

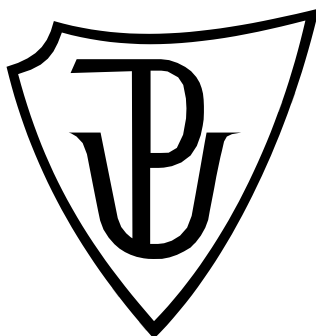
Univerzita Palackého v Olomouci

Bakalářská práce

Olomouc 2023

Marie Červenková

**Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky**



**Analýza exprese genů v endospermu ječmene
setého technikou RNA *in-situ* hybridizace**

Bakalářská práce

Marie Červenková

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2023

Vedoucí práce: Mgr. Martin Kovačik

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Akademický rok: 2021/2022

ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(projektu, uměleckého díla, uměleckého výkonu)

Jméno a příjmení: Marie ČERVENKOVÁ
Osobní číslo: R20695
Studijní program: B1501 Biologie
Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie
Téma práce: Analýza exprese genů v endospermu ječmene setého technikou RNA in-situ hybridizace
Zadávající katedra: Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování

- 1) Zpracování exprese genů v endospermu ječmene setého technikou RNA in-situ hybridizace
- 2) Návrh a syntéza RNA sond pro vyprané geny
- 3) Příprava vzorků včetně řezání na mokrotomu
- 4) RNA in-situ hybridizace
- 5) Detekce a vyhodnocení exprese jednotlivých genů

Rozsah pracovní zprávy:

Rozsah grafických prací:

Forma zpracování bakalářské práce: tištěná

Seznam doporučené literatury:

- 1) Sabelli, P. A., & Larkins, B. A. (2009). The development of endosperm in grasses. *Plant physiology*, 149(1), 14-26.
- 2) Olsen, O. A. (2001). Endosperm development: cellularization and cell fate specifications. *Annual review of plant biology*, 52(1), 233-267.
- 3) Sreenivasulu, N., Borisjuk, L., Junker, B. H., Mock, H. P., Rolletschek, H., Seiffert, U., & Wobus, U. (2010). Barley grain development: toward an integrative view. *International review of cell and molecular biology*, 281, 49-89.
- 4) Nowicka, A., Kovacik, M., Tokarz, b., Vrána, J., Zhang, Y., Weigt, D., & Pecinka, A. (2021). Dynamics of endoreduplication in developing barley seeds. *Journal of Experimental Botany*, 72(2), 268-286.
- 5) Zölner, N. R., Bezruczyk, M., Laureyns, R., Nellisen, H., Simon, R., & Frommer, W. B. (2021). An RNA in situ hybridization protocol optimized for monocot tissue. *STAR protocols*, 2(2), 100398.
- 6) Lafon-Placette, C., & Köhler, C. (2014). Embryo and endosperm, partners in seed development. *Current Opinion in Plant Biology*, 17, 64-69.
- 7) Olsen, O. A. (2020). The modular control of cereal endosperm development. *Trends in Plant Science*, 25(3), 279-290.

Vedoucí bakalářské práce:

Mgr. Martin Kovačik

Katedra buněčné biologie a genetiky

Datum zadání bakalářské práce: 29. března 2022
Termín odevzdání bakalářské práce: 31. července 2023

doc. RNDr. Martin Kubala, Ph.D.
děkan

prof. RNDr. Zdeněk Dvořák, DrSc.
vedoucí katedry

V Olomouci dne 30. března 2022

BIBLIOGRAFICKÉ ÚDAJE

Jméno a příjmení autora: Marie Červenková

Název práce: Analýza exprese genů v endospermu ječmene setého technikou RNA *in-situ* hybridizace

Typ práce: Bakalářská

Pracoviště: Katedra buněčné biologie a genetiky, PřF UP v Olomouci

Vedoucí práce: Mgr. Martin Kovačik

Rok obhajoby práce: 2023

Abstrakt:

Endosperm představuje největší část semen a je jejich významnou částí, a to nejen z pohledu vývoje rostliny, ale také z hospodářského hlediska. Obsahuje několik částí, z nichž každá plní specifickou funkci. Diferenciace těchto částí je spojena s expresí rozdílných genů se specifickou expresí v určitých obdobích vývoje. Technika RNA *in-situ* hybridizace umožňuje ověřit expresi specifických genů v průběhu vývoje a určit konkrétní oblast endospermu, ve které jsou exprimovány.

Teoretická část této práce se věnuje popisu částí semene ječmene setého, včetně jednotlivých částí endospermu. Dále je popsán průběh vývoje endospermu a jeho jednotlivá období. Další kapitoly obsahují informace o technice RNA *in-situ* hybridizace a o jednotlivých sledovaných genech.

Experimentální část sestávala z fixace a přípravy vzorků, navržení a syntézy RNA sond a samotnou hybridizací. Byla provedena optimalizace několika kroků v celém tomto procesu. Přesto však nebylo dosaženo detekce signálu s použitím sond pro sledované geny a jejich exprese tedy nemohla být analyzována.

Klíčová slova: *Hordeum vulgare*, vývoj endospermu, *in-situ* hybridizace, RNA

Počet stran: 65

Jazyk: Český

BIBLIOGRAPHICAL IDENTIFICATION

Author's first name and surname: Marie Červenková

Title: Analysis of gene expression in barely endosperm by RNA *in-situ* hybridization

Type of thesis: Bachelor

Department: Department of cell biology and Genetics, Faculty of Science, Palacky University, Olomouc

Supervisor: Mgr. Martin Kovačik

The year of presentation: 2023

Abstract:

Endosperm represents the largest part of the seeds and is their important part, not only for plant development, but also from an economic point of view. It contains several parts, each of which performs a specific function. The differentiation of these parts is associated with the expression of different genes with specific expression in certain periods of development. The technique of RNA *in-situ* hybridization makes it possible to determine the expression of specific genes during development and to establish the specific region of the endosperm in which they are expressed.

The theoretical part of this work is devoted to the description of the parts of the Barley seed, including the individual parts of the endosperm. The course of endosperm development and its individual periods are also described. Other chapters contain information on the technique of RNA *in-situ* hybridization and on individual monitored genes.

The experimental part consisted of fixation and preparation of samples, design and synthesis of RNA probes and hybridization itself. Several steps in this entire process have been optimized. Nevertheless, signal was not detected using the probes for the genes of interest and their expression could not be analyzed.

Keywords: *Hordeum vulgare*, endosperm development, *in-situ* hybridization, RNA

Number of pages: 65

Language: Czech

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracovala samostatně v průběhu bakalářského studia pod vedením Mgr. Martina Kovačika s použitím uvedených literárních zdrojů.

Poděkování

Ráda bych poděkovala vedoucímu své práce Mgr. Martinu Kovačikovi za odborné vedení, věnovaný čas, ochotu a veškeré poskytnuté rady. Dále bych ráda poděkovala celému vědeckému týmu doc. Mgr. Aleše Pečinky, Ph.D. za poskytnuté rady a příjemné pracovní prostředí.

Obsah:

| | |
|---|----|
| 1 ÚVOD | 1 |
| 2 CÍLE PRÁCE | 2 |
| 3 LITERÁRNÍ PŘEHLED | 3 |
| 3.1 Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)..... | 3 |
| 3.2 Struktura obilky ječmene setého | 4 |
| 3.2.1 Obalové vrstvy | 5 |
| 3.2.2 Endosperm..... | 6 |
| 3.2.3 Embryo | 7 |
| 3.3 Vývoj obilky ječmene setého | 8 |
| 3.3.1 Raný vývoj | 8 |
| 3.3.2 Diferenciace..... | 10 |
| 3.3.3 Zrání | 12 |
| 3.4 RNA <i>in-situ</i> hybridizace..... | 12 |
| 3.5 Sledované geny..... | 15 |
| 4 MATERIÁL a METODY | 16 |
| 4.1 Biologický materiál | 16 |
| 4.2 Použité chemikálie, soupravy, roztoky..... | 16 |
| 4.2.1 Požité chemikálie..... | 16 |
| 4.2.2 Použité soupravy | 18 |
| 4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava..... | 18 |
| 4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení..... | 22 |
| 4.3.1 Přístroje a zařízení | 22 |
| 4.3.2 Programy | 23 |
| 4.4 Experimentální a vyhodnocovací postupy..... | 23 |
| 4.4.1 Získání a úprava semen | 23 |
| 4.4.2 Fixace a ukotvení pletiv..... | 24 |
| 4.4.3 Příprava řezů..... | 25 |
| 4.4.4 Barvení toluidinovou modří | 25 |
| 4.4.5 Design sond | 26 |
| 4.4.6 Syntéza DNA sond | 29 |

| | |
|---|----|
| 4.4.7 Syntéza RNA sond | 31 |
| 4.4.8 Kontrola efektivity značení | 31 |
| 4.4.9 <i>In-situ</i> hybridizace | 32 |
| 4.4.10 Detekce | 34 |
| 5 VÝSLEDKY | 36 |
| 5.1 Optimalizace fixace | 36 |
| 5.2 Syntéza sond..... | 38 |
| 5.3 Optimalizace hybridizace | 40 |
| 6 DISKUSE | 45 |
| 7 ZÁVĚR..... | 47 |
| 8 LITERATURA..... | 48 |

SEZNAM SYMBOLŮ a ZKRATEK:

| | |
|----------------------|--|
| BCIP | 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfát |
| BSA | Hovězí sérový albumin (bovine serum albumin) |
| cDNA | Komplementární DNA |
| DAP | Dny po opylení (days after pollination) |
| DEPC | Dietyl pyrokarbonát |
| DIG | digoxigenin |
| EDTA-Na ₂ | Dihydrát disodné soli kyseliny etylendiamintetraoctové |
| ESR | Oblast obklopující embryo (embryo surrounding region) |
| NBT | 4-Nitro blue tetrazolium chlorid |

SEZNAM OBRÁZKŮ:

Obrázek č. 1: Morfologie květu ječmene.

Obrázek č. 2: Morfologie obilky ječmene.

Obrázek č. 3: Morfologie embrya u semene 16 dní po opylení.

Obrázek č. 4: Semeno ječmene setého v různých bodech vývoje od opylení do dozrání.

Obrázek č. 5: Postup celularizace syncytia.

Obrázek č. 6: Dělení buněk a tvorba nových vrstev endospermu.

Obrázek č. 7: Schéma průběhu hybridizace a detekce sondy.

Obrázek č. 8: Schéma ořezání semen ječmene před jejich fixací znázorněné na semeni 16 DAP.

Obrázek č. 9: Semena 4 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Obrázek č. 10: Semena 8 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Obrázek č. 11: Semena 16 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Obrázek č. 12: Elektroforetická separace prekurzorů sond syntetizovaných v PCR 1.

Obrázek č. 13: Elektroforetická separace DNA sond syntetizovaných v PCR 2.

Obrázek č. 14: Detekce a ověření funkčnosti syntetizovaných RNA sond.

Obrázek č. 15: Výsledky třetí hybridizace.

Obrázek č. 16: Výsledek hybridizace u semene 16 DAP se sense sondou pro histon H4.

Obrázek č. 17: Výsledky čtvrté hybridizace pro pozitivní kontrolu.

SEZNAM TABULEK:

Tabulka č. 1: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro barvení toluidinovou modří.

Tabulka č. 2: Přehled primerů použitých k přípravě sond.

Tabulka č. 3: Přehled prekurzorů sond použitých k syntéze antisense a sense DNA sond.

Tabulka č. 4: Sekvence primerů a prekurzoru sondy pro histon H4.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro PCR reakci.

Tabulka č. 6: Seznam použitých primerů pro syntézu prekurzorů DNA sond v PCR 1.

Tabulka č. 7: Program pro PCR reakci.

Tabulka č. 8: Seznam použitých primerů pro syntézu DNA sond v PCR 2.

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro syntézu RNA sond.

Tabulka č. 10: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro ověření funkčnosti RNA sond.

Tabulka č. 11: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro přípravu pletiv.

Tabulka č. 12: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro vymývání.

Tabulka č. 13: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro detekci RNA sond po hybridizaci.

Tabulka č. 14: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro ukončení reakce alkalické fosfatázy.

Tabulka č. 15: Schéma kombinované optimalizace teploty denaturace a doby inkubace s proteinázou.

Tabulka č. 16: Podmínky jednotlivých hybridizací.

1 ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je hospodářsky velmi významnou plodinou, pěstovanou již od starověku napříč světem. Dnes se v největší míře používá jako krmivo hospodářských zvířat a na výrobu pivovarnického sladu. Pro tyto účely se používá plod ječmene, tedy obilka.

Obilka ječmene se skládá z obalových vrstev mateřského původu, triploidního endospermu vznikajícího oplozením jádra zárodečného vaku a samotného embrya nesoucího kopie mateřského i otcovského genomu. Z hospodářského hlediska je nejdůležitější z těchto částí endosperm, představující většinu objemu obilky a obsahující zásobní látky v podobě škrobu a bílkovin.

Endosperm je heterogenní pletivo složené se z několika domén, z nichž každá plní specifickou funkci. Během vývoje prochází endosperm výraznými změnami, které jsou spojeny s expresí odlišných genů. Genová exprese se proto v průběhu vývoje liší na časové i prostorové úrovni.

Technika RNA *in-situ* hybridizace umožňuje sledování transkriptů genů přímo v místech, ve kterých se v organismu nacházejí, a tím určit kde dochází k expresi příslušného genu. Lepší znalost jednotlivých molekulárních a buněčných procesů zapojených ve vývoji obilky je obecně spojena s možností zlepšovat kvalitu plodin.

2 CÍLE PRÁCE

- Zpracování literární rešerše na téma vývoje obilky, se zaměřením na vývoj endospermu
- Návrh a syntéza RNA sond pro vybrané geny
- Příprava vzorků včetně řezání na mikrotomu
- RNA *in-situ* hybridizace
- Detekce a vyhodnocení exprese jednotlivých genů

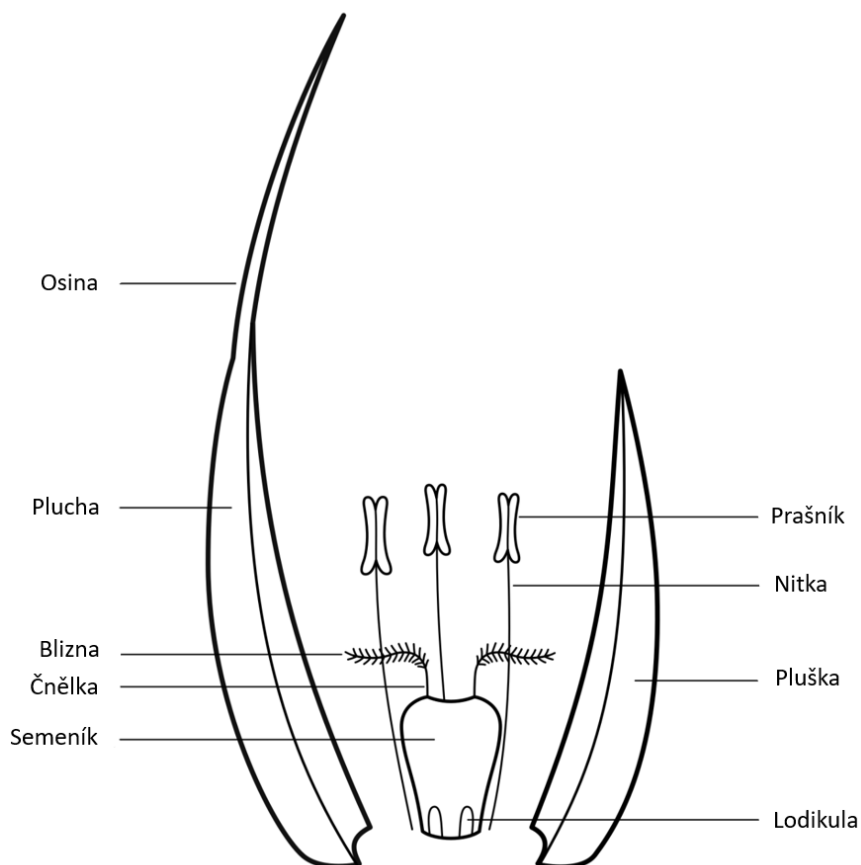
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)

Ječmen setý je kulturní plodina z čeledi lipnicovité (*Poaceae*), podčeledi *Pooideae* a tribusu *Triticeae* (Lifemap, 2023). Spolu s dalšími druhy z této čeledi pěstovanými v zemědělské produkci, se řadí mezi obilniny. Jeho předchůdcem je planý ječmen (*Hordeum vulgare* subsp. *spontaneum*), který byl postupně domestikován v oblasti Blízkého východu označované jako Úrodný půlměsíc, odkud se následně rozšířil do dalších částí světa (Beneš *et al.*, 2011). Dnes je čtvrtou nejdůležitější obilninou světa (Geng *et al.*, 2022). Mezi říjnem 2021 a zářím 2022 dosáhla světová produkce ječmene 145,9 miliónů tun (Statista, 2023). Je možné jej pěstovat v širší škále klimatických podmínek, než je tomu u jakékoliv jiné obilniny, a to i v zeměpisných šířkách za hranici severního polárního kruhu a ve vysokých nadmořských výškách například v Tibetu, či Alpách (Geng *et al.*, 2022; Šašková, 1993).

Jedná se o hospodářsky velmi významnou plodinu. Jeho semena se nejčastěji využívají jako krmivo pro hospodářská zvířata. Významná část produkce je zpracovávána v pivovarnickém průmyslu při výrobě sladu. V lihovarnickém průmyslu se také používá k výrobě whisky. Dále se z ječmene vyrábí například kroupy, líh, nebo melta. Z hlediska přípravy pokrmů je u nás obecně nahrazen pšenicí, ale například v Etiopii, Maroku, nebo Himálajských oblastech je ječmen důležitou součástí jídelníčku tamního obyvatelstva dodnes (Baik *et Ullrich*, 2008). Kromě samotných semen se pro krmné účely zpracovává také zbylá nadzemní část rostliny nebo např. mláto, které vzniká jako odpad při výrobě piva (Šašková, 1993). Slouží také jako modelový organismus pro studium genomu obilnin. Oproti hospodářsky významnější pšenici je v tomto ohledu preferován pro svůj diploidní genom. Ten má velikost 5,3 Gbp a tvoří jej sedm párů chromozomů, zatímco genom pšenice má 17 Gbp a je polyploidní (Giraldo *et al.*, 2019).

Ječmen setý je jednoletá bylina s mělkým kořenovým systémem a dutým stéblem členěným do článků kolénky, ze kterých vyrůstají dlouhé tenké listy. Jedna rostlina má 2–6 stébel. Podle vegetační doby rozlišujeme jarní a ozimou formu (Šašková, 1993). Květenstvím je klas, tvořený větvenem nesoucím jednotlivé klásky, které tvoří svislé řady. V klasu může být různý počet řad klásků. Podle tohoto znaku se ječmen dělí na dvouřadý a šestřadý. Klásky ječmene jsou jednokvěté. Samotný obal klásku je tvořen dvěma plevami. První je menší pluška, kterou překrývá větší plucha zakončená osinou. Uvnitř se nachází samotné generativní orgány. Květ je oboupohlavný a obsahuje semeník se dvěma čnělkami na které navazují blizny a tři tyčinky tvořené nitkou a prašníkem. Kromě nich se uvnitř květu nachází ještě dvě lodikuly (Balounová, 2010). Celý květ je zobrazen na obrázku č. 1.

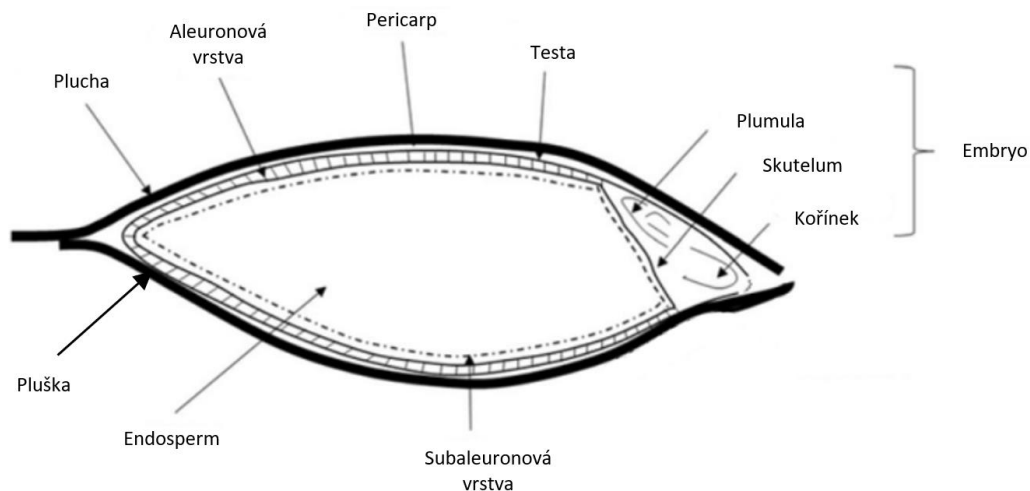


Obrázek č. 1: Morfologie květu ječmene.

Ječmen je samosprašný a k opylení dochází přímo v rámci květu. Po dozrání pohlavních orgánů dojde ke zduření lodikul a tím k rozevření pluchy a plušky. Díky tomu může do květu proudit vzduch a přenést pyl na bliznu. Květ zůstává takto otevřený pouze krátkodobě a následně se opět uzavře (Šašková, 1993). Pyl následně klíčí v pylovou láčku, která prorůstá do semeníku, kde dochází ke dvojímu oplození. Jedna spermatická buňka splývá s vajíčkem, čímž vzniká zygota. Druhá spermatická buňka splývá s diploidním jádrem centrální buňky zárodečného vaku, které vzniká ze dvou haploidních jader při vývoji zárodečného vaku. Toto spojení dá vzniknout triploidnímu endospermu.

3.2 Struktura obilky ječmene setého

Plodem ječmene je obilka složená z několika částí s odlišnou morfologií a funkcí (viz obrázek č. 2). Na povrchu je obilka kryta pluchou a pluškou, které mohou být v závislosti na variantě ječmene s obilkou spojeny dvěma různými způsoby. U nahých variant plevy s obilkou nesrůstají a lze je snadno oddělit, naproti tomu u pluchatých variant plucha a pluška s obilkou pevně srůstají (Moritz, 1955).



Obrázek č. 2: Morfologie obilky ječmene (převzato a upraveno z Filipowska *et al.*, 2021).

3.2.1 Obalové vrstvy

Obalové vrstvy jsou čistě mateřského původu a jejich hlavní funkcí je ochrana semene. U ječmene je tvoří vnější perikarp, testa a nucelární epidermis. Perikarp neboli oplodí se vyvíjí ze stěny plodolistu a je tvořen více vrstvami buněk. Na vnější straně se nachází epidermis tvořená protáhlými buňkami a pokrytá kutikulou. Pod ní následuje hypodermis se stejným tvarem a orientací buněk a dále několik vrstev parenchymatických buněk obsahujících škrobová zrna. Následují dvě vrstvy buněk, které jsou orientovány kolmo k buňkám epidermis a u nezralé obilky se v nich nacházejí chloroplasty. Pod nimi se nachází izolované shluky buněk jejichž orientace je opět rovnoběžná s buňkami epidermis a v nezralém stavu obsahují chloroplasty. Během prvních dní vývoje obilky má perikarp zásobovací funkci a představuje zásobárnu škrobu (Radchuk *et* Borisjuk, 2014). V průběhu zrání podléhají vrstvy parenchymatických buněk programované buněčné smrti a zůstávají z nich pouze ojedinělé izolované buňky. U zralé obilky je perikarp tvořen převážně suchými a prázdnými buňkami. Kutikula perikarpu je propustná pro vodu, která následně proniká dále do obilky (Evers *et* Millar, 2002).

Následuje testa neboli osemení, která je tvořena dvěma vrstvami na sebe navzájem kolmých buněk. Ve vnější vrstvě jsou delší strany buněk paralelní s rýhou semene, zatímco ve vnitřní vrstvě jsou k ní naopak kolmé. Ve větší vzdálenosti od rýhy se osa směřování buněk v obou vrstvách zkosuje. Během vývoje vzniká testa ze dvou integumentů přítomných ve vajíčku. Mezi testou a perikarpem se nachází jednovrstevná kutikula, která je tenčí než kutikulární vrstva perikarpu, a zabraňuje prostupu vody. Jediným místem kudy může voda pronikat do vnitřních částí semene je klovy otvor (mikropyle) v oblasti embrya (Evers *et* Millar, 2002; Freeman *et* Palmer, 1984).

Poslední vrstva, která obaluje endosperm i embryo, je nucelární epidermis, někdy označována jako hyalinní vrstva. Vyvíjí se z nucellu, což je diploidní pletivo nacházející se uvnitř vajíčka. U zralé obilky ji představuje pouze jednovrstevná epidermis a kutikula, která se nachází mezi ní a testou (Evers *et* Millar, 2002). Tato kutikulární vrstva je nejtenčí ze všech již zmíněných (Freeman *et* Palmer, 1984).

3.2.2 Endosperm

Endosperm je triploidní pletivo a obsahuje dvě kopie mateřského genomu a jednu kopii genomu otcovského. Tvoří většinu objemu obilky a představuje zdroj živin pro embryo během klíčení. Hospodářsky se jedná o nejdůležitější část. Ve zralém semeni se skládá převážně z mrtvých a vysušených buněk. Obsahuje čtyři typy buněk: aleuronové buňky, buňky škrobového endospermu, transferové buňky a buňky oblasti obklopující embryo (Olsen, 2001, Sabelli *et* Larkins, 2009).

Aleuronová vrstva je tvořena třemi vrstvami buněk obklopujících z vnější strany celý endosperm s výjimkou místa, kde jsou umístěny transferové buňky a místa, kde endosperm nasedá na embryo (Sabelli *et* Larkins, 2009). Jednotlivé buňky mají silné stěny a v jejich cytoplazmě se nachází velké množství organel, včetně dobře vyvinutého endoplazmatického retikula a vyššího počtu mitochondrií (Jones, 1969). Dále se v nich nacházejí malé vakuoly s obsahem inkluzí, označované jako aleuronová zrna a v průběhu vývoje se v nich hromadí také antokyany (Buttrose, 1963; Faris, 1955). I po plném dozrání semene zůstává aleuronová vrstva na rozdíl od jiných částí endospermu živá. Poté, co embryo nasaje vodu a začíná proces klíčení, reaguje aleuronová vrstva na signalizaci gibbereliny uvolňovanými z embrya. Dochází k syntéze proteolytických a hydrolytických enzymů, které se následně uvolňují do endospermu, kde štěpí buněčné stěny a rozkládají zásobní proteiny na aminokyseliny a škrob na cukry. Tyto látky jsou následně absorbovány embryem (Olsen, 2004).

Největší část endospermu představuje škrobový endosperm, obsahující většinu živin v semeni. Jak napovídá název, v jeho buňkách se syntetizuje a ukládá škrob. Škrob je složen z amylozy a amylopektinu, a k jeho syntéze dochází v amyloplastech. Výchozí surovinou je sacharóza a hlavními enzymy syntézy jsou ADP-glukózapyrofosforyláza, syntáza škrobu, větvicí enzym a linearizační enzym (Hannah, 2007). Zatímco poslední tři se nacházejí v amyloplastech, ADP-glukózapyrofosforyláza se u ječmene nachází převážně v cytosolu (Beckles, 2001). U ječmene dochází ke tvorbě dvou typů škrobových zrn. Velkých zrn A-typu a malých kulovitých nebo vejčitých zrn B-typu (Shapter, 2008). Kromě škrobu obsahuje tato část endospermu také zásobní proteiny, které v lumenu drsného endoplazmatického retikula formují proteinová tělíčka. Ta jsou následně ukládána v zásobních vakuolách (Herman, 1999). Základními zásobními proteiny jsou prolaminy (hordein) a globuliny (Coleman *et* Larkins, 1999).

Buňky endospermu se škrobovými zrny nejsou zcela uniformní. Buňky, které se nacházejí nejbližší k aleuronové vrstvě, bývají menší a mitoticky aktivnější než buňky ve středu endospermu. Obvykle se označují jako subaleuronová vrstva a někdy bývají považovány za pátý typ buněk endospermu (Sabelli *et* Larkins, 2009).

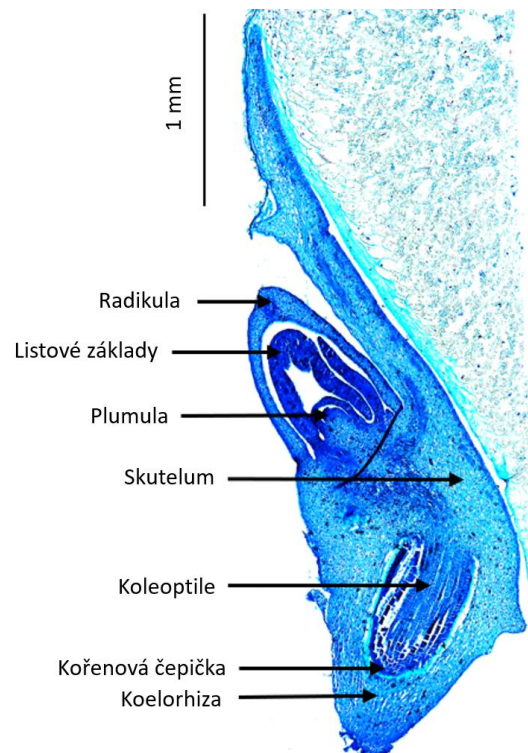
Transferové buňky tvoří několik vrstev v chalazální oblasti, kde je vyvíjející se obilka spojena s cévním svazkem mateřské rostliny. Jejich hlavní funkcí je zprostředkování přenosu živin do endospermu. Povrch buněk je zvětšen četnými invaginacemi, které tento přenos usnadňují. Předpokládá

se, že v jejich cytoplazmatické membráně se nachází velké množství transportérů. V cytoplazmě se dále nachází rozsáhlý endomembránový systém a množství malých kulovitých mitochondrií (Offler *et al.*, 2003, Sabelli *et Larkins*, 2009).

Oblast obklopující embryo (anglicky embryo surrounding region, ESR) je tvořena několika vrstvami buněk, které nejprve obklopují celé embryo, ale později během vývoje se tato oblast postupně zmenšuje a mizí (Cosségal, 2007). Jednotlivé buňky mají tenké stěny a obsahují hustou cytoplazmu s velkým počtem malých vakuol a rozsáhlý systém endoplazmatického retikula (Schel *et al.*, 1984). ESR má imunitní funkci během raných fází vývoje semene. Dochází zde k syntéze proteinu strukturně podobného rostlinným defenzinům, které mají antimikrobiální funkci (Balandín *et al.* 2005).

3.2.3 Embryo

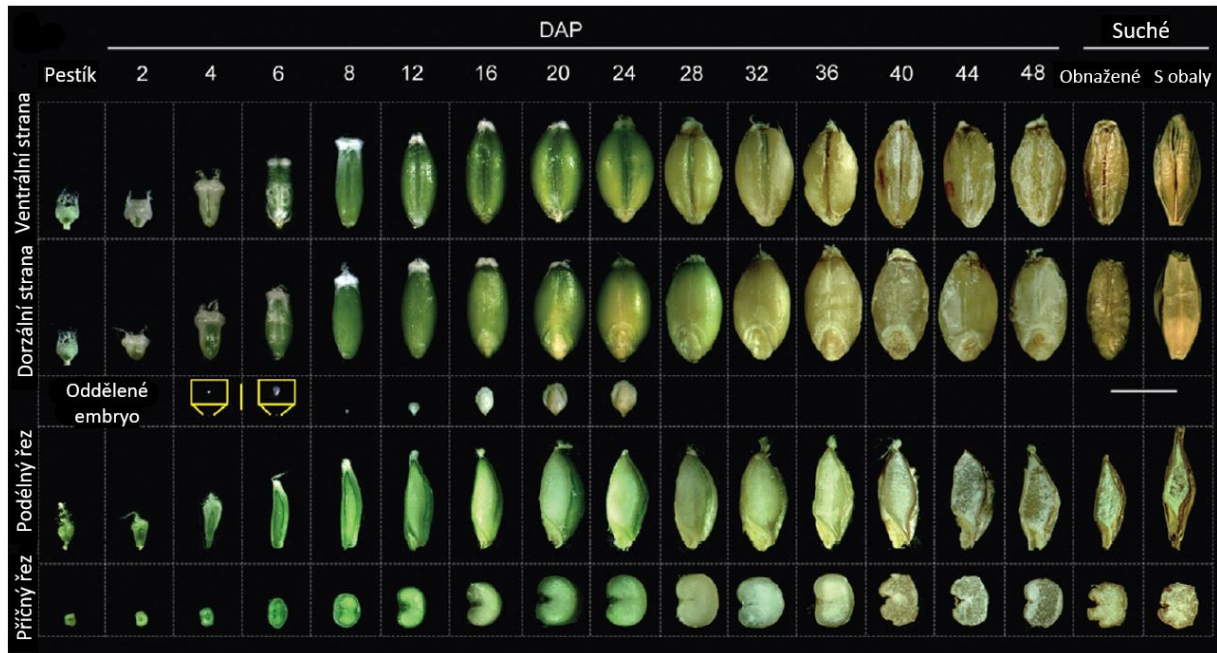
Původně jednobuněčná zygota, vzniklá spojením rodičovských gamet, se postupně dělí a dává vzniknout embryu. To nese jednu kopii mateřského a jednu kopii otcovského genomu a na konci svého vývoje tvoří základ pro novou rostlinu. Z hlediska rozmnožování rostliny je tedy embryo nejdůležitější částí semene a všechny ostatní části mají podpůrnou funkci při jeho vývinu, šíření, dormanci a klíčení. U plně vyvinutého semene je v embryu možné rozpoznat několik částí a to skutelum, plumulu a radikulu (viz obrázek č. 3). Skutelum, neboli štítek, přiléhá k endospermu a umožňuje absorpci živin z něj. Druhou částí je plumula s listovými základy. Z vnější strany je kryta koleoptilí s otvorem, kterým při klíčení prorůstají listy. Poslední částí je kořínek (radikula), obklopený koleorhizou, a na vrcholu chráněný kořenovou čepičkou (Agrobiologie, 2023, Reid, 1985).



Obrázek č. 3: Morfologie embrya u semene 16 dní po opylení (anglicky days after pollination, DAP).

3.3 Vývoj obilky ječmene setého

Vyvíjející se obilka ječmene setého prochází řadou morfologických změn týkajících se všech jejích struktur (viz obrázek č. 4). Vývoj lze vzhledem k endospermu rozdělit do tří hlavních částí: ranný vývoj, diferenciace a zrání (Sabelli *et* Larkins, 2009).



Obrázek č. 4: Semeno ječmene setého v různých bodech vývoje od opylení do dozrání (převzato a upraveno z Nowicka *et al.*, 2020).

Legenda: Měřítko u zvětšených obrázků embryí 0,5 mm, u zbylých semen 5 mm.

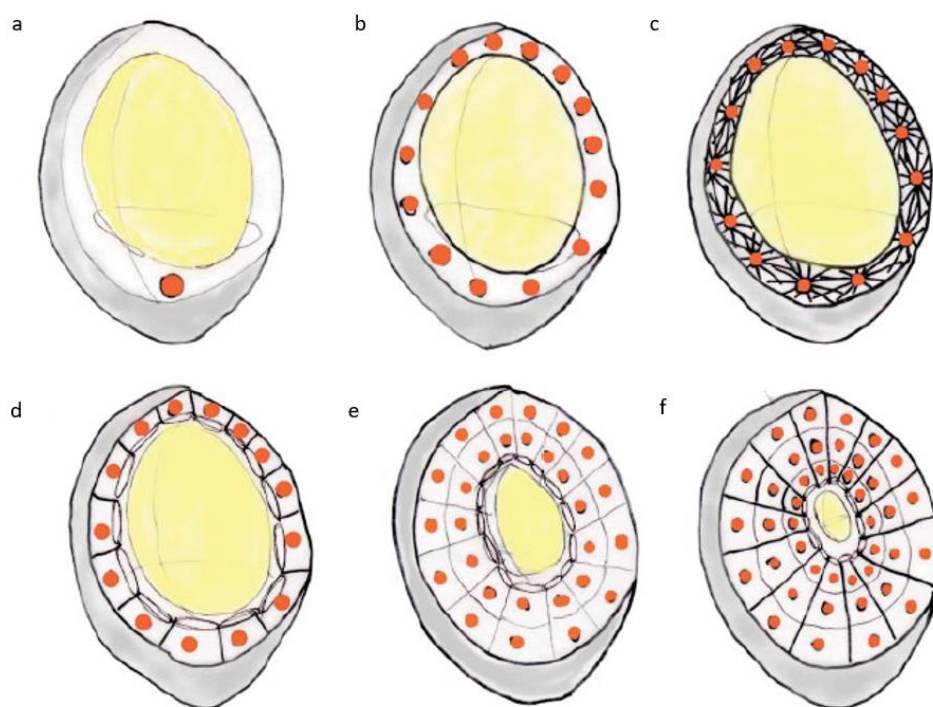
3.3.1 Raný vývoj

Z počátku vývoje endospermu se jádro endospermu rychle mitoticky dělí, aniž by mezi jednotlivými děleními docházelo k cytokinezi. Takto vzniká syncytium (Sabelli *et* Larkins, 2009). Počáteční dělení v endospermu je výrazně rychlejší než dělení v embryu, což je zapříčiněno tím, že nedochází k syntéze cytoplazmatických membrán, buněčných stěn, ani samotné cytoplazmy. Pouze se rychle zvyšuje počet jader a ty vyplňují již existující cytoplazmu centrální buňky zárodečného vaku. Během prvního dne po oplození je dělení jader synchronní, ale později dochází ke vzniku vývojového gradientu od embrya k chaláze (Bennet *et al.*, 1975). Následně dochází ke zvětšování centrální vakuoly a vzniklá jádra jsou vytlačována k membráně centrální buňky (Sabelli *et* Larkins, 2009). U ječmene dochází k přerušování mitózy 3 dny po oplození (anglicky days after pollination, DAP) a je opět obnovena až po dvou dnech. Během této doby dochází k radikálnímu přeskupení cytoskeletu a přípravě na celularizaci (Olsen, 2001).

Během celularizace je syncytium rozděleno buněčnými stěnami na jednotlivé buňky (viz obrázek č. 5). Tento proces iniciuje přeskupení mikrotubulárního systému, po jehož

dokončení mikrotubuly vystupují z obalů jednotlivých jader paprskovitě do všech stran. Rozsah těchto mikrotubulů určuje rozměr následně vznikajících buněk. Takto vzniká okolo membrány centrální buňky zárodečného vaku jedna vrstva jader, které jsou od sebe přibližně stejně vzdáleny a obklopeny mikrotubuly. V místech, kde se mikrotubuly ze sousedních jader setkávají následně vzniká fragmoplast. Na těchto místech se poté ukládá materiál pro tvorbu nových buněčných stěn. Ty vznikají kolmo k membráně centrální buňky a vytvářejí alveoly, což je trubicovitá struktura z buněčných stěn, otevřená na straně směřující k centrální vakuole, obklopující jednotlivá jádra. Mikrotubulární systém opět prochází přestavbou, po které mikrotubuly vystupují pouze z opačných pólů jádra. Na jednom pólu kotví jádro k původní membráně centrální buňky, na druhém pólu směřují k centrální vakuole. Na tomto konci zprostředkovávají ukládání nového materiálu do dostředivě narůstajících buněčných stěn (Brown, 1994, Olsen, 2001).

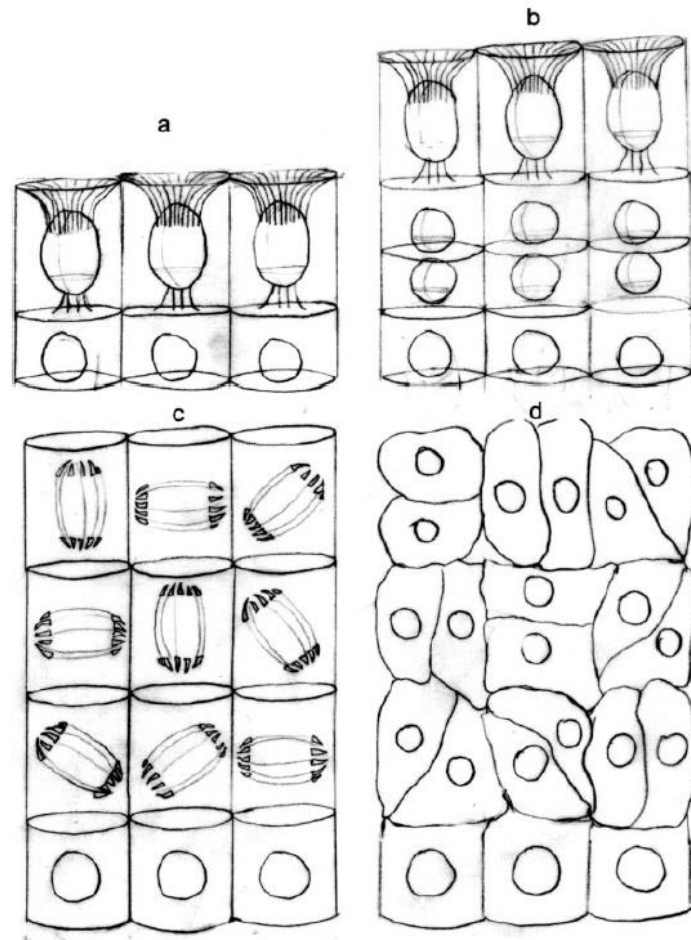
Po zformování alveol dochází u jader k dalšímu mitotickému dělení. V tomto případě ovšem následuje ihned po dělení cytokineze a formování buněčné stěny. Nově vzniklá stěna je rovnoběžná s membránou centrální buňky, ale kolmá na stěny alveoly. Po mitóze tedy vzniká na periferii původní centrální buňky vrstva kompletně uzavřených buněk. Struktura alveol se takto posouvá směrem ke středu a stále zůstává otevřená, což je viditelné na obrázcích č. 5 a 6 (Olsen, 2001).



Obrázek č. 5: Postup celularizace syncytia (převzato z Olsen, 2001).

Legenda: (a) Triploidní oplodněné jádro centrální buňky (oranžové) a centrální vakuola (žlutá) (b) Syncytium (c) Syncytium s mikrotubuly paprskovitě vystupujícími z jader (d) Zformované alveoly (e) První vrstva kompletně uzavřených buněk, vznikající po mitotickém dělení a nad ní vrstva alveol (f) Zformována druhá vrstva buněk po druhém mitotickém dělení.

Stejným způsobem následují další cykly mitotického dělení a prostor původní centrální buňky se postupně dostředivě zaplňuje až do chvíle, kdy je zcela vyplněn. V dalších vrstvách buněk je směřování nově vznikajících buněčných stěn různé (viz obrázek č. 6). Celý proces celularizace trvá přibližně šest dní (Olsen, 2001).



Obrázek č. 6: Dělení buněk a tvorba nových vrstev endospermu (převzato z Olsen, 2001).

Legenda: (a) První vrstva kompletně uzavřených buněk, vznikající po mitotickém dělení a nad ní vrstva alveol (b) Tři vrstvy uzavřených buněk s vrstvou alveol (c) Průběh mitotického dělení v buňkách (d) Nově vzniklé vrstvy buněk s rozdílným směřováním buněčné stěny.

3.3.2 Diferenciace

Na proces celularizace navazuje diferenciace jednotlivých buněk a pletiv. Ta v některých případech probíhá ještě před plným dokončením celularizace celého endospermu (Sabelli *et* Larkins, 2009).

Aleuronové buňky diferencují ve třech vrstvách po celém obvodu endospermu až na místo u chalázy, kde se nacházejí transferové buňky. Za první důkaz jejich diferenciace je považováno nahromadění husté cytoplazmy a malých vakuol v první vrstvě buněk okolo 8 DAP (Sabelli *et* Larkins, 2009). Diferenciace buněk aleuronové vrstvy je dána jejich polohou v blízkosti membrány původní

centrální buňky. V průběhu vývoje může docházet ke změně diferenciaci některých aleuronových buněk v buňky škrobového endospermu a naopak, právě v závislosti na poloze (Tian *et al.*, 2007). Během zrání dochází v aleuronové vrstvě k aktivaci specializovaného vývojového programu, který je ochraňuje před vysycháním a zůstávají tak živé i po dozrání semene (Hoecker *et al.*, 1995).

Z většiny buněk vzniklých během ranného vývoje endospermu se stávají buňky se škrobovými zrny. Dochází u nich ke zvětšování a akumulaci škrobu a zásobních proteinů. Tyto procesy jsou spojené s vysokou metabolickou aktivitou a spotřebou energie (Sabelli *et Larkins*, 2009). Ukládání škrobových zrn začíná ve střední části endospermu a postupně se rozšiřuje také do periferií (Borisjuk, 2004). Přechod od buněčného dělení k akumulaci zásobních látek je spojován s množstvím sacharózy. Vyšší obsah glukózy při nižším obsahu sacharózy vede k buněčnému dělení, zatímco zvýšení obsahu sacharózy souvisí se začátkem akumulace (Borisjuk *et al.*, 2004, Sabelli *et Larkins*, 2009).

Transferové buňky vznikají z několika vrstev buněk u chalázy, představují rozhraní mezi endospermem a mateřským cévním svazkem a umožňují mezi nimi rychlou výměnu živin (Offler *et al.*, 2003, Sabelli *et Larkins*, 2009). Diferencují ze všech čtyř typů buněk nejdříve a jejich diferenciaci je spojována s genem *END1*. Jeho transkript je možné nalézt již v syncytiu, a to právě u chalázy (Doan *et al.*, 1996). Transferové buňky zůstávají naživu i ve zralém semeni (Sreenivasulu *et al.*, 2010).

Oblast obklopující embryo začíná jako několik vrstev buněk obalujících embryo, ale v průběhu vývoje a stárnutí semene dochází k jejímu zmenšování a eliminaci (Cosségal, 2007). V blízkosti embrya dochází k celularizaci brzy během vývoje, ovšem není potvrzeno, jestli jsou vznikající buňky prekursorů buněk ESR (Engell, 1989, Olsen, 2001). Buňky v této oblasti se od ostatních buněk endospermu odlišují expresí genů z genové rodiny *Esr* (Cosségal, 2007).

Kromě diferenciaci a ukládání zásobních látek se buňky v této fázi vývoje dále mitoticky dělí a zvyšují svůj počet. To, společně se zvětšováním buněk, vede k celkovému nárůstu endospermu (Young *et Gallie*, 2000a). Mitotické dělení probíhá asi do 20 DAP, ale celé semeno roste do 32 DAP (Nowicka *et al.*, 2020). S růstem buněk je kromě ukládání zásobních látek spojena také endoreduplikace, což je neúplný buněčný cyklus, při kterém dochází k replikaci genetické informace, ale nedochází k rozpadu jaderné membrány, kondenzaci chromozomů, jejich rozdělení, ani cytokinezi. Výsledkem tohoto procesu jsou tedy endopolyploidní buňky s chromozomy s vyšším počtem chromatid. Endoreduplikace může probíhat i opakovaně v několika cyklech po sobě (Larkins *et al.*, 2001). Tento proces je spojován s větší velikostí buněk, jejich diferenciaci a vyšší metabolickou aktivitou (Sabelli *et Larkins*, 2007). U buněk se škrobovými zrny probíhá endoreduplikace ve vysoké míře. První polyploidní jádra jsou přítomna již v syncytiu 2 DAP. Jejich počet následně roste až do 28 DAP, kdy tvoří přibližně 50 % všech buněk. Následně ovšem jejich množství opět klesá, což souvisí s programovanou buněčnou smrtí, která probíhá nejdříve právě u endopolyploidních buněk (Nowicka *et al.*, 2020). V endospermu ječmene jsou kromě buněk se škrobovými zrny polyploidní i aleuronové

buňky (Keown *et al.*, 1977). Mimo samotný endosperm dochází k endoreduplikaci v jisté míře také u obalových vrstev a embrya (Nowicka *et al.*, 2020).

3.3.3 Zrání

Velmi důležitým procesem v průběhu zrání semene je programovaná buněčná smrt. V tomto případě však, na rozdíl od apoptózy u živočichů, není spojená s úplným zánikem buňky (Sabelli, 2012). Programovaná buněčná smrt nastupuje nejdříve u obalových vrstev, a to již 2 DAP. Začíná v horní a spodní části a později postupuje do středu. U endospermu se škrobovými zrny jsou první mrtvé buňky detekovatelné již 8 DAP a jejich počet se postupně zvyšuje. Nejprve odumírají endopolyploidní buňky (Nowicka *et al.*, 2020). Podobně jako u apoptózy je součástí procesu buněčné smrti fragmentace DNA, způsobená endonukleázovou aktivitou a činností proteáz s funkcí podobnou živočišným kaspázám (Nguyen *et al.*, 2007, Young *et Gallie*, 1999). Celý proces je také spojen s působením hormonů. Nejdůležitějším z nich je v tomto případě etylen, jehož zvýšená hladina urychluje průběh buněčné smrti (Young *et Gallie*, 1999). Naopak kyselina abscisová je spojená s redukcí fragmentace DNA a oddálením buněčné smrti (Young *et Gallie*, 2000b). Předpokládá se, že důvodem pro programovanou buněčnou smrt je následné usnadnění enzymatického trávení buněk bez funkčních membrán a přesunu živin skrze ně při klíčení (Nguyen *et al.*, 2007).

V poslední fázi zrání semeno vysychá, což je spojeno s dramatickým poklesem metabolické aktivity a přechodem do fáze dormance (Sreenivasulu *et al.*, 2008). Vysychání se ovšem netýká všech pletiv v semeni. Embryo a aleuronová vrstva jsou proti němu odolné a uchovávají si svou životaschopnost i po dozrání semene. S touto odolností jsou spojeny tzv *LATE EMBRYOGENESIS ABUNDANT* geny a proteiny vznikající jejich expresí. Jedná se o silně hydrofilní proteiny, které jsou syntetizovány v počátcích procesu vysychání (Garay-Arroyo *et al.*, 2000, Stacy *et al.*, 1999).

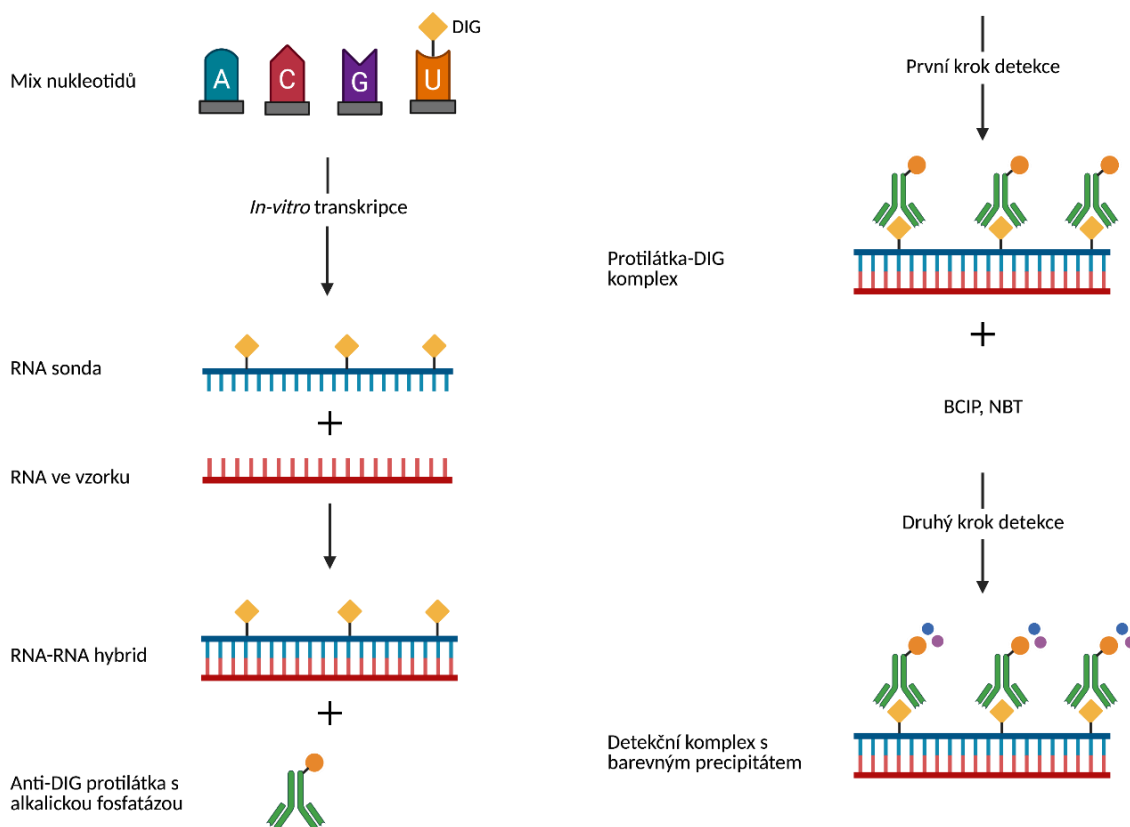
3.4 RNA *in-situ* hybridizace

Hybridizace je proces, při kterém dochází ke spojení dvou alespoň částečně komplementárních jednovláknových nukleových kyselin za vzniku dvouvláknové molekuly. Jedna z molekul přitom obvykle slouží jako hybridizační sonda, detekující druhé vlákno navázáním něj, či na specifické místo na něm. Aby mohla být sonda po samotné hybridizaci detekována, bývá značena, a to buď radioaktivními, nebo chemickými značkami. Při radioaktivním značení jsou jako značky nejčastěji používány radioizotopy tritia, fosforu, nebo síry, při chemickém zase digoxigenin, či biotin (Jin *et Lloyd*, 1997).

Značení sond je dále možno dělit na přímé a nepřímé. Při přímém značení je detekována přímo sonda, a to ať už pomocí navázaného radioizotopu, fluorochromu, nebo enzymu. Při značení nepřímém je na samotné sondě navázán haptén, na který se následně specificky váže protilátka. Teprve na té je navázána látka umožňující detekci (Jin *et Lloyd*, 1997).

In-situ hybridizace umožňuje detekovat nukleové kyseliny přímo v tkáních a pletivech, ve kterých se nacházejí, a tím získat informace o jejich přítomnosti i přesném umístění. Poprvé byla tato metoda popsána v roce 1969 Gallem a Parduem v jejich práci Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. V rámci této práce detekovali DNA v cytologických preparátech pomocí radioaktivně značené RNA sondy (Gall *et* Pardue, 1969). *In-situ* hybridizaci je možné využít například pro detekci patogenů, analýzu genové exprese, nebo ve formě fluorescenční *in-situ* hybridizace v cytogenetice a molekulární genetice (Jin *et* Lloyd, 1997).

Při chemickém značení digoxigeninem (DIG) je tento kovalentně navázan na jeden typ nukleotidu. Takto značený nukleotid je následně přidán do mixu ostatních nukleotidů a pomocí *in vitro* reakce s polymerázou je zabudován do vznikající sondy. V té nahrazuje neznačenou formu nukleotidu a tím umožňuje následnou detekci sond po jejich hybridizaci (McCreery, 1997). Detekce probíhá prostřednictvím specifické anti-digoxigenin protilátky. Přesněji se jedná o Fab fragmenty polyklonální protilátky, na které je navázan enzym alkalická fosfatáza. Tyto fragmenty se specificky vážou na DIG obsažený v sondách. Následně je k hybridizovaným vzorkům s navázanou protilátkou přidáván pufr s obsahem 4-nitro blue tetrazolium chloridu (NBT) a 5-bromo-4-chloro-3-indolylfosfátu (BCIP). NBT a BCIP představují substrát pro alkalickou fosfatázu. Enzymatickou reakcí dochází ke vzniku nerozpustného fialového precipitátu, který je pozorovatelný světelným mikroskopem (Deblock *et* Debrouwer, 1993). Průběh celé reakce je znázorněn na obrázku č. 7. Jedná se o nepřímý způsob značení.



Obrázek č. 7: Schéma průběhu hybridizace a detekce sondy (vytvořeno v programu BioRender).

Přestože samotný princip tvorby hybridních molekul a jejich detekce není příliš složitý, hybridizace jako taková vyžaduje množství dalších kroků, aby mohla fungovat. Prvním důležitým krokem je fixace biologického materiálu takovým způsobem, aby nedošlo k poškození pletiv, ani nukleových kyselin obsažených v nich. K fixaci se často používá formaldehyd, který je schopen vytvářet cross-linky. Dále je možné k němu pro lepší účinnost přidat detergenty jako například Triton™ X-100 a Tween® 20, které mají schopnost penetrovat buněčné stěny a tím usnadnit pronikání formaldehydu do buněk. K tomuto účelu je také možné využít působení vakua na materiál. Po fixaci jsou vzorky dehydratovány s využitím etanolového gradientu (Jin *et al.*, 1997, Young *et al.*, 2020).

Dále je potřeba připravit mikrořezy, na kterých je samotná hybridizace prováděna. Jednou z metod přípravy řezů je zalití již fixovaného biologického materiálu do Paraplastu Plus®. Jedná se o směs parafinu a plastových polymerů, která je schopná pronikat do pletiv, a následně poskytuje oporu při řezání na mikrotomu. Před samotným zalitím je možné vzorky ještě pročistit například pomocí ROTI®Histolu, který je navíc mísitelný jak s etanolem, tak s Paraplastem Plus®, a umožňuje přechod mezi nimi (Coen *et al.*, 1990, Jackson, 1991, Zölner *et al.*, 2021).

Již hotové řezy procházejí před hybridizací řadou přípravných kroků, jejichž účelem je umožnit vazbu sond, zvýšit její specifitu, a naopak snížit míru nespecifické vazby (Jin *et al.*, 1997). Nejprve je třeba odstranit přebytečný Paraplast Plus® mezi řezy. Toho je možné dosáhnout působením ROTI®Histolu. Následně jsou vzorky rehydratovány. Dalším krokem je aplikace kyseliny chlorovodíkové, která inhibuje endogenní alkalickou fosfatázu. Důležité je také vystavení vzorků působení proteázy, které zajišťuje zpřístupnění vazebných míst pro sondy, štěpením proteinů vážících se k nukleovým kyselinám. Její reakci je možné zastavit působením glycinu. Posledním přípravným krokem je inkubace s anhydridem kyseliny octové. Ten snižuje míru nespecifické vazby sond (Jin *et al.*, 1997, Young *et al.*, 2020). Po těchto krocích jsou vzorky opět dehydratovány.

Sondy jsou před použitím denaturovány působením zvýšené teploty a formamidu, který má schopnost narušovat vodíkové můstky. Také zvyšuje specifitu hybridizace. Do hybridizačního mixu se přidávají i další pomocné látky. Dextranulfát urychluje průběh hybridizace, Denhart's Solution a soli pro *in-situ* snižují míru nespecifické vazby a tRNA se váže k nespecifickým vazebným místům a také může do jisté míry chránit mRNA před degradací případnými RNázami (Young *et al.*, 2020).

Po ukončení hybridizace se vzorky inkubují v promývacím pufrech, kde se uvolňují nenavázané molekuly sondy. Pro jejich úplné odstranění se používá také nukleáza štěpící jednovláčkové molekuly nukleové kyseliny, ale neovlivňující dvouvláčkové hybridy (Young *et al.*, 2020).

Před inkubací s protilátkou je možné inkubovat vzorky v pufrech s obsahem blokujícího činidla, nebo hovězím sérovým albuminem (anglicky bovine serum albumin, BSA), které blokují nespecifickou vazbu. Po inkubaci je nenavázaná protilátka vymyta inkubací v dalších pufrech (Young *et al.*, 2020). Do těch je možné přidat Triton™ X-100 pro další penetraci buněk. Nakonec jsou vzorky inkubovány

v pufru s obsahem substrátů. Kromě těch může pufr obsahovat také Levamisol, který inhibuje činnost endogenní alkalické fosfatázy, ale neovlivňuje izoformu navázanou na protilátce (Coen *et al.*, 1990, Jackson, 1991).

3.5 Sledované geny

V rámci mé bakalářské práce byly pro analýzu exprese v semenech ječmene různého stáří vybrány tři orthology genů z kukuřice (*Zea mays*). Jednalo se o strukturální geny *STARCH BRANCHING ENZYME 1 (SBE1)*, *MYB RELATED PROTEIN 1 (MRP1)* a *EMBRYO SURROUNDING REGION 6 (ESR6)*. Jde o takzvané markerové geny, jelikož k jejich expresi dochází pouze v jedné části endospermu, pro kterou jsou specifické. Cílem bylo zjistit, jestli tomu je stejně i u ječmene. Pokud by byla exprese genů charakteristická pro jednotlivé oblasti, bylo by možné na základě jejich exprese odvodit, kdy a kde v endospermu dochází k diferenciaci daných částí.

Gen *SBE1* kóduje jednu z izoform větvicího enzymu, který se podílí se na syntéze škrobu. Kromě něj jsou u kukuřice známy ještě *STARCH BRANCHING ENZYME 2A (SBE2A)* a *STARCH BRANCHING ENZYME 2B (SBE2B)*; Boyer *et Preiss*, 1978, MaizeGDB, 2023). Funkcí větvicích enzymů je štěpení α -1,4 vazeb amylozy, přenášení vzniklých glukanových řetězců a jejich propojování přes α -1,6 vazby za vzniku amylopektinu (Yao *et al.*, 2004). Isoforma 1 obecně větví spíše méně rozvětvené molekuly amylopektinu, zatímco obě izoformy 2 dále větví ty více rozvětvené. Isoforma 1 také preferenčně přenáší delší glukanové řetězce, než izoformy 2 (Guan *et Preiss*, 1993).

MYB RELATED PROTEIN 1 je spojen s diferenciací transferových buněk. Tento gen je u kukuřice exprimován v raných fázích vývoje. Jeho transkript se hromadí ještě před celularizací v syncytiu, a to právě v oblasti budoucího vzniku transferových buněk. Po dozrání transferových buněk v nich transkript tohoto genu již není přítomen. Exprimovaný protein obsahuje ve své struktuře DNA vazebnou doménu, která je vysoce homologní s MYB doménou. Je spojován s aktivací promotorů dalších genů specifických pro transferové buňky (Gómez *et al.*, 2002, MaizeGDB, 2023).

Posledním studovaným genem je *ESR6*, který je exprimován v oblasti obklopující embryo. Kóduje protein o velikosti 5,5 kDa, který vykazuje strukturální homologii s rostlinnými defenziny. Je spojován s imunitou a ochranou embrya v raných fázích vývoje. Při *in vitro* pokusech bylo prokázáno, že inhibuje růst a množení bakteriálních a houbových patogenů (Balandín *et al.* 2005, MaizeGDB, 2023).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

Pro účely této bakalářské práce bylo vypěstováno 6 rostlin ječmene setého (*Hordeum vulgare*) cv. Morex. Semena byla umístěna na vlhký ubrousek a shora překryta filtračním papírem. Takto byla ponechána klíčit při 25 °C, ve tmě, po dobu tří dnů. Naklíčená semena byla následně přesunuta do rašelinového květináče obsahujícího mix zeminy a hlíny v poměru 3:1, a umístěna do fytotronové komory, kde byla pěstována při denní teplotě 20 °C (po dobu 16 hod), noční teplotě 16 °C (po dobu 8 hod) a vzdušné vlhkosti 60 %.

Po deseti dnech byly rostliny přesazeny do větších květináčů s půdou a pískem ve stejném poměru. Dále byly pěstovány ve fytotronové komoře při denní teplotě 15 °C, noční teplotě 13 °C a vzdušné vlhkosti 65 %. Po objevení prvních klasů byly přesunuty do fytotronové komory s denní teplotou 20 °C, noční teplotou 16 °C a vlhkostí 60 %.

Zhruba po šesti týdnech začaly rostliny matet a z dozrávajících klasů byly postupně získávány semena daného stáří, které sloužily jako výchozí materiál pro následnou analýzu.

4.2 Použité chemikálie, soupravy, roztoky

4.2.1 Požité chemikálie

- 4-Nitro blue tetrazolium chloride (Roche, kat. č. 11383213001)
- 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (Roche, kat. č. 11383221001)
- 5× Q5® Reaction Buffer (BioLabs, kat. č. B9027S)
- 5× Transcription Buffer (Thermo Scientific, kat. č. EP0111)
- 6× TriTrack DNA Loading Dye (Thermo Scientific, kat. č. R1161)
- 50× Denhart's Solution (Thermo Scientific, kat. č. 750018)
- Acetic anhydride (Sigma-Aldrich, kat. č. 320102)
- Aceton (VWR Chemicals, kat. č. 67-64-1)
- Agarose I™ (VWR Life Science, kat. č. 0710)
- Ambion™ Nuclease-Free Water (Thermo Fisher Scientific, kat. č. AM9932)
- Amonium acetate (Sigma-Aldrich, kat. č. 631-61-8)
- Anti-Digoxigenin-AP Fab fragmenty (Roche, kat. č. 11093274910)
- ATP (Thermo Fisher Scientific, kat. č. 18330019)

- Blocking reagens (Roche, kat. č. 11096176001)
- Bovine Serum Albumin (Sigma-Aldrich, kat. č. A7906)
- Calcofluor White Stain (Sigma-Aldrich, kat. č.18909)
- CTP (Thermo Fisher Scientific, kat. č.18331017)
- Deionizovaná voda
- Dextran sulfate (Sigma-Aldrich, kat. č. D-8906)
- Dietyl pyrokarbonát (Sigma-Aldrich, kat. č. D5758)
- Digoxigenin-11-UTP (Roche, kat. č.11209256910)
- DNase I, RNase-free (Thermo Scientific, kat. č. EN0521)
- Entellan® new (Sigma-Aldrich, kat. č. 1.07961.0100)
- Etanol (Tereos TTD, index. č. 603-002-00-5)
- Ethidium bromide (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751)
- Ethylenediaminetetraacetic acid disodium salt dihydrate (Sigma-Aldrich, kat.č. E5134)
- Formamide (Sigma-Aldrich, kat. č. 47671)
- Formamide, deionized (Sigma-Aldrich, kat. č. S4117)
- GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1333)
- Glycin (Carl Roth, kat. č. HN07.2)
- GTP (Thermo Fisher Scientific, kat. č.18332015)
- Hydroxid sodný (Lach-Ner, kat. č. 10006-AP2)
- Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, kat. č. M8266)
- Chlorid sodný (Lach-Ner, kat. č. 30093-AP0)
- Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, kat. č. 10033-A35)
- Levamisole Solution (Vector Laboratories, kat. č. SP-5000)
- Paraplast Plus® (Sigma-Aldrich, kat. č. P3683)
- Paraformaldehyd (Sigma-Aldrich, kat. č. 16005)
- Proteinase K, recombinant PCR grade (Roche, kat. č. 03115879001)
- Q5® High-Fidelity DNA polymeráza (BioLabs, kat. č. M0491S)

- Ribolock RNase inhibitor (Thermo Scientific, kat. č. EO0381)
- RNase A, DNase and Protease-free (Thermo Scientific, kat. č. EN0531)
- ROTI®Histol (Carl Roth, kat. č. 6640.5)
- Sodium citrate (Sigma-Aldrich, kat. č. 6132-04-3)
- Sodium phosphate dibasic dodecahydrate (Sigma-Aldrich, kat. č. 10039-32-4)
- Sodium phosphate monobasic dihydrate (Sigma-Aldrich, kat. č. 13472-35-0)
- T7 RNA polymeráza (Thermo Scientific, kat. č. EP0111)
- Toluidine Blue (Sigma-Aldrich, kat. č. 89640)
- Trietanolamine (Sigma-Aldrich, kat. č. T1377)
- Tris(hydroxymethyl)aminomethane (VWR Chemicals, kat. č. 28808.294)
- Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, kat. č. T8787)
- Tween® 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416)
- Yeast tRNA (Thermo Fischer Scientific, kat. č. 15401-029)

4.2.2 Použité soupravy

- QIAquick® PCR Purification Kit (250) (QIAGEN, kat. č. 28106)
- RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, kat. č. k1632)

4.2.3 Použité roztoky a jejich příprava

- Agarózový gel pro elektroforetickou separaci, 1,5%:

Složení: 1× TAE pufr, 1,5% agaróza, 1,9% ethidium bromid.

Příprava: 1,5 g agarózy rozvařit v mikrovlnné troubě ve 100 ml 1× TAE pufru, přidat 2 µl 95% ethidium bromidu.

- DEPC voda:

Složení: 0,096% Dietyl pyrokarbonát, deionizovaná voda.

Příprava: Do 800 ml deionizované vody přidat 0,8 ml 96% dietyl pyrokarbonátu, protřepat, míchat přes noc. Sterilizovat v autoklávu.

- Dextran sulfát, 50%

Složení: 50% dextran sulfát, DEPC voda

Příprava: 5 g dextran sulfátu rozpustit v 10 ml DEPC vody

- Formaldehyd, 4%:

Složení: 4% paraformaldehyd, 0,05% NaOH, 1× PBS, DEPC voda.

Příprava: Přivést k varu 180 ml DEPC vody, přidat 8 g paraformaldehydu, rozpustit za přidání 100 μl 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaOH. Přidat 20 ml 10× PBS, zchladit, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 7.

- HCl, 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$:

Složení: 0,2 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ HCl, deionizovaná voda.

Příprava: 3,53 ml 35% HCl, doplnit do 200 ml deionizovanou vodou.

- NTE, 10×:

Složení: 5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 0,1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,01 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ EDTA- Na_2 , deionizovaná voda.

Příprava: 6,06 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit ve 300 ml deionizované vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 7,5. Přidat 146,13 g NaCl a 1,86 g EDTA- Na_2 . Doplnit do objemu 500 ml deionizovanou vodou. Sterilizovat v autoklávu.

- Octan amonný, 3,8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$:

Složení: DEPC voda, 3,8 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CH}_3\text{COONH}_4$.

Příprava: 2,93 g $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ rozpustit v 9 ml DEPC vody, doplnit do objemu 10 ml. Sterilizovat filtrací.

- PBS, 10×:

Složení: 1,3 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 0,07 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 0,03 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, deionizovaná voda.

Příprava: Rozpustit 75,98 g NaCl, 25,07 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4\cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ a 4,68 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ v deionizované vodě, doplnit do objemu 1000 ml. Sterilizovat v autoklávu.

- Promývací pufr:

Složení: 50% 2× SSC, 50% Formamid.

Příprava: Smíchat 400 ml SSC a 400 ml formamidu.

- Pufr 1, 10×:

Složení: 1 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 1,5 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, deionizovaná voda.

Příprava: 121,14 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit v 750 ml deionizované vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 7,5. Přidat 87,67 g NaCl, doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizovat v autoklávu, skladovat ve 4 °C.

- Pufr 1 s Tritonem™ X-100

Složení: 1× pufr 1, 0,3% Triton™ X-100.

Příprava: Do 800 ml 1× pufru 1 přidat 2400 µl Tritonu™ X-100.

- Pufr 2:

Složení: 1× pufr 1, 0,5% blokující činidlo.

Příprava: Do 200 ml pufru 1 přidat 1 g blokujícího činidla, rozpouštět na vyhřívané magnetické míchačce při 65 °C po dobu 60 min.

- Pufr 3:

Složení: 1× pufr 1, 1% BSA, 0,3% Triton™ X-100.

Příprava: Ve 400 ml pufru 1 rozpustit 4 g BSA, přidat 1200 µl Tritonu™ X-100.

- Pufr 4:

Složení: 1× pufr 1, 1:3000 Anti-Digoxigenin-AP Fab fragmenty.

Příprava: Do 150 ml pufru 3 přidat 50 µl Anti-Digoxigenin-AP Fab fragmentů.

- Pufr 5, 10×:

Složení: 0,1 mol·l⁻¹ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,1 mol·l⁻¹ NaCl, 0,05 mol·l⁻¹ MgCl₂.

Příprava: 12,11 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit v 900 ml deionizované vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 9,5. Přidat 5,85 g NaCl a 4,76 g MgCl₂, doplnit do objemu 1000 ml deionizovanou vodou. Sterilizovat filtrací, skladovat ve 4 °C.

- Pufr 6:

Složení (varianta 1): 1× pufr 5, 0,1% NBT, 0,14% BCIP, 0,09% Levamisol.

Příprava (varianta 1): Do 150 ml pufru 5 přidat 157 µl 100 mg·ml⁻¹ NTB, 210 µl 50 mg·ml⁻¹ BCIP a 141 µl 0,125 mol·l⁻¹ Levamisolu.

Složení (varianta 2): 1× pufr 5, 0,5% NBT, 0,38% BCIP, 0,09% Levamisol.

Příprava (varianta 2): Do 10 ml pufru 5 přidat 50 µl 100 mg·ml⁻¹ NTB, 37,5 µl 50 mg·ml⁻¹ BCIP a 9 µl 0,125 mol·l⁻¹ Levamisolu.

- Pufr pro proteinasu K, 10×:

Složení: 1 mol·l⁻¹ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,1 mol·l⁻¹ EDTA-Na₂, deionizovaná voda.

Příprava: 12,12 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit v 95 ml deionizované vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 7,5. Přidat 3,72 g EDTA-Na₂, doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou.

- Soli pro *in situ*, 10×:

Složení: 3 mol·l⁻¹ NaCl, 0,1 mol·l⁻¹ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,05 mol·l⁻¹ EDTA-Na₂, 0,05 mol·l⁻¹ NaH₂PO₄·2 H₂O, 0,05 mol·l⁻¹ NaH₂PO₄·2 H₂O, DEPC voda.

Příprava: 0,61 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit ve 40 ml DEPC vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 6,8. Přidat 8,78 g NaCl, 0,93 g EDTA-Na₂, 0,44 g NaH₂PO₄·2 H₂O a 0,91 g NaH₂PO₄·12 H₂O. Doplnit do objemu 50 ml DEPC vodou. Sterilizovat filtrací, skladovat na -20 °C.

- SSC, 20×:

Složení: 3 mol·l⁻¹ NaCl, 0,3 mol·l⁻¹ citronan sodný, DEPC voda.

Příprava: Rozpustit 87,68 g NaCl a 38,71 g citronanu sodného v DEPC vodě, doplnit do objemu 500 ml.

- TAE pufr, 1×:

Složení: 50× TAE pufr, deionizovaná voda.

Příprava: 200 ml 50× TAE pufru doplnit do 10 l deionizovanou vodou.

- TMS pufr:

Složení: 0,01 mol·l⁻¹ Tris(hydroxymethyl)aminomethan, 0,01 mol·l⁻¹ MgCl₂, 0,05 mol·l⁻¹ NaCl, DEPC voda.

Příprava: 0,121 g Tris(hydroxymethyl)aminomethanu rozpustit v 95 ml DEPC vody, upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 7,5. Přidat 0,095 g MgCl₂ a 0,292 g NaCl, doplnit do objemu 100 ml DEPC vodou. Sterilizovat filtrací.

- Trietanolamin, 2 mol·l⁻¹:

Složení: 2 mol·l⁻¹ trietanolamin, deionizovaná voda.

Příprava: 26,4 ml trietanolaminu doplnit do objemu 100 ml deionizovanou vodou. Upravit pomocí roztoku HCl na hodnotu pH 8. Sterilizovat filtrací.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

4.3.1 Přístroje a zařízení

- Analytické váhy (Sartorius)
- Centrální výrobce vakua DC1/0ZV (KNF Neuberger)
- Centrifuga Micro Star 17R (VWR)
- Centrifugační evaporátor SPD1010 (Thermo Scientific)
- Digitální předvážky Scout SC4010 (Ohaus)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Hlubokomrazicí box JOUAN pultový ULF 320 (Trigon-Plus)
- Horizontální elektroforéza MultiSUB Choice Trio se zdrojem napětí (Cleaver Scientific)
- Chlazený inkubátor INCU-Line 150R (VWR)
- Inkubátor Memmert INE 200 (Memmert)
- Laboratorní digestoř M 1800 (Merci)
- Lednice (Goorenje)
- Míchačka magnetická s topením AREX digital PRO (VELP Scientifica)
- Mikrovlnná trouba EMN (Zanussi)
- Mikroskop Olympus BX60 (Olympus)
- Mikrotom RM50H (Reichert Jung)
- Nahřívací deska (Medax)
- Nanodrop One spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- Odsávací rameno BT2 Arm 3IN X 5FT Original 70540444 (Nederman)
- pH metr inoLab pH Level 1 (WTW)
- Šuplíkový mražák (Siemens)
- Termocycler C100 Touch (Bio-Rad)
- Transluminátor InGenius 3 (Syngene)
- Třepačka Reax control (Heidolph)
- Třepačka s vodní lázní Memmert WNB 14 (Memmert)

- U-RFL-T Power supply for mercury burner (Olympus)
- Vodní lázeň Grant SUB6 (Grant)
- Výrobník ledu GM 360 (Nuove Tecnologie del Freddo)

4.3.2 Programy

- QuickPHOTO CAMERA 3.2
- GIMP 2.10.34

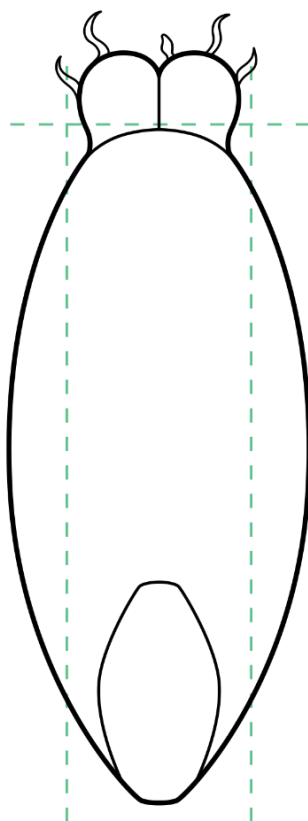
4.4 Experimentální a vyhodnocovací postupy

Všechny kroky postupu s výjimkou získání a úpravy semen a barvení toluidinovou modří byly provedeny podle kombinace protokolů sepsaných Coenem *et al.* (1990) a Jacksonem (1991) s drobnými modifikacemi zmíněnými níže. Modifikace byly prováděny mimo jiné podle protokolu od Zölnera *et al.* (2021).

4.4.1 Získání a úprava semen

Pro účely získání semen byly vybírány klasy, u nichž byly klásky rostoucí ve středu klasu dozrálé do bodu opylení. Tyčinky tedy byly zbarveny žlutě (případně se z nich již uvolňoval pyl) a blizny byly roztaženy. Klas byl vybalen z praporcového listu, který byl následně zastřížen. Poté byly ostříhány osiny jednotlivých klásků spolu s malou vrchní částí plušky a pluchy. To způsobilo, že do klásku mohl pronikat vzduch, který vysušil tyčinky, ze kterých se následně uvolnil pyl. Tímto postupem došlo k synchronizaci data opylení u velké části klásků. Klas byl následně zabalen do papírového pytlíku pro izolaci.

Po dosažení požadovaného počtu dní po opylení byl daný klas ustříhnut a byly z něj uvolněny jednotlivé klásky. Z těch byla odstraněním pluchy a plušky vyňata semena. Semena odpovídajícího stáří byla upravena ořezáním krajních částí podle obrázku č. 8. Upravená semena byla následně fixována.



Obrázek č. 8: Schéma ořezání semen ječmene před jejich fixací znázorněné na semeni 16 DAP.

Legenda: Přerušované zelené čáry zobrazují vedení řezu.

4.4.2 Fixace a ukotvení pletiv

K fixaci byl použit 4% roztok formaldehydu, do kterého bylo přidáno 200 μ l TritonuTM X-100 a 200 μ l Tweenu® 20.

Do 25 ml tohoto roztoku bylo přidáno deset předpřipravených semen a na hladinu byla umístěna síťka, která zabraňovala, aby se semena dostala nad hladinu. Takto byla semena vystavena působení vakua po dobu 10, 20, nebo 30 minut. Ideální z těchto tří časů byl určován v rámci optimalizace. Následně byla semena přenesena do čerstvého roztoku formaldehydu a v něm ponechána přes noc při teplotě 4 °C.

Cílem dalšího postupu bylo fixovaná pletiva semen dehydratovat pomocí etanolové řady a ukotvit do vosku, což později umožnilo přípravu řezů na mikrotomu. Nejprve byl fixační roztok formaldehydu nahrazen 25 ml 50% etanolu, ve kterém byla semena inkubována po dobu 90 minut. Poté byl původní etanol nahrazen 70% etanolem a vzorky byly opět inkubovány 90 minut. Tento postup se dále opakoval s 85% a 95% etanolem. Po uplynutí posledních 90 minut byl 95% etanol nahrazen 100% etanolem, ve kterém byla semena ponechána přes noc a ráno byl etanol vyměněn za čerstvý 100% etanol. Veškeré kroky byly prováděny s chlazeným etanolem a během čekání byly falkony se vzorky uloženy v lednici při teplotě 4 °C.

V rámci dalšího postupu byl 100% etanol nahrazen 25 ml roztoku 50% ROTI®Histolu (dále jen rotihistol) v etanolu a semena byla inkubována 90 minut. Následně byl roztok nahrazen 25 ml čistého rotihistolu a vzorek byl inkubován 90 minut. Tento krok byl zopakován ještě dvakrát, vždy s čerstvým rotihistolem. Všechny kroky byly prováděny za pokojové teploty.

Po odstranění poslední dávky rotihistolu bylo do falkon přidáno 15 ml čerstvého rotihistolu a přibližně 15 ml Paraplastu Plus® (dále jen paraplast), který byl přidán ve formě tuhých pelet. Takto byly vzorky umístěny do vodní lázně přehřáté na 45 °C a ponechány v ní přes noc.

Ráno následujícího dne byl mix rotihistolu a roztopeného paraplastu nahrazen předem rozpuštěným paraplastem. V něm byly vzorky dále inkubovány při 60 °C. Paraplast byl znovu vyměněn večer. Tímto způsobem byly vzorky inkubovány po další dva dny. K výměně paraplastu docházelo vždy ráno a večer.

Pátý den byla semena umístěna do formy a následně zalita voskem. Semena byla orientována tak, aby je později bylo možné podélně řezat. Vzorky byly do přípravy řezů uchovávány v lednici při teplotě 4 °C.

4.4.3 Příprava řezů

Pro přípravu řezů byl voskový blok umístěn na držák mikrotomu. Čepel skalpelu byla zahřata nad plamenem lihového kahanu, a s její pomocí byla natavena jedna strana voskového bloku se zalitým semenem. Blok byl následně přitlačen na držák a po zatuhnutí byl držák se vzorkem umístěn do mikrotomu. Držák byl seřízen tak, aby byla čepel mikrotomu umístěna paralelně k delší straně voskového bloku.

Pomocí mikrotomu byly nařezány pásy propojených řezů o tloušťce 7 µm, které byly umístěny na podložní sklíčka s kladným nábojem SuperfrostPlus™ Gold Adhesion Microscope Slides (EpreDia). Na povrch sklíčka, pod jednotlivé voskové pásy, byla pomocí Pasteurovy pipety přidána DEPC voda, na jejímž povrchu bylo možné s řezy manipulovat. Celé sklíčko bylo umístěno na nahřívací desku o teplotě 42 °C, kde vlivem tepla došlo k vyrovnání voskových pásů. Přebytečná voda byla následně odsáta pomocí Pasteurovy pipety a buničiny a sklíčko bylo ponecháno na nahřívací desce do vysušení. Sklíčka s řezy byla poté uchovávána v lednici při 4 °C.

4.4.4 Barvení toluidinovou modří

V rámci optimalizace fixace biologického materiálu byly některé řezy barveny toluidinovou modří za účelem kontroly integrity pletiv po fixaci. Před samotným barvením byly vzorky inkubovány v řadě roztoků, viz tabulka č. 1.

Tabulka č. 1: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro barvení toluidinovou modří.

| Roztok | Koncentrace | Čas inkubace [min] |
|-------------------|--------------------|---------------------------|
| Rotihistol | 100 % | 10 |
| Rotihistol | 100 % | 10 |
| Etanol | 100 % | 1 |
| Etanol | 100 % | 1 |
| Etanol | 95 % | 1 |
| Etanol | 85 % | 1 |
| Etanol | 50 % | 1 |
| Etanol | 30 % | 1 |
| Deionizovaná voda | - | 1 |
| PBS | 1× | 2 |
| Formaldehyd | 4% | 10 |
| PBS | 1× | 2 |
| PBS | 1× | 2 |
| PBS | 1× | 2 |

Vzorky byly následně dehydratovány inkubací v etanolové řadě. Proces byl prováděn v opačném pořadí, než je uvedeno v tabulce č. 1. Barvení bylo prováděno nanesením 1% roztoku toluidinové modří v deionizované vodě. Po 1 minutě byly vzorky třikrát promyty v deionizované vodě.

Po vysušení byly na vzorky nanесeny 2-3 kapky Entellanu® new. Následně byla skla překryta krycími sklíčky. Tímto byly vzorky trvale fixovány. Skla byla následně ponechána 2 hod vytvrdnout. Po vytvrdnutí bylo možné vzorky mikroskopovat. Fotografie byly pořízeny pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 3.2 a upraveny v programu GIMP 2.10.34.

4.4.5 Design sond

Pro RNA *in-situ* hybridizaci byly navrženy sondy pro detekci tří vybraných analogů genů. Pro syntézu každé sondy byly navrženy 4 páry primerů. Analogy genů byly vyhledány na webu GrainGenes v databázi Horvu Morex V3 (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>). Zde byl vybrán nejdelší exon daného genu a jeho sekvence byla následně vložena do programu Primer3 (<https://primer3.ut.ee/>). První pár primerů byl navržen tak, aby se délka produktu pohybovala mezi 150 a 300 bp. Ostatní parametry byly ponechány ve výchozím nastavení. Místa nasedání primerů byla porovnána pomocí programu Primer Map (https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html) a specificita sond vznikajících jejich použitím byla ověřena pomocí služby BLAST na webu GrainGenes. Specificita primerů byla ověřena službou BLAST na webu EnsemblPlants (<https://plants.ensembl.org/index.html>). Pomocí

T_m Calculatoru na webu NEB byla pro všechny páry primerů zjištěna teplota tání při použití Q5® High-Fidelity DNA polymerázy (<https://tmcalculator.neb.com>). První pár primerů byl využit pro syntézu prekursoru DNA sondy v PCR 1.

Druhý pár primerů byl odvozen od páru jedna tak, že na jejich 5' konec byla přidána sekvence promotoru pro T7 RNA polymerázu. Kombinací forward primeru bez promotorové sekvence a reverse primeru s promotorovou sekvencí v PCR 2 vznikla DNA sonda, ze které byla následně syntetizována antisense RNA sonda, využitelná pro detekci mRNA při hybridizaci. Kombinací forward primeru s promotorovou sekvencí a reverse primeru bez ní vznikla DNA sonda, ze které byla následně syntetizována sense RNA sonda, neschopná vazby na mRNA, využitá v experimentu jako negativní kontrola. Přehled všech primerů je uveden v tabulce č. 2. Přehled všech sond je uveden v tabulce č. 3.

Tabulka č. 2: Přehled primerů použitých k přípravě sond.

| Označení primeru | Pro analog genu | Typ | Sekvence (5' - 3') |
|--------------------|-----------------|---------|---|
| SBE1A_FW | <i>SBE1.A</i> | Forward | CGCCTGTTCAACTATGCCAA |
| SBE1A_RV | <i>SBE1.A</i> | Reverse | ATGCCTGAAACATCTTCCGC |
| EX_T7_SBE1A_FW | <i>SBE1.A</i> | Forward | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGACGCCTGTTCAACTATGCCAA |
| EX_T7_SBE1A_RV | <i>SBE1.A</i> | Reverse | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGAATGCCTGAAACATCTTCCGC |
| MRP1C_FW | <i>MRP1.C</i> | Forward | TACATCGCTTTGCTCCTCAC |
| MRP1C_RV | <i>MRP1.C</i> | Reverse | GCTCCAAACTGTCAGGCTTC |
| EX_T7_MRP1C_F W | <i>MRP1.C</i> | Forward | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGATACATCGCTTTGCTCCTCAC |
| EX_T7_MRP1C_RV | <i>MRP1.C</i> | Reverse | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGAGCTCCAAACTGTCAGGCTTC |
| ESR6A_FW | <i>ESR6.A</i> | Forward | GCTGCCATTCGTCCTGATC |
| ESR6A_RV | <i>ESR6.A</i> | Reverse | AGTTGCATGCTCCTCCCTC |
| EX_T7_ESR6A_FW | <i>ESR6.A</i> | Forward | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGAGCTGCCATTCGTCCTGATC |
| EX_T7_ESR6A_RV | <i>ESR6.A</i> | Reverse | CAGTGAATTGTAATACGACTCACTATAG GGAGAAGTTGCATGCTCCTCCCTC |

Tabulka č. 3: Přehled prekurzorů sond použitých k syntéze antisense a sense DNA sond.

| Analog genu | Místo nasednutí | Sekvence (5' - 3') | Délka [bp] |
|----------------|--------------------|---|---------------|
| <i>SBE1.A</i> | Exon 6 | CGCCTGTTCAACTATGCCAACTGGGAGGTCTTACGAT TTCTTCTTTCTAATCTGAGATATTGGATGGACGAATTC ATGTTTGATGGCTTCCGATTTGACGGGGTAACATCCA TGCTATATAATCACCATGGTATCAATATGTCATTCTCT GGAGATTACAAGGAATATTTTGGTTTGGATACTGATG TAGATGCAGTTGTTTACATGATGCTCGGAACCATTT AATGCACAAACTCTTGCCAGAAGCAACTGTTGTTGCG GAAGATGTTTCAGGCAT | 278 |
| <i>MRP1.C</i> | Exon 1 | TACATCGCTTTGCTCCTCACCTCCCTCACAAGCACTC AGAGTTCATACTATCACCTGTTTTATGGCAACCAACT CTCTTTCATCGACCATGAAGGCGAGAGTGGAGGGTG AGGGACCAGCTCCATTCAACACTGGGTTTGACGACAA CAACAACAATAGTTGTGATGGTACCAACCATGACAA GAACAAGAAGCCTGACAGTTTGGAGC | 210 |
| <i>ESR6.A</i> | Exon 2 | GCTGCCATTCGTCCTGATCCCGCTCAAGGGCCATCTG AGGGCAACAAGACCTGCACGGAGCTGAGCAAGAGGA GCCCCATCCTCTTCTGCGAAGAACGCGCGTGCGCCGA CAACTGCCGCATCGAGGGTTTTACCGAGGGAGGAGC ATGCAACT | 154 |

Kromě těchto sond byla v experimentu použita také sonda pro histon H4, která byla poskytnuta vedoucím mé práce Mgr. Martinem Kovačikem. Přehled sekvencí primerů i samotné sondy viz tabulka č. 4.

Tabulka č. 4: Sekvence primerů a prekurzoru sondy pro histon H4.

| Typ | Sekvence (5' - 3') |
|---------------------------------------|---|
| Primer forward | ATGTCGGGGCGCGGCAAGGG |
| Primer reverse | TGAGCGCGTAGACGACATCC |
| Primer forward s promotorem pro T7 | GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGAATGTCGGGGCGCGGCA AGGG |
| Primer reverse s promotorem pro T7 | GAATTGTAATACGACTCACTATAGGGAGATGAGCGCGTAGACGAC ATCC |

Sonda

ATGTCGGGGCGCGGCAAGGGCGGCAAGGGTCTGGGCAAGGGCGG
CGCCAAGCGCCACCGGAAGGTGCTGCGCGACAACATCCAGGGCAT
CACCAAGCCGGCCATCCGTCGCCTGGCGAGGAGGGGCGGCGTGAA
GCGCATCTCCGGCCTCATCTACGAGGAGACCCGCGGCGTGCTCAA
GATCTTCCTCGAGAACGTCATCCACAATGCCGTCACCCACATCGA
GCACACCCGCCGCAAGACCGTCACCGCCATGGATGTCGTCTACGC
GCTCAAGC

4.4.6 Syntéza DNA sond

Před přípravou DNA sond bylo potřeba získat cDNA. Pro její syntézu byla použita rostlinná RNA extrahovaná ze semen 4, 8 a 16 DAP ječmene setého. Samotná extrakce byla provedena mým vedoucím Mgr. Martinem Kovačikem. K syntéze cDNA byla využita souprava RevertAid H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit. Byly smíchány 9 μl rostlinné RNA, 1 μl Oligo(dT) primeru a 2 μl Nuclease-free vody do celkového objemu 12 μl . Směs byla inkubována v termocycleru při 65 °C po dobu 5 minut. Po ukončení inkubace byly ke směsi přidány 4 μl 5 \times reakčního pufru, 1 μl RiboLock RNase inhibitoru, 2 μl dNTPs o koncentraci 0,01 mol \cdot l $^{-1}$ a 1 μl RevertAid H Minus Reverse Transcriptase. Směs byla inkubována 60 minut při teplotě 42 °C a následně 5 minut při teplotě 70 °C.

Pro první polymerázovou řetězovou reakci byla použita syntetizovaná cDNA a Q5® High-Fidelity DNA polymeráza. Nejprve byl připraven mix, jehož složení je uvedeno v tabulce č. 5. Podle něj byly připraveny tři reakce, které jsou včetně použitých primerů zaznamenány v tabulce č. 6. Následně byly jednotlivé mixy přeneseny do termocycleru. Program termocycleru je zaznamenán v tabulce č. 7.

Tabulka č. 5: Složení reakční směsi pro PCR reakci.

| Složka reakční směsi | Finální koncentrace | Pipetovaný objem [μl] |
|--|---------------------------------------|------------------------------------|
| Nuclease-free voda | - | 15,5 |
| 5 \times Q5® Reaction pufr | 1 \times | 5 |
| dNTPs (10 mmol \cdot l $^{-1}$) | 0,2 mmol \cdot l $^{-1}$ | 0,5 |
| Forward primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,25 |
| Reverse primer (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$) | 0,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ | 1,25 |
| Templátová DNA | < 1000 ng | 1,25 |
| Q5® High-Fidelity DNA polymeráza | 0,02 u μl^{-1} | 0,25 |

Tabulka č. 6: Seznam použitých primerů pro syntézu prekurzorů DNA sond v PCR 1.

| Sonda | Forward primer | Reverse primer |
|-------|----------------|----------------|
| SBE | SBE1A_FW | SBE1A_RV |
| MRP | MRP1C_FW | MRP1C_RV |
| ESR | ESR6A_FW | ESR6A_RV |

Tabulka č. 7: Program pro PCR reakci.

| Krok procesu | Teplota [°C] | Čas | Počet cyklů |
|----------------------|--------------|-------|-------------|
| Počáteční denaturace | 98 | 30 s | 1 |
| Amplifikace | 98 | 10 s | 35 |
| | 67 | 30 s | |
| | 72 | 15 s | |
| Závěrečná elongace | 72 | 2 min | 1 |

Produkty PCR reakce byly následně elektroforeticky separovány v 1,5% agarózovém gelu s přídavkem ethidium bromidu. 5 µl jednotlivých vzorků bylo smícháno s 1 µl 6× TriTrack DNA Loading Dye a nanášeno na gel. Kromě vzorků byl na gel nanášen také GeneRuler™ 1 kb Plus DNA Ladder, který sloužil k přibližnému určení velikosti fragmentů DNA. Elektroforetická separace probíhala za napětí 110 v po dobu 60 minut. Následně byly výsledky vizualizovány pomocí UV transluminátoru InGenius-3.

V dalším kroku byly produkty PCR 1 použity pro syntézu DNA sond s použitím primerů uvedených v tabulce č. 8. Složení reakční směsi i program termocycleru odpovídal PCR 1 viz tabulky č. 5 a 7. Produkty PCR reakce byly následně elektroforeticky separovány za stejných podmínek jako po PCR 1. Na konci byla pomocí Nanodrop One spektrofotometru změřena koncentrace výsledných DNA sond.

Tabulka č. 8: Seznam použitých primerů pro syntézu DNA sond v PCR 2.

| Sonda | Typ sondy | Forward primer | Reverse Primer |
|-------|-----------|----------------|----------------|
| SBE | Antisense | SBE1A_FW | EX_T7_SBE1A_RV |
| SBE | Sense | EX_T7_SBE1A_FW | SBE1A_RV |
| MRP | Antisense | MRP1C_FW | EX_T7_MRP1C_RV |
| MRP | Sense | EX_T7_MRP1C_FW | MRP1C_RV |
| ESR | Antisense | ESR6A_FW | EX_T7_ESR6A_RV |
| ESR | Sense | EX_T7_ESR6A_FW | ESR6A_RV |

4.4.7 Syntéza RNA sond

RNA sondy byly syntetizovány z DNA sond. Kromě šesti sond zmíněných v tabulce č. 8 byla použita také antisense a sense sonda pro histon H4. Výchozí DNA sondy pro jejich syntézu byly poskytnuty vedoucím mé práce Mgr. Martinem Kovačikem. Sondy pro histon H4 byly použity jako pozitivní kontrola, jelikož k expresi histonu H4 dochází ve všech dělících se buňkách. Reakční směs pro tuto syntézu byla připravována za pokojové teploty. Její složení je uvedeno v tabulce č. 9.

Tabulka č. 9: Složení reakční směsi pro syntézu RNA sond.

| Složka reakční směsi | Konečná koncentrace | Pipetovaný objem [μ l] |
|--|---------------------|------------------------------|
| 5 \times transcription pufr | 1 \times | 5 |
| RiboLock RNase inhibitor | 40 U | 1 |
| ATP (0,005 mol \cdot l $^{-1}$) | 0,5 mmol l $^{-1}$ | 2,5 |
| GTP (0,005 mol \cdot l $^{-1}$) | 0,5 mmol l $^{-1}$ | 2,5 |
| CTP (0,005 mol \cdot l $^{-1}$) | 0,5 mmol l $^{-1}$ | 2,5 |
| Digoxigenin-11-UTP (0,001 mol \cdot l $^{-1}$) | 0,1 mmol l $^{-1}$ | 2,5 |
| DNA templát | \geq 100 ng | Podle koncentrace DNA sondy |
| T7 RNA polymeráza | 20 U | 1 |
| Deionizovaná voda | - | Doplnit do objemu 25 μ l |

Vzorky byly inkubovány v termocycleru při teplotě 37 °C po dobu 50 minut. Po skončení inkubace byla reakce zastavena přidáním 75 μ l 1 \times TMS, 2 μ l tRNA o koncentraci 100 mg \cdot ml $^{-1}$, a 1 μ l DNasy o koncentraci 1 U \cdot μ l $^{-1}$. Vzorky byly inkubovány 10 minut při teplotě 37 °C v termocycleru. Poté bylo ke vzorkům přidáno 100 μ l 3,8 mol \cdot l $^{-1}$ CH₃COONH₄ a 600 μ l 100% etanolu o teplotě -20 °C. Následně byly 15 minut inkubovány při -80 °C a po skončení inkubace byly vzorky po dobu 15 minut centrifugovány rychlostí 14000 rpm při teplotě 4 °C. Byl odstraněn supernatant a k peletu bylo přidáno 150 μ l 70% etanolu o teplotě -20 °C. Po centrifugaci byl odstraněn supernatant, pelet byl vysušen pomocí centrifugačního evaporátoru SPD1010 a následně resuspendován v 50 μ l Nuclease-free vody.

4.4.8 Kontrola efektivity značení

Na membránu Amersham HybondTM-N⁺ (Cytiva) byly postupně naneseny 1 μ l neředěné sondy, 1 μ l sondy ředěné v poměru 1:10, a 1 μ l sondy ředěné v poměru 1:100. Dále byla na membránu nanesena negativní kontrola ve formě deionizované vody a vzorky byly na membráně zafixovány pomocí UV

záření UV transluminátorem InGenius 3. Po zafixování byla membrána inkubována v řadě roztoků viz tabulka č. 10.

Tabulka č. 10: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro ověření funkčnosti RNA sond.

| Roztok | Čas inkubace |
|---|---------------------|
| Pufr 1 | Pouze namočeno |
| Pufr 2 | 30 min |
| Pufr 1 | 5 min |
| Pufr 1 | 5 min |
| Pufr 1 s Anti-Digoxigenin-AP Fab fragmenty (0,2 $\mu\text{l}\cdot\text{ml}^{-1}$) | 30 min |
| Pufr 1 | 15 min |
| Pufr 1 | 15 min |
| Pufr 5 | Pouze namočeno |
| Pufr 6 | Dle potřeby |

Při inkubaci v pufru 6 byla membrána umístěna do tmy a inkubována do doby, kdy došlo ke zviditelnění vzorků sond o všech koncentracích.

4.4.9 *In-situ* hybridizace

Prvním krokem *in-situ* hybridizace byla příprava řezů, která je učinila přístupnější navázání RNA sond a snížila míru nespecifické vazby. Skla s řezy připravenými na mikrotomu byla umístěna do stojanu, ve kterém byla následně postupně nořena do jednotlivých roztoků, a v nich inkubována. Schéma tohoto postupu je uvedeno v tabulce č. 11.

Tabulka č. 11: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro přípravu pletiv.

| Roztok | Koncentrace | Čas inkubace [min] |
|---------------|--------------------|---------------------------|
| Rotihistol | 100 % | 10 |
| Rotihistol | 100 % | 10 |
| Etanol | 100 % | 1 |
| Etanol | 100 % | 1 |
| Etanol | 95 % | 1 |
| Etanol | 85 % | 1 |
| Etanol | 50 % | 1 |
| Etanol | 30 % | 1 |
| DEPC voda | - | 1 |

| | | |
|---|--|-----------|
| HCl | 0,2 mol·l ⁻¹ | 10 |
| DEPC voda | - | 5 |
| PBS 1 | 1× | 2 |
| Proteináza k v pufru pro proteinázu k (1×) | 0,125 mg·ml ⁻¹ | 5 nebo 10 |
| Glycin | 0,2% roztok v PBS | 2 |
| PBS 1 | 1× | 2 |
| Formaldehyd | 4% | 10 |
| PBS 1 | 1× | 2 |
| PBS 2 | 1× | 2 |
| Anhydrid kyseliny octové | 1 ml na 100 ml 0,1 mol·l ⁻¹ trietanolaminu | 10 |
| PBS 2 | 1× | 2 |

Pufr pro proteinázu k byl před jejím přidáním zahřát na 37 °C, a i při samotné inkubaci byla teplota udržována na 37 °C v inkubátoru VWR. Anhydrid kyseliny octové byl do roztoku trietanolaminu přidán těsně před přenesením stojanu se skly.

Vzorky byly následně dehydratovány inkubací v etanolové řadě. Proces byl prováděn v opačném pořadí, než je uvedeno v tabulce č. 11, tedy od 30% etanolu až po etanol 100%. Po tomto procesu byla v boxu pod skly ponechána malé množství etanolu, aby skla zcela nevyschla. Takto byla uchována v lednici při 4 °C do samotné hybridizace.

Před hybridizací bylo potřeba připravit mix obsahující RNA sondu a hybridizační pufr. Mix obsahující sondu byl připraven smícháním 3 µl RNA sondy, 3 µl Nuclease-free vody a 6 µl deionizovaného formamidu. Směs byla 2 minuty denaturována při 80 nebo 90 °C. Celkové množství 12 µl bylo určeno pro hybridizaci jednoho skla. Hybridizační pufr byl připraven smícháním 200 µl 10× solí, 800 µl deionizovaného formamidu, 400 µl 50% dextran sulfátu, 20 µl 100 mg·ml⁻¹ tRNA, 40 µl 50× Denhart's Solution a 140 µl Nuclease-free vody. Smícháním 12 µl mixu obsahujícího sondu a 48 µl hybridizačního pufru vzniklo 60 µl roztoku, který byl následně použit pro hybridizaci jednoho podložního skla. Po přidání tohoto roztoku bylo podložní sklo se vzorkem zakryto krycím sklíčkem. Krycí sklíčka byla předem inkubována v acetonu po dobu 2 hodin.

Takto ošetřená skla byla uložena do boxu s malým množstvím promývacího pufru. Po uložení všech skel byl box utěsněn parafilmem, aby bylo zabráněno odpařování a vzorky byly inkubovány přes noc při teplotě 50 °C.

Pro odstranění krycích sklíček byl stojan se vzorky ponořen do promývacího pufru o teplotě 50 °C. Po uplynutí několika minut se krycí sklíčka samovolně uvolnila. Následně byly vzorky inkubovány v sérii roztoků viz tabulka č. 12.

Tabulka č. 12: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro vymývání.

| Roztok | Čas inkubace [min] | Teplota |
|--|--------------------|------------------|
| Promývací pufr | 60 | 50 °C |
| Promývací pufr | 60 | 50 °C |
| NTE | 5 | 37 °C |
| NTE | 5 | 37 °C |
| NTE s RNázou a (20 µg·ml ⁻¹) | 30 | 37 °C |
| NTE | 5 | Pokožová teplota |
| NTE | 5 | Pokožová teplota |
| Promývací pufr | 60 | 50 °C |
| PBS | 5 | Pokožová teplota |

4.4.10 Detekce

Po ukončení hybridizace bylo možné detekovat RNA sondy pomocí Anti-Digoxigenin protilátky s navázanou alkalickou fosfatázou, která následně reagovala se substrátem NBT a BCIP. Vzorky byly opět inkubovány v sérii roztoků viz tabulka č. 13.

Tabulka č. 13: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro detekci RNA sond po hybridizaci.

| Roztok | Čas inkubace [min] |
|-------------------------------|--------------------|
| Pufr 1 | 5 |
| Pufr 2 | 60 |
| Pufr 3 | 60 |
| Pufr 4 | 150 |
| Pufr 1 s 0,3 % Tritonu™ X-100 | 15 nebo 20 |
| Pufr 1 s 0,3 % Tritonu™ X-100 | 15 nebo 20 |
| Pufr 1 s 0,3 % Tritonu™ X-100 | 15 nebo 20 |
| Pufr 1 s 0,3 % Tritonu™ X-100 | 15 nebo 20 |
| Pufr 1 | 5 |
| Pufr 5 | 5 |
| Pufr 6 | Dle potřeby |

Pufř 4 obsahující Anti-Digoxigenin-AP Fab fragmenty byl nanášen přímo na skla a následně překryt parafilmem. Inkubace skel v pufřu 6 probíhala v petriho miskách. Skla byla následně inkubována ve tmě a tento proces trval přibližně 12 až 72 hodin, tak aby bylo dosaženo co nejlepšího poměru signál:šum. Pro ukončení reakce byla skla se vzorky navracena do stojanu a inkubována v řadě roztoků podle tabulky č. 14.

Tabulka č. 14: Schéma inkubace vzorků v roztocích pro ukončení reakce alkalické fosfatázy.

| Roztok | Koncentrace | Čas inkubace [min] |
|-------------------|--------------------|---------------------------|
| Deionizovaná voda | - | 5 |
| Etanol | 70 % | 5 |
| Etanol | 95 % | 5 |
| Etanol | 70 % | 5 |
| Deionizovaná voda | - | 5 |

Následně byly vzorky 5 minut inkubovány ve 200 ml deionizované vody s přídavkem 200 μ l Calcofluor White Stain. Po uplynutí pěti minut byla skla krátce opláchnuta v deionizované vodě.

Po vyjmutí z deionizované vody byla skla vysušena na vzduchu. Na suchá skla byly naneseny 2-3 kapky Entellanu® new a byla překryta krycími sklíčky. Tímto byly vzorky trvale fixovány. Skla byla následně ponechána 2 hodiny vytvrdnout. Poté je bylo možné prohlížet pod mikroskopem a pořizovat fotografie. Fotografie byly pořizeny pomocí programu QuickPHOTO CAMERA 3.2 a upraveny v programu GIMP 2.10.34.

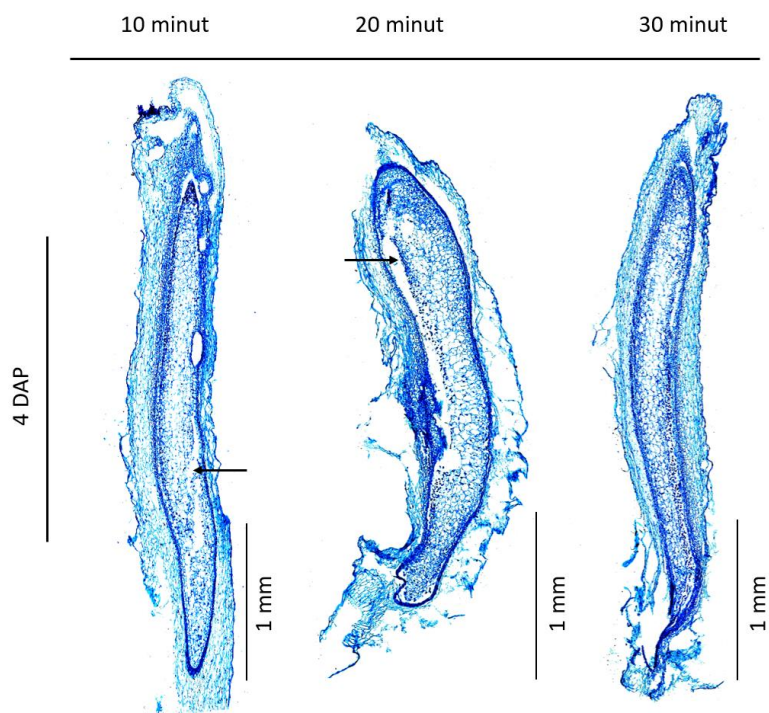
5 VÝSLEDKY

V rámci mé bakalářské práce byla detekována RNA přítomná v řezech semen pomocí RNA sondy, za vzniku RNA-RNA hybridních molekul. Cílem bylo detekovat mRNA transkripty markerových genů v diferenciaci endospermu přímo v pletivech semen ječmene o stáří 4, 8 a 16 DAP.

5.1 Optimalizace fixace

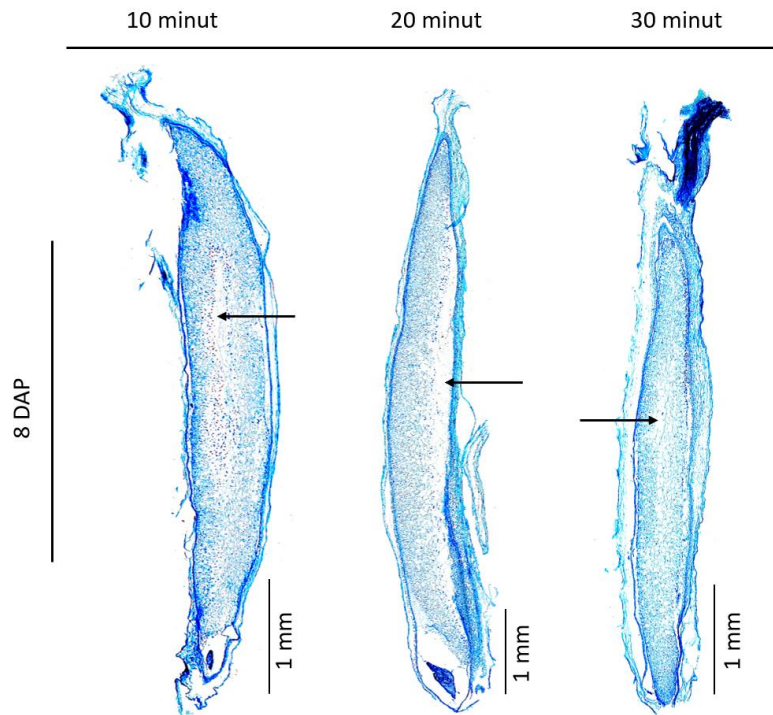
Před *in-situ* hybridizací bylo nejprve potřeba optimalizovat postup pro fixaci biologického materiálu. Optimalizována byla doba aplikace vakua, a to i vzhledem k rozdílné velikosti semen o různém stáří. Nedostatečná míra fixace znemožňuje přípravu řezů, které se následkem toho rozpadají. Naopak vyšší míra vakua způsobuje vznik trhlin.

Testovaná doba vystavení vakuu byla stanovena na 10, 20 a 30 min, a to v jednotlivých krocích vždy po 10 minutách. Semena pocházející z jednoho klasu byla rozdělena do tří skupin, z nichž každá byla vakuu vystavena rozdílnou dobu. Připravené řezy byly pro vizualizaci barveny toluidinovou modří, která barví chromatin a buněčné stěny. Výsledky jsou zobrazeny na obrázcích č. 9-11.



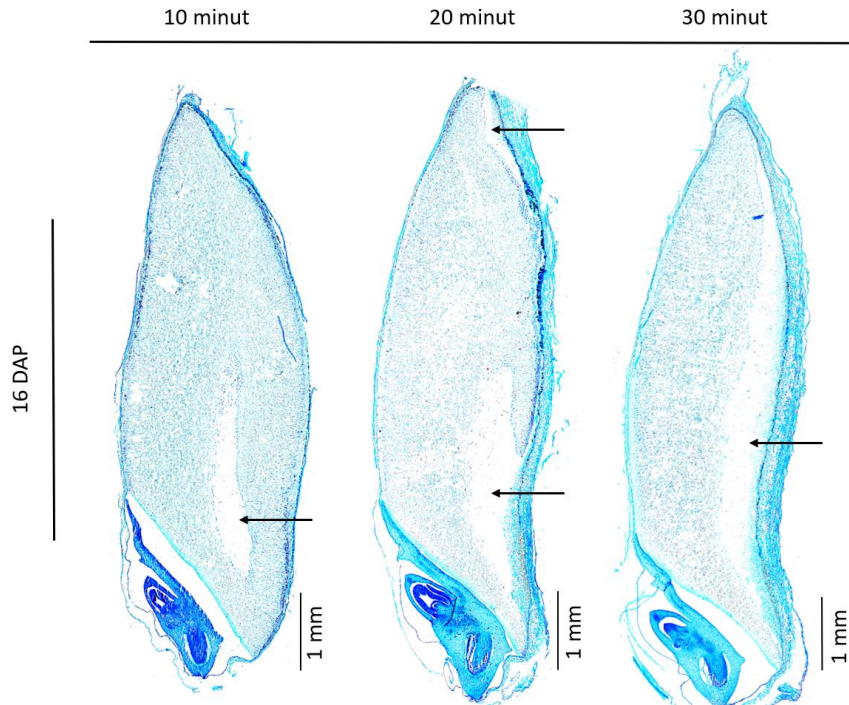
Obrázek č. 9: Semena 4 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Legenda: Čtyřdenní semena vystavena působení 10, 20 a 30 minut vakua. Šípkami jsou označeny trhliny vzniklé vlivem vakua.



Obrázek č. 10: Semena 8 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Legenda: Osmidenní semena vystavena působení 10, 20 a 30 minut vakua. Šípkami jsou označeny trhliny vzniklé vlivem vakua.



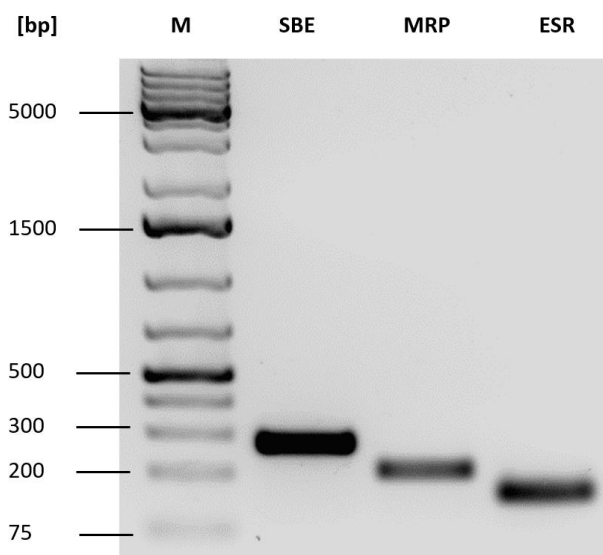
Obrázek č. 11: Semena 16 DAP vystavená různé délce vakua obarvená toluidinovou modří.

Legenda: Šestnáctidenní semena vystavena působení 10, 20 a 30 minut vakua. Šípkami jsou označeny trhliny vzniklé vlivem vakua.

Všechna semena byla dostatečně fixována již po 10 minutách, a proto byla veškerá další semena vystavována vakuu vždy po dobu 10 minut.

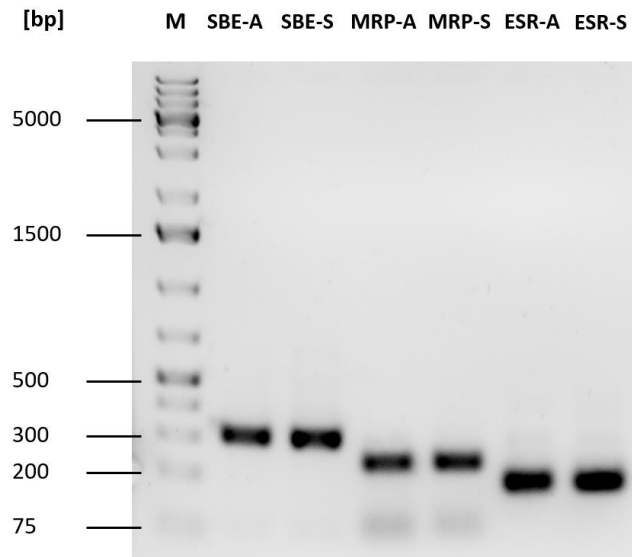
5.2 Syntéza sond

RNA sondy byly syntetizovány ve dvou krocích. Nejprve byly syntetizovány DNA sondy, a to pomocí dvou PCR. Při první vznikly tři prekurzory sond, ze kterých byly následně přidáním příslušných primerů při druhé PCR vytvořeny sense a antisense DNA sondy. Po obou PCR následovala elektroforetická separace pro ověření, zda velikost produktů odpovídá očekávání. Výsledek elektroforetické separace s produkty první PCR je zobrazen na obrázku č. 12. Vzhledem k tomu, že produkty první PCR měly odpovídající velikost, bylo přistoupeno k PCR 2. Po druhé PCR měly produkty větší velikost, jelikož jejich součástí byla sekvence promotoru pro T7 RNA polymerázu o délce 33 bp (viz obrázek č. 13).



Obrázek č. 12: Elektroforetická separace prekurzorů sond syntetizovaných v PCR 1.

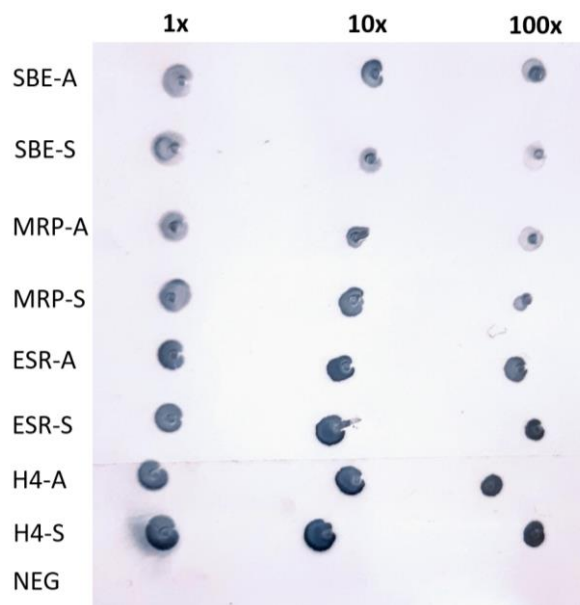
Legenda: u PCR produktů jednotlivých sond bylo dosaženo očekávaných velikostí. A to 278 bp pro SBE, 210 bp pro MRP a 154 bp pro ESR. (M) Marker molekulové hmotnosti.



Obrázek č. 13: Elektroforetická separace DNA sond syntetizovaných v PCR 2.

Legenda: u PCR produktů jednotlivých sond bylo dosaženo očekávaných velikostí. A to 311 bp pro SBE, 243 bp pro MRP a 187 bp pro ESR. Písmeno a v názvu sond označuje antisense sondy, zatímco písmeno s označuje sense sondy. (M) Marker molekulové hmotnosti.

V dalším kroku byly z výchozích DNA sond syntetizovány RNA sondy. Antisense i sense DNA sonda pro histon H4 byla poskytnuta vedoucím mé práce Mgr. Martinem Kovačikem. Funkčnost syntetizovaných sond byla ověřována detekcí na membráně (viz obrázek č. 14).



Obrázek č. 14: Detekce a ověření funkčnosti syntetizovaných RNA sond.

Legenda: Detekované signály pocházejí ze sond vázaných na membráně. Byly testovány tři koncentrace: původní (1x) a po ředění (10x a 100x) Písmeno a v názvu sond označuje antisense sondy, písmeno s označuje sense sondy. (NEG) Negativní kontrola v podobě vody.

Signál byl detekován u všech sond ve všech koncentracích. Míra jeho síly se ovšem mezi jednotlivými sondami lišila. Signál ze sond SBE a MRP byl obecně u všech koncentrací slabší, než signál sond ESR a H4.

Vzhledem k tomu, že syntetizovaných RNA sond nebylo dostatečné množství pro veškeré hybridizace, byla následně provedena druhá syntéza. Výsledky druhé detekce byly v podstatě stejné jako v předchozím případě.

5.3 Optimalizace hybridizace

Druhá optimalizace provedená v rámci mé bakalářské práce se týkala samotného procesu hybridizace. Podmínky první hybridizace byly stanoveny podle dostupných zdrojů (Coen *et al.* 1990, Jackson, 1991, Zölner *et al.* 2021) viz v tabulka č. 16.

Za uvedených podmínek však nedošlo k detekci signálů u žádného ze vzorků, ani u pozitivní kontroly. Jako možná příčina byla stanovena denaturace sond, která byla prováděna v objemu 72 μ l a v 1,5 ml mikrozkuhavce, která má silnější stěnu než klasická 0,2 ml mikrozkuhavka pro PCR. To mohlo vést k nedostatečné denaturaci. Při druhém pokusu byly tedy sondy denaturovány pouze v objemu 12 μ l v 0,2 ml PCR mikrozkuhavce a zbylé podmínky zůstaly beze změny, viz tabulka č. 16.

Ani při druhém pokusu však nebyl detekován žádný signál. Jako další možné příčiny byly prověřeny kroky, které bývají obecně kritické pro následnou detekci signálu po hybridizaci, a to teplota denaturace sondy a doba inkubace v pufru s proteinázou K. Nedostatečná teplota denaturace by opět vedla k tomu, že by sonda nebyla schopna vazby. Příliš dlouhá inkubace s proteinázou by mohla vést k přílišnému štěpení proteinů, narušení zcrosslinkované struktury řezu a k následnému vyplavení RNA ze vzorku. Aby mohlo být určeno, zda je některá z těchto podmínek příčinou neúspěšné hybridizace, byl navržen experiment, při kterém byla provedena hybridizace se čtyřmi vzorky, z nichž všechny byly hybridizovány s antisense sondou pro histon H4 představující pozitivní kontrolu. U výše zmíněných podmínek byla provedena kombinace modifikací, které jsou uvedeny v tabulce č. 15.

Tabulka č. 15: Schéma kombinované optimalizace teploty denaturace a doby inkubace s proteinázou.

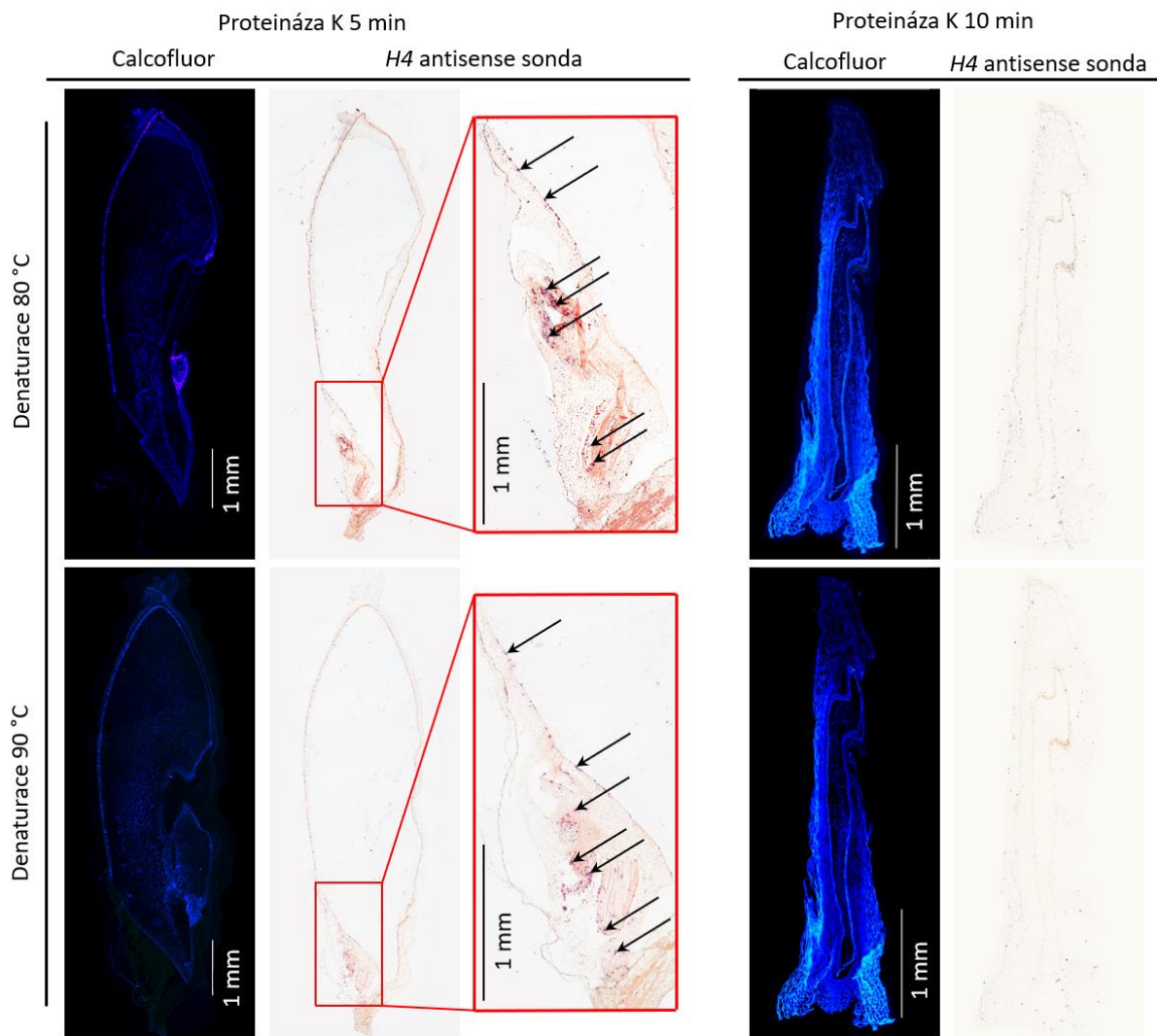
| Číslo vzorku | Teplota denaturace [°C] | Inkubace s proteinázou k [min] |
|--------------|-------------------------|--------------------------------|
| 1 | 80 | 10 |
| 2 | 80 | 5 |
| 3 | 90 | 10 |
| 4 | 90 | 5 |

Mimo jiné byly provedeny změny společné pro všechny čtyři vzorky s cílem snížit limit detekce signálu. Za tímto účelem byl změněn způsob inkubace v pufru s protilátkou. Ta byla v předchozích

případech prováděna po dobu jedné hodiny ve svislé poloze, což mohlo vést k sedimentaci protilátky na dně. Proto byl v tomto případě pufr s protilátkou nanesen přímo na skla umístěná ve vodorovné poloze, překryt parafilmem zabraňujícím vypařování a doba inkubace byla prodloužena na 2,5 hodiny. Naopak doba promývání v pufru 1 s Tritonem™ X-100 byla zkrácena na 15 minut. Poslední změna zahrnovala zvýšení koncentrace substrátů obsažených v pufru 6. Původní koncentrace byly 0,1% NBT, 0,14% BCIP a 0,09% Levamisol a zvýšeny byly na 0,5% NBT, 0,38% BCIP a 0,09% Levamisol. Veškeré podmínky jsou shrnuty v tabulce č. 16.

U této hybridizace byl detekován signál u vzorků 2 a 4 poukazující na vliv délky inkubace s proteinázou k (viz obrázek č. 15). U obou 16 DAP vzorků byl v oblasti embrya viditelný signál, značící přítomnost mRNA vzniklé transkripcí genu pro histon H4. Jinde v semeni signál detekován nebyl. Z toho lze odvodit, že v semeni 16 DAP dochází k dělení buněk a s ním spojené expresi histonu H4 v embryu, ale již ne v endospermu nebo obalových vrstvách. Dále je viditelné zbarvení testy, obalových vrstev a pletiv embrya vzniklé působením hybridizace nezávisle na přítomnosti mRNA (viz obrázek č. 16).

U vzorků 1 a 3 k detekci signálu nedošlo (viz obrázky č. 15). U 4 DAP semen byl předpoklad, že se signál bude ve vysoké míře vyskytovat v celém endospermu, jelikož v této fázi vývoje zde dochází k výraznému dělení buněk. Při mikroskopování ve viditelném světle je pozorovatelné pouze mírné zbarvení testy a obalových vrstev, ke kterému dochází po inkubaci se substrátem nezávisle na přítomnosti mRNA a se signálem nesouvisí. Tento fakt je zřetelný i z negativní kontroly (viz obrázek č. 16).



Obrázek č. 15: Výsledky třetí hybridizace

Legenda: Semena po třetí hybridizaci. Levý sloupec (5minutová inkubace s proteinázou K) zobrazuje semena 16 DAP barvená calcofluorem a po hybridizaci s antisense sondou pro histon H4. V detailu embrya je viditelné větší množství fialových teček tvořených precipitátem vzniklým reakcí NBT a BCIP s alkalickou fosfatázou. Ty představují signál a některé z nich jsou označeny šipkami. Pravý sloupec (10minutová inkubace s proteinázou K) zobrazuje semena 4 DAP barvená calcofluorem a po hybridizaci se sense sondou pro histon H4. Není zde viditelný žádný signál, pouze mírné zbarvení testy a obalových vrstev.



Obrázek č. 16: Výsledek hybridizace u semene 16 DAP se sense sondou pro histon H4.

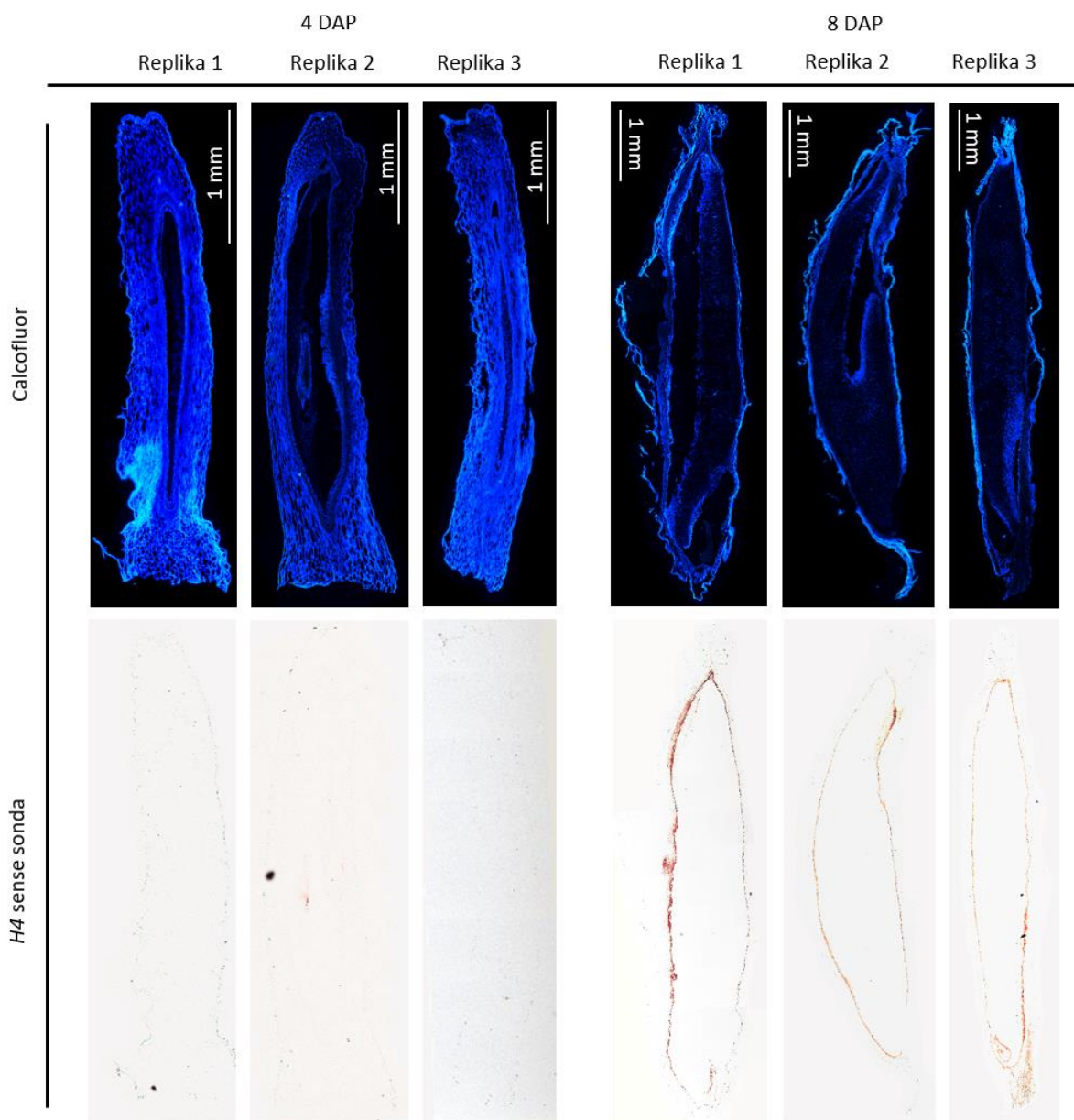
Legenda: Šestnáctidenní semeno po hybridizaci se sense sondou pro histon H4 představující negativní kontrolu. Je viditelné zbarvení testy (T), obalových vrstev (O) a mírně i pletiv embrya (E).

V návaznosti na předchozí výsledky byla provedena hybridizace pro všechny sledované geny s kratší dobou inkubace s proteinázou K. Ostatní podmínky zůstaly beze změny a jsou shrnuty v tabulce č. 16. Sondy pro histon H4 a ESR byly 10x naředěny, aby došlo k vyrovnání síly signálu se sondami pro SBA a MRP a vyvíjení signálu v pufru 6 mohlo být zastaveno u všech vzorku současně. Hybridizace byla prováděna u semen 4 a 8 DAP, a to ve třech replikách. Při této hybridizaci nedošlo k detekci signálů u sond pro sledované geny, ani u pozitivní kontroly (viz obrázek č. 17).

Tabulka č. 16: Podmínky jednotlivých hybridizací.

| Krok optimalizace | Hybridizace 1 | Hybridizace 2 | Hybridizace 3 | Hybridizace 4 |
|-----------------------------|-------------------|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| Denaturace | 72 μ l, 80 °C | 12 μ l, 80 °C | 12 μ l, 80/90 °C | 12 μ l, 80 °C |
| Proteináza K | 10 minut | 10 minut | 5/10 minut | 5 minut |
| Pufr 4 | 1 hodina, svisle | 1 hodina, svisle | 2,5 hodiny, vodorovně | 2,5 hodiny, vodorovně |
| Pufr 1 s Tritonem™ X-100 | 4x 20 minut | 4x 20 minut | 4x 15 minut | 4x 15 minut |

| | | | | |
|--------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| | 0,1% NBT, | 0,1% NBT, | 0,5% NBT, | 0,5% NBT, |
| Pufr 6 | 0,14% BCIP, | 0,14% BCIP, | 0,38% BCIP, | 0,38% BCIP, |
| | 0,09% Levamisol | 0,09% Levamisol | 0,09% Levamisol | 0,09% Levamisol |



Obrázek č. 17: Výsledky čtvrté hybridizace pro pozitivní kontrolu.

Legenda: Semena 4 a 8 DAP barvená calcofluorem a po hybridizaci s antisense sondou pro histon H4. Hybridizace byla provedená ve třech replikách. V žádném semeni není viditelný signál, pouze zbarvení testy, obalových vrstev a pletiv embrya. To je mnohem výraznější u semen 8DAP.

6 DISKUSE

Endosperm je významnou součástí semen, a to nejen z pohledu vývoje rostliny, ale také z hospodářského hlediska. Představuje hlavní zdroj zásobních látek důležitých pro klíčení rostlin i výživu člověka (Evers *et* Millar, 2002). Endosperm obsahuje několik částí, které plní různé funkce. Diferenciace těchto částí je spojena se specifickou expresí rozdílných genů v určitých obdobích vývoje (Sabelli *et* Larkins, 2009). Zda je gen exprimován v konkrétním období vývoje a v konkrétní oblasti endospermu, je možné zjistit pomocí techniky RNA *in-situ* hybridizace (Jin *et* Lloyd, 1997). Cílem praktické části mé bakalářské práce bylo optimalizovat celý proces hybridizace, provést hybridizaci pro tři sledované markerové geny a analyzovat jejich expresi.

V první části byly vzorky fixovány, ukotveny v paraplastu a zpracovány do podoby řezů. Správná fixace je klíčová, aby byla následná hybridizace funkční a bylo možné z ní vyčíst informace o expresi sledované mRNA v jednotlivých pletivech. Fixaci usnadňuje mimo jiné aplikace vakua na biologické vzorky. Tímto krokem dochází k odstranění vody z pletiv, což po uvolnění vakua napomáhá lepšímu proniknutí fixáže. Prvním optimalizovaným parametrem byla délka aplikace vakua. Příliš krátká fixace znemožňuje přípravu řezů, příliš dlouhá naopak vede ke tvorbě trhlin v samotných semenech. Semena jsou k narušení pletiv při aplikaci vakua náchylnější, než jiné rostlinné orgány jako listy nebo kořeny. To je dáno tím, že jsou tvořena větším množstvím rozdílných pletiv různého původu a orientace. Vliv má také jejich velikost. Testovány byly tři časové intervaly po 10 minutách (tedy 10, 20 a 30 min). Z výsledků vyplývá, že semena byla bez ohledu na stáří a velikost dostatečně fixována již po 10 minutách vystavení vakuu. Delší doba fixace ve většině případů vedla k narušení pletiv, či ke vzniku rozměrově větších trhlin. Proces přípravy řezů nebyl delší dobou fixace ovlivněn, a proto byla stanovena optimální délka vakua 10 minut. Ovšem i při aplikaci pouze 10 minut vakua docházelo v semeni ke tvorbě trhlin, a to i přesto, že většina protokolů doporučuje pro fixaci semen právě tuto dobu. Další optimalizace by v budoucnu měla být zaměřena na sílu vakua. To v tomto případě dosahovalo tlaku přibližně 20 mbar. Přiblížení tohoto tlaku k atmosférické hodnotě by mohlo vést ke snížení pravděpodobnosti poškození materiálu. Je možné, že při aplikaci nižšího vakua bude nutné prodloužit čas aplikace vakua, pro dosažení dostatečné fixace. Na integritu vzorků mohla mít během fixace vliv také příliš prudká změna tlaku. Je možné, že po uplynutí stanoveného času byl tlak navrácen k atmosférické hodnotě příliš rychle, což mělo za následek vznik trhlin. Řešením tohoto problému by mohlo být pozvolnější zvyšování tlaku.

Ve druhé části byly optimalizovány některé důležité kroky v procesu hybridizace. Klíčovou rolí při hybridizaci hraje sonda. Aby byla schopna vazby, je nutné provést její denaturaci. Ta byla původně prováděna pro všechny vzorky najednou v objemu 72 μ l v 1,5 ml mikrozkuhavce. Ta má silnější stěny než 0,2 ml mikrozkuhavka běžně používaná pro PCR. To, společně s větším objemem roztoku, mohlo vést k nedostatečnému a nerovnoměrnému zahřátí a k neúplné denaturaci sond, které poté nebyly

schopné vazby. Ačkoliv se jedná o kritický krok hybridizace, tato změna neměla v tomto případě na průběh hybridizace vliv. Z hlediska denaturace sond je důležitým parametrem také teplota, při které probíhá. Ukázalo se však, že ani ta nehrála v tomto případě roli a sondy byly dostatečně denaturovány již při teplotě 80 °C. Dalším předmětem optimalizace byla doba inkubace vzorků s proteinázou K. Příliš dlouhá doba inkubace vede nadměrnému štěpení proteinů, narušení struktury řezu a ztrátě detekované RNA. Naopak při krátké inkubaci není cílová mRNA zpřístupněna pro vazbu. V rámci optimalizace byly testovány intervaly inkubace 5 a 10 minut. Z výsledků vyplynulo, že délka inkubace s proteinázou k má v tomto případě rozhodující vliv a při zkrácení na 5 minut, došlo k detekci signálu u pozitivní kontroly. Zásadní vliv na míru štěpení a délku inkubace má také stáří použitého enzymu. V případě mých experimentů byl používán nově objednaný enzym s vysokou aktivitou. V rámci optimalizací byla pro snížení detekčního limitu upravena také délka a způsob inkubace s protilátkou. Ta byla původně prováděna se vzorky umístěnými ve svislé poloze, což mohlo vést k sedimentaci protilátky. Proto byly vzorky v rámci optimalizací umístěny do vodorovné polohy, pufr s protilátkou byl nanesen přímo na ně a byl překryt parafilmem aby se zabránilo vypařování. Tento způsob hybridizace navíc snížil potřebný objem pufru s protilátkou. Doba inkubace byla prodloužena ze 60 na 150 minut. V posledním kroku byla při optimalizaci zvýšena koncentrace substrátů v pufru pro detekci, což také vedlo ke snížení detekčního limitu.

I přes tyto úpravy nedošlo během hybridizace sond pro markerové geny k detekci signálu, a to včetně pozitivní kontroly. Syntéza DNA sond pro markerové geny proběhla v pořádku, její výsledky byly ověřeny elektroforetickou separací a odpovídaly očekáváním. Po *in vitro* transkripci vznikly při první syntéze funkční RNA sondy, které byly ověřeny hybridizací na membráně. Je však možné, že v průběhu došlo ke kontaminaci sond RNázami. Příčinou absence signálu v poslední hybridizaci mohlo být také ředění některých sond. Sondy pro *H4* a *ESR* nemusely být po ředění přítomny v množství dostatečném pro detekci. Tento problém se mohl týkat také sond pro *SBE* a *MRP*, kde byla koncentrace od počátku nízká. U použitých protokolů (Coen *et al.* 1990, Jackson, 1991, Wu *et Wagner*, 2012, Zölner *et al.* 2021) bylo pro hybridizaci doporučeno použití hydrolyzovaných fragmentů sond o délce přibližně 150 bp. Sondy pro *SBE*, *MRP* a *H4* byly delší, což mohlo znesnadnit jejich pronikání do pletiv. Ovšem se sondou pro *H4* byla provedena úspěšná hybridizace, a to i přes její délku 277 bp. Vliv mohla mít také délka skladování syntetizovaných RNA sond. Sondy byly připraveny o několik týdnů dříve, což mohlo vést k jejich postupné degradaci. Ta se opět mohla projevit až při ředění sondy. Mohlo také dojít ke kontaminaci vzorků či roztoků RNázami během procesu přípravy pletiv pro hybridizaci, nebo při přípravě hybridizačního mixu. Absence signálu v poslední hybridizaci byla pravděpodobně kombinací výše zmíněných faktorů.

7 ZÁVĚR

V rámci této bakalářské práce bylo cílem zpracovat literární rešerši na téma vývoje obilky se zaměřením na vývoj endospermu, navrhnout a syntetizovat RNA sondy pro vybrané geny, připravit vzorky včetně jejich řezání na mikrotomu, provést RNA *in-situ* hybridizaci a detekovat a vyhodnotit expresi jednotlivých genů. Většina těchto cílů byla úspěšně splněna. Jediným cílem, který se nepodařilo splnit je detekce a vyhodnocení exprese jednotlivých genů, a to z důvodu neúspěšné hybridizace se sondami pro tyto geny. V rámci toho byl optimalizován protokol pro RNA *in-situ* hybridizaci u semen ječmene, a to v několika krocích.

Nejprve byla optimalizována délka působení vakua na semena v průběhu fixace. Ta byla stanovena na deset minut. Pro tuto část by bylo vhodné do budoucna dále optimalizovat míru působícího podtlaku a způsob jeho následného uvolňování.

Další optimalizace se týkaly procesu přípravy pletiv, hybridizace a následné detekce. Jako dostatečná denaturační teplota bylo stanoveno 80 °C. Délka inkubace s proteinázou k byla zkrácena na 5 minut. Naopak délka inkubace s protilátkou byla prodloužena na 2,5 hodiny za současné změny orientace ze svislé do vodorovné polohy. Jako poslední byla zvýšena koncentrace substrátů v detekčním pufru 6. Tyto kroky vedly k detekci signálu pro pozitivní kontrolu během optimalizace.

I přes tyto úpravy nedošlo k detekci signálu u sledovaných genů. Jednou z příčin mohla být kontaminace RNázami štěpícími sondy, sledovanou mRNA, nebo obojí. Dále mohla hrát roli degradace sond v průběhu času, případně mohlo mít vliv ředění sond. Za neúspěchem mohla stát také kombinace těchto faktorů.

RNA *in-situ* hybridizace je komplikovaný proces, složený z velkého množství kroků, z nichž mnohé jsou klíčové pro její úspěch. To ji činí náročnou na provedení a komplikuje její optimalizaci. Úspěšná hybridizace bude nejspíše vyžadovat další proces optimalizace.

8 LITERATURA

- Agrobiologie. [online] [navštíveno 6.4.2023] Dostupné z https://agrobiologie.cz/SMEP3/Pestovani_rostlin_cviceni_Obilninny/etext.czu.cz/php/skripta/kapitolaf0d5.html?titul_key=81&idkapitola=4
- Baik, B.-K., Ullrich, S. E. (2008): Barley for food: Characteristics, improvement, and renewed interest. *Journal of Cereal Science*, 48(2): 233–242.
- Balandín M., Royo J., Gómez E., Muniz L. M., Molina A., Hueros G. (2005): a protective role for the embryo surrounding region of the maize endosperm, as evidenced by the characterisation of ZmESR-6, a defensin gene specifically expressed in this region. *Plant Molecular Biology*, 58(2): 269–282.
- Balounová M. (2010): Metodika křížení – ječmen, pšenice. Agrofest fyto, Kroměříž.
- Beckles D. M. (2001): a Cytosolic ADP-Glucose Pyrophosphorylase Is a Feature of Gramineous Endosperms, But Not of Other Starch-Storing Organs. *Plant Physiology*, 125(2): 818–827.
- Beneš A., Šálková T., Vaněček Z. (2011): Původ a nejstarší historie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) na Předním východě: pohled archeobotaniky. *Kvasný průmysl*, 57(5): 121-126.
- Bennett M. D., Smith J. B., Barclay I. (1975): Early Seed Development in the Triticeae. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 272(916): 199–227.
- Borisjuk L., Rolletschek H., Radchuk R., Weschke W., Wobus U., Weber H. (2004): Seed Development and Differentiation: a Role for Metabolic Regulation. *Plant Biology*, 6(4): 375–386.
- Boyer C. D., Preiss J. (1978): Multiple forms of (1 → 4)- α -d-glucan, (1 → 4)- α -d-glucan-6- glycosyl transferase from developing *zea mays* L. Kernels. *Carbohydrate Research*, 61(1): 321–334.
- Brown R. C. (1994): Endosperm Development in Barley: Microtubule Involvement in the Morphogenetic Pathway. *The Plant Cell*, 6(9): 1241–1252.
- Buttrose M. (1963): Ultrastructure of the Developing Aleurone Cells of Wheat Grain. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16(4): 768-774.
- Coen E.S., Romero J.M., Doyle S., Elliott R., Murphy G., Carpenter R. (1990): *floricaula* : a homeotic gene required for flower development in *Antirrhinum majus*. *Cell* 63: 1311-1322.
- Coleman C. E., Larkins B. A. (1999): The Prolamins of Maize. *Seed Proteins*, 109–139.
- Cosségal M., Vernoud V., Depège N., Rogowsky P. M. (2007): The Embryo Surrounding Region. Endosperm, *Plant Cell Monographs* 8: 57–71.

- Deblock M., Debrouwer D. (1993): RNA-RNA in Situ Hybridization Using Digoxigenin-Labeled Probes: The Use of High-Molecular-Weight Polyvinyl Alcohol in the Alkaline Phosphatase Indoxyl-Nitroblue Tetrazolium Reaction. *Analytical Biochemistry*, 215(1): 86–89.
- Doan D. N. P., Linnestad C., Olsen O.-A. (1996): Isolation of molecular markers from the barley endosperm coenocyte and the surrounding nucellus cell layers. *Plant Molecular Biology*, 31(4): 877–886.
- Engell K. (1989): Embryology of barley: Time course and analysis of controlled fertilization and early embryo formation based on serial sections. *Nordic Journal of Botany*, 9(3): 265–280.
- EnsemblPlants. [online] [navštíveno dne 21.2.2023] Dostupné z: <https://plants.ensembl.org/index.html>
- Evers T., Millar S. (2002): Cereal Grain Structure and Development: Some Implications for Quality. *Journal of Cereal Science*, 36(3): 261–284.
- Faris D.G. (1955): Physiol Genet of the kernel color of barley. Disertační práce. University of British Columbia, Vancouver.
- Filipowska W., Jaskula-Goiris B., Ditych M., Bustillo Trueba P., De Rouck G., Aerts G., Powell C., Cook D., De Cooman L. (2021): On the contribution of malt quality and the malting process to the formation of beer staling aldehydes: a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 127(2): 107–126.
- Freeman P. L., Palmer G. H. (1984): The Structure of the Pericarp and Testa of Barely. *Journal of the Institute of Brewing*, 90(2): 88–94.
- Gall J. G., Pardue M. L. (1969): Formation and Detection of RNA-DNA Hybrid Molecules in Cytological Preparations. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 63(2): 378–383.
- Garay-Arroyo A., Colmenero-Flores J.M., Garcarrubio A., Covarrubias A.A. (2000): Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *Journal of Biological Chemistry*, 275(8): 5668-74.
- Geng L., Li M., Zhang G., Ye L. (2022): Barley: a potential cereal for producing healthy and functional foods. *Food Quality and Safety* 6: 1-13.
- Giraldo P., Benavente E., Manzano-Agugliaro F., Gimenez E. (2019): Worldwide Research Trends on Wheat and Barley: a Bibliometric Comparative Analysis. *Agronomy*, 9(7): 352.
- Gómez E., Royo J., Guo Y., Thompson R., Hueros G. (2002): Establishment of Cereal Endosperm Expression Domains. *The Plant Cell*, 14(3): 599–610.
- GrainGenes. [online] [navštíveno 21.2.2023] Dostupné z: <https://wheat.pw.usda.gov/GG3/>

- Guan H. P., Preiss J. (1993): Differentiation of the Properties of the Branching Isozymes from Maize (*Zea mays*). *Plant Physiology* 102(4): 1269–1273.
- Hannah L. C. (2007) Starch Formation in the Cereal Endosperm. *Endosperm, Plant Cell Monographs* 8: 179-193.
- Herman E. M. (1999): Protein Storage Bodies and Vacuoles. *The Plant Cell*, 11(4): 601–614.
- Hoecker U., Vasil I. K., McCarty D. R. (1995): Integrated control of seed maturation and germination programs by activator and repressor functions of Viviparous-1 of maize. *Genes & Development*, 9(20): 2459–2469.
- Jackson D.P. (1991): *In situ* hybridisation in plants. In: D.J. Bowles, S.J. Gurr, M. McPherson (eds.): *Molecular Plant Pathology: a Practical Approach*. Oxford University Press, England.
- Jin L., Lloyd R. V. (1997): In situ hybridization: Methods and applications. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*, 11(1): 2–9.
- Jones R. L. (1969): The fine structure of barley aleurone cells. *Planta*, 85(4): 359–375.
- Keown A. C., Taiz L., Jones R. L. (1977): The Nuclear DNA Content of Developing Barley Aleurone Cells. *American Journal of Botany*, 64(10): 1248-1253.
- Larkins B. A., Dilkes B. P., Dante R. A., Coelho C. M., Woo Y., Liu Y. (2001): Investigating the hows and whys of DNA endoreduplication. *Journal of Experimental Botany*, 52(355): 183–192.
- Lifemap. [online] [navštíveno 16.4.2023] Dostupné z <https://lifemap-ncbi.univ-lyon1.fr/?tid=4513>
- Moritz L. A. (1955): Husked and “Naked” Grain. *The Classical Quarterly*, 5(3-4): 129–134.
- Nguyen H.N., Sabelli P.A., Larkins B.A. (2007): Endoreduplication and Programmed Cell Death in the Cereal Endosperm. In: Olsen O.A. (ed.): *Endosperm*, pp. 21-43, *Plant Cell Monographs*, vol 8. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Nowicka A., Kovacik M., Tokarz B., Vrána J., Zhang Y., Weigt D., Doležel J., Pecinka A. (2020): Dynamics of endoreduplication in developing barley seeds, *Journal of Experimental Botany*, 72(2): 268–282.
- MaizeGDB. [online] [navštíveno 8.4.2023] Dostupné z: <https://www.maizegdb.org/>
- McCreery T. (1997): Digoxigenin labeling. *Molecular Biotechnology*, 7(2): 121–124.
- Offler C.E., McCurdy D.W., Patrick J.W., Talbot M.J. (2003): Transfer cells: cells specialized for a special purpose. *Annual Review Plant Biology*, 54(1): 431-54.
- Olsen O.-A. (2001): Endosperm Development: Cellularization and Cell Fate Specification. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 52(1): 233–267.

- Olsen O.-A. (2004): Nuclear Endosperm Development in Cereals and *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Cell*, 16(1): S214–S227.
- Primer Map. [online] [navštíveno dne 21.2.2023] Dostupné z: https://www.bioinformatics.org/sms2/primer_map.html
- Primer 3. [online] [navštíveno dne 21.2.2023] Dostupné z: <https://primer3.ut.ee/>
- Radchuk V., Borisjuk L. (2014): Physical, metabolic and developmental functions of the seed coat. *Frontiers in Plant Science*, 5: 510.
- Reid D. A. (1985): Morphology and Anatomy of the Barley Plant. In: D.C. Rasmusson (ed.): *Barley*, pp. 73-101, Amer Society of Agronomy, Madison.
- Sabelli P.A., Larkins B.A. (2007): The Endoreduplication Cell Cycle: Regulation and Function. In: Verma D.P.S., Hong Z. (eds.): *Cell Division Control in Plants*, pp. 75-100, Springer Berlin, Heidelberg.
- Sabelli P. A., Larkins B. A. (2009): The Development of Endosperm in Grasses. *Plant Physiology*, 149(1): 14–26.
- Sabelli P. A. (2012): Replicate and die for your own good: Endoreduplication and cell death in the cereal endosperm. *Journal of Cereal Science*, 56(1): 9–20.
- Shapter F. M., Henry R. J., Lee L. S. (2008): Endosperm and starch granule morphology in wild cereal relatives. *Plant Genetic Resources: Characterization and Utilization*, 6(2), 85–97.
- Schel J. H. N., Kieft H., Lammeren A. A. M. V. (1984): Interactions between embryo and endosperm during early developmental stages of maize caryopses (*Zea mays*). *Canadian Journal of Botany*, 62(12): 2842–2853.
- Sreenivasulu N., Usadel B., Winter A., Radchuk V., Scholz U., Stein N., Weschke W., Strickert M., Close T.J., Stitt M., Graner A., Wobus U. (2008): Barley Grain Maturation and Germination: Metabolic Pathway and Regulatory Network Commonalities and Differences Highlighted by New MapMan/PageMan Profiling Tools. *Plant Physiology*, 146 (4): 1738–1758.
- Sreenivasulu N., Borisjuk L., Junker B. H., Mock H.-P., Rolletschek H., Seiffert U., Weschke W., Wobus, U. (2010): Barley grain development: toward an integrative view. In: Jeon K, (ed.): *International review of cell and molecular biology*, pp. 49-89, Elsevier Inc., Amsterdam.
- Stacy R.A., Nordeng T.W., Culiáñez-Macià F.A., Aalen R.B. (1999): The dormancy-related peroxiredoxin anti-oxidant, PER1, is localized to the nucleus of barley embryo and aleurone cells. *The Plant Journal*, 19(1): 1-8.
- Statista. [online] [navštíveno 6.4.2023] Dostupné z <https://www.statista.com/statistics/271973/world-barley-production-since-2008/>

- Šašková D. (1993): Trávy a obilí. Artia, Granit, Praha.
- Tian Q., Olsen L., Sun B., Lid S. E., Brown R. C., Lemmon B. E., Fosnes K., Gruis D. F., Opsahl-Sortebiers H.-G., Otegui M. S., Olsen, O.-A. (2007): Subcellular Localization and Functional Domain Studies of DEFECTIVE KERNEL1 in Maize and *Arabidopsis* Suggest a Model for Aleurone Cell Fate Specification Involving CRINKLY4 and SUPERNUMERARY ALEURONE LAYER1. *The Plant Cell*, 19(10): 3127–3145.
- Tm Calculator NEB. [online] [navštíveno dne 21.2.2023] Dostupné z: <https://tmcalculator.neb.com>
- Wu MF., Wagner D. (2012): RNA In Situ Hybridization in Arabidopsis. In: Jin H., Gassmann W. (eds.): RNA Abundance Analysis, pp. 75-86, Humana Press, Totowa, NJ.
- Yao Y., Thompson D. B., Guiltinan M. J. (2004): Maize Starch-Branching Enzyme Isoforms and Amylopectin Structure. In the Absence of Starch-Branching Enzyme IIb, the Further Absence of Starch-Branching Enzyme Ia Leads to Increased Branching. *Plant Physiology* 136(3): 3515–3523.
- Young A.P., Jackson D.J., Wyeth R.C. (2020): a technical review and guide to RNA fluorescence in situ hybridization. *PeerJ* 8: e8806.
- Young T.E., Gallie D.R. (1999): Analysis of programmed cell death in wheat endosperm reveals differences in endosperm development between cereals. *Plant Molecular Biology* 39: 915–926.
- Young T. E., Gallie D. R. (2000a): Programmed cell death during endosperm development. *Plant Molecular Biology*, 44: 283-301.
- Young T.E., Gallie D.R. (2000b): Regulation of programmed cell death in maize endosperm by abscisic acid. *Plant Molecular Biology* 42: 397–414.
- Zölner N. R., Bezruczyk M., Laureyns R., Nellisen H., Simon R., Frommer W. B. (2021): An RNA in situ hybridization protocol optimized for monocot tissue. *STAR protocols*, 2(2): 100398.