

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Molekulární a fenotypová charakterizace vybraných
HvMPK3 knockout a *HvMPK3* nadprodukčních
transgenních linií ječmene**

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

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

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

V Olomouci dne 10.5.2018

Eva Trejtnarová

Poděkování:

Ráda bych poděkovala vedoucímu mé práce Ing. Pavlu Křenkovi Ph.D. za ochotu, trpělivost a rady při zpracování této bakalářské práce. Zároveň děkuji také mé kolegyni Jiřině Havránkové, která se mnou spolupracovala a rodině za podporu.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Eva Trejtnarová
Název práce	Molekulární a fenotypová charakterizace vybraných <i>HvMPK3</i> knockout a <i>HvMPK3</i> nadprodukčních transgenních linií ječmene
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2018
Abstrakt	

Tato bakalářská práce se zabývá genotypovou a fenotypovou charakterizací transgenních linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden promise se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* a s vyřazeným genem *HvMPK3* (knockout). S využitím polymerasové řetězové reakce byla u transgenních rostlin ověřena přítomnost T-DNA kazety, a to pomocí specifických PCR markerů charakteristických pro daný konstrukt. Vybrané rostliny se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* byly podrobeny Multiplex TaqMan qPCR analýze, která umožnila predikovat transgenní genotyp u těchto rostlin. V práci byly identifikovány transgenní linie s nadprodukcí *HvMPK3*, které obsahovaly jednu kopii T-DNA/případně tandemově inzerované kopie T-DNA a také homozygotní jedinci v T-DNA inerci v rámci těchto linií. Vybraní jedinci s vyřazeným genem *HvMPK3* byli charakterizováni pomocí sekvenční analýzy. Výsledky této analýzy vedly k identifikaci jedinců s homozygotními mutacemi, které způsobují posun čtecího rámce genu *HvMPK3*. V následující generaci rostlin byla přítomnost těchto homozygotních mutací potvrzena. Ověřena byla také spolehlivost genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Měření dynamiky ztráty vody neukázalo žádné rozdíly mezi transgenními rostlinami a kontrolními rostlinami. Při sledování dynamiky vadnutí rostlin se zdály být rostliny s vyřazeným genem *HvMPK3* odolnější vůči působení vodního deficitu oproti rostlinám se zvýšenou expresí genu *HvMPK3*.

Klíčová slova	<i>HvMPK3</i> , ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>), sucho, transgenní rostliny, hygromycinová rezistence
Počet stran	76
Počet příloh	4
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Eva Trejtnarová
Title	Molecular and phenotypic characterization of selected <i>HvMPK3</i> knockout and <i>HvMPK3</i> overexpression transgenic barley lines
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Ing. Pavel Křenek, Ph.D.
The year of presentation	2018
Abstract	

This bachelor thesis deals with the genotypic and phenotypic characterization of transgenic lines of barley (*Hordeum vulgare*) cv. Golden Promise in which the *HvMPK3* gene was overexpressed and knocked out. Polymerase chain reaction was carried out to verify the presence of the T-DNA cassettes in these plants by using specific PCR markers for each construct. Selected plants overexpressing *HvMPK3* were subjected to the Multiplex TaqMan qPCR analysis in order to predict the transgenic genotype of these plants. Transgenic lines were identified, which contained one copy of T-DNA or tandem T-DNA insertions, as well as individual plants homozygous in T-DNA insertion. Selected plants in which *HvMPK3* gene was knocked out were characterized by sequence analysis. Results of this analysis led to the identification of the individual plants with homozygous frameshift mutations in the *HvMPK3* gene. In the subsequent generation of plants, the presence of these homozygous mutations was confirmed. Furthermore, the reliability of simple genotyping of transgenic plants with *in vitro* hygromycin resistance test was verified. The measurements of water lost dynamic showed no differences between transgenic and control plants. When wilting dynamic was monitored, *HvMPK3* knockout plants appeared to be more resistant to drought stress than plants overexpressing *HvMPK3* gene.

Keywords	<i>HvMPK3</i> , barley (<i>Hordeum vulgare</i>), drought, transgenic plants, hygromycin resistance
Number of pages	76
Number of appendices	4
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	MITOGENEM AKTIVOVANÉ PROTEIN KINASY ROSTLIN	2
2.1.1	MAPK KASKÁDA A PŘENOS SIGNÁLU	2
2.1.2	ČLENĚNÍ MAPK RODINY	2
2.1.3	ROLE MAP KINASOVÝCH DRAH U ABIOTICKÉHO STRESU	4
2.2	VODNÍ STRES A MAP KINASOVÉ MODULY ROSTLIN	5
2.2.1	EFEKTY PŮSOBNÍ SUCHA NA ROSTLINY	6
2.2.2	MECHANISMY REZISTENCE PŘI PŮSOBNÍ SUCHA	7
2.2.3	MAP KINASOVÉ MODULY V REAKCI NA SUCHO	9
2.3	GENOVÉ INŽENÝRSTVÍ A PŘÍPRAVA TRANSGENNÍCH ROSTLIN	13
2.3.1	METODY PŘÍPRAVY TRANSGENNÍCH ROSTLIN	14
2.3.2	MODIFIKOVANÉ ROSTLINY S CÍLENÝMI EDITACEMI GENOMU	14
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	17
3.1	MATERIÁLY	17
3.1.1	ROSTLINNÝ MATERIÁL	17
3.1.2	CHEMIKÁLIE A REAGENCIE	17
3.1.3	PŘÍSTROJE	18
3.1.4	PROGRAMY	19
3.2	METODY	19
3.2.1	IZOLACE GENOMICKÉ DNA	19
3.2.2	POLYMERASOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE	20
3.2.3	GELOVÁ ELEKTROFORÉZA	22
3.2.4	PURIFIKACE PCR PRODUKTŮ MARKERU JK3ZGR A SEKVENACE	23
3.2.5	MULTIPLEX TAQMAN QPCR ANALÝZA	23
3.2.6	<i>IN VITRO</i> TEST HYGROMYCINOVÉ REZISTENCE	24
3.2.7	TESTOVÁNÍ ODOLNOSTI ROSTLIN NA PŮSOBNÍ SUCHA	24
4	VÝSLEDKY	27
4.1	MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE K3I A Z1 TRANSGENNÍCH LINIÍ JEČMENE	27
4.1.1	MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE K3I LINIÍ	27
4.1.2	MOLEKULÁRNÍ CHARAKTERIZACE Z1 LINIÍ	38
4.2	SLEDOVÁNÍ VLIVU SUCHA NA FENOTYPOVÝ PROJEV K3I A Z1 TRANSGENNÍCH LINIÍ ROSTLIN	46
4.2.1	SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY ZTRÁTY VODY	46
4.2.2	VLIV SUCHA NA VADNUTÍ K3I A Z1 TRANSGENNÍCH ROSTLIN	49
5	DISKUZE	53
6	ZÁVĚR	55
7	LITERATURA	56
8	SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	64
9	PŘÍLOHY	66

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

1. Příprava literární rešerše na nosné téma mitogenem aktivované protein kinasy v odpovědích modelových rostlin a plodin na vodní stres.

Experimentální část:

1. Preselekce transgenních linií ječmene odrůdy Golden Promise se zvýšenou expresí *HvMPK3* genu a s vyřazeným *HvMPK3* genem (knockout) pro vlastní experimenty na základě genotypování rostlin a stanovení počtu kopií transgenů. K tomuto účelu budou využity molekulární (PCR, Sangerova sekvenace, Multiplex TaqMan qPCR) a genetické metody (statistická verifikace segregace transgenů). Dílčím cílem práce bude také ověření spolehlivosti genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí *in vitro* provokačního testu hygromycinové rezistence.
2. Kondicionální fenotypování vybraných transgenních a knockout linií ječmene v podmínkách působení vodního stresu. Klíčící rostliny vybraných transgenních linií ječmene budou vystaveny nedostatku vody a v časové řadě bude pozorována a vyhodnocena rychlost jejich vadnutí ve srovnání s netransgenní kontrolou. Bude také analyzována dynamika ztráty vody u transgenních a kontrolních rostlin pomocí vážení rostlin v časové řadě po jejich saturaci vodou.

1 ÚVOD

Neustálé vystavení biosféry abiotickým stresům, jako je například sucho, extrémní teploty, působení těžkých kovů, salinita a další, vede k nerovnováze v přirozeném stavu životního prostředí. Rostliny se jako imobilní organismy na tyto faktory dokázaly adaptovat a vytvořit si během svého vývoje mechanismy, které jim umožňují přizpůsobit se vnějším podmínkám a zajistit jim přežití (Lisar *et al.*, 2012). Díky působení rozličných environmentálních podmínek jsou rostliny schopné adaptovat se na změny prostřednictvím své fyziologie, růstu a vývoje. Tyto adaptace zahrnují rychlou a dynamickou regulaci enzymatické aktivity a modifikaci programů genové exprese. Fosforylace a defosforylace proteinů patří mezi nejčastější posttranslační úpravy u všech organismů. Proteinovou fosforylací zprostředkovávají enzymy kinasy, které jsou typicky organizovány do signálních kaskád (Colcombet a Hirt, 2008).

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAP kinasy) jsou jedny ze zprostředkovatelů, které působí v rostlinách jako přenašeči signálů, přičemž je jejich dráha založena na fosforylaci substrátů (Sinha *et al.*, 2011). MAP kinasové moduly jsou evolučně vysoce konzervované, vyskytují se u všech eukaryotických organismů a představují jeden z nejvýznamnějších studovaných signálních mechanismů u rostlin (Danquah *et al.*, 2014). Tyto signální dráhy hrají významnou roli v mnoha buněčných procesech zahrnujících buněčné dělení, hormonální odpovědi, vývoj, senescenci a odpovědi na biotické a abiotické stesy (Asai *et al.*, 2002; Nakagami *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2011; Danquah *et al.*, 2015; Matsuoka *et al.*, 2015; Xu a Zhang, 2015).

Sucho je nepochybně ve světě jedním z hlavních abiotických stresů, které působí na rostliny. Globální zvýšení teploty a desertifikace půdy vedou ke značným úbytkům výnosů pěstovaných plodin. Genetické inženýrství přináší účinné a ekonomicky výhodné prostředky, pomocí kterých by se dalo dosáhnout zlepšení tolerance vůči suchu u kulturních rostlin (Ashraf *et al.*, 2010). Právě modifikace MAP kinasových drah představuje pro své vlastnosti ideální cíle genetické manipulace (Šamajová *et al.*, 2013b).

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

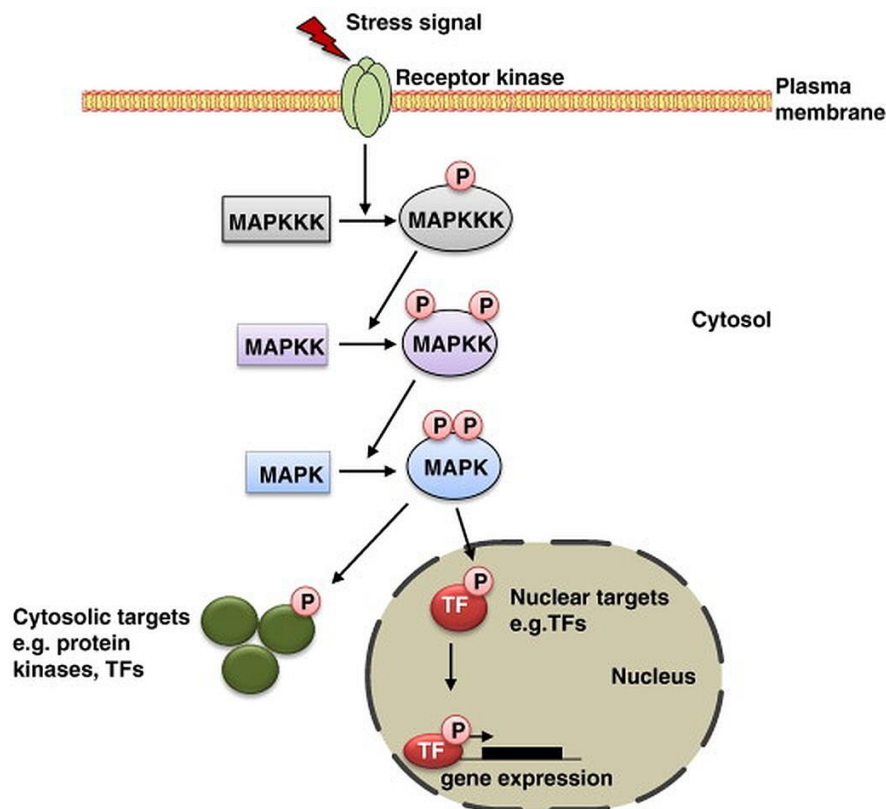
2.1 Mitogenem aktivované protein kinasy rostlin

2.1.1 MAPK kaskáda a přenos signálu

Mitogenem aktivované protein kinasy (MAP kinasy) fungují na principu přenosu externího signálu v buňkách za účasti nejméně tří proteinových kinas: MAPK kinas kinas (MAP3K/MEKK/MKKK), MAPK kinas (MKK/MEK) a MAPK (MPK), přičemž k jejich postupné aktivaci dochází prostřednictvím fosforylace (Ichimura *et al.*, 2002; Colcombet a Hirt, 2008). MAP3 kinasy a MAP2 kinasy jsou postupně fosforylovány a aktivovány na serinových (S) nebo threoninových (T) residuích. Aktivované MAP2 kinasy, s navázaným fosforem v místě aktivační smyčky S/T-X₃₋₅-S/T, dále dvojitě fosforylují MAP kinasy na specifickém místě vysoce konzervovaného motivu T-X-Y, tedy v místě threoninu (T) a tyrosinu (Y), (X – symbolizuje jakoukoliv aminokyselinu) (Hamel *et al.*, 2012). V některých případech je součástí této kaskády i čtvrtá kinasa označovaná jako MAPKKKK (MAP4K), která má za úlohu aktivaci MAP3K (Colcombet a Hirt, 2008; Keshet a Seger, 2010). Fosforylované MAP kinasy se mohou v buňce podílet na regulaci různých specifických cílů. Pokud jsou lokalizovány do jádra, podílí se na modulaci transkripčních faktorů a/nebo jiných proteinů, které se účastní transkripce. Ovlivňují tak genovou expresi, programování vývoje rostlin a/nebo odpovědi na stresové podmínky (Šamajová *et al.*, 2013b). Mimo oblast jádra interagují tyto enzymy například s cytoskeletálními proteiny (Šamajová *et al.*, 2013a) a dalšími proteinovými kinasami (Popescu *et al.*, 2009). Organizace MAPK kaskády je znázorněna na Obr. 1.

2.1.2 Členění MAPK rodiny

Obecně byly MAP kinasové rodiny nalezeny u mnoha rostlinných druhů, ale i u živočichů a hub. Vědecké studie dokazují, že tyto kaskády působí jako velmi konzervované mechanismy napříč mnoha organismy (Colcombet a Hirt, 2008). Jako modelová rostlina pro studium MAP kinasových drah slouží obzvláště Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), u kterého kompletní znalost jeho genomu odhalila velkou skupinu příbuzných kinas: 80 MAP3 kinas, 10 MAP2 kinas a 20 MAP kinas. Podobný soubor genů se vyskytuje u rostlinných druhů, jako je například rýže (*Oryza sativa*), topol (*Populus sp.*) nebo vinná réva (*Vitis vinifera*) (Ichimura *et al.*, 2002).



Obr. 1 Typická MAPK kaskáda (Danquah *et al.*, 2014). MAPKs kaskády jsou obecně organizovány jako modulové dráhy, ve kterých dochází k postupné aktivaci jednotlivých složek prostřednictvím fosforylace (znázorněno šipkami). Příchozí enviromentální signály se přenášejí a překládají do posttranslačních modifikací cílových proteinů, jako jsou např. transkripční faktory nebo jiné cytosolové proteiny.

V současné době představuje heterogenní skupina MAP3 kinas nejméně prostudovanou rodinu. U *Arabidopsis* jsou klasifikovány tři základní podskupiny této rodiny: MEKK-typ, Raf-typ a ZIK-typ (Colcombet a Hirt, 2008). MEKK-typ je dále rozdělován na 6 dalších tříd A1-A6. V současné době jsou do určité míry funkčně charakterizováni pouze členové A1-A4. Mezi A1 se řadí protein MEKK1 patřící k nejlépe prostudované MAP3K u *Arabidopsis*. Je zapojen do rostlinných imunitních reakcí (Asai *et al.*, 2002; Gao *et al.*, 2008; Rodriguez *et al.*, 2010) a do odpovědi na solný a chladový stres (Teige *et al.*, 2004). A2 třída obsahuje tři proteiny MAPKKK α , MAPKKK γ a YODA. Nejvíce je známo o proteinu YODA, který hraje roli při modelaci stomat a u buněk embryí (Bergmann *et al.*, 2004; Lukowitz *et al.*, 2004; Bush and Krysan, 2007; Wang *et al.*, 2007). Členové A3 se podílí na cytokinezi (Krysan *et al.*, 2002). Ke třídě A4 náleží MAPKKK ϵ 1 a MAPKKK ϵ 2 ovlivňující buněčné dělení (Jouannic *et al.*, 2001)

a vývoj pylových zrn (Chaiwongsar *et al.*, 2012). Biologické a molekulární funkce zbylých A5-A6 zůstávají neznámé.

MAP2 kinasy u *Arabidopsis* jsou rozdělovány na 4 podskupiny (A-D). Je známo, že rostlinné MAP2 kinasy nesou obvykle 5 aminokyselin mezi serin/threonin residui (S/TxxxxS/T), liší se tak od savčích MAP2 kinas, které obsahují ve své aktivační smyčce pouze 3 aminokyseliny (S/TxxxS/T) (Ichimura *et al.*, 2002). Z podskupin A jsou známy MKK1 a MKK2, které slouží jako „upstream“ regulátory MPK4 a MPK6 při odpovědi rostlin na stres (Ichimura *et al.*, 2006; Meszaros *et al.*, 2006; Nakagami *et al.*, 2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008). Jako jediný člen podskupiny B je představována MKK3. Tato kinasa se podílí na vývojových reakcích zprostředkovaných kyselinou jasmonovou (JA) a působí při obraně proti patogenům (Doczi *et al.*, 2007; Takahashi *et al.*, 2007). MKK4 a MKK5 náležící do skupiny C pozitivně regulují odpovědi na PAMPs (pathogen-associated molecular patterns) a zároveň modulují některé důležité vývojové procesy (Kovtun *et al.*, 2000; Asai *et al.*, 2002; Ren *et al.*, 2002; Bush and Krysan, 2007). Z dalších rostlinných druhů byly analyzovány MAP2 kinasy jako jsou např. MsSIMKK u vojtěšky (*Medicago sativa*), NtSIPKK a NtMEK u tabáku (*Nicotiana tabacum*), ZmMAPKK1 a ZmMEK1 u kukuřice (*Zea mays*) nebo OsMEK1 a OsMCK1 u rýže (*Oryza sativa*) (Ichimura *et al.*, 2002).

MAP kinasy jsou také rozdělovány na základě strukturálních motivů a sekvenčních podobností do 4 podskupin (A-D). S výjimkou členů nejbližší podskupiny D, která nese v aktivační smyčce fosforylační motiv T-D-Y, jsou všechny ostatní MAP kinasy (A-C) aktivovány v motivu T-E-Y (Ichimura *et al.*, 2002). K nejlépe prostudovaným kinasám skupiny (A-C) patří MPK3, MPK4 a MPK6. Podílejí se na přirozené imunitě rostlin (Petersen *et al.*, 2000; Droillard *et al.*, 2004), cytokinesi a organizaci mikrotubulů (Kosetsu *et al.*, 2010; Beck *et al.*, 2010, 2011; Zeng *et al.*, 2011) nebo jsou spojovány s abiotickým stresem a ABA (kyselinou abscisovou) (Ichimura *et al.*, 2000; Droillard *et al.*, 2002, 2004; Ahlfors *et al.*, 2004; Teige *et al.*, 2004; Gudesblat *et al.*, 2007). U zástupců dalších rostlin jsou studovány např. NtWIPK u tabáku, MsSIMK u vojtěšky, OsMAPK2 u rýže nebo ZmMPK4 u kukuřice, revidováno v Ichimura *et al.*, 2002.

2.1.3 Role MAP kinasových drah u abiotického stresu

MAP kinasové dráhy jsou známy pro svou aktivitu v rostlinném metabolismu během abiotických stresů, jako jsou chlad, zvýšená teplota, poranění, UV záření, působení

těžkých kovů, zvýšená koncentrace soli v půdě nebo působení ozonu (Šamajová *et al.*, 2013b). U *Arabidopsis* byl identifikován MAP kinasový modul MEKK1-MKK2-MPK4/MPK6, který je aktivován nízkou teplotou a solným stresem (Teige *et al.*, 2004). Při oxidativním stresu aktivuje H₂O₂, jako jeden z mnoha představitelů reaktivních forem kyslíku (ROS), zástupce MPK1 a MPK2 (Ortiz-Masia *et al.*, 2007), MPK3 a MPK6 (Kovtun *et al.*, 2000), MPK4 (Nakagami *et al.*, 2006) a MPK7 (Doczi *et al.*, 2007). U ozonu jako dalšího představitele ROS byla zjištěna spojitost s MAP kinasovými signalizačními dráhami a akumulací ethylenu, kyseliny jasmonové (JA) a kyseliny salicylové (SA) (Ahlfors *et al.*, 2004). S použitím technologie RNA interference pro umlčení genu se u transgenních rostlin tabáku ukázalo, že gen NtMPK4 hraje významnou roli při odpovědích na poranění a je zapojený právě v procesech tolerance rostlin vůči ozonu (Gomi *et al.*, 2005). Vysoká koncentrace soli, sucho a ABA spouští aktivaci Raf-typu MAP3K známé jako DSM1 (drought hypersensitive mutant1) u rýže (Ning *et al.*, 2010). U *Arabidopsis* se při hyperosmotické reakci aktivuje v rostlině MKKK20, která následně aktivuje MPK6 (Kim *et al.*, 2012). Kromě již zmiňované MPK6 bylo dále u rostlin *Arabidopsis* zjištěno, že zvýšená salinita indukuje aktivaci MPK4 (Teige *et al.*, 2004). Jako hlavní aktivátor těchto kinas působí MKK2. Při testování mutantů *mkk2* se potvrdilo, že rostlina s deaktivovaným genem je hypersensitivní vůči soli (Teige *et al.*, 2004). MAP kinasy mohou být také aktivovány u rostlin při vysokých hladinách těžkých kovů. Příkladem jsou geny *OsMPK3* a *OsMPK6* u rýže (Yeh *et al.*, 2007) nebo kinasy SIMK, MMK2, MMK3 a SAMK u vojtěšky (Jonak *et al.*, 2004). MAP kinasové dráhy fungují jako univerzální převodníky při působení mnoha abiotických stresů, a proto jsou jedny z nejvíce studovaných signalizačních drah u rostlin.

2.2 Vodní stres a MAP kinasové moduly rostlin

Vodní stres může nastat jako důsledek dvou podmínek, buď přebytku vody, nebo kvůli jejímu nedostatku. Častěji dochází k deficitu vody, což se označuje jako suchý stres (Mahajan a Tuteja, 2005). Sucho je jeden z hlavních abiotických stresů na světě, přičemž úbytky výnosů plodin v důsledku tohoto stresu jsou značné (Ashraf, 2010). Přestože pro zmírnění problémů vyvolaných suchem bylo použito řady přístupů ve šlechtění rostlin, zdá se být konvenční zemědělství nebo genetické inženýrství efektivním a ekonomickým prostředkem na přizpůsobení plodin suchému stresu (Ashraf, 2010). Efekty působení sucha jsou patrné ve všech fenologických stádiích růstu rostlin. Deficit vody se projevuje na morfologických i na molekulárních úrovních (Farooq *et al.* 2009).

2.2.1 Efekty působení sucha na rostliny

Na morfologické úrovni působení sucha ovlivňuje vegetativní růst rostlin, zejména růst stonku (Mahajan a Tuteja, 2005). Sucho ovlivňuje u rostlin procesy jako je například klíčení nebo kvetení. Bylo zaznamenáno, že stres ze sucha výrazně snižuje klíčivost a vývoj semenáčků (Kaya *et al.*, 2006). Studie hrachu odhalila, že sucho narušilo klíčení a časný růst rostlin (Okcu *et al.*, 2005). U rýže se během vegetačního období výrazně snížil růst a vývoj rostlin (Tripathy *et al.*, 2000; Manikavelu *et al.*, 2006). U ječmene vyvolalo působení sucha před obdobím kvetení snížení výnosů semen tím, že se snížil u rostlin počet odnoží, listů a celkový počet semen na rostlinu (Samarah, 2005).

Na molekulární úrovni suchý stres snižuje dostupnost, využití a translokaci mnoha pro metabolismus důležitých nutrientů. V procesech odpovědi na sucho jsou zahrnuty aspekty jako je uzavírání průduchů, procesy fotosyntézy, role cukrů a osmolytů a MAP kinasové dráhy (Farooq *et al.* 2009). Prakticky u všech rostlin je první odezvou na akutní vodní deficit uzavření jejich průduchů, aby se zabránilo ztrátám vody (Mansfield a Atkinson, 1990). Průduchy mohou být uzavřeny v rámci přímého odpařování vody a rychlé odezvy svěřacích buněk nebo skrze metabolickou aktivitu, a to prostřednictvím iontových kanálů (Mahajan a Tuteja, 2005). Procesy hydroaktivního uzavírání jsou regulovány ionty a metabolity, z nichž největší podíl na kontrole mají hormony, jako jsou ABA, cytokinininy nebo ethylen (Mahajan a Tuteja, 2005). Působení sucha souvisí také s fotosyntézou a aktivitou enzymu Rubisco. Při působení stresu dochází k rychlému poklesu množství tohoto enzymu, a tudíž i k poklesu jeho aktivity v rostlinách. Následný nedostatek CO₂ vede k snížení rychlosti fotosyntézy (Lisar *et al.*, 2012). Bylo prokázáno, že pokles rychlosti fotosyntézy při stresu v důsledku sucha je primárně způsoben nedostatkem CO₂, neboť fotochemická účinnost může být vrácena zpět do normálu po rychlém přechodu listů do prostředí obohaceného o CO₂ (Meyer a Genty, 1998). Během těchto procesů se také generují látky ze skupiny ROS zahrnující superoxid, peroxid vodíku a hydroxylové radikály. Tyto látky působí jako sekundární poslové při transdukci signálů a jsou zahrnuty v hormonálních odpovědích (Foyer a Noctor 2003). V rostlinách je syntetizováno velké množství sloučenin, které hrají klíčovou roli při udržování osmotické rovnováhy a zároveň se podílí na ochraně membrán. Tyto sloučeniny zahrnují prolin, glutamát, glycin-betain, karnitin, mannitol, sorbitol, sacharosu, oligosacharidy a anorganické ionty. Jsou to látky, které pomáhají buňkám udržovat si hydratovaný stav, fungují tak, že poskytují odolnost proti suchu a proti dehydrataci buněk (Hoekstra *et al.*, 2001; Ramanjulu a Bartels, 2002).

2.2.2 Mechanismy rezistence při působení sucha

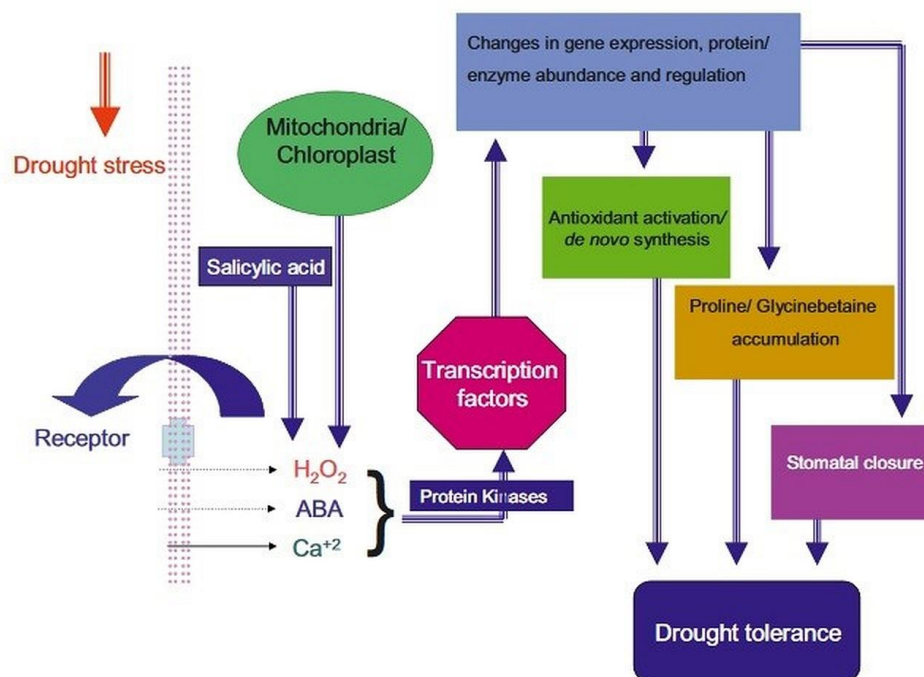
Rostliny reagují na sucho a přizpůsobují se mu díky reakcím na morfologické, biochemické a fyziologické úrovni. Tolerance vůči suchu je definována jako schopnost rostlin růst, kvést a dosáhnout ekonomického výnosu i přes nedostatek vody. Suchý stres ovlivňuje procesy v rámci jednotlivých buněk, pletiv a celých orgánů, což způsobuje specifické a nespecifické reakce, poškození struktur, ale také zapříčiňuje mechanismy adaptace (Beck *et al.*, 2007).

V rámci morfologických mechanismů zahrnuje tolerance rostlin vůči suchému stresu tři základní mechanismy. Rostliny mohou před působením sucha tzv. „utéct“. Při tomto mechanismu dochází u rostlin ke zkrácení životního cyklu nebo vegetačního období, rostliny dokáží reprodukovat ještě před působením sucha. Doba kvetení je v rámci krátkého životního cyklu důležitou vlastností související s adaptací na stresové podmínky (Araus *et al.*, 2002). Jako další mechanismus se uplatňuje „vyvarování se“ suchu prostřednictvím regulace ztráty vody. Do těchto procesů se zahrnují děje jako je kontrola transpirace a zachování příjmu vody skrze kořenový systém rostliny (Turner *et al.*, 2001; Kavar *et al.*, 2007). Znaky kořene, jako je biomasa, délka, tloušťka a hloubka, jsou hlavními charakteristikami tohoto mechanismu, které přispívají ke konečnému výnosu v podmínkách sucha (Subbarao *et al.*, 1995; Turner *et al.*, 2001). Jako poslední mechanismus se uplatňuje fenotypová flexibilita, pomocí které rostliny dokáží limitovat počet listů u nadzemní části rostliny a tím regulovat aktuální vodní stav (Schuppler *et al.*, 1998). Protože jsou kořeny jediným zdrojem pro získání vody z půdy, jsou u nich důležité vlastnosti jako je růst, hustota kořenového systému a jeho velikost (Kavar *et al.*, 2007).

Regulace osmotického potenciálu, působení antioxidantů, růstových regulátorů a membránová stabilita jsou zahrnuty ve fyziologických mechanismech rezistence k suchu. Udržení vhodného vodního statusu v rostlinných pletivech může být dosaženo nastavením správného osmotického potenciálu a/nebo změnami v elasticitě buněčných membrán. Tyto faktory jsou důležité pro udržení fyziologické aktivity po delší dobu trvání sucha (Kramer a Boyer, 1995). Antioxidační obranný systém v rostlinných buňkách tvoří enzymatické i neenzymatické složky. Mezi enzymatické složky patří superoxid dismutasa, katalasa, peroxidasa a glutathion reduktasa. Neenzymatické složky tvoří cystein, redukovaný glutathion a ABA (Gong *et al.*, 2005). Růstové regulátory, aplikovány externě, a fytohormony, produkovány buňkami, jsou látky, které ovlivňují fyziologické procesy rostlin, a to už ve velmi nízkých koncentracích (Morgan, 1990). Oba tyto pojmy jsou použity zaměnitelně, zvláště když se jedná o auxiny, gibereliny,

cytokininy, ethylen a ABA (Taiz a Zeiger, 2006). Při působení sucha dochází k poklesu endogenního obsahu auxinů, giberelinů a cytokininů, zatímco u ABA a ethylenu se jejich obsah zvyšuje (Nilsen a Orcutte, 1996). Biologické membrány jsou prvním cílem mnoha abiotických stresů. Je obecně uznáváno, že udržování integrity a stability membrán při působení vodního stresu je hlavním faktorem odolnosti u rostlin (Bajji *et al.*, 2002). Dhanda *et al.* (2004) ukázali, že membránová stabilita u segmentu listu pšenice byla jedním z nejdůležitějších znaků pro analýzu odolnosti rostlin proti suchu.

Molekulární mechanismy zahrnují změny genové exprese v rámci odpovědi na nedostatek vody. Různé geny jsou indukovány v reakci na suchu na úrovni transkripce. Předpokládá se, že jejich genové produkty hrají úlohu při toleranci vůči suchu (Kavar *et al.*, 2007). Genetická exprese může být spuštěna přímo za podmínek stresu nebo je výsledkem sekundárního působení a/nebo je reakcí na škody způsobené stresem. Je však známo, že tolerance vůči suchu je složitým fenoménem zahrnujícím společné působení mnoha genů (Agarwal *et al.*, 2006, Cattivelli *et al.*, 2008). Obecné reakce na stres zahrnují detekci stresu a následnou signalizaci přes redoxní systém, kontrolní body zastavující buněčný cyklus a procesy opravy deoxyribonukleové kyseliny stimulované v reakci na poškození DNA. Signalizační dráhy spojené se snímáním stresu a aktivací obranných procesů jsou složité. Předpokládá se, že zahrnují reaktivní kyslík, vápník, proteiny regulované vápníkem, reakce mezi různými transkripčními faktory a mitogenem aktivované protein kinasy (Kovtun *et al.*, 2000, Chen *et al.*, 2002). Chemické látky jako jsou ROS, vápník a rostlinné hormony se podílejí na indukci stresové tolerance působením signálních kaskád (Joyce *et al.*, 2003) (Obr. 2). Mitogenem aktivované protein kinasy jsou důležitými mediátory při přenosu signálu, spojují rozpoznání vnějších stimulů s buněčnými odezvami. Právě MAP kinasové kaskády se podílejí na signalizaci v rámci různých stresů, včetně působení sucha (Wrzaczek a Hirt, 2001).



Obr. 2 Navrhované buněčné procesy a signalizační kaskády v rostlinné buňce reagující na stres ze sucha (Farooq *et al.* 2009). Suchý stres aktivuje signalizační kaskády, pravděpodobně přes kyselinu abscisovou (ABA), peroxid vodíku (H_2O_2) a vápník (Ca^{2+}). Tyto signály aktivují syntézu specifických proteinových kinas, které regulují další procesy v buňkách (např. expresi genů). Reakce signalizující kaskády vedou také ke změnám v metabolismu rostlin včetně aktivace a syntézy antioxidantů, syntézy a akumulace osmoprotektantů a jiných metabolicky významných látek a vede také k uzavření průduchů při akutním suchém stresu.

2.2.3 MAP kinasové moduly v reakci na sucho

V porovnání s dalšími stresy je sucho jedním z hlavních environmentálních faktorů, omezuje produktivitu a distribuci rostlin (Boyer, 1982; Mahajan a Tuteja, 2005). Bylo identifikováno mnoho genů reagujících na stresové podmínky a jejich změněná genová exprese hraje důležitou roli v odolnosti rostlin proti suchu (Zhu, 2002; Li *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2009). Rostlinné MAP kinyasy se podílejí při působení sucha na regulaci transkripce a ovlivňují tak genovou expresi a efekty nedostatku vody (Sinha *et al.*, 2011). Úlohy těchto signálních drah jsou široce studovány a je známo, že jsou spojeny s aktivitou sekundárních posílů (ROS, ABA, Ca^{2+}) (Smékalová *et al.*, 2013).

2.2.3.1 MAP kinyasy dvouděložných rostlin

Mezi nejvíce studované dvouděložné rostliny patří Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), u kterého jsou známy různé MAP kinyasy pro svou funkci při odpovědích na suchý stres. ABA působí jako rostlinný fytohormon a látka regulující

zavírání průduchů a dormanci semen. V souvislosti s MAP kinasami bylo zjištěno, že inhibitor MAP2K, PD98059, byl schopen snížit ABA-indukované zavírání průduchů. Tyto výsledky naznačují, že MAP kinasová kaskáda může působit v rámci signalizace zprostředkované ABA (Burnett *et al.*, 2000). Další výsledky při analýze MPK3 potvrdily, že u RNAi (RNA interference) linií byla ovlivněna činnost ABA, což u rostlin narušilo mechanismus otevírání průduchů (Gudesblat *et al.*, 2007). Data získaná pomocí kvasinkového dvouhybridního systému ukázala, že ABI1 (ABA-INSENSITIVE 1) jako člen PP2C (protein fosfatasa 2C) rodiny fungující v ABA signalizaci interaguje *in vitro* s MPK6 (Leung *et al.*, 2006). Ortiz-Masia *et al.* (2007) získali důkaz aktivace MAP kinas pomocí ABA. S použitím expresního systému protoplastů u *Arabidopsis* odhalili MPK1 a MPK2 jako kandidáty zprostředkovávající signalizaci ABA v rostlinných buňkách. Otevírání a zavírání průduchů při odpovědi na sucho je také regulováno MPK9 a MPK12, které jsou přednostně exprimovány v buňkách průduchů (Jammes *et al.*, 2011). Rostliny s nadexpresí MKK4 vykazovaly při analýze působení suchého stresu lepší schopnost udržení vody oproti rostlinám divokého typu (Kim *et al.*, 2011). Tyto výsledky naznačují, že MPK3 jako cíl fosforylace MKK4 v MAP kinasové kaskádě může rovněž figurovat v odpovědích na vodní deficit. MAPKKK18 reguluje senescenci a odpovědi na ABA (Danquah *et al.*, 2015; Matsuoka *et al.*, 2015; Mitula *et al.*, 2015). U mutantů *Arabidopsis* s vyřazeným genem *MAPKKK18* se objevila zvýšená citlivost na suchý stres, kdežto u rostlin se zvýšenou expresí *MAPKKK18* docházelo k rezistenci vůči suchu. Další analýzy vedly k výsledkům, že právě MAPKKK18 působí jako „upstream“ regulátor pro MAPKK3, která funguje jako pozitivní regulátor rezistence vůči suchu u *Arabidopsis* (Li *et al.*, 2017). EDR1 (enhanced disease resistance 1), jako člen skupiny MAP3 kinas, působí u *Arabidopsis* jako negativní regulátor rezistence k chorobám a suchu (Frye *et al.*, 2001; Tang *et al.*, 2005). U mutantů *edr1* s defektním genem pro kinasu *EDR1* byla pozorována zvýšená tolerance proti patogenům a odolnost rostlin na suchý stres.

Zhang *et al.* (2013) uvádějí, že u rostlin tabáku (*Nicotiana tabacum*) bylo při jejich studii indukováno suchým stresem šest NtMP kinas. V signalizační kaskádě působily u tohoto stresu kinasy NtMPK1 (někdy uváděná jako NtMPK4), NtMPK3, NtMPK9, NtMPK10, NtMPK14 (Ntf3) a NtMPK15.

U bavlníku (*Gossypium hirsutum*) jsou při působení sucha zapojeny v organismu geny *GhMPK2* a *GhMPK16*. U transgenních rostlin tabáku se zvýšenou expresí *GhMPK2* se projevovala snížená rychlost ztráty vody a rostliny zároveň vykazovaly zvýšenou

toleranci vůči suchu a soli. Pomocí Northern blotu byla pak provedena analýza, která indikovala, že kinasa GhMPK2 byla indukována ABA a abiotickým stresem (Zhang *et al.*, 2011). Pro ověření působení GhMPK16 se připravily transgenní rostliny *Arabidopsis*, které při zvýšené expresi *GhMPK16* poskytovaly rostlinám rezistenci vůči některým houbovým a bakteriálním patogenům. Zároveň však tyto rostliny byly citlivé k suchu a akumulaci H₂O₂ (Shi *et al.*, 2011). Data z analýzy GhRaf19, MAPKKK Raf-typu, ukazovala, že exprese *GhRaf19* byla inhibována aplikací PEG a NaCl a indukována chladem a H₂O₂. Při umlčení genu docházelo u rostlin bavlníku ke zvýšení tolerance vůči suchému stresu a stresu ze soli, akumulace ROS byla snížena a exprese ROS-příbuzných genů byla zvýšena. V souladu s těmito výsledky se provedly hodnocení u transgenních rostlin *N. benthamiana*, kde nadměrná exprese GhRaf19 snížila toleranci vůči suchu a soli. Rostliny bavlníku s umlčeným genem *GhRaf19* vykazovaly sníženou odolnost vůči chladu, tento účinek koreloval s akumulací ROS. Naproti tomu nadměrná exprese GhRaf19 v *N. benthamiana* zvýšila odolnost vůči chladu indukovaním vyšších hladin exprese a aktivity antioxidantních genů / enzymů souvisejících s ROS. Tyto výsledky naznačují, že GhRaf19 u bavlny negativně reguluje toleranci vůči suchu a soli a pozitivně reguluje odolnost proti chladu modulací ROS (Jia *et al.*, 2016).

U sóji (*Glycine max*) byla zjištěna aktivita MAP kinas spojená s mykorhizou. Liu *et al.* (2015) ukazují, že existují souvislosti mezi mykorhizou a působením suchého stresu v signalizační MAP kinasové kaskádě. Analýza odhalila, že přítomnost AMF (arbuscular mycorrhizal fungi) a sucha v testovaném systému ovlivnilo expresi GmMAPK2, GmMAPK5 u sóji a GiMAPK1 u houby (*Glomus intraradices*), což naznačuje, že houbové a rostlinné MAP kinasové cesty nefungují při mykorhize nezávisle.

Analýza působení suchého stresu v přírodních podmínkách a stresu vyvolaného pomocí PEG u brukve (*Brassica napus*) u BnMAPK1 svědčila o vlivu této kinasy na odolnost rostlin (Weng *et al.*, 2014). V porovnání s divokým typem rostlin se u linií s nadprodukcí BnMAPK1 vyskytla zvýšená odolnost proti suchu. Při dalším srovnání měly transgenní semenáčky vyšší obsah listové vody, vyšší kořenovou aktivitu, mírně vyšší aktivitu peroxidasy a superoxid dismutasy, vyšší obsah prolinů a nižší obsah malondialdehydu (MDA).

Pro studium působení sucha u rajčat byly umlčeny geny *SpMPK1*, *SpMPK2* a *SpMPK3* u rostlin divokého typu (*Solanum pimpinellifolium*) s použitím metody VIGS (virus-induced gene silencing) (Li *et al.*, 2013). Výsledky naznačily, že umlčení jednotlivých genů nebo jejich společné umlčení snižuje u rostlin odolnost vůči deficitu

vody. Společné umlčení genů *SpMPK1* a *SpMPK2* narušilo procesy spojené se systémem uzavírání průduchů a zvýšilo produkci H_2O_2 . Podobné výsledky byly pozorovány u rostlin s umlčeným genem *SpMPK3*, ale nikoliv v případě umlčení samostatných genů *SpMPK1* a *SpMPK2*. Tyto údaje naznačují, že funkce *SpMPK1* a *SpMPK2* jsou nadbytečné a překrývají se s funkcí *SpMPK3* v signálních drahách při působení sucha.

2.2.3.2 MAP kinasy jednoděložných rostlin

U skupiny jednoděložných rostlin jsou v rámci analýzy MAP kinasových drah studovány rostliny jako je například rýže (*Oryza sativa*), proso (*Panicum virgatum*), kasie (*Senna italica*), čirok (*Sorghum bicolor*) a kukuřice (*Zea mays*). Studie provedená podle Mohanta *et al.* (2015) ukázala, že rýže obsahuje 17 MAP kinas místo původních 15, jak se uvádělo původně. V porovnání s dalšími jednoděložnými rostlinami obsahuje nejvíce MAP kinas ve svém genomu proso (De *et al.*, 2010).

U rýže v rámci sucha působí *OsMPK3*, *OsMPK4*, *OsMPK7*, *OsMPK14*, *OsMPK20-4* a *OsMPK20-5* (Shen *et al.*, 2012). *OsMPK5* je zahrnuta v odpovědích v reakci na sucho, dále pak na solný a chladový stres (Xiong a Yang, 2003). U této plodiny bylo dále zjištěno, že *MPKK10.2* poskytuje rezistenci vůči patogenu *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzicola* (*Xoc*) a zároveň zvyšuje toleranci vůči působení suchého stresu prostřednictvím fosforylace *MPK6* a *MPK3* (Ma *et al.*, 2017). Rostliny se zvýšenou expresí *MPKK10.2* vykazovaly zvýšenou rezistenci k *Xoc* a suchu, kdežto rostliny *MPKK10.2-RNAi* vykazovaly zvýšenou citlivost na tyto stresové podmínky. Zvýšená exprese *DSM1*, *MAPKKK* Raf-typu, poskytuje toleranci k dehydrataci a oxidativnímu stresu u semenáčků rýže (Ning *et al.*, 2010). Dále bylo zjištěno, že sucho ovlivňuje hladinu mRNA kinasy *OsMSRMK3* jakožto třetí MAP kinasy působící v rýži při odpovědích na více stresových stimulů (Agrawal *et al.*, 2003).

U kukuřice jako u další plodiny byla při působení sucha zaznamenána aktivita *ZmMPK3* (Wang *et al.*, 2010). Sun *et al.*, (2015) ve své studii identifikovali 20 *ZmMPK*, z nichž většina přednostně vykazovala expresi v reprodukčních pletivech a orgánech. Kromě toho se u 19 z 20 *ZmMP* kinas projevila odlišná exprese za podmínek působení soli, sucha, chladu a v přítomnosti ABA. Ačkoliv existuje jen málo důkazů o tom, že se MAP kinasy podílejí na regulaci rostlinné reprodukce, tato studie poukazuje na vazbu mezi rostlinnou reprodukcí a signalizací způsobenou abiotickým stresem. Funkce *MAP3* kinas jako prvních komponent kaskádové dráhy jsou u kukuřice stále neznámé. Bylo však identifikováno 71 *MAP3* kinas, z nichž 14 bylo nových, založených na výpočetní analýze

genomu kukuřice (Liu *et al.*, 2015). S pomocí RNA-seq analýzy se podařilo určit 5866 diferenciálně exprimovaných genů (DEG – differentially expressed genes), včetně 8 MAP3 kinas zapojených do odpovědí na stres ze sucha (Liu *et al.*, 2015).

Mezi další obiloviny patří ječmen (*Hordeum vulgare*), u kterého se také zkoumá působení MAP kinasových drah. Aminokyselinová sekvence HvMPK4 je z 94 % podobná sekvenci OsMPK4 u rýže. Analýza u rostlin ječmene ukázala, že HvMPK4 působí jako zprostředkovatel při odpovědích na biotické a abiotické stimuly. Pro testování byly použity technologie antisense a strategie nadexprese genu. Rostliny se zvýšenou expresí *HvMPK4* genu byly odolnější vůči soli. Je možné, že tyto linie dokáží projevit odolnost i vůči působení sucha, k tomuto tvrzení jsou však nutné další analýzy (Abass a Morris, 2013).

2.3 Genové inženýrství a příprava transgenních rostlin

Konvenční zemědělství je založeno na empirické selekci podle výnosu rostlin. Tento směr však není zdaleka optimální, protože výtěžek je kvantitativním znakem, vyznačuje se nízkou heritabilitou a vysokou interakcí genotypu s prostředím (Babu *et al.*, 2003). Pochopení fyziologických a molekulárních procesů může pomoci zaměřit se na klíčové vlastnosti, které omezují produktivitu. Takový přístup může doplnit běžné šlechtitelské programy a usnadnit pěstování plodin za účelem vyššího výnosu (Cattivelli *et al.*, 2008).

Genové inženýrství zahrnuje změnu kvalitativních a kvantitativních znaků přenášením požadovaných genů z jednoho organismu do druhého. Tato strategie je označována jako transgenní přístup (Gosal *et al.*, 2009). Na rozdíl od klasického zemědělství umožňuje transgenní přístup začlenění pouze specifických klonovaných genů a omezuje přenos nežádoucích genů z donorového organismu. Pomocí tohoto přístupu lze také dosáhnout pyramidace genů s podobnými účinky. Rychlý pokrok v technologii rekombinantní DNA a vývoj přesných a účinných protokolů přenosu genů vedly k efektivní transformaci a generování transgenních linií u řady druhů plodin (Gosal *et al.*, 2009).

Rostlinné MAP kinasy jsou aktivovány biotickým a abiotickým stresem. Jejich dráhy jsou indukovány již během několika minut působení stresu a ovlivňují mnoho procesů v rostlinné buňce. Podílejí se na regulaci transkripce díky interakci s transkripčními faktory, mohou však také regulovat jiné proteiny přímo v cytoplasmě. MAP kinasy samotné ale i jejich cílové proteiny mohou být identifikovány pomocí transkriptomických, proteomických nebo fosfoproteomických analýz. Modifikace těchto signálních drah mohou přispívat ke zvyšování odolnosti rostlin v rámci působení mnoha

rozličných vnějších stimulů, a proto jsou MAP kinasy důležitými kandidáty pro studium mechanismů a tolerance rostlin vůči různým stresovým podmínkám (Šamajová *et al.*, 2013b).

2.3.1 Metody přípravy transgenních rostlin

Příprava transgenních rostlin je pro mnoho druhů v dnešní době už rutinním procesem. Transgeny se do organismů vpravují za účelem získání nových vlastností, zvýšení obsahu nutričních prvků, získání tolerance vůči znečišťujícím látkám a rezistence vůči patogenům či pro studium metabolismu látek. V současné době je možné vkládat geny z rostlin evolučně vzdálených od hostitelské rostliny, stejně jako z hub, virů, bakterií a dokonce i zvířat (Rivera *et al.*, 2012). Metody pro genetickou transformaci jsou obvykle rozděleny na nepřímou a přímou transformaci (Rao *et al.*, 2009).

Nepřímé metody zahrnují vektorem zprostředkovaný přenos genů. Pro tyto transformace se používají bakteriální plasmidy nebo rostlinné virové vektory. Nejvíce používaným mikroorganismem v rostlinné transformaci je *Agrobacterium tumefaciens* (Zupan *et al.*, 2011). Tato fytopatogenní bakterie je schopná přenášet část své DNA, označované jako transferová DNA (T-DNA), do genomu rostlinných buněk. Charakteristickým znakem rostlin infikovaných divokými kmeny *A. tumefaciens* je tvorba nádorů díky zvýšené produkci auxinů a cytokininů v rostlinných pletivech (Meyers *et al.*, 2010). Při řízené transformaci rostlin jsou geny indukující tvorbu nádorů v T-DNA nahrazeny genem zájmu a požadovaný gen je poté vpraven *Agrobacteriem* do hostitelské rostliny namísto onkogenů.

Mezi přímé metody se řadí elektroporace, biolistika, vakuová infiltrace, použití ultrazvuku nebo silikon karbidových vláken, mikroinjekce a makroinjekce (Rivera *et al.*, 2012).

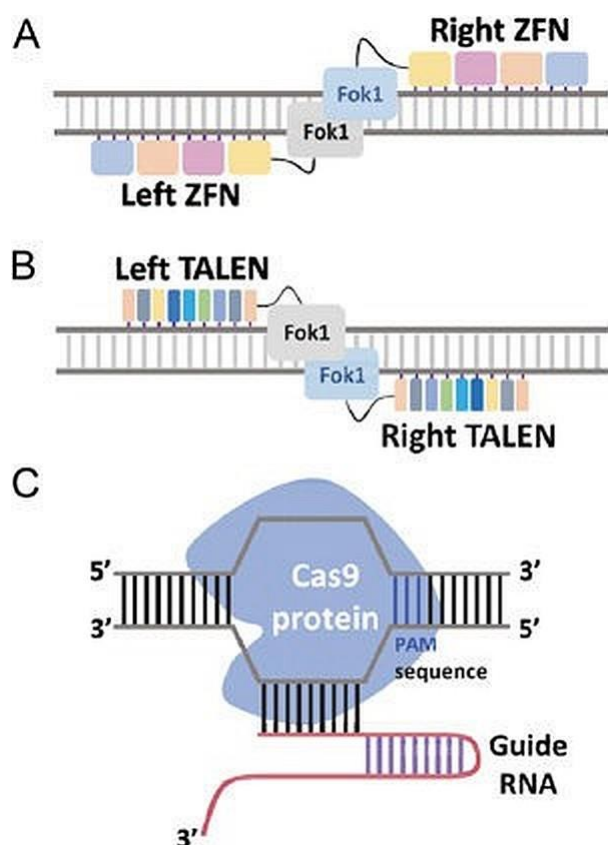
2.3.2 Modifikované rostliny s cílenými editacemi genomu

Genetická variabilita je klíčovým zdrojem pro zlepšení vlastností rostlin. V posledních letech se objevily nové techniky, které umožňují cílenou manipulaci prakticky s jakýmkoli genem u různých typů buněk a organismů. Nové technologie jsou označovány jako editace genomu. Editace genomu jsou cílené modifikace sekvence DNA v živých buňkách. Využívá se přidání, odstranění, nahrazení nebo jiná modifikace stávající sekvence DNA, a to s pomocí specifických nukleas (Germini *et al.*, 2018). Základem těchto modifikací, je vytvoření dvouřetězcového zlomu (DSB – double-strand

break) v cílovém místě DNA, jehož následná oprava zapříčiní požadovanou modifikaci skrze nehomologní spojování konců chromosomů (NHEJ – nonhomologous end-joining) nebo homologní rekombinaci (HR – homologous recombination) (Shalem *et al.*, 2015). Běžně používané systémy editace genomu jsou zobrazeny na Obr. 3. Náhodné inserce nebo delece v kódující oblasti genu během NHEJ vedou ke změně posunu čtecího rámce a vyřazení genu z činnosti, tímto způsobem vznikají tzv. „knockout“ geny. Editace genomu pomocí těchto technologií může například přispět ke zlepšení chuti a zvýšení obsahu cukrů u rajčat, může dále přispět k většímu výnosu v suchých podmínkách u kukuřice nebo může být využita pro získání rezistentní pšenice vůči různým plísňovým a houbovým chorobám (Wang *et al.*, 2014; Shi *et al.*, 2017; Tieman *et al.*, 2017).

První z řady navržených byla nukleasa ZFN (Zn-finger nuclease), když byla v roce 1991 (Pavletich a Pabo, 1991) k DNA vazebné doméně s motivem zinkových prstů (Zn fingers) přidána doména *FokI*. *FokI* je nespecifická bakteriální restriční endonukleasa, která pro štěpení dvouřetězcové DNA vyžaduje interakci dvou podjednotek (domén) – dimer *FokI* (Kim *et al.*, 1996). ZFN dimery se váží na DNA a vytváří DSB. Zlom následně indukují opravné mechanismy, které vytvářejí v daném lokusu modifikace. Vazebná specifita navržené Zn-finger jednotky rozhoduje o místě vazby celé ZFN na dané místo v genomu (Gaj *et al.*, 2013). Pole 4-6 vazebných modulů vytváří jednu Zn-finger jednotku. Každý modul rozeznává kodon, takže se každý modul váže specificky vždy na 3 nukleotidy. ZFN dimery dohromady identifikují jedinečnou sekvenci DNA o délce 18-24 bp (base pair – párů bází) a dimer *FokI* vytvoří zlom. Přírodně vyskytující se *FokI* nukleasy štěpí jenom jedno vlákno dvouřetězcové DNA, proto se používají pro vytvoření úplných zlomů dimery (Pabo *et al.*, 2001). ZFN jsou úspěšně využívány při genové modifikaci různých rostlin, příkladem je sója, tabák nebo kukuřice (Curtin *et al.*, 2011; Ainley *et al.*, 2013; Baltes *et al.*, 2014).

Jako další se využívají v editaci genomu TALENY indukované mutace (TALENs – transcription activator-like effector nucleases). TAL efektor nukleasy byly získány fúzí *FokI* s třídou specifických TAL efektorů vázajících se na DNA. Při použití párů TAL efektor nukleas dochází ke zlomu na cílové sekvenci DNA (Christian *et al.*, 2010). Ve srovnání se ZFN se TALENY na DNA nevážou pomocí kodonů, ale přes jednotlivé nukleotidy v rámci 30 tandemových repetitivních 33-35 aminokyselinového sekvenčního motivu TAL efektorových proteinů (Arora a Narula, 2017). Několik rozsáhlých systematických studií využívajících různé způsoby navržení struktur ukázalo,



Obr. 3 Nukleasy používané při editaci genomu (Shim *et al.* 2017). Při editaci genomu jsou používány systémy ZFN (A), TALEN (B), and CRISPR/Cas9 (C). U ZFN (A) dochází k vazbě na DNA pomocí tripletů, součástí systému jsou i *FokI* nukleasy. TALENY (B) rozpoznávají na DNA každý samostatný nukleotid, opět jsou v systému *FokI* nukleasy. S metodou CRISPR/Cas9 (C) se využívá komplexu sgRNA/Cas9, který nasedá na DNA po rozpoznání místa PAM.

že repeticity TAL efektorů mohou být kombinovány k rozpoznání prakticky jakékoli uživatelem definované sekvence (Reyon *et al.*, 2012).

Jako nejvíce perspektivní se v poslední době jeví systém CRISPR/Cas9. Jedná se o systém, který si během evoluce vyvinuly některé bakterie a archea na obranu proti virům (Cong *et al.*, 2013). CRISPR/Cas9 (CRISPR – clustered regulatory interspaced short palindromic repeats) jako jednoduchý a všestranný systém využívá sgRNA (single-guide RNA) v komplexu s nukleasou Cas9. Na DNA jsou tzv. PAM (protospacer adjacent motifs) úseky, což jsou místa, která jsou rozpoznávána sgRNA/Cas9 komplexem. Jakmile dojde k rozpoznání, komplex zapříčiní štěpení DNA a následně dochází k DSB. V případě, že není k dispozici žádný homologní templát pro mechanismus opravy, dochází k NHEJ (Arora a Narula, 2017). U systému CRISPR/Cas9 se očekává, že má v rostlinné biotechnologii značný potenciál kvůli své univerzálnosti, jednoduchosti a efektivitě (Bortesi a Fischer, 2015).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály

3.1.1 Rostlinný materiál

Pro práci byly použity kontrolní a transgenní rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise. Jako transgenní linie ječmene byly použity rostliny se zvýšenou expresí *HvMPK3* genu (dále označované jako K3i rostliny) a s vyřazeným *HvMPK3* genem (dále označované jako Z1 rostliny).

Rostliny byly pěstovány nesterilně, půdní prostředí tvořila směs zahradnického substrátu a substrátu Sondermischung s příměsí perlitu. Pro pěstování byl využit skleník i fytotron za podmínek: skleník – den 20°C, 16 h světla a noc 18°C, 8 h světla a fytotron – den 15°C, 16 h světla a noc 12°C, 8 h světla. Kultivační podmínky u pokusů dynamiky ztráty vody se lišily, viz kapitola 3.2.7.1.

Seznam použitých transgenních linií K3i rostlin

Rostliny T1 generace z linií: 1-2, 2-2, 3-1, 4-5, 5-2, 6-2, 6-3, 7-3, 9-2, 10-1, 11-1

Rostliny T2 generace z linií: 3-1-1, 3-1-5, 4-5-1, 4-5-4, 4-5-7, 5-2-2, 5-2-8, 6-2-2, 6-3-5,
6-2-7

Seznam použitých transgenních linií Z1 rostlin

Rostliny T1 generace z linií: 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 6-2

Rostliny T2 generace z linií: 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12, 3-1-7, 11-2-14, 11-2-22, 14-1-1,
14-1-9

Rostliny T3 generace z linií: 11-2-14-4, 11-2-22-4, 14-1-1-9

3.1.2 Chemikálie a reagensie

Izolace DNA z listových segmentů

- Extrakční pufr
 - Sorbitol 0,35 mol·l⁻¹ - Sigma Aldrich
 - TrisHCl 0,1 mol·l⁻¹ (pH 8,0) - Sigma Aldrich
 - EDTA 5 mmol·l⁻¹ (pH 8,0) - Thermo scientific
- Lyzační pufr
 - TrisHCl 0,2 mol·l⁻¹ (pH 8,0) - Sigma Aldrich
 - EDTA 0,05 mol·l⁻¹ (pH 8,0) - Thermo scientific
 - NaCl 2 mol·l⁻¹ - Sigma Aldrich

- CTAB (cetyltrimethylamonium bromid) 2% - AppliChem
- Chloroform:isoamyl alkohol (24:1) - Sigma Aldrich
- Disulfid sodný 0,5% - AppliChem
- Ethanol 70% - Penta
- Isopropanol - Penta
- MilliQ H₂O
- RNAasa - Promega
- Sarkosyl 5% - Sigma Aldrich

Elektroforéza

- 6x Gel Loading Dye - Thermo scientific
- Agarosa - Sigma
- GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder - Thermo Scientific
- Midori green DNA Staining Solution - Advance DNA Stain Genetics
- TAE (Tris-acetát-EDTA)

Polymerasová řetězová reakce

- ABGene Absolute QPCR Rox Mix (AB1139)
- DNA templát
- ImmoMix™ - Bioline
- MilliQ H₂O
- Primery - V. B. C Biotech

Hygromycinový test

- Hygromycin B (50 mg/ml) - Thermo Scientific
- MilliQ H₂O

3.1.3 Přístroje

- Analytické váhy (XA 110/2X) - Radwag
- Centrifuga (Eppendorf® Minispin®) - Sigma Aldrich
- Chlazená centrifuga (Allegra 64R) - Beckman
- Dokumentační zařízení Geldoc™ EZ systém - Bio-Rad
- Horizontální agarosová elektroforéza - Bio-Rad
- Mlýnek pro homogenizaci vzorků (MM400) - Retsch

- MyCycler™ Personal Thermal Cycler - Bio-Rad
- NanoDrop Lite Spectrophotometer - Thermo Scientific
- StepOnePlus Real-Time PCR Systems - Thermo Scientific
- Thermal cycler T100™ - Bio-Rad
- Zdroj stejnosměrného napětí (PowerPac Basic) - Bio-Rad

Další pomůcky

- 96 jamková destička - Life Technologies
- Automatické pipety - Eppendorf
- Laboratorní digestoř (M 1200) - MERCI
- Laboratorní flowbox - MERCI
- Mikrozkuřavky - Eppendorf
- Předvážky (S1502) - BEL Engineering

3.1.4 Programy

- ImageLab software - Bio-rad
- Microsoft Excel
- Microsoft Power Point

3.2 Metody

3.2.1 Izolace genomické DNA

Pro izolaci DNA byly odebírány listy u rostlin, které měly 5-6 plně vyvinutých listů. Do mikrozkuřavky byla odebrána část listového segmentu a každý vzorek byl rychle zmrazen v kapalném dusíku. Poté byly vzorky zhomogenizovány pomocí kovových kuliček na mlýnku (2 min, 27 Hz). Ke každému vzorku homogenátu bylo přidáno 0,8 ml směsi extrakčního pufu, lyzačního pufu, sarcosylu (1:1:0,4) a disulfidu sodného (0,5 % w/v). Vzorky byly inkubovány 60 min při teplotě 65°C a každých 20 min promíchány převrácením mikrozkuřavek. Po inkubaci se vzorky nechaly stát 5 min při pokojové teplotě (cca 20°C). Ke každému vzorku bylo přidáno množství 0,8 ml směsi chloroform:isoamyl alkohol (24:1). Mikrozkuřavky byly následně čtyřikrát třepány po dobu 15 s, aby došlo ke smísení látek. Vzorky se nechaly centrifugovat 15 min při 4°C a 12 000 g. Následně byly vzorky umístěny na led a byl odebrán supernatant. Množství 0,4 ml supernatantu odpovídalo přidání 0,28 ml isopropanolu. Opakovaným převrácením mikrozkuřavek se směsí vzorku s isopropanolem došlo ke zviditelnění nukleových

kyselin. Vzorky se nechaly centrifugovat 9 min při pokojové teplotě a 12 000 g. Veškerý supernatant byl odebrán a peleta byla promyta v 1 ml 70% ethanolu. Vzorky se opětovně nechaly centrifugovat 9 min při pokojové teplotě a 12 000 g. Po odstranění ethanolu se pelety nechaly vysušit. Do každé zkumavky bylo přidáno 50 μl milliQ H_2O s RNAsou (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$). DNA se nechala rozpustit a uskladnila při teplotě -20°C .

3.2.2 Polymerasová řetězová reakce

Pro genotypování rostlin byla izolovaná DNA naředěná 18 krát (34 μl H_2O + 2 μl DNA). Pro transgenní rostliny K3i byly použity markery genjK3 a hyg. Pro transgenní rostliny Z1 byly použity markery jK3Zgr a hyg. Polymerasová řetězová reakce (Polymerase Chain Reaction – PCR) se uskutečnila s rozdílnými protokoly pro každé transgenní rostliny zvlášť. Kompletní seznam použitých markerů a primerů je uveden v Tab. 1. Pro K3i rostliny je chemické složení PCR reakce pro marker genjK3 uvedeno v Tab. 2, pro marker hyg se nachází v Tab. 4. Pro Z1 rostliny je složení PCR reakce pro marker jK3Zgr uvedeno v Tab. 3, pro marker hyg je popsáno v Tab. 4. Teplotní rozdíly v rámci jednotlivých cyklů PCR jsou uvedeny v Tab. 5 a Tab. 6. Protokoly PCR reakce pro markery genjK3 a hyg byly shodné (objem 15 μl), lišil se pouze protokol pro marker jK3Zgr pro rostliny Z1 (objem 50 μl).

Před provedením reakce byl nejdříve připraven premix, který obsahoval milliQ H_2O , ImmoMix™ a jednotlivé primery (F – forward, R – reverse) v poměru pro cílový objem reakce (Tab. 2, Tab. 3 a Tab. 4). Koncentrace primerů v zásobním roztoku byla 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, ve vzorku byla poté 0,3 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Připravený premix byl napipetován opět v závislosti objemu reakce do 96 jamkové destičky a následně se přidala templátová DNA (13 μl premixu a 2 μl DNA na celkový objem 15 μl ; 46 μl premixu a 4 μl DNA na celkový objem 50 μl). Destička byla se všemi komponentami reakce uzavřena, vzorky se nechaly stočit a byla provedena PCR reakce na cykleru (byl použit My Cycler™ Thermal cycler nebo T100™ Thermal cycler).

Tab. 1 Seznam použitých PCR markerů a PCR primerů.

Název markeru	Název primerů	Sekvence	Velikost (bp)
genjK3	genjK3_F2	GCGCCTACGGGATCGTCT	350
	genjK3_R2	TCCCTCGTCTCGAAGTTCAT	350
jK3Zgr	jK3ZgrF2	CGGTTTGGTTCTTGGCTGTT	380
	jK3ZgrR2	ACCACAGAGCACCGACAGAT	380
hyg	hygF	ACTCACCGCGACGTCTGT	917
	hygR	GCGCGTCTGCTGCTCCAT	917

Tab. 2 Složení PCR reakce pro marker genjK3 pro jeden vzorek na celkový objem reakce 15 μ l pro rostliny K3i.

Název reagensie	Množství μ l na 1 reakci (celkem 15 μ l)
ImmoMix	7,5
MilliQ H ₂ O	5,41
Primer forward genjK3_F2	0,045 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
Primer reverse genjK3_R2	0,045 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
DNA templát	2

Tab. 3 Složení PCR reakce pro marker jK3Zgr pro jeden vzorek na celkový objem reakce 50 μ l pro rostliny Z1.

Název reagensie	Množství μ l na 1 reakci (celkem 50 μ l)
ImmoMix	25
MilliQ H ₂ O	20,7
Primer forward jK3ZgrF2	0,15 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
Primer reverse jK3ZgrR2	0,15 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
DNA templát	4

Tab. 4 Složení PCR reakce pro marker hyg pro jeden vzorek na celkový objem reakce 15 μ l pro rostliny K3i i Z1.

Název reagensie	Množství μ l na 1 reakci (celkem 15 μ l)
ImmoMix	7,5
MilliQ H ₂ O	5,41
Primer forward hygF	0,045 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
Primer reverse hygR	0,045 (finální koncentrace 0,3 μ mol \cdot l ⁻¹)
DNA templát	2

Tab. 5 Protokol pro PCR reakci s markerem genjK3 a hyg, objem 15 μ l (genjK3 pouze pro K3i, hyg pro K3i i Z1).

Fáze PCR	Teplota (°C)	Čas (min:s)	Počet opakování
Iniciační denaturace	95	10:00	1
Denaturace	95	00:05	1
Nasedání primerů	59	00:25	32
Polymerace	72	01:00	
Finální polymerace	72	01:00	
Skladování	8	∞	1

Tab. 6 Protokol pro PCR reakci s markerem jK3Zgr, objem 50 μ l (jK3Zgr pouze pro Z1).

Fáze PCR	Teplota (°C)	Čas (min:s)	Počet opakování
Iniciační denaturace	95	10:00	1
Denaturace	95	00:05	1
Nasedání primerů	61	00:25	29
Polymerace	72	00:30	
Finální polymerace	72	20:20	
Skladování	8	∞	1

3.2.3 Gelová elektroforéza

Po PCR reakci se pro hodnocení vzorků provedla agarosová elektroforéza. V závislosti na počtu a variantě vzorků se zvolila velikost i koncentrace agarosového gelu. Pro PCR produkty získané z genotypování Z1 rostlin se využil 1% gel, pro vzorky K3i rostlin byl připraven 1,6% gel. Na přípravu středně velkého 1% gelu bylo použito 75 ml 1xTAE a 0,75 g agarosy. Pro středně velký 1,6% gel bylo použito na 75 ml 1xTAE a 1,2 g agarosy. Pro velký 1,6% gel bylo smícháno 100 ml 1xTAE a 1,6 g agarosy. Tato směs byla ohřívána v mikrovlnné troubě v Erlenmeyerově baňce, dokud se všechna agarosa nerozpustila. Po rozpuštění byla baňka ponechána na krátkou dobu ve studené vodě a následně bylo přidáno barvivo Midori Green (na 75 ml se přidalo 3,75 μ l barviva, na 100 ml 5 μ l barviva). Roztok byl poté nalit do elektroforetické vany, přidal se hřebínek a gel se nechal ztuhnout. Po ztuhnutí se vana s gelem přenesla do elektroforetické aparatury a podle potřeby se doplnil roztok 1xTAE v aparatuře tak, aby byl gel úplně ponořený. Do první jamky se napipetovalo množství 3 μ l hmotnostního standardu GeneRulerTM 1 kb Plus. Do dalších jamek se pipetovaly vzorky, které byly barveny s pomocí 6x Gel Loading Dye. Na 7 μ l DNA byly použity 2 μ l barvičky. Samotná elektroforéza probíhala při napětí 80 V. Proces byl zastaven každých 20 minut a separace se kontrolovala pomocí dokumentačního zařízení GeldocTM EZ a softwaru Image lab.

3.2.4 Purifikace PCR produktů markeru jK3Zgr a sekvenace

Vybrané produkty PCR reakce získané amplifikací genomické DNA Z1 rostlin byly purifikovány a následně poslány na sekvenaci. Purifikace proběhla s použitím komerčního purifikačního kitu QIAquick PCR purification kit od firmy QIAGEN. Koncentrace DNA byla po přečištění stanovována na přístroji NanoDrop. Před samotným měřením a mezi měřeními jednotlivých vzorků se s pomocí milliQ H₂O a buničité vaty vždy vyčistil snímač přístroje. Přístroj byl nastaven pro měření cDNA a byla zjištěna koncentrace DNA u každého vzorku. Podle naměřených hodnot byla provedena příprava vzorků pro sekvenaci. Ke každému vzorku bylo přidáno 2,5 μl jK3ZgrR2 primeru. Celkový objem každého vzorku poté činil 10 μl. Sekvenace byla provedena firmou SEQme.

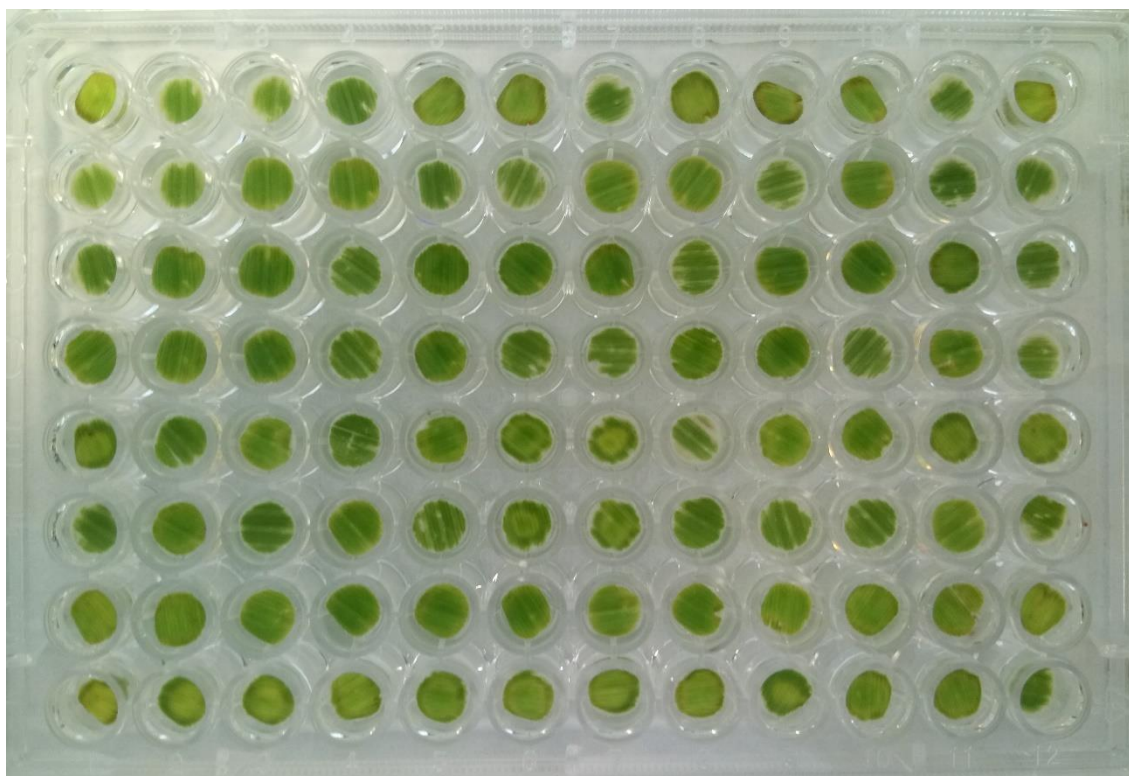
3.2.5 Multiplex TaqMan qPCR analýza

Pro provedení Multiplex TaqMan qPCR analýzy se použila 18 krát naředěná DNA. Analýza byla provedena s použitím primerů a sond specifických pro markery p35S a HvCon2 (Tab. 7). Vzorky byly připraveny pro reakci, jejíž celkový objem činil 10 μl. Bylo použito 5 μl ABGene Absolute QPCR Rox mixu (AB1139) s DNA polymerasou, 2,5 μl ředěné templátové DNA a 2,5 μl směsi primerů a sond. Koncentrace zásobního roztoku sond byla 10 μmol·l⁻¹. Finální použitá koncentrace sond a primerů byla 200 nmol·l⁻¹ na jednu reakci. Analýza proběhla na 96 jamkové destičce na přístroji StepOnePlus Real-Time PCR Systems. Podmínky PCR reakce byly: 50°C 2 min, 95°C 10 min (aktivace enzymu), 40 cyklů při 95°C 15 s a 60°C 60 s. Výsledky byly normalizovány pomocí 2^{-Δ(ΔC(T))} (Livak a Schmittgen, 2001) metody vůči hypotetické rostlině s jednou T-DNA inzercí v heterozygotní sestavě a data se vynesla do grafu.

Tab. 7 Sekvence primerů a sond pro Multiplex TaqMan qPCR analýzu.

	Název	Sekvence
Primery	p35SF	CGTCTTCAAAGCAAGTGGATTG
	p35SR	TCTTGCGAAGGATAGTGGGATT
	HvCon2F1	TGCTAACCGTGTGGCATCAC
	HvCon2R1	GGTACATAGTGCTGCTGCATCTG
Sondy	p35SP	6FAM-TCTCCACTGACGTAAGGGATGACGCA-TAMRA
	HvCon2P	VIC-CATGAGCGTGTGCGTGTCTGCG-TAMRA

3.2.6 *In vitro* test hygromycinové rezistence

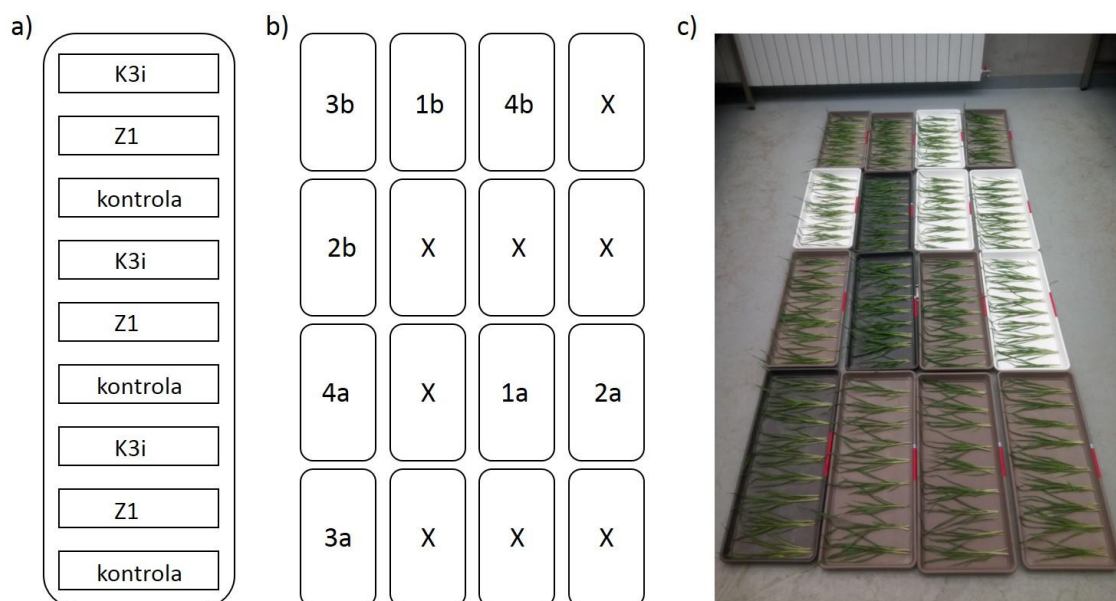


Obr. 4 Ukázka testu hygromycinové rezistence v 96 jamkové destičce.

Pro genotypování rostlin byl použit *in vitro* test hygromycinové rezistence. Test byl prováděn pomocí roztoku Hygromycinu B, který byl zředěn a pipetován do jednotlivých jamek na 96 jamkové destičce. Pro přípravu jedné destičky bylo použito 30 ml milliQ H₂O a 150 μ l Hygromycinu B – výsledná koncentrace Hygromycinu B v roztoku byla 250 μ g/ml. Do každé jamky bylo následně pipetováno 300 μ l připraveného roztoku. Pomocí biooptického průbojníku byly vyřezány z listů listové disky, které se umístily do jamek do roztoku na destičce (Obr. 4). Byly odebrány segmenty prvních listů od báze nebo od špičky listu u rostlin, které byly alespoň dva týdny staré. Destička se uzavřela, zalepila porézní páskou a nechala inkubovat při 21°C a světelném režimu 16 h světlo/8 h tma v kultivační komoře. Po pěti až sedmi dnech byly pozorovány výsledky. Podle zbarvení listových terčků bylo zjištěno, které rostliny nesou konstrukt hygromycinové rezistence a které rostliny tento konstrukt naopak postrádají.

3.2.7 Testování odolnosti rostlin na působení sucha

Pro fenotypovou charakterizaci rostlin se vyhodnocovala odolnost jedinců při působení sucha. Rostliny byly kultivovány ve fytotronu a ve skleníku při různých podmínkách.



Obr. 5 Schéma rozmístění plat při pokusech sledování dynamiky ztráty vody z rostlin: **a)** Schéma rozmístění jednotlivých rostlin na jednom platu, kontrolní rostliny se střídaly s rostlinami K3i a Z1. Na jednom platu bylo vždy devět rostlin. **b)** Schéma rozmístění plat na zemi v kóji ve skleníku. Bylo použito celkem osm plat, přičemž dvě plata v páru (příkladem 1a a 1b) obsahovala rostliny ze stejných mateřských rostlin. Pro každou mateřskou rostlinu bylo použito pro měření šest rostlin. Plata byla rozmístěna tak, aby se rostliny nenacházely u sebe. X charakterizuje plata nezahrnutá ve vyhodnocení. **c)** Fotografie znázorňující skutečné rozmístění plat na zemi v kóji ve skleníku.

Byla u nich měřena a vyhodnocována dynamika ztráty vody a při dalším testování bylo sledováno vadnutí rostlin v různých dnech od začátku působení sucha.

3.2.7.1 Sledování dynamiky ztráty vody

Pro sledování dynamiky ztráty vody byly použity měsíc staré K3i a Z1 rostliny a kontrolní rostliny. Rostliny byly prvních čtrnáct dní po vysetí ponechány ve fytotronu a poté byly přeneseny pro další kultivaci do skleníku. Den předem byly rostliny zality větším množstvím vody a pro samotné měření dynamiky ztráty vody byly rostliny v celé své délce ustřižnuty a rozmístěny na plata, která byla ponechána na zemi v kóji ve skleníku. Rozmístění rostlin na jednotlivých platech a umístění plat v kóji je znázorněno na Obr. 5. Charakterizováno bylo celkem 12 potomstev mateřských transgenních rostlin (sedm K3i rostlin a pět Z1 rostlin) a kontrolní rostliny. Pro každou mateřskou rostlinu bylo na základě testu hygromycinové rezistence vybráno pro měření šest rostlin potomstva. Měření proběhlo celkem ve dvou nezávislých pokusech, a to při různých teplotních podmínkách, které jsou uvedeny v Tab. 8. Pro měření ztráty vody byly použity laboratorní digitální váhy. Hodnoty byly zaznamenávány v různých časových

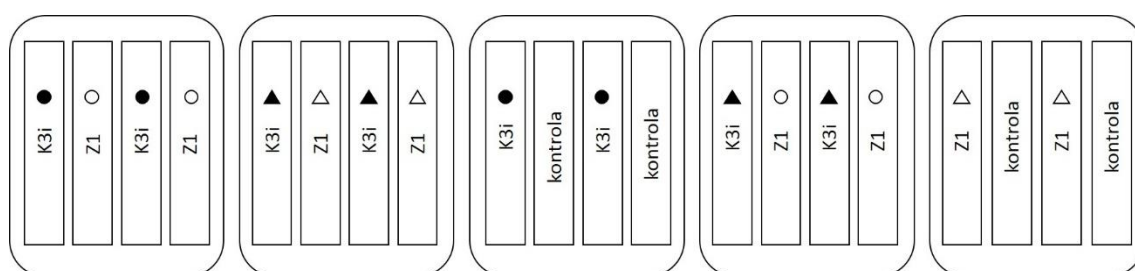
Tab. 8 Kultivační podmínky ve skleníku při sledování dynamiky ztráty vody u rostlin K3i, Z1 a kontrolních rostlin při prvním a druhém pokusu.

Podmínky při prvním pokusu		Podmínky při druhém pokusu	
Světlo/h	Teplota (°C)	Světlo/h	Teplota (°C)
Lampy/5-10	19	Lampy/5-10	15
Den/10-15	19	Den/10-15	15
Lampy/15-21	19	Lampy/15-21	15
Tma/21-5	14	Tma/21-5	12

intervalech. První měření bylo uskutečněno ihned po ustřihnutí rostlin a po jejich rozmístění na plata (čas 0 h). Měření probíhalo celkem sedm dní. Během prvních dvou dnů byly rostliny váženy 3 krát denně po 4 hodinách (ráno, v poledne, odpoledne), třetí a čtvrtý den 2 krát denně po 8 hodinách (ráno a odpoledne) a pátý a sedmý den pouze 1 krát denně (ráno). Naměřené hodnoty byly zpracovány v programu Microsoft Excel a výsledky vyneseny do grafů.

3.2.7.2 Vadnutí rostlin

Pro sledování efektu působení sucha byly použity měsíc staré kontrolní rostliny a vybrané rostliny K3i a Z1 linií. Pro pokus byly použity květináče naplněné stejným množstvím zeminy, aby byly zajištěny stejné podmínky pro všechny rostliny. Byly vybrány dvě transgenní K3i linie, dvě transgenní Z1 linie a kontrolní rostliny, které se sledovaly v podmínkách fytostronu. Rostliny byly vysety do pěti květináčů. Do každého zvlášť bylo zaseto celkem 40 semen, 20 semen z jedné linie (10 x 2) a 20 semen z druhé (10 x 2). Schematické znázornění je uvedeno na Obr. 6. Rostliny byly před působením stresu zality větším množstvím vody a poté se zalévat přestaly. V rámci působení sucha byly rostliny fotografovány a proběhlo u nich vyhodnocení na základě vizuálního porovnávání stupně vadnutí jednotlivých transgenních a kontrolních rostlin.



Obr. 6 Schéma rozmístění transgenních a kontrolních rostlin při pokusu vadnutí. Transgenní rostliny označené stejným symbolem znázorňují rozmístění potomků stejné mateřské rostliny v řádcích v různých květináčích.

4 VÝSLEDKY

V této práci byly charakterizovány transgenní linie ječmene se zvýšenou expresí *HvMPK3* genu (K3i rostliny) a s vyřazeným *HvMPK3* genem (Z1 rostliny). U jednotlivých transgenních linií proběhla preselekce pro vlastní experimenty na základě genotypování rostlin a stanovení počtu kopií transgenů. K tomuto účelu byly využity molekulárně genetické metody. Pro genotypování rostlin byla využita také metoda testu hygromycinové rezistence. Vybrané transgenní K3i a Z1 linie ječmene byly fenotypovány v podmínkách působení vodního stresu. V jednom typu experimentů byla u transgenních a kontrolních rostlin analyzována dynamika ztráty vody. Vodou saturovaná nadzemní část rostlin byla umístěna na plata a posléze vážena v časové řadě. Výsledné procentuální hodnoty úbytku vody byly vyneseny do grafu v závislosti na čase. Pro posouzení působení sucha byla také analyzována dynamika vadnutí transgenních a kontrolních rostlin. V rámci těchto experimentů byly rostliny v jednotlivých dnech působení sucha fotografovány a vizuálně hodnoceny.

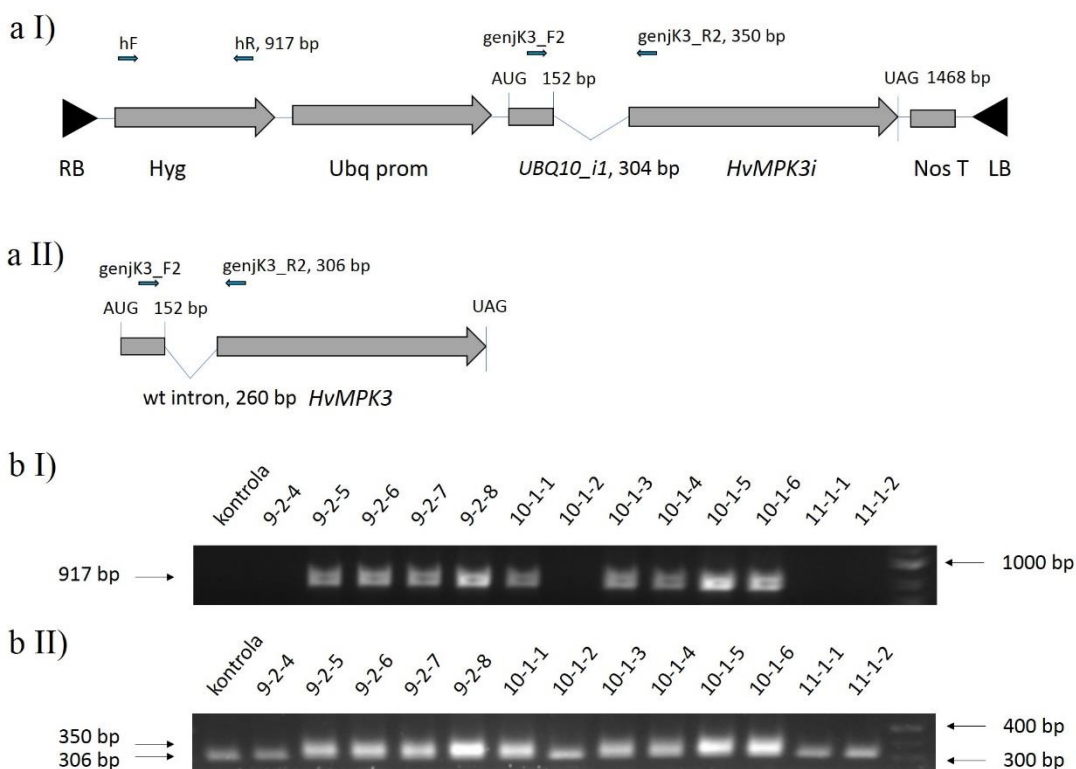
4.1 Molekulární charakterizace K3i a Z1 transgenních linií ječmene

Pro molekulární charakterizaci byla využita polymerasová řetězová reakce (PCR), Sangerova sekvenace, Multiplex TaqMan qPCR analýza a statistická verifikace segregace transgenů. Dílčím cílem práce bylo také ověření spolehlivosti genotypování rostlin pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence.

4.1.1 Molekulární charakterizace K3i linií

4.1.1.1 K3i rostliny T1 generace

Transgenní rostliny jsou označovány čísly podle následujícího schématu. Dvoučíslené označení rostlin, např. 9-2 odpovídá jednotlivým rostlinám T0 generace, trojčíslené např. 9-2-4 pak jednotlivým rostlinám T1 generace, čtyřčíslené např. 9-2-4-5 pak jednotlivým rostlinám T2 generace atd. První číslo je číslo kalusu, ze kterého byly rostliny odebrány. Rostliny s odlišnými prvními čísly jsou pak nezávislými transgenními liniemi. Pro charakterizaci transgenních linií ječmene s nadprodukcí *HvMPK3* genu byly vybrány rostliny T0 generace deseti nezávislých transgenních linií: 1-2, 2-2, 3-1, 4-5, 5-2, 6-2, 6-3, 7-3, 9-2, 10-1 a 11-1. Z těchto rostlin byly získány rostliny T1 generace, které byly podrobeny molekulární analýze pro vyhodnocení úspěšnosti transformace rostlin. Rostliny byly analyzovány pro přítomnost T-DNA kazety pro nadexpresi *HvMPK3* genu.



Obr. 7 Schéma konstruktů a molekulární charakteristika vybraných transgenních K3i rostlin. **a)** Schéma genotypování rostlin s nadexpresí *HvMPK3* genu. **a I)** Konstrukt pro expresi syntetického genu *HvMPK3i*. RB/LB – pravá/levá hranice T-DNA; Hyg – gen pro hygromycin; Ubq prom – ubikvitinový promotor; *UBQ10_i1* – intron z *Arabidopsis* s velikostí 304 bp; *HvMPK3i* – syntetický gen pro kinasu *HvMPK3*; Nos T – terminátor; modré šipky – nasedání odpovídajících primerů, které po PCR reakci poskytují produkty charakteristické velikosti; AUG – start kodon; UAG – stop kodon. **a II)** Schéma úseku genu rostlin divokého typu (*wt* – wild type). *Wt* intron s velikostí 260 bp; modré šipky – nasedání primerů (genjK3_F2/R2), které po PCR reakci poskytují produkt 306 bp; AUG – start kodon; UAG – stop kodon. Zobrazen je pouze první intron genu v pozici 152 bp. **b I)** Vzorový elektroforeogram genotypování vybraných K3i rostlin T1 generace pro detekci hygromycinového genu (produkt 917 bp). **b II)** Vzorový elektroforeogram genotypování vybraných K3i rostlin T1 generace pro detekci syntetického *HvMPK3i* genu. Rostliny obsahující T-DNA kazetu mají navíc proužek o velikost 350 bp.

Součástí této T-DNA kazety jsou hraniční oblasti – pravá a levá hranice (RB a LB), gen pro hygromycin (*hyg*), kukuřičný ubikvitinový promotor (*Ubq prom*) pro kontrolu exprese *HvMPK3i* a Nos T – terminátor (Obr. 7aI). *HvMPK3i* je syntetický cDNA gen, který v místě původního prvního *wt* intronu genu *HvMPK3* obsahuje intron *Arabidopsis UBQ10_i1* o velikosti 304 bp. Přítomnost tohoto transgenu je detekována PCR primery genjK3_F2/R2, které lemují intron *UBQ10_i1* a poskytují PCR produkt o velikosti 350 bp. V případě *wt HvMPK3* genu poskytují primery genjK3_F2/R2 PCR produkt o velikosti 306 bp (amplifikace původního *wt* intronu o velikosti 260 bp) (Obr. 7aII). Přítomnost hygromycinového genu je u transgenních rostlin detekována pomocí

primerů hygF/R, které poskytují PCR produkt o velikosti 917 bp (Obr. 7aI). Výsledky genotypování potvrdily přítomnost T-DNA kazety pro nadprodukcí *HvMPK3* u transgenních rostlin (Obr. 7 bI a 7 bII). V případě použití primerů genjK3_F2/R2 byly pro transgenní rostliny detekovány dva PCR produkty o očekávané velikosti 350bp – přítomnost transgenu *HvMPK3i* a 306 bp – přítomnost wt genu *HvMPK3*. Pro kontrolní rostliny a negativní sesterské rostliny transgenních rostlin (9-2-4 a 10-1-2) pak byl detekován výhradně PCR produkt o velikosti 306 bp – přítomnost wt genu *HvMPK3* (Obr. 7 bII). V případě použití primerů hygF/R byl PCR produkt o očekávané velikosti 917 bp detekován výhradně pro transgenní rostliny (Obr. 7 bI).

Celkem bylo pomocí PCR genotypováno 73 rostlin T1 generace potomků deseti nezávislých transgenních linií ječmene s nadprodukcí genu *HvMPK3*. Výsledky genotypování potvrdily přítomnost T-DNA kazety pro nadprodukcí *HvMPK3* celkem u 49 rostlin všech 10 nezávislých linií. Pro všech 49 rostlin byly získány PCR produkty o velikosti 350 bp a 306 bp v případě primerů genjK3_F2/R2 a současně PCR produkt o velikosti 917 bp v případě primerů hygF/R. Genotypování na přítomnost hygromycinového genu a syntetického transgenu *HvMPK3i* tak vykázalo 100% korelaci a nebyly nalezeny nekompletní T-DNA inserce. Z celkového počtu 73 rostlin bylo poté vyselektováno 44 rostlin 10 nezávislých linií pro kultivaci do další generace. Souhrnné výsledky genotypování jsou uvedeny v Tab. 9a-e.

Tab. 9a Genotypování transgenních rostlin T1 generace potomků K3i linií a jejich výběr pro kultivaci do další generace. Hyg – hygromycinový gen; *HvMPK3i* – *HvMPK3* transgen; + – rostlina byla kultivována do další generace; - – rostlina nebyla kultivována do další generace; 0 – absence PCR produktu; I – detekován jeden PCR produkt o očekávané velikosti; II – detekovány dva PCR produkty o očekávané velikosti. Bylo charakterizováno celkem 73 rostlin – 44 (+), 29 (-), 49 hyg (I), 49 genjK3 (II), 24 hyg (0), 24 genjK3 (I).

Rostliny	1-2-1	1-2-2	1-2-3	1-2-4	1-2-5	2-2-1	2-2-2	2-2-3	2-2-4	2-2-5	2-2-6	2-2-7	2-2-8	3-1-1	3-1-2
kultivace	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
hyg	I	I	0	I	I	0	0	0	0	0	0	0	0	I	I
<i>HvMPK3i</i>	II	II	I	II	II	I	I	I	I	I	I	I	I	II	II

Tab. 9b Genotypování transgenních rostlin T1 generace potomků K3i linií a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	3-1-3	3-1-4	3-1-5	3-1-6	3-1-7	4-5-1	4-5-2	4-5-3	4-5-4	4-5-5	4-5-6	4-5-7	4-5-8	5-2-1	5-2-2
kultivace	-	+	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	+
hyg	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	0	I	I	I
<i>HvMPK3i</i>	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	II	I	II	II	II

Tab. 9c Genotypování transgenních rostlin T1 generace potomků K3i linií a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	5-2-3	5-2-4	5-2-5	5-2-6	5-2-7	5-2-8	6-2-1	6-2-2	6-2-3	6-2-4	6-2-5	6-2-6	6-2-7	6-2-8	6-3-1
kultivace	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-
hyg	0	I	I	I	0	I	I	0	I	I	0	I	I	I	I
<i>HvMPK3i</i>	I	II	II	II	I	II	II	I	II	II	I	II	II	II	II

Tab. 9d Genotypování transgenních rostlin T1 generace potomků K3i linií a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

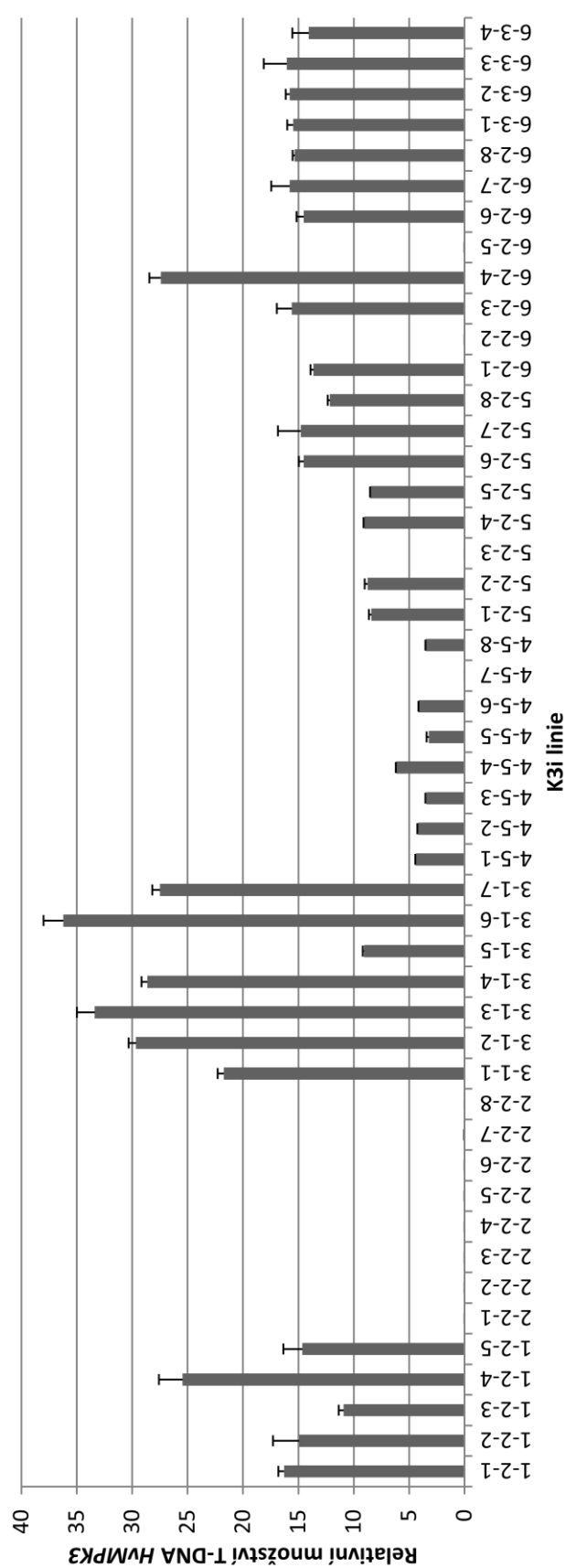
Rostliny	6-3-2	6-3-3	6-3-4	6-3-5	7-3-2	7-3-4	7-3-6	7-3-8	9-2-1	9-2-2	9-2-3	9-2-4	9-2-5	9-2-6	9-2-7
kultivace	+	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-
hyg	I	I	I	I	I	I	0	I	0	0	0	0	I	I	I
<i>HvMPK3i</i>	II	II	II	II	II	II	I	II	I	I	I	I	II	II	II

Tab. 9e Genotypování transgenních rostlin T1 generace potomků K3i linií a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	9-2-8	10-1-1	10-1-2	10-1-3	10-1-4	10-1-5	10-1-6	11-1-1	11-1-2	11-1-3	11-1-4	11-1-5	11-1-6
kultivace	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+
hyg	I	I	0	I	I	I	I	0	0	I	0	I	0
<i>HvMPK3i</i>	II	II	I	II	II	II	II	I	I	II	I	II	I

Pro odhad transgenního genotypu byla u transgenních rostlin provedena Multiplex TaqMan qPCR analýza, a to u potomků linií: 1-2, 2-2, 3-1, 4-5, 5-2, 6-2 a 6-3 (Obr. 8). Analyzovány byly ty rostliny, u kterých byla potvrzena přítomnost T-DNA pro nadprodukcí *HvMPK3* pomocí genotypování (viz výše). Výsledky byly normalizovány vůči hypotetické rostlině s jednou kopií transgenu v heterozygotní sestavě pomocí 2-(Delta Delta C(T)) metody a vyneseny do grafu. Analyzováno bylo celkem 48 rostlin, pro které získané výsledky naznačily, že většina linií má větší počet T-DNA inzercí, a to zejména potomstvo linií 1-2, 3-1, 6-2 a 6-3 (Obr. 8). Při této metodě nebyl bohužel analyzován spolu se vzorky DNA také vzorek DNA z kontrolní rostliny s jednou kopií transgenu v heterozygotní sestavě z důvodu její nedostupnosti. Nebylo tak možné přesněji odhadnout počet T-DNA inzercí v transgenních rostlinách. Analýza však měla informativní účinek pro odhad genotypu (homozygotní nebo heterozygotní sestava transgenu/transgenů) transgenních rostlin a byla využita jako pomocné kritérium pro selekci rostlin pro kultivaci do další generace (Tab. 9a-e). Pro další kultivaci byly vybrány především ty rostliny, které v případě výrazně vícekopiových linií měly nejmenší relativní množství T-DNA (např. rostlina 3-1-5) a v případě rostlin s nižším množstvím kopií pak rostliny s nejmenším relativním množstvím T-DNA (např. 4-5-1) i rostliny s přibližně dvojnásobným relativním množstvím T-DNA (např. 4-5-4), které mohly představovat potenciální homozygoty v T-DNA inzerci.

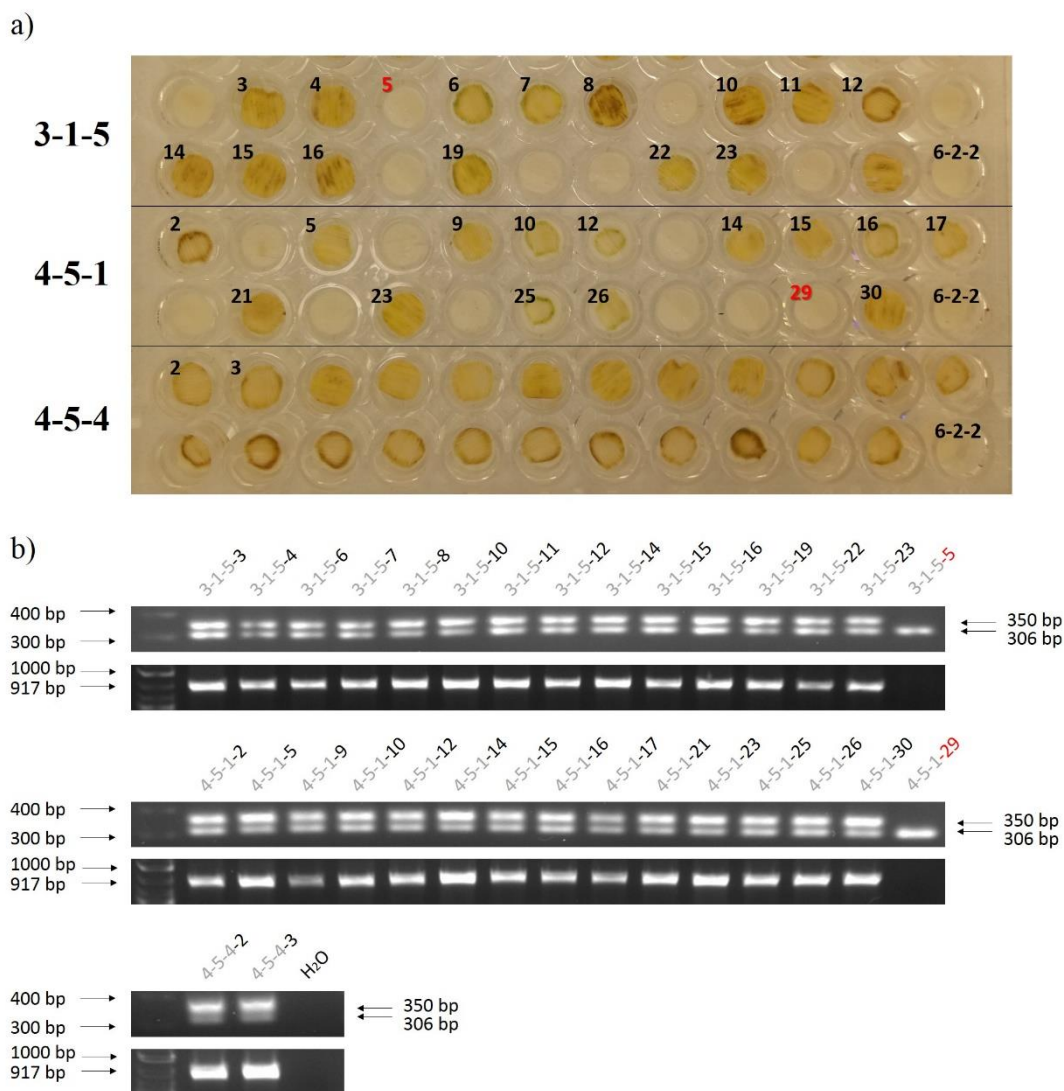
Odhad genotypu transgenních K3i rostlin T1 generace



Obr. 8 Odhad genotypu transgenních K3i rostlin T1 generace pomocí multiplex TaqMan PCR. Potomci rostlin 1-2, 3-1, 6-2 a 6-3 vykazovali největší relativní množství T-DNA ve srovnání s potomky rostlin 4-5, kteří vykazovali nejmenší relativní množství T-DNA. Potomci rostliny 2-2 jsou netransgenní – negativní kontroly analýzy.

4.1.1.2 K3i rostliny T2 generace

Pro další analýzu byly získány rostliny T2 generace potomků transgenních linií ječmene s nadprodukcí *HvMPK3* genu. Rostliny byly genotypovány a selektovány pro jejich následnou fenotypovou charakterizaci. Jako metoda genotypizace transgenních linií byla v této práci ověřována analýza rostlin pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Listové disky z rostlin obsahujících T-DNA kazetu s genem pro hygromycinovou rezistenci vykázaly při tomto testu rozdílný barevný výsledek oproti kontrolním rostlinám a rostlinám, které gen rezistence postrádaly (Obr. 9). Listové disky kontrolních rostlin a negativních sesterských rostlin byly působením hygromycinu vyběleny, zatímco listové disky pozitivních rostlin po působení hygromycinu zežloutly, případně výrazněji nekrotizovaly (Obr. 9a). Pro ověření spolehlivosti metody byla z rostlin vyizolována DNA a provedena PCR reakce s primery hygF/R pro hygromycinový gen a s primery genjK3_F2/R2 pro gen *HvMPK3* (Obr. 9b). Výsledky PCR-genotypování byly porovnány s destičkami obsahující listové disky jednotlivých analyzovaných rostlin (Obr. 9). U rostlin, pro které nebyla detekována přítomnost transgenu pomocí PCR reakce, došlo po 7 dnech kultivace k vybělení listového disku, zatímco disky transgenních rostlin (přítomnost 917bp a 350 bp PCR produktu) po 7 dnech kultivace zežloutly nebo nekrotizovaly. Pro všech 30 analyzovaných rostlin tak byla potvrzena 100% shoda mezi genotypováním pomocí PCR reakce a *in vitro* testem hygromycinové rezistence. Dále byla verifikována spolehlivost metody pro různé typy listového materiálu. U potomstva rostlin 3-1-1, 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4 byly listové disky vyřezány pomocí bioptického průbojníku z bazální části a zároveň ze špičky prvního listu. Kultivační destičky s tímto materiálem byly porovnány a vyhodnoceny. Výsledky ukázaly, že je metoda vhodná pro jakoukoli odebranou část prvního listu (Obr. 10). Získání pouze listové špičky poté umožňuje snazší odběr části rostliny a menší působení stresu při ustříhnutí pouze krátké koncové části listu. S pomocí této metody bylo v 96 jamkovém formátu možné charakterizovat velké množství transgenních rostlin. Výhodou metody je její jednoduchost a časová nenáročnost přípravy kultivačních destiček s listovými disky.

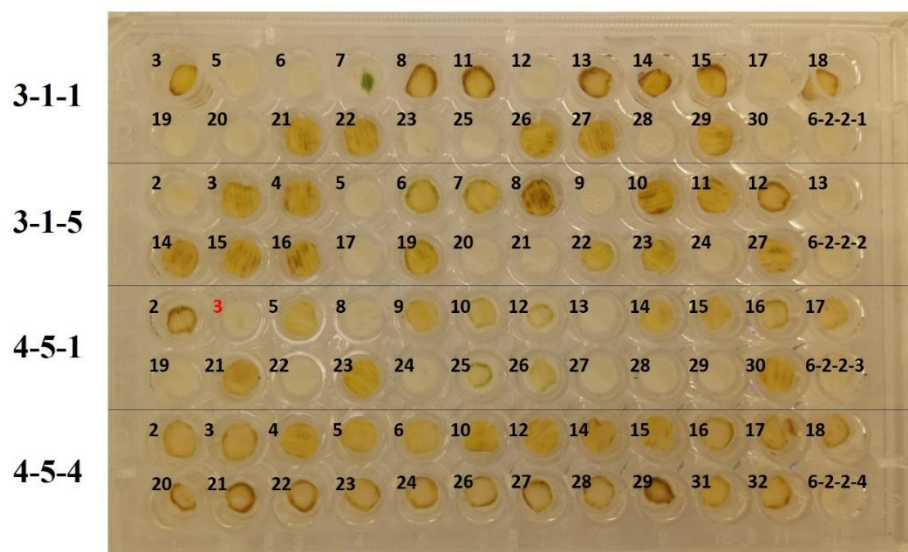


Obr. 9 Ověření metody *in vitro* testu hygromycinové rezistence u T2 generace K3i rostlin. **a)** *In vitro* test hygromycinové rezistence pro potomky rostlin 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4. Samostatná čísla odpovídají označení jednotlivých rostlin T2 generace potomků. Červeně jsou zvýrazněna označení rostlin, které postrádají konstrukt s T-DNA kazetou. Potomstvo negativní rostliny 6-2-2 slouží jako negativní kontrola. **b)** PCR-genotypování vybraných potomků transgenních rostlin 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4. Čtyřčíselné označení rostlin odpovídá rostlinám T2 generace. První ze dvou gelů odpovídá PCR-genotypování pomocí primerů genjK3_F2/R2. Druhý ze dvou gelů odpovídá PCR-genotypování pomocí primerů hygF/R. Šedě jsou zvýrazněna označení rostlin T1 generace. Červeně jsou zvýrazněna označení rostlin, které postrádají T-DNA kazetu.

Pro odhad genotypu pomocí Multiplex TaqMan qPCR byly vybrány rostliny T2 generace potomstva rodičovských rostlin 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4. Tato potomstva byla vybrána, protože rodičovské rostliny 3-1-5 a 4-5-1 měly nejnížší relativní množství T-DNA (Obr. 8). Potomstvo rostliny 4-5-4 pak bylo vybráno, protože rostlina 4-5-4 obsahovala přibližně dvojnásobné relativní množství T-DNA než sesterská rostlina 4-5-1 a mohlo se tak, vzhledem k malému relativnímu množství T-DNA u potomstva

linie 4-5, jednat o homozygotní rostlinu (Obr. 8). Z těchto důvodů bylo také u potomstev rostlin 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4 realizováno genotypování pomocí PCR a *in vitro* test hygromycinové rezistence (Obr. 9). Výsledky *in vitro* testu hygromycinové rezistence naznačily, že u potomstva rostlin 3-1-5 a 4-5-1 může docházet k segregaci jedné T-DNA inzerce. V případě segregace jedné T-DNA inzerce je u potomků heterozygota v jedné kopii transgenu očekáván mendelistický štěpný poměr 3 (transgenní) ku 1 (wt).

a)



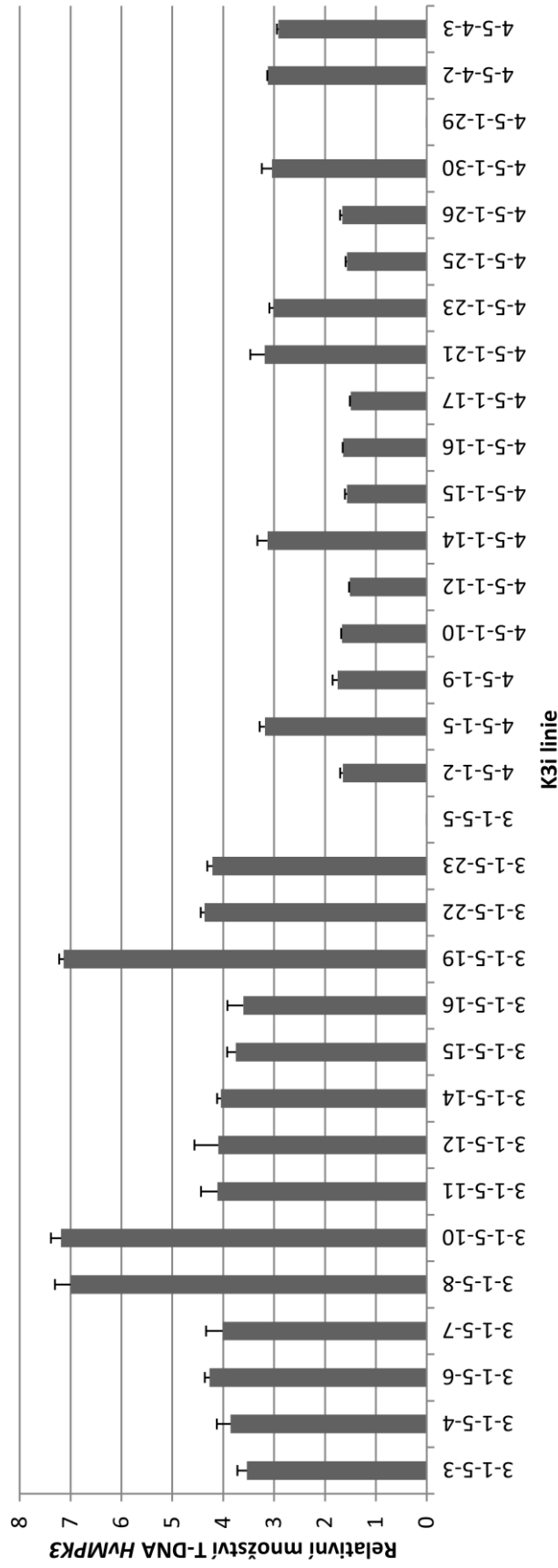
b)



Obr. 10 Ověření metody *in vitro* testu hygromycinové rezistence pro různé typy listového materiálu K3i rostlin. Číslo jednotlivých disků na obou destičkách se shodují, vzorky byly odebrány z různých částí prvního listu jedné rostliny. Potomci rostliny 6-2-2 slouží jako negativní kontrola. Červeně označená je jediná rostlina (4-5-1-3), která vykazovala rozdíl. **a)** Destička obsahující listové disky vyřezané z bazální části prvního listu **b)** Destička obsahující listové disky vyřezané ze špičky prvního listu.

V potomstvu 3-1-5 segregovalo 15 transgenních jedinců ku 8 wt jedincům, což odpovídá mendelistickému štěpnému poměru 3:1 podle chí kvadrát testu ($\chi^2 = 1,174$, pro $f=1$, $p<0,95$). Potomstvo 4-5-1 segregovalo v poměru 14 ku 9, což také odpovídá mendelistickému štěpnému poměru 3:1 podle chí kvadrát testu ($\chi^2 = 2,449$, pro $f=1$, $p<0,95$). Potomstvo linie 4-5-4 bylo podle *in vitro* testu hygromycinové rezistence uniformní – všech 23 jedinců bylo pozitivních, což naznačilo, že rostlina 4-5-4 je homozygotní v jedné T-DNA inzerci (Obr. 9). Pomocí Multiplex TaqMan qPCR pak byli analyzováni stejní jedinci potomstva rostlin 3-1-5, 4-5-1 a 4-5-4, jako ti, kteří byli genotypováni pomocí PCR (Obr. 9b). Výsledky této analýzy poskytly dodatečný důkaz pro mendelistickou segregaci T-DNA u potomstev rostlin 3-1-5 a 4-5-1 a zároveň homozygotním genotypu rostliny 4-5-4 (Obr. 11). U potomstev rostlin 3-1-5 a 4-5-1 byly detekovány pouze dvě kategorie relativního množství T-DNA inzercí, tak jak lze očekávat pro segregaci jedné T-DNA inzerce v rámci populace T-DNA pozitivních potomků heterozygota. V případě potomků rostliny 3-1-5 vykázaly tři rostliny (3-1-5-8, 3-1-5-10, 3-1-5-19) přibližně dvakrát větší relativní množství T-DNA než zbylých 11 pozitivních rostlin. V případě potomků rostliny 4-5-1 pak vykázalo pět rostlin (4-5-1-5, 4-5-1-14, 4-5-1-21, 4-5-1-23, 4-5-1-30) přibližně dvakrát větší relativní množství T-DNA než zbylých 9 pozitivních rostlin. V případě mendelistické segregace jedné kopie T-DNA lze očekávat vyštěpení homozygotů a heterozygotů mezi T-DNA pozitivními jedinci v poměru 1 ku 2. Tomuto segregáčnickému poměru odpovídá podle chí kvadrát testu i segregace T-DNA v populaci T-DNA pozitivních potomků linie 3-1-5 ($\chi^2 = 0,893$, pro $f=1$, $p<0,95$) a 4-5-1 ($\chi^2 = 0,036$, pro $f=1$, $p<0,95$). Jedinci s dvojnásobným relativním množstvím T-DNA tak mohou být na základě výsledků této analýzy považováni za homozygoty v jedné T-DNA inzerci. V rámci potomstva rostliny 4-5-4 byla Multiplex TaqMan qPCR reakce provedena pro dvě rostliny (4-5-4-2 a 4-5-4-3). Tyto rostliny vykázaly relativní množství T-DNA, které přibližně odpovídalo relativnímu množství T-DNA u pěti homozygotních rostlin potomstva sesterské rostliny 4-5-1. Rostlina 4-5-4 je tedy homozygotní v jedné T-DNA inzerci, což dokládá také uniformita rezistence jejího potomstva vůči hygromycinu (Obr. 9) a také, jak už bylo uvedeno, její analýza pomocí Multiplex TaqMan qPCR (Obr. 8). Celkové množství T-DNA se zdá být v průměru zhruba dvakrát větší u potomstva rostliny 3-1-5 než u potomstva rostliny 4-5-1 (Obr. 11). Je tedy možné, že se vzhledem k mendelistickému segregáčnickému poměru T-DNA, jedná v případě potomstva rostliny 3-1-5 o tandemovou inzerci dvou T-DNA kopií.

Odhad genotypu transgenních K3i rostlin T2 generace



Obr. 11 Odhad genotypu transgenních K3i rostlin T2 generace. U potomků rostliny 3-1-5 bylo analyzováno 15 rostlin. Z celkového počtu 14 rostlin obsahujících gen pro hygromycinovou rezistenci vykazovaly 3 rostliny zhruba 2 krát větší relativní množství T-DNA (3-1-5-8, 3-1-5-10, 3-1-5-19) oproti zbylým 11 rostlinám. U potomků rostliny 4-5-1 bylo také analyzováno 14 pozitivních T-DNA rostlin. U 5 rostlin bylo zaznamenáno zhruba 2 krát větší relativní množství T-DNA (4-5-1-5, 4-5-1-14, 4-5-1-21, 4-5-1-23, 4-5-1-30) oproti zbylým rostlinám. V rámci potomstva rostliny 4-5-4 byly analyzovány dva vzorky (4-5-4-2 a 4-5-4-3). Rostliny vykazaly relativní množství T-DNA, které přibližně odpovídá relativnímu množství T-DNA u pěti homozygotních rostlin potomstva sesterské rostliny 4-5-1.

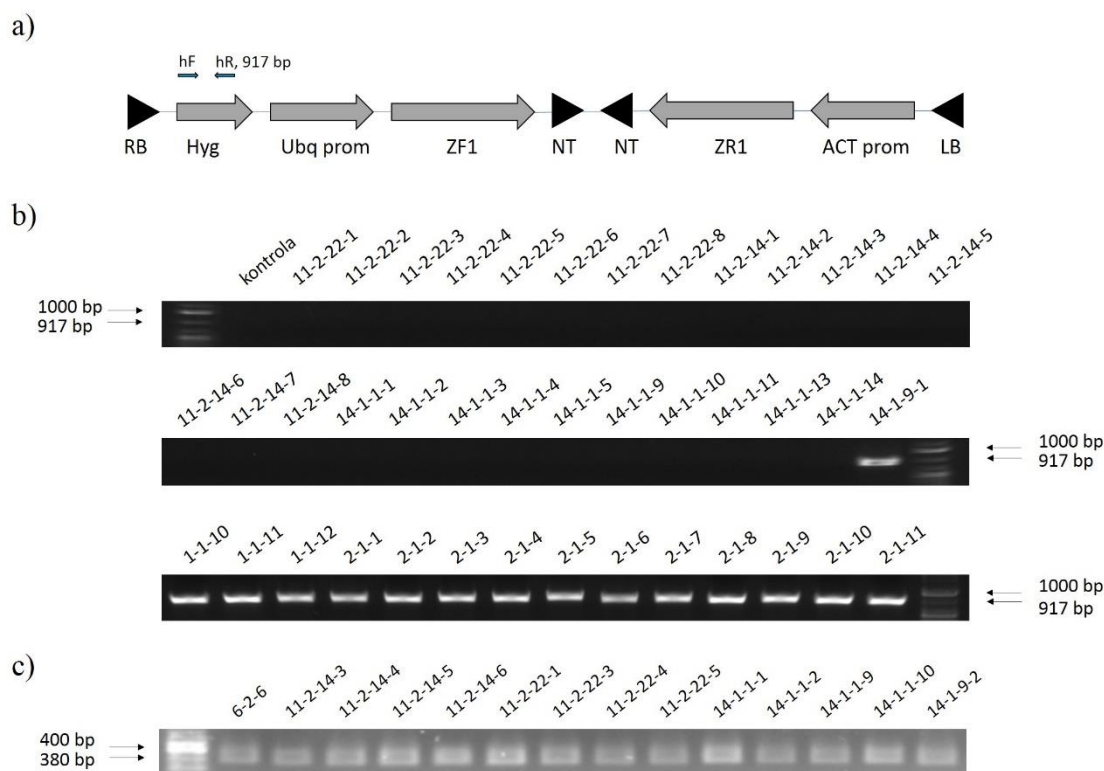
Pro fenotypovou charakterizaci reakce na sucho bylo pak na základě hygromycinového testu a výše uvedených analýz využito potomstvo rostlin 3-1-5, 4-5-4, 5-2-8 a 8-1-4. Výsledky hygromycinového testu pro potomstva rostlin 5-2-2 a 8-1-4 nejsou prezentovány. Všichni potomci linií 5-2-8 a 4-5-4 vykazovali rezistenci vůči hygromycinu, potomstva ostatních rostlin segregovala.

4.1.2 Molekulární charakterizace Z1 linií

V této práci byly charakterizovány transgenní linie ječmene s vyřazeným genem *HvMPK3* (Z1 rostliny). Pro práci byly využity rostliny T1 generace získané z T0 rostlin pěti nezávislých transgenních linií: 1-1, 2-1, 3-1, 4-1 a 6-2. Dále pak rostliny T2 generace získané z T1 rostlin pěti nezávislých transgenních linií: 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12, 3-1-7, 11-2-14, 11-2-22, 14-1-1, 14-1-9. A rostliny T3 generace získané z T2 rostlin: 11-2-14-4, 11-2-22-4 a 14-1-1-9. Tato práce navazuje na diplomovou práci Mgr. Terezy Tiché, která charakterizovala Z1 rostliny T0 generace dvou nezávislých transgenních linií 11-2, 14-1 a T1 generaci rostlin 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1.

Rostliny Z1 linií ječmene byly nejprve genotypovány pomocí primerů hygF/R na přítomnost T-DNA kazety pro TAL efektor specifické nukleasy (TALENY) cílené na vyřazení genu *HvMPK3* (Obr. 12). T-DNA kazeta pro talenový pár je zobrazena na Obr. 12a. Kazeta obsahuje hraniční oblasti – pravá a levá hranice (RB a LB), gen pro hygromycin (Hyg), dva konstitutivní promotory: kukuřičný ubikvitinový promotor (Ubq prom) a rýžový aktinový promotor (ACT prom), nukleotidovou sekvenci pro TAL efektor s monomerem nukleasy *FokI* (ZF1), nukleotidovou sekvenci pro TAL efektor s monomerem nukleasy *FokI* (ZR1) a terminátory (NT). Hygromycinový gen byl detekován u Z1 rostlin, které nesly T-DNA kazetu pro talen (Obr. 12b). Velikost získaného PCR produktu odpovídala 917 bp. Pro jedince, kteří konstrukt nenesli, nebyl pomocí genotypování detekován žádný PCR produkt (Obr. 12b).

V této práci bylo celkově genotypováno na přítomnost hygromycinového genu 72 rostlin Z1 linií, které jsou uvedeny v Tab. 10a-e. Nově byly v této práci charakterizovány rostliny T1 generace získané z doposud necharakterizovaných T0 rostlin pěti nezávislých Z1 linií: 1-1, 2-1, 3-1, 4-1, 6-2. Dále byli analyzováni T2 potomci rostlin T1 generace 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 v návaznosti na diplomovou práci Mgr. Terezy Tiché, která již u těchto jedinců detekovala homozygotní posunové mutace v cílovém místě prvního exonu *HvMPK3* genu (Obr. 13) a zároveň ukázala, že tito jedinci jsou segreganti v T-DNA – neobsahují T-DNA konstrukt pro taleny a nesou



Obr. 12 Schéma konstruktů a molekulární charakteristika vybraných transgenních Z1 linií rostlin. **a)** Schéma T-DNA kazety pro talenový pár Z1. RB/LB – pravá/levá hranice T-DNA; hyg – gen pro hygromycin; Ubq prom – ubikvitinový promotor; ACT prom – aktinový promotor; ZF1/ZR1 – nukleotidová sekvence pro TAL efektor s monomerním nukleasem *FokI* (sestava DNA vázající domény); NT – terminátory; modré šipky – nasedání odpovídajících primerů hygF/R. **b)** Vzorový elektroforeogram genotypování vybraných Z1 rostlin T1 a T2 generace pro detekci hygromycinového genu (produkt 917 bp). **c)** Vzorový elektroforeogram genotypování vybraných Z1 rostlin T1 a T2 generace pro detekci taleny indukované mutace v *HvMPK3* genu s primery jK3ZgrF2/R2 (produkt 380 bp).

tedy výhradně homozygotní mutace v genu *HvMPK3*. Výsledky genotypování pomocí primerů HygF/R ukázaly, že z celkového počtu 72 analyzovaných rostlin neslo 43 rostlin gen pro hygromycinovou rezistenci (Tab. 10a-e). Téměř všichni analyzovaní T2 potomci rostlin T1 generace 1-1, 2-1, 3-1, 4-1 a 6-2 vykázali přítomnost hygromycinového genu, respektive kazety pro talen (Tab. 10a-c, Obr. 12b). K segregaci konstruktů došlo pouze u potomků rostliny 4-1. Z celkového počtu 26 genotypovaných T2 potomků rostlin 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 byla detekována u všech jedinců nepřítomnost genu pro hygromycinovou rezistenci a byla tak potvrzena absence T-DNA konstruktů pro taleny u rodičovských rostlin T1 generace 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 v souladu s prací Mgr. Terezy Tiché (Tab. 10d-e, Obr. 12b).

Tab. 10a Genotypování transgenních Z1 rostlin T1 a T2 generace a jejich výběr pro kultivaci do další generace. Hyg – hygromycinový gen; jK3Zgr – marker pro detekci taleny indukované mutace v genu *HvMPK3*; + – rostlina byla kultivována do další generace; - – rostlina nebyla kultivována do další generace; 0 – nedetekován žádný PCR produkt; I – detekován jeden PCR produkt o očekávané velikosti; prázdné – neproběhla analýza. Charakterizováno bylo celkem 72 rostlin – 35 (+), 37 (-), 43 hyg (I), 28 jK3Zgr (I), 29 hyg (0), 4 jK3Zgr (0). Nepřítomnost PCR produktu markeru jK3Zgr u některých vzorků byla zřejmě zapříčiněna malým množstvím DNA v analýze.

Rostliny	1-1-2	1-1-3	1-1-4	1-1-5	1-1-6	1-1-7	1-1-8	1-1-9	1-1-10	1-1-11	1-1-12	2-1-1	2-1-2	2-1-3	2-1-4
kultivace	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-
hyg	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
jK3Zgr	0	0			I			I					I		

Tab. 10b Genotypování transgenních Z1 rostlin T1 generace a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	2-1-5	2-1-6	2-1-7	2-1-8	2-1-9	2-1-10	2-1-11	2-1-12	3-1-1	3-1-2	3-1-3	3-1-5	3-1-6	3-1-7	3-1-8
kultivace	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	+
hyg	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
jK3Zgr	I	I						I		I	0			I	0

Tab. 10c Genotypování transgenních Z1 rostlin T1 generace a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	4-1-1	4-1-2	4-1-3	4-1-4	4-1-5	4-1-6	4-1-7	4-1-8	6-2-1	6-2-2	6-2-3	6-2-4	6-2-5	6-2-6	6-2-7	6-2-8
kultivace	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
hyg	I	I	I	0	I	0	0	I	I	I	I	I	I	I	I	I
jK3Zgr	I	I	I	I					I			I	I	I		

Tab. 10d Genotypování transgenních Z1 rostlin T2 generace a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

Rostliny	11-2-14-1	11-2-14-2	11-2-14-3	11-2-14-4	11-2-14-5	11-2-14-6	11-2-14-7	11-2-14-8	11-2-22-1	11-2-22-2	11-2-22-3	11-2-22-4	11-2-22-5	11-2-22-6	11-2-22-7
kultivace	-	-	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+
hyg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
jK3Zgr			I	I	I	I			I		I	I	I		

Tab. 10e Genotypování transgenních Z1 rostlin T2 generace a jejich výběr pro kultivaci do další generace.

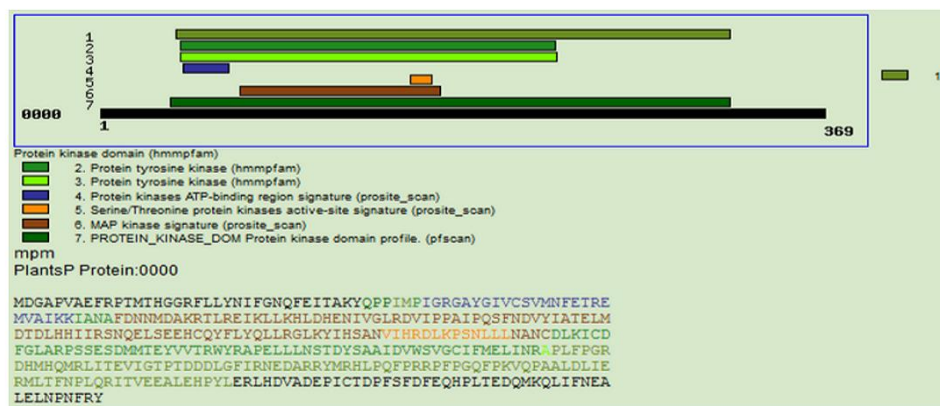
Rostliny	11-2-22-8	14-1-1-1	14-1-1-2	14-1-1-3	14-1-1-4	14-1-1-5	14-1-1-9	14-1-1-10	14-1-1-11	14-1-1-13	14-1-1-14
kultivace	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	+
hyg	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
jK3Zgr		I	I				I	I			

V další fázi práce byla u vybraných rostlin provedena detekce mutací indukovaných taleny v *HvMPK3* genu. K tomuto účelu byla využita sekvenace PCR produktu generovaného s využitím primerů jK3ZgrF2/R2, které lemují cílové místo talenů v prvním exonu *HvMPK3* genu a poskytují PCR produkt o velikosti 380 bp (Obr. 12c). Tímto způsobem byly charakterizovány rostliny T1 generace: 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12, 3-1-7 a 4-1-1 a rostliny T2 generace: 11-2-14-3, 11-2-14-4, 11-2-14-5, 11-2-22-1, 11-2-22-3, 11-2-22-4, 14-1-1-1, 14-1-1-2 a 14-1-1-9. U všech analyzovaných potomků rostlin 11-2 a 14-1 byla zjištěna přítomnost homozygotních posunových mutací (deleci o velikosti 20bp, respektive 4bp) v cílovém místě prvního exonu *HvMPK3* genu (Obr. 13). Byl tak potvrzen dědičný přenos těchto mutací z T1 generace analyzované Mgr. Terezou Tichou na T2 generaci, která byla analyzována v této práci (Příloha Obr. P1). Všichni potomci rostlin 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 jsou tak homozygoté s vyřazeným genem *HvMPK3*, kteří navíc neobsahují transgen pro talen Z1 (Tab. 10d-e, Obr. 12b). Nově byla v této práci detekována homozygotní posunová mutace v *HvMPK3* genu u T1 generace rostlin 1-1-6, 2-1-5 a 2-1-12 (Obr. 13). V obou případech se jedná o 5bp delecii v cílovém místě talenu v prvním exonu *HvMPK3* genu. V případě rostliny 3-1-7 byla v cílovém místě detekována homozygotní delecce o velikosti 51bp, která nezpůsobuje posun čtecího rámce (Obr. 13). Bioinformatická analýza příslušného mutantního proteinu HvMPK3 však ukázala nepřítomnost ATP-vázací domény, čímž se rostlina 3-1-7 a její potomstvo jeví jako zajímavý nástroj pro studium funkce HvMPK3 (Obr. 14). V případě rostliny 4-1-1 pak byla v cílovém místě zjištěna neposunová homozygotní delecce o velikosti 3bp (Obr. 13).

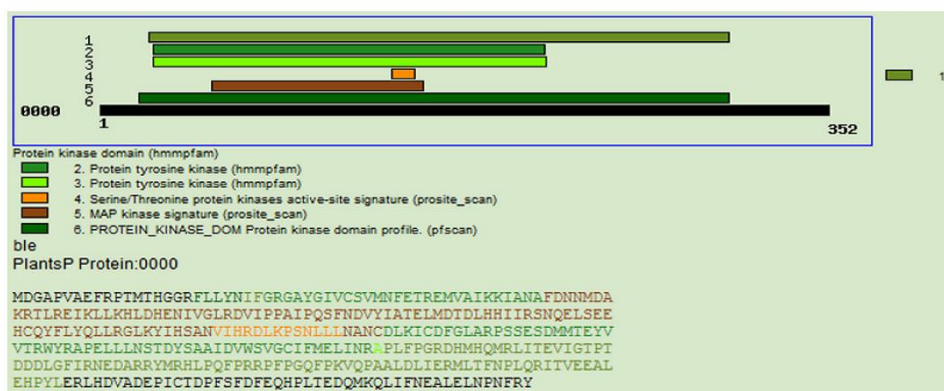
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGCAACCAGTTCGAGAT	TCACGGCCAAGTACC	AGCCGCCGATC	Divoký typ	
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA-----	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(1-1-6)	5nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA-----	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(2-1-5)	5nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA-----	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(2-1-12)	5nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT-----	-----	-----	-----	CGG (3-1-7)	51nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---GTT	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(4-1-1)	3nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGC-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-2-14)	20nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGC-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-2-17)	20nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGC-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-2-22)	20nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGC-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-3-13)	20nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGG-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-3-18)	21nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---GTT	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(13-1-1)	3nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---GTT	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(13-1-22)	3nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---GTT	TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(13-1-23)	3nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---TTC	GAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(14-1-1)	4nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGCAA---TTC	GAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCCGATC		(9-1-13)	4nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGGGC-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(11-3-9)	20nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGG-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(14-1-2)	21nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGG-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(14-1-6)	21nt
CCGGTTCCTCCTCTACAACATATT	CGG-----	-----CAAGTACCAGCCGCCGATC		(14-1-10)	21nt

Obr. 13 Detekce mutací indukovaných talenem v prvním exonu *HvMPK3* genu v T1 generaci Z1 transgenních rostlin. Zobrazeny jsou výsledky sekvenační analýzy PCR produktu markeru jK3Zgr. Přiřazeny jsou jenom nukleotidové sekvence zahrnující dílčí oblast prvního exonu *HvMPK3* genu – místo nasedání talenového páru Z1 (červeně). Žlutě jsou zvýrazněny sekvence alel *HvMPK3*, u kterých se vyskytují mutace způsobující posun čtecího rámce. Šedě je naznačena sekvence *HvMPK3* alely rostliny divokého typu. Nezvýrazněné sekvence odpovídají alelám s mutacemi, které nezpůsobují posun čtecího rámce. Počet nt za závorkou definuje množství deletovaných nukleotidů. Nově byly v práci charakterizovány rostliny 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12, 3-1-7 a 4-1-1 čtyř nezávislých linií. Svorka a* charakterizuje jedince T1 generace s příslušnou homozygotní mutací, kteří byli analyzováni v diplomové práci Mgr. Terezy Tiché (převzato). U potomků rostlin 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12, 3-1-7 a stejně tak u potomků rostlin 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 dochází k přenosu mutací do dalších generací, viz Příloha Obr. P1.

a)



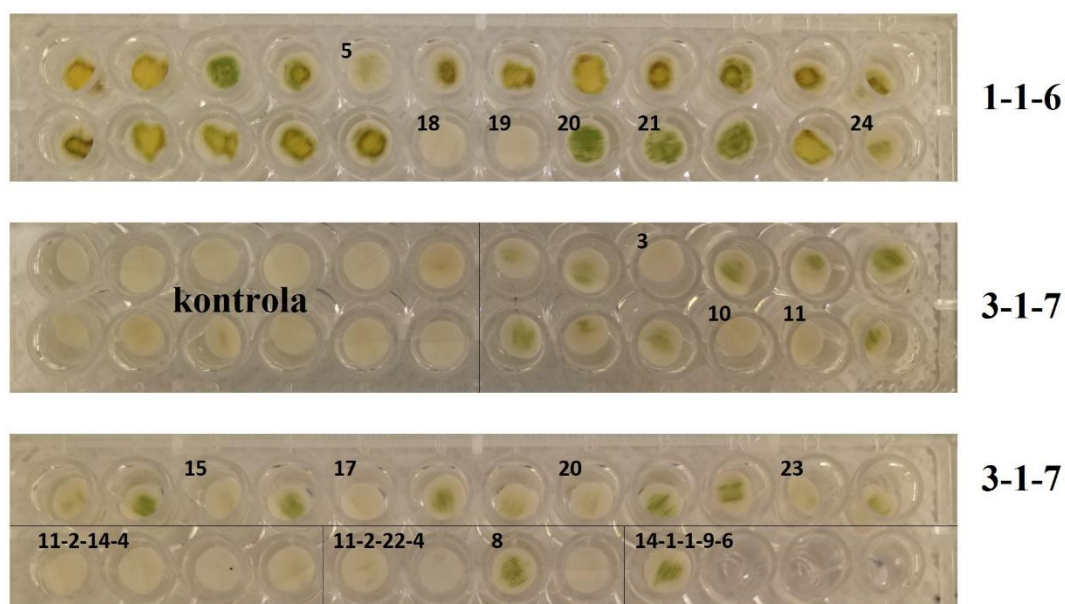
b)



Obr. 14 Výsledky analýzy 51 bp delece v prvním exonu *HvMPK3* genu u jedince 3-1-7. **a)** V pozici 4 je obsažena ATP-vázací doména (modrý proužek). **b)** ATP-vázací doména chybí.

V další části práce bylo cílem identifikovat homozygotní mutanty v *HvMPK3* genu se segregovaným konstruktem pro talen u T2 potomků rostlin T1 generace 1-1-6, 2-1-5 a 2-1-12 a 3-1-7. K tomuto účelu se jako velmi vhodný jeví *in vitro* test hygromycinové rezistence, protože umožňuje velmi rychle preselektovat z velkého počtu rostlin rostliny s náchylnou reakcí na přítomnost hygromycinu (absencí konstruktu). Náchylné rostliny je pak možné doověřit pro absenci konstruktu PCR-genotypováním. Nejprve byl tento přístup použit pro charakterizaci potomstva rostlin 1-1-6 a 3-1-7 (Obr. 15). Výsledky tohoto experimentu ukázaly, že u transgenních Z1 rostlin *in vitro* test hygromycinové rezistence pravděpodobně nefunguje stejně efektivně jako u transgenních K3i rostlin. Možným důvodem je repetitivní povaha konstruktu pro talen, která může ovlivňovat expresi hygromycinového genu. Nicméně, i v případě potomků rostlin 1-1-6 a 3-1-7 umožnila tato metoda preselektovat rostliny s absencí hygromycinového genu (Obr. 15a), mezi kterými byly jako negativní potvrzeny pomocí PCR-genotypování rostliny 3-1-7-3,

a)



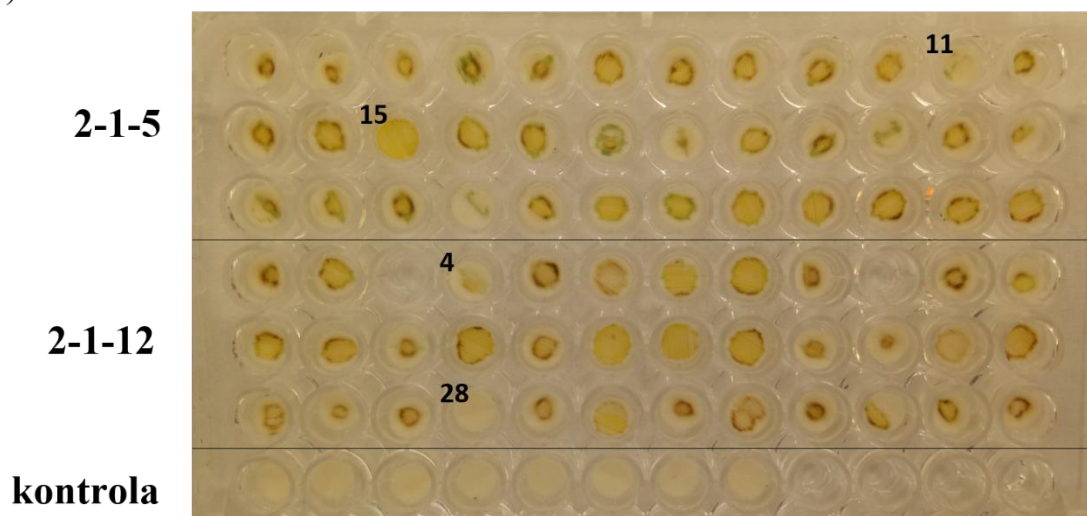
b)



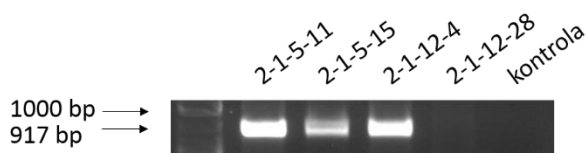
Obr. 15 Ověření metody *in vitro* testu hygromycinové rezistence u Z1 rostlin. **a)** Hygromycinový test pro potomstvo rostlin 1-1-6 a 3-1-7. Jako kontrola jsou použity potomci negativních Z1 rostlin 11-2-14-4, 11-2-22-4, 14-1-1-9 a kontrolní rostliny divokého typu. **b)** Genotypování vyselektovaných potomků rostlin 1-1-6 a 3-1-7. Jako kontrola jsou použity potomci negativních Z1 rostlin 11-2-22-4 a 14-1-1-9 a kontrolní rostlina divokého typu. První ze dvou gelů odpovídá PCR-genotypování pomocí primerů hygF/R (PCR produkt o velikost 917 bp). Druhý ze dvou gelů odpovídá PCR-genotypování pomocí primerů jK3ZgrF2/R2 (380 bp).

1-1-6-18, -19, -20, -21, -24 (Obr. 15b). Obdobně byla identifikována rostlina 2-1-12-28 jako rostlina s absencí hygromycinové genu/ konstruktu pro talen (Obr. 16). V tomto experimentu se metoda *in vitro* testu hygromycinové rezistence jevila jako spolehlivější. V případě potomstva rostliny 2-1-12 stačilo na základě výsledku hygromycinové rezistence (Obr. 16a) genotypovat jednu rostlinu pozitivní na hygromycinový gen (jako pozitivní kontrolu) a jednu identifikovanou rostlinu náchylnou na hygromycin, tj. 2-1-12-28 (Obr. 16b). Rostlina 2-1-12-28 pak byla velmi pravděpodobně jedinou

a)



b)



Obr. 16 Ověření metody *in vitro* testu hygromycinové rezistence u potomků Z1 rostlin 2-1-5 a 2-1-12. **a)** Terčkový test pro potomstvo rostlin 2-1-5 a 2-1-12. Číslo značí genotypované rostliny. Jako kontrola sloužila rostlina divokého typu. **b)** Elektroforeogram vybraných potomků rostlin 2-1-5 a 2-1-12. Gel odpovídá PCR-genotypování pomocí primerů hygF/R (PCR produkt o velikost 917 bp).

rostlinou náchylnou na hygromycin v rámci potomstva rostliny 2-1-12 – jediný kompletně vybělený listový disk (Obr. 16a). Posléze byla u takto preselektovaných rostlin T2 generace (absence konstruktů pro talen) potvrzena přítomnost příslušných homozygotních mutací v *HvMPK3* genu (5bp a 51 bp delece) identifikovaných u mateřských rostlin T1 generace 1-1-6 a 3-1-7 (Obr. 13). Rostliny T2 generace 1-1-6-18, -19, -20, -21, -24, 2-1-12-28 a 3-1-7-3 tak nesou příslušné homozygotní mutace nově identifikované v této práci (Příloha Obr. P1) a zároveň mají segregovaný konstrukt pro talen Z1 (Obr. 15 a Obr. 16).

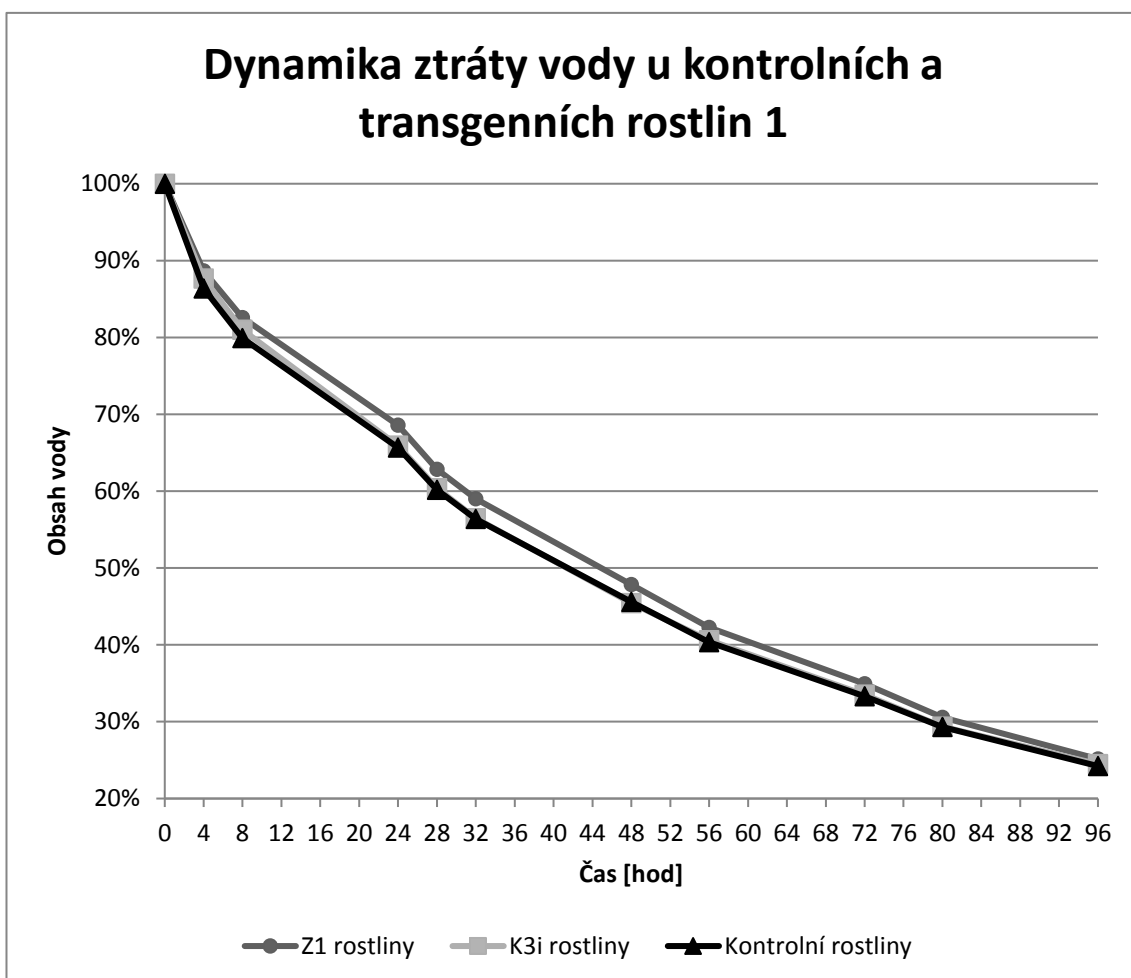
4.2 Sledování vlivu sucha na fenotypový projev K3i a Z1 transgenních linií rostlin

Pro fenotypovou charakterizaci byly rostliny analyzovány v podmínkách působení sucha. U rostlin byla zaznamenávána dynamika ztráty vody a dále pak byly rostliny sledovány při pokusu vadnutí, kdy docházelo u rostlin k vodnímu deficitu.

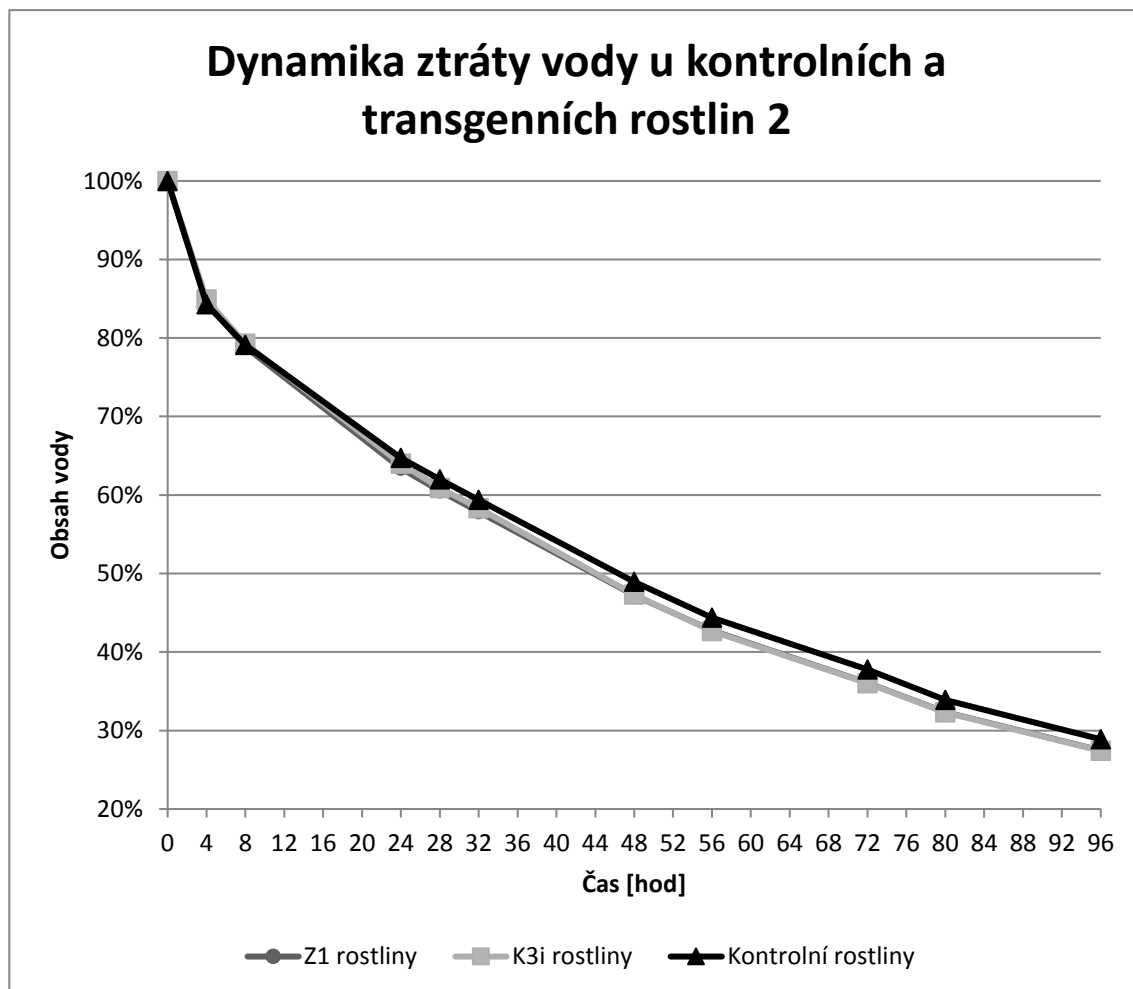
4.2.1 Sledování dynamiky ztráty vody

Pro měření a sledování dynamiky ztráty vody byly použity měsíc staré rostliny transgenních K3i a Z1 linií. Pro charakterizaci K3i rostlin byli vybráni T2 potomci rostlin T1 generace 3-1-5, 4-5-4, 5-2-8 a 8-1-4. Jako kontrolní rostliny byli použiti potomci rostlin: 4-5-7, 6-2-2 a 8-1-3 (negativní sesterské rostliny K3i linií). Pro charakterizaci Z1 rostlin byli vybráni potomci rostlin T1 generace 2-1-5 a 3-1-7. Dále byli vybráni potomci rostlin T2 generace 11-2-14-4, 11-2-22-4 a 14-1-1-9. Pro vlastní experimenty bylo vždy vybráno šest rostlin potomstva mateřské rostliny na základě výsledku analýzy potomstev pomocí *in vitro* hygromycinového testu (Příloha Obr. P2 a Obr. P3). Pouze v případě prvního pokusu u potomků rostliny 8-1-4 byli vybráni pro pokus 3 jedinci z důvodu realizace hygromycinového testu pouze u 3 rostlin (Příloha Obr. P2 a Obr. P3). Pokusy byly provedeny dva, a to při různých teplotních podmínkách v kóji ve skleníku (viz Tab. 8). Měření probíhalo po dobu jednoho týdne, kdy se nadzemní část rostliny v časových intervalech vždy zvažila a vypočtené průměrné hodnoty procentuální ztráty vody byly následně vyneseny do grafu (Obr. 18 a Obr. 19). Pro lepší přehlednost jsou v grafu uvedeny měření pouze z pěti prvních dní (96 h místo 168 h). Při prvním pokusu během prvních 24 h klesla hmotnost měřených rostlin z původních 100 % na průměrnou hodnotu 67 %. Během dalších 24 h, tedy po 48 h od počátku měření, klesla průměrně hmotnost na 46 %. Po 72 h klesla hmotnost rostlin na 34 % a po 96 h na průměrnou hodnotu 24 %. Při posledním měření po 168 h rostliny snížily svou hmotnost na průměrnou hodnotu 13 %. Při druhém pokusu během prvních 24 h klesla hmotnost měřených rostlin z původních 100 % na průměrnou hodnotu 64 %. Po 48 h od počátku měření klesla průměrně hmotnost na 48 %. Po 72 h klesla hmotnost rostlin na 37 % a po 96 h na průměrnou hodnotu 28 %. Sedmý den měření po 168 h rostliny snížily svou hmotnost na průměrnou hodnotu 16 %.

Z výsledků obou pokusů vyplývá, že se dynamika ztráty vody u transgenních rostlin ječmene se zvýšenou expresí *HvMPK3* genu (K3i rostliny) a s vyřazeným *HvMPK3* genem (Z1 rostliny) neliší od kontrolních rostlin (Obr. 18 a Obr. 19).



Obr. 17 Výsledky prvního pokusu měření dynamiky ztráty vody nadzemní části rostlin. U transgenních linií K3i a Z1 nebyly při prvnímu pokusu zaznamenány žádné rozdíly v dynamice ztráty vody oproti kontrolním rostlinám.



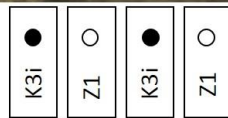
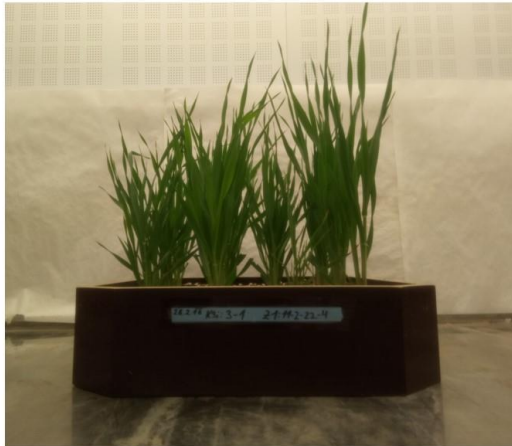
Obr. 18 Výsledky druhého pokusu měření dynamiky ztráty vody nadzemní části rostlin. U transgenních linií K3i a Z1 rostlin nebyly při druhém pokusu zaznamenány žádné rozdíly v dynamice ztráty vody oproti kontrolním rostlinám.

4.2.2 Vliv sucha na vadnutí K3i a Z1 transgenních rostlin

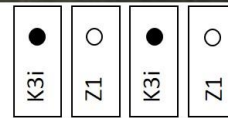
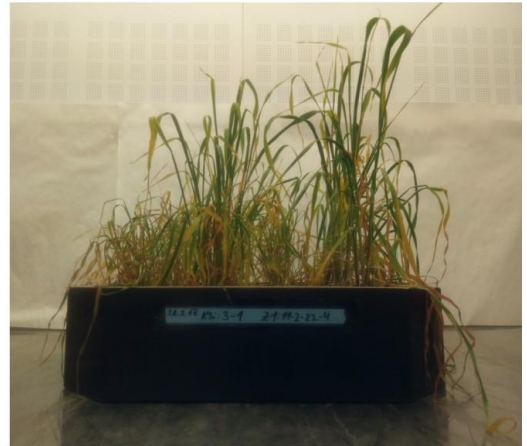
Pro další posouzení vlivu sucha na fenotyp transgenních K3i a Z1 linií, byla provedena analýza dynamiky vadnutí rostlin při nedostatku vody v pěstebním substrátu. Pro hodnocení byla vyseta transgenní semena T1 potomstva T0 rostlin K3i linií 3-1 a 4-5 a T3 potomstva T2 rostlin Z1 11-2-22-4 a 14-1-1-9. Jako kontrola byla použita rostlina divokého typu. Součástí vyhodnocení bylo provedení hygromycinového testu na 96 jamkové destičce u dvoutýdenních rostlin (Příloha Obr. P4). Celkem bylo vyseto 200 semen. Na tento pokus byly použity měsíc staré rostliny, které byly vysety do hlubokých květináčů s větším množstvím zeminy o stejném objemu ve všech nádobách. Na jeden květináč připadalo 40 semen. Rostliny byly analyzovány v podmínkách fytostronu po dobu necelých tří týdnů od posledního zalití rostlin větším množstvím vody. Jednotlivé květináče byly fotografovány v různých dnech po startu pokusu. První známky vadnutí rostlin se začaly objevovat po 9 dnech od posledního zalití rostlin vodou. Po 18 dnech byly patrné rozdíly mezi jednotlivými transgenními liniemi. Podle vizuálního hodnocení dosahovali potomci Z1 rostlin 11-2-22-4 a 14-1-1-9 většího vzrůstu a větší odolnosti vůči působení sucha oproti potomkům K3i rostlin 3-1 a 4-5. Při porovnávání kontroly s potomky K3i rostliny 3-1 a Z1 rostliny 14-1-1-9 však nebyly zaznamenány žádné velké rozdíly ve fenotypu. Fotografie jednotlivých květináčů před začátkem a během pokusu jsou zobrazeny na Obr. 20-24.

V tomto pokusu nebyly bohužel zajistěny přesné podmínky pro kultivaci rostlin. Během růstu rostlin došlo k napadení některých jedinců plísní a rostliny musely být postříkány pesticidem těsně před začátkem pokusu vadnutí. Dalším možným problémem byl nízký počet opakování (1) kombinací linií v jednotlivých květináčích z důvodu prostorové nedostatečnosti. Pro jednoznačnou fenotypovou charakterizaci transgenních a kontrolních rostlin je nutno provést opakování experimentu a rozšířit počet květináčů pro každou kombinaci linií.

a)



b)

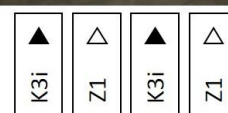
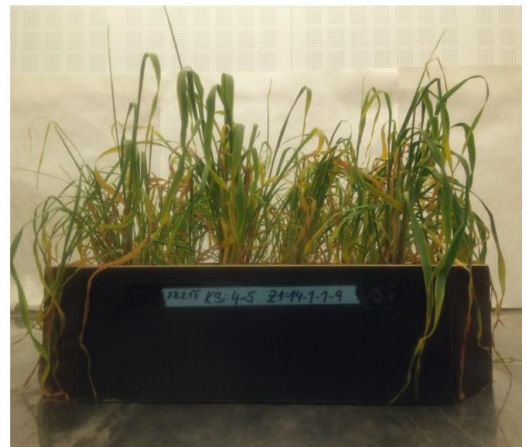


Obr. 19 Fotografie pokusu vadnutí rostlin u potomků rostlin K3i 3-1 a Z1 11-2-22-4. **a)** Fotografie pořízená před začátkem pokusu. **b)** Fotografie pořízená 18 dní po začátku pokusu.

a)

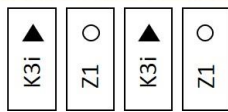


b)

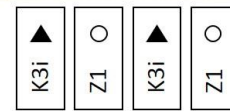


Obr. 20 Fotografie pokusu vadnutí rostlin u potomků rostlin K3i 4-5 a Z1 14-1-1-9. **a)** Fotografie pořízená před začátkem pokusu. **b)** Fotografie pořízená 18 dní po začátku pokusu.

a)

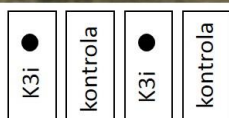


b)

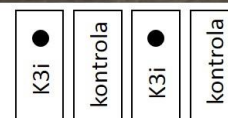
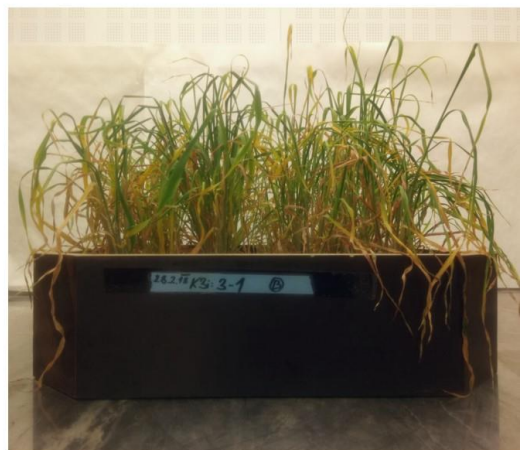


Obr. 21 Fotografie pokusu vadnutí rostlin u potomků rostlin K3i 4-5 a Z1 11-2-22-4. **a)** Fotografie pořízená před začátkem pokusu. **b)** Fotografie pořízená 18 dní po začátku pokusu.

a)

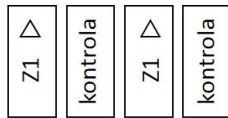


b)

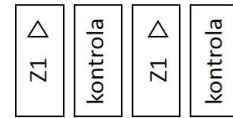
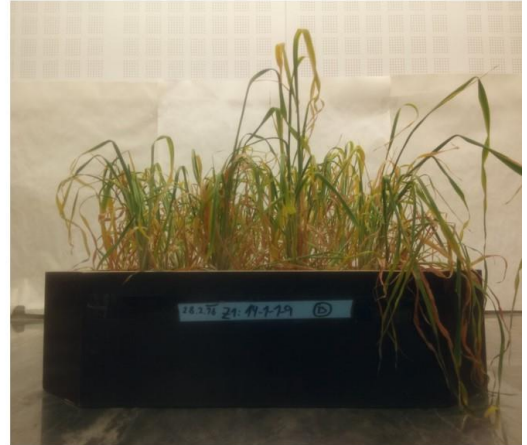


Obr. 22 Fotografie pokusu vadnutí rostlin u potomků rostlin K3i 3-1 a kontrolních rostlin. **a)** Fotografie pořízená před začátkem pokusu. **b)** Fotografie pořízená 18 dní po začátku pokusu.

a)



b)



Obr. 23 Fotografie pokusu vadnutí rostlin u potomků rostlin Z1 14-1-1-9 a kontrolních rostlin. **a)** Fotografie pořízená před začátkem pokusu. **b)** Fotografie pořízená 18 dní po začátku pokusu.

5 DISKUZE

MAP kinasové dráhy se vyskytují u všech eukaryotických organismů a u rostlin představují jeden z nejvýznamnějších studovaných mechanismů přenosu signálu (Danquah *et al.*, 2014). Mezi nejvíce prostudované rostliny patří Huseníček rolní (*Arabidopsis thaliana*), u kterého bylo charakterizováno 20 MAP kinas. Z těchto kinas jsou nejvíce analyzované MPK3, MPK4 a MPK6 (Ichimura *et al.*, 2002). V této práci byly charakterizovány transgenní linie ječmene odrůdy Golden Promise se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* a s vyřazeným genem *HvMPK3* (knockout). Gen *HvMPK3* v ječmeni vykazuje homologii s genem *AtMPK3* u huseníčku (Křenek *et al.*, 2015). Ječmen jako jednoděložná a zemědělsky hojně využívaná plodina představuje významný cíl genetické manipulace a fenotypové charakterizace získaných transgenních linií. Cílená modifikace specifické sekvence DNA pomocí editace genomu znamená v dnešní době rozsáhlé možnosti zisku geneticky upravených rostlin. Využití specifických TAL efektor nukleas nachází uplatnění v genovém inženýrství pro změnu exprese téměř jakéhokoli genu (Reyon *et al.*, 2012). V současné době je již známo použití této technologie u ječmene, kdy byly připraveny transgenní rostliny, které mutovaný gen přenášely také do další generace (Gurushidze *et al.*, 2014). Kromě vyřazení genu z činnosti jsou také známy manipulace pro zvýšení exprese genu. V této práci byly charakterizovány rostliny se zvýšenou expresí genu *HvMPK3*, které v konstruktu nesly intron *UBQ10_i1* původem z huseníčku. Bartlett *et al.* (2009) popsali pozitivní vliv tohoto intronu na zvýšenou expresi genu luciferasy v rostlinách ječmene. Efekt tohoto intronu u rostlin charakterizovaných v této předkládané práci však nebyl analyzován.

U vybraných jedinců T1 generace a T2 generace K3i rostlin byla provedena Multiplex TaqMan qPCR analýza, která poskytla odhad genotypu analyzovaných rostlin. Bartlett *et al.* (2008) použili tuto metodu jako efektivní nástroj pro odhad počtu kopií genu luciferasy u ječmene, který byl transformován pomocí *Agrobacteria*. V této práci byla analýza realizována podle stejného protokolu, avšak s rozdílem, že pro tuto práci nebyla k dispozici referenční kontrola v podobě jednokopiové heterozygotní transgenní rostliny s pomocí které by mohla být analýza optimalizovaná. Byly pozorovány rozdílné výsledky v rámci teoretického počtu kopií u stejných vzorků analyzovaných na různých platech. Prezentované výsledky byly proto normalizovány pomocí metody 2-(Delta Delta C(T)) vůči hypotetické jednokopiové heterozygotní transgenní rostlině (Livak a Schmittgen, 2001). Metoda se však ukázala jako informativní pro odhad

genotypu transgenních rostlin při nižším počtu obsažených kopií, což bylo potvrzeno také nezávislými metodami – *in vitro* testem hygromycinové odolnosti a statistickou verifikací segregace transgenů.

Pro genotypování byl využit v této práci *in vitro* test hygromycinové rezistence a to jak u transgenních K3i rostlin se zvýšenou expresí genu *HvMPK3*, tak i u Z1 rostlin s vyřazeným genem *HvMPK3*. U K3i rostlin bylo potvrzeno, že metoda funguje u jakékoli odebrané části rostliny. Při porovnávání dvou destiček s různými částmi listu došlo v jednom případě u rostliny 4-5-1-3 k rozdílným výsledkům (Obr. 10). Důvodem bylo buď špatné umístění části listu do jamky, takže nedošlo ke kontaktu listu s roztokem hygromycinu nebo záměna vzorku rostliny na kultivačním platě. U testování rostlin Z1 linií byly při molekulárním genotypování rostlin získány rozdílné výsledky v porovnání s destičkou s listovými disky (Obr. 15). Listové disky těchto rostlin byly získány z nejmladších plně vyvinutých listů. Pro další analýzu se odebíraly disky odlišných Z1 linií, které byly vysety v jinou dobu. Odebíraly se listy ze stejně starých rostlin, avšak první listy rostlin (Obr. 16). Výběr listu rostliny má proto zřejmě vliv na získané výsledky hygromycinového testu v případě Z1 linií. Dalším možným důvodem je repetitivní povaha konstruktů pro talen, která může ovlivňovat expresi hygromycinového genu v případě Z1.

Fenotypová charakterizace transgenních linií obsahovala sledování dynamiky ztráty vody a sledování efektu deficitu vody u vadnoucích rostlin. Dynamika ztráty vody byla sledována ve skleníku při různých teplotních podmínkách. Zajištění stejných podmínek bohužel v rámci jednotlivých dnů pokusů nebylo možné kvůli venkovnímu počasí. Pokusy tudíž nejsou reprodukovatelné. Řešením by bylo rostliny měřit ve fytotronu v přesně definovaných podmínkách. Fytotrony však nebyly využity z důvodu nedostatku plochy pro umístění plat s analyzovanými rostlinami. Pro pokus vadnutí byly rostliny umístěny do fytotronu. Tyto rostliny však byly napadnuty plísní a byl u nich proveden postřik, který mohl ovlivnit výsledky pokusu. Na tento pokus byly použity rostliny, které byly jeden měsíc staré. Je možné, že takto staré rostliny už nebyly vhodné pro tento pokus a u mladších rostlin by mohlo být dosaženo výraznějších rozdílů. Pro další fenotypovou charakterizaci by bylo tedy nutné nejdříve postup optimalizovat.

6 ZÁVĚR

Tato práce byla nejdříve zaměřena na teoretickou část, kde byly charakterizovány MAP kinasové dráhy vyskytující se v různých rostlinách. Tyto dráhy byly poté zvláště popsány při odpovědích modelových rostlin a plodin na vodní stres. Součástí literární rešerše byl také stručný popis přípravy transgenních rostlin a obecný přehled nových technologií editace genomu. V experimentální části byly genotypově a fenotypově charakterizovány rostliny se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* a rostliny s TALENem indukovanými mutacemi v genu *HvMPK3*.

Pro molekulární charakterizaci byla pomocí genotypování ověřena přítomnost T-DNA kazet u T1 až T3 generace transgenních linií rostlin. Vybrané rostliny T1 a T2 generace se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* byly podrobeny Multiplex TaqMan qPCR analýze, která umožnila predikovat transgenní genotyp u těchto rostlin. Výsledky získané pomocí této metody byly potvrzeny pomocí nezávislých metod – statistické ověření segregace transgenů a *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Pomocí kombinace těchto metod byly identifikovány transgenní linie s nadprodukcí *HvMPK3*, které obsahovaly jednu kopii T-DNA/případně tandemově inzerované kopie T-DNA a také homozygotní jedinci v T-DNA inzerci v rámci těchto linií. Vybraní jedinci T1 až T3 generace s vyřazeným genem *HvMPK3* byli charakterizováni pomocí sekvenační analýzy. Výsledky této analýzy vedly k identifikaci jedinců s homozygotními mutacemi, které způsobují posun čtecího rámce genu *HvMPK3*. V následující generaci rostlin byla přítomnost těchto homozygotních mutací opět potvrzena pomocí sekvenace. Byly také identifikovány rostliny s homozygotními posunovými mutacemi a zároveň absencí T-DNA pro talen. Dílčím cílem práce bylo dále ověření spolehlivosti genotypování transgenních rostlin ječmene pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence. Tento test byl ověřen pomocí PCR-genotypování u rostlin se zvýšenou expresí genu *HvMPK3* i u rostlin s vyřazeným genem *HvMPK3*.

Pro fenotypovou charakterizaci byly transgenní rostliny analyzovány při působení sucha. Měření dynamiky ztráty vody neukázalo žádné rozdíly mezi transgenními a kontrolními rostlinami. U pokusu vadnutí, kdy byly rostliny sledovány při působení vodního deficitu, se zdály být rostliny s vyřazeným genem *HvMPK3* odolnější oproti rostlinám se zvýšenou expresí genu *HvMPK3*.

7 LITERATURA

- Abass M., Morris P.C. (2013): The *Hordeum vulgare* signalling protein MAP kinase 4 is a regulator of biotic and abiotic stress responses. *Journal of Plant Physiology* **170**, 1353-1359.
- Agarwal P.K., Agarwal P., Reddy M.K., Sopory S.K. (2006): Role of DREB transcription factors in abiotic and biotic stress tolerance in plants. *Plant Cell Reports* **25**, 1263-1274.
- Agrawal G.K., Iwahashi H., Rakwal R. (2003): Rice MAPKs. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **302**, 171-180.
- Ahlfors R., Macioszek V., Rudd J., Brosché M., Schlichting R., Scheel D., Kangasjärvi J. (2004): Stress hormone-independent activation and nuclear translocation of mitogen-activated protein kinases in *Arabidopsis thaliana* during ozone exposure. *Plant Journal* **40**, 512-522.
- Ainley W. M., Sastry-Dent L., Welter M. E., Murray M. G., Zeitler B., Amora R., Corbin D.R., Miles R.R., Arnold N.L., Strange T.L., Simpson M.A., Cao Z., Carroll C., Pawelczak K.S., Blue R., West K., Rowland L.M., Perkins D., Samuel P., Dewes C.M., Shen L., Sriram S., Evans S.L., Rebar E.J., Zhang L., Gregory P.D., Urnov F.D., Webb S.R., Petolino J.F. (2013): Trait stacking via targeted genome editing. *Plant Biotechnology Journal* **11**, 1126-1134.
- Araus J.L., Slafer G.A., Reynolds M.P., Royo C. (2002): Plant breeding and drought in C3 cereals: what should we breed for? *Annals of Botany* **89**, 925-940.
- Arora L., Narula A. (2017): Gene Editing and Crop Improvement Using CRISPR-Cas9 System. *Frontiers in Plant Science* **8**, 1932.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Ashraf M. (2010): Inducing drought tolerance in plants: Recent advances. *Biotechnology Advances* **28**, 169-183.
- Babu R.C., Nguyen B.D., Chamarek V.P., Shanmugasundaram P., Chezhian P., Jeyaprakash S.K., Ganesh A., Palchamy S., Sadasivam S., Sarkarung S., Wade L.J., Nguyen H.T. (2003): Genetic analysis of drought resistance in rice by molecular markers. *Crop Science* **43**, 1457-1469.
- Bajji M., Kinet J., Lutts S. (2002): The use of the electrolyte leakage method for assessing cell membrane stability as a water stress tolerance test in durum wheat. *Plant Growth Regulation* **36**, 61-70.
- Baltes N. J., Gil-Humanes J., Cermak T., Atkins P. A., Voytas D. F. (2014): DNA replicons for plant genome engineering. *The Plant Cell* **26**, 151-163.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood W.A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* **4**:22. <https://doi.org/10.1186/1746-4811-4-22>.
- Bartlett J.G., Snape J.W., Harwood W.A. (2009): Intron-mediated enhancement as a method for increasing transgene expression levels in barley. *Plant Biotechnology Journal* **7**, 856-66.
- Beck E.H., Fettig S., Knake C., Hartig K., Bhattarai T. (2007): Specific and unspecific responses of plants to cold and drought stress. *Journal of Biosciences* **32**, 501-510.
- Beck M., Komis G., Müller J., Menzel D., Šamaj J. (2010): *Arabidopsis* homologs of nucleus- and phragmoplast-localized kinase 2 and 3 and mitogen-activated protein kinase 4 are essential for microtubule organization. *The Plant Cell* **22**, 755-771.
- Beck M., Komis G., Ziemann A., Menzel D., Samaj J. (2011): Mitogen-activated protein kinase 4 is involved in the regulation of mitotic and cytokinetic microtubule transitions in *Arabidopsis thaliana*. *New Phytologist* **189**, 1069-1083.
- Bergmann D.C., Lukowitz W., Somerville C.R. (2004): Stomatal development and pattern controlled by a MAPKK kinase. *Science* **304**, 1494-1497.
- Bortesi L., Fischer R. (2015): The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* **33**, 41-52.
- Boyer J.S. (1982): Plant productivity and environment. *Science* **218**, 443-448.
- Burnett E.C., Desikan R., Moser R.C., Neill S.J. (2000): ABA activation of an MBP kinase in *Pisum sativum* epidermal peels correlates with stomatal responses to ABA. *Journal of Experimental Botany* **51**, 197-205.

- Bush S.M., Krysan P.J. (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of Experimental Botany* **58**, 2181-2191.
- Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Mare C., Tondelli A., Stanca A.M. (2008): Drought tolerance improvement in crop plants: An integrative view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 1-14.
- Cattivelli L., Rizza F., Badeck F.W., Mazzucotelli E., Mastrangelo A.M., Francia E., Mare C., Tondelli A., Stanca A.M. (2008): Drought tolerance improvement in crop plants: An integrative view from breeding to genomics. *Field Crops Research* **105**, 1-14.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): Arabidopsis MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* **413**, 217-226.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823.
- Curtin S.J., Zhang F., Sander J.D., Haun W.J., Starker C., Baltes N.J., Reyon D., Dahlborg E.J., Goodwin M.J., Coffman A.P., Dobbs D., Joung J.K., Voytas D.F., Stupar R.M. (2011): Targeted mutagenesis of duplicated genes in soybean with zinc-finger nucleases. *Plant Physiology* **156**, 466-473.
- Danquah A., de Zélicourt A., Boudsocq M., Neubauer J., Frei Dit Frey N., Leonhardt N., Pateyron S., Gwinner F., Tamby JP, Ortiz-Masia D, Marcote MJ, Hirt H, Colcombet J. (2015): Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **82**, 232-244.
- Danquah A., de Zelicourt A., Boudsocq M., Neubauer J., Frei dit Frey N., Leonhardt N., Pateyron S., Gwinner F., Tamby J.-P., Ortiz-Masia D., Marcote M. J., Hirt H., Colcombet J. (2015): Identification and characterization of an ABA-activated MAP kinase cascade in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **82**, 232-244.
- Danquah A., de Zelicourt A., Colcombet J., Hirt H. (2014): The role of ABA and MAPK signaling pathways in plant abiotic stress responses. *Biotechnology Advances* **32**, 40-52.
- De K.K., Saha A., Tamang R., Sharma B. (2010): Investigation on relative genome sizes and ploidy levels of Darjeeling-Himalayan *Rhododendron* species using flow cytometer. *Indian Journal of Biotechnology* **9**, 64-68.
- Dhanda S.S., Sethi G.S., Behl, R.K. (2004): Indices of drought tolerance in wheat genotypes at early stages of plant growth. *Journal of Agronomy and Crop Science* **190**, 6-12.
- Dóczi R., Brader G., Pettkó-Szandtner A., Rajh I., Djamei A., Pitzschke A., Teige M., Hirt H. (2007): The Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase MKK3 is upstream of group C mitogen-activated protein kinases and participates in pathogen signaling. *The Plant Cell* **19**, 3266-3279.
- Droillard M.-J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Laurière C. (2002): Different protein kinase families are activated by osmotic stresses in *Arabidopsis thaliana* cell suspensions. Involvement of the MAP kinases AtMPK3 and AtMPK6. *FEBS Letters* **527**, 43-50.
- Droillard M.J., Boudsocq M., Barbier-Brygoo H., Lauriere C. (2004): Involvement of MPK4 in osmotic stress response pathways in cell suspensions and plantlets of *Arabidopsis thaliana*: activation by hypoosmolarity and negative role in hyperosmolarity tolerance. *FEBS Letters* **574**, 42-48.
- Farooq M., Wahid A., Kobayashi N., Fujita D., Basra S. M. A. (2009): Plant drought stress: effects, mechanisms and management. *Agronomy for Sustainable Development* **29**, 185-212.
- Foyer C.H., Noctor G. (2003): Redox sensing and signalling associated with reactive oxygen in chloroplasts, peroxisomes and mitochondria. *Physiologia Plantarum* **119**, 355-364.
- Frye C.A., Tang D., Innes R.W. (2001): From the cover: negative regulation of defense responses in plants by a conserved MAPKK kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 373-378.
- Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. (2013): ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. *Trends in Biotechnology* **31**, 397-405.

- Gao M., Liu J., Bi D., Zhang Z., Cheng F., Chen S., Zhang Y. (2008): MEKK1, MKK1/MKK2 and MPK4 function together in a mitogen-activated protein kinase cascade to regulate innate immunity in plants. *Cell Research* **18**, 1190-1198.
- Germini D., Tsfasman T., Zakharova V.V., Sjakste N., Lipinski M., Vassetzky Y. (2018): A Comparison of Techniques to Evaluate the Effectiveness of Genome Editing. *Trends in Biotechnology* **36**, 147-159.
- Gomi K., Ogawa D., Katou S., Kamada H., Nakajima N., Saji H., Soyano T., Sasabe M., Machida Y., Mitsuhashi I., Ohashi Y., Seo S. (2005): A mitogen-activated protein kinase NtMPK4 activated by SIPKK is required for jasmonic acid signaling and involved in ozone tolerance via stomatal movement in tobacco. *Plant and Cell Physiology* **46**, 1902-1914.
- Gong H., Zhu X., Chen K., Wang S., Zhang C. (2005): Silicon alleviates oxidative damage of wheat plants in pots under drought. *Plant Science* **169**, 313-321.
- Gosal S.S., Wani S.H., Kang M.S. (2009): Biotechnology and drought tolerance. *Journal of Crop Improvement* **23**, 19-54.
- Gudesblat G.E., Iusem N.D., Morris P.C. (2007): Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytologist* **173**, 713-721.
- Gudesblat G.E., Iusem N.D., Morris P.C. (2007): Guard cell-specific inhibition of Arabidopsis MPK3 expression causes abnormal stomatal responses to abscisic acid and hydrogen peroxide. *New Phytol* **173**, 713-721.
- Gurushidze M., Hensel G., Hiekel S., Schedel S., Valkov V., Kumlehn J. (2014): True-Breeding Targeted Gene Knock-Out in Barley Using Designer TALE-Nuclease in Haploid Cells. *Plos one*, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0092046>.
- Hamel L.-P., Nicole M.-C., Duplessis S., Ellis B.E. (2012): Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling in Plant-Interacting Fungi: Distinct Messages from Conserved Messengers. *The Plant Cell* **24**, 1327-1351.
- Hoekstra F.A., Golovina E.A., Buitink J. (2001): Mechanisms of plant desiccation tolerance. *Trends in Plant Science* **6**, 431-438.
- Chaiwongsar S., Strohm A.K., Su S.H., Krysan P.J. (2012): Genetic analysis of the Arabidopsis protein kinases MAP3Kepsilon1 and MAP3Kepsilon2 indicates roles in cell expansion and embryo development. *Frontiers in Plant Science* **3**, 228.
- Chen W., Provart N.J., Glazebrook J., Katagiri F., Chang H.S., Eulgem T., Mauch F., Luan S., Zou G., Whitham S.A., Budworth P.R., Tao Y., Xie Z., Chen X., Lam S., Kreps J.A., Harper J.F., Si-Ammour A., Mauch-Mani B., Heinlein M., Kobayashi K., Hohn T., Dangl J.L., Wang X., Zhu T. (2002): Expression profile matrix of Arabidopsis transcription factor genes suggests their putative functions in response to environmental stresses, *The Plant Cell* **14**, 559-574.
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 756-761.
- Ichimura K., Casais C., Peck S.C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006): MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissue-specific and temperature-dependent cell death in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 36969-36976.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate Arabidopsis MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *Plant Journal* **24**, 655-665.
- Ichimura K., Shinozaki K., Tena G., Sheen J., Henry Y., Champion A., Kreis M., Zhang S., Hirt H., Wilson C., Heberle-Bors E., Ellis B.E., Morris P.C., Innes R.W., Ecker J.R., Scheel D., Klessig D.F., Machida Y., Mundy J., Ohashi Y., Walker J.C. (2002): Mitogen activated protein kinase cascades in plants: a new nomenclature. *Trends in Plant Science* **7**, 301-308.
- Jammes F., Song C., Shin D., Munemasa S., Takeda K., Gu D., Cho D., Lee S., Giordo R., Sritubtim S., Leonhardt N., Ellis B.E., Murata Y., Kwak J.M. (2009): MAP kinases MPK9 and MPK12 are preferentially expressed in guard cells and positively regulate ROS-mediated ABA signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20520-20525.

- Jia H., Hao L., Guo X., Liu S., Yan Y., Guo X. (2016): A Raf-like MAPKKK gene, GhRaf19, negatively regulates tolerance to drought and salt and positively regulates resistance to cold stress by modulating reactive oxygen species in cotton. *Plant Science* **252**, 267-281.
- Jonak C., Nakagami H., Hirt H. (2004): Heavy metal stress. Activation of distinct mitogen-activated protein kinase pathways by copper and cadmium. *Plant physiology* **136**, 3276-3283.
- Jouannic S., Champion J.A., Segui-Simarro J.-M., Salimova E., Picaud A., Tregear J., Testillano P., Risueño M.-C., Simanis V., Kreis M., Henry Y. (2001): The protein kinases AtMAP3Kepsilon1 and BnMAP3Kepsilon1 are functional homologues of *S. pombe* cdc7p and may be involved in cell division. *Plant Journal* **26**, 637-649.
- Joyce S.M., Cassells A.C., Mohan J.S. (2003): Stress and aberrant phenotypes *in vitro* culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* **74**, 103-121.
- Kavar T., Maras M., Kidric M., Sustar-Vozlic J., Meglic V. (2007): Identification of genes involved in the response of leaves of *Phaseolus vulgaris* to drought stress. *Molecular Breeding* **21**, 159-172.
- Kaya M.D., Okçub G., Ataka M., Çıkılıc Y., Kolsarıcia Ö. (2006): Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy* **24**, 291-295.
- Keshet Y., Seger R. (2010): The MAP Kinase Signaling Cascades: A System of Hundreds of Components Regulates a Diverse Array of Physiological Functions. In: *MAP Kinase Signaling Protocols*. 2nd ed., (Seger R. ed.), Humana Press, New York, USA, 3-38.
- Kim J.-M., Woo D.-H., Kim S.-H., Lee S.-Y., Park H.-Y., Seok H.-Y., Chung W.S., Moon Y.-H. (2012): Arabidopsis MKKK20 is involved in osmotic stress response via regulation of MPK6 activity. *Plant Cell Reports* **31**, 217-224.
- Kim S.H., Woo D.H., Kim J.M., Lee S.Y., Chung W.S., Moon Y.H. (2011): Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, 150-154.
- Kim S.H., Woo D.H., Kim J.M., Lee S.Y., Chung W.S., Moon Y.H. (2011): Arabidopsis MKK4 mediates osmotic-stress response via its regulation of MPK3 activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **412**, 150-154.
- Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 1156-1160.
- Kosetsu K., Matsunaga S., Nakagami H., Colcombet J., Sasabe M., Soyano T., Takahashi Y., Hirt H., Machida Y. (2010): The MAP kinase MPK4 is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell* **22**, 3778-3790.
- Kovtun Y., Chiu W.-L., Tena G., Sheen J. (2000): Functional analysis of oxidative stress-activated mitogen-activated protein kinase cascade in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 2940-2945.
- Kramer P.J., Boyer J.S. (1995): *Water relations of Plants and Soils*. Academic Press, San Diego.
- Krysan P.J., Jester P.J., Gottwald J.R., Sussman M.R. (2002): An Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinase kinase gene family encodes essential positive regulators of cytokinesis. *The Plant Cell* **14**, 1109-1120.
- Křenek P., Niks R.E., Vels A., Vyplelová P., Šamaj J. (2015): Genome-wide analysis of the barley MAPK gene family and its expression patterns in relation to *Puccinia hordei* infection. *Acta Physiologiae Plantarum* **37**, 254.
- Lee H.K., Cho S.K., Son O., Xu Z., Hwang I., Kim W.T. (2009): Drought Stress-Induced Rma1H1, a RING Membrane-Anchored E3 Ubiquitin Ligase Homolog, Regulates Aquaporin Levels via Ubiquitination in Transgenic Arabidopsis Plants. *The Plant Cell* **21**, 622-641.
- Leung J., Orfanidi S., Chedford F., M'ezaros T., Bolte S., Mizoguchi T., Shinozaki K., Giraudat J., B'ogre L. (2006): Antagonistic interaction between MAP kinase and protein phosphatase 2C in stress recovery. *Plant Science* **171**, 595-606.
- Li C., Yan J.M., Li Y.Z., Zhang Z.C., Wang Q.L., Liang Y. (2013): Silencing the SpMPK1, SpMPK2, and SpMPK3 Genes in Tomato Reduces Abscisic Acid-Mediated Drought Tolerance. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 21983-21996.

- Li W.X., Oono Y., Zhu J., He X.J., Wu J.M., Iida K., Lu X.Y., Cui X., Jin H., Zhu J.K. (2008): The Arabidopsis NFYA5 transcription factor is regulated transcriptionally and posttranscriptionally to promote drought resistance. *The Plant Cell* **20**, 2238-2251.
- Li Y., Cai H., Liu P., Wang C., Gao H., Wu C., Yan K., Zhang S., Huang J., Zheng C. (2017): Arabidopsis *MAPKKK18* positively regulates drought stress resistance via downstream *MAPKK3*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **484**, 292-297.
- Lisar S.Y.S., Motafakkerzad R., Hossain M. M., Rahman I.M.M. (2012): Water Stress in Plants: Causes, Effects and Responses. In: *Water Stress*. (Rahman I.M.M., Hasegawa H.), InTech, 1-14.
- Liu Y., Zhou M., Gao Z., Ren W., Yang F., He H., Zhao J. (2015): RNA-Seq Analysis Reveals MAPKKK Family Members Related to Drought Tolerance in Maize. *Plos one*, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0143128>.
- Liu Z., Li Y., Ma L., Wei H., Zhang J., He X., Tian C. (2015): Coordinated regulation of arbuscular mycorrhizal fungi and soybean MAPK pathway genes improved mycorrhizal soybean drought tolerance. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **28**, 408-419.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lukowitz W., Roeder A., Parmenter D., Somerville C. (2004): A MAPKK kinase gene regulates extra-embryonic cell fate in Arabidopsis. *Cell* **116**, 109-119.
- Ma H., Chen J., Zhang Z., Ma L., Yang Z., Zhang O., Li X., Xiao J., Wang S. (2017): MAPK kinase 10.2 promotes disease resistance and drought tolerance by activating different MAPKs in rice. *The Plant Journal* **92**, 557-570.
- Mahajan S., Tuteja N. (2005): Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **444**, 139-158.
- Manikavelu A., Nadarajan N., Ganesh S.K., Gnanamalar R.P., Babu R.C. (2006): Drought tolerance in rice: morphological and molecular genetic consideration. *Plant Growth Regulation* **50**, 121-138.
- Mansfield T.J., Atkinson C.J. (1990): Stomatal behaviour in water stressed plants. In: *Stress Responses in Plants: Adaptation and Acclimation Mechanisms*. (Alscher R.G., Cumming J.R.), Wiley-Liss, New York, 241-264.
- Matsuoka D., Yasufuku T., Furuya T., Nanmori T. (2015): An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Molecular Biology* **87**, 565-575.
- Matsuoka D., Yasufuku T., Furuya T., Nanmori T. (2015): An abscisic acid inducible Arabidopsis MAPKKK, MAPKKK18 regulates leaf senescence via its kinase activity. *Plant Molecular Biology* **87**, 565-575.
- Mészáros T., Helfer A., Hatzimasoura E., Magyar Z., Serazetdinova L., Rios G., Bardóczy V., Teige M., Koncz C., Peck S., Bögre L. (2006): The Arabidopsis MAP kinase kinase MKK1 participates in defence responses to the bacterial elicitor flagellin. *Plant Journal* **48**, 485-498.
- Meyer S., Genty B. (1998): Mapping Intercellular CO₂ Mole Fraction (C_i) in *Rosa rubiginosa* Leaves Fed with Abscisic Acid by Using Chlorophyll Fluorescence Imaging: Significance of C_i Estimated from Leaf Gas Exchange. *Plant Physiology* **116**, 947-957.
- Meyers B., Zaltsman A., Lacroix B., Kozlovsky S.V., Krichevsky A. (2010): Nuclear and plastid genetic engineering of plants: comparison of opportunities and challenges. *Biotechnology Advances* **28**, 747-756.
- Mitula F., Tajdel M., Cieśla A., Kasproicz-Maluški A., Kulik A., Babula-Skowrońska D., Michalak M., Dobrowolska G., Sadowski J., Ludwików A. (2015): Arabidopsis ABA-Activated Kinase MAPKKK18 is Regulated by Protein Phosphatase 2C ABI1 and the Ubiquitin-Proteasome Pathway. *Plant and Cell Physiology* **56**, 2351-2367.
- Mohanta T.K., Arora P.K., Mohanta N., Parida P., Bae H. (2015): Identification of new members of the MAPK gene family in plants shows diverse conserved domains and novel activation loop variants. *BMC Genomics* **16**:58. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1244-7>.
- Morgan P.W. (1990): Effects of abiotic stresses on plant hormone systems. In: *Stress Responses in plants: adaptation and acclimation mechanisms*. Wiley-Liss, Inc., 113-146.

- Nakagami H., Soukupová H., Schikora A., Zárský V., Hirt H. (2006): A Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Kinase Mediates Reactive Oxygen Species Homeostasis in Arabidopsis. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 38697-38704.
- Nilsen E.T., Orcutte D.M. (1996): Phytohormones and plant responses to stress. In: *Physiology of Plant under Stress: Abiotic Factors*. (Nilsen E.T., Orcutte D.M.), John Wiley and Sons, New York, 183-198.
- Ning J., Li X., Hicks L.M., Xiong L. (2010): Raf-like MAPKKK gene DSM1 mediates drought resistance through reactive oxygen species scavenging in rice. *Plant Physiology* **152**, 876-890.
- Okcu G., Kaya M.D., Atak M. (2005): Effects of salt and drought stresses on germination and seedling growth of pea (*Pisum sativum* L.). *Turkish Journal of Agriculture and Forestry* **29**, 237-242.
- Ortiz-Masia D., Perez-Amador M.A., Carbonell J., Marcote M.J. (2007): Diverse stress signals activate the C1 subgroup MAP kinases of Arabidopsis. *FEBS Letters* **581**, 1834-1840.
- Pabo C. O., Peisach E., Grant R. A. (2001): Design and selection of novel Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 313-340.
- Pavletich N.P., Pabo C.O. (1991): Zinc finger-DNA recognition: crystal structure of a Zif268-DNA complex at 2.1. *Science* **252**, 809-817.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., Johansen B., Nielsen H.B., Lacy M., Austin M.J., Parker J.E., Sharma S.B., Klessig D.F., Martienssen R., Mattsson O., Jensen A.B., Mundy J. (2000): Arabidopsis MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* **103**, 1111-1120.
- Popescu S.C., Popescu G.V., Bachan S., Zhang Z., Gerstein M., Snyder M., Dinesh-Kumar S.P. (2009): MAPK target networks in Arabidopsis thaliana revealed using functional protein microarrays. *Genes & Development* **23**, 80-92.
- Qiu J.-L., Zhou L., Yun B.-W., Nielsen H.B., Fiil B.K., Petersen K., MacKinlay J., Loake G.J., Mundy J., Morris P.C. (2008): Arabidopsis mitogen-activated protein kinase kinases MKK1 and MKK2 have overlapping functions in defense signaling mediated by MEKK1, MPK4, and MKS1. *Plant Physiology* **148**, 212-222.
- Ramanjulu S., Bartels D. (2002): Drought- and desiccation-induced modulation of gene expression in plants. *Plant, Cell & Environment* **25**, 141-151.
- Rao A.Q., Bakhsh A., Kiani S., Shahzad K., Shahid A.A., Husnain T., Riazuddin S. (2009): The myth of plant transformation. *Biotechnology Advances* **27**, 753-763.
- Ren D., Yang H., Zhang S. (2002): Cell death mediated by MAPK is associated with hydrogen peroxide production in Arabidopsis. *Journal of Biological Chemistry* **277**, 559-565.
- Reyon D., Tsai S.Q., Khayter C., Foden J.A., Sander J.D., Joung J.K. (2012): FLASH assembly of TALENs for high-throughput genome editing. *Nature Biotechnology* **30**, 460-465.
- Rivera A.L., Gómez-Lim M., Fernández F., Loske A.M. (2012): Physical methods for genetic plant transformation. *Physics of Life Reviews* **9**, 308-345.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Samarah N.H. (2005): Effects of drought stress on growth and yield of barley. *Agronomy for Sustainable Development* **25**, 145-149.
- Shalem O., Sanjana N.E., Zhang F. (2015): High-throughput functional genomics using CRISPR-Cas9. *Nature Reviews Genetics* **16**, 299-311.
- Shen H., Liu C., Zhang Y., Meng X., Zhou X., Chu C., Wang X. (2012): OsWRKY30 is activated by MAP kinases to confer drought tolerance in rice. *Plant Molecular Biology* **80**, 241-253.
- Shi J., Gao H., Wang H., Lafitte H. R., Archibald R. L., Yang M., Hakimi S.M., Mo H., Habben J.E. (2017): ARGOS8 variants generated by CRISPR-Cas9 improve maize grain yield under field drought stress conditions. *Plant Biotechnology Journal* **16**, 299-311.
- Shi J., Zhang L., An H., Wu C., Guo X. (2011): GhMPK16, a novel stress-responsive group D MAPK gene from cotton, is involved in disease resistance and drought sensitivity. *BMC Molecular Biology* **12**:22. <http://www.biomedcentral.com/1471-2199/12/22>.
- Shim G., Kim D., Park G.T., Jin H., Suh S.K., Oh Y.K. (2017): Therapeutic gene editing: delivery and regulatory perspectives. *Acta Pharmacologica Sinica* volume 38, 738-753

- Schuppler U., He P.H., John P.C.L., Munns R. (1998): Effects of water stress on cell division and cell-division-cycle-2-like cell-cycle kinase activity in wheat leaves. *Plant Physiology* **117**, 667-678.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 196-203.
- Sinha A.K., Jaggi M., Raghuram B., Tuteja N. (2011): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants under abiotic stress. *Plant Signaling & Behavior* **6**, 196-203.
- Smékalová V., Doskočilová A., Komis G., Šamaj J. (2013): Crosstalk between secondary messengers, hormones and MAPK modules during abiotic stress signalling in plants. *Biotechnology Advances* **32**, 2-11.
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.-H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. (2007): MEKK1 Is required for flg22-Induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant Physiology* **143**, 661-669.
- Subbarao G.V., Johansen C., Slinkard A.E., Rao R.C.N., Saxena N.P., Chauhan Y.S. (1995): Strategies and scope for improving drought resistance in grain legumes. *Critical Reviews in Plant Sciences* **14**, 469-523.
- Sun W., Chen H., Wang J., Sun W.H., Yang S.K., Sang Y.L., Lu X.B., Xu X.H. (2015): Expression analysis of genes encoding mitogen-activated protein kinases in maize provides a key link between abiotic stress signaling and plant reproduction. *Functional & Integrative Genomics* **15**, 107-120.
- Šamajová O., Komis G., Šamaj J. (2013a): Emerging topics in the cell biology of mitogen-activated protein kinases. *Trends in Plant Science* **18**, 140-148.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013b): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* **31**, 118-128.
- Taiz L., Zeiger E. (2006): *Plant Physiology*, 4th Ed., Sinauer Associates, Inc. Publishers, Massachusetts.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3–MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 805-818.
- Takahashi Y., Soyano T., Kosetsu K., Sasabe M., Machida Y. (2010): HINKEL kinesin, ANP MAPKKs and MKK6/ANQ MAPKK, which phosphorylates and activates MPK4 MAPK, constitute a pathway that is required for cytokinesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology* **51**, 1766-1776.
- Tang D., Christiansen K.M., Innes R.W. (2005): Regulation of plant disease resistance, stress responses, cell death, and ethylene signaling in Arabidopsis by the EDR1 protein kinase. *Plant Physiology* **138**, 1018-1026.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., Shinozaki K., Dangl J.L., Hirt H. (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in Arabidopsis. *Molecular Cell* **15**, 141-152.
- Tieman D., Zhu G., Resende M.F.Jr., Lin T., Nguyen C., Bies D., Rambla J.L., Beltran K.S., Taylor M., Zhang B., Ikeda H., Liu Z., Fisher J., Zemach I., Monforte A., Zamir D., Granell A., Kirst M., Huang S., Klee H. (2017): A chemical genetic roadmap to improved tomato flavor. *Science* **355**, 391-394.
- Tichá T. (2016): *Charakterizace transgenních linií ječmene s modifikovanou expresí vybraných mitogenaktivovaných protein kinas*. Diplomová práce, UP Olomouc, Česká republika.
- Tripathy J.N., Zhang J., Robin S., Nguyen T.T., Nguyen H.T. (2000): QTLs for cell-membrane stability mapped in rice (*Oryza sativa* L.) under drought stress. *Theoretical and Applied Genetics* **100**, 1197-1202.
- Turner N.C., Wright G.C., Siddique K.H.M. (2001): Adaptation of grain legumes (pulses) to water-limited environments. *Advances in Agronomy* **71**, 123-231.
- Wang H., Ngwenyama N, Liu Y., Walker J.C., Zhang S. (2007): Stomatal development and patterning are regulated by environmentally responsive mitogen-activated protein kinases in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 63-73.

- Wang J, Ding H, Zhang A, Ma F, Cao J, Jiang M. (2010): A novel mitogen-activated protein kinase gene in maize (*Zea mays*), ZmMPK3, is involved in response to diverse environmental cues. *Journal of Integrative Plant Biology* **52**, 442-452.
- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C. (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature Biotechnology* **32**, 947-951.
- Weng Ch.M., Lu J.X., Wan H.F., Wang S.W., Wang Z., Lu K., Liang Y. (2014): Over-Expression of *BnMAPK1* in Brassica napus Enhances Tolerance to Drought Stress. *Journal of Integrative Agriculture* **13**, 2407-2415.
- Wrzaczek M., Hirt H. (2001): Plant MAP kinase pathways: how many and what for? *Biology of the Cell* **93**, 81-87.
- Xiong L., Yang Y. (2003): Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant Cell* **15**, 745-759.
- Xu J., Zhang S. (2015): Mitogen-activated protein kinase cascades in signaling plant growth and development. *Trends in Plant Science* **20**, 56-64.
- Yeh C.-M., Chien P.-S., Huang H.-J. (2007): Distinct signalling pathways for induction of MAP kinase activities by cadmium and copper in rice roots. *Journal of Experimental Botany* **58**, 659-671.
- Zeng Q., Chen J.-G., Ellis B.E. (2011): AtMPK4 is required for male-specific meiotic cytokinesis in Arabidopsis. *Plant Journal* **67**, 895-906.
- Zhang L., Xi D., Li S., Gao Z., Zhao S., Shi J., Wu C., Guo X. (2011): A cotton group C MAP kinase gene, GhMPK2, positively regulates salt and drought tolerance in tobacco. *Plant Molecular Biology* **77**, 17-31.
- Zhang X., Cheng T., Wang G., Yan Y., Xia Q. (2013): Cloning and evolutionary analysis of tobacco MAPK gene family. *Molecular Biology Reports* **40**, 1407-1415.
- Zhu J.K. (2002): Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual Review of Plant Biology* **53**, 247-273.
- Zupan J., Zambryski P., Citovsky V. (2011): The *Agrobacterium* DNA Transfer Complex, *Critical Reviews in Plant Sciences* **16**, 279-295.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

% – procento

°C – stupeň Celsia

ABA – kyselina abscisová

ABI1 – „ABA-INSENSITIVE 1“

ACT1 – rýžový aktinový promotor

AMF – „arbuscular mycorrhizal fungi“

CRISPR – „clustered regulatory interspaced short palindromic repeats“

CTAB – cetyltrimetylamoniumbromid

DEG – „differentially expressed genes“

DSB – dvouřetězcový zlom

DSM1 – „drought hypersensitive mutant1“

EDR1 – „enhanced disease resistance 1“

EDTA – kyselina ethylendiamintetraoctová

g – násobek gravitačního zrychlení

h – hodina

HR – homologní rekombinace

Hyg – hygromicinový gen - marker pro selekci transgenních rostlin

LB – levá hranice T-DNA

MAP4K – mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa kinasa

MAPK (MPK) – mitogenem aktivovaná protein kinasa

MAPKK (MAP2K, MKK) – mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa

MAPKKK (MAP3K, MEKK) – mitogenem aktivovaná protein kinasa kinasa kinasa

MDA – malondialdehyd

min – minuta

mol.l⁻¹ – mol na litr

NHEJ – nehomologního spojování konců chromosomů

NT – nos terminátor

PAMP – molekulární vzorec asociovaný s patogeny

PCR – polymerasová řetězová reakce

PEG – polyethylenglykol

PP2C – protein fosfatasa 2C

RB – pravá hranice T-DNA

RNAi – RNA interference

ROS – reaktivní formy kyslíku

s – sekunda

SAMK – stresem aktivovaná MAPK

SIMK – solným stresem indukovaná MAPK

SIMKK – solným stresem indukovaná MAPK kinasa

TAE – Tris-acetát-EDTA

TALLEN – TAL efektor nukleasy

T-DNA – transferová DNA

Ubi – kukuřičný ubikvitinový promotor

V – volt

VIGS – virem indukované umlčení genu

w/v – hmotnost na objem

Wt – rostlina divokého typu

ZF1 – kódující nukleotidová sekvence pro TAL efektor s monomerem *FokI* nukleasy

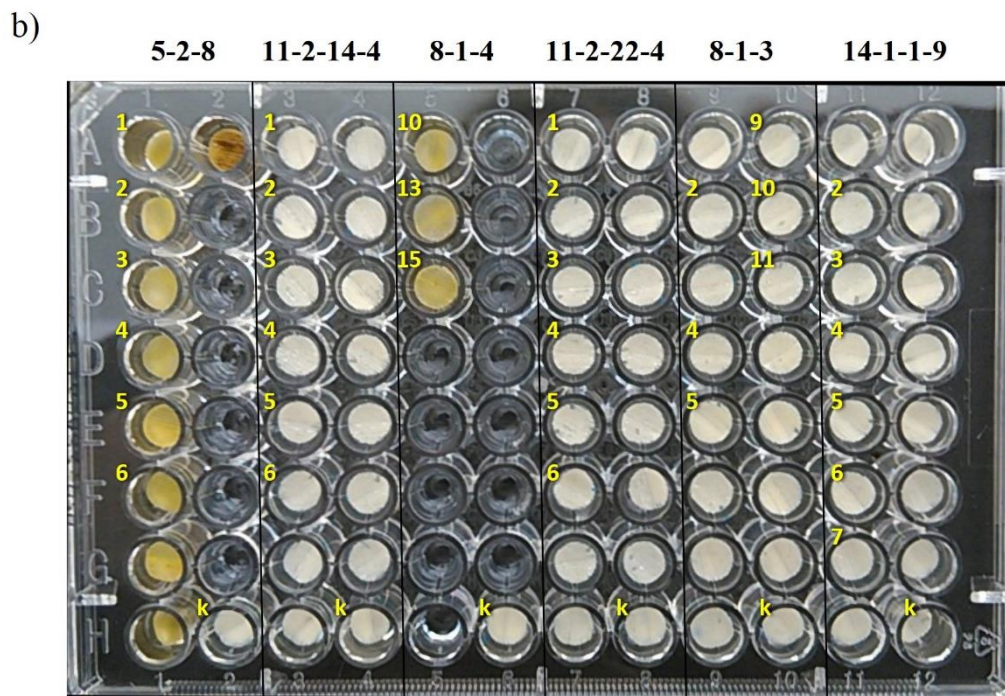
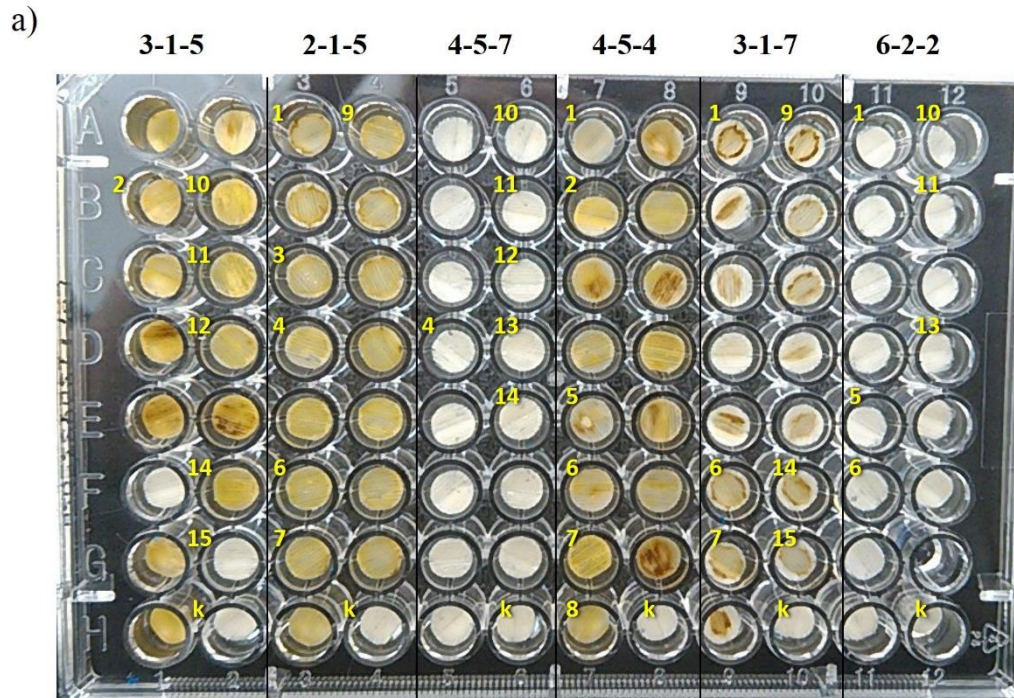
ZFN – nukleasa s motivem zinkových prstů

ZR1 – kódující nukleotidová sekvence pro TAL efektor s monomerem *FokI* nukleasy

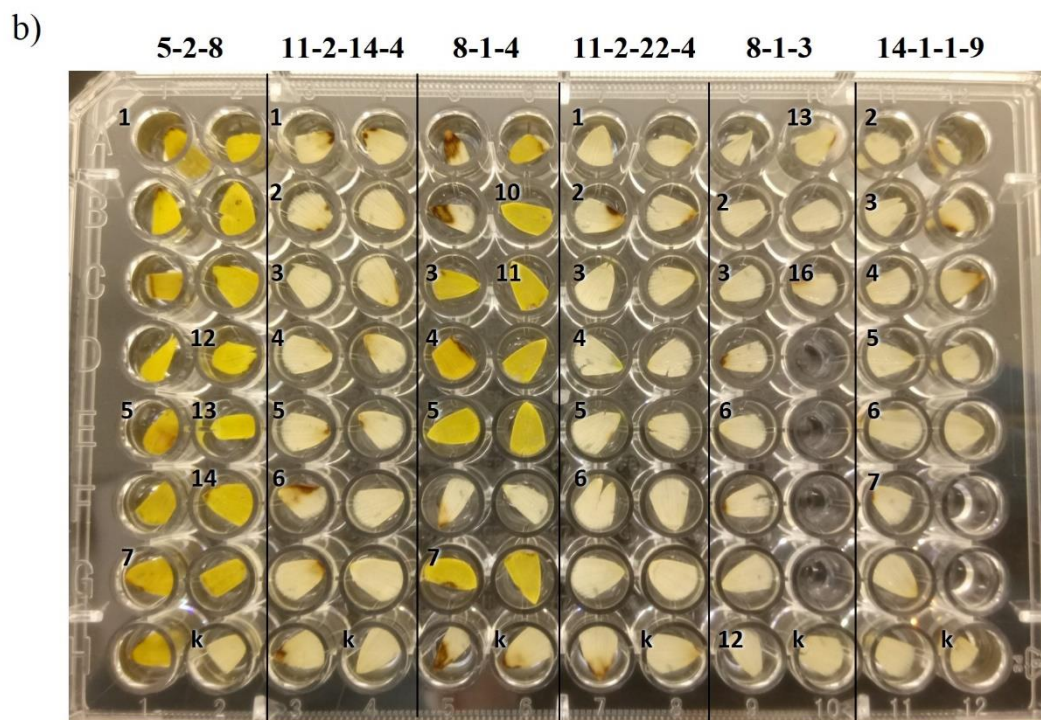
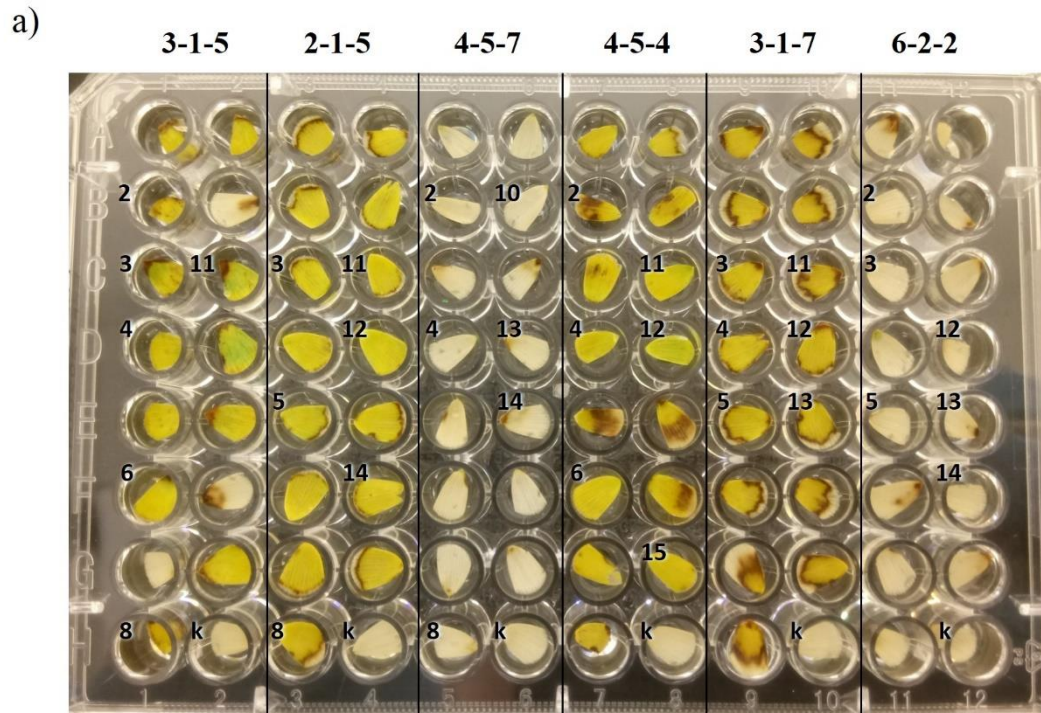
9 PŘÍLOHY

CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAACCAGTTCGAGATCAGCGGCAAGTACAGCCGCGGATC	Divoký typ
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA-----TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(1-1-6-20) 5nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA-----TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(1-1-6-24) 5nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA-----TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(2-1-5-21) 5nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA-----TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(2-1-5-22) 5nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA-----TCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(2-1-12-2) 5nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CGG	(3-1-7-3) 47nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-3) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-4) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-5) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-1) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-3) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGC-----CAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-4) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-1) 4nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-2) 4nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-9) 4nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-4-1) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-4-2) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-14-4-3) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-4-2) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-4-3) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTC-----GGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(11-2-22-4-4) 20nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-9-5) 4nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-9-6) 4nt
CCGGTTCCTCTCTACAACATATTCGGCAA----TTCGAGATCACGGCCAAGTACCAGCCGCGGATC	(14-1-1-9-8) 4nt

Obr. P1 Výsledky sekvenace vybraných jedinců T2 a T3 generace transgenních Z1 rostlin s taleny indukovanými mutacemi v genu *HvMPK3*. Zobrazeny jsou výsledky sekvenační analýzy PCR produktu markeru jK3Zgr. Přiřazeny jsou jenom nukleotidové sekvence zahrnující dílčí oblast prvního exonu *HvMPK3* genu – místo nasedání talenového páru Z1 (červeně). Šedě je naznačena sekvence *HvMPK3* alely rostliny divokého typu. Žlutě jsou zvýrazněny sekvence alel *HvMPK3*, kde se vyskytují mutace způsobující posun čtecího rámce (nezvýrazněné sekvence odpovídají mutacím, které nezpůsobují posun čtecího rámce). Počet nt za závorkou definuje množství deletovaných nukleotidů. U potomků rostlin 11-2-14, 11-2-22 a 14-1-1 (charakterizováno Mgr. Terezou Tichou) dochází k přenosu mutace na potomstvo. Mutace byla potvrzena u rostlin v další generaci. Potomci rostlin 1-1-6, 2-1-5, 2-1-12 a 3-1-7 mutaci v genu přenášejí do další generace. Rostlina 3-1-7 nenesla mutaci, která by způsobovala posun čtecího rámce (Obr. 13), avšak u jejího potomka 3-1-7-3 se vyskytla mutace způsobující posun čtecího rámce (mutace o násobku třech nukleotidů).

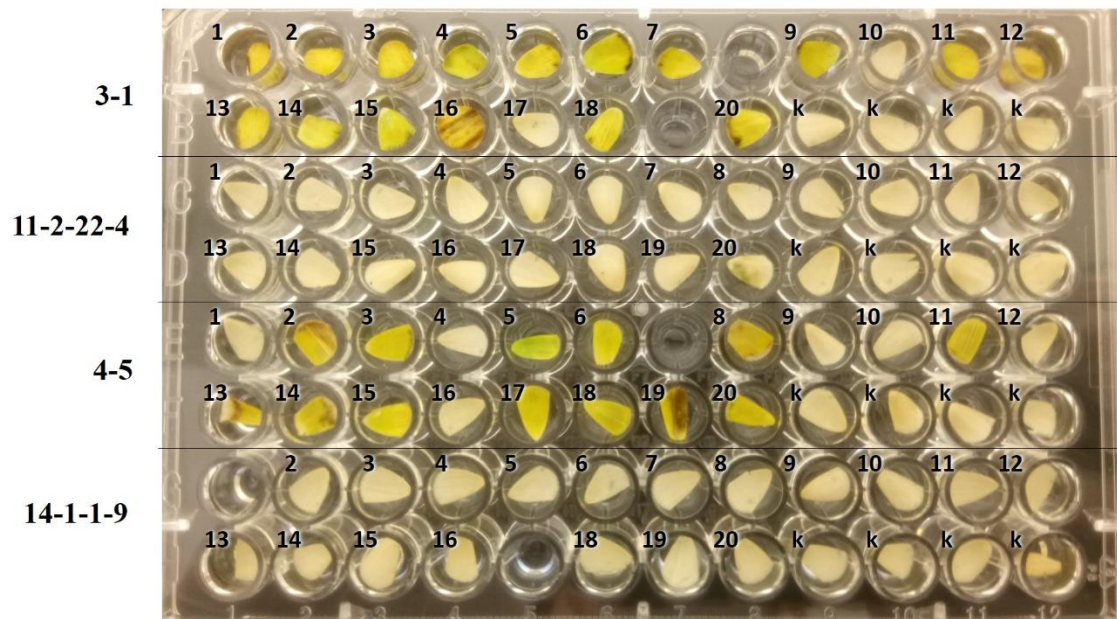


Obr. P2 Test hygromycinové rezistence pro první pokus měření dynamiky ztráty vody z rostlin. **a)** První destička s listovými disky potomků transgenních rostlin. Z1 linie: 2-1-5, 3-1-7. K3i linie: 3-1-5, 4-5-4. Negativní sesterské rostliny: 4-5-7, 6-2-2. **b)** Druhá destička s listovými disky potomků transgenních linií. Z1 linie: 11-2-14-4, 11-2-22-4, 14-1-1-9. K3i linie: 5-2-8, 8-1-4. Negativní sesterské rostliny: 8-1-3, k označuje kontrolní rostlinu divokého typu. Žlutá čísla značí vybrané rostliny pro pokus.

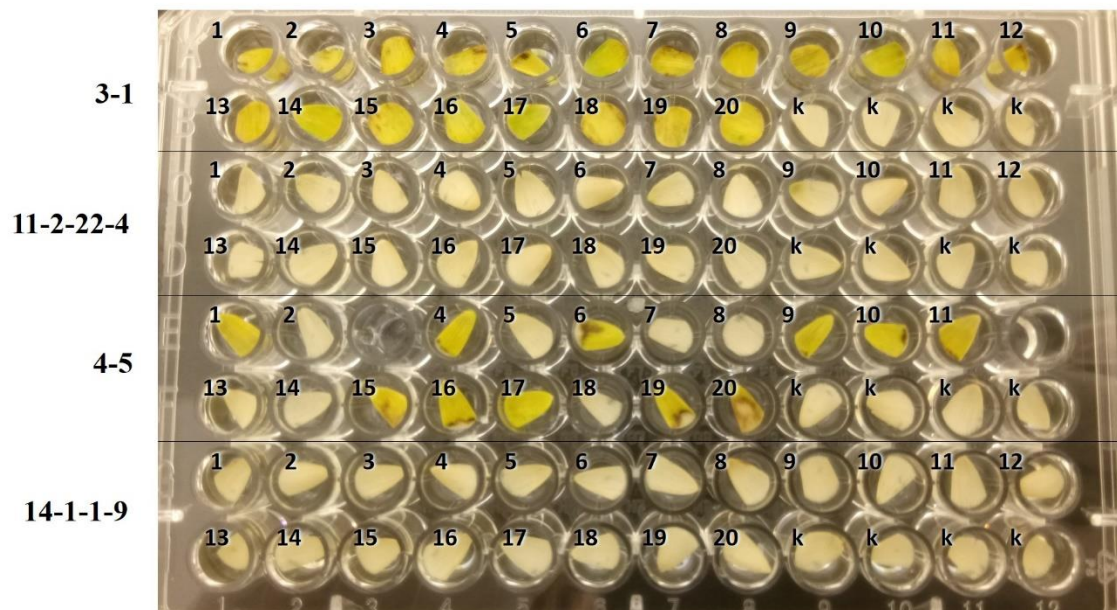


Obr. P3 Test hygromycinové rezistence pro druhý pokus měření dynamiky ztráty vody z rostlin. **a)** První destička s listovými disky potomků transgenních rostlin. Z1 linie: 2-1-5, 3-1-7. K3i linie: 3-1-5, 4-5-4. Negativní sesterské rostliny: 4-5-7, 6-2-2. **b)** Druhá destička s listovými disky potomků transgenních rostlin. Z1 linie: 11-2-14-4, 11-2-22-4, 14-1-1-9. K3i linie: 5-2-8, 8-1-4. Negativní sesterské rostliny: 8-1-3, k označuje kontrolní rostlinu divokého typu. Černá čísla značí vybrané rostliny pro pokus.

a)



b)



Obr. P4 Test hygromycinové rezistence pro pokus vadnutí. Celkem bylo analyzováno touto metodou 185 rostlin, z toho bylo 153 transgenních a 32 kontrolních rostlin. Z1 linie: 11-2-22-4, 14-1-1-9. K3i linie: 3-1, 4-5. Od každé linie bylo celkem vyseto 40 semen. Prázdná místa na destičkách značí rostliny, které nevyrostly nebo nebyly z důvodu malého vzrůstu analyzovány. **a)** První destička s listovými disky potomků transgenních rostlin (prvních 20 potomků). **b)** Druhá destička s listovými disky potomků transgenních rostlin (dalších 20 potomků).