 16 hodín v tme. Medzitým boli sadbové vaničky TEKU JP 3050/160 T naplnené substrátom a umiestnené do meracích nádob. Sadbové vaničky obsahovali 110 buniek, pričom 1 bunka mala objem 21,5 ml. Do každej bunky bolo zasadené 1 semeno do hĺbky substrátu 1 cm. Do každej sadbovej vaničky bola do plnej objemovej kapacity pridaná čistá voda alebo voda s obsahom NaCl s koncentráciou 75 a 150 mM, alebo s 31% (w/v) PEG. Následne boli sadbové vaničky zavlažované 0,5 l čistej vody každý tretí deň až do skončenia experimentu. Sadbové vaničky boli náhodne umiestnené na plošine, ktorá

bola súčasťou fenotypizačnej komory. Vo fenotypizačnej komore boli nastavené kontrolované podmienky tak, aby simulovaly dlhý deň s teplotou 22°C/20°C s fotoperiódou 16 hodín svetlo/ 8 hodín tma, s osvetlením 120 $\mu\text{mol} \cdot \text{PAR} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a relatívnou vlhkosťou 60 %. Rastliny boli v stresových aj kontrolných podmienkach snímané 10 dní.

Súčasťou fenotypizačnej komory bol Plant Screen™ XYZ systém, ktorý pozostával z roboticky riadeného ramena, na ktorom je upevnená RGB kamera s prednastaveným svetelným panelom a kultivačnej plochy s rozlohou 7 m² s kapacitou 60 meracích nádob.

Testovanie prebehlo vo fenotypizačnej komore v spolupráci s oddelením Chemickej biológie a genetiky pod dohľadom Mgr. Lukáša Spíchal, Ph.D. a Mgr. Nuria De Diego, Ph.D.

Pre každé semeno jačmeňa bol zaznamenaný moment prieniku koleoptily cez osemenie, tzv. čas prieniku. Experiment bol snímaný každé 2 hodiny. Prvý snímok bol priradený vždy na základe času prieniku, keď bol viditeľný prvý semenáčik. Semená, ktoré nevyklíčili počas experimentu boli označené ako cenzurované. Výsledné dáta pozostávali z niekoľko predikovaných premenných (stupeň zasolenia, prítomnosť a koncentrácia pôsobiaceho činidla) a výstupných premenných (čas prieniku).

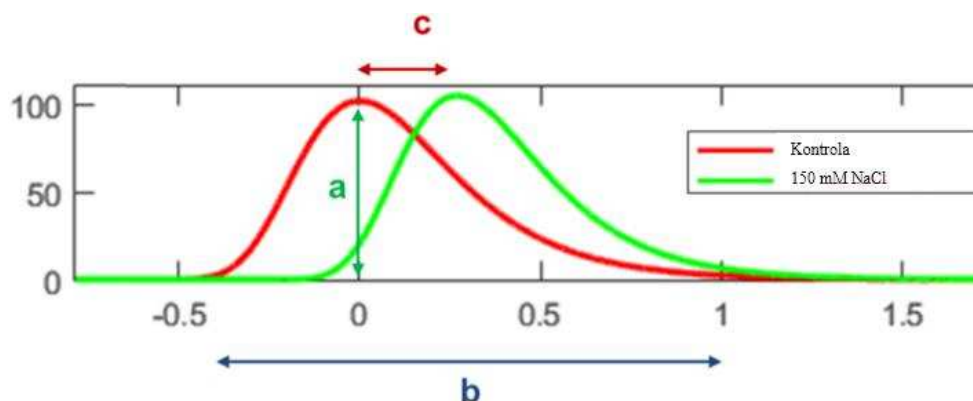
Prienik koleoptily testovaných semien bol analyzovaný zostavením Gompertzovej krivky. Krivka obsahuje tri parametre: konečnú hodnotu vyklíčených semien, ktorá vyjadruje počet semenáčikov detegovaných na konci experimentu; časový posun, ktorý predstavuje časový rozdiel v klíčení analyzovaných semien dvoch odlišných línii alebo semien jednej línie v odlišných podmienkach a synchronicitu prieniku, ktorá vyjadruje aký veľký bol časový posun v klíčení jednotlivých analyzovaných semien jednej línie alebo v rámci konkrétnych testovacích podmienok. Následne bola vykonaná analytická derivácia Gompertzovej krivky, kedy maximálna hodnota je rovná konečnej hodnote vyklíčených semenáčikov (a), časový posun je vzdialenosť pozície maxim vyklíčených semenáčikov medzi dvoma líniami alebo dvoma druhmi kultivačných podmienok (b) a synchronicita je rovná šírke jednotlivých pík (c) (Obr. 2).

Po testovaní bola v prípade 50 rastlín oboch línii a všetkých typov podmienok analyzovaná dĺžka nadzemnej časti pomocou pravítka a hmotnosť nadzemnej časti rastlín. Dĺžka nadzemnej časti bola meraná od prieniku rastliny substrátom po koniec listu.

Boli odobrané vzorky rastlín línie 3C1 10 na analýzu relatívnej expície génu osm vo všetkých testovacích podmienkach. Zhluk 5 rastlín z každých typov testovacích podmienok bol použitý na izoláciu RNA. Z každého zhluku boli vytvorené 3 vzorky RNA a následne vizualizované na 1,5% agarovom gély metódou elektroforézy a v UV-iluminácii. RNA bola prepísaná do cDNA, ktorá bola použitá na analýzu relatívnej expície génu osm metódou qRT-PCR. Vzorky cDNA boli riedené na koncentráciu $100 \text{ ng} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ a zmiešané s reakčnou zmesou (Tab. 12). Vzorky boli analyzované v troch technických opakovaniach, výsledná relatívna expresia génu osm bola vypočítaná ako hodnota $2^{-(\Delta\Delta C_t)}$.

10 rastlín z oboch línií a všetkých typov podmienok bolo odobraných na analýzu obsahu chlorofylu.

5 listov z rastlín oboch línií a všetkých typov podmienok bolo odobraných na analýzu obsahu osmolytických látok. Analýza prebehla v spolupráci s oddelením Chemickej biológie a genetiky, ktoré je súčasťou Centra Regiónu Hanná pre biotechnologický a poľnohospodársky výskum, pod dohľadom Mgr. Nuria De Diego, Ph.D.



Obr. 2 Derivovaná Gompertzová krivka.

Obrázok zobrazuje tri parametre klíčenia semenáčikov analyzovaných v dvoch odlišných typoch podmienok kultivácie.

a – konečná hodnota vyklíčených semien, b – synchronicita prieniku, C – časový posun, Kontrola – kontrolné podmienky, 150 mM NaCl – stresové podmienky.

3.2.10.1 Analýza chlorofylu

1. Pomocou nožníc bol odstrihnutý list jačmeňa s veľkosťou 3 cm.
2. List bol obkreslený na priesvitnú fóliu a pomocou programu ImageJ bola zmeraná plocha listu.
3. List bol uložený do 2ml mikroskúmavky a zamrazený v tekutom dusíku.

4. Následne boli vzorky skladované pri teplote -80°C do momentu izolácie chlorofylu.
5. Zmrazený list bol rozotrený v trecej miske s trochou MgCl_2 a 2 ml 80% acetónu.
6. Acetónový extrakt bol prenesený pomocou automatickej pipety späť do 2ml mikroskúmavky a centrifugovaný pri 3600 g a teplote 4°C , 15 minút.
7. Následne bol supernatant prenesený do 15ml sklenenej skúmavky.
8. Vzorky boli nariadené na určitý objem tak, aby sa ich absorbancia pohybovala v rozmedzí od 0,4-0,8.
9. Nariadený extrakt bol prenesený do jednocentimetrovej kyvety.
10. Pomocou spektrofotometra bola meraná absorbancia chlorofylu vo vzorkách extraktu pri vlnových dĺžkach 470; 646,8; 663,2 a 750 nm.
11. Výsledné absorbancie boli dosadené do vzorca pre výpočet obsahu chlorofylu a a b podľa Lichtenthalera (1987).
12. Obsah chlorofylu bol vynásobený objemom extraktu a plochou listu. Výsledná hodnota chlorofylu bola vyjadrená v jednotkách $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$.

3.2.10.2 Analýza osmolytických látok

1. Listy rastlín boli odstrihnuté, uložené do 50ml skúmavky a zamrazené v tekutom dusíku.
2. Takto zamrazená vzorka bola prenesená do 0,6ml mikrozkúmavky, ktorá bola uložená do ďalšej 1,5ml mikrozkúmavky a vzorky listov boli ponechané pri laboratórnej teplote, aby sa roztopili.
3. Následne boli pomocou centrifugácie pri 15000 g 20 minút extrahované tekutiny z listov.
4. Extrakt bol inkubovaný pri teplote 25°C 15 minút.
5. S použitím osmometra 3320 Single-Sample Micro bola meraná koncentrácia rozpustených látok v extrakte.
6. Osmotický potenciál ($\Psi\Pi$) bol vypočítaný pomocou Van't Hoffovej rovnice:

$$\Psi\Pi = -R \cdot T \cdot c_s$$

kde R je plynová konštanta, T je teplota vzorky, c_s je koncentrácia rozpustených látok ($\text{mol} \cdot \text{kg}^{-1}$).

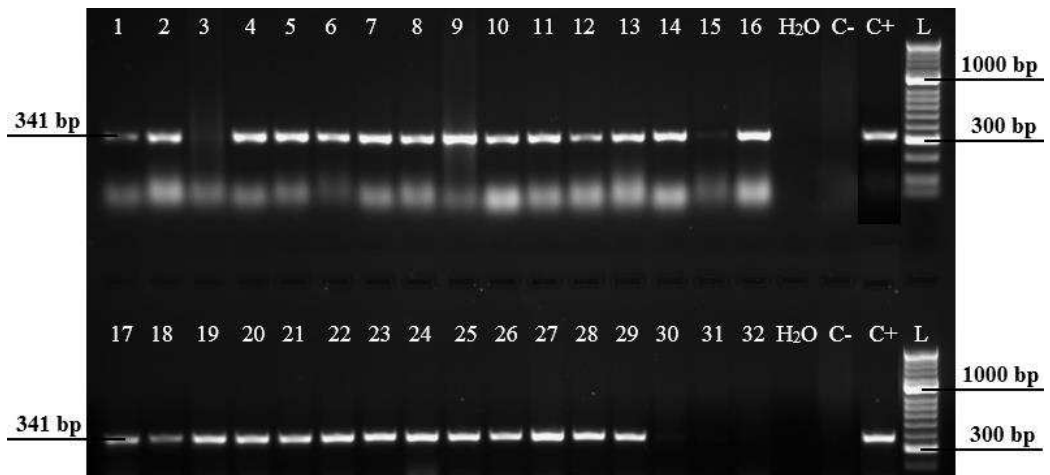
4 VÝSLEDKY

4.1 Selekcia transgénnych rastlín T₁ generácie

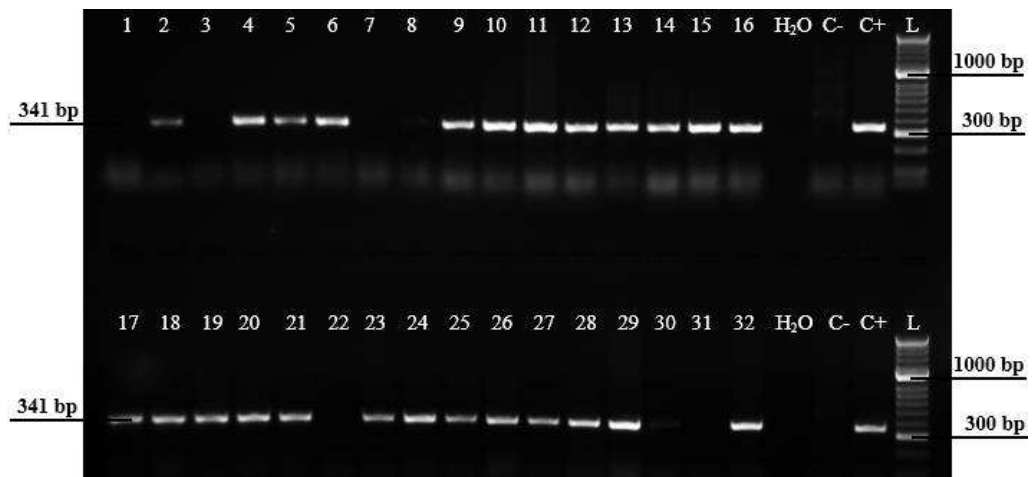
Z regenerovaných rastlín T₀ generácie, v ktorých bola potvrdená prítomnosť transgénu osm, boli pre urýchlené získanie T₁ generácie izolované nezrelé zygotické embryá. Z 9 donorových rastlín bolo celkovo izolovaných 513 embryí, z ktorých na ½ MS médiu s 30 mg.l⁻¹ Hygromycínu regenerovalo 338 zelených a 15 albikátnych rastlín. Z celkového počtu 353 rastlín bolo 256 rastlín pozitívnych a 82 rastlín neobsahovalo transgén osm, pomer pozitívnych a negatívnych rastlín bol 3:1, líšil sa však v rámci jednotlivých donorových rastlín (Tab. 12). Najvyšší počet pozitívnych rastlín bol získaný v potomstve rastliny 1B, kedy bolo kultivovaných 41 embryí, po kultivácii na médiu s Hygromycínom regenerovalo 35 rastlín, z ktorých bolo 27 rastlín pozitívnych (Obr. 3). Oproti tomu v potomstve rastliny 5A bol aj po predselekcii na ½ MS médiu s Hygromycínom zistený pomer pozitívnych a negatívnych rastlín 1:1 a v potomstve 2B2 bol zistený pomer 2,4:1 (Obr. 4). Z dôvodu veľkého množstva výsledkov z PCR analýz bola vybraná iba časť výsledkov.

Tab. 12 Počet získaných transgénnych rastlín v T₁ generácii

Donorové rastliny T ₀	Počet kultivovaných embryí	Počet regenerovaných rastlín T ₁	Počet zelených rastlín	Počet albínov	PCR +	PCR- -	Pomer PCR+ : PCR- -
1A1	16	8	8	0	6	2	3:1
1B	41	35	28	7	27	1	27:1
1C	50	30	22	8	22	0	22:1
3B	48	34	34	0	32	2	16:1
3C1	28	20	20	0	20	0	20:1
2B1	82	65	65	0	53	12	4,4:1
2B2	73	62	62	0	44	18	2,4:1
4D	100	55	55	0	30	25	1,2:1
5A	75	44	44	0	22	22	1:1
Spolu	513	353	338	15	256	82	3:1



Obr. 3 PCR analýza génu *osm* v rastlinách T₁ generácie línie 1B.
 1-32 – vzorky DNA rastlín, H₂O – voda, C+ - pozitívna kontrola (DNA transgéennej rastliny T₀ generácie), C- – negatívna kontrola (netransformovaná rastlina), L – veľkostný márker Hypper Ladder II. PCR produkt – 341 bp.



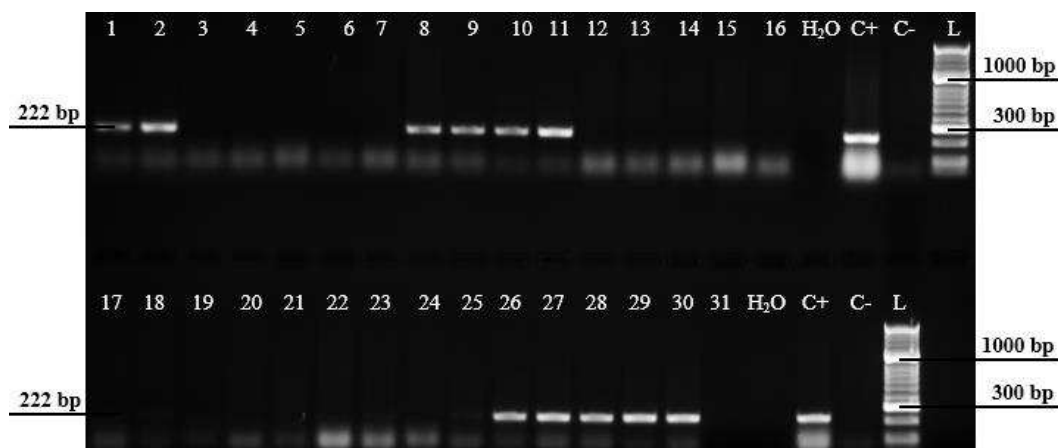
Obr. 4 PCR analýza génu *osm* v rastlinách T₁ generácie línie 2B2.
 1-32 – vzorky DNA rastlín, H₂O – voda, C- – negatívna kontrola (netransformovaná rastlina), C+ – pozitívna kontrola (DNA transgéennej rastliny T₀ generácie), L – veľkostný márker Hypper Ladder II. PCR produkt – 341 bp.

4.2 Detekcia génu osm v rastlinách regenerovaných z peľníc

Z 3 vybraných pozitívnych rastlín T₁ generácie označených ako 3C1, 2B2 a 4D boli izolované peľnice. V regenerovaných rastlinách bola pomocou PCR stanovená prítomnosť transgénu osm (Obr. 5). Z celkového počtu 1209 kultivovaných peľníc bolo získaných 35 zelených a 36 albikátnych rastlín, z toho 14 rastlín obsahujúcich transgén osm a 21 netransgenných rastlín (Tab. 13).

Tab. 13 Kultivácia peľníc transgenných rastlín T₁ generácie

Rastliny T ₁ generácie	Počet kultivovaných peľníc	Počet kultivovaných kalusov	Počet regenerovaných zelených rastlín	Počet albínov	PCR +	PCR- -	Pomer PCR+ : PCR- -
3C1	230	18	14	8	3	11	1:3,6
2B2	405	14	20	26	11	9	1:1,2
4D	574	23	1	2	0	1	0
Spolu	1209	55	35	36	14	21	1:1,5



Obr. 5 PCR analýza génu osm v rastlinách regenerovaných z peľníc.

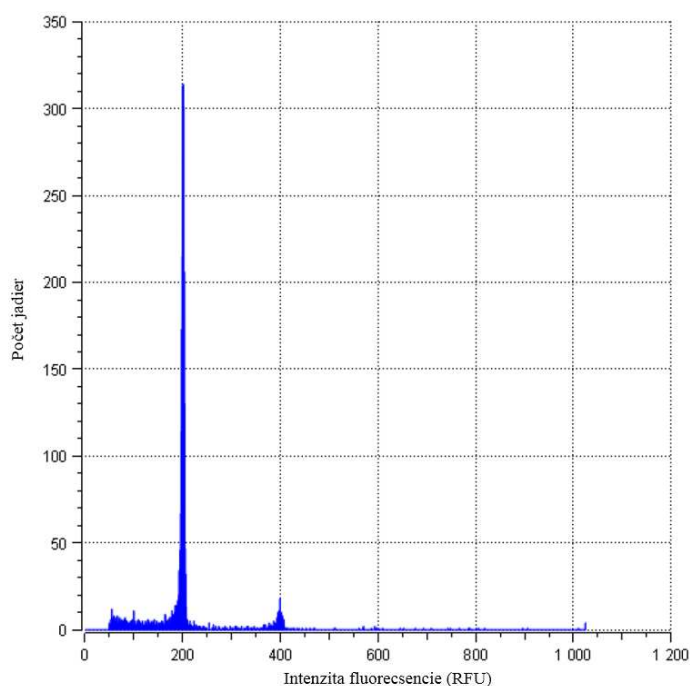
1-31 – vzorky DNA rastlín, H₂O – voda, C- – negatívna kontrola (netransformovaná rastlina), C+ - pozitívna kontrola (DNA transgénnej rastliny T₀ generácie), L – veľkostný márker Hypper Ladder II, PCR produkt – 222 bp.

4.3 Analýza ploidity transgenných rastlín regenerovaných z peľníc

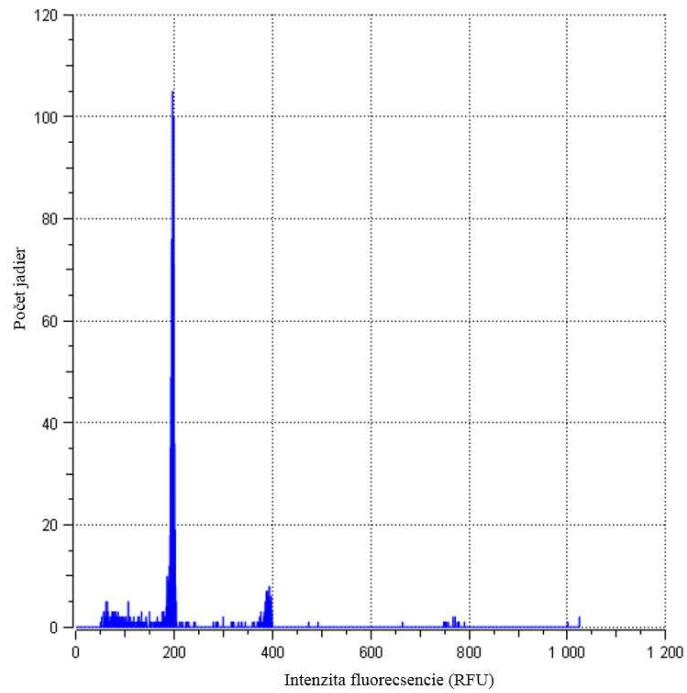
Pomocou prietokovej cytometrie bolo analyzovaných 14 transgenných rastlín generácie T₂DH₀, ktoré regenerovali z peľníc izolovaných z rastlín 2B2 a 3C1. Z peľníc rastliny 2B2 regenerovalo 11 transgenných rastlín, z čoho 11 rastlín bolo haploidných a z peľníc rastliny 3C1 regenerovali 3 pozitívne rastliny, z čoho všetky 3 boli dihaploidné (Tab. 14). Ako štandard bola použitá vzorka listu jarného jačmeňa odrody Golden Promise s diploidným genómom, ktorej výsledná intenzita fluorescence analyzovaných jadier bola 200 RFU (Obr. 6). Rovnaká hodnota intenzity fluorescence bola detegovaná v rastlinách regenerovaných z peľníc z rastliny 3C1, ktoré boli následne označené ako dihaploidné (Obr. 7). Hodnota intenzity fluorescence v rastlinách regenerovaných z peľníc z rastliny 2B2 bola 100 RFU, rastliny boli označené ako haploidné (Obr. 8).

Tab. 14 Ploidia rastlín generácie T₂DH₀

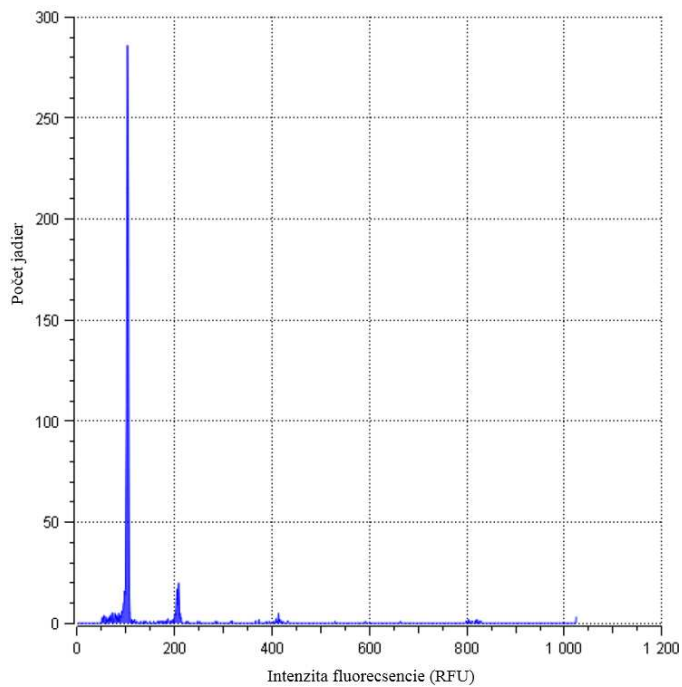
Donorová rastlina	Haploidné rastliny (n)	Diploidné rastliny (2n)
2B2	11	-
3C1	-	3



Obr. 6 Stanovenie ploidity prietokovým cytometrom kontrolnej diploidnej rastliny. Obsah jadrovej DNA kontrolnej rastliny je 2n.



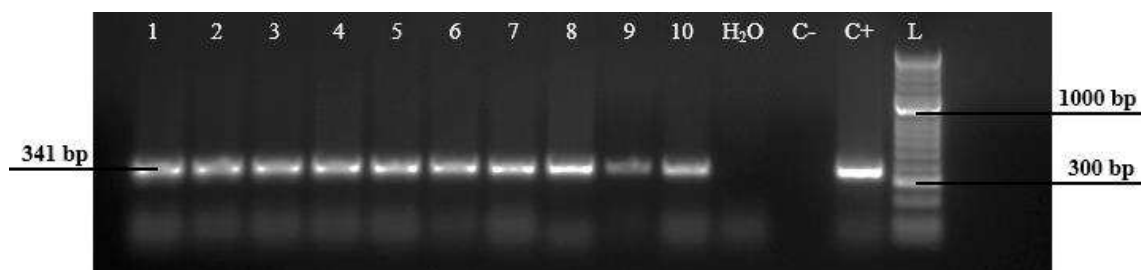
Obr. 7 Stanovenie ploidity prietokovým cytometrom rastliny 3C1 10 regenerovanej z peľníc. Obsah jadrovej DNA je $2n$, rastlina je dihaploidná.



Obr. 8 Stanovenie ploidity prietokovým cytometrom rastliny 2B2 1 regenerovanej z peľníc. Obsah jadrovej DNA je n , rastlina je haploidná.

4.4 Overenie prítomnosti transgénu v potomstve dihaploidnej rastliny 3C1 10

Z transgéennej dihaploidnej rastliny označenej ako 3C1 10 boli izolované nezrelé zygotické embryá. Vo všetkých 10 rastlinách, ktoré regenerovali z nezrelých zygotických embryí bola metódou PCR preukázaná prítomnosť génu osm (Obr. 9).



Obr. 9 PCR analýza homozygotných rastlín generácie T₃DH₁.

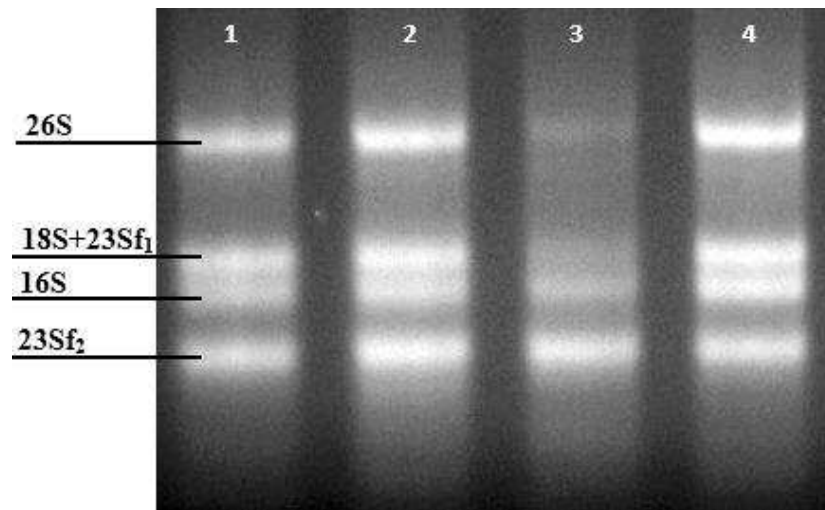
1-10 – vzorky DNA rastlín, H₂O – voda, C- – negatívna kontrola (netransgéenna rastlina), C+ – pozitívna kontrola (DNA transgéennej rastliny T₀ generácie), L – veľkostný márker Hypper Ladder II, PCR produkt – 341 bp.

4.5 Výsledky exprese génu *osm*

Z haploidných a dihaploidných rastlín, rastliny T_0 generácie a rastliny netransgénného jarného jačmeňa odrody Golden Promise bola izolovaná RNA. Izolovaná RNA bola separovaná v 1,5% agarózovom gély (Obr. 10). RNA bola prepísaná do cDNA a bola potvrdená prítomnosť transkriptu génu *osm* v cDNA vzorkách transgénnych rastlín (Obr. 11).

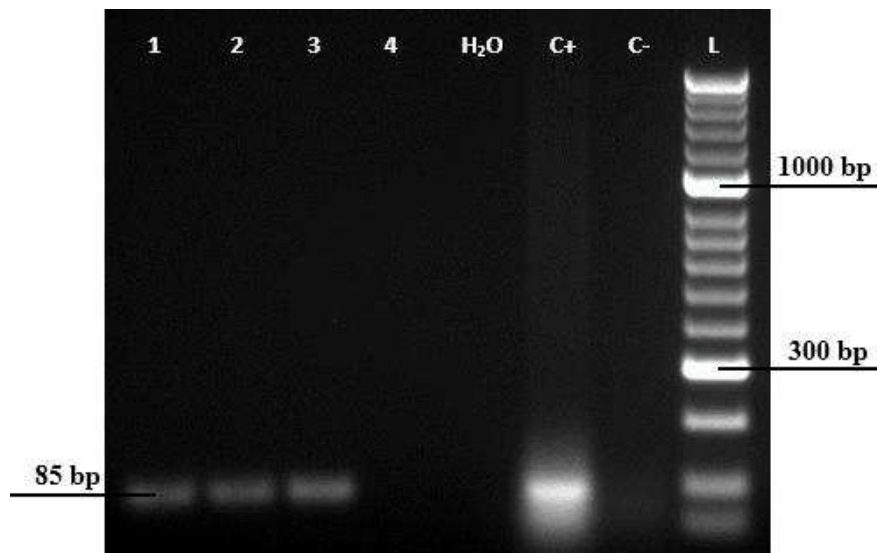
Vzorka genómovej DNA transgéennej rastliny T_0 generácie bola použitá na amplifikáciu génu *ef1* a *osm*, vzniknuté produkty boli následne prečistené a vizualizované na 1,5% agarózovom gély (Obr. 12). Produkty boli nariedené a použité na zostavenie kalibračných kriviek pre gén *ef1* a *osm* (Obr. 13, Obr. 14). Efektivity amplifikácie génu *ef1* a *osm* boli 2,045 a 2,015, ktorým prislúchajú hodnoty spoľahlivosti určenia (R^2) 0,9754 a 0,9799. Vzorky cDNA boli analyzované pomocou qRT-PCR a bola zistená intenzita fluorescencie jednotlivých vzoriek počas amplifikácie génu *ef1* a *osm* vzhľadom na cyklus reakcie v jednotlivých typoch rastlín (Obr. 15, Obr. 17). Analýzou teploty topenia produktov qRT-PCR reakcie génov *ef1* a *osm* sa potvrdilo, že sa v qRT-PCR reakciách amplifikovali požadované produkty (Obr. 16, Obr. 18).

Zo získaných dát kalibračných kriviek pre gén *ef1* a *osm* a dát intenzít fluorescencie qRT-PCR reakcie génov *ef1* a *osm* bola vypočítaná expresia génu *osm* vo všetkých typoch analyzovaných vzoriek. Expresia génu *osm* v transgéennej rastline T_0 dosiahla veľmi nízku hodnotu 0,001. V transgénnych dihaploidných rastlinách bola detegovaná hodnota exprese 1,25. Expresia detegovaná v transgénnych haploidných rastlinách dosiahla hodnotu 3,24. Hodnoty exprese sa výrazne líšili medzi biologickými vzorkami dihaploidných a haploidných rastlín, čomu zodpovedá aj veľkosť smerodajných odchýlok (Obr. 19).



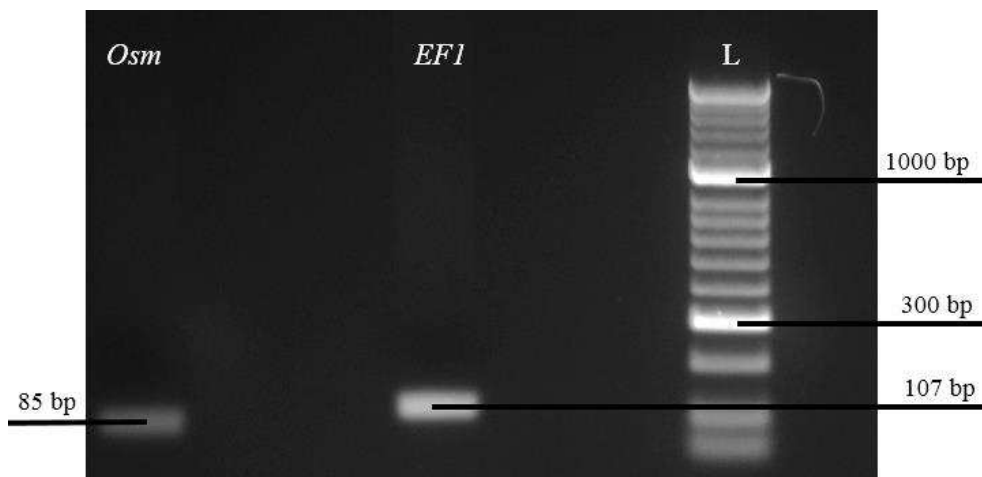
Obr. 10 Analýza RNA metódou agarózovej elektroforézy.

1-4 – vzorky RNA; 26S a 18S – ribozomálna RNA z cytoplazmy; 23Sf₁, 23Sf₂ a 16S – ribozomálna RNA z chloroplastov.

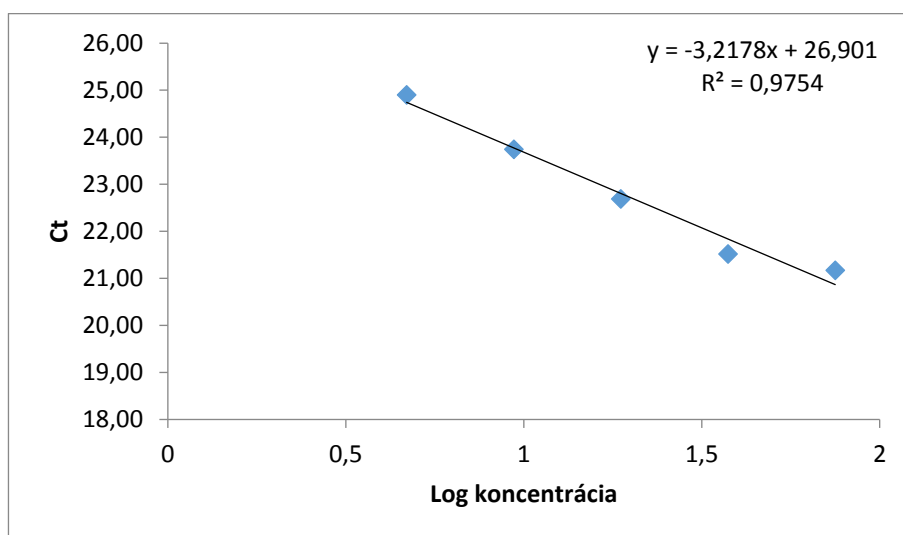


Obr. 11 Analýza cDNA metódou agarózovej elektroforézy.

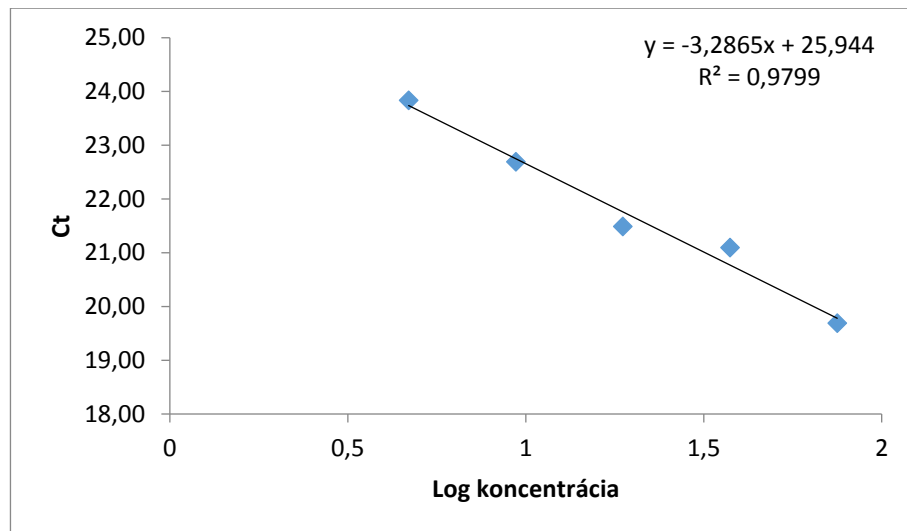
1 – vzorka cDNA transgénnej rastliny T₀ generácie, 2 – Vzorka cDNA haploidnej rastliny, 3 – vzorka cDNA dihaploidnej rastliny, 4 – vzorka cDNA rastliny bez obsahu génu osm, H₂O – voda, C+ - pozitívna kontrola, C- – negatívna kontrola, L – Hypper Lader II, výsledný produkt – 85 bp.



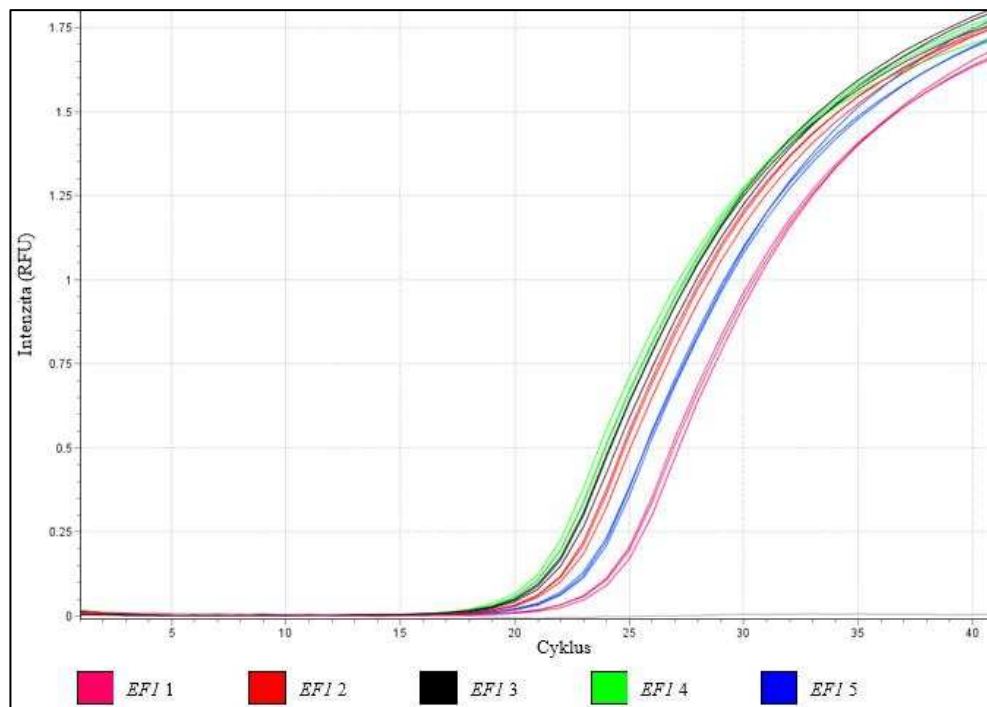
Obr. 12 Analýza prečistených produktov génu *osm* a *efl* metódou agarózovej elektroforézy. *osm* – prečistený produkt génu osmotin, *efl* – prečistený produkt génu *elongačný faktor 1*, L – veľkostný márker Hypper Lader II, výsledný produkt génu *osm* – 85 bp, výsledný produkt génu *efl* – 107 bp.



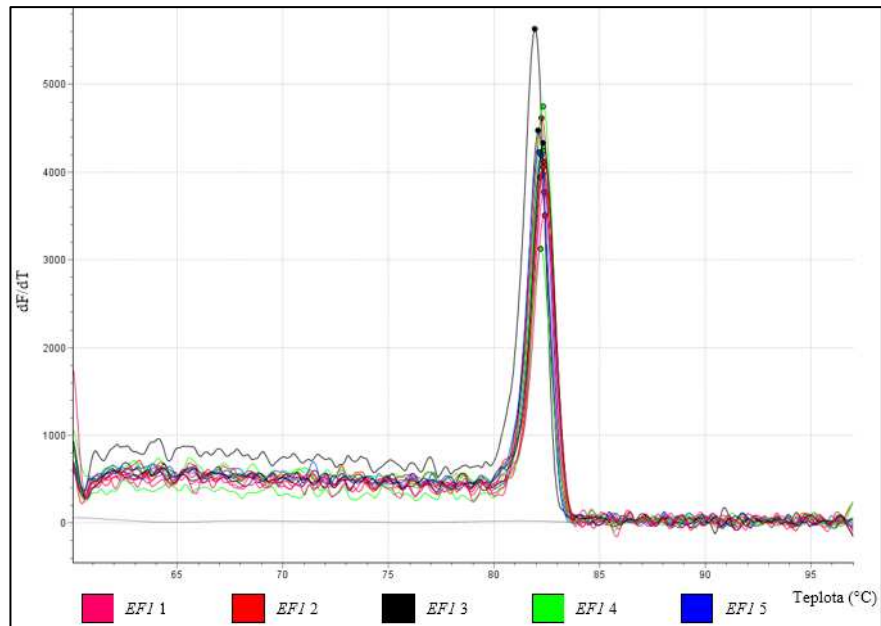
Obr. 13 Kalibračná krivka pre gén *efl*. Závislosť Ct hodnôt na koncentrácii vzoriek nariedeného produktu PCR reakcie génu *efl*. Log koncentrácia – dekadický logaritmus hodnôt koncentrácie, Ct – hodnoty cyklu prahu.



Obr. 14 Kalibračná krivka pre gén osm.
Závislosť Ct hodnôt na koncentrácii vzoriek nariedeného produktu PCR reakcie génu osm.
Log koncentrácia – dekadický logaritmus hodnôt koncentrácie, Ct – hodnoty cyklu prahu.

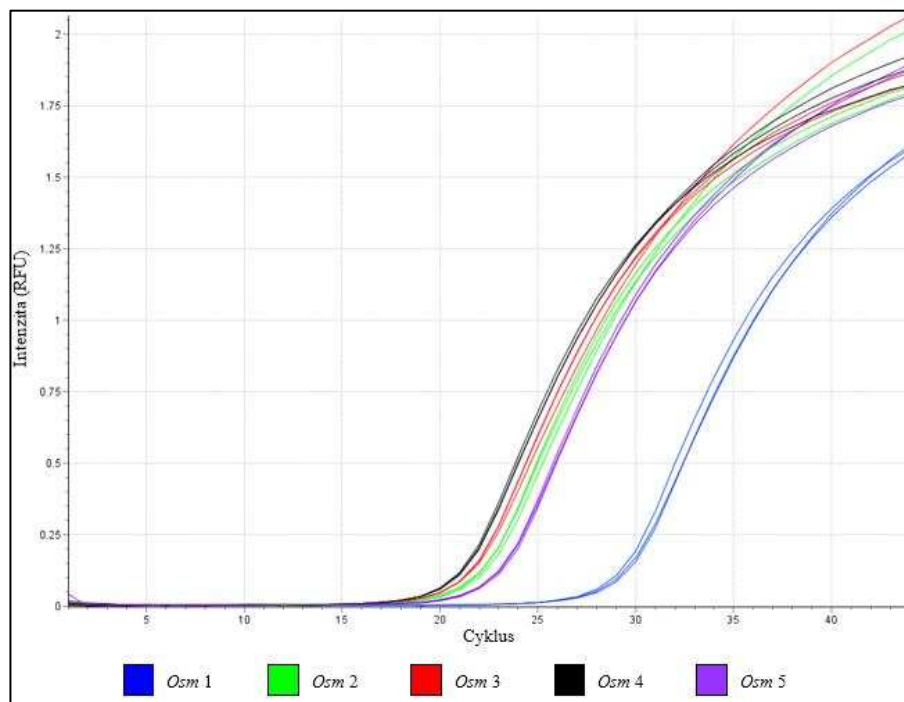


Obr. 15 qRT-PCR analýza génu efl.
Intenzita fluorescencie vzoriek počas amplifikácie génu efl vzhľadom na cyklus qRT-PCR reakcie. EF1 1 – vzorka cDNA pôvodného transformanta, EF1 1 a EF1 2 – vzorky cDNA transgénnych dihaploidných rastlín, EF1 4 a EF1 5 – vzorky cDNA transgénnych haploidných rastlín, RFU – jednotka relatívnej fluorescencie.



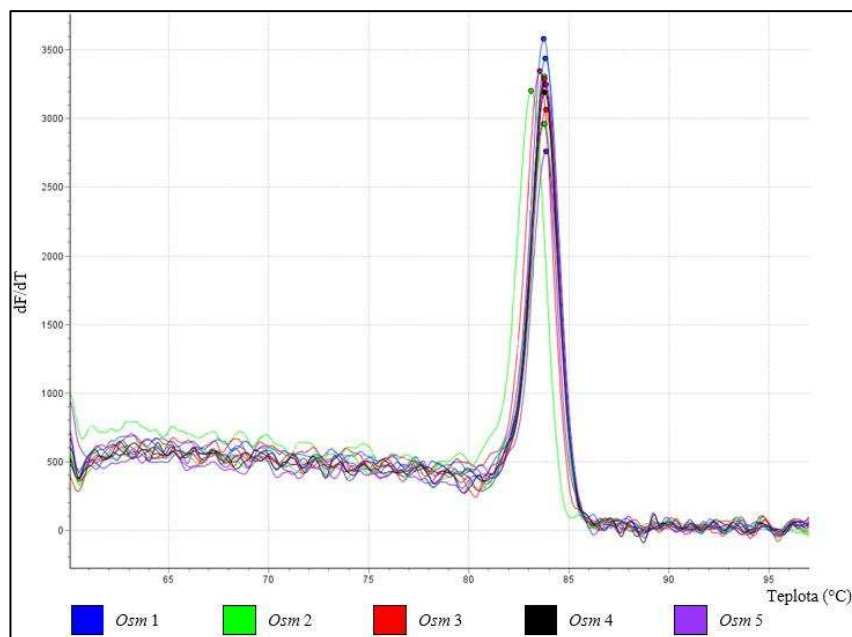
Obr. 16 Krivka teploty topenia génu *efl*.

Veľkosť zmeny fluorescence vzoriek pri amplifikácii génu *efl* vzhľadom na zmenu teploty qRT-PCR reakcie. EF1 1 – vzorka cDNA pôvodného transformanta, EF1 1 a EF1 2 – vzorky cDNA transgénnych dihaploidných rastlín, EF1 4 a EF1 5 – vzorky cDNA transgénnych haploidných rastlín, dF/dT – hodnota zmeny fluorescence vzhľadom na zmenu teploty.



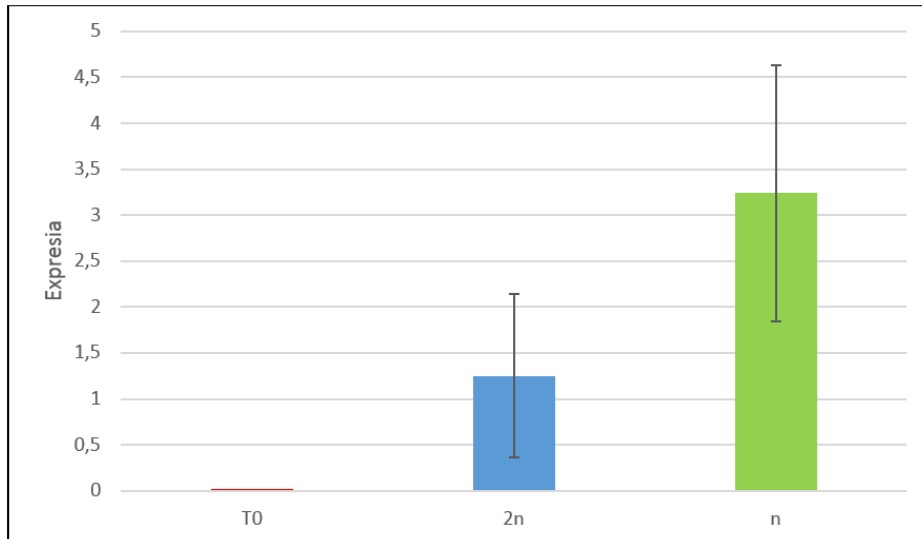
Obr. 17 qRT-PCR analýza génu *osm*.

Intenzita fluorescence vzoriek počas amplifikácie génu *osm* vzhľadom na cyklus qRT-PCR reakcie. Osm 1 – vzorka cDNA pôvodného transformanta, Osm 1 a Osm 2 – vzorky cDNA transgénnych dihaploidných rastlín, Osm 4 a Osm 5 – vzorky cDNA transgénnych haploidných rastlín, RFU – jednotka relatívnej fluorescence.



Obr. 18 Krivka teploty topenia génu *osm*.

Veľkosť zmeny fluorescence vzoriek pri amplifikácii génu *osm* vzhľadom na zmenu teploty qRT-PCR reakcie. *Osm 1* – vzorka cDNA pôvodného transformanta, *Osm 1* a *Osm 2* – vzorky cDNA transgénnych dihaploidných rastlín, *Osm 4* a *Osm 5* – vzorky cDNA transgénnych haploidných rastlín, dF/dT – hodnota zmeny fluorescence vzhľadom na zmenu teploty.



Obr. 19 Expresia génu *osm*.

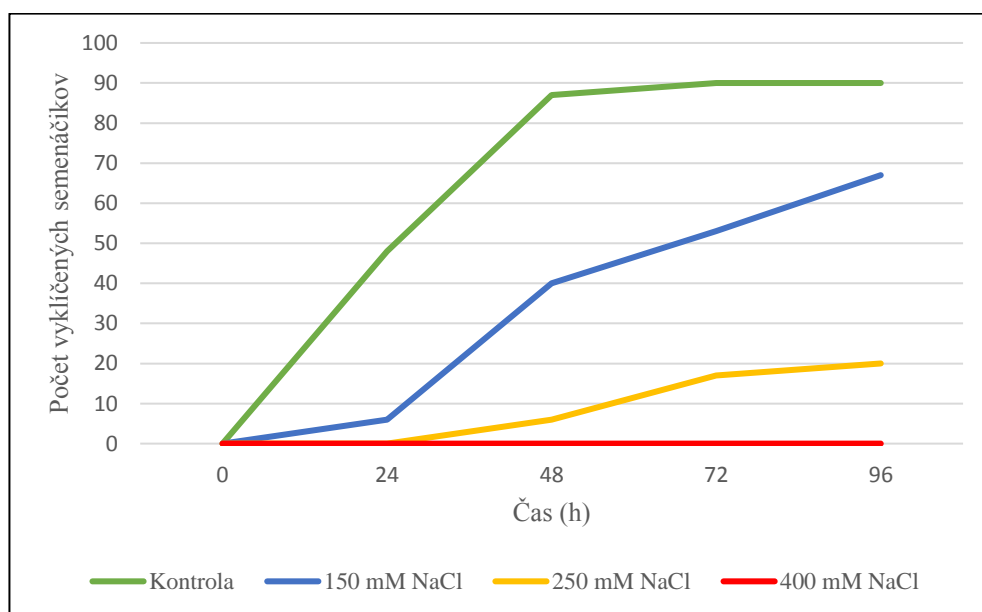
Hodnoty expresie génu *osm* v analyzovaných vzorkách. T0 – transgénny jačmeň generácie T₀ (pôvodný transformant), 3C1 10 – dihaploidné transgénne rastliny, 2B2 – haploidné transgénne rastliny.

4.6 Vplyv NaCl a manitolu na klíčenie semien

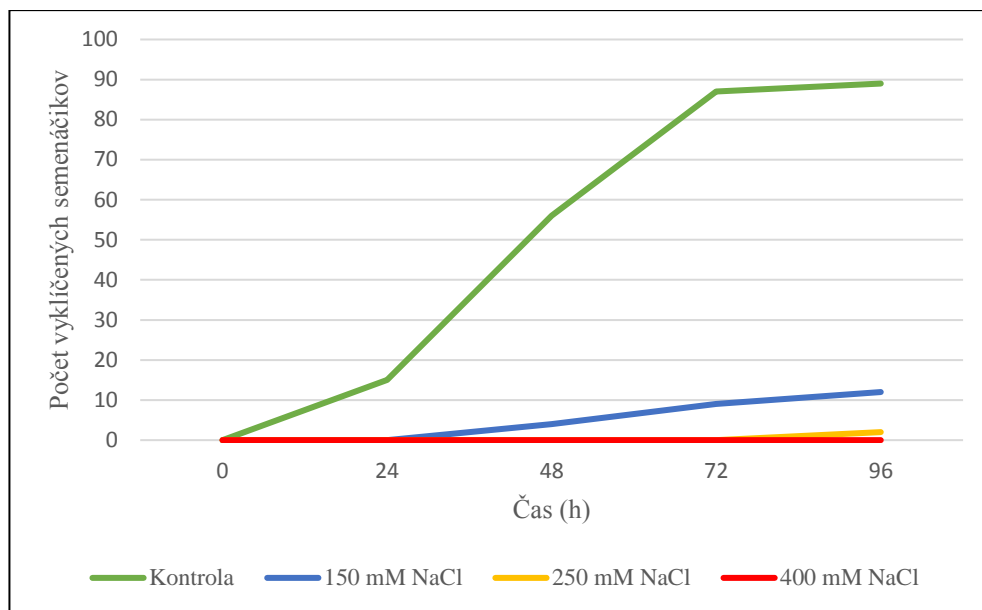
Semená transgéennej dihaploidnej homozygotnej línie 3C1 10 a netransgéenneho jarného jačmeňa odrody Golden Promise boli použité na testovanie vplyvu rôznych koncentrácií NaCl a manitolu na klíčenie semien.

Počet vyklíčených semenáčikov jarného jačmeňa odrody Golden Promise dosiahol v kontrolných podmienkach maximum 90 semenáčikov v čase 72 hodín od začiatku merania. S narastajúcou koncentráciou NaCl klesal počet vyklíčených semenáčikov. Pri koncentrácii 150 mM NaCl bol počet vyklíčených semenáčikov 67 a pri 250 mM NaCl vyklíčilo 20 semenáčikov. Po pôsobení 400 mM NaCl nebola zaznamenaná žiadna klíčivosť (Obr. 20).

Počet vyklíčených semenáčikov línie 3C1 10 dosiahol v kontrolných podmienkach maximum 90 semenáčikov v čase 96 hodín od začiatku merania. Vplyvom NaCl došlo k výraznému poklesu počtu vyklíčených semenáčikov. Pri koncentrácii 150 mM NaCl bol počet vyklíčených semenáčikov 12 a pri 250 mM NaCl vyklíčili 2 semenáčky. Po pôsobení 400 mM NaCl nebola zaznamenaná žiadna klíčivosť (Obr. 21).



Obr. 20 Klíčivosť semien jarného jačmeňa odrody Golden Promise po ošetrení NaCl. Počet vyklíčených semien odrody Golden Promise vzhľadom na čas kultivácie. Kontrola – sterilná voda; 150 mM NaCl, 250 mM NaCl, 400 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl.

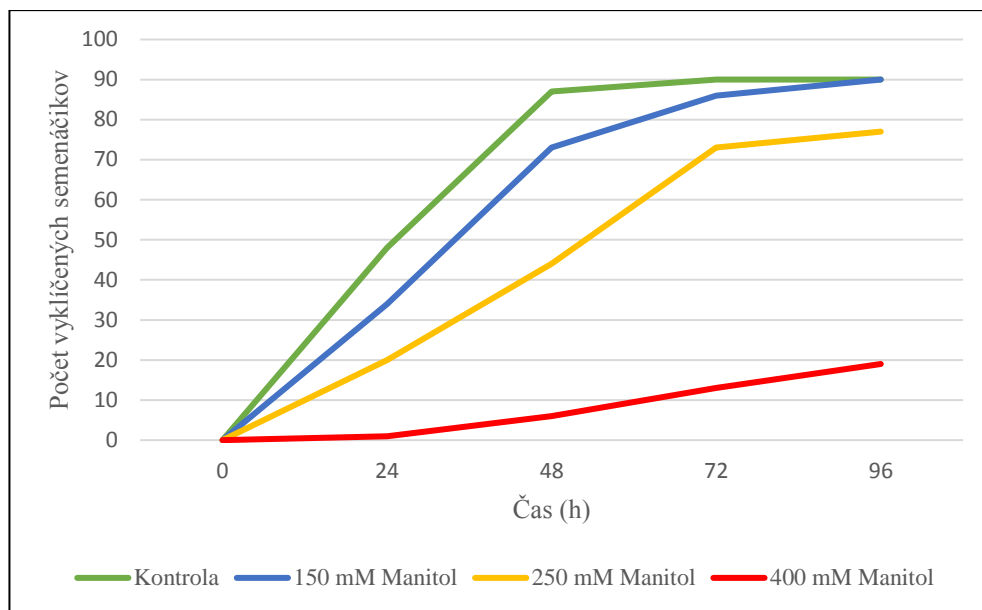


Obr. 21 Klíčivosť semien línie 3C1 10 po ošetrení NaCl.

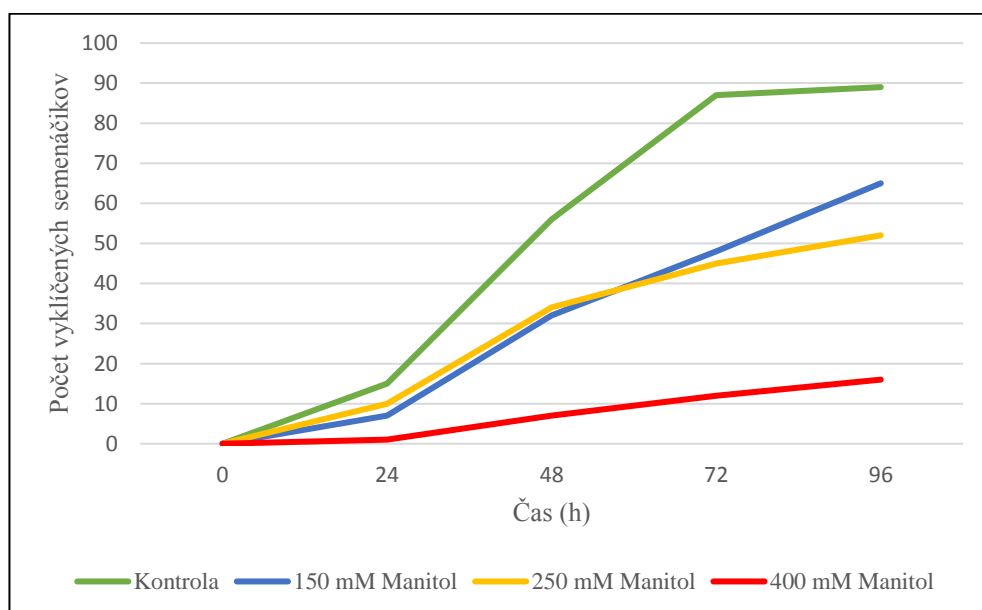
Počet vyklíčených semien transgénej homozygotnej línie 3C1 10 generácie T₂ vzhľadom na čas kultivácie. Kontrola - sterilná voda; 150 mM, 250 mM NaCl, 400 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl.

Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise sa znižoval s rastúcou koncentráciou manitolu. Pri koncentrácii 150 mM manitolu vyklíčilo všetkých 90 semien v čase 96 hodín od začiatku merania. V porovnaní s klíčením semien v kontrolných podmienkach bol pri 150 mM manitolu zaznamenaný časový posun 24 hodín. Pri koncentrácii 250 mM manitolu klesol počet vyklíčených semenáčikov na hodnotu 77 oproti kontrole. Počet vyklíčených semenáčikov pri 400 mM manitolu bol 19 (Obr. 22).

V prípade semien línie 3C1 10 bol zaznamenaný nižší počet vyklíčených semenáčikov s rastúcou koncentráciou manitolu. Pri koncentrácii 150 mM manitolu vyklíčilo 65 semenáčikov a pri 250 mM manitolu vyklíčilo 52 semenáčikov. Vplyvom 400 mM manitolu došlo k výraznému zníženiu klíčivosti semien až na výsledný počet 16 semenáčikov (Obr. 23).



Obr. 22 Klíčivosť semien jarného jačmeňa odrody Golden Promise po ošetrení manitolom. Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise vzhľadom na čas kultivácie. Kontrola – sterilná voda; 150 mM Manitol, 250 mM Manitol, 400 mM Manitol – použité koncentrácie manitolu.

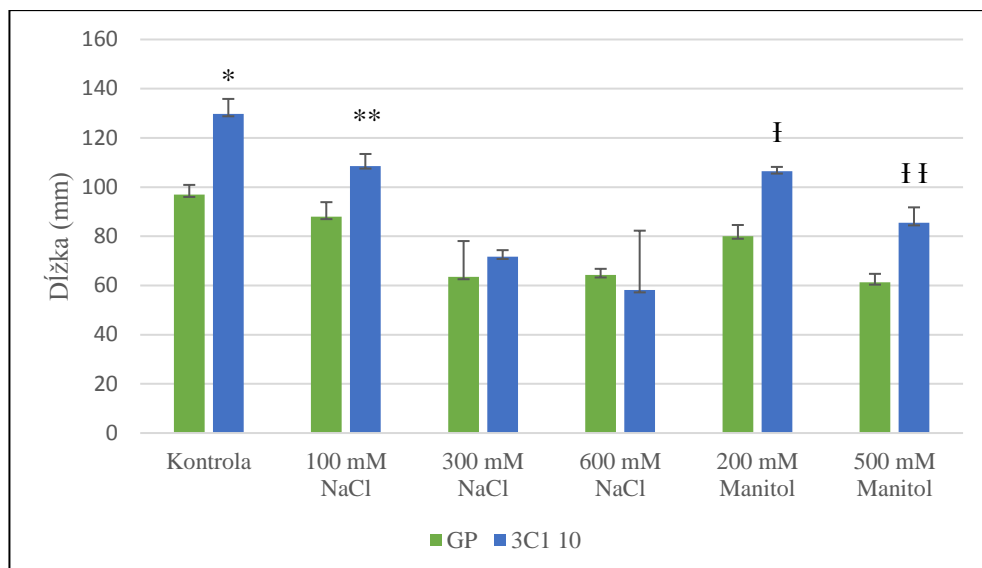


Obr. 23 Klíčivosť semien línie 3C1 10 po ošetrení manitolom. Počet vyklíčených semenáčikov transgéennej homozygotnej línie 3C1 10 generácie T₂ vzhľadom na čas kultivácie. Kontrola - sterilná voda; 150 mM Manitol, 250 mM Manitol, 400 mM Manitol – použité koncentrácie manitolu.

4.7 Vplyv NaCl a manitolu na dĺžku nadzemnej časti a koreňov rastlín

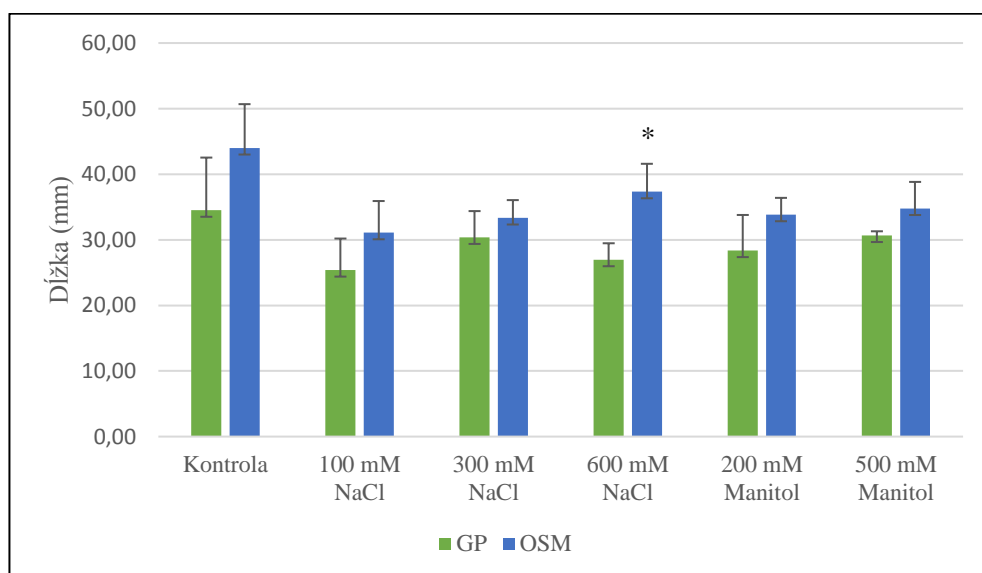
Bol analyzovaný vplyv rôznych koncentrácií NaCl a manitolu na vývoj a rast 5 dní starých rastlín línie 3C1 10 a odrody Golden Promise pestovaných v hydroponných podmienkach. Dĺžka nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise po kultivácii v $\frac{1}{2}$ MS médiu bola 97 mm. S rastúcou koncentráciou NaCl a manitolu došlo k zníženiu dĺžky nadzemnej časti rastlín. Najnižšie rastliny boli detegované v podmienkach s 500 mM manitolu, kedy bola dĺžka rastlín 61 mm. Rastliny línie 3C1 10 dosiahli po kultivácii v $\frac{1}{2}$ MS médiu dĺžku nadzemnej časti 130 mm. S rastúcou koncentráciou NaCl a manitolu sa ich dĺžka znižovala. Najnižšie rastliny boli namerané v podmienkach s 600 mM NaCl, kedy ich dĺžka bola 58 mm. Dĺžka nadzemnej časti rastlín línie 3C1 10 bola signifikantne vyššia v podmienkach s $\frac{1}{2}$ MS médiom, 100 mM NaCl, 200 mM a 500 mM manitolu oproti dĺžke nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise (Obr. 24).

Dĺžka koreňa rastlín odrody Golden Promise po kultivácii v $\frac{1}{2}$ MS médiu dosiahla 34,5 mm. V podmienkach so 100 mM NaCl bola dĺžka koreňa 25 mm, čo bola najnižšia hodnota. V stresových podmienkach s koncentraciami 300 mM NaCl, 600 mM NaCl, 200 mM manitolu a 500 mM manitolu sa dĺžka koreňa rastlín pohybovala v rozmedzí 27 – 30,5 mm, kedy nedošlo k výraznému nárastu ani poklesu dĺžky koreňa. Rastliny línie 3C1 10 po kultivácii v $\frac{1}{2}$ MS médiu dosiahli maximálnu dĺžku koreňa 44 mm. Minimálnu dĺžku koreňa 31 mm rastliny dosiahli v podmienkach so 100 mM NaCl. V podmienkach s koncentraciami 300 mM NaCl, 600 mM NaCl, 200 mM manitolu a 500 mM manitolu sa ich dĺžka koreňa pohybovala v rozmedzí 33–37 mm. Dĺžka koreňa rastlín línie 3C1 10 bola vo všetkých podmienkach kultivácie väčšia oproti koreňom rastlín odrody Golden Promise. Signifikantné navýšenie dĺžky koreňa rastlín línie 3C1 10 oproti koreňom kontrolných rastlín bolo detegované pri koncentrácii 600 mM NaCl (Obr. 25).



Obr. 24 Pôsobenie NaCl a manitolu na dĺžku nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Dĺžka nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej línie 3C1 10 generácie T₃DH₁ v rôznych kultivačných podmienkach. Kontrola – ½ MS médium; 100 mM NaCl, 300 mM NaCl, 600 mM NaCl – ½MS médium s obsahom NaCl; 200 mM Manitol, 500 mM Manitol – ½MS médium s obsahom manitolu., GP – odroda Golden Promise, 3C1 10 – transgéenna homozygotná línia; *, **, I, II – štatisticky významné výsledky vyhodnotené pomocou T-testu, p<0.05.



Obr. 25 Pôsobenie NaCl a manitolu na dĺžku koreňa rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Dĺžka koreňa rastlín odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej línie 3C1 10 generácie T₃DH₁ v rôznych kultivačných podmienkach. Kontrola - kontrolné podmienky bez indukcie stresu; 100 mM NaCl, 300 mM NaCl, 600 mM NaCl ½MS médium s obsahom NaCl; 200 mM Manitol, 500 mM Manitol – ½MS médium s obsahom manitolu, GP – odroda Golden Promise, 3C1 10 – transgéenna homozygotná línia, * - štatisticky významná hodnota vyhodnotená pomocou T-testu, p<0.05.

4.8 Test odolnosti rastlín voči *B. graminis* f. sp. hordei

Netransgénne rastliny jarného jačmeňa odrody Golden Promise a rastliny transgénnej homozygotnej línie 3C1 10 boli testované na odolnosť voči 54 rasám hubového patogénu *Blumeria graminis* f. sp. hordei. Rastliny odrody Golden Promise a línie 3C1 10 vykazovali rezistenciu voči jednej rase patogénu *B. graminis* f. sp. hordei. Za rezistenciu zodpovedá produkt génu *mlo8*, ktorý sa v jačmeni vyskytuje prirodzene. K zvyšným 53 rasám nebola zistená rezistencia u žiadnej z testovaných rastlín (Tab. 15).

Tab. 15 Výsledok testovania odolnosti rastlín voči patogénu *B. graminis* f. sp. hordei

Testovaná línia/ odroda	Počet prípadov odolnosti	Počet prípadov náchylnosti
Golden Promise	1*	53
3C1 10	1*	53

* Gén *mlo8*, ktorý sa nachádza v kontrolných aj transformovaných rastlinách a je zodpovedný za odolnosť voči konkrétnej rase patogénu *B. graminis* f. sp. hordei.

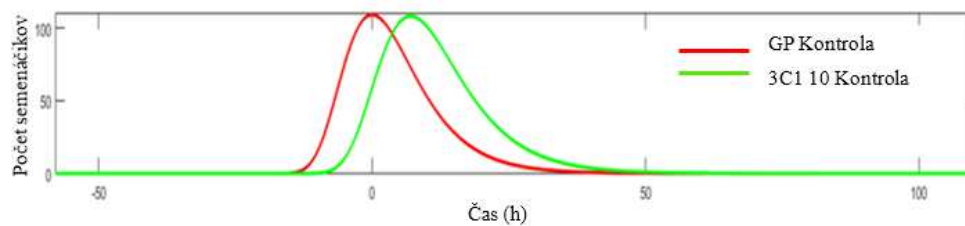
4.9 Vplyv NaCl a PEG na klíčenie rastlín

Vplyv NaCl a PEG na klíčenie netransgénnych rastlín odrody Golden Promise a transgénnych rastlín homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 bol testovaný v automatizovanej rastlinnej fenotypizačnej jednotke, ktorá je súčasťou Centra regiónu Haná pre biotechnologický a poľnohospodársky výskum.

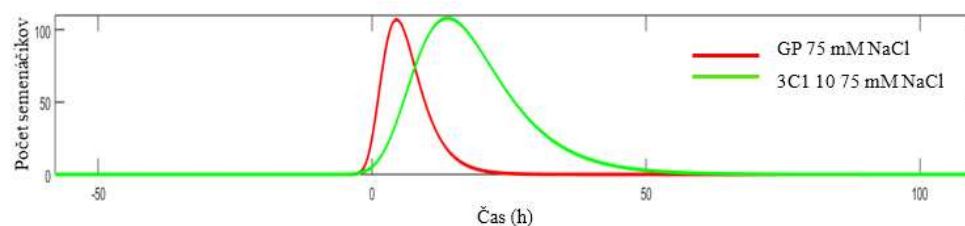
Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise testovaných v podmienkach bez stresu dosiahol hodnotu 108 semenáčikov. Po pôsobení 75 mM NaCl bol počet vyklíčených semenáčikov 107 a po pôsobení 150 mM NaCl bolo zaznamenaných 107 vyklíčených semenáčikov. Semená testované v prítomnosti 75 mM a 150 mM NaCl klíčili s vyššou synchronicitou oproti semenám testovaným v kontrolných podmienkach (Obr. 26, Obr. 27, Obr. 28). Po pôsobení 31% PEG bolo zaznamenaných 80 vyklíčených semenáčikov a došlo k zvýšeniu synchronicity klíčenia semenáčikov v porovnaní so semenáčikmi testovanými v kontrolných podmienkach (Obr. 29).

Po analýze semien línie 3C1 10 v kontrolných testovacích podmienkach bolo zaznamenaných 108 vyklíčených semenáčikov, po pôsobení 75 mM NaCl rovnako 108 semenáčikov a po pôsobení 150 mM NaCl bolo zaznamenaných 104 semenáčikov. Semená línie 3C1 10 klíčili s rovnakou synchronicitou v kontrolných testovacích podmienkach aj po pôsobení 75 mM a 150 mM NaCl (Obr. 26, Obr. 27, Obr. 28). Maximálna hodnota vyklíčených semenáčikov po pôsobení 31% PEG bola 54 semenáčikov a došlo k výraznému poklesu synchronicity klíčenia semien v porovnaní so semenami analyzovanými v kontrolných testovacích podmienkach (Obr. 29).

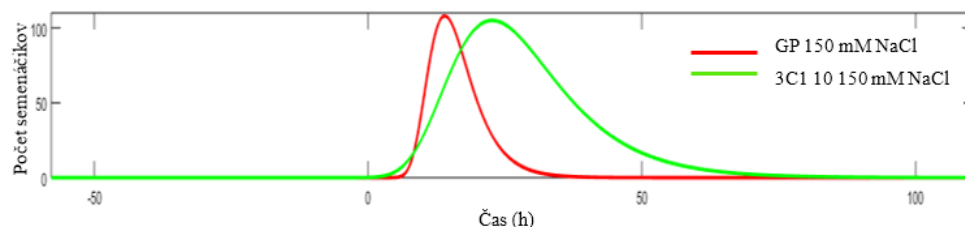
Nebol zaznamenaný výrazný rozdiel v počte vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise a línie 3C1 10 po testovaní v kontrolných podmienkach a v prítomnosti 75 mM a 150 mM NaCl. Synchronicita klíčenia semien línie 3C1 10 bola signifikantne nižšia v porovnaní so synchronicitou klíčenia semien odrody Golden Promise po pôsobení NaCl. Semená línie 3C1 10 klíčili s miernym časovým oneskorením v porovnaní so semenami odrody Golden Promise vo všetkých testovacích podmienkach.



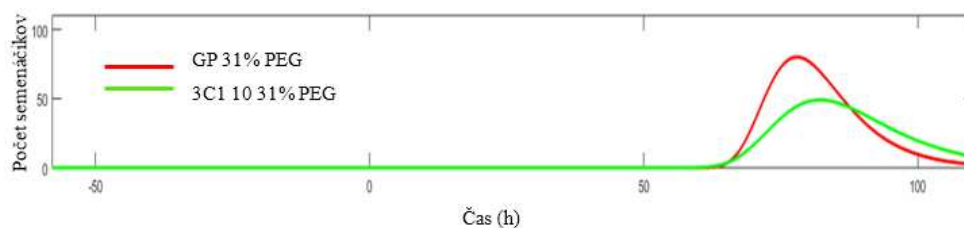
Obr. 26 Klíčivosť semien odrody Golden Promise a línie 3C1 10 v kontrolných podmienkach. Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise a transgénej homozygotnej línie 3C1 10, analyzovaných v kontrolných podmienkach, vzhľadom na čas kultivácie. GP – kontrolná línia rastlín odrody Golden Promise, 3C1 10 – transgéna homozygotná línia, Kontrola – kontrolné testovacie podmienky.



Obr. 27 Klíčivosť semien odrody Golden Promise a línie 3C1 10 v prítomnosti 75 mM NaCl. Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise a transgénej homozygotnej línie 3C1 10, analyzovaných v prítomnosti 75 mM NaCl, vzhľadom na čas kultivácie. GP – kontrolná línia rastlín odrody Golden Promise, 3C1 10 – transgéna homozygotná línia.



Obr. 28 Klíčivosť semien odrody Golden Promise a línie 3C1 10 v prítomnosti 150 mM NaCl. Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise a transgénej homozygotnej línie 3C1 10, analyzovaných v prítomnosti 150 mM NaCl, vzhľadom na čas kultivácie. GP – kontrolná línia rastlín odrody Golden Promise, 3C1 10 – transgéna homozygotná línia.



Obr. 29 Klíčivosť semien odrody Golden Promise a línie 3C1 10 v prítomnosti 31% PEG. Počet vyklíčených semenáčikov odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej línie 3C1 10, analyzovaných v prítomnosti 31% (w/v) PEG, vzhľadom na čas kultivácie. GP – kontrolná línia rastlín odrody Golden Promise, 3C1 10 – transgéenna homozygotná línia.

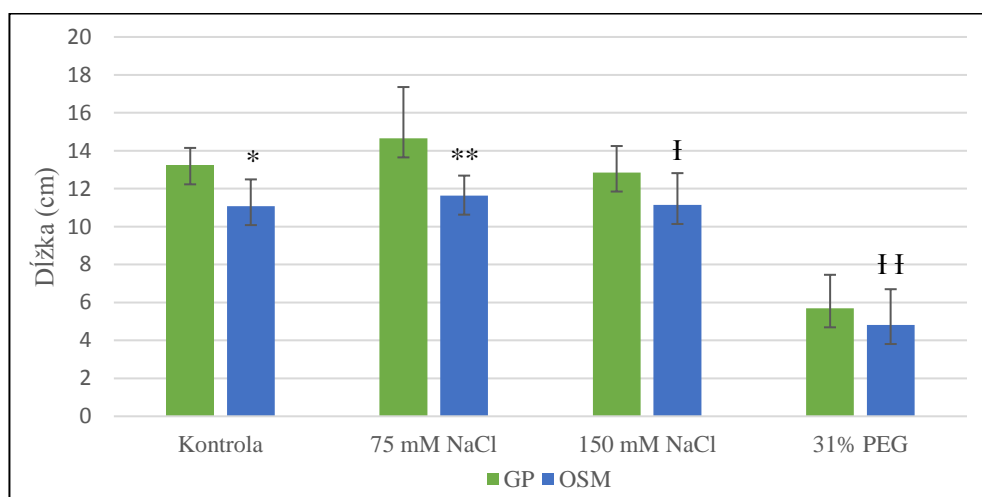
4.10 Vplyv NaCl a PEG na dĺžku a hmotnosť nadzemnej časti rastlín

Bola vyhodnotená dĺžka a hmotnosť nadzemnej časti netransgénnych rastlín odrody Golden Promise a transgéennej línie 3C1 10, ktoré boli testované vo fenotypizačnej komore. V kontrolných testovacích podmienkach bola dĺžka nadzemnej časti netransgénnych rastlín 13 cm. Dĺžka nadzemnej časti netransgénnych rastlín v prítomnosti 75 mM a 150 mM NaCl činila 14,6 cm a 12,8 cm. Pôsobením NaCl teda nedošlo k výraznému nárastu ani poklesu oproti dĺžke nadzemnej časti v kontrolných testovacích podmienkach. V prítomnosti 31% PEG došlo k výraznému zníženiu dĺžky nadzemnej časti na hodnotu 5,7 cm (Obr. 30).

Dĺžka nadzemnej časti rastlín transgéennej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 v kontrolných testovacích podmienkach činila 11 cm. V prítomnosti 75 mM a 150 mM NaCl bola dĺžka nadzemnej časti transgénnych rastlín 11,6 cm a 11,1 cm. Pôsobením NaCl nedošlo k výraznému nárastu ani poklesu oproti dĺžke nadzemnej časti v kontrolných testovacích podmienkach. V podmienkach s 31% PEG došlo k výraznému zníženiu dĺžky nadzemnej časti na hodnotu 4,8 cm. V kontrolných aj stresových podmienkach bola dĺžka nadzemnej časti rastlín línie 3C1 10 výrazne nižšia oproti kontrolným netransgénnym rastlinám odrody Golden Promise (Obr. 30).

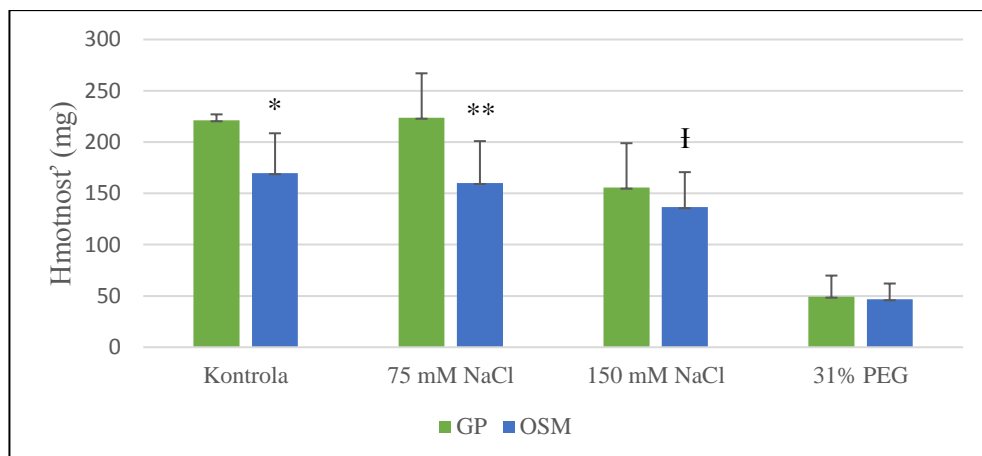
Hmotnosť nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise bola v kontrolných testovacích podmienkach 221 mg. Po pôsobení 75 mM NaCl bola hmotnosť nadzemnej časti 223 mg, nedošlo k výraznej zmene oproti hmotnosti rastlín testovaných v podmienkach bez stresu. V podmienkach s 150 mM NaCl došlo k poklesu hmotnosti na 155,5 mg, čo činí signifikantný pokles oproti hmotnosti rastlín v kontrolných testovacích podmienkach. Po pôsobení 31% PEG došlo k výraznému poklesu hmotnosti nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise na hodnotu 49 mg (Obr. 31).

Hmotnosť nadzemnej časti rastlín transgénej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 bola v kontrolných testovacích podmienkach 170 mg. Pôsobením 75 mM NaCl hmotnosť klesla na hodnotu 160 mg, tento pokles nebol vyhodnotený ako signifikantný oproti hmotnosti rastlín v kontrolných testovacích podmienkach. Hmotnosť rastlín kultivovaných s 150 mM NaCl bola 136,5 mg, teda signifikantne nižšia oproti hmotnosti rastlín v kontrolných testovacích podmienkach. Minimálnu hodnotu hmotnosti 47 mg mali rastliny testované v prítomnosti 31% PEG. V kontrolných testovacích podmienkach aj v prítomnosti 75 mM a 150 mM NaCl bola hmotnosť nadzemnej časti rastlín línie 3C1 10 signifikantne nižšia než hmotnosť kontrolných rastlín odrody Golden Promise (Obr. 31).



Obr. 30 Pôsobenie NaCl a PEG na dĺžku nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Dĺžka nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a transgénej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10, analyzovaných v rôznych kultivačných podmienkach, Kontrola – kontrolné testovacie podmienky; 75 mM NaCl, 150 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl; 31% (w/v) PEG – použitá koncentrácia PEG; GP – odroda Golden Promise, 3C1 10 – transgéna línia; *, **, I, II – štatisticky významné hodnoty vyhodnotených pomocou T-testu, $p < 0.05$.



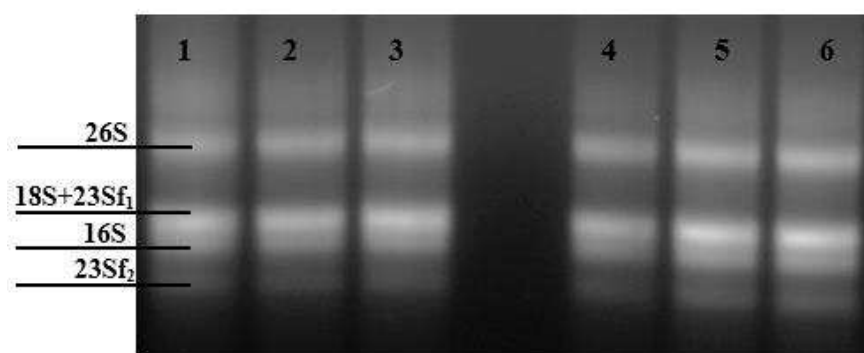
Obr. 31 Pôsobenie NaCl a PEG na hmotnosť nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Hmotnosť nadzemnej časti rastlín odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej línie 3C1 10, analyzovaných v rôznych kultivačných podmienkach, Kontrola – kontrolné testovacie podmienky; 75 mM NaCl, 150 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl; 31% (w/v) PEG – použitá koncentrácia PEG; GP – odroda Golden Promise, 3C1 10 – transgéenna línia; *, **, ^I – štatisticky významné hodnoty vyhodnotenú pomocou T-testu, $p < 0.05$.

4.11 Vplyv NaCl a PEG na expresiu génu *osm*

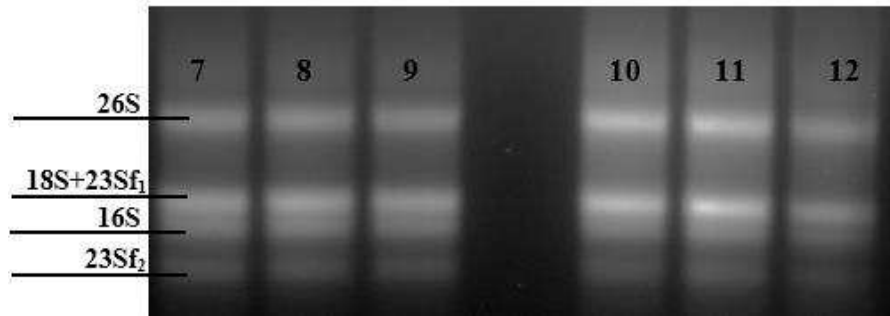
Z transgénnych rastlín homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 testovaných vo fenotypizačnej komore bola izolovaná RNA a vizualizovaná metódou agarózovej elektroforézy (Obr. 32, Obr. 33). 12 vzoriek RNA bolo prepísaných do cDNA. Metódou qRT-PCR bola analyzovaná expresia génu *efl* a *osm*. Na analýzu expresie bola vybraná jedna biologická vzorka z každého typu testovacích podmienok. Vzorky boli analyzované v troch technických opakovaníach (Obr. 34, Obr. 36). Analýzou teploty topenia produktov qRT-PCR reakcie génov *osm* a *efl*, že sa v qRT-PCR reakciách amplifikovali požadované produkty (Obr. 35, Obr. 37).

Expresia génu *osm* v kontrolných testovacích podmienkach bola stanovená na hodnotu 1. Pôsobením 75 mM NaCl sa expresia génu *osm* znížila na hodnotu 0,46 a vplyvom 150 mM NaCl na hodnotu 0,5 oproti expresii génu *osm* v kontrolných testovacích podmienkach. Po pôsobení 31% PEG došlo k poklesu relatívnej expresie génu *osm* na hodnotu 0,24 oproti relatívnej expresie génu *osm* v kontrolných testovacích podmienkach (Obr. 38).



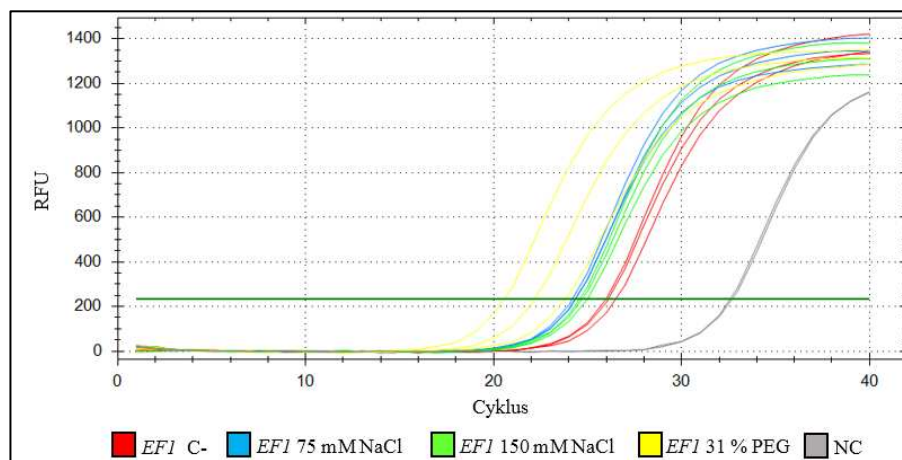
Obr. 32 Analýza RNA pomocou agarózovej elektroforézy.

1-3 – vzorky RNA rastlín kultivovaných v kontrolných podmienkach, 4-6 – vzorky rastlín kultivovaných v prítomnosti 75 mM NaCl; 26S a 18S – ribozomálna RNA z cytoplazmy; 23Sf₁, 23Sf₂ a 16S – ribozomálna RNA z chloroplastov.



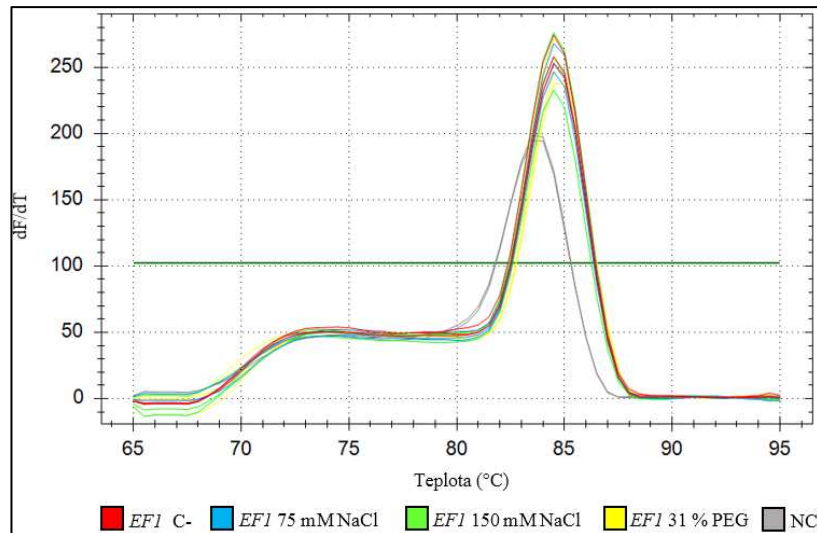
Obr. 33 Analýza RNA pomocou agarózovej elektroforézy.

7-9 – vzorky RNA rastlín kultivovaných v prítomnosti 150 mM NaCl, 10 – 12 vzorky rastlín kultivovaných v prítomnosti 31% PEG; 26S a 18S – ribozomálna RNA z cytoplazmy; 23Sf₁, 23Sf₂ a 16S - ribozomálna RNA z chloroplastov.



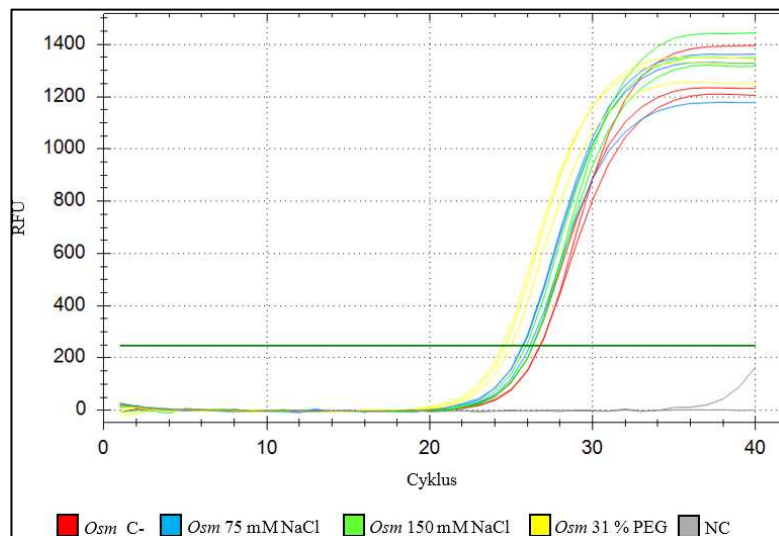
Obr. 34 qRT-PCR analýza génu *efl*.

Veľkosť relatívnej fluorescence vzoriek vzhľadom na počet cyklov RT-qPCR reakcie génu *efl*. EF1 C- – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v kontrolných podmienkach; EF1 75 mM NaCl, EF1 150 mM NaCl – vzorky cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 75 mM a 150 mM NaCl; EF1 31% PEG – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 31% (w/v) PEG; NC – voda.



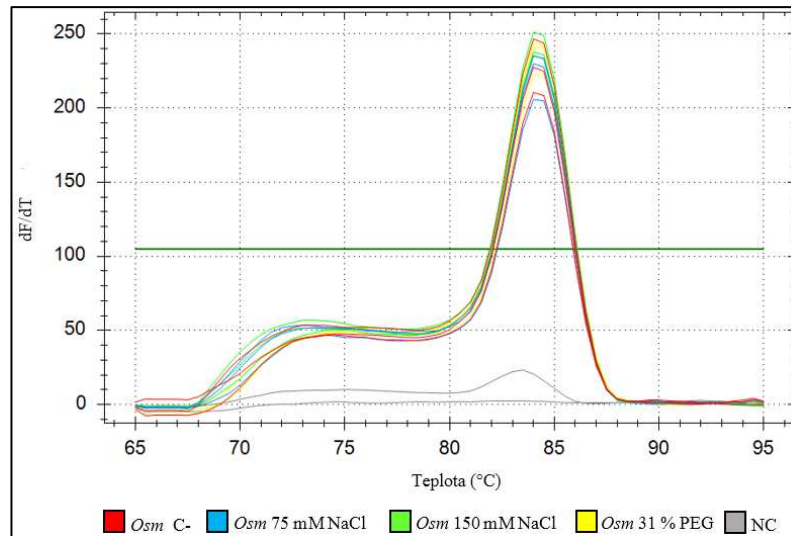
Obr. 35 Krivka teploty topenia po RT-qPCR reakcii génu *efl*.

Veľkosť zmeny fluorescence pri amplifikácii génu *efl* vzhľadom na zmenu teploty qRT-PCR reakcie. *Efl* C- – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v kontrolných podmienkach; *Efl* 75 mM NaCl, *Efl* 150 mM NaCl – vzorky cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 75 mM a 150 mM NaCl; *Efl* 31% PEG – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 31% (w/v) PEG; NC – voda.



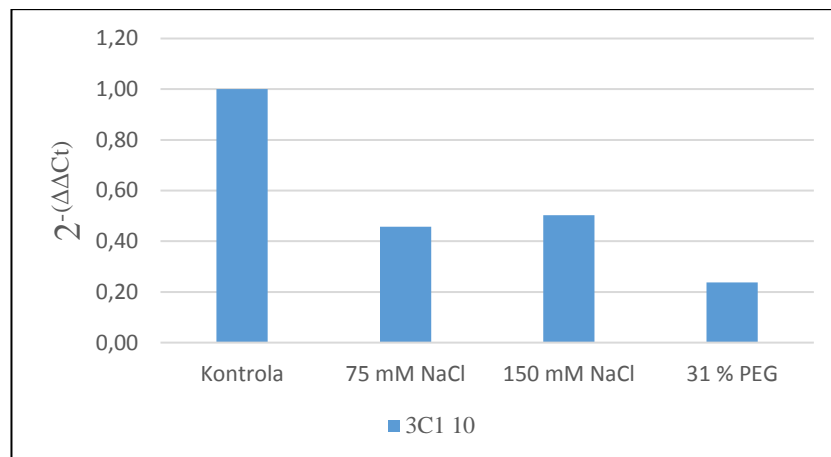
Obr. 36 Výsledok RT-qPCR reakcie génu *osm*.

Veľkosť relatívnej fluorescence vzoriek vzhľadom na počet cyklov RT-qPCR reakcie génu *osm*. *Osm* C- – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v kontrolných podmienkach; *Osm* 75 mM NaCl, *Osm* 150 mM NaCl – vzorky cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 75 mM a 150 mM NaCl; *Osm* 31% PEG – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 31% (w/v) PEG; NC – voda.



Obr. 37 Krivka teploty topenia po RT-qPCR reakcii génu *osm*.

Veľkosť zmeny fluorescence pri amplifikácii génu *osm* vzhľadom na zmenu teploty qRT-PCR reakcie. *Osm C-* – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v kontrolných podmienkach; *Osm 75 mM NaCl*, *Osm 150 mM NaCl* – vzorky cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 75 mM a 150 mM NaCl; *Osm 31% PEG* – vzorka cDNA transgénnych rastlín kultivovaných v podmienkach s 31% (w/v) PEG; NC – voda.



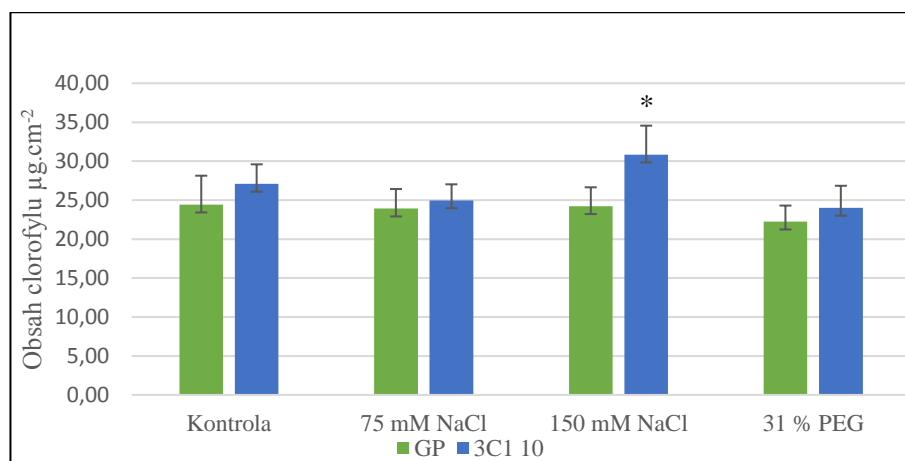
Obr. 38 Relatívna expresia génu *osm* v rôznych testovacích podmienkach.

Zmena expresie génu *osm* v transgénnych rastlinách línie 3C1 10 v rôznych podmienkach kultivácie, Kontrola – kontrolné podmienky; 75 mM NaCl, 150 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl; 31% PEG – použitá koncentrácia PEG; 2^{-(ΔΔCt)} – hodnota relatívnej expresie génu *osm*, 3C1 10 – transgénna homozygotná línia.

4.12 Vplyv NaCl a PEG na obsah chlorofylu

Listy netransgénnych rastlín odrody Golden Promise a transgénnych rastlín homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 testovaných vo fenotypyzačnej komore boli použité na analýzu obsahu chlorofylu. Obsah chlorofylu kontrolných rastlín v kontrolných testovacích podmienkach dosiahol hodnotu $24,4 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Po pôsobení 75 mM a 150 mM NaCl bol obsah chlorofylu v listoch kontrolných rastlín $24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $24,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, teda nedošlo k výraznej zmene oproti obsahu chlorofylu v kontrolných podmienkach. Po kultivácii kontrolných rastlín s 31% PEG obsah chlorofylu klesol na hodnotu $22,2 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Použité koncentrácie NaCl a PEG nespôsobili výraznú zmenu obsahu chlorofylu v listoch kontrolných rastlín (Obr. 39).

Obsah chlorofylu v listoch transgénnych rastlín línie 3C1 10 bol $27 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. V kultivačných podmienkach s 75 mM a 150 mM NaCl hodnota obsahu chlorofylu dosiahla $25 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ a $30,8 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Po pôsobení 31% PEG bol obsah chlorofylu v listoch transgénnych rastlín $24 \mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$. Vplyvom 150 mM NaCl došlo k výraznému zvýšeniu obsahu chlorofylu v listoch transgénnych rastlín v porovnaní s obsahom chlorofylu v rastlinách testovaných v kontrolných podmienkach. V podmienkach s 150 mM NaCl bol zaznamenaný štatisticky významný nárast obsahu chlorofylu v listoch transgénnych rastlín oproti obsahu chlorofylu kontrolných rastlín (Obr. 39).



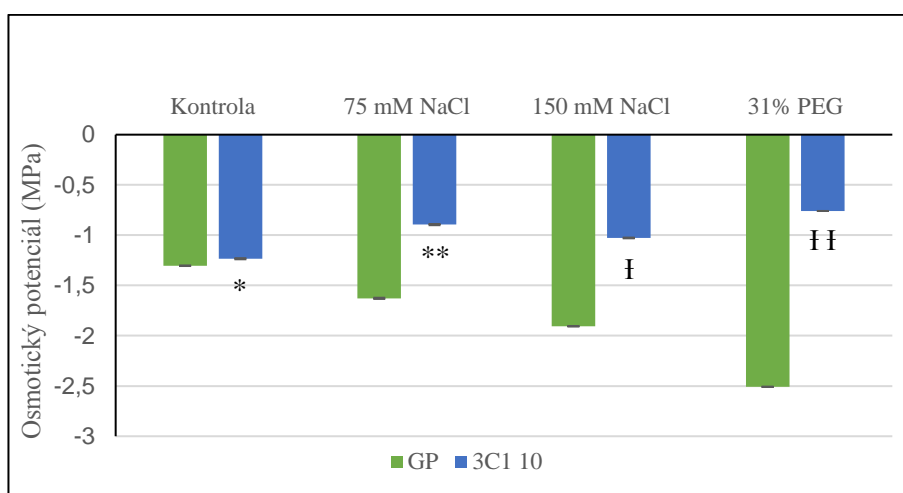
Obr. 39 Pôsobenie NaCl a PEG na obsah chlorofylu v listoch rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Obsah chlorofylu v rastlinách jarného jačmeňa odrody Golden Promise a v transgénnych rastlinách homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10. Kontrola – kontrolné testovacie podmienky; 75 mM NaCl, 150 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl; 31% (w/v) PEG – použitá koncentrácia PEG; 3C1 10 – transgénna homozygotná dihaploidná línia, * – štatisticky významná hodnota vyhodnotená pomocou T-testu, $p < 0,05$.

4.13 Vplyv NaCl a PEG na veľkosť osmotického potenciálu

Bol analyzovaný vplyv NaCl a PEG na veľkosť osmotického potenciálu v listoch netransgénnych rastlín odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10 testovaných vo fenotypizačnej komore. Hodnota osmotického potenciálu v listoch kontrolných rastlín v kontrolných testovacích podmienkach bola -1,3 MPa. V stresových podmienkach sa osmotický potenciál kontrolných rastlín znižoval. Pôsobením 75 mM a 150 mM NaCl klesol osmotický potenciál kontrolných rastlín na hodnotu -1,6 MPa a -1,9 MPa. Najnižšia hodnota osmotického potenciálu -2,5 MPa v listoch kontrolných rastlín bola detegovaná po pôsobení 31% PEG (Obr. 40).

Transgéenne rastliny línie 3C1 10 mali v kontrolných testovacích podmienkach osmotický potenciál -1,2 MPa. Vplyvom 75 mM a 150 mM NaCl sa ich osmotický potenciál zvýšil na hodnoty -0,9 MPa a -1 MPa. Najvyšší osmotický potenciál -0,7 MPa dosiahli transgéenne rastliny v kultivačných podmienkach s 31% PEG. V kontrolných aj stresových podmienkach bol zistený signifikantne vyšší osmotický potenciál v listoch transgénnych rastlín oproti osmotickému potenciálu v listoch kontrolných rastlín (Obr. 40).



Obr. 40 Vplyv NaCl a PEG na veľkosť osmotického potenciálu v listoch rastlín odrody Golden Promise a línie 3C1 10.

Veľkosť osmotického potenciálu v listoch rastlín odrody Golden Promise a transgéennej homozygotnej línie 3C1 10 v rôznych testovacích podmienkach. Kontrola – kontrolné testovacie podmienky; 75 mM NaCl, 150 mM NaCl – použité koncentrácie NaCl; 31 % PEG – použitá koncentrácia PEG; GP – odroda Golden Promise, 3C1 10 – transgéenna homozygotná línia; *, **, †, †† – štatisticky významné hodnoty vyhodnotené pomocou T-testu, $p < 0,05$.

5 DISKUSIA

Rastliny si vytvorili obranné mechanizmy aby sa vysporiadali so stresovými podmienkami prostredia. Proteín osmotin patrí do skupiny s patogenézou-súvisiacich (PR) proteínov, do rodiny PR-5, ktoré rastliny produkujú v rámci odpovede na biotický a abiotický stres (Hakim et al., 2018). Osmotin je využívaným génom pri vývoji transgénnych plodín odolných voči hubovým patogénom a osmotickému stresu (George et al., 2017). Transformácia a nadexpresia génu osmotin a osmotin-like génov bola študovaná v niekoľkých druhoch rastlín a týmto spôsobom boli získané mnohé transgénne rastliny tolerantné voči suchu, vysokej koncentrácii soli, chladu a chorobám, ako napríklad transgénne rastliny tabaku (Barthakur et al., 2001), jahôd (Zhang a Shih, 2007), bavlníku (Parkhi et al., 2009), rajčiaku (Goel et al., 2010) a mrkvy (Annon et al., 2014).

V diplomovej práci boli získané transgénne rastliny jarného jačmeňa T₁ generácie s nadexpresiou génu osmotin. Metódou androgenézy boli získané haploidné a dihaploidné transgénne rastliny a z nich boli odvodené transgénne homozygotné dihaploidné rastliny.

Skúmaním vplyvu NaCl na klíčenie transgénnych homozygotných dihaploidných rastlín a netransgénnych kontrolných rastlín jarného jačmeňa testovaných na filtračnom papieri v Petriho miske bolo zistené, že transgénne rastliny klíčili s časovým oneskorením a vykazovali nižšiu klíčivosť oproti kontrolným rastlinám. V koncentrácii 250 mM a 400 mM NaCl bola klíčivosť transgénnych a netransgénnych rastlín veľmi nízka až nulová.

Test klíčivosti bol znova testovaný v substráte s obsahom 75 mM a 150 mM NaCl. V týchto podmienkach semená transgénnych aj netransgénnych rastlín vykazovali výbornú klíčivosť. Husaini a Abdin (2008) naopak dokázali, že nadexpresia génu osmotin v rastlinách jahody zvýšila schopnosť klíčenia semien na ½MS médiu s obsahom 150 mM NaCl počas pôsobenia soľného stresu. Pre potvrdenie hypotézy, že proteín osmotin je zodpovedný za lepšiu klíčivosť semien transgénnych rastlín počas soľného stresu je potrebné vykonať ďalšie experimenty klíčivosti semien v substráte s vyššími koncentraciami NaCl.

Testovaním pôsobenia soľného stresu na rast transgénnych a netransgénnych rastlín jarného jačmeňa v hydroponných podmienkach bolo zistené, že s rastúcou koncentraciou NaCl klesala dĺžka nadzemnej časti transgénnych aj netransgénnych rastlín. Vo vyšších

koncentráciách 300 mM a 600 mM NaCl bola ich dĺžka nadzemnej časti rovnaká a zároveň výrazne nižšia oproti dĺžke testovaných rastlín v bezstresových podmienkach. Použité koncentrácie 300 mM a 600 mM NaCl boli zjavne príliš vysoké.

Dĺžka koreňa transgénnych rastlín testovaných v hydroponných podmienkach v prítomnosti 100 mM, 300 mM a 600 mM NaCl bola vo všetkých podmienkach kultivácie väčšia oproti koreňom rastlín odrody Golden Promise. Sadat Noori a Sokhansanj (2008) publikovali, že transgénna pšenica s nadexpresiou génu osmotin bola schopná produkovať dlhšie korene pri koncentrácii 250 mM NaCl oproti kontrolným rastlinám.

Semená transgénnych a netransgénnych rastlín, ktoré klíčili na filtračnom papieri v Petriho miskách v prítomnosti manitolu boli schopné klíčiť pri koncentráciách 150 mM a 250 mM manitolu. Manitol je cukorný alkohol, ktorý zvyšuje klíčivosť semien. Túto skutočnosť potvrdili Cokkizgin et al. (2019), ktorí prídavkom 1% manitolu do média zvýšili klíčivosť semien fazule. Vo vysokých koncentráciách manitol spôsobuje osmotický stres, preto sa klíčivosť testovaných rastlín so zvyšujúcou koncentraciou manitolu znižovala.

Po pôsobení 200 mM a 500 mM manitolu v hydroponných podmienkach bola zaznamenaná nižšia dĺžka nadzemnej časti transgénnych aj netransgénnych rastlín oproti dĺžke rastlín v kontrolných podmienkach bez manitolu. Avšak, dĺžka nadzemnej časti transgénnych rastlín bola signifikantne väčšia v porovnaní s dĺžkou nadzemnej časti netransgénnych rastlín testovaných v prítomnosti manitolu.

Transgénne rastliny s nadexpresiou génu osmotin, ktoré boli testované vo fenotypizačnej komore a vystavené pôsobeniu 75 mM a 150 mM NaCl mali signifikantne nižšiu dĺžku nadzemnej časti v porovnaní s dĺžkou netransgénnych rastlín. Nižšiu dĺžku mali transgénne rastliny aj v kontrolných podmienkach bez pôsobenia soľného stresu. Dĺžka nadzemnej časti transgénnych aj netransgénnych rastlín jarného jačmeňa bola rovnaká v kontrolných aj stresových podmienkach. Podobné výsledky priniesla štúdia, kedy transgénne rastliny jahôd s nadexpresiou génu osmotin mali v bezstresových podmienkach viditeľne kratšie stonky oproti kontrolným netransgénnym rastlinám. (Husaini a Abdin., 2008).

Tavakkoli et al. (2010) vo svojej štúdií porovnávali vplyv NaCl na vývoj rastlín jačmeňa odrody náchylnej a odrody tolerantnej na soľný stres v hydroponných podmienkach a v substráte. V hydroponných podmienkach v prítomnosti NaCl sa dĺžka

nadzemnej časti rastlín znižovala s rastúcou koncentráciou NaCl ale nelíšila sa medzi testovanými odrodami. V substráte s NaCl sa dĺžka rastlín znižovala s rastúcou koncentráciou NaCl a líšila sa aj medzi odrodami. Rastliny náchylné na soľný stres boli nižšieho vzrastu. Testovanie tolerancie voči soľnému stresu v hydroponných podmienkach sa nepreukázalo ako vhodná metóda. Preto sú výsledky testovania vplyvu NaCl na jarný jačmeň v substráte relevantnejšie.

Barthakur et al. (2001) vo svojej práci dokázali, že nadexpresia génu osmotin súvisí so zvýšením obsahu chlorofylu v transgénnych rastlinách tabaku, ktoré boli vystavené pôsobeniu 200 mM NaCl. Súvislosť medzi nadexpresiou génu osmotin a zvýšeným obsahom chlorofylu potvrdili aj Subramanyam et al. (2012), ktorí vo svojej štúdií transformovali rastliny čili papriky. Obsah chlorofylu v transgénnych homozygotných dihaploidných rastlinách a netransgénnych rastlinách jarného jačmeňa, testovaných v prítomnosti NaCl a PEG sa nemenil pôsobením stresových faktorov. Pri koncentrácii 150 mM NaCl došlo k signifikantnému zvýšeniu obsahu chlorofylu v transgénnych rastlinách v porovnaní s obsahom chlorofylu v netransgénnych rastlinách.

Proteín osmotin je zahrnutý do formovania rastlinnej odpovede na biotický a abiotický stres, kedy pôsobí ako regulátor transkripcie génov kódujúcich kľúčové enzýmy, alebo je využívaný ako signálna molekula a interaguje pomocou intracelulárnych receptorov (Abdin et al., 2011). Osmotin môže byť tiež zahrnutý do bunkovej osmotickej regulácie. Funkciou proteínu osmotin v tomto procese je akumulácia alebo kompartmentalizácia rozpustných látok (Goel et al., 2010). Zvýšená akumulácia osmolytov v rastlinných bunkách súvisí so zvýšenou toleranciou rastlín k osmotickému stresu (Szabados et al., 2011). V rámci experimentu diplomovej práce bola analyzovaná veľkosť osmotického potenciálu v transgénnych homozygotných dihaploidných rastlinách a netransgénnych rastlinách po pôsobení NaCl a PEG. Množstvo osmolytických látok v trasgénnych rastlinách sa znižovalo s rastúcimi koncentraciami NaCl a v prítomnosti PEG. V netransgénnych rastlinách došlo k nárastu osmolytov so zvyšujúcou sa koncentráciou NaCl a v prítomnosti PEG. Nadexpresiou génu osmotin nedošlo k zvýšenej akumulácii osmotických látok v transgénnych rastlinách.

Expresia génu osmotin v transgénnych dihaploidných rastlinách jarného jačmeňa bola niekoľkonásobne vyššia ako v pôvodných transgénnych rastlinách T₀ generácie. Vzhľadom na nižší vzrast a nižšiu hmotnosť transgénnych dihaploidných rastlín v porovnaní s netransgénnymi rastlinami jarného jačmeňa, možno predpokladať, že došlo

k čiastočnému potlačeniu expresie transgénu z dôvodu nadmernej metabolickej záťaže pre rastlinný organizmus. Transgén je najčastejšie umlčaný dvoma spôsobmi a to na úrovni transkripcie, kedy je proces umlčovania génov asociovaný s metyláciou promótorovej oblasti, čím dochádza k blokácii transkripcie génu. Druhým najčastejším spôsobom umlčovania transgénu je post-transkripčný proces, kedy dochádza k degradácii mRNA v cytoplazme buniek (Rajeevkumar et al., 2015).

S rastúcou koncentráciou NaCl a v prítomnosti PEG bola detegovaná znižujúca sa expresia transgénu v transgénnych homozygotných dihaploidných rastlinách. Tieto výsledky korelujú so znižujúcim sa obsahom osmolytických látok v transgénnych rastlinách analyzovaných v rovnakých stresových podmienkach.

V žiadnej štúdií neboli na testovanie odolnosti voči suchu a soľnému stresu použité homozygotné dihaploidné rastliny s nadexpresiou génu osmotin. Predpokladá sa, že nadexpresia transgénu bola aj po čiastočnom umlčaní jeho expresie v transgénnych dihaploidných homozygotných rastlinách príliš vysoká. Transgénne rastliny neboli schopné vysporiadať sa s vysokou expresiou génu osmotin a následne ani s abiotickým stresom. Na druhej strane netransgénne rastliny jarného jačmeňa odrody Golden Promise sa dokázali čiastočne vyrovnáť s nižšími koncentraciami NaCl. Je známe, že odroda Golden Promise je tolerantná voči soľnému stresu (Forster, 2002).

Rastliny tabaku s konštitutívne exprimovaným génom osmotin vykazovali rezistenciu voči niekoľkým hubovým patogénom vrátane *Neurospora crassa*, *Trichoderma reesei*, *Candida albicans* (Subramanyam et al., 2012), *Rhizoctonia solani* (Parkhi et al., 2009), *Colleotrichum dematium*, *Colleotrichum gloeosporioides*, *Fusarium pallidoroseum* (Das et al., 2011). *Phytophthora infestans* (Liu et al., 1994), *Fusarium solani* (de Freitas et al., 2011), *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia methanolica* a *Cryptococcus neoformans* (Tzou et al., 2011). Testovaním rezistencie transgénnych homozygotných dihaploidných rastlín jarného jačmeňa voči hubovému patogénu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* nebola preukázaná rezistencia voči danému patogénu.

6 ZÁVER

V teoretickej časti diplomovej práce bola vypracovaná literárna rešerš na tému jačmeň, rastlinný stres a PR proteíny.

V rámci praktickej časti diplomovej práce boli selektované rastliny jarného jačmeňa T₁ generácie, odrody Golden Promise, s nadexpresiou génu osmotin. Pomocou androgenézy boli kultiváciou peľníc získané haploidné a dihaploidné transgénne rastliny. V transgénnej rastline T₀ generácie, transgénnych haploidných a dihaploidných rastlinách bola potvrdená expresia génu osm a analyzovaná miera expresie génu osm. Z dihaploidných transgénnych rastlín bola získaná transgénna dihaploidná homozygotná línia 3C1 10, generácie T₂DH₁.

Transgénne homozygotné dihaploidne rastliny a netransgénne rastliny jarného jačmeňa inkubované s 54 rasami hubového patogénu *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* vykazovali rezistenciu voči jednej rase vďaka prítomnosti génu mlo8, ktorý je zodpovedný za rezistenciu voči danej rase patogénu v rastlinách jarného jačmeňa. K zvyšným 53 rasám patogénu nebola potvrdená rezistencia transgénnych rastlín.

V transgénnych homozygotných dihaploidných rastlinách testovaných v prítomnosti NaCl bola stanovená relatívna expresia génu osmotin.

Bol testovaný vplyv NaCl, manitolu a PEG na klíčenie a vývoj rastlín kontrolných rastlín odrody Golden Promise bez obsahu génu osm a rastlín transgénnej homozygotnej dihaploidnej línie 3C1 10. Zo získaných výsledkov testovania vplyvu abiotického stresu na transgénne a netransgénne rastliny nemožno potvrdiť spojitosť medzi nadexpresiou génu osmotin a zvýšenou toleranciou. Aby sa úplne vylúčila alebo naopak potvrdila tolerancia transgénnych rastlín voči abiotickému stresu je potrebné zopakovať testy s vyššími koncentraciami NaCl a nižšími koncentraciami PEG v substráte.

Časť výsledkov diplomovej práce je súčasťou vedeckej publikácie a tiež bola prezentovaná na medzinárodnej konferencii:

Vedecká publikácia prijatá do tlače 30.4.2019

Viktorova J., **Klcova B.**, Rehorova K., Vlcko T., Stankova L., Jelenova N., Cejnar P., Kumar J.K., Ohnoutkova L., Macek T. (2019): Recombinant expression of osmotin in barley improves stress resistance and food safety during adverse growing conditions. PLOS ONE. PONE-D-19-03718R2, (abstrakt viz. príloha).

<https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/02/11/546721.full.pdf>

Poster v anglickom jazyku

Klcova B., Ohnoutkova L., Vlcko1 T., Viktorova J., Rehorova K., Macek T. (2017): Transformation of spring barley with Osmotin protein exhibiting protective features against biotic and abiotic stress. Plant Biotechnology: Green For Good IV; Olomouc Czech Republic, June 19-22. Book of abstract P30, 103. In English (viz. príloha).

7 LITERATÚRA

- Abdin M. Z., Kiran U., Alam A. (2011): Analysis of osmotin, a PR protein as metabolic modulator in plants. *Bioinformation*, **5**, 336-340.
- Abogadallah G. M. (2010): Antioxidative defense under salt stress. *Plant signal behavior*, **5**:369-374.
- Agrios G. N. (2005): Parasitism and disease development. In: *Plant pathology*, 5th ed., Elsevier, United Kingdom, 3-76.
- Annon A., Rathore K., Kevin C. (2014): Overexpression of a tobacco osmotin gene in carrot (*Daucus carota* L.) enhances drought tolerance. *In vitro cellular and developmental biology of plant*, **50**, 299-306.
- Barthakur S., Babu V., Bansal K. C. (2001): Over-expression of osmotin induces proline accumulation and confers tolerance to osmotic stress in transgenic tobacco. *Journal of plant biochemistry and biotechnology*, **10**, 31-37.
- Bartlett J.G., Alves S. C., Smedley M., Snape J. W., Harwood W. A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *BMC Plant Methods*, **4**:22. <https://plantmethods.biomedcentral.com/articles/10.1186/1746-4811-4-22>.
- Bartels D., Salamini F. (2001): Desiccation tolerance in the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. A contribution to the study of drought tolerance at the molecular level. *Journal of Plant physiology*, **127**, 1346–1353.
- Bartels D., Schneider K., Terstappen G., Piatkowski D., Salamini, F. (1990): Molecular cloning of abscisic acid-modulated genes which are induced during desiccation of the resurrection plant *Craterostigma plantagineum*. *Planta*, **181**, 27–34.
- Both M., Spanu P. D. (2004): *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*, an obligate pathogen of barley. *Annual plant reviews*, **11**, 202-218.
- Boudsocq M., Laurière C. (2005): Osmotic signaling in plants – multiple pathways mediated by emerging kinase families. *Plant physiology*, **140**, 103-125.
- Boudsocq M., Sheen J. (2013): CDPKs in immune and stress signaling. *Trends in plant science*, **18**, 30-40.
- Bouman B. A. M., Peng S., Castaõeda A. R., Visperas R.M. (2005): Yield and water use of irrigated tropical aerobic rice systems. *Agricultural water management*, **74**, 87-105.
- Braun U., Cook R. T. A., Inman A. J., Shin H. D. (2002): The taxonomy of the powdery mildew fungi. In: *The powdery mildews: A comprehensive treatise*, (Bélanger R. R., Bushnell W. R., Dik A. J., Carver T. L. W., eds.), APS press, Saint Paul, Minnesota, 13-55.
- Buchanan B. B., Gruissem W., Jones, R. L. (2000): *Biochemistry & Molecular Biology of Plants*, Vol. 40. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland, 1367 strán.
- Bulgarelli D, Biselli C, Collins N C, Consonni G, Stanca A M, Schulze-Lefert P, Valè G. (2010): The CC-NB-LRR-type Rdg2a resistance gene confers immunity to the seed-borne barley leaf stripe pathogen in the absence of hypersensitive cell death. *Plos one*, **5**: 12599. <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0012599>.
- Burton R. A., Collins H. M., Kibble N. A. J., Smith J. A., Shirley N. J., Jobling S. A., Henderson M., Singh R. R., Pettolino F., Wilson S. M., Bird A. R., Topping D. L., Bacic A., Fincher G. B. (2011) Over-expression of specific HvCslF cellulose synthase-like genes in transgenic barley increases the levels of cell wall (1,3; 1,4)-β-d-glucans and alters their fine structure. *Plant biotechnology journal*, **9**, 117-135.
- Carciofi M., Blennow A., Jensen S., Shaik S., Henriksen A., Buleon A., Holm P., Hebelstrup K. (2012): Concerted suppression of all starch branching enzyme genes in barley produces amylose-only starch granules. *BMC Plant biology*, **12**, 223.
- Chaves M. M., Flexas J., Pinheiro C. (2009): Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. *Annals of botany*, **103**, 551-560
- Cokkizgin A., Girgel U., Cokkizgin H. (2019): Manitol (C₆H₁₄O₆) effects on germination of broad bean (*Vicia faba* L.) seeds, *Forestry research and engineering*, **3**, 20-22.
- Consonni C., Humphry M. E., Hartmann H. A., Livaja M., Durner J., Westphal L., Vogel J., Lipka V., Kemmerling B., Schulze-Lefert P., Somerville S. C., Panstruga R. (2006): Conserved

- requirement for a plant host cell protein in powdery mildew pathogenesis. *Nature genetics*, **38**, 716-720.
- Dai A. (2011): Drought under global warming: a review. *Wiley interdisciplinary reviews: Climate change*, **2**, 45-65.
- Das M., Chauhan H., Chhibbar A., Haq Q. M. R., Khurana P. (2011): High-efficiency transformation and selective tolerance against biotic and abiotic stress in mulberry, *Morus indica* cv. K2, by constitutive and inducible expression of tobacco osmotin, *Transgenic research*, **20**, 231-246.
- Daszkowska-Golec A., Skubacz A., Kurowska M., Słota M., Swiergolik D., Szarejko I. (2018): Methods for the simple and reliable assessment of barley sensitivity to abiotic stresses during early development. In: *Barley: Methods and protocols*, (Harwood W. A., eds.), Springer, New York, U.S.A., 127-152.
- Dean R., Van Kan J. A. L., Pretorius Z. A., Hammond-Kosack K. E., Di Petro A., Spanu P. D., Rudd J. J., Dickman M., Kahmann R., Ellis J., Foster G. D. (2012): The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, **13**, 414-430.
- de Freitas C. D. T., Nogueira F. C. S., Vasconcelos I. M., Oliveira J. T. A., Domont G. B., Ramos M. V. (2011): Osmotin purified from the latex of *Calotropis procera*: biochemical characterisation, biological activity and role in plant defence, *Plant physiology and biochemistry*, **49**, 738-743.
- Dickinson M. (2003): The fundamentals of plant pathology, In: *Molecular plant pathology*, Taylor and Francis group, London, United Kingdom, 1-31.
- Dolezel J., Göhde W. (1995): Sex determination in dioecious plants *Melandrium album* and *M. rubrum* using high-resolution flow cytometry, *Cytometry*, **19**, 103-106.
- Dzhavakhiya V. G., Ozeretskovskaya O. L., Zinovyeva S. V. (2007): Immune response. In: *Comprehensive and molecular phytopathology*, 1st ed., (Dyakov Y., Dzhavakhiya V. G., Korpela T., eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 265-314.
- Edmeades G.O. (2008): Drought tolerance in maize: an emerging reality. Companion document to Executive Summary. In: *Global status of commercialized biotech/GM crops*, (James, C., ed.), ISAAA, Ithaca, New York, 12 strán.
- Edwards H. H. (2002): Development of primary germ tubes by conidia of *Blumeria graminis* f.sp. *hordei* on leaf epidermal cells of *Hordeum vulgare*, *Canadian journal of botany*, **80**, 1121-1125.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic acids research*, **19**, 1349.
- Eichmann R., Bischof M., Weis C., Shaw J., Lacomme C., Schweizer P., Duchkov D., Hensel G. Kumlehn J., Hückelhoven R. (2010): BAX INHIBITOR-1 is required for full susceptibility of barley to powdery mildew. *Molecular plant-microbe interactions*, **23**, 1217-1227.
- Evers D., Overney S., Simon P., Greppim H., Hausman J. F. (1999): Salt tolerance of *Solanum tuberosum* L. overexpressing an heterologous osmotin-like protein. *Biology of plant*, **42**, 105-112.
- Fatima M., Zaynab M., Sharif Y., Abbas S., Zaffar M. H., Saleem T. (2018): Recent advances in plant biotechnology and genetic engineering: Applications in agriculture. *International journal of molecular microbiology*, **1**, 40-43.
- Forster B. P. (2002): Mutation genetics of salt tolerance in barley: an assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants. In: *Mutations, in vitro and molecular techniques for environmentally sustainable crop improvement*, 1st edition, (Maluszynski M., Kasha K. J., eds.), Springer science + Business media, Berlin, Germany, 1-16.
- Garcion C., Lamotte O., Metraux J. P. (2007): Mechanism of defence to pathogens: Biochemistry and physiology. In: *Induced resistance for plant defence: a sustainable approach to crop protection*. (Walters D., Newton A., Lyon G., eds.), John Wiley and Sons Ltd, United States, 106-136.
- George K. J., Malik N., Kumar I. P. V., Krishnamurthy K. S. (2017): Gene expression analysis in drought tolerant and susceptible black pepper (*Piper nigrum* L.) in response to water deficit stress. *Acta physiologiae plantarum*, **39**: 104. <https://doi.org/10.1007/s11738-017-2398-5>.

- Gimenez C., Gallardo M., Thompson R.B. (2005): Plant water relations. In: Encyclopedia of Soils in the Environment. (Hillel D, ed.), Elsevier, Oxford, 231–238.
- Goel D., Singh A. K., Zadav V., Babbar S. B., Bansal K. C. (2010): Overexpression of osmotin gene confers tolerance to salt and drought stresses in transgenic tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Protoplasma*, **245**, 133-141.
- Goldstein C. S., Kronstad W. E. (1986): Tissue culture and plant regeneration from imatures embryo explants of barley, *Hordeum vulgare*. *Theoretical and applied genetics* **71**, 631-636.
- Graner A., Kilian A., Kleinhofs A. (2011): Barley genome organisation, mapping and sytenhy. In: *Barley: Production, improvement and uses*, (Ullrich S. E., ed.), Willey-Blackwell, Oxford, United Kingdom, 3-13.
- Gubler F., Kalla R., Roberts J. K., Jacobsen J. V.. (1995): Gibberellinregulated expression of a myb gene in barley aleurone cells: evidence for Myb transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter. *The plant cell online*, **7**, 1879-1891.
- Gupta B., Huang B. (2014): Mechanism of salinity tolerance in plants: physiological, biochemical, and molecular characterization. *International journal of genomics*, **18**. <https://www.hindawi.com/journals/ijg/2014/701596/>
- Gürel F, Gözükmizi N. (2000): Optimization of gene transfer into barley (*Hordeum vulgare* L.) mature embryos by tissue electroporation. *Plant Cell Reports*, **19**, 787-791.
- Hakim, Ullah A., Hussain A., Shaban M., Khan A. H., Alariqi M., Gul S., Jun Z., Lin S., Li J., Jin S., Munis M.F.H. (2018): Osmotin: A plant defence tool against biotic and abiotic stresses. *Plant physiology and biochemistry*, **123**, 149-159.
- Harwood W A. (2012): Advances and remaining challenges in the transformation of barley and wheat. *Journal of experimental botany*, **63**, 1791-1798.
- Harwood W. A. (2018): An introduction to barley: The crop and the model. In: *Barley: Methods and protocols*, *Methods in molecular biology*, vol. 1900, (Harwood W. A., eds.), Springer-science, New York, U.S.A., 1-5.
- Harwood W, Ross S, Bulley S, Travella S, Busch B, Harden J, Snape J.(2002): Use of the firefly luciferase gene in a barley (*Hordeum vulgare*) transformation system. *Plant cell reports*, **21**, 320-326.
- Hensel G, Valkov V, Middlefell-Williams J, Kumlehn J. (2008): Efficient generation of transgenic barley: The way forward to modulate plant-microbe interactions. *Journal of plant physiology*, **165**, 71-82.
- Hinchliffe A., Harwood W. A. (2018): Agrobacterium-mediated transformation of barley immature embryos. In: *Barley: Methods and protocols*, *Methods in molecular biology*, vol. 1900, (Harwood W. A., eds.), Springer-science, New York, U.S.A., 115-126.
- Horvath H., Rostoks N., Brueggeman R., Steffenson B., Wettstein D. V., Kleinhofs A. (2003): Genetically engineered stem rust resistance in barley using the Rpg1 gene. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, **100**, 364-369.
- Hossain M. S., Dietz K. J. (2016): Tuning of redox regulatory mechanisms, reactive oxygen species and redox homeostasis under salinity stress. *Frontiers in plant science*, **7**:548. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2016.00548>
- Husaini A. M., Abdin M. Z. (2008): Development of transgenic strawberry (*Rfagia x ananassa* Duch.) plants tolerant to salt stress, *Plant science*, **174**, 446-455.
- Hückelhoven R., Dechert C., Kogel K. H.. (2003): Overexpression of barley BAX inhibitor 1 induces breakdown of mlo-mediated penetration resistance to *Blumeria graminis*. *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america*, **100**, 5555-5560.
- Jansen M. A. K., Potters G. (2017): *Stres: The way of life*. In: *Plant stress physiology*, 2nd ed., (Shabala S., ed.), CABI, Boston, Massachusetts, IX-XIV.
- Junker B, Zimny J, Lührs R, Lörz H. 1987. Transient expression of chimaeric genes in dividing and non-dividing cereal protoplasts after PEG-induced DNA uptake. *Plant cell reports*, **6**, 329-332.
- Kim J. M., To T. K., Nishioka T., Seki M. (2010): Chromatin regulation functions in plant abiotic stress responses. *Plant cell environment*, **33**, 604-611.

- Kim M. C., Panstruga R., Elliott C., Muller J., Devoto A., Yoon H. W., Park H. C., Cho M. J., Schultze-Lefert P. (2002): Calmodulin interacts with MLO protein to regulate defence against mildew in barley. *Nature*, **416**, 447-450.
- Kinane J., Oliver R. P. (2003): Evidence that the appressorial development in barley powdery mildew is controlled by MAP kinase activity in conjunction with the cAMP pathway. *Fungal genetics and biology*, **39**, 94-102.
- Klcova B. (2017): *Transformácia jarného jačmeňa génom osmotin*. Bakalárska práca, Univerzita Palackého, Olomouc, Česká republika.
- Klcova B., Ohnoutkova L., Vlcko1 T., Viktorova J., Rehorova K., Macek T. (2017): Transformation of spring barley with Osmotin protein exhibiting protective features against biotic and abiotic stress, *Plant Biotechnology: Green For Good IV*; Olomouc Czech Republic, June 19-22, Book of abstract P30, 103.
- Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Loerz H.. (2006): Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant biotechnology journal*, **4**, 251-261.
- Kupchak B. R., Villa N. Y., Kulemina L., Lyons T. (2008): Dessecting the regulation of yeast genes by the osmotin receptor. *Biochemical and biophysical research communications*, **374**, 210-213.
- Larcher W. (1980): *Physiological Plant Ecology*, 2nd ed. Springer, Berlin, Germany, 254 strán.
- Lawas L. M., Zuther E., Jagadish S. V. K., Hinch D. K. (2018): Molecular mechanisms of combined heat and drought stress resilience in cereals. *Current opinion in plant biology*, **45**, 212-217.
- Leclerc J. C. (2003): *Plant Ecophysiology*. Science Publishers, Enfield, United Kingdom, 314 strán.
- Lee B. T., Murdoch K., Topping J., Jones M. G. K., Kreis M. (1991): Transient expression of foreign genes introduced into barley endosperm protoplasts by PEG-mediated transfer or into intact endosperm tissue by microprojectile bombardment. *Plant science*, **78**, 237-246.
- Lichtenthaler H. K. (1987): Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods in enzymology*, **148**, 350-382.
- Lindemose S., Shea C., Jensen M., Skriver K. (2013): Structure, function and networks of transcription factors involved in abiotic stress responses. *International journal of molecular sciences*, **14**, 5842-5878.
- Liu D., Raghothama K. G., Hasegawa P. M., Bressan R. A. (1994): Osmotin overexpression in potato delays development of disease symptoms, *Proceedings of the national academy of sciences of the USA*, **5**, 1888-1892.
- Lü B., Wu J., Fu D. (2015): Constructing the barley model for genetic transformation in Triticeae. *Journal of integrative agriculture* **14**, 453-468.
- Lyngkjær M. F., Newton A. C., Atzema J. L., Baker S. J. (2000): The barley mlo-gene: an important powdery mildew resistance source. *Agronomie*, **20**, 745-756.
- Marco F., Bitrián M., Carrasco P., Rajam M. V., Alcázar R., Tiburcio A. F. (2015): Genetic engineering strategies for abiotic stress tolerance in plants. In: *Plant biology and biotechnology*, Vol. 2, (Bahadur B., Rajam M. V., Sahijram L., Krishnamurthy K. V., eds.), Springer, India, 579-610.
- McGrath P. F., Vincent J. R., Lei C. H., Pawlowski W. P., Torbert K. A., Gu W., Kaeppler H. F., Wan Y., Lemaux P. G., Rines H. R., Somers D. A., Larkins B. A., Lister R. M.. 1997. Coat protein-mediated resistance to isolates of barley yellow dwarf in oats and barley. *European journal of plant pathology*, **103**, 695-710.
- Min K., Ha S. C. Hasegawa P. M., Bressan R. A., Yun D. J., Kim K. K. (2004): Crystal structure of osmotin, a plant antifungal protein. *Proteins: structure, function and bioinformatics*, **54**, 170-173.
- Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D, Jacobsen J. (2004): Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant cell reports*, **22**, 397-402.

- Murray F., Matthews P., Jacobsen J., Gubler F. (2006): Increased expression of HvGAMYB in transgenic barley increases hydrolytic enzyme production by aleurone cells in response to gibberellin. *Journal of cereal science*, **44**, 317-322.
- Munns R., James R. A., Lauchli A. (2006): Approaches to increasing the salt tolerance of wheat and other cereals. *Journal of experimental botany*, **57**, 1025-1043.
- Naranjo M. A., Romero C., Belles M. J., Motesinos C., Vincente O., Serrano R. (2003): Lithium treatment induces hypersensitive like response in tobacco. *Planta*, **217**, 417-429.
- Nobre J., Davey M. R., Lazzeri P. A., Cannell M. E.. (2000): Transformation of barley scutellum protoplasts: Regeneration of fertile transgenic plants. *Plant cell reports*, **19**, 1000-1005.
- Nuutila A. M., Ritala A., Skadsen R. W., Mannonen L., Kauppinen V. (1999): Expression of fungal thermotolerant endo-1,4- β -glucanase in transgenic barley seeds during germination. *Plant molecular biology*, **41**, 777-783.
- Ohnoutkova L. (2019a): Mutation breeding in barley: Historical overview. In: *Barley: Methods and protocols, Methods in molecular biology*, vol. 1900, (Harwood W. A., eds.), Springer-science, New York, U.S.A., 7-19.
- Ohnoutkova L. (2019b): Barley anther culture. In: *Barley: Methods and protocols, Methods in molecular biology*, vol. 1900, (Harwood W. A., eds.), Springer-science, New York, U.S.A., 37-52.
- Ohnoutkova L., Zitka O., Mrizova K., Vaskova J., Galuszka P., Cernei N., Smedley M. A., Harwood W. A., Adam V., Kizek R. (2012): Electrophoretic and chromatographic evaluation of transgenic barley expressing a bacterial dihydrodipicolinate synthase. *Electrophoresis*, **33**, 2365-2373.
- Oliver M. J., Bewley J. D. (1997): Desiccation-tolerance of plant tissues: a mechanistic overview. *Horticultural reviews*, **18**, 171-121.
- Oostendorp M., Kunz W., Dietrich B., Staub T. (2001): Induced disease resistance in plants by chemicals. *European journal of plant pathology*, **107**, 7-12.
- Pandey P., Irulappan V., Bagavathiannan M. V., Senthil-Kumar M. (2017): Impact of combined abiotic and biotic stresses on plant growth and avenues for crop improvement by exploiting physio-morphological traits. *Frontiers in plant science*, **8**: 537. <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fpls.2017.00537>.
- Parkhi V., Kumar V., Sunilkumar G., Campbell L. M., Singh N. K., Rathore K. S. (2009): Expression of apoplastically secreted tobacco osmotin in cotton confers drought tolerance, *Molecular breeding*, **23**, 625-639.
- Piffanelli P., Ramsey L., Waugh R., Benabdelmouna A., D'Hont A., Hollricher K., Jorgensen J. H., Schultze-Lefert P., Panstruga R. (2004): A barley cultivation-associated polymorphism conveys resistance to powdery mildew. *Nature*, **430**, 887-891.
- Piffanelli P., Zhou F. S., Casais C., Orme J., Jarosch B., Schaffrath U., Collins N. C., Panstruga R., Schulze-Lefert P. (2002): The barley MLO modulator of defence and cell death is responsive to biotic and abiotic stress stimuli. *Plant physiology*, **129**, 1076-1085.
- Pryce-Jones E., Carver T., Gurr S. J. (1999): The roles of cellulase enzymes and mechanical force in host penetration by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Physiological and molecular plant pathology*, **55**, 175-182.
- Rajeevkumar S., Anunanthini P., Sathishkumar R. (2015): Epigenetic silencing in transgenic plants, *Frontiers in plant science*, **6**: 693. <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2015.00693>.
- Roberts D. R., Mims C. W., Fuller M. S. (1996): Ultrastructure of extracellular matrix deposits associated with conidia of powdery mildew fungus *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*. *Canadian journal of botany*, **74**, 231-237.
- Rodriguez A. A., Maiale S. J., Menendez A. B., Ruiz O. A. (2009): Polyamine oxidase activity contributes to sustain maize leaf elongation under saline stress. *Journal of experimental botany*, **60**:4249-4262.
- Sadat Noori S. A., Sokhansanj A. (2008): Wheat plants containing an osmotin gene show enhanced ability to produce roots at high NaCl concentration, *Journal of plant physiology*, **55**, 256-258.

- Shrawat A. K., Becker D., Lörz H. (2007): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, **172**, 281-290.
- Shrivastava P., Kumar R. (2015): Soil salinity: A serious environmental issue and plant growth promoting bacteria as one of the tools for its alleviation. *Saudi journal of biological sciences*, **22**, 123-131.
- Singh N. K., Bracker Ch. A., Hasegawa P. M., Handa A. K., Buckel S., Hermodson M. A., Pfankoch E., Regnier F. E., Bressan R. A. (1987): Characterisation of osmotin a thaumatine-like protein associated with osmotic adaptation in plant cells. *Plant physiology*, **85**, 529-536.
- Smith A. M., Coupland G., Dolan L., Harberd N., Jones J., Martin C., Sablowski R. Amey A. (2010): *Plant Biology*. Garland Science, New York, United Kingdom, 664 strán.
- Strange R. N. (2003): The causal agents of plant disease: Identity and impact. In: *Introduction to plant pathology*, John Wiley and sons Ltd, England, 1-32.
- Subramanyam K., Arun M., Mariashibu T. S., Theboral J., Rajesh M., Singh N. K., Manickavasagam M., Ganapathi A. (2012): Overexpression of tobacco osmotin (Tbosm) in soybean conferres resistance to salinity stress and fungal infections, *Planta*, **236**, 1909-1925.
- Sudisha J., Sharathchandra R. G., Amruthesh K. N., Kumar A., Shetty H. S. (2012): Pathogenesis related proteins in plant defense response. In: *Plant defence: Biological control*. Vol. 12, (Mérillon J. M., Ramawat K. G., eds.), Springer, London, New York, 379-403.
- Suzuki N., Miller G., Morales J., Shulaev V., Torres M. A., Mittler R (2011): Respiratory burst oxidases: the engines of ROS signaling. *Current opinion in plant biology*, **14**, 691-699.
- Szabados L., Kovacs H., Zilberstein A., Bouchereau A. (2011): Importance of protective compounds in stress tolerance, *Advances in botanical research*, **57**, 105-50.
- Taiz L., Zeiger E. (2002): *Plant Physiology*, 3rd edn. Sinauer Associates, Sunderland, Massachusetts, 690 strán.
- Tavakkoli E., Rrengasamy P., McDonald G. K. (2010): The response of barey to salinity stress differs between hydroponic and soil systems, *Functional plant biology*, **37**, 621-633.
- Travella S., Ross S. M., Harden J., Everett C., Snape J. W., Harwood W. A. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant cell report* **23**, 780-789.
- Tiong J., McDonald G. K., Genc Y., Pedas P., Hayes J. E., Toubia J., Langridge P., Huang C. Y. (2014): HvZIP7 mediates zinc accumulation in barley (*Hordeum vulgare*) at moderately high zinc supply. *New phytologist*, **201**, 131-143.
- Tuteja N., Mahajan S. (2007): Calcium signaling network in plants: an overview. *Plant signaling behaviour*, **2**, 79-85.
- Tuteja N., Sopory S. K. (2008): Chemical signaling under abiotic stress environment in plants. *Plant signalling behaviour*, **3**, 525-536.
- Tzou Y. M., Huang T. S., Huggins K. W., Chin B. A., Simonne A. H., Singh N. K. (2011): Expression of truncated tobacco osmotin in *Escherichia coli*: purification and fungal activity, *Biotechnology letters*, **33**, 539-543.
- Von Bothmer R., Van Hintum T., Knüpffer H., Sato K. (2003): Barley diversity- an introduction. In: *Diversity in barley (Hordeum vulgare)*. 1st ed., (Von Bothmer R., Van Hitum T., Knüpffer H., Sato K., eds.), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, 3-8.
- Viktorova J., Klcova B., Rehorova K., Vlcko T., Stankova L., Jelenova N., Cejnar P., Kumar J. K., Ohnoutkova L., Macek T. (2019): Recombinant expression of odmotine in barley improves stress resistance and food safety during adverse growing conditions. *Plos one*, PONE-D-19-03718R2. <https://www.biorxiv.org/content/biorxiv/early/2019/02/11/546721.full.pdf>.
- Wan Y., Lemaux P. G. (1994): Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant physiology* **104**, 37-48.
- Wang M. B., Abbott D. C., Waterhouse P. M. (2000): A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Molecular plant pathology*, **1**, 347-356.
- Wang W., Vinocur B., Altman A. (2003): Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance. *Planta*, **218**, 1-14.

- Wright A. J., Barry T. J., Carver T. L. W. (2002): Early adhesion of *Blumeria graminis* to plant and artificial surfaces demonstrated by centrifugation. *Physiological and molecular plant pathology*, **61**, 217-226.
- Zhang Y., Shih D. S. (2007): Isolation of an osmotin-like protein gene from strawberry and analysis of the response of this gene to abiotic stresses, *Journal of plant physiology*, **164**, 68-77.
- Zhao M., Running S.W. (2010): Drought-induced reduction in global terrestrial net primary production from 2000 through 2009. *Science*, **329**, 940-943.

8 ZOZNAM POUŽITÝCH SYMBOLOV A SKRATIEK

- $\Psi\Pi$ – osmotický potenciál
- ABA – abscisová kyselina
- BDYV – „barley dwarf yellow virus“ – vírus žltej zakrpatenosti jačmeňa
- CAT – chloramfenikol acetyltransferáza
- CDK – ciklín-dependentná proteín kináza
- CPK – Ca^+ - dependentná proteín kináza
- CIPK – kalcineurin „B-like“ interagujúca proteín kináza
- DAPI – 2-(4-amidinofenyl)-1H -indol-6-karboxamidin
- EF 1 – elongačný faktro 1
- ETC – „electron transport chain“ – elektrónový transportný reťazec
- GA – giberilíny/ gyberilínová kyselina
- GAMYB – giberilínmi regulovaný transkripčný aktivátor
- GFP – „green fluorescent protein“ – zelený fluorescenčný proteín
- GUS – β -glukoronidáza
- HLH – „helix-loop-helix“ – hélix-sľučka-hélix
- HPT – hygromycin fosfotransferáza
- Hyg – Hygromycín
- LUC – luciferáza
- LZ – leucínový zips
- MAPK – mitogén-aktivovaná proteín kináza
- mlo – „mildew resistance locus“ – lokus pre rezistenciu k múčnatke
- NPTII – neomycin fosfotransferáza
- osm – gén osmotin
- PAR – „photosynthetically active radiation“ – fotosynteticky aktívna radiácia
- PAT – fosfínotricin acetyltransferáza
- RFU – „relative fluorescence unit“ – jednotka relatívnej fluorescencie

Transformation of spring barley with Osmotin protein exhibiting protective features against biotic and abiotic stress

Barbora Klcova¹, Ludmila Ohnoutkova¹, Tomas Vlcko¹, Jitka Viktorova², Katerina Rehorova², Tomas Macek²

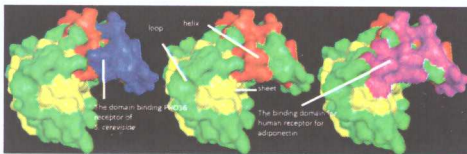
¹Palacky University in Olomouc, Faculty of Science, Centre of the Region Hana for Biotechnological and Agricultural Research, Department of Chemical Biology and Genetics, Olomouc, Czech Republic, Email: ludmila.ohnoutkova@upol.cz
²University of Chemistry and Technology in Prague, Department of Microbiology and Biochemistry, Prague, Czech Republic

Background

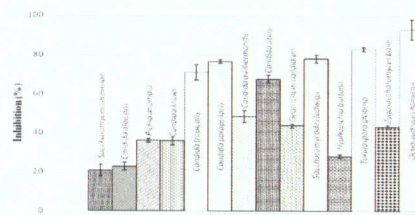
Plant stress of biotic or abiotic origin is responsible for the significant losses in yield annually. Plants react on various stress conditions by production of secondary metabolites (e. g. mycotoxins, alkaloids), followed by degradation of these metabolites. Production and degradation of those metabolites can lead to crop toxicity. Genetically modified plants have potential to overcome these problems by production of specific proteins involved in the plant response to biotic and abiotic stress. Those proteins, such as Osmotin, are being synthesized as a reaction to stress conditions in order to prevent cell damage. Osmotin is well known multifunctional protein with antifungal activity. It is also being expressed in conditions of water deficiency, salinity, and cold.

Functions of osmotin protein

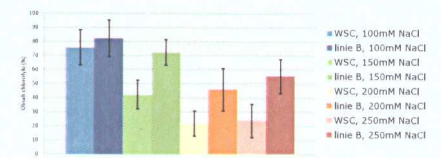
- antifungal activity (biotic protection)
- interaction with cytokinins
- interaction with human receptor for adiponectin
- osmolyte function (abiotic protection)



Inhibition effect on different yeasts species

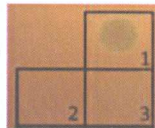


The increase salt tolerance



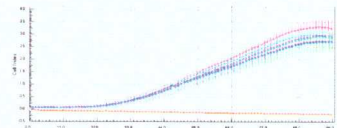
Study of osmotin toxicity in erythrocytes

Determination of hemolytic activity
 1 - chrysothysin (20 µg), 2 - osmotin (2 µg)
 3 - osmotin (20 µg)



Study of osmotin toxicity in HepG2

Growth curve of kidney cells under the influence of osmotin (3 – 500 µg/ml).
 Light blue – cell growth without influence of osmotin



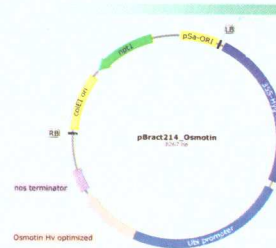
Material and Methods

- Gene *Osm* was prepared synthetically by Thermo Fisher Scientific GENEART, the sequence was optimized for barley, cloned into pDONOR207 vector and then into destination vector pBract214.
<https://www.bract.org/bract.html>.
- *A. tumefacience*-mediated transformation was used to transform the immature zygotic embryos of the spring barley variety Golden Promise. Explants were cultivated in vitro conditions on selection - callus induction, and regeneration medium (Harwood et al. 2009).
- The presence of the transgene in putative transgenic plants was verified by PCR. The analysis was performed with the isolated genomic DNA from leaf tissue of putative transgenic plants using the procedure of Edwards et al. 1991.
- For PCR reaction premix REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix (R2523-100RXN, Sigma-Aldrich, USA,) was used. The presence of *osmotin* was determined by amplifying a 85 bp fragment and a 341 bp fragment.

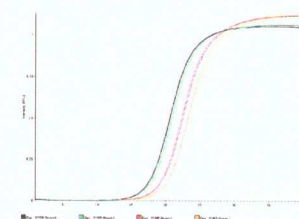


Total number of transformed immature embryos	Number of the regenerated plants of T ₀ generation	Number of PCR positive plants	Number of PCR negative plants	Number of independent transgenic lines
210	26	25	1	9

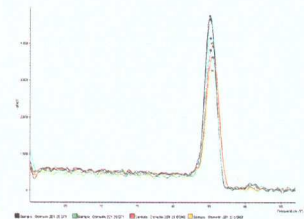
Results



PCR analysis of regenerated plants.



Quantification of *osmotin* expression by comparison with EF1-α internal standard.



Melting analysis of PCR products.

Conclusion

- Transgenic plants carrying *osmotin* transgene were obtained.
- In total, 9 independent transgenic events occurred.
- Transformation efficiency was 12%.
- Toxicity and salinity assays are now underway.
- Our work demonstrates that transgenic plants can prevent the plant immune system from over-responding to stress.

Acknowledgements

This work was supported by the project GAČR 5-22276S.