

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Molekulárně genetická charakterizace transgenních
linií ječmene s vyřazenými geny pro mitogenem
aktivované proteinkinázy a jejich imunitní odpověď na
flg22**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Elizaveta Chubar
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biotechnologie a genové inženýrství
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Pavel Křenek, Ing. Ph.D.
Rok:	2020

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

V Olomouci dne

.....

Poděkování:

Nejprve bych ráda poděkovala vedoucímu mé práce Ing. Pavlu Křenkovi Ph.D. za neocenitelnou pomoc při zpracování této práce, pochopení a trpělivost a také všem členům oddělení buněčné biologie CRH za poskytnuté možnosti. Dále bych chtěla také poděkovat mé rodině za podporu. Práce byla podpořena projekty GA_PrF_2019_011 a IGA_PrF_2020_025.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora Elizaveta Chubar

Název práce Molekulárně genetická charakterizace transgenních linií ječmene s vyřazenými geny pro mitogenem aktivované proteinkinázy a jejich imunitní odpověď na flg22

Typ práce Diplomová

Pracoviště Centrum regionu Haná

Vedoucí práce Ing. Pavel Křenek, Ph.D.

Rok obhajoby práce 2020

Abstrakt

V předkládané práci byly charakterizovány transgenní linie ječmene setého odrůdy Golden Promise s CRISPR/Cas9 mutovaným genem pro mitogenem aktivovanou proteinkinásu 6 HvMPK6 (*HvMPK6-KO*) a s TALENem vyřazeným genem pro mitogenem aktivovanou proteinkinásu 3 HvMPK3 (*HvMPK3-KO*). Nejprve bylo genotypováno pomocí sekvenování 121 jedinců T2 potomstva *HvMPK6-KO* linie. V rámci této analýzy bylo identifikováno 58 jedinců divokého typu a 63 jedinců mutovaných v cílové oblasti třetího exonu *HvMPK6* genu, přičemž žádný z mutovaných jedinců nebyl homozygot v mutaci v *HvMPK6* genu. Bližší analýza 51 mutovaných jedinců ukázala, že se jedná o heterozygoty tvořené knock-out *HvMPK6* alelou a *HvMPK6* alelou divokého typu. Dohromady tyto výsledky naznačují, že homozygotní (posunové) mutace v *HvMPK6* genu způsobují letalitu nebo embryo-letalitu. Dále byla studována role *HvMPK3* v regulaci exprese genů spojených s patogenezí (*PR*). Exprese *PR* genů byla indukována v kořenech *HvMPK3-KO* a kontrolních linií působením 1 μ M flg22 po dobu 6 hodin. Nebyl pozorován rozdíl v míře indukce exprese *PR* genů mezi *HvMPK3-KO* a kontrolními liniemi.

Klíčová slova *Hordeum vulgare*, mitogenem aktivovaná proteinkináza, CRISPR/Cas9, letalita, flg22

Počet stran 67

Jazyk Český

Bibliographical identification

Author's first name and surname Elizaveta Chubar

Title Molecular genetics characterization of transgenic barley lines with disrupted genes for mitogen-activated protein kinases and their immune response to flg22

Type of thesis Diploma

Department Centrum of the Region Haná

Supervisor Ing. Pavel Křenek, Ph.D.

The year of presentation 2020

Abstract

Transgenic barley lines of variety Golden Promise with CRISPR/Cas9-mutated gene for mitogen-activated protein kinase 6 *HvMPK6* (*HvMPK6-KO*) and with TALEN-disrupted gene for mitogen-activated protein kinase 3 *HvMPK3* (*HvMPK3-KO*) were characterized in the present thesis. Initially, 121 T2 progenies of *HvMPK6-KO* line were genotyped by sequencing. By means of this analysis, 58 wild type (wt) and 63 individuals mutated in the target region of *HvMPK6* gene were identified. However, none of the mutated individuals was homozygous for the mutation in *HvMPK6* gene. More detailed analysis of 51 mutated individuals showed they were heterozygotes comprised of a knock-out *HvMPK6* allele and a wt *HvMPK6* allele. Taking together this results indicate that homozygous (frame-shift) mutations in *HvMPK6* gene cause lethality or embryo-lethality in barley. Furthermore, the role of *HvMPK3* in the regulation of pathogenesis related (*PR*) genes expression was studied. Expression of *PR* genes was induced by six-hour treatment of the roots of *HvMPK3-KO* and control lines with 1 μ M flg22. There was no difference observed in the induction of *PR* genes expression between *HvMPK3-KO* and control lines.

Keywords *Hordeum vulgare*, mitogen-activated protein kinase, CRISPR/Cas9, lethality, flg22

Number of pages 67

Language Czech

OBSAH

1 ÚVOD	1
2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1 Imunita spouštěná vzorci (PTI) a imunita spouštěná efektry (ETI) rostlin	3
2.1.1 Úvod	3
2.1.2 S patogeny asociované molekulární vzory (PAMP), s mikroby asociované molekulární vzory (MAMP) a jejich účast na rostlinné imunitě	3
2.1.3 Příklady imunitních receptorů, vzorů a efektorů patogenů	5
2.1.3.1 Úvod	5
2.1.3.2 Druhy a struktury receptorů	5
2.1.4 Detekce flagelinu rostlinou a reakce na něj	7
2.1.5 Detekce chitinu rostlinou a reakce na něj	8
2.1.6 Křížová signalizace mezi FLS2-BAK1 a LYK5-CERK1	9
2.1.7 Aktivace MAPK spuštěná pomocí PAMP/MAMP	9
2.2 Místně specifické nukleázy a cílené editace genomu	10
2.2.1 Úvod	10
2.2.2 Editace genomu pomocí nukleáz s doménami se zinkovými prsty (ZFN)	11
2.2.3 Editace genomu pomocí efektorových nukleáz podobných transkripčním aktivátorům (TALEN)	12
2.2.4 Editace genomu pomocí segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR/Cas9)	13
3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	16
3.1 Materiály a metody	16
3.1.1 Chemikálie a přístroje	16
3.1.2 Roztoky	18
3.1.3 Rostlinný materiál	22
3.1.4 Izolace genomické DNA z listů ječmene	23
3.1.5 Standardní polymerázová řetězová reakce (PCR) pro amplifikaci třetího exonu <i>HvMPK6</i> genu, cílové oblasti CRISPR/Cas9	24
3.1.6 Gelová elektroforéza	24
3.1.7 Purifikace a sekvenace PCR produktů získaných amplifikací třetího exonu <i>HvMPK6</i> genu s cílem detekce indukovaných mutací	25
3.1.8 Genotypování transgenních rostlin pomocí Multiplex TaqMan Real-Time PCR	26
3.1.9 Klonování PCR produktů získaných amplifikací třetího exonu <i>HvMPK6</i> genu v <i>Escherichia coli</i>	27
3.1.10 Ošetření kořenů <i>HvMPK3_KO</i> a kontrolních rostlin ječmene bakteriálním elicitorem flg22 .	28
3.1.11 Izolace celkové RNA z kořenů ječmene	29
3.1.12 Syntéza cDNA	30
3.1.13 Kvantifikace exprese genů souvisejících s patogenezí (<i>PR</i> genů) a <i>HvMPK3</i> genu pomocí Real-Time PCR (qRT-PCR)	30
4 VÝSLEDKY	32
4.1 Molekulárně genetická charakterizace T2 potomstva transgenní linie <i>HvMPK6-KO</i>	32
4.2 Exprese genů asociovaných s patogenezí (<i>PR</i>) v kořenech <i>HvMPK3-KO</i> a kontrolních rostlin ječmene po ošetření flg22	41
5 DISKUSE	46
6 ZÁVĚRY	49

7 LITERATURA	50
8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK	58

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- 1) Příprava literární rešerše na téma role mitogenem aktivovaných proteinkinás (MAPK) v imunitě spouštěné molekulárními vzory (PAMP) u jednoděložných a dvouděložných rostlin.

Experimentální část:

- 1) Molekulárně genetická charakterizace *HvMPK6* knock-out transgenních linií ječmene připravených pomocí CRISPR/Cas9 technologie.
- 2) Kvantifikace exprese genů spojených s patogenezí u kontrolních a *HvMPK3* knock-out transgenních linií ječmene po ošetření bakteriálním elicitorem flg22.

1 ÚVOD

Během svého života jsou rostliny nuceny koexistovat s obrovským a rozmanitým světem mikroorganismů, kde některé z nich poškozují jejich zdraví. Proto jejich přežití závisí na jejich schopnosti rozpoznat a reagovat na patogeny. Tento úkol komplikuje nepohyblivý životní styl. Rostliny však získaly řadu funkcí, které se vyvinuly během evoluce. Jednou z těchto funkcí je složitý a rozmanitý imunitní systém, který umožňuje včas rozpoznat patogena a aktivovat ochranný systém. Tento systém se skládá ze speciálních mechanismů pro přizpůsobení se měnícím podmínkám prostředí a odolnosti vůči vnějším stresovým faktorům.

Imunita rostlin to je úplná nebo částečná odolnost jedince vůči infekčním částicím a cizím látkám, které způsobují poškození rostlinných buněk a pletiv. Rostliny jsou v přírodě imunní vůči většině potenciálních patogenních mikroorganismů (odolnost vůči chorobám, které nejsou kompatibilní s příslušným rostlinným druhem) a mají schopnost snížit závažnost onemocnění, pokud jsou kompatibilní s patogenem. Studie ukázaly, že ochrana rostlinného organismu před účinky patogenu je determinována fungováním víceúrovňového imunitního systému, který se skládá z různých struktur a mechanismů specifické a nespecifické imunity. Rozpoznání konzervativních s patogeny asociovaných molekulárních vzorů (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) prostřednictvím membránových rostlinných receptorů, a také molekul vznikajících při poškození buněčné stěny hostitele pomocí hydrolytických enzymů patogenu, určuje nespecifickou imunitu rostliny. Zatímco efektorové molekuly patogenu jsou rozpoznávány intracelulárními receptory rostliny, což vyvolává specifickou imunitu, která vede k vývoji hypersenzitivní reakci, systémové rezistenci a rostlinné imunitní paměti. Faktory virulence a strategie napadení patogenů na jedné straně a mechanismy imunitního systému rostliny na straně druhé jsou výsledkem neustálého vývoje, který se podobá „závodům ve zbrojení“ mezi protilehlými stranami.

Ne všechny vazby a úseky cesty, které určují utváření imunity rostlin, jsou však podrobně studovány. Proto bylo provedeno mnoho studií zaměřených na podrobnější výzkum těchto otázek. Pochopení podstaty vztahu mezi rostlinami a mikroorganismy z pohledu interakce různých úrovní imunity rostlin může být praktické, protože umožňuje vyvinout nové imunologické přístupy k preventivním opatřením v boji proti chorobám rostlin.

Jedním z nástrojů pro vylepšení rostlinné imunity rostlin je editace genomu. Ke

změnám v genomech živých organismů dochází neustále a určuje průběh jejich evoluce. Člověk do těchto procesů začal zasahovat před tisíci lety, vybíral úspěšně pěstované rostliny a choval domácí zvířata. Genetické inženýrství, které vzniklo před více než půlstoletím, umožnilo vytvořit transgenní organismy, tj. přenášet geny mezi genomy nebo je manipulovat v rámci jednoho genomu. Před více než 30 lety bylo navrženo použití molekulárních (DNA) markerů ve šlechtění a dnes jsou DNA markery široce rozšířeným pomocným nástrojem při selekci rostlin na mono- nebo oligogenní znaky.

V souvislosti se studiem imunity rostlin může cílená editace genomu poskytnout vhodný nástroj pro úpravy genů zapojených v imunitní odpovědi. To může ve výsledku vést k modifikovaným rostlinám, které mohou mít zlepšenou odolnost vůči patogenům, chorobám nebo nepříznivým podmínkám prostředí.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Imunita spouštěná vzorci (PTI) a imunita spouštěná efektry (ETI) rostlin

2.1.1 Úvod

Vývoj studií vztahů mezi rostlinami a patogeny začal tím, že v polovině 20. století byl navržen koncept interakce „gen proti genu“, podle kterého jsou vztahy v tomto systému geneticky určovány (Flor, 1947). Princip rozpoznávání vzorů (Pattern Recognition Principle) byl definován později; uvádí, že mnohobuněčné organismy mají schopnost rozpoznávat konzervativní molekulární vzory, které jsou přítomny ve specifických typech mikroorganismů (Janeway a Medzhitov, 2002). Toto rozpoznání je zajištěno pomocí receptorů lokalizovaných na plazmatické membráně, které rozpoznávají „cizí“ molekulární struktury, které jsou přítomny v patogenech, ale v hostitelské rostlině chybí (Kamoun, 2001; Thordal-Christensen, 2003; Boller a Felix, 2009). Molekuly rozpoznávané těmito receptory jsou rozděleny do několika typů. Patří sem: s patogeny asociované molekulární vzory (pathogen-associated molecular patterns, PAMP) a s mikroby asociované molekulární vzory (mikrobe-associated molecular patterns, MAMP). (Boller a Felix, 2009; Monaghan a Zipfel, 2012). Kromě toho existují s poškozením asociované molekulární vzory (damage-associated molecular patterns, DAMP), což jsou molekuly (části buněčné stěny nebo fragmenty kutikuly) uvolněné hostitelskou rostlinou po napadení (Dodds a Rathjen, 2010).

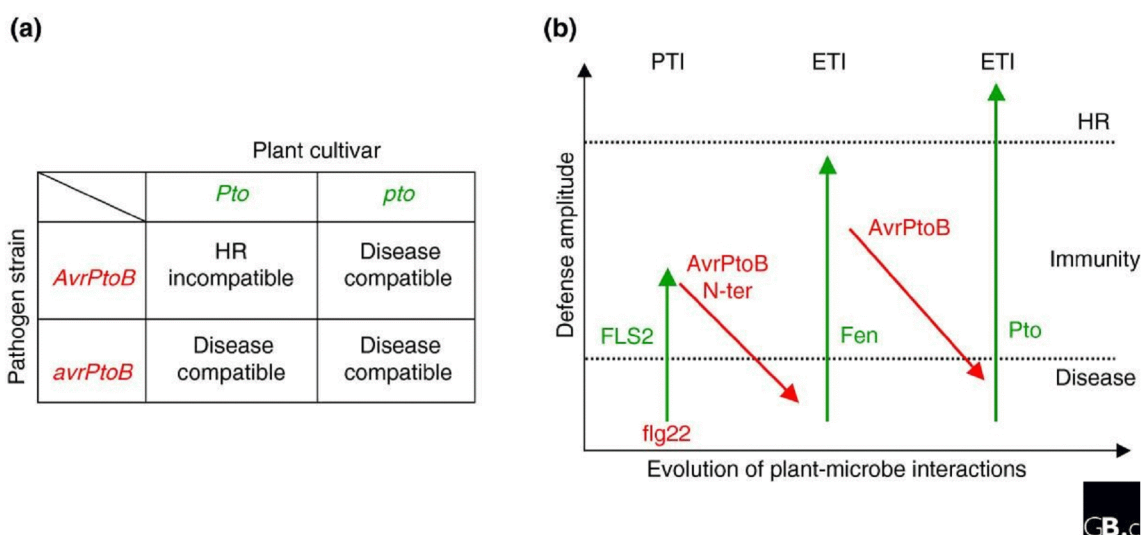
2.1.2 S patogeny asociované molekulární vzory (PAMP), s mikroby asociované molekulární vzory (MAMP) a jejich účast na rostlinné imunitě

PAMP a MAMP jsou konzervativní struktury jedinečné pro každou třídu mikroorganismů. Například pro bakterie je to flagellin a pro houby fragmenty chitinu (Dow *et al.*, 2000; Naito *et al.*, 2008; Hayafune *et al.*, 2014).

Rozdíl mezi PAMP a MAMP je v tom, že PAMP označuje molekulární vzory patřící k potenciálně patogenním mikroorganismům. Ale protože tyto molekulární vzory jsou také přítomny v neutrálních organismech, byl tento koncept rozšířen na MAMP (s mikroby asociované molekulární vzory) (Staal a Dixelius, 2007). Výsledkem „rozpoznání“ těchto vzorů je aktivace řady ochranných reakcí nespecifické imunity rostlin (imunita spouštěná vzorci, PTI). Jako například tvorba reaktivních forem kyslíku (ROS) a dusíku (NO), syntéza fytoalexinu, lignifikace buněčných stěn, ukládání kalózy a další (Huitema *et al.*, 2003; Liu a Zhang, 2004; Ren *et al.*, 2008a; Wang *et al.*, 2013).

Vývoj patogenů zaměřený na překonání PTI vedl ke vzniku látek zvaných efektorů. Jsou to produkty avirulenčních (*Avr* genů). Kromě samotných efektorů vyvinuli patogeni také různé systémy pro jejich transport přímo do rostlinné buňky (Grant *et al.*, 2006). Prostřednictvím těchto systémů jsou efektorů dodávány do cytoplazmy bez detekce senzorů, receptorů umístěných na povrchu buněk, které zodpovídají za PTI reakci (Grant *et al.*, 2006). Postupem času rostliny vyvinuly prostředky pro ovládání efektorů, jmenovitě rezistentní geny, *R* geny, z nichž většina kóduje intracelulární nebo cytoplazmatické receptory typu NB-LRR (Mindrinos *et al.*, 1994; Whitham, 1995). Rozpoznávají proteinový efektor, což vede k aktivaci druhé úrovně imunity - specifické (imunita spouštěná efektorů, ETI). ETI implementuje interakci gen proti genu; to znamená, že pro každý specifický proteinový efektor existuje jemu odpovídající komplementární NB-LRR receptor. Tyto interakce byly shrnuty jako „zigzag“ model (Jones a Dangl, 2006). Tento model doplňuje klasickou teorii „genu proti genu“ a zdůrazňuje neustálé evoluční přizpůsobení hostitelské rostliny a patogenního mikroorganismu během jejich vztahu (obr. 1).

Dlouho se věřilo, že PTI a ETI jsou dva samostatné typy imunity, které se liší v závislosti na rozpoznané molekule patogenu (Jones a Dangl, 2006). Nedávno se však objevily studie, které ukazují, že PTI a ETI mají do značné míry překrývající se signální dráhy a odpovědi (Qi *et al.*, 2011; Thomma *et al.*, 2011; Hatsugai *et al.*, 2017). A



Obr. 1 Klasické a moderní představy o interakcích mezi rostlinami a mikroby (Robatzek a Saijo, 2008). (a) Model gen proti genu navržený Florem v roce 1946 je ilustrován pomocí interakcí *Pseudomonas syringae* *AvrPtoB* a *Pto* rajče. (b) Model „Zigzag“, který navrhli Jonathan Jones a Jeffrey Dungle v roce 2006. Senzibilizace PAMP receptoru rozpoznávajícího vzor aktivuje PTI. Patogen pak vylučuje efektor, který inhibuje PAMP a tím PTI. Dále rostlina aktivuje ETI prostřednictvím syntézy *R* genu *Fen*.

signály, které pocházejí z virů, bakterií, hub nebo oomycet, zpočátku vyvolávají obecnou obrannou odpověď.

To znamená, že PTI a ETI jsou integrální úrovně imunity, které jsou stejně důležité pro vnímání a reakci na signály nebezpečí. Výsledkem takové aktivace imunity, a to jak na úrovni PTI, tak na úrovni ETI, může být vývoj systémové rezistence, která poskytuje dlouhodobou ochranu celé rostliny před širokým souborem patogenů (Durrant a Dong, 2004). Rostliny také mohou tvořit mechanismy tvorby imunitní paměti (trans-generational immune memory), tj. účinek stresu na generaci rodičů může vést k adaptaci na stejný stresový faktor u jejich potomků (Slaughter *et al.*, 2012; Fu a Dong, 2013).

2.1.3 Příklady imunitních receptorů, vzorů a efektorů patogenů

2.1.3.1 Úvod

Na začátku interakce s rostlinou musí mikroorganismus překonat faktory konstitutivní rezistence rostlin, jaké jsou vosková vrstva, tvrdá buněčná stěna a ochranné sloučeniny, včetně lipidů, antimikrobiálních enzymů a sekundárních metabolitů, jako je sulforaphan (4-methylsulfinylbutyl isothiocyanát) v *Arabidopsis thaliana* (Agrios, 1997; Fan *et al.*, 2011). Další ochrannou bariérou proti patogenu je nespecifický rostlinný imunitní systém PTI, k překonání kterého musí patogen buď zabránit rozeznání rostlinou nebo potlačit aktivaci ochranných reakcí hostitele. PTI může mít za následek přecitlivělostí reakci (hypersensitivity reaction, HR), což představuje lokalizovanou buněčnou smrt, což v konečném důsledku omezuje invazi patogenu (Naito *et al.*, 2007).

MAMP jsou rozpoznávány receptory pro rozpoznávání speciálních vzorů (pattern recognition receptor, PRR) na buněčném povrchu (Nicaise *et al.*, 2009). K překonání imunity vyvolané MAMP/PAMP a následné infekci, používají patogeny dva přístupy: za prvé únik detekci, tzv. „maskování“, a za druhé může narušení pochodů v hostiteli (He *et al.*, 2006). Kromě toho za účelem podpory virulence produkují patogeny efektorové molekuly, které snižují nebo inhibují účinky odpovědi na MAMP, což činí například houba *Magnaporthe oryzae*, která překonává první linii obrany rostlin vylučováním efektorového proteinu Slp1 (sekretovaný protein LysM1) při infekci rýže (Mueller *et al.*, 2013; Mentlak *et al.*, 2012). Rozpoznání efektoru se provádí produkty specifických genů rezistence (*R*), což vede k ETI, která je obvykle doprovázena HR (Jones *et al.*, 2006; Cui *et al.*, 2015).

2.1.3.2 Druhy a struktury receptorů

PRR, které specificky rozpoznávají MAMP, zahrnují kinázy podobné receptorům (RLKs), proteiny podobné receptorům (RLP) a PRR s LysM doménami (LysM) (Gust *et al.*, 2012; Dangl *et al.*, 2013). Rostlinné genomy obsahují obrovské množství kódovaných PRR, jmenovitě přibližně 410 RLK a 170 RLP v *Arabidopsis* a 640 RLK a 90 RLP v rýži (Shiu *et al.*, 2004; Fritz-Laylin *et al.*, 2005).

První největší skupina je RLK, což jsou transmembránové receptory, které jsou lokalizovány v plazmatické membráně a skládají se z domény vázající ligand, transmembránové domény a intracelulární serin/threonin kinasové domény. Charakteristickým rysem RLK je přítomnost N-terminální domény s repeticí bohatou na leucin (LRR), která se podílí rozpoznání MAMP (Fritz-Laylin *et al.*, 2005; Couch *et al.*, 2006; Dodds a Rathjen, 2010).

Druhou největší skupinou po RLK jsou receptory RLP. Obsahují pouze extracelulární a membránové domény (Wang *et al.*, 2008). Protože postrádají intracelulární aktivační doménu, potřebují k přenosu signálu interakci s molekulami adaptéru. V důsledku této interakce se ligand váže na receptor. To přispívá ke změně konformace molekuly receptoru, což jí zase umožňuje přenášet přijímaný signál dále. Protože molekuly receptorových kináz jsou docela mobilní, mohou rychle a snadno vytvářet dimerní komplexy. V důsledku konvergence obou receptorů se aktivují kinázová centra a molekuly receptorů se začnou navzájem fosforylovat podle zbytků serinu a threoninu v oblasti tohoto centra. V důsledku této fosforylace se vytvoří platforma, která je základem pro interakci s následujícími složkami signálního řetězce (Kruijt *et al.*, 2005).

U LysM PRR je transmembránová oblast představována α -helixem. Cytoplazmatická doména, která je umístěná na C-konci, obsahuje kinasový fragment, ve kterém k autofosforylaci zbytků serinu a threoninu dochází při tvorbě dimerního komplexu v důsledku aktivace receptoru ligandem (Miya *et al.*, 2007).

V současné době je známo velké množství patogenních molekulárních struktur a jim odpovídajících receptorů, ale pouze několik z nich bylo studováno podrobněji než ostatní. Jedná se o flagellin a konkrétně jeho peptid flg22, EF-Tu (elongační faktor Tu) a oligosacharidy z buněčných stěn hub, zejména chitin (Felix *et al.*, 1999; Miya *et al.*, 2007; Takai *et al.*, 2008). Rozpoznání těchto látek rostlinami je dosaženo pomocí specifických PRR, FLS2 pro flagellin, EFR pro EF-Tu a několika receptorů pro chitin. Jiné MAMP a receptory jsou méně studovány a ne vždy je znám MAMP a současně příslušný receptor. Mezi MAMP u nichž není známý receptor patří například

lipopolysacharidy (LPS) a protein studeného šoku (CSP22) (Felix a Boller, 2003; Erbs a Newman, 2012). Mezi receptory s neznámými MAMPs patří XA21 a XA3/XA26, které poskytují odolnost vůči bakterie *Xanthomonas oryzae* (Song *et al.*, 1995; Sun *et al.*, 2004; Bahar *et al.*, 2014).

2.1.4 Detekce flagelinu rostlinou a reakce na něj

Flagelin je hlavním strukturním proteinem bičíku bakterií. A flg22 je jeho součástí. Jedná se o peptid z 22 aminokyselinových zbytků, který se nachází v nejkonzervativnější části N-oblasti flagelinu (Felix *et al.*, 1999; Chinchilla *et al.*, 2006). Tento peptid je dostatečný k vyvolání imunitní odpovědi rostlin a začíná působit jako silný elicitor už při subnanomolárních koncentracích (Felix *et al.*, 1999). U *Arabidopsis* flg22 způsobuje tvorbu kalózy, akumulaci ochranného proteinu PR1, rychlý nárůst cytosolické hladiny Ca^{2+} , produkci extracelulárního ROS a silnou inhibici růstu semenáčků (Gómez-Gómez *et al.*, 1999; Seybold *et al.*, 2014; Keinath *et al.*, 2015).

FLS2 (FLAGELLIN-SENSITIVE 2) byl identifikován studiem genomu *Arabidopsis thaliana* a kóduje LRR receptorovou kinázu (LRR-RK) (Gómez-Gómez a Boller, 2000). FLS2 je umístěn na plazmatické membráně (Zipfel *et al.*, 2006). Experimenty s použitím heterologní exprese receptoru FLS2 z *A. thaliana* v buňkách rajčete prokázaly, že FLS2 nese vazebné místo pro flg22, a je tedy receptorem pro jeho vnímání (Chinchilla *et al.*, 2006).

Orthology FLS2 jsou přítomny v genomech všech vyšších rostlin, které byly dosud analyzovány. Přímý důkaz funkčnosti receptoru FLS2 byl získán pro jeho orthology u rajčat, tabáku, *Nicotiana benthamiana* a rýže (Hann *et al.*, 2007; Heese *et al.*, 2007; Robatzek *et al.*, 2007; Takai *et al.*, 2008). Rýže vnímá některé bičíkové monomery bakterie *Pseudomonas avenae* dalšími způsoby, založenými na posttranslačních modifikacích závislých na kmeni (Che *et al.*, 2000).

Při interakci s bakteriemi je kinásová doména receptoru FLS2 rychle fosforylována v důsledku rozpoznání flg22 beze změny konformace, a poté se fosforylovaný FLS2 okamžitě váže na kinásový receptor BAK1 (brassinosteroidní insenzitivní 1 (BRI1) kináza) (Chinchilla *et al.*, 2007; Sun *et al.*, 2007). BAK1 (SERK3) je receptorová LRR kináza *A. thaliana* (Heese *et al.*, 2007). Patří do rodiny proteinových kinás LRR II, která má 14 členů (Shiu a Bleecker, 2003). BAK1 a jeho homology fungují jako coreceptory v přenosu MAMP signálů a jsou důležité pro imunitu rostlin (Heese *et al.*, 2007). Důležitou funkci BAK1 potvrzuje skutečnost, že tato kináza často slouží jako cíl pro

efektory určitých patogenů, například AvrPto a AvrPtoB (Shan et al, 2008). Když je BAK1 inhibován těmito efekty, je inhibována PTI. V nestimulovaných buňkách mohou být FLS2 a BAK1 lokalizovány společně, ale netvoří pevný komplex. Po ošetření flg22 se však tento komplex vytvoří méně než za 2 minuty (Chinchilla *et al.*, 2007). Současně FLS2 mění konformaci, což jí umožňuje kontaktovat BAK1. Interakce ektodomén FLS2 a BAK1 také vede ke kontaktu intracelulárních kinásových domén, což umožňuje iniciovat transdukcii intracelulárního signálu v důsledku transfosforylačních událostí. Výsledkem je komplex FLS2/BAK1. Tato interakce je funkčně důležitá, protože rostliny *Arabidopsis thaliana* nesoucí *bak1* mutaci vykazují výrazně snížené odpovědi na flg22 a elf18 (Chinchilla *et al.*, 2007).

Tento komplex pak interaguje s BIK1 kinásou (botrytis-indukovaná kináza 1) (Lu *et al.*, 2010). BAK1 přímo fosforyluje BIK1 na zbytcích tyrosinu a serinu/threoninu, což vede k jeho konformačním změnám, a nakonec se fosforylovaný BIK1 uvolní pro aktivaci následných signálů (Lin *et al.*, 2014).

Existuje také další MAMP odvozený od flagelinu, jmenovitě flgII-28. Tento peptid není detekován FLS2 (Clarke *et al.*, 2013). Místo toho je vnímán PRR receptorem FLS3. Vyskytuje se pouze u lilkovitých, mezi které patří rajčata a brambory. FLS3 rozpoznává peptid flgII-28, který u brambor vyvolává silnější reakci než flg22. (Hind *et al.*, 2016; Moroz a Tanaka, 2020).

2.1.5 Detekce chitinu rostlinou a reakce na něj

Dalším důležitým PAMP je chitin. Tento polysacharid je hlavní složkou buněčné stěny hub a je také přítomen v exoskeletech korýšů a hmyzu (Lee *et al.*, 2008; Muzzarelli, 2013).

Po aktivaci PRR chitinem, dochází ke změnám v biosyntéze hormonů a stěny rostlinných buněk jsou posíleny kalózou (Macho *et al.*, 2014). U *A. thaliana* je chitin rozpoznán receptorem LysM-RLK CERK1/RLK1/LYK1 prostřednictvím třech extracelulárních LysM domén, které se přímo vážou na oligomery chitinu (Miya *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2012). Na rozdíl od flg22 není rozpoznání chitinu a signalizace prostřednictvím receptoru CERK1 spojena s SERK3/BAK1 (Shan *et al.*, 2008; Kemmerling *et al.*, 2011).

Mnoho studií *A. thaliana* považovalo za hlavní rozpoznávací receptor chitinu CERK1 (CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1), který zprostředkovává signalizaci indukovanou chitinem prostřednictvím homodimerizace a fosforylace (Miya

et al., 2007; Liu *et al.*, 2012). Vazebná afinita chitinu k (At)CERK1 je však poměrně nízká, a proto byla provedena studie, která prozkoumala (At)LYK5. Ten má vyšší afinitu k chitinu než AtCERK1, v důsledku čehož je (At)LYK5 považován za hlavní chitinový receptor *A. thaliana* (Cao *et al.*, 2014). Kromě toho je LYK5 (a v menší míře jeho nejbližší homolog LYK4) geneticky nezbytný pro citlivost na chitin a tvoří komplex závislý na chitinu s CERK1 (Wan *et al.*, 2012; Cao *et al.*, 2014).

Rýže obsahuje kromě samotného CERK1 receptoru také protein obsahující LysM doménu označovaný jako protein vázající chitinový-elicitor (CEBiP). Jako doplněk k CERK1 je nezbytný pro vnímání a přenos chitinového signálu (Shimizu *et al.*, 2010). Obdobně aktivovaná CERK1 fosforyluje RLCK PBL27 protein, který pak přímo aktivuje MAPK kaskády asociované s imunitou, respektive MAPKKK5. (Yamada *et al.*, 2016).

2.1.6 Křížová signalizace mezi FLS2-BAK1 a LYK5-CERK1

Po dlouhou dobu se věřilo, že signály flg22 a chitinu byly vnímány a přenášeny dvěma komplexy FLS2-BAK1 a LYK5-CERK1, které vzájemně neinteragují. V nedávné studii však bylo zjištěno, že u *A. thaliana* dochází ke křížové signalizaci mezi těmito komplexy, která spouští lokální a krátkodobý křížový imunitní priming (Gong *et al.*, 2019).

2.1.7 Aktivace MAPK spuštěná pomocí PAMP/MAMP

Jedním z buněčných procesů po přijetí signálu detekce flg22 a chitinu je aktivace MAPK (mitogenem aktivovaná proteinová kináza). U *A. thaliana* jsou flg22 a chitinem aktivovány MPK3, MPK6, MPK4 a MPK11, přičemž aktivace je silná, ale krátkodobá. (Asai *et al.*, 2002; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Bethke *et al.*, 2012). MAPK kaskády pak přímo aktivuje uvolněný BIK1 (Ren *et al.*, 2008b).

Tyto kaskády jsou nezbytné pro nespecifickou imunitu rostlin (Tena *et al.*, 2011). Přenášejí signály z membránových receptorů do jádra a cytoplazmy, čímž aktivují obranné reakce. Typický MAPK modul se skládá ze tří typů proteinových kinás: MAPK kináza kináza (MAPKKK) fosforyluje a aktivuje MAPK kinázu (MAPKK), která zase fosforyluje a aktivuje MAPK (Pedley a Martin 2005; Colcombet a Hirt 2008).

U *Arabidopsis thaliana* existují alespoň dvě MAP kinasové dráhy, které jsou aktivovány MAMP. Jedna signální kaskáda zahrnuje MEKK1, dále pak ve směru přenosu signálu MKK1/MKK2 a dále MPK4 (Ichimura *et al.*, 2002; Ichimura *et al.*,

2006; Suarez-Rodriguez *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2008; Qiu *et al.*, 2008). V neaktivní formě existuje MPK4 v buňce jako jaderný komplex s transkripčním faktorem WRKY33 (Andreasson *et al.*, 2005). Substrátem tohoto komplexu je 1 MAP kináza (MKS1). Senzibilizace Flg22 vede k aktivaci MPK4, která fosforyluje substrátový protein MKS1, což vede k disociaci komplexu MKS1-WRKY33 od MPK4 (Qiu *et al.*, 2008). Celá událost následně vede k translokaci WRKY33 do jádra, kde se WRKY33 váže se na promotor *PAD3* a zvyšuje jeho expresi. *PAD3* kóduje enzym cytochrom p450 nezbytný pro biosyntézu camalexinu, jednoduchého indolového alkaloidu, který pomáhá imunitě rostliny (Qiu *et al.*, 2008). Transkripční represor ASR3 byl také identifikován jako substrát MPK4, který moduluje transkripci obranných genů (Li *et al.*, 2015).

Druhá signální kaskáda zahrnuje MAPKKK5, dále pak ve směru přenosu signálu MAPK kinázy MKK4/MKK5 a dále MPK3/MPK6, (Asai *et al.*, 2002; Bi *et al.*, 2018; Sun *et al.*, 2018). Na rozdíl od MPK4, MPK6 přímo fosforyluje WRKY33, který stimuluje aktivitu exprese *PAD3* (Mao *et al.*, 2011). MAPKKK5 také reguluje aktivaci MAPK indukovanou chitinem (Yamada *et al.*, 2016). MPK3 v reakci na flg22 fosforyluje a aktivuje transkripční faktor VIP1, který po aktivaci translokuje z cytoplazmy do jádra. Pokud se VIP1 váže na promotory genů *Trxh8* a *MYB44*, což vede to k zvýšené expresi těchto obranných genů (Pitzschke *et al.*, 2009).

Aktivace MAPK kaskády vede k mnoha obranným reakcím. Patří sem např. syntéza a/nebo signalizace hormonů modulujících imunitu jako jsou ethylen a kyselina jasmonová (JA) (Takahashi *et al.*, 2007; Han *et al.*, 2010). Aktivace *A. thaliana* MPK3/MPK6 vede k transkripční aktivaci mnoho genů souvisejících s obranou odpovědí (Su *et al.*, 2011). Kromě toho MAPK reagující na PAMP stimulují produkci ROS a regulují uzavírání stomat, při napadení hostitele patogeny (Pitzschke a Hirt, 2009).

2.2 Místně specifické nukleázy a cílené editace genomu

2.2.1 Úvod

V posledních letech byly k tradičním selekčním metodám přidány nové, umožňující přímou editaci genomu (Miller *et al.*, 2011; Xie a Yang, 2013).

Přes existenci mnoha technik pro řízenou změnu komplexních eukaryotických genomů se však v současné době v praxi používá jen několik technologií. Těmi jsou místně specifická rekombinace a místně specifická oprava indukovaná nukleázou

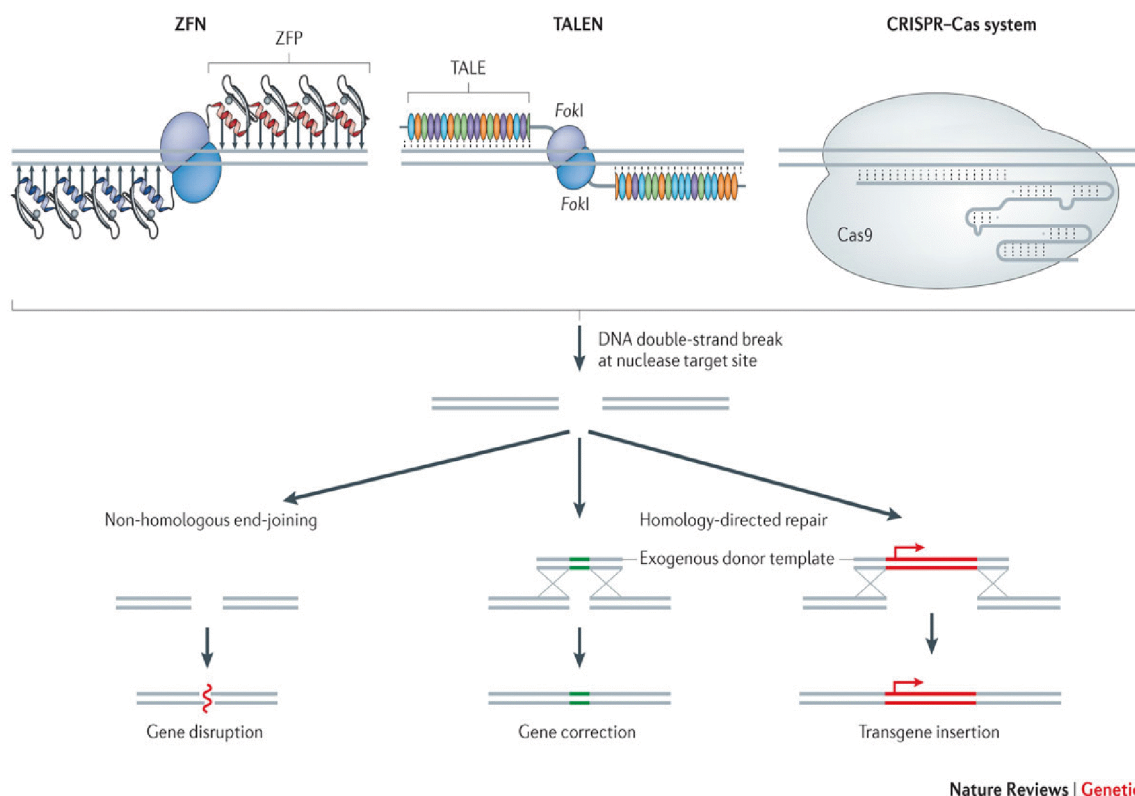
(O'Gorman *et al.*, 1991). Poslední je rozdělena do několika podskupin v závislosti na použitých nukleázách. Jedná se o syntetické nukleázy s doménami se zinkovými prsty (zinc finger nuclease, ZFN), efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům (transcription activator-like effector nuclease, TALEN) a segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated nuclease 9, CRISPR/Cas9), komplexu Cas9 nukleázy a vodící RNA (gRNA) (Wolfe *et al.*, 2000; Boch 2011; Carroll, 2011; Xie a Yang, 2013).

V současné době jsou nejefektivnější přístupy založené na použití syntetických místně specifických nukleáz, jmenovitě ZFN, TALEN a CRISPR/Cas9 (Nemudriy *et al.*, 2014). Z toho nejvíce využívaným je poslední typ nukleáz.

2.2.2 Editace genomu pomocí nukleáz s doménami se zinkovými prsty (ZFN)

Kolem poloviny osmdesátých let byly identifikovány malé domény stabilizované jedním nebo více zinkovými ionty a byly identifikovány jako „zinkové prsty“. Tyto domény jsou schopné účinně a sekvenčně specificky vazet DNA, RNA, proteiny a lipidy (Kim *et al.*, 1996). V případě DNA jeden „zinkový prst“ specificky váže triplet nukleotidů. Pokud se 3–6 „zinkových prstů“ se známou specificitou tandemově spojí do jednoho proteinu, lze dosáhnout dostatečně přesného rozpoznání sekvence DNA o rozsahu 9–18 nukleotidů. Pokud současně přidáme nějaký druh endonukleázy k „zinkovým prstům“ (nejčastěji s použitím dimeru FokI), pak lze výsledný komplex zacílit na specifické místo v genomu. Pro získání dvouvláknového zlomu je nutné vytvořit dva takové enzymy s monomery FokI, které rozpoznávají blízké úseky na protilehlých řetězcích DNA oddělené mezerou, ve kterém dojde ke zlomu (Obr. 2) (Kim a Pabo, 1998; Liu *et al.*, 1997).

Od počátku roku 2000 až dosud byly systémy založené na zinkových prstech úspěšně používány v celé řadě praktických modifikací genomů plodin, například ke zvýšení odolnosti vůči herbicidům (Townsend *et al.*, 2009). Mezi výhody tohoto způsobu patří univerzálnost a konzervativnost mechanismu, pomocí kterého se váže DNA vazebná doména na DNA. Nevýhody zahrnují poměrně vysokou složitost sestavení syntetické DNA vazebné domény, potřebu vytvořit dvě DNA vazebné domény s enzymem, každou na jeden z řetězců DNA a nedostatečná specifita tohoto typu systému (Pattanayak *et al.*, 2011). Z těchto důvodů se od aplikace této techniky postupně opouští.



Obr. 2 Zinkové prsty s nukleázou (ZFN), efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům (TALEN) a segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR-Cas). Tyto syntetické nukleázy mohou manipulovat genomy s vysokou přesností a účinností vytvořením dvouřetězcových zlomů (DSB) v cílových oblastech genomu. DSB je opraven nehomologním spojováním volných konců nebo homologní rekombinací, pokud jsou poskytnuty donorové sekvence DNA (Yin *et al.*, 2014).

2.2.3 Editace genomu pomocí efektorových nukleáz podobných transkripčním aktivátorům (TALEN)

Historie vývoje systému TALEN je spojena se studiem bakterií rodu *Xanthomonas*, především *X. oryzae* (Yang *et al.*, 2006). Důvodem pro studium této skupiny bakterií byl jejich patogenní účinek na pěstované rostliny jako jsou rajčata, paprika, rýže a několik dalších. Bylo prokázáno, že *Xanthomonas* vylučuje regulační proteiny (efektorové transkripční aktivátory, TALE) v cytoplazmě rostlinných buněk, které zvyšují citlivost buňky na patogena (Christian *et al.*, 2010; Miller *et al.*, 2011). Při dalším studiu mechanismů působení těchto proteinů bylo zjištěno, že jsou schopny vázat se na DNA a aktivovat expresi určitých genů, respektive, že jsou podobné transkripčním faktorům hostitelské buňky (Obr. 2) (Boch *et al.*, 2009; Moscou a Bogdanove, 2009).

Princip použití systému TALEN je podobný jako u metody využívající syntetických zinkových prstů. DNA vazebná doména TALE se skládá z jednotlivých subdomén, přičemž každá specificky rozpoznává jeden nukleotid. Syntetické DNA vazebné domény obsahují obvykle 12–20 tandemově uspořádaných subdomén, které dohromady rozpoznávají 12–20 nukleotidů. Jako nukleáza se používá dimer FokI. Pro získání dvouřetězcového zlomu v DNA je nutné vytvořit dvě DNA vazebné domény s FokI monomery a vazebnými místy na protilehlých DNA řetězcích. Mezerník mezi dvěma vazebnými místy má velikosti 20 párů bází. Výhodou této metody je její univerzálnost, tedy možnost vytvořit DNA vazebné domény prakticky pro libovolnou DNA sekvenci. Hlavní nevýhodou je složitost a časová náročnost přípravy rekombinantní DNA kódující DNA vazebné domény a také nutnost připravit dvě DNA vazebné domény s FokI monomery.

Tato metoda byla úspěšně použita k modifikaci genomu *A. thaliana* a také plodin jako jsou rýže, kukuřice a pšenice (Li *et al.*, 2012; Christian *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2014; Char *et al.*, 2015).

2.2.4 Editace genomu pomocí segmentů nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetitiv (CRISPR/Cas9)

Třetím typem úpravy genomu je RNA-řízená editace genomu (RGE) pomocí systému CRISPR-Cas9. Až do roku 2013 byly v oblasti úpravy genomu rostlin dominantní systémy ZFN a TALEN. Od roku 2013, kdy byly zveřejněny první výsledky jejího úspěšného využití u modelových i pěstovaných rostlinných druhů, pak převažují aplikace metody CRISPR/Cas9 (Feng *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2013). Jedná se o jednoduchý a vysoce účinný nástroj pro editaci genomu v mnoha organismech (Jinek *et al.*, 2012; Cong *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Existence této technologie vedla k prudkému nárůstu počtu prací, které uvádějí úspěšnou úpravu rostlinného genomu, včetně řízené modifikace ekonomicky cenných genů plodin (kukuřice, pšenice, ječmene, brambor, rajčat, rýže) (Zhu *et al.*, 2016). Tyto práce demonstrují možnost získání rostlin pomocí systému CRISPR / Cas9 se specifickými mutacemi, které jsou stabilně přenášeny do dalších generací (Xu *et al.*, 2015; Zhu *et al.*, 2016).

Začátkem roku 2014 byla publikována práce zaměřená na klíčové otázky související s používáním systému CRISPR/Cas9 na rostlinách: stabilita editovaných genomů, dědičnost změn provedených v genomu, frekvence nežádoucích modifikací mimo cílový gen a způsoby, jak zlepšit přesnost modifikací genů (Feng *et al.*, 2014).

Modifikované rostliny, které nenesou použitý transgenní konstrukt, jsou vyselektovány v generaci T2. Přítomnost takových rostlin v T2 je způsobena skutečností, že vložené transgeny a modifikovaný cílový gen jsou umístěny v různých částech genomu a jsou nezávisle přenášeny na potomstvo (Feng *et al.*, 2014). To bylo potvrzeno editací genomu *A. thaliana*, rajčat a rýže (Brooks *et al.*, 2014; Fauser *et al.*, 2014; Zhang *et al.*, 2014). Později bylo možné získat homozygotní mutace přímo v první generaci transformantů (Zhang *et al.*, 2014; Zhou *et al.*, 2014). Kromě toho byla demonstrována možnost vložení krátkých, ale i relativně dlouhých fragmentů DNA pomocí systému CRISPR/Cas9. (Zhou *et al.*, 2014).

CRISPR/Cas9 se zásadně liší z hlediska mechanismu cílení nukleáz ve srovnání se „zinkovými prsty“ a TALEN. Liší se tím, že nevyužívá proteinové domény, ale RNA molekulu (guide RNA, gRNA) o délce asi 40 nukleotidů, která se skládá ze dvou částí: vodící crRNA a adaptorové (transaktivací) tracrRNA (Obr. 2). Ještě na konci 80. let byly v genomu bakterií a archaea objeveny oblasti zvané CRISPR. Ukázalo se, že se jedná o zvláštní prvek „imunitního systému“ bakterie, který ji chrání před cizorodou DNA (například před pronikáním bakteriofágů), respektive jakýsi „očkovací průkaz“ bakterie. Za účasti specifických nukleáz ukládají bakterie do oblasti CRISPR, mezi roztroušené repetitivně elementy, specifické části genomu bakteriofágů (tzv. protospacery o velikosti cca 20bp). Po napadení fágem je archivovaná DNA fága – protospacer, přepsána do molekuly vodící crRNA, která na základě komplementarity k DNA infikujícího fága v komplexu s tracrRNA a specializovanou nukleázou Cas9 štěpí fágovou DNA (Barrangou *et al.*, 2007; Horvath a Barrangou, 2010; Makarova *et al.*, 2006; Mojica *et al.*, 2009).

Ukázalo se také, že sekvence vodících crRNA lze měnit beze ztráty nukleázové aktivity enzymu Cas9, což činí CRISPR/Cas9 technologii komplementární prakticky s jakoukoli částí DNA (Gasiunas *et al.*, 2012; Swarts *et al.*, 2012). Zásadní význam pro technologii CRISPR/cas9 mělo dále zjištění, že crRNA je možné beze ztráty aktivity fúzovat s tracrRNA do jedné RNA, tzv. guide RNA (gRNA) (Jinek *et al.*, 2012). Jedinou limitací při designu gRNA, je pak nutnost zohlednit přítomnost tzv. PAM motivu (protospacer adjacent motiv, protospacer sousedící motiv o velikosti 2-6bp) v DNA, který bezprostředně předchází sekvenci protospaceru (Jinek *et al.*, 2012; Shan *et al.*, 2013; Swarts *et al.*, 2012). Aplikace CRISPR/Cas9 systému, obdobně jako ZFN a TALEN, může vést k výskytu modifikací v nežádoucích pozicích v genomu, které jsou homologní s cílovým místem (Hsu *et al.*, 2013; Mali *et al.*, 2013). Jednou z možností

zvýšení specificity je použití dvou gRNA fúzovaných s FokI nukleázou (Guilinger *et al.*, 2014).

System CRISPR / Cas9 však v současné době vypadá jako nejslibnější nástroj pro úpravu genomu, protože je univerzální a jednoduchý na přípravu při relativně vysoké specifitě pro cílové místo.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiály a metody

3.1.1 Chemikálie a přístroje

Izolace DNA z listů ječmene

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

Eppendorf: pipety

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

Retsch: kuličkový mlýnek MM 200/400

Thermo Fisher Scientific: EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina)

Sigma-Aldrich: chlorid sodný (NaCl), chloroform-isoamyl alkohol (24/1), Corning®
1,2 ml zkumavky po 8 ve stripu, sarkosyl, sorbitol, špičky, Tris-base, RNAsa I

Purifikace PCR produktů

Gyrozen: centrifuga

Qiagen: QIAquick PCR Purification Kit (250), kit pro purifikaci PCR produktů

Eppendorf: pipety

ThermoFisher Scientific: NanoDrop™ Lite Spectrophotometer

Ošetření bakteriálním elicitem flg22

Discovery peptides: flg22

Biosan: třepačka

Eppendorf: pipety

Voltcraft: luxmetr

Izolace RNA z listů ječmene

Eppendorf: pipety

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

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

Retsch: kuličkový mlýnek MM 200/400

Savo: Savo originál

Sigma-Aldrich: TRI Reagent, špičky

Syntéza cDNA

Bio-rad: Thermal Cycler T100™

Eppendorf: pipety

Promega: Deoxynukleotidový mix (dNTPs), DNasa I

(dNTPs), DNasa I, M-MLV Reversní Transkriptáza, 5× reakční pufr, RNasin® Plus RNase inhibitor, 100µM PAGE přečištěné 18 bp oligo dT primery

Sigma-Aldrich: špičky

ThermoFisher Scientific: EDTA, pufr pro Dnasu I, NanoDrop™ Lite Spectrophotometer

Standardní a kvantitativní polymerázové řetězové reakce

Bioline: ImmoMix™ (komerční směs pro PCR)

Bio-rad: Thermal Cycler T100™, My Cycler™ Thermal cycler (PCR cyklery)

Eppendorf: pipety

Sigma-Aldrich: špičky, špičky s filtrem

Thermo Fisher Scientific: ABGene Absolute QPCR Rox Mix (komerční qPCR reakční směs pro TaqMan qPCR), Power SYBR® Green PCR Master Mix (komerční qPCR reakční směs pro qPCR), MicroAmp™ Optical 96-Well Reaction Plate (amplifikační destička pro qPCR), MicroAmp™ Optical Adhesive Film (optická lepicí fólie pro qPCR destičky), StepOnePlus™ Real-Time PCR System (qPCR cykler)

Penta: isopropanol (C₃H₈O), ethanol (C₂H₅OH)

V.B.C. Biotech: primery

Gelová elektroforéza

Advance DNA StainGenetics: Midori Green (barvení gelů)

Bio-Rad: PowerPac™ Basic (zdroj stejnosměrného napětí), Gel Doc™ EZ Imager (přístroj pro gelovou dokumentaci)

Eppendorf: pipety

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

Thermo Fisher Scientific: EDTA (ethylendiamintetraoctová kyselina), 1 kb Gene Ruler (hmotnostní standard), 6x loading dye (nanášecí roztok)

Klonování PCR produktů v *Escherichia coli*

Eppendorf: pipety

Sigma-Aldrich: LB Broth, LB Broth s agarem

Thermo Fisher Scientific: TA Cloning™ Kit, with pCR™2.1 Vector, *Escherischia coli* Top10 chemicky kompetentní buňky

3.1.2 Roztoky

1) 70% Ethanol

70 ml Ethanol

30 ml ddH₂O

2) 75% Ethanol

75 ml Ethanol

25 ml ddH₂O

3) 96% Ethanol

96 ml Ethanol

4 ml ddH₂O

4) Lýzační pufr, pH 7,5

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

0,05 M EDTA (pH 8,0)

2 M NaCl

2% CTAB

5) Extrakční pufr, pH 7,5

100 mM Tris-HCl (pH 7,5)

5 mM EDTA (pH 8,0)

0,35 M Sorbitol

6) 5% Sarkosyl

95 ml ddH₂O

5 ml Sarkosyl

7) Pufr pro izolace DNA (na jeden vzorek)

207,5 µl Lyzační pufr, pH 7,5

207,5 µl Extrakční pufr, pH 7,5

82,5 µl 5% Sarkosyl

2,5 mg Disiřičitan sodný

8) Premix s DNasou (na jeden vzorek)

2 µl pufr pro DNasu I

6 µl ddH₂O

2 µl Dnasa

9) Premix s oligo(dT) primerem (na jeden vzorek)

3,5 µl ddH₂O

1 µl oligo(dT) primer

10) Premix pro reverzní transkripci (na jeden vzorek)

4,2 µl ddH₂O

0,4 µl M-MLV Reverzní transkriptasa

4 µl M-MLV Reverse Transcriptase 5× reakční pufr

0,4 µl dNTP (10mM)

0,4 µl inhibitor RNasin.

11) Pufr pro PCR (na jeden vzorek)

25 µl 2x ImmoMix

3,9 µl Forward primer

3,9 µl Reverse primer

17,2 µl ddH₂O

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

2,5 µl premix primerů (0,3 µM každý)

5µl Power SYBR®Green PCR Master Mix

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

2,5 µl premix primerů a sond (0,2 µM každá, celkem 4 primery a 2 sondy)

5µl ABGene Absolute QPCR RoxMix

14) 50x Tris-acetátový pufr (TAE)

24,22 g Tris

1,862 g EDTA

8,96 ml Kyselina octová

73,3 ml H₂O

15) 1x Tris-acetátový pufr (TAE)

20 ml 50x TAE

980 ml H₂O

16) Zásobní roztok MgSO₄ x 7H₂O

1,232 g MgSO₄ x 7H₂O

10 ml H₂O

17) Zásobní roztok KH₂PO₄

0,953 g KH₂PO₄ x 7H₂O

10 ml H₂O

18) Zásobní roztok Na₂HPO₄ x 2H₂O

0,712 g Na₂HPO₄ x 7H₂O

10 ml H₂O

19) Zásobní roztok Fe – EDTA - FeSO₄ x 7H₂O

0,056 g Fe – EDTA - FeSO₄ x 7H₂O

10 ml H₂O

20) Zásobní roztok Na₂ EDTA

0,074 g Na₂ EDTA

10 ml H₂O

21) Zásobní roztok MnSO₄ x H₂O

0,01 g MnSO₄ x H₂O

10 ml H₂O

22) **Zásobní roztok $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$**

0,015 g $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$

10 ml H_2O

23) **Zásobní roztok $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$**

0,017 g $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

10 ml H_2O

24) **Zásobní roztok H_3BO_3**

0,01 g H_3BO_3

10 ml H_2O

25) **Zásobní roztok $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$**

0,011 g $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$

10 ml H_2O

26) **Zásobní roztok CaCl_2**

1,1098 g CaCl_2

10 ml H_2O

27) **Zásobní roztok NH_4NO_3**

0,8 g NH_4NO_3

10 ml H_2O

28) **Zásobní roztok KNO_3**

1,01 g KNO_3

10 ml H_2O

29) **FAH – medium, pH 6,5**

1 ml $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

1 ml $\text{KH}_2\text{PO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

2 ml $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$

2,5 ml Fe – EDTA - $\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ a Na_2EDTA

100 μ l $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
100 μ l $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$
100 μ l $\text{ZnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
100 μ l H_3BO_3
100 μ l $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$
100 μ l CaCl_2
0,5 ml NH_4NO_3 a KNO_3
992,4 ml H_2O

30) Pevné FAH – medium, pH 6,5

1 l FAH – medium, pH 6,5
13 g microagar

31) LB – medium, pH 7,2

25 g LB Broth
1 l H_2O

32) Pevné LB – medium, pH 7,2

25 g LB Broth s agarem
1 l H_2O

3.1.3 Rostlinný materiál

Pro vlastní experimenty byly používány rostliny ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise. Jmenovitě transgenní linie s vyřazenými geny *HvMPK3* s označením *HvMPK3-KO* a *HvMPK6* s označením *HvMPK6-KO*. Příprava, charakterizace a selekce *HvMPK3-KO* transgenních linií byla popsána v diplomové magisterské práci Mgr. et Mgr. Terezy Tiché a v bakalářské diplomové práci Bc. Evy Trejtnarové. Jedná se o zatím nepublikovaná data. Konstrukt pro expresi gRNA komplementární k cílové oblasti třetího exonu *HvMPK6* genu byl získán zakloňováním příslušného protospaceru společně s částí vektoru pSH91 do vektoru p6i-2x35s-TE9 (DNA Cloning Service, Hamburg, Germany) (Křenek, nepublikovaná data). Výsledný vektor nese označení p6i-K6E3. Transgenní linie *HvMPK6-KO* byla připravena pomocí transformace nezralých embryí ječmene odrůdy Golden Promise konstruktem p6i-K6E3 (Dr. Ohnoutková, nepublikovaná data). Jako kontrolní rostliny byly pěstovány linie

ječmene divokého typu (WT) odrůdy Golden Promise. Pro účely genotypování transgenních linií ječmene a pro experiment s analýzou reakce na stres způsobený ošetřením flg22 byly použity dva různé způsoby kultivace.

Pro účely genotypování T2 generace potomků *HvMPK6-KO* linie byly transgenní rostliny vypěstovány ve třech opakováních. Pro účely genotypování byly rostliny ječmene pěstovány v sadbovačích ve fytotronu při relativní vlhkosti vzduchu 70% s fotoperiodou 16 hodin světlo při teplotě 15°C a 8 hodin tma při teplotě 12°C. Pro pokus s ošetřením rostlin flg22 byly rostliny pěstovány sterilně v *in vitro* podmínkách na pevném FAH - mediu, které bylo nalito do poloviny výšky čtvercových Petriho misek. Po umístění semen na medium, byly misky omotány z boku porézní páskou a stratifikovány při 4 °C po dobu 2 dnů. Dále byly rostliny kultivovány po dobu 7 dnů ve fytotronu při relativní vlhkosti vzduchu 70% s fotoperiodou 16 hodin světlo při teplotě 21°C a 8 hodin tma při teplotě 21°C.

3.1.4 Izolace genomické DNA z listů ječmene

Pro analýzu byly používány 15 dní až 2 měsíce staré rostliny. Části jejich listů byly odebrány do 1,2 ml zkumavek, které jsou spojeny po 8 ve stripu, do kterých byly předem přidány dvě kovové kuličky. Odebrané listy byly ve stripech uchovávány na ledu a po odběru byly zmrazeny v tekutém dusíku (N₂, -196°C).

Dále byly, při konstantní udržování teploty pod bodem mrazu, za pomoci kulového mlýnku zmražené listy rozdrnceny na prášek prášku. Pak byl každý vzorek smíchán s 400 µl pufru pro izolaci DNA. Dále byly stripy se vzorky inkubovány v termostatu za občasného míchání při teplotě 60°C po dobu 75 minut.

Další postup je shrnut v následujících krocích protokolu:

1) Přidání 400 µl chloroform-isoamyl alkoholu (24/1) ke každému vzorku. Extrakce po dobu 4 minuty. Centrifugace 30 minut při teplotě 20°C a 4000 rcf (angl. relative centrifugal force, relativní centrifugační síla). Odběr 250 µl supernatantu do nových zkumavek.

2) Přidání 200 µl isopropanolu ke každému vzorku. Promísení roztoků převrácením stripů a precipitace DNA po dobu 4 minuty do vizualizace sraženiny genomické DNA s CTAB. Centrifugace po dobu 15 minut při 20°C a 4000 rcf pro vytvoření pelety DNA. Odebrání isopropanolu slitím.

3) Přidání 300 μ l 70% ethanolu do zkumavek k peletě genomické DNA. Centrifugace po dobu 10 minut při 20°C a 4000 rcf. Odebrání ethanolu vícekanálovou pipetou a vysušení pelety.

4) Přidání 30 μ l Milli-Q vody s RNAsou (25 μ g/ml).

5) Rozpouštění genomické DNA po dobu 24 hodiny při laboratorní teplotě. Hotové vzorky byly uchovány při 4°C stupňů.

3.1.5 Standardní polymerázová řetězová reakce (PCR) pro amplifikaci třetího exonu *HvMPK6* genu, cílové oblasti CRISPR/Cas9

Pro amplifikaci cílové oblasti gRNA, která se nachází ve třetím exonu *HvMPK6* genu byly využity primery E3F/E3R2 (Tab. 1). Nejprve byla genomická DNA ve zkumavkách naředěna 11 krát přidávkem Milli-Q H₂O. Následně bylo přidáno do jamek 96 jamkového PCR plata 42,5 μ l premixu pro PCR a 7,5 μ l vzorku ředěné DNA. Celkový objem reakce byl 50 μ l. Následně byla PCR plata uzavřena pomocí lepící fólie a inkubovaná v termocykleru za specifických teplotních a časových podmínek PCR reakce (Tab. 2).

3.1.6 Gelová elektroforéza

Elektroforéza byla provedena pro vizualizaci PCR produktů získaných pomocí primerů E3F/ E3R2. Gel pro elektroforézu byl připraven následujícím způsobem: do 200 ml

Tab. 1 PCR markery použité pro kontrolu čistoty izolované DNA

Název markeru	Název primeru	F R	Sekvence	Velikost PCR produktu
	E3R2	R	AAGCTAGACATTATCTAAGGCATGT	316 bp
	E3F	F	GGGTATGAGAAGGGTTTA	

Tab. 2 Program pro amplifikaci třetího exonu *HvMPK6* genu

Název PCR kroku	Teplota	Čas (min:sec)	Počet cyklů
Předehřátí	95°C	10:00	1
Denaturace	95°C	00:10	29-32
Nasednutí primerů	57°C	00:25	29-32
Syntéza DNA	65°C	00:40	29-32
Závěrečné syntéza DNA	72°C	05:00	1
Uchovávání	8°C	Pauza	1

kádinky bylo přidáno 100 ml 1 X TAE a 1,5 g agarózy. Směs byla promíchaná a zahřívána v mikrovlnné troubě až do úplného rozpuštění agarózy. Dále bylo do roztoku přidáno barvivo Midori Green v poměru 1,5 µl na 100 ml. Pak byl roztok přelit do elektroforetické vany s hřebínkem a ponechán polymerizovat. Po ztuhnutí gelu bylo do první jamky každého řádku přidáno 3 µl hmotnostního standardu (1 kb Gene Ruler) a do ostatních jamek jednotlivé vzorky tvořené směsí PCR produktu (6 µl) a barviva 6x loading dye (1,5 µl) o výsledném objemu 7,5 µl. Elektroforetická separace PCR produktů byla provedena po dobu 45-50 minut při napětí 75 V generovaném zdrojem PowerPacTM Basic. Vizualizace elektroforeogramů byla provedena pomocí přístroje Gel DocTM EZ Imager v softwaru Image lab v5.1.

3.1.7 Purifikace a sekvenace PCR produktů získaných amplifikací třetího exonu *HvMPK6* genu s cílem detekce indukovaných mutací

Purifikace PCR produktů pomocí Qiaquick pcr purification kit zahrnovala následující kroky:

- 1) Ve 2 ml zkumavce byly smíchány pufr pro navázání DNA na kolonu (Binding buffer) a PCR produkt jednotlivého vzorku v poměru 1 ku 5, konkrétně 200 µl pufru na 40 µl PCR produktu. Dále směs byla vortexována.
- 2) Poté byla celá směs přenesena do nových speciálních filtračních zkumavek s kolonou.
- 3) Centrifugaci po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a 13300 rcf.
- 4) Přenesení kolony do nových čistých zkumavek bez víček.
- 5) Přidání 750 µl promývacího pufru (Wash buffer).
- 6) Centrifugaci po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a 13300 rcf.
- 7) Přenesení kolony do nových čistých zkumavek bez víček.
- 8) Centrifugaci zkumavek po dobu 1,5 minuty při pokojové teplotě a 13300 rcf úchytkou víčka nahoru.
- 9) Centrifugaci zkumavek po dobu 1,5 minuty při pokojové teplotě a 13300 rcf úchytkou víčka dolů.
- 10) Přenesení kolony do nových čistých zkumavek.
- 11) Přidání 26 µl ddH₂O.
- 12) Centrifugace zkumavek s otevřenými víčky po dobu 1 minuty při pokojové teplotě a 13300 rcf.

Dále byla stanovena koncentrace DNA pomocí Nanodropu a připravena reakční směs

pro sekvenaci, která byla realizována komerčně firmou SEQme Reakční směs pro sekvenování měla objem 10 µl a obsahovala:

1. 2,5 µl 10 µM roztoku E3F primeru
2. 50 ng purifikovaného PCR produktu
3. ddH₂O

3.1.8 Genotypování transgenních rostlin pomocí Multiplex TaqMan Real-Time PCR

Genomická DNA byla zředěna 11 krát pomocí Milli-Q H₂O. Pro genotypování transgenních rostlin ječmene byly v multiplex formátu využity primery a sonda pro detekci hygromycin fosfotransferázového genu (*hpt*) a primery a sonda pro detekci *HvCon2* genu (Bartlett *et al.*, 2008) (Tab. 3). Do jamek 96 jamkového PCR plata bylo přidáno 2,5 µl vzorku genomické DNA, a 7,5 µl směsi reagentů (primery, sondy a reakční směs). Celkový objem vzorku byl 10 µl. Každý vzorek byl analyzován v jednom nebo dvou technických replikátech. Dále byla PCR plata uzavřena pomocí

Tab. 3 Primery a sondy použité pro genotypování *HvMPK6-KO* transgenních rostlin pomocí Multiplex TaqMan qPCR

Název markeru	Druh	Název	Přední F Zadní R	Sekvence
hyg	primery	PHygF1/PHygR1	F	GCGGATTTTCGGCTCCAA
			R	CTCCAGTCAATGACCGC TGTT
	sonda	HygP		FAM- TCCTGACGGACAATGGC CGCA-TAMRA
HvCon2	primery	HvCon2F1/HvCon2R1	F	TGCTAACCGTGTGGCAT CAC
			R	GGTACATAGTGCTGCTG CATCTG
	sonda	HvCon2P		VIC- CATGAGCGTGTGCGTGT CTGCG-TAMRA

Tab. 4 Teplotní a časový průběh PCR amplifikace pro genotypování *HvMPK6-KO* transgenních rostlin

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

transparentní fólie a následně inkubována v termocykleru StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Teplotní a časový průběh amplifikace pro genotypování transgenních rostlin je uveden v Tab. 4. Data byla analyzována pomocí StepOne software v2.3. Výsledky byly normalizovány vůči rostlinám divokého typu. Normalizace výsledků byla provedena pomocí $2^{-\Delta\Delta CT}$ metody (Livak a Schmittgen, 2001). Byly provedeny celkem čtyři analýzy, které zahrnovaly rostliny ze všech tří opakování (Bartlett *et al.*, 2008).

3.1.9 Klonování PCR produktů získaných amplifikací třetího exonu *HvMPK6* genu v *Escherichia coli*

Klonování PCR produktů v *E. coli* zahrnovalo následující kroky:

- 1) Přípravu ligační směsi s poměrem PCR produktu (inzertu) k vektoru pCR™ 2.1 3:1. Ligační směs o celkovém objemu 5 μ l obsahovala 1 μ l 316 bp PCR produktu (6 ng/ μ l), 1 μ l 5X reakčního pufru pro T4 DNA ligázu, 1 μ l pCR®2.1 vektoru (25 ng/ μ l), 1 μ l ExpressLink™ T4 DNA ligázy (5 jednotek) a 1 μ l ddH₂O.
 - 2) Inkubaci ligační směsi v 0,2 ml stripech v termocykleru při teplotě 24°C (víčko 31°C) po dobu 3 hodin.
 - 3) Přidání 2,5 μ l ligační směsi do zkumavky s TOP10 *E. coli* chemicky kompetentními buňkami a následnou inkubací suspence bakterií a DNA na ledu po dobu 30 minut.
 - 4) Teplotní šok suspence ve vodní lázni s destilovanou vodou o teplotě 42°C po dobu 45 sekund. Posléze inkubaci suspence na ledu po dobu 2 minut.
- Následná práce byla provedena ve sterilním boxu.
- 5) Do sterilních 2 ml zkumavek byly přidány LB médium a suspence transformovaných bakterií v poměru 5 ku 1.
 - 6) Poté byly vzorky přeneseny do inkubátoru. Tam byly inkubovány při frekvenci třepání 150 rpm po dobu 70 minut ve tmě při teplotě 37 °C.
 - 7) Paralelně s inkubací byly připraveny Petriho misky s tuhým LB médiem suplementovaným antibiotikem kanamycinem ve finální koncentraci 50 μ g/ml. Antibiotikum bylo přidáno do LB media po ochlazení média na teplotu přibližně 50 °C. Médium s antibiotikem bylo promícháno a poté bylo rozlito do Petriho misek.
 - 8) Po ukončení inkubace byla suspenze bakterií v tekutém LB médiu centrifugována po dobu 3 minuty při pokojové teplotě a otáčkách 7000 rcf.
 - 9) Po ukončení centrifugace byl ze zkumavek odebrán supernatant, přičemž bylo ve zkumavkách ponecháno médium o objemu cca 80 μ l, ve kterém byly následně

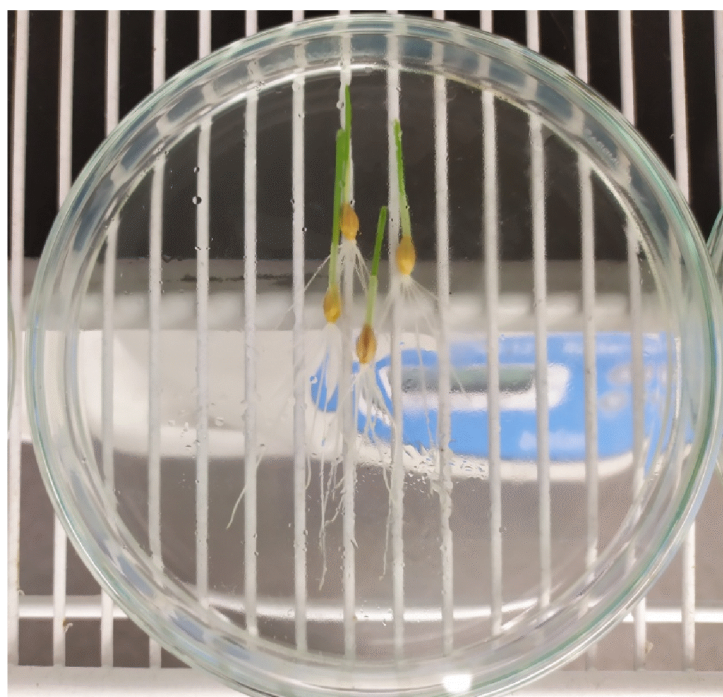
resuspendovány bakteriální pelety.

10) Resuspendovaná bakteriální kultura byla rozetřena po povrchu pevného LB média s kanamycinem na Petriho miskách pomocí kónické spodní části 2 ml zkumavek.

Misky s bakteriálními kulturami byly inkubovány přes noc v inkubátoru při teplotě 37 °C. Pozitivní kolonie byly identifikovány pomocí PCR kolonií bakterií. Chemické složení, teplotní a časový průběh PCR reakce byl stejný jako v kapitole 3.1.5. PCR produkty byly detekovány pomocí horizontální agarózové elektroforézy stejně jako v kapitole 3.1.6.

3.1.10 Ošetření kořenů *HvMPK3_KO* a kontrolních rostlin ječmene bakteriálním elicitorem flg22 .

Sedm dní staré rostliny ječmene byly sterilně odebrány z misek s pevným FAH médiem a umístěny do sterilních skleněných misek s kapalným FAH médiem (50 ml) v počtu 4 nebo 8 rostlin v závislosti na experimentu. Misky s rostlinami byly umístěny do fytotronu s kultivačními podmínkami: relativní vlhkost vzduchu 70%, fotoperioda 16 hodin světlo při teplotě 21°C a 8 hodin tma při teplotě 21°C a intenzitou světla 50 $\mu\text{M}/\text{m}^2/\text{S}$. Misky byly umístěny na třepačku s kývavým pohybem a inkubovány s mírným kývavým pohybem s malým úhlem náklonu (Obr. 3). Po 24 hodinách bylo



Obr. 3 Skleněná miska s rostlinami ječmene v kapalném FAH médiu, která je umístěna na třepačce.

médium v miskách opatrně nahrazeno 1 μ M roztokem flg22 v tekutém FAH médiu o objemu 50 ml nebo případně pouze samotným FAH médiem o objemu 50 ml (kontrolní ošetření). V závislosti na experimentu byl odběr rostlin proveden po 15 minutách, 4 nebo 6 hodinách od začátku ošetření. Po vytažení z média byly kořeny rostliny rychle zmrazeny dusíkem (-196°C) a homogenizovány ve třecích miskách. Homogenát byl rozdělen na stejné části a přenesen do 2 ml zkumavek.

3.1.11 Izolace celkové RNA z kořenů ječmene

Během izolace byly v pracovním prostředí udržovány semisterilní podmínky pomocí Sava a 70% ethanolu.

Izolace RNA zahrnovala následující kroky:

- 1) Přidání 1 ml TRI Reagentu k homogenizovanému vzorku kořene, resuspendaci homogenátu kořene pomocí pipety v TRI Reagentu a uchování resuspendovaných vzorků na ledu. Následně centrifugaci resuspendovaných vzorků po dobu 10 minut při 4°C a otáčkách 12000 rcf s cílem sedimentace zbytků buněk a pletiv.
 - 2) Přidání 100 μ l BCP (brom-chlor-propan) do druhé sady 2ml zkumavek. Přepipetování 1 ml supernatantu ze vzorků po centrifugaci do druhé sady zkumavek s BCP. Intenzivní protřepání směsi po dobu 15 s s následnou inkubací po dobu 4 minut. Dále pak centrifugaci směsi po dobu 15 minut při 4°C a 12000 rcf.
 - 3) Přidání 195 μ l BCP do třetí sady zkumavek. Přepipetování 390 μ l vodní fáze z druhých do vzorků po centrifugaci do třetí sady zkumavek s BCP. Intenzivní protřepávání směsi po dobu 15 s 3 minut. Dále pak centrifugaci po dobu 15 minut při 4°C a 12000 rcf.
 - 4) Přidání 140 μ l isopropanolu do čtvrté sady zkumavek. Přepipetování 200 μ l vodní fáze ze vzorků po centrifugaci do čtvrté sady zkumavek s izopropanolem. Promísení směsi převrácením vzorku a inkubaci vzorků po dobu 10 minut. Dále pak centrifugaci po dobu 9 minut při 4°C a 12000 rcf.
 - 5) Odebrání isopropanolu a přidání 1 ml 75% ethanolu k peletám RNA. Centrifugaci po dobu 5 minut při 4°C a 6500 rcf. Odebrání ethanolu pomocí pipety a vysušení RNA pelety.
 - 6) Přidání 15-40 μ l Milli-Q vody, v závislosti na velikosti RNA pelety.
- Vzorky RNA byly uchovávány při -80°C .

3.1.12 Syntéza cDNA

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

Syntéza cDNA zahrnovala následující kroky:

- 1) V 0,2 ml PCR stripech byly připraveny vzorky se stejnou koncentrací RNA, jmenovitě 2000 ng RNA v objemu 15 μ l ddH₂O.
- 2) K směsi RNA a ddH₂O bylo přidáno 5 μ l premixu s Dnasou I a pufrům pro Dnasu I.
- 3) Po následné centrifugaci byly vzorky inkubovány v termocykleru při teplotě 37°C (víčko 40°C) po dobu 40 minut s cílem degradace genomické DNA.
- 4) Po inkubaci bylo ke vzorkům přidáno 2 μ l EDTA s cílem zabránění degradace RNA během tepelné inaktivace DNasy I. Inaktivace DNasy I probíhala při teplotě 70°C po dobu 8 minut v termocykleru.
- 5) Dále byl do druhé sady 0,2 ml PCR stripů napipetován pro každý vzorek premix o celkovém objemu 4,5 μ l, který se skládal z 4 μ l ddH₂O a 0,5 μ l oligo-dT primeru (100 μ M roztok). K 4,5 μ l premixu byly následně přidány 5,5 μ l RNA vzorku (500ng RNA) ošetřeného DNAsou I. Po promíchání byly stripy se vzorky inkubovány v termocykleru při teplotě 70°C po dobu 10 min a bezprostředně po inkubaci umístěny na led. Toto ošetření mělo za cíl denaturovat sekundární struktury v mRNA, které by mohl bránit nasedání oligo-dT primeru. A nakonec bylo ke každému vzorku přidáno 10 μ l premixu pro reverzní transkripci.
- 6) Po promísání vzorků s premixem pro reverzní transkripci byly stripy se vzorky inkubovány v termocykleru po dobu 2 hodin při teplotě 42°C (víčko 44°C) s cílem syntézy jednořetězcové cDNA.
- 7) Následně byly stripy se vzorky inkubovány v termocykleru po dobu 10 minut při teplotě 70°C (víčko 72°C). Toto ošetření mělo za cíl inaktivovat reverzní transkriptázu.
- 8) Připravená cDNA byla 4x naředěna přidáním 60 μ l ddH₂O.

Vzorky cDNA byly uchovávány při -80°C.

3.1.13 Kvantifikace exprese genů souvisejících s patogenezí (*PR* genů) a *HvMPK3* genu pomocí Real-Time PCR (qRT-PCR)

Pro kvantifikaci exprese *HvMPK3* genu a *PR* genů byly použity primery uvedené v Tab. 5. Jako referenční gen byl použit gen *HvMPK14*, který vykazuje konstantní expresi po napadení ječmene houbou *Puccinia hordei* (Křenek *et al.*, 2015) (Tab. 5). Do jednotlivých jamek 96 jamkového PCR plátu bylo přidáno 2,5 μ l vzorku cDNA a 7,5 μ l

Tab. 5 qPCR primery použité pro kvantifikaci exprese *HvMPK3* a *PR* genů

Název genového produktu	F	R	Sekvence
HvMPK3	F	R	GTAAGATCGAAGAACGGGGTTA AGGTCTGAAGCAGCAGCAA
HvPR1b_ kyselý neznámý protein	F	R	CTCGCCGCAGGACTACGT GCTGGAGCTTGCAGTCGTT
HvPR3_Chit2a_chitinasa	F	R	GGTTCCAGGCTACGGTGTA GTTCCGTTGGGTGTAGCAGT
HvPR4b_chitinasa	F	R	CTGTCGTGGCGGAGCAAGTA ATCCCGTTGGTGTGATCTTG
HvPR5_TLP5,6_ thaumatinu podobný protein	F	R	GCGTCCTCTCGTGTGTCTAC GGCCGCGTCTGTGGTG
HvMPK14	F	R	CACAAAAGCCACGCAGAGA CCGAACCAACCACTTTACCA

směsi reagentů a primerů o výsledné koncentraci 0,3 μ M v roztoku. Celkový objem vzorku byl 10 μ l. Každý vzorek byl realizován ve dvou technických replikátech. Dále bylo PCR plato uzavřeno pomocí lepící transparentní fólie a inkubováno v termocykleru StepOnePlus™ Real-Time PCR System. Teplotní a časový průběh amplifikace je uveden v Tab. 6. Výsledky byly analyzovány pomocí StepOne software v2.3. Normalizace výsledků byla provedena pomocí $2^{-\Delta\Delta CT}$ metody vůči referenčnímu genu *HvMPK14* (Livak a Schmittgen, 2001).

Tab. 6 Teplotní a časový průběh qPCR reakce pro kvantifikaci exprese *HvMPK3* genu a *PR* genů

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

4 VÝSLEDKY

4.1 Molekulárně genetická charakterizace T2 potomstva transgenní linie *HvMPK6-KO*

V předkládané práci jsou prezentovány výsledky molekulárně genetické charakterizace T2 potomstva transgenní linie ječmene *HvMPK6-KO*. T0 generace a T1 generace rostlin této linie byly charakterizovány Dr. Křenkem a výsledky této charakterizace nejsou proto v práci prezentovány. Z výsledků Dr. Křenka vyplývá, že v T0 generaci byla získána jedna linie nesoucí mutaci v cílovém místě ve třetím exonu *HvMPK6* genu. Mezi T1 potomky této linie se pak s frekvencí přibližně 25% vyskytli jedinci s mutací v cílovém místě v *HvMPK6* genu, přičemž všichni analyzovaní jedinci T1 generace vykázali přítomnost CRISPR/Cas9 T-DNA kazety.

Pro vlastní experimenty byly vysety semena transgenních rostlin T1 generace ve třech opakováních. V prvním opakování byla vyseta semena T1 rostlin B3/1, B3/2, B3/5, B4/5 a B6/5, ve druhém a třetím opakování pak pouze semena T1 rostlin B3/5, B4/5 a B6/5 (Tab. 7). Nejprve byly rostliny genotypovány pro přítomnost CRISPR/Cas9 T-DNA kazety pomocí TaqMan Multiplex Real-Time PCR (Obr. 4). Z výsledku analýzy je patrné, že všechny analyzované rostliny, kromě rostliny B3/1/20, vykázaly přítomnost CRISPR/Cas9 T-DNA kazety. Celkem se jedná o 120 pozitivních rostlin ze 121 analyzovaných rostlin T2 generace. V rámci T2 potomstev jednotlivých rostlin T1 generace pak vykázalo přítomnost T-DNA celkem 36 potomků rostliny B3/5, 38 potomků rostliny B4/5 a 43 potomků rostliny B6/5 (Tab. 7 a), b), c), Obr. 4 a), b) a c)). U potomstev rostlin B3/5, B4/5 a B6/5 (rostlin s největším počtem analyzovaných potomků) nedošlo k vyštěpení jedinců s absencí CRISPR/Cas9 T-DNA kazety. Rostliny B3/5, B4/5 a B6/5 tak pravděpodobně obsahují více než jednu kopii T-DNA, případně jsou tyto rostliny homozygotní v jedné nebo ve více T-DNA inzercích. Počet inzercí T-DNA by bylo možné odhadnout pomocí metody TaqMan Multiplex Real-Time PCR, pokud by byla k dispozici referenční linie s jednou kopií T-DNA vektoru p6i-2x35s + pSH91. Referenční linie však nebyla dostupná. Přesto je možné v rámci jednotlivých běhů (run) porovnat relativní množství T-DNA mezi analyzovanými jedinci. Při použití tohoto způsobu porovnání je zřejmé, že všichni potomci rostliny B3/5 obsahují přibližně stejné množství T-DNA (Obr. 4 b) a c1)), zatímco u potomků rostlin B4/5 a B6/5 dochází k segregaci množství T-DNA (Obr. 4 b), c1) a c2)). Rostlina B3/5 je tedy pravděpodobně homozygotní v jedné T-DNA inzerci případně ve dvou nebo více

Tab. 7 Souhrné výsledky genotypování transgenních rostlin T2 generace potomstva *HvMPK6-KO* linie a) První opakování b) Druhé opakování c) Třetí opakování. Sekvence – Výsledek sekvenace PCR produktu získaného amplifikací cílového regionu třetího exonu *HvMPK6* genu. M – jedinec mutovaný v *HvMPK6* genu, WT – jedinec divokého typu. Přítomnost transgenu - stanoveno pomocí Multiplex TaqMan qPCR.

a)

Číslo	Analyzovaná rostlina	Sekvence	Přítomnost transgenu
1	B3/2/16	WT	+
2	B6/3/23	WT	+
3	B4/5/4	WT	+
4	B4/5/9	M	+
5	B4/5/21	M	+
6	B3/1/20(WT)	WT	-
7	B6/5/1	M	+
8	B6/5/5	M	+
9	B3/2/3	M	+
10	B4/5/24	M	+
11	B3/5/2	M	+

b)

Číslo vzorku	Analyzovaná rostlina	Sekvence	Přítomnost transgenu	Číslo vzorku	Analyzovaná rostlina	Sekvence	Přítomnost transgenu
1	B3/5/4	M	+	20	B4/5/20	M	+
2	B3/5/7	M	+	21	B4/5/22	M	+
3	B3/5/8	M	+	22	B6/5/6	M*	+
4	B3/5/9	WT	+	23	B6/5/7	WT	+
5	B3/5/12	M*	+	24	B6/5/8	M	+
6	B3/5/15	WT	+	25	B6/5/9	WT	+
7	B3/5/17	M	+	26	B6/5/10	WT	+
8	B3/5/18	WT	+	27	B6/5/11	WT	+
9	B3/5/20	WT	+	28	B6/5/13	WT	+
10	B3/5/22	WT	+	29	B6/5/14	WT	+
11	B3/5/23	M	+	30	B6/5/15	WT	+
12	B4/5/1	WT	+	31	B6/5/16	M*	+
13	B4/5/2	M*	+	32	B6/5/17	WT	+
14	B4/5/3	M	+	33	B6/5/18	WT	+
15	B4/5/8	M	+	34	B6/5/19	WT	+
16	B4/5/11	M	+	35	B6/5/21	WT	+
17	B4/5/13	WT	+	36	B6/5/22	WT	+
18	B4/5/14	M*	+	37	B6/5/23	WT	+
19	B4/5/15	M	+	38	B6/5/24	WT	+

Tab. 7 Souhrné výsledky genotypování transgenních rostlin T2 generace potomstva *HvMPK6-KO* linie a) První opakování b) Druhé opakování c) Třetí opakování. Sekvence – Výsledek sekvenace PCR produktu získaného amplifikací cílového regionu třetího exonu *HvMPK6* genu. M – jedinec mutovaný v *HvMPK6* genu, wt – jedinec divokého typu. Přítomnost transgenu - stanoveno pomocí Multiplex TaqMan qPCR (pokračování).

c)

Číslo vzorku	Analyzována		Přítomnost transgenu	Číslo vzorku	Analyzována		Přítomnost transgenu
	rostlina	Sekvence			rostlina	Sekvence	
1	B3/5/11	M	+	37	B4/5/20	M	+
2	B3/5/12	M	+	38	B4/5/21	M	+
3	B3/5/13	WT	+	39	B4/5/23	WT	+
4	B3/5/14	M	+	40	B4/5/24	M	+
5	B3/5/16	M	+	41	B4/5/25	WT	+
6	B3/5/17	M	+	42	B4/5/26	WT	+
7	B3/5/18	M	+	43	B4/5/32	M	+
8	B3/5/19	M	+	44	B4/5/33	WT	+
9	B3/5/21	M	+	45	B4/5/34	WT	+
10	B3/5/22	M	+	46	B4/5/36	M	+
11	B3/5/25	M	+	47	B4/5/37	M	+
12	B3/5/27	M	+	48	B4/5/38	M	+
13	B3/5/28	WT	+	49	B6/5/7	WT	+
14	B3/5/29	M	+	50	B6/5/8	WT	+
15	B3/5/30	WT	+	51	B6/5/9	M	+
16	B3/5/31	M	+	52	B6/5/10	M	+
17	B3/5/32	M	+	53	B6/5/11	WT	+
18	B3/5/33	WT	+	54	B6/5/12	M	+
19	B3/5/34	WT	+	55	B6/5/13	M	+
20	B3/5/35	M	+	56	B6/5/14	WT	+
21	B3/5/36	M	+	57	B6/5/15	WT	+
22	B3/5/37	M	+	58	B6/5/16	WT	+
23	B3/5/38	M	+	59	B6/5/17	WT	+
24	B3/5/39	M	+	60	B6/5/18	WT	+
25	B4/5/1	M	+	61	B6/5/19	WT	+
26	B4/5/2	WT	+	62	B6/5/20	WT	+
27	B4/5/3	M	+	63	B6/5/21	WT	+
28	B4/5/4	WT	+	64	B6/5/22	WT	+
29	B4/5/5	M	+	65	B6/5/23	M	+
30	B4/5/8	WT	+	66	B6/5/24	WT	+
31	B4/5/9	M	+	67	B6/5/25	WT	+
32	B4/5/10	M	+	68	B6/5/26	WT	+
33	B4/5/12	M	+	69	B6/5/27	WT	+
34	B4/5/14	M	+	70	B6/5/28	WT	+
35	B4/5/15	WT	+	71	B6/5/29	WT	+
36	B4/5/17	WT	+	72	B6/5/30	M	+

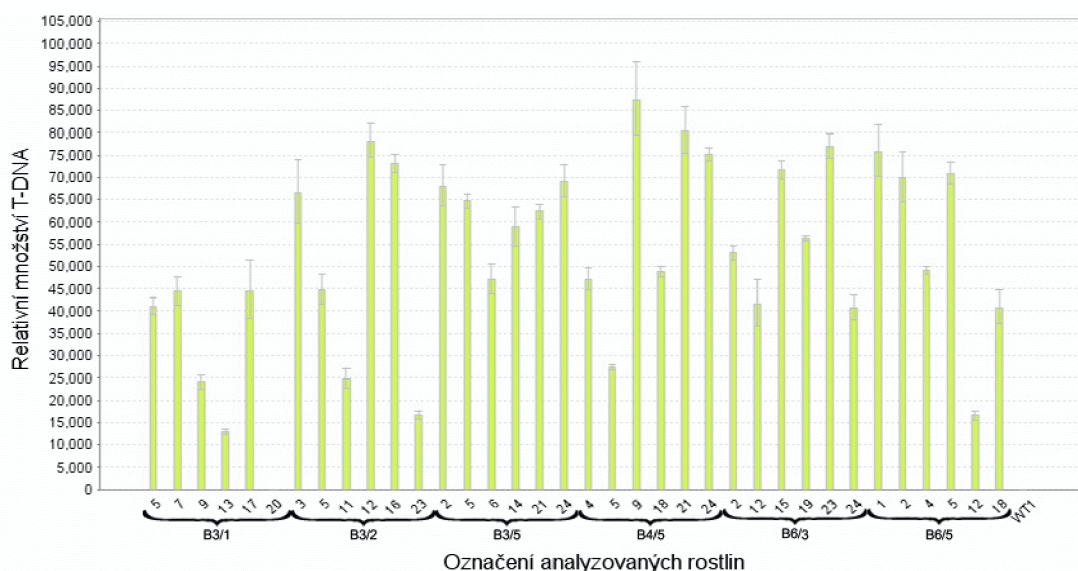
* PCR produkt asociovaný s těmito genotypy byl klonován *in vivo*.

T-DNA inzercích, zatímco rostliny B4/5 a B6/5 jsou pravděpodobně heterozygotní ve

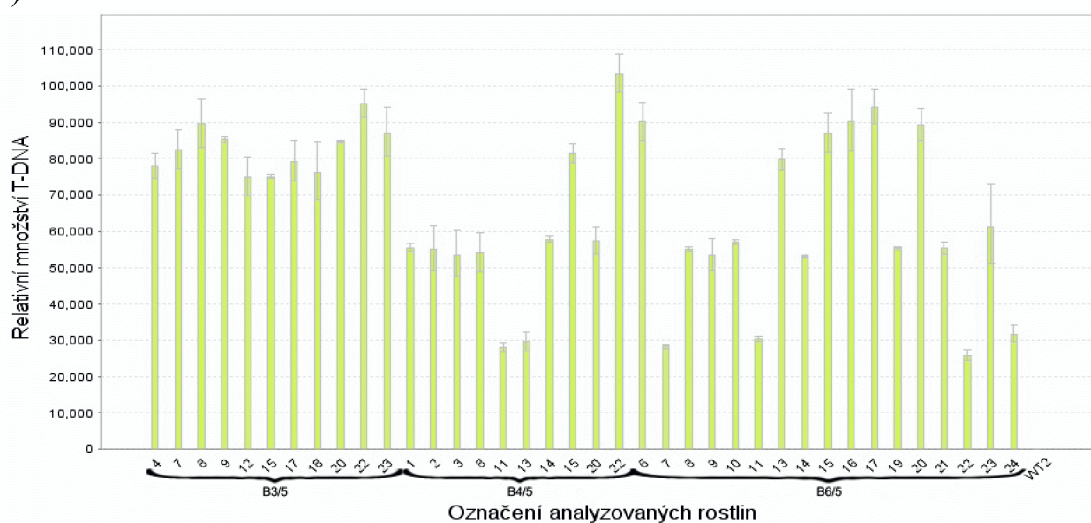
dvou nebo ve více T-DNA inzercích. Mezi potomky rostlin B4/5 a B6/5 lze identifikovat jedince s relativně nízkým množstvím T-DNA, kteří zároveň vykazují přítomnost mutace v cílové oblasti *HvMPK6* genu. Jedná se např. o jedince B4/5/3, B4/5/36 a B4/5/38 (Obr. 4 c1), Tab. 7 c)). V T3 potomstvu těchto jedinců může dojít k vyštěpení rostlin s absencí T-DNA kazety, které budou zároveň vykazovat přítomnost mutace v cílové oblasti *HvMPK6* genu.

V další fázi experimentů byly transgenní rostliny T2 generace genotypovány pro přítomnost mutací v cílové oblasti třetího exonu *HvMPK6* genu. Nejprve byla u 121 testovaných jedinců T2 generace amplifikována cílová oblast třetího exonu *HvMPK6*

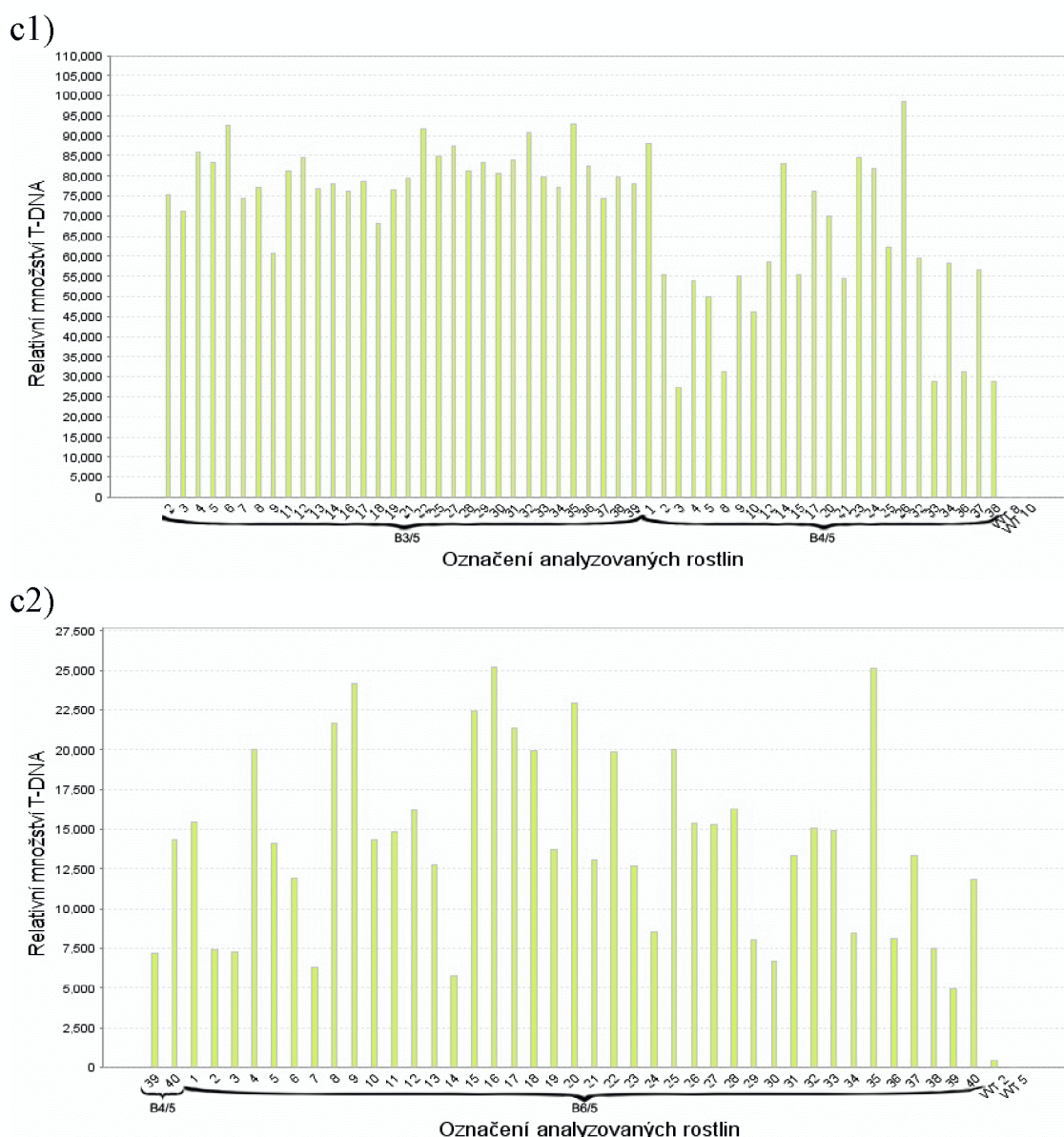
a)



b)



Obr. 4 Genotypování rostlin T2 generace potomků *HvMPK6* knock-out transgenní linie ječmene pomocí Multiplex TaqMan qPCR. a) První opakování. b) Druhé opakování. c1) Třetí opakování, první běh (run). c2) Třetí opakování, druhý běh (run)

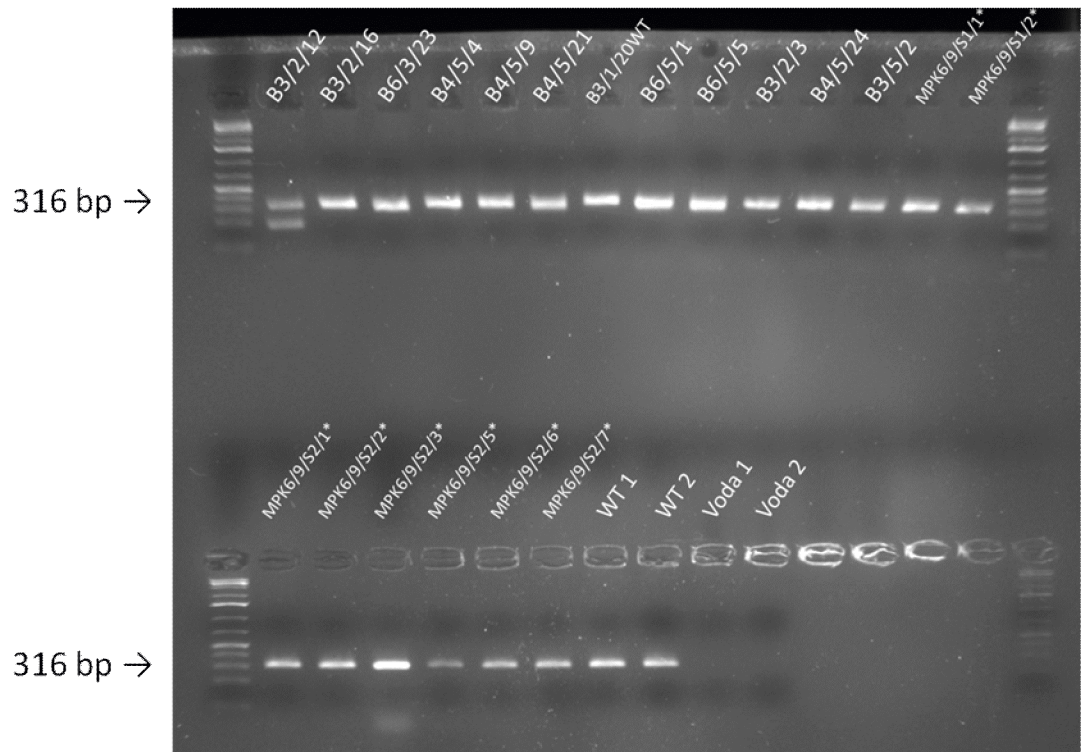


Obr. 4 Genotypování rostlin T2 generace potomků *HvMPK6* knock-out transgenní linie ječmene pomocí Multiplex TaqMan qPCR. a) První opakování. b) Druhé opakování. c1) Třetí opakování, první běh (run). c2) Třetí opakování, druhý běh (run) (*pokračování*).

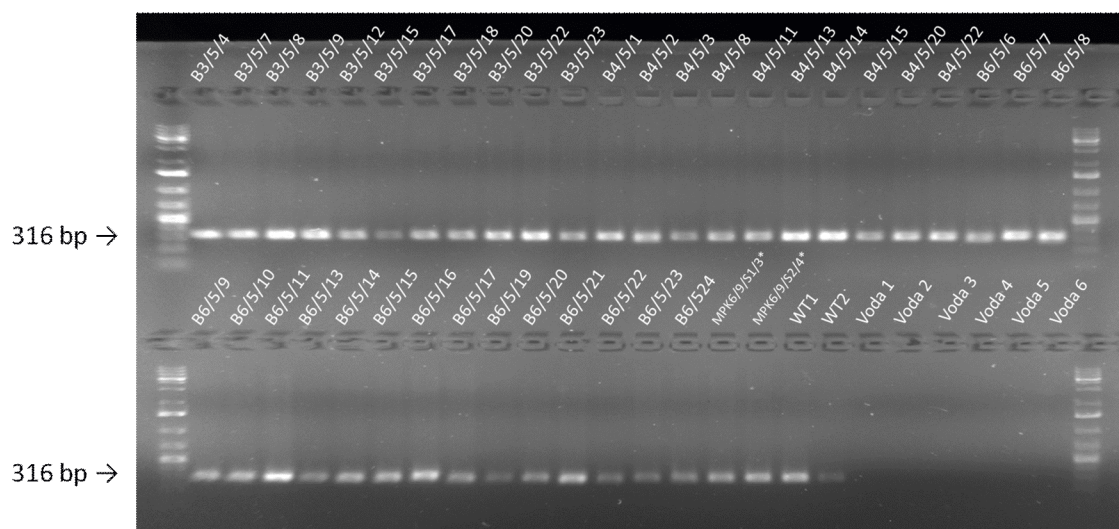
genů pomocí PCR s primery E3F a E3R2 (Tab. 1, Obr. 5). Následně byly získané PCR produkty přečištěny a sekvenovány. Pomocí sekvenace bylo identifikováno celkem 58 jedinců divokého typu a 63 jedinců s překrývajícími se chromatogramy v oblasti protospaceru - mutovaných genotypů (Obr. 6 a), Tab. 7). Nebyl identifikován žádný homozygot v mutaci v cílové oblasti *HvMPK6* genu. Překrývající se chromatogramy indikují, že byla mutována pouze jedna alela, zatímco druhá alela je divokého typu (heterozygoté), nebo že došlo k odlišným mutacím obou alel (bialelické mutace). Nejspolehlivější metodou pro identifikaci alel asociovaných s překrývajícími se chromatogramy je *in vivo* klonování příslušných PCR produktů a následná sekvenace

jednotlivých klonů. Pro klonování bylo vybráno celkem pět PCR produktů, které se lišily počátkem překryvu chromatogramů (Obr. 6 b), Tab. 7 b)). Pro identifikaci pozitivních kolonií byla využita PCR kolonií bakterií (Obr. 7). Výsledky sekvenace

a)



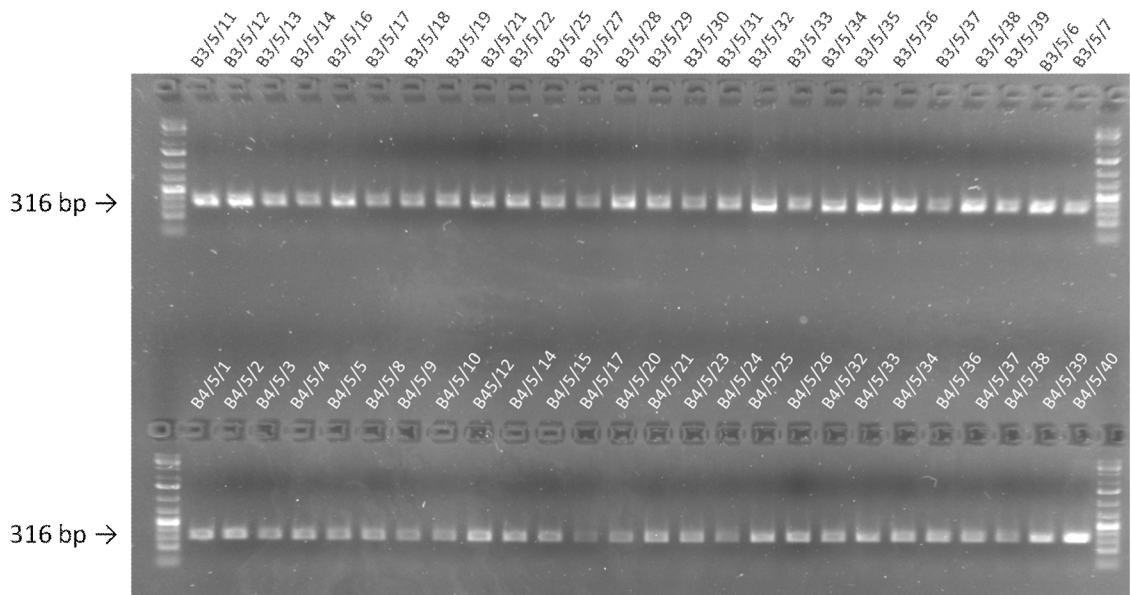
b)



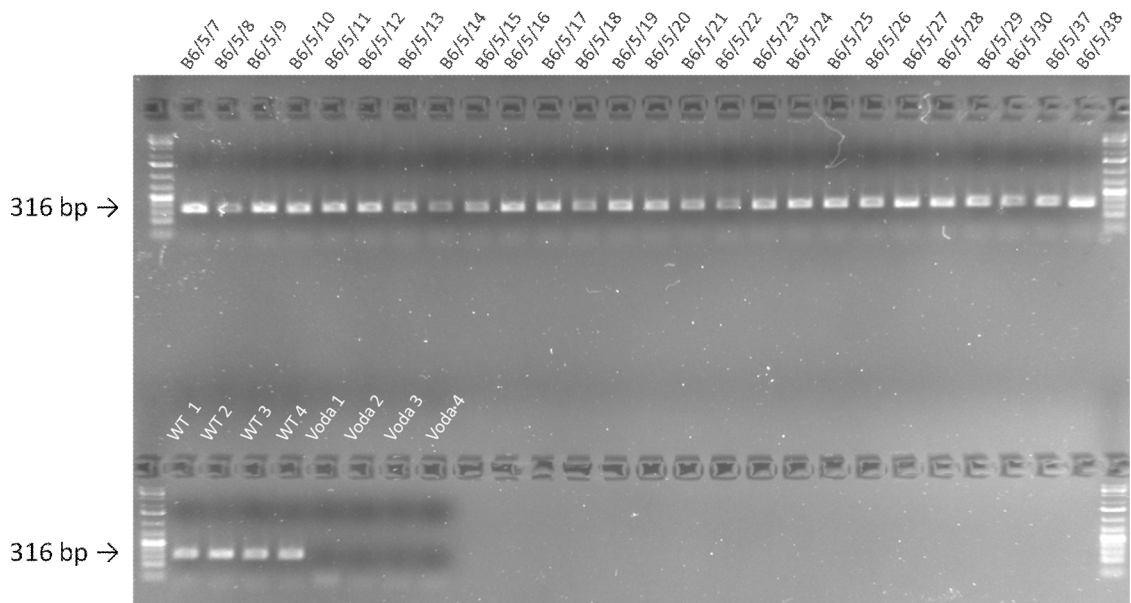
Obr. 5

Amplifikace třetího exonu *HvMPK6* genu pomocí PCR. a) První opakování b) Druhé opakování c) Třetí opakování, první běh. c2) Třetí opakování, druhý běh. Se všemi genotypy byl asociován PCR produkt o přibližně očekávané velikosti 316bp. Rostliny označené hvězdičkou nebyly součástí analýz prováděných v této práci.

c1)



c2)

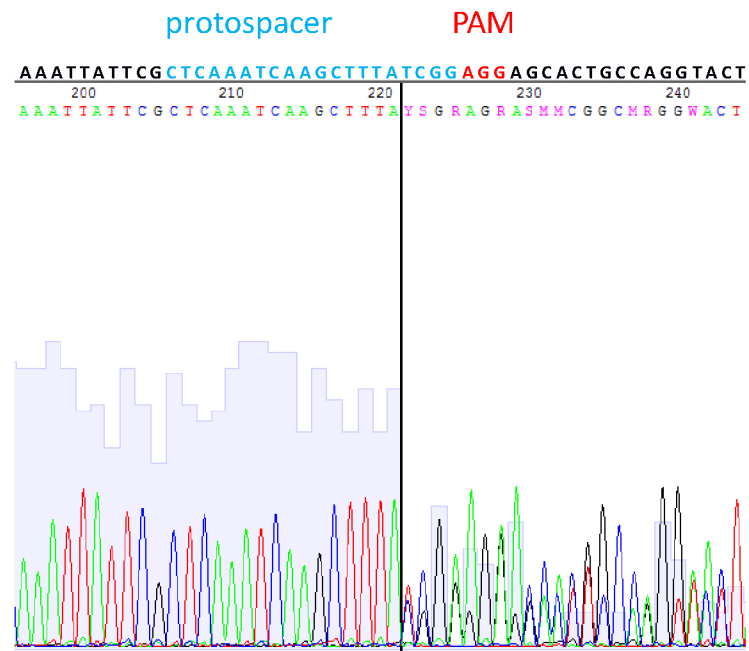


Obr. 5

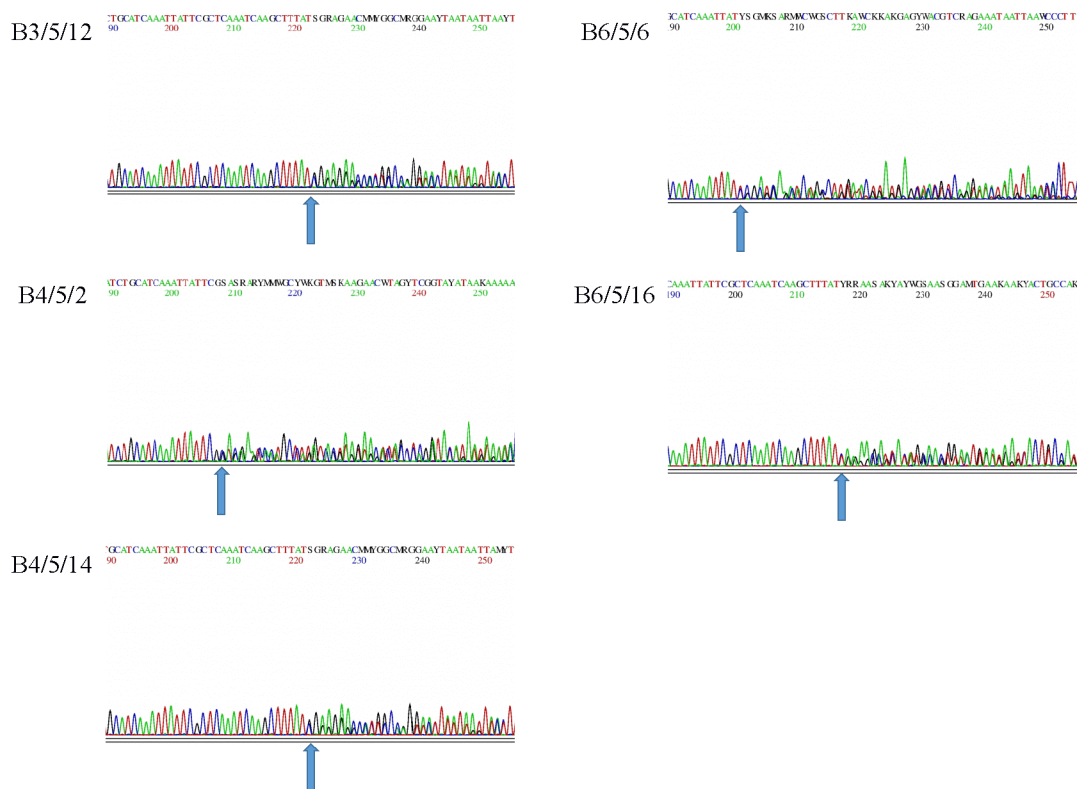
Amplifikace třetího exonu *HvMPK6* genu pomocí PCR. a) První opakování b) Druhé opakování c1) Třetí opakování, první běh. c2) Třetí opakování, druhý běh. Se všemi genotypy byl asociován PCR produkt o přibližně očekávané velikosti 316bp. Rostliny označené hvězdičkou nebyly součástí analýz prováděných v této práci. (pokračování).

jednotlivých klonů ukázaly, že všechny analyzované genotypy obsahovaly alelu divokého typu a mutovanou alelu a jednalo se tedy o heterozygoty v mutaci v cílovém místě *HvMPK6* genu. Identifikované mutované *HvMPK6* alely obsahovaly posunové, respektive knock-out mutace s výjimkou jedné alely, která obsahovala 21 bp inzerci

a)

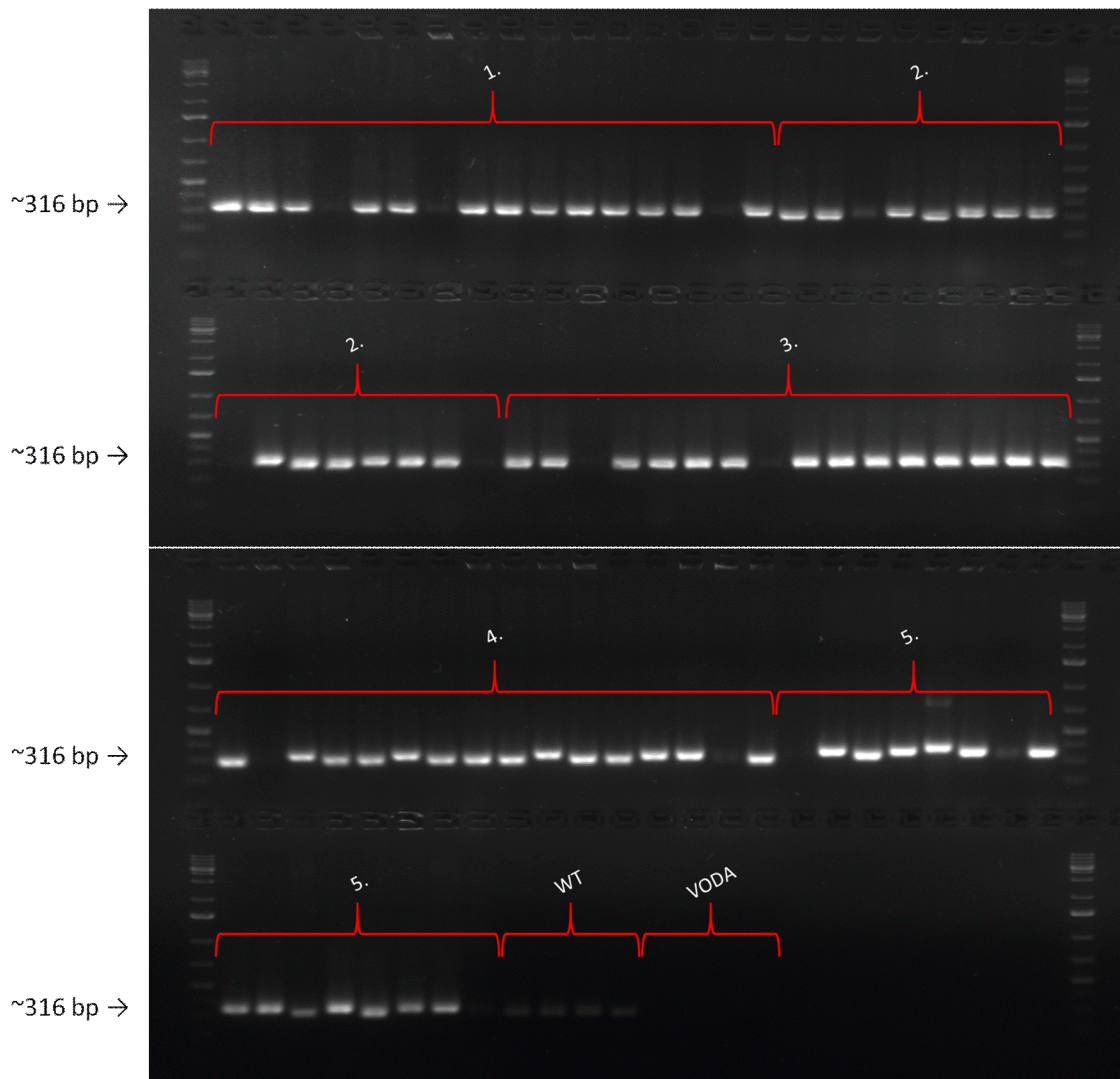


b)



Obr. 6 Překrývající se sekvenační chromatogramy asociované s jedinci, kteří nesou mutace v cílové oblasti *HvMPK6* genu. a) Počátek překryvu chromatogramů, který indukuje vertikální černá čára, se nachází v oblasti protospaceru. b) Jednotlivé typy překrývajících se chromatogramů asociované s příslušnými genotypy. Modrá šipka označuje počátek překryvu chromatogramů. PCR produkty, jejichž sekvenací byly tyto chromatogramy získány byly dále klonovány *in vivo*.

(Obr. 8). Překrývající se chromatogram asociovaný s jedinci B3/5/12 a B4/5/14 (Obr. 6



Obr. 7 Klonování PCR produktů *in vivo* v *Escherichia coli*: PCR jednotlivých kolonií bakterií. Klonovány byly PCR produkty asociované s rostlinami B3/5/12 (1.), B4/5/2 (2.), B4/5/14 (3.), B6/5/6 (4.) a B6/5/16 (5.) Pozitivní kolonii indikuje přítomnost PCR produktu o přibližné velikosti 316 bp. WT – kontrola amplifikace při použití genomické DNA rostlin ječmene divokého typu jako templátu. Voda – negativní kontrola, PCR bez templátu.

b)) byl asociován s naprostou většinou mutovaných potomků rostliny B3/5 (24 jedinců z 26 mutovaných) a také s naprostou většinou mutovaných potomků rostliny B4/5 (24 z 26) (data nejsou prezentována). Tomuto chromatogramu odpovídá heterozygotní kombinace (-1) knock-out *HvMPK6* alely a *HvMPK6* alely divokého typu (Obr. 8). Pouze dva mutovaní potomci rostliny B3/5 a dva mutovaní potomci rostliny B4/5 byli asociováni s jinými typy překrývajících se chromatogramů. Navzdory tomu, každý z 11 mutovaných potomků rostliny B6/5 byl asociován s jiným typem překrývajících se chromatogramů (data nejsou prezentována). Frekvence mutovaných jedinců byla v potomstvu rostliny B6/5 výrazně nižší (11 jedinců / na celkový počet 43 analyzovaných jedinců) než v potomstvech rostlin B3/5 (26/36) a B4/5 (25/38) (Obr. 9).

```

GATCTGCATCAAATTATTTCGCTCAAATCAAGCTTTATCGGAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (REFERENCE)
GATCTGCATCAAATTATTTCGCTCAAATCAAGCTTTATCGGAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (wt)
GATCTGCATCAAATTATTTCGCTCAAATCAAGCTTTAT-GGAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (-1) B3/5/12 a B4/5/14
GATCTGCATCAAATTATTTCG-----GAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (-19) B4/5/2
GATCTGCATCAAATTAT-----CGGAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (-20) B6/5/6

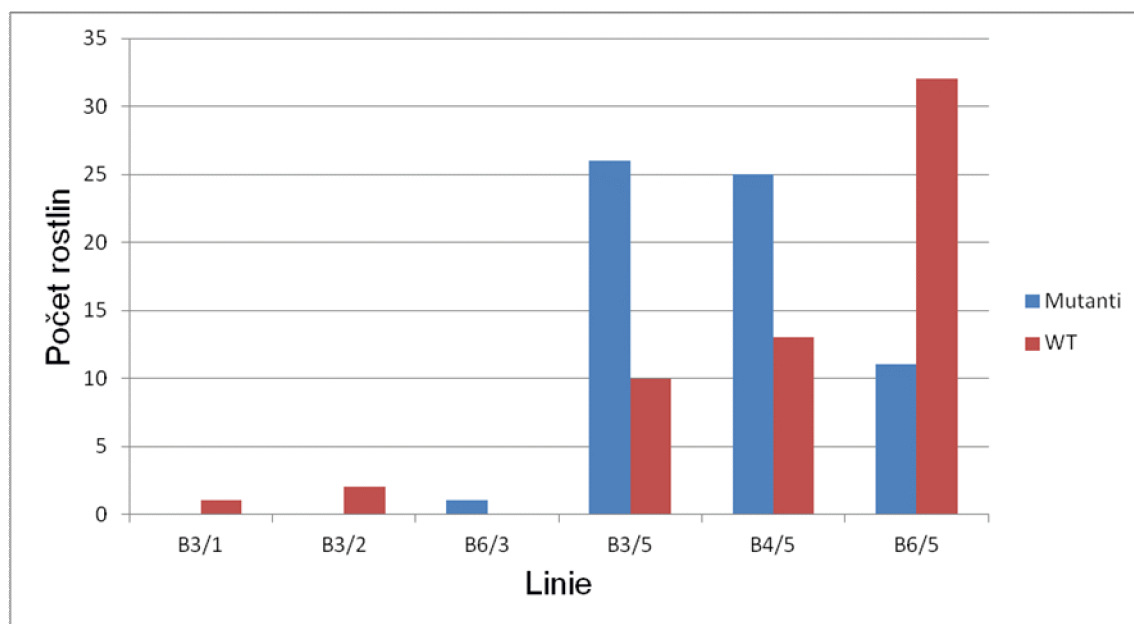
CAAATCAAGCTTTAT-----C-----GAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (REFERENCE)
TCAAATCAAGCTTTATTAAGACCTTATATGAAGTGTATGGAGGAGCACTGCCAG/GTACTTATTAGT (+16, +5) B6/5/16

```

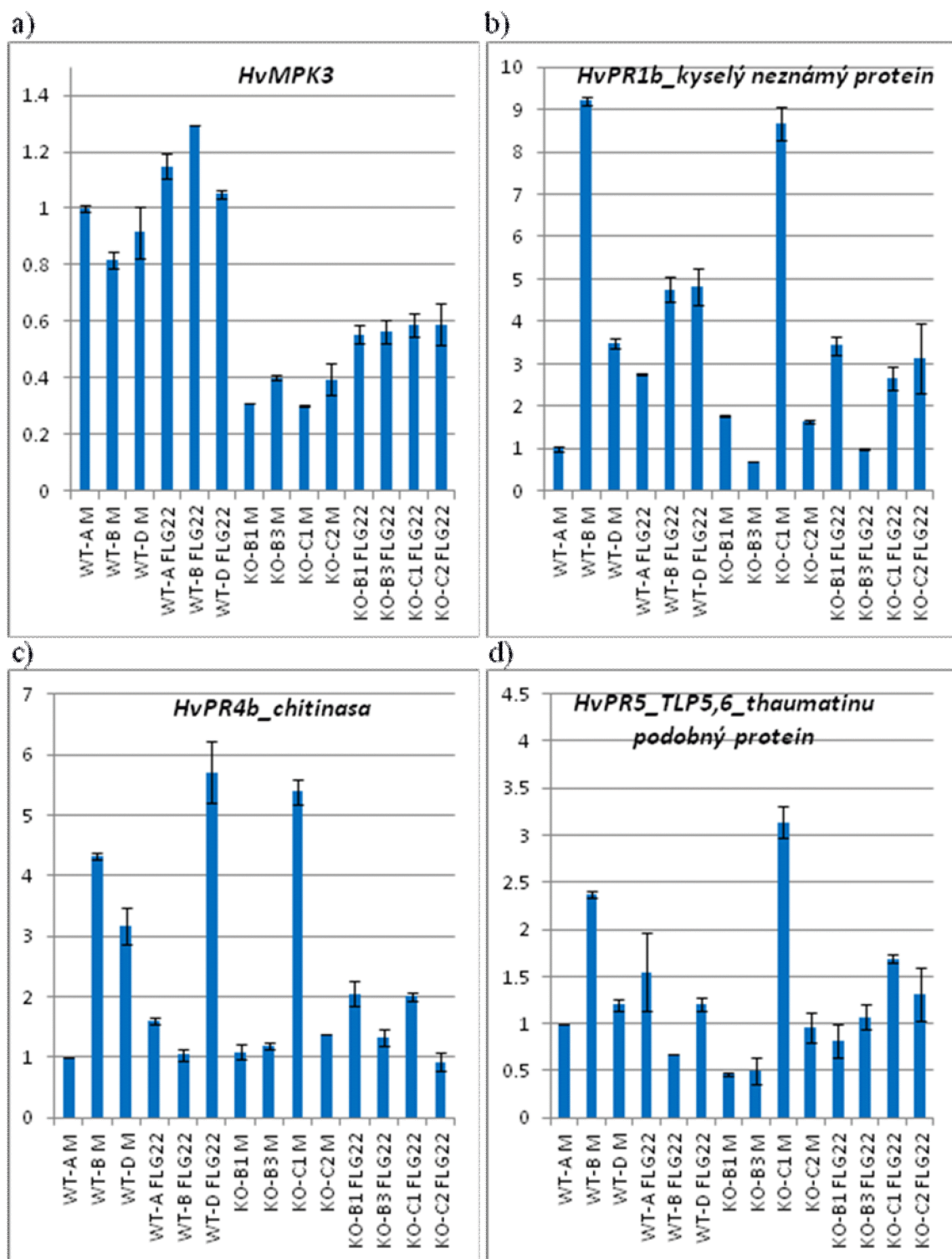
Obr. 8 Mnohočetné přiřazení cílové oblasti identifikovaných *HvMPK6* alel. Červeně je znázorněna oblast protospaceru, podtržené nukleotidy představují PAM místo. Na pravé straně přiřazení jsou v závorce uvedeny typy mutací a označení genotypů, které obsahovaly příslušné *HvMPK6* alely.

4.2 Exprese genů asociovaných s patogenezí (PR) v kořenech *HvMPK3-KO* a kontrolních rostlin ječmene po ošetření flg22

Pro vlastní analýzy byly kromě kontrolních rostlin divokého typu odrůdy ječmene Golden Promise využity také tři nezávislé *HvMPK3-KO* linie ječmene odrůdy Golden Promise. Tyto linie obsahují rozdílné homozygotní knock-out mutace v *HvMPK3* genu indukované TALENem a byly zároveň vyselektovány pro absenci TALENové T-DNA kazety (výsledky diplomových prací Bc. Evy Trejtnarové a Mgr. et Mgr. Terezy Tiché). Nejprve byla analyzována exprese *HvMPK3* genu (kontrola vyřazení *HvMPK3*) a *PR* genů po 15 minutách působení flg22 na kořeny *HvMPK3-KO* a kontrolních rostlin (Obr. 10). Výsledky této analýzy ukázaly přibližně poloviční obsah *HvMPK3* transkriptu u *HvMPK3-KO* rostlin ve srovnání s kontrolními rostlinami (Obr 10 a)). Žádný z testovaných *PR* genů však nebyl konzistentně indukován flg22 (Obr 10 b), c),

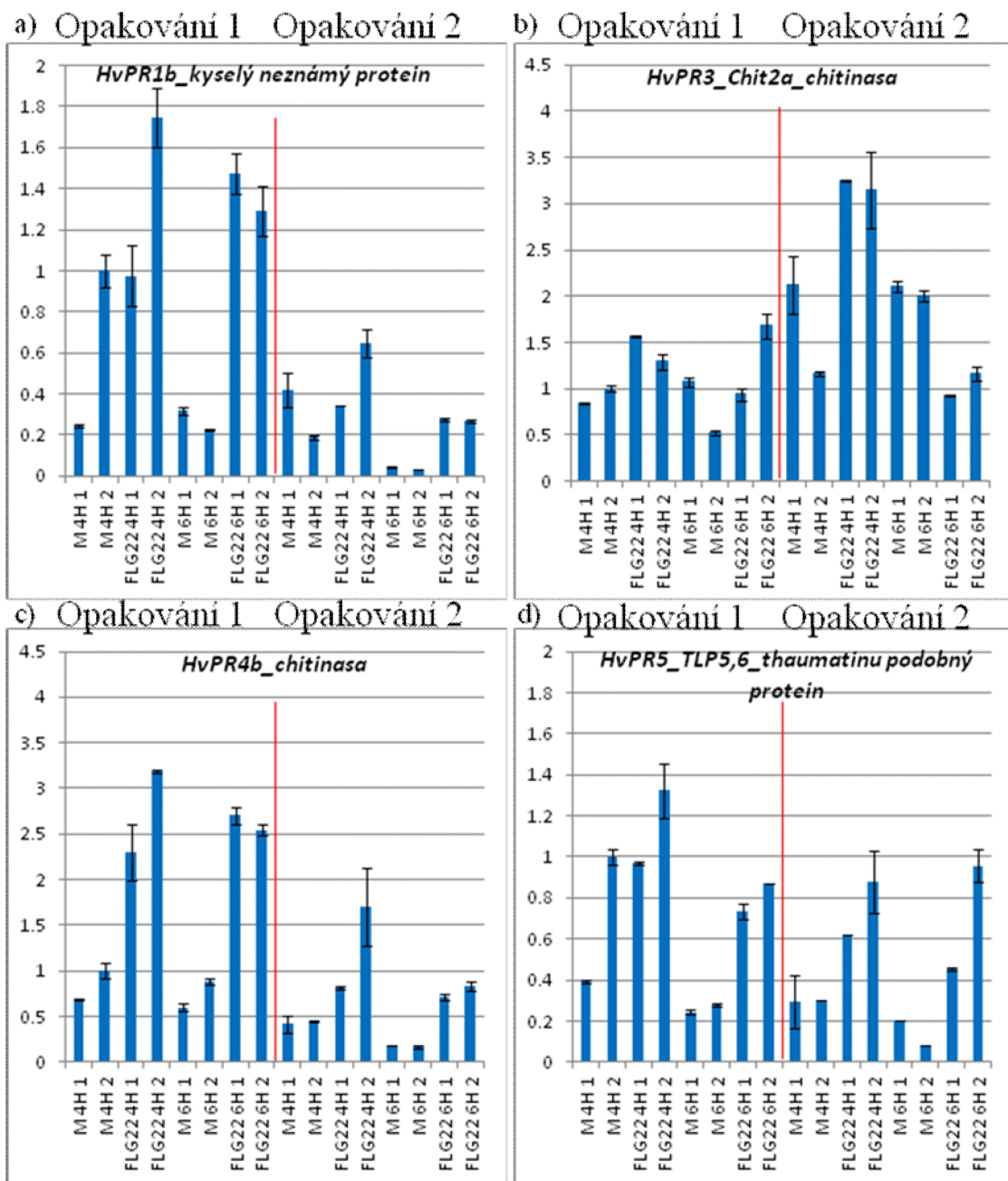


Obr. 9. Absolutní počet jedinců mutovaných v *HvMPK6* genu a jedinců divokého typu v rámci T2 potomstva jednotlivých T1 rostlin.



Obr. 10 Relativní exprese genů asociovaných s patogenezí (*PR*) v kořenech *HvMPK3_KO* a kontrolních linií ječmene po 15 min ošetření 1 μ M flg22. Wt-A, Wt-B, Wt-D - kontrolní linie; KO B, KO-C - *HvMPK3_KO* linie; M - kontrolní ošetření, flg22 - ošetření flg22

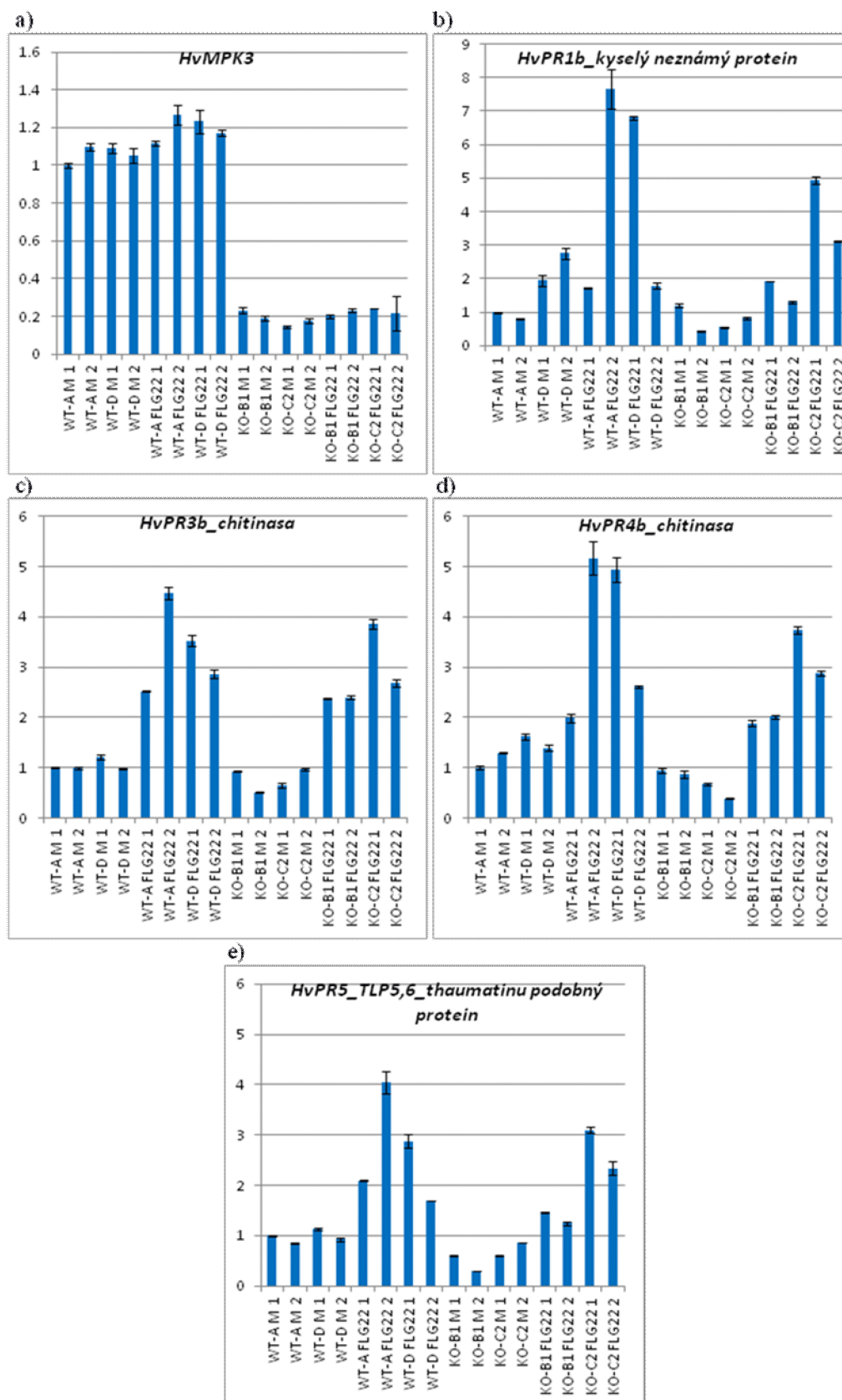
d). Dále byl ve dvou opakováních sledován vliv dlouhodobějšího působení flg22 (4 hodiny a 6 hodin) na indukcii exprese *PR* genů v kořenech rostlin divokého typu (Obr. 11).



Obr. 11 Relativní exprese genů asociovaných s patogenezi (*PR*) v kořenech rostlin divokého typu ječmene po 4 a 6 hod ošetření 1 uM flg22. M – kontrolní ošetření, flg22 – ošetření flg22, 4h – působení flg22 po dobu 4 hodin, 6h – působení flg22 po dobu 6 hodin

Výsledky této analýzy ukázaly konzistentní, přibližně šesti násobnou indukci exprese genu *HvPR1b* po šesti hodinovém působení flg22 (Obr. 11 a)). Obdobně byl po šesti hodinovém působení flg22 konzistentně v kořenech indukován gen *HvPR5_TLP5,6* a to přibližně trojnásobně ve srovnání s působením kontrolních podmínek (Obr. 11 d)). Gen *HvPR4b* byl v kořenech indukován dvou až trojnásobně po čtyř i šesti hodinovém působení flg22, avšak více konzistentní indukce byla opět pozorována po šesti hodinách ošetření flg22 (Obr. 11 c)). Gen *HvPR3* nevykázal konzistentní indukci po

dlouhodobém působení flg22 (Obr. 11 b)). Vzhledem k tomu, že šestihodinové ošetření 1 μ M flg22 vedlo k indukci tří odlišných *PR* genů v kořenech kontrolních rostlin, byl následně realizován experiment s šesti hodinovým působením 1 μ M flg22 na indukci *PR* genů u dvou *HvMPK3-KO* linií (Obr. 12). Výsledky analýzy exprese *HvMPK3* genu ukázaly, že množství *HvMPK3* transkriptu bylo přibližně pěti násobně sníženo v kořenech *HvMPK3-KO* linií ve srovnání s kořeny kontrolních rostlin (Obr. 12 a)). Byla tak potvrzena identita *HvMPK3-KO* linií v rámci experimentu. Byla pozorována dvou a půl až třináásobná indukce exprese genu *HvPR3b* po ošetření kontrolních i *HvMPK3-KO* rostlin, avšak nebyl pozorován rozdíl v míře indukce mezi kontrolními a mutantními rostlinami (Obr. 12 c)). Obdobně byl gen *HvPR5_TLP 5, 6* dvou až tří násobně indukován působením flg22 u kontrolních i *HvMPK3-KO* rostlin (Obr. 12 e)). Množství transkriptu *HvPR5_TLP 5, 6* bylo mírně sníženo u *HvMPK3-KO* linií ve srovnání s kontrolními liniemi (Obr. 12 e)). Geny *HvPR1b* a *HvPR4b* nevykázaly konzistentní indukci po ošetření flg22 v rámci biologických replik (Obr. 12 b) a d)).



Obr. 12 Relativní exprese genů asociovaných s patogenezi (*PR*) v kořenech *HvMPK3_KO* a kontrolních linií ječmene po 6 hod ošetření 1 μ M flg22. Wt-A, Wt-D - kontrolní linie; KO-B1, KO-C2 – *HvMPK3_KO* linie; M – kontrolní ošetření, flg22 – ošetření flg22, 1, 2 – biologické repliky

5 DISKUSE

V předkládané práci bylo genotypováno pomocí sekvenování celkem 121 jedinců T2 generace potomků CRISPR/Cas9 *HvMPK6-KO* linie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise pro přítomnost mutací ve třetím exonu *HvMPK6* genu. Výsledky této analýzy identifikovaly 58 jedinců divokého typu a 63 jedinců mutovaných v oblasti cílového místa (protospaceru) *HvMPK6* genu. Všichni mutovaní jedinci byli asociováni s překrývajícími se chromatogramy a další analýzy zahrnující mj. klonování PCR produktů ukázaly, že se jedná, minimálně v 51 případech (mutovaní potomci rostlin B3/5 a B4/5), o heterozygoty tvořené knock-out alelou *HvMPK6* a alelou *HvMPK6* divokého typu. Potomstvo rostliny B6/5 nebylo vzhledem k hypervariabilitě překrývajících se chromatogramů asociovaných s mutovanými jedinci podrobněji studováno. Nízká frekvence mutovaných jedinců společně s hypervariabilitou chromatogramů však naznačuje, že mateřská rostlina B6/5 byla chimérou mutovaných buněčných linií a buněčné linie divokého typu. Absence jedinců s homozygotní mutací v cílovém místě *HvMPK6* genu mezi relativně velkým počtem 121 analyzovaných jedinců, společně s heterozygotní a nikoli bialelickou povahou mutací u mutovaných jedinců naznačuje, že homozygotní (posunové) mutace v *HvMPK6* genu jsou pravděpodobně letální nebo embryo-letální.

Orthology genu *HvMPK6* byly studovány pomocí reverzně genetických přístupů u modelové dvouděložné rostliny *Arabidopsis thaliana* – *AtMPK6* a modelové jednoděložné rostliny *Oryza sativa* – *OsMPK6* (Bush a Krysan 2007; Müller et al., 2010; López-Bucio et al., 2014; Liu et al., 2015; Yi et al., 2016; Minkenberg et al., 2017). Široká škála fenotypových projevů byla popsána u *AtMPK6* knock-out mutantu *A. thaliana*. Analýza délky kořene u mutantních semenáčků ukázala výrazně opožděný vývoj a růst kořenů ve srovnání s kontrolními semenáčky ekotypu Col-0 (Müller et al., 2010). Dále bylo demonstrováno, že knock-out mutace v *AtMPK6* způsobuje abnormální vývoj embryí, který vede k tvorbě tří kategorií typů semen (Bush a Krysan 2007; López-Bucio et al., 2014). V průběhu klíčení a růstu rostlin jsou pak s těmito kategoriemi semen asociovány změny v architektuře tvorby kořenů (López-Bucio et al., 2014). Mutantní rostliny *A. thaliana* také vykázaly sníženou samčí plodnost, abnormální vývoj tyčinek a tvorbu kratších šesulí (Bush a Krysan 2007). *AtMPK6* knock-out mutantní *A. thaliana* však vždy dokončí životní cyklus, jsou plodní a vytváří semena. Na rozdíl od *A. thaliana* je u *O. sativa* popsán embryo-letální fenotyp knock-out mutací

v *OsMPK6* (Yi *et al.*, 2016; Minkenberg *et al.*, 2017). Defektní embryo homozygotních mutantů v *OsMPK6* nevytváří embryonální orgány, respektive jeho vývoj je zastaven v globulárním stádiu (Yi *et al.*, 2016). Jiná pozorování však ukazují, že knock-out mutanti v *OsMPK6* jsou zakrslí, mají vzpřímené listy a vytváří malá semena, při zachování plodnosti (Liu *et al.*, 2015). Výsledky získané v této práci naznačují, že homozygotní knock-out mutace v *HvMPK6* pravděpodobně způsobují u ječmene letalitu nebo embryo-letalitu, což by bylo v souladu s pozorováním Yi *et al.*, 2016, Minkenberg *et al.*, 2017 u rýže. Bylo by však zapotřebí dalších experimentů, které by prokázaly, že část T2 semen *HvMPK6-KO* linie obsahuje defektní embryo, která nekličí a navíc, že tato defektní embryo jsou homozygotní v knock-out mutaci/ mutacích v *HvMPK6* genu.

V předkládané práci byl dále sledován vliv ošetření 1 μ M flg22 na expresi *PR* genů v kořenech *HvMPK3-KO* a kontrolních linií ječmene. Nejprve byla optimalizována délka působení flg22, kdy byl sledován vliv 15ti minutového, čtyř a šestihodinového ošetření na indukci vybraných *PR* genů. Bylo zjištěno, že *PR* geny jsou konzistentně indukovány v kořenech kontrolních rostlin po šesti hodinách působení flg22. Následně byla sledována indukce *PR* genů v kořenech *HvMPK3-KO* linií po šesti hodinovém působení flg22. Nebyl však pozorován výrazný rozdíl v expresi a v míře indukce *PR* genů u *HvMPK3-KO* a kontrolních rostlin. Původně byla očekávána snížená indukce *PR* genů u *HvMPK3-KO* linií, protože *AtMAPK3* (ortholog *HvMPK3*) zvyšuje prostřednictvím fosforylace transkripčního faktoru *VIP1* expresi *PRI* genu u *A. thaliana* (Djamei *et al.*, 2007). Dále pak také *MPK3* a *MPK6 Arabidopsis* indukují prostřednictvím fosforylace transkripčního faktoru *ERF6* expresi řady genů obranné odpovědi vůči patogenům, včetně genů kódujících *PR* proteiny defensiny (Meng *et al.*, 2013). Z pozorovaných výsledků absence regulace exprese *PR* genů prostřednictvím *HvMPK3* u ječmene však nelze činit jednoznačné závěry. V průběhu ošetření byly rostliny kultivovány v tekutém živném médiu na světle. Kořeny rostlin tak byly vystaveny nedostatku kyslíku a oxidativnímu stresu v důsledku přímé iluminace. Zvýšené míře stresu kořenů by odpovídala i pozorovaná vysoká úroveň exprese *PR* genů (Ct = 22-28) u rostlin vystavených kontrolnímu ošetření (bez flg22). Principiálně by měla být exprese *PR* genů za absence stresových podmínek nízká. S vysokou mírou stresu kořenů může také souviset pozorovaná relativně nízká míra indukce *PR* genů flg22, která byla u kontrolních rostlin maximálně šestinásobná. Například u *Arabidopsis* byla pozorována až 40ti násobná indukce *PRI* genu pro ošetření 1 μ M flg22 (Denoux *et al.*, 2008). Je možné, že by za méně stresových podmínek rozdíly v expresi *PR* genů

mezi *HvMPK3-KO* a kontrolními liniemi byly po ošetření flg22 pozorovány. Z časových důvodů nebylo v práci realizováno ošetření listů flg22, při kterém lze působení nežádoucích stresových faktorů minimalizovat. Jako vhodný se v této souvislosti jeví především postřik listů klíčících rostlin pěstovaných nesterilně v půdě roztokem flg22 pomocí rozprašovače (Meng *et al.*, 2019).

6 ZÁVĚRY

- 1) CRISPR/Cas9 indukované homozygotní (posunové) mutace v genu pro mitogenem aktivovanou proteinkinásu 6 HvMPK6 ječmene setého (*Hordeum vulgare*) jsou letální nebo embryo-letální.
- 2) V T2 generaci byli identifikováni jedinci s mutovaným genem *HvMPK6* a současně s nízkým relativním množstvím CRISPR/Cas9 T-DNA. V jejich potomstvu mohou vyštěpit rostliny s mutací v *HvMPK6* a zároveň s absencí T-DNA.
- 3) Optimální doba působení flg22 pro indukci exprese genů asociovaných s patogenezí (*PR* genů) v kořenech ječmene setého je 6 hodin.
- 4) Nebyl pozorován rozdíl ve flg22 indukované expresi *PR* genů mezi liniemi ječmene setého s vyřazeným genem pro mitogenem aktivovanou proteinkinásu 3 HvMPK3 a kontrolními liniemi.

7 LITERATURA

- Agrios G.N. (1997): How plants defend themselves against pathogens. *Plant pathology*, 93-114.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M.R., Chiu W.L., Gomez-Gomez L., Boller T., Ausubel F.M., Sheen J. (2002): MAP kinase signaling cascade in Arabidopsis innate immunity. *Nature* **415**, 977-983.
- Bahar O., Pruitt R., Luu, D.D., Schwessinger B., Daudi A., Liu, F., Ruan R., Fontaine-Bodin L., Koebnik R., Ronald P. (2014): The Xanthomonas Ax21 protein is processed by the general secretory system and is secreted in association with outer membrane vesicles. *PeerJ* **2**, e242.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., Moineau S., Romero D.A., Horvath P. (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* **315**, 1709-1712.
- Bartlett J.G., Alves S.C., Smedley M., Snape J.W., Harwood W.A. (2008): High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation. *Plant Methods* **4**, 22.
- Bethke G., Pecher P., Eschen-Lippold L., Tsuda K., Katagiri F., Glazebrook J., Scheel D., Lee J. (2012): Activation of the Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase MPK11 by the flagellin-derived elicitor peptide, flg22. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 471-480.
- Bi G., Zhou Z., Wang W., Li L., Rao S., Wu Y., Zhang X., Menke F.L.H., Chen S., Zhou, J.M. (2018): Receptor-like cytoplasmic kinases directly link diverse pattern recognition receptors to the activation of mitogen-activated protein kinase cascades in Arabidopsis. *The Plant Cell* **30**, 1543-1561.
- Boch J. (2011): TALEs of genome targeting. *Nature biotechnology*, **29**, 135.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512.
- Boller T., Felix G. (2009): A renaissance of elicitors: perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. *Annual review of plant biology* **60**, 379-406.
- Brooks C., Nekrasov V., Lippman Z.B., Van Eck J. (2014): Efficient gene editing in tomato in the first generation using the clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated9 system. *Plant physiology* **166**, 1292-1297
- Bush S.M., Krysan P J. (2007): Mutational evidence that the Arabidopsis MAP kinase MPK6 is involved in anther, inflorescence, and embryo development. *Journal of experimental botany* **58**, 2181-2191.
- Cao Y., Liang Y., Tanaka K., Nguyen C.T., Jedrzejczak R.P., Joachimiak A., Stacey G. (2014): The kinase LYK5 is a major chitin receptor in Arabidopsis and forms a chitin-induced complex with related kinase CERK1. *elife* **3**, e03766.
- Carroll D. (2011): Genome engineering with zinc-finger nucleases. *Genetics* **188**, 773-782.
- Clarke C.R., Chinchilla D., Hind S.R., Taguchi F., Miki R., Ichinose Y., Martin G.B., Leman S., Felix G., Vinatzer B.A. (2013): Allelic variation in two distinct Pseudomonas syringae flagellin epitopes modulates the strength of plant immune responses but not bacterial motility. *New Phytologist* **200**, 847-860.
- Cong L., Ran F.A., Cox D., Lin S., Barretto R., Habib N., Hsu P.D., Wu X., Jiang W., Marraffini L.A., Zhang F. (2013): Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science* **339**, 819-823.
- Couch B.C., Spangler R., Ramos C., May G. (2006): Pervasive purifying selection characterizes the evolution of I2 homologs. *Molecular plant-microbe interactions* **19**, 288-303.
- Cui H., Tsuda K., Parker J.E. (2015): Effector-triggered immunity: from pathogen perception to robust defense. *Annual review of plant biology*, **66**, 487-511.
- Dangl J.L., Horvath D.M., Staskawicz B.J. (2013): Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Science* **341**, 746-751.
- Denoux C., Galletti R., Mammarella N., Gopalan S., Werck D., De Lorenzo G., Ferrari S., Ausubel F.M., Dewdney J. (2008): Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. *Molecular plant* **1**, 423-445.

- Djamei A., Pitzschke A., Nakagami H., Rajh I., Hirt H. (2007): Trojan horse strategy in *Agrobacterium* transformation: abusing MAPK defense signaling. *Science* **318**, 453-456.
- Dodds P.N., Rathjen J.P. (2010). Plant immunity: towards an integrated view of plant–pathogen interactions. *Nature Reviews Genetics* **11**, 539-548.
- Dow M., Newman M.A., Von Roepenack E. (2000): The induction and modulation of plant defense responses by bacterial lipopolysaccharides. *Annual review of phytopathology* **38**, 241-261.
- Durrant W.E., Dong X. (2004): Systemic acquired resistance. *Annu. Rev. Phytopathol.* **42**, 185-209.
- Erbs G., Newman M.A. (2012): The role of lipopolysaccharide and peptidoglycan, two glycosylated bacterial microbe-associated molecular patterns (MAMPs), in plant innate immunity. *Molecular plant pathology* **13**, 95-104.
- Fan J., Crooks C., Creissen G., Hill L., Fairhurst S., Doerner P., Lamb C. (2011): *Pseudomonas sax* genes overcome aliphatic isothiocyanate-mediated non-host resistance in *Arabidopsis*. *Science* **331**, 1185-1188.
- Fausser F., Schiml S., Puchta H. (2014): Both CRISPR/C as-based nucleases and nickases can be used efficiently for genome engineering in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **79**, 348-359.
- Felix G., Boller T. (2003): Molecular Sensing of Bacteria in Plants the highly conserved RNA-binding motif rnp-1 of bacterial cold shock proteins is recognized as an elicitor signal in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* **278**, 6201-6208.
- Felix G., Duran J. D., Volko S., Boller T. (1999): Plants have a sensitive perception system for the most conserved domain of bacterial flagellin. *The Plant Journal* **18**, 265-276.
- Feng Z., Mao Y., Xu N., Zhang B., Wei P., Yang D.L., Wang Z., Zhang Z., Zheng R., Yang L., Zeng L., Liu X., Zhu J.K. (2014): Multigeneration analysis reveals the inheritance, specificity, and patterns of CRISPR/Cas-induced gene modifications in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 4632-4637.
- Feng Z., Zhang B., Ding W., Liu X., Yang D.L., Wei P., Cao F., Zhu S., Zhang F., Mao Y., Zhu, J. K. (2013): Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system. *Cell research* **23**, 1229-1232.
- Flor H.H. (1947): Inheritance of reaction to rust in flax. *J. agric. Res* **74**, 41.
- Fritz-Laylin L.K., Krishnamurthy N., Tör M., Sjölander K.V., Jones, J.D. (2005): Phylogenomic analysis of the receptor-like proteins of rice and *Arabidopsis*. *Plant physiology* **138**, 611-623.
- Fu, Z.Q., Dong X. (2013): Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. *Annual review of plant biology* **64**, 839-863.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnys V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, E2579-E2586.
- Gómez-Gómez, L., & Boller, T. (2000). FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Molecular cell*, **5**(6), 1003-1011.
- Gómez-Gómez L., Felix G., Boller T. (1999): A single locus determines sensitivity to bacterial flagellin in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* **18**, 277-284.
- Gong B. Q., Guo J., Zhang N., Yao X., Wang H.B., Li J.F. (2019): Cross-microbial protection via priming a conserved immune co-receptor through juxtamembrane phosphorylation in plants. *Cell Host & Microbe* **26**, 810-822.
- Grant S.R., Fisher E.J., Chang J.H., Mole B.M., Dangl J.L. (2006): Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* **60**, 425-449.
- Guilinger J.P., Thompson D.B., Liu D.R. (2014): Fusion of catalytically inactive Cas9 to FokI nuclease improves the specificity of genome modification. *Nature biotechnology* **32**, 577.

- Gust A.A., Willmann R., Desaki Y., Grabherr H.M., Nürnberger T. (2012): Plant LysM proteins: modules mediating symbiosis and immunity. *Trends in plant science* **17**, 495-502.
- Han L., Li G.J., Yang K.Y., Mao G., Wang R., Liu Y., Zhang S. (2010): Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate Botrytis cinerea-induced ethylene production in Arabidopsis. *The Plant Journal* **64**, 114-127.
- Hann D.R., Rathjen, J.P. (2007): Early events in the pathogenicity of Pseudomonas syringae on Nicotiana benthamiana. *The Plant Journal* **49**, 607-618.
- Hatsugai N., Igarashi D., Mase K., Lu Y., Tsuda Y., Chakravarthy S., Wei H.L., Foley J.W., Collmer A., Glazebrook J., Katagiri F. (2017): A plant effector-triggered immunity signaling sector is inhibited by pattern-triggered immunity. *The EMBO journal* **36**, 2758-2769.
- Hayafune M., Berisio R., Marchetti R., Silipo A., Kayama M., Desaki Y., Arima S., Squeglia F., Ruggiero A., Tokuyasu K., Molinaro A., Kaku H., Shibuya N. (2014): Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, E404-E413.
- Heese A., Hann D.R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M., He K., Li J., Schroeder J.I., Peck S.C., Rathjen J.P. (2007): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 12217-12222.
- Hind S.R., Strickler S.R., Boyle P.C., Dunham D.M., Bao Z., O'Doherty I.M., Baccile J.A., Hoki J.S., Viox E.G., Clarke C.R., Vinatzer B.A., Schroeder F.C., Martin G.B. (2016): Tomato receptor FLAGELLIN-SENSING 3 binds flgII-28 and activates the plant immune system. *Nature plants* **2**, 1-8.
- Horvath P., Barrangou R. (2010): CRISPR/Cas, the immune system of bacteria and archaea. *Science* **327**, 167-170.
- Huitema E., Vleeshouwers V.G., Francis D.M., Kamoun S. (2003): Active defence responses associated with non-host resistance of Arabidopsis thaliana to the oomycete pathogen Phytophthora infestans. *Molecular plant pathology* **4**, 487-500.
- Char S.N., Unger-Wallace E., Frame B., Briggs S.A., Main M., Spalding M.H., Vollbrecht E., Wang K., Yang B. (2015): Heritable site-specific mutagenesis using TALEN s in maize. *Plant biotechnology journal* **13**, 1002-1010.
- Che F.S., Nakajima Y., Tanaka N., Iwano M., Yoshida T., Takayama S., Kadota I., Isogai A. (2000): Flagellin from an incompatible strain of Pseudomonas avenae induces a resistance response in cultured rice cells. *Journal of Biological Chemistry* **275**, 32347-32356.
- Chinchilla D., Bauer Z., Regenass M., Boller T., Felix G. (2006): The Arabidopsis receptor kinase FLS2 binds flg22 and determines the specificity of flagellin perception. *The Plant Cell* **18**, 465-476.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., Jones J.D., Felix G., Boller T. (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* **448**, 497-500.
- Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Christian M., Qi Y., Zhang Y., Voytas D.F. (2013): Targeted mutagenesis of Arabidopsis thaliana using engineered TAL effector nucleases. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **3**, 1697-1705.
- Ingle R.A., Carstens M., Denby K.J. (2006): PAMP recognition and the plant-pathogen arms race. *Bioessays* **28**, 880-889.
- Janeway Jr C.A., Medzhitov R. (2002): Innate immune recognition. *Annual review of immunology* **20**, 197-216.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *science* **337**, 816-821.
- Jones J.D., Dangl J.L. (2006): The plant immune system. *nature* **444**, 323-329.

- Kamoun S. (2001): Nonhost resistance to Phytophthora: novel prospects for a classical problem. *Current opinion in plant biology* **4**, 295-300.
- Keinath N.F., Waadt R., Brugman R., Schroeder J.I., Grossmann G., Schumacher K., Krebs M. (2015): Live cell imaging with R-GECO1 sheds light on flg22-and chitin-induced transient $[Ca^{2+}]$ cyt patterns in Arabidopsis. *Molecular plant* **8**, 1188-1200.
- Kemmerling B., Halter T., Mazzotta S., Mosher S., Nürnberger T. (2011): A genome-wide survey for Arabidopsis leucine-rich repeat receptor kinases implicated in plant immunity. *Frontiers in plant science* **2**, 88.
- Kim Y.G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to Fok I cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **93**, 1156-1160.
- Kim J.S., Pabo C.O. (1998): Getting a handhold on DNA: design of poly-zinc finger proteins with femtomolar dissociation constants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **95**, 2812-2817.
- Křenek P., Niks R.E., Vels A., Vyplelová P., Šamaj J. (2015): Genome-wide analysis of the barley MAPK gene family and its expression patterns in relation to Puccinia hordei infection. *Acta physiologiae plantarum* **37**, 254.
- Kruijt M., de Kock M.J., de Wit P.J. (2005): Receptor-like proteins involved in plant disease resistance. *Molecular plant pathology* **6**, 85-97.
- Lee C.G., Da Silva C.A., Lee J.Y., Hartl D., Elias J.A. (2008): Chitin regulation of immune responses: an old molecule with new roles. *Current opinion in immunology* **20**, 684-689.
- Li J.F., Norville J.E., Aach J., McCormack M., Zhang D., Bush J., Church G.M., Sheen J. (2013): Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in Arabidopsis and Nicotiana benthamiana using guide RNA and Cas9. *Nature biotechnology* **31**, 688-691.
- Li T., Liu B., Spalding M.H., Weeks D.P., Yang B. (2012): High-efficiency TALEN-based gene editing produces disease-resistant rice. *Nature biotechnology* **30**, 390.
- Lin W., Li B., Lu D., Chen S., Zhu N., He P., Shan L. (2014): Tyrosine phosphorylation of protein kinase complex BAK1/BIK1 mediates Arabidopsis innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 3632-3637.
- Liu T., Liu Z., Song C., Hu Y., Han Z., She J., Fan F., Wang J., Jin C., Chang J., Zhou J.M., Chai J. (2012): Chitin-induced dimerization activates a plant immune receptor. *Science* **336**, 1160-1164.
- Liu S., Hua L., Dong S., Chen H., Zhu X., Jiang J.E., Chen F. (2015): Os MAPK 6, a mitogen-activated protein kinase, influences rice grain size and biomass production. *The Plant Journal* **84**, 672-681.
- Liu Q., Segal D.J., Ghiara J.B., Barbas, C.F. (1997): Design of polydactyl zinc-finger proteins for unique addressing within complex genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **94**, 5525-5530.
- Liu Y., Zhang S. (2004): Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **16**, 3386-3399.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $^{-\Delta\Delta CT}$ Method. *Methods* **25**, 402-408.
- Lloyd A., Plaisier C.L., Carroll D., Drews G.N. (2005): Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 2232-2237.
- López-Bucio J.S., Dubrovsky J.G., Raya-González J., Ugartechea-Chirino Y., López-Bucio J., de Luna-Valdez L.A., Ramos-Vega M., León P., Guevara-García A.A. (2014): Arabidopsis thaliana mitogen-activated protein kinase 6 is involved in seed formation and modulation of primary and lateral root development. *Journal of experimental botany* **65**, 169-183.
- Lu D., Wu S., Gao X., Zhang Y., Shan L., He P. (2010): A receptor-like cytoplasmic kinase, BIK1, associates with a flagellin receptor complex to initiate plant innate immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 496-501.
- Macho A.P., Zipfel C. (2014): Plant PRRs and the activation of innate immune signaling. *Molecular cell* **54**, 263-272.

- Mali P., Aach J., Stranges P.B., Esvelt K.M., Moosburner M., Kosuri S., Yang L., Church G.M. (2013): CAS9 transcriptional activators for target specificity screening and paired nickases for cooperative genome engineering. *Nature biotechnology* **31**, 833.
- Makarova K.S., Grishin N.V., Shabalina S.A., Wolf Y.I., Koonin E.V. (2006): A putative RNA-interference-based immune system in prokaryotes: computational analysis of the predicted enzymatic machinery, functional analogies with eukaryotic RNAi, and hypothetical mechanisms of action. *Biology direct* **1**, 7.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., Zhang S. (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* **23**, 1639-1653.
- Meng Q., Gupta R., Min C.W., Kim J., Kramer K., Wang Y., Park S.R., Finkemeier I., Kim, S.T. (2019): A proteomic insight into the MSP1 and flg22 induced signaling in *Oryza sativa* leaves. *Journal of proteomics* **196**, 120-130.
- Meng X., Xu J., He Y., Yang K.Y., Mordorski B., Liu, Y., Zhang S. (2013): Phosphorylation of an ERF transcription factor by Arabidopsis MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *The Plant Cell* **25**, 1126-1142.
- Mentlak T.A., Kombrink A., Shinya T., Ryder L.S., Otomo I., Saitoh H., Terauchi R., Nishizawa Y., Shibuya N., Thomma B.P., Talbot N.J. (2012): Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. *The Plant Cell* **24**, 322-335.
- Miller J.C., Tan S., Qiao G., Barlow K.A., Wang J., Xia D.F., Meng X., Paschon D.E., Leung E., Hinkley S.J., Dulay G.P., Hua K.L., Ankoudinova I., Cost G.J., Urnov F.D., Zhang H.S., Holmes M.C., Zhang L., Gregory P.D., Rebar E.J. (2011): A TALE nuclease architecture for efficient genome editing. *Nature biotechnology* **29**, 143.
- Mindrinos M., Katagiri F., Yu G.L., Ausubel F.M. (1994): The *A. thaliana* disease resistance gene RPS2 encodes a protein containing a nucleotide-binding site and leucine-rich repeats. *Cell* **78**, 1089-1099.
- Minkenberg B., Xie K., Yang Y. (2017): Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes. *The Plant Journal* **89**, 636-648.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., Shirasu K., Narusaka Y., Kawakami N., Kaku H., Shibuya N. (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signaling in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104**, 19613-19618.
- Mojica F.J., Díez-Villaseñor C., García-Martínez J., Almendros C. (2009): Short motif sequences determine the targets of the prokaryotic CRISPR defence system. *Microbiology* **155**, 733-740.
- Monaghan J., Zipfel C. (2012): Plant pattern recognition receptor complexes at the plasma membrane. *Current opinion in plant biology* **15**, 349-357.
- Moroz N., Tanaka K. (2020): FlgII-28 Is a Major Flagellin-Derived Defense Elicitor in Potato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **33**, 247-255.
- Moscou M.J., Bogdanove, A.J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501-1501.
- Müller J., Beck M., Mettbach U., Komis G., Hause G., Menzel D., Šamaj J. (2010): Arabidopsis MPK6 is involved in cell division plane control during early root development, and localizes to the pre-prophase band, phragmoplast, trans-Golgi network and plasma membrane. *The Plant Journal* **61**, 234-248.
- Müller A.N., Ziemann S., Treitschke S., Aßmann D., Doehlemann G. (2013): Compatibility in the *Ustilago maydis*-maize interaction requires inhibition of host cysteine proteases by the fungal effector Pit2. *PLoS pathogens* **9**.
- Muzzarelli R.A. (1977): *Chitin*. 1st ed., Pergamon Press Ltd, Headington Hill Hall, England, 308 stran.
- Naito K., Ishiga Y., Toyoda K., Shiraiishi T., Ichinose Y. (2007): N-terminal domain including conserved flg22 is required for flagellin-induced hypersensitive cell death in Arabidopsis thaliana. *Journal of General Plant Pathology* **73**, 281-285.

- Naito K., Taguchi F., Suzuki T., Inagaki Y., Toyoda K., Shiraishi T., Ichinose Y. (2008): Amino acid sequence of bacterial microbe-associated molecular pattern flg22 is required for virulence. *Molecular plant-microbe interactions* **21**, 1165-1174.
- Nemudriy A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakiyan S.M. (2014): Sistemy redaktirovaniya genomov TALEN i CRISPR/Cas—instrumenty otkrytiy. *Acta naturae* **6**, 3.
- Nicaise V., Roux M., Zipfel C. (2009): Recent advances in PAMP-triggered immunity against bacteria: pattern recognition receptors watch over and raise the alarm. *Plant physiology* **150**, 1638-1647.
- Nishida E., Gotoh Y. (1993): The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends in Biochemical Sciences* **18**, 128-131.
- O'Gorman, S.T.E.P.H.E.N., Fox D.T., Wahl G.M. (1991): Recombinase-mediated gene activation and site-specific integration in mammalian cells. *Science* **251**, 1351-1355.
- Pattanayak V., Ramirez C.L., Joung J.K., Liu D.R. (2011): Revealing off-target cleavage specificities of zinc-finger nucleases by in vitro selection. *Nature methods* **8**, 765.
- Pitzschke A., Djamei A., Teige M., Hirt, H. (2009): VIP1 response elements mediate mitogen-activated protein kinase 3-induced stress gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 18414-18419.
- Pitzschke A., Hirt H. (2009): Disentangling the complexity of mitogen-activated protein kinases and reactive oxygen species signaling. *Plant Physiology* **149**, 606-615.
- Qi Y., Tsuda K., Glazebrook J., Katagiri F. (2011): Physical association of pattern-triggered immunity (PTI) and effector-triggered immunity (ETI) immune receptors in Arabidopsis. *Molecular plant pathology* **12**, 702-708.
- Qiu J.L., Fiil B.K., Petersen K., Nielsen H.B., Botanga C.J., Thorgrimsen, S., Palma K., Suarez-Rodriguez M.C., Sandbech-Clausen S., Lichota J., Brodersen P., Grasser K.D., Mattsson O., Glazebrook J., Mundy J., Petersen M. (2008): Arabidopsis MAP kinase 4 regulates gene expression through transcription factor release in the nucleus. *The EMBO journal* **27**, 2214-2221.
- Ren D., Liu Y., Yang K.Y., Han L., Mao G., Glazebrook J., Zhang S. (2008a): A fungal-responsive MAPK cascade regulates phytoalexin biosynthesis in Arabidopsis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 5638-5643.
- Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C., Shi Y. (2008b): Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* **2**, 141-150.
- Robatzek S., Saijo Y. (2008): Plant immunity from A to Z. *Genome Biol* **9**, 304.
- Robatzek S., Bittel P., Chinchilla D., Köchner P., Felix G., Shiu S.H., Boller T. (2007): Molecular identification and characterization of the tomato flagellin receptor LeFLS2, an orthologue of Arabidopsis FLS2 exhibiting characteristically different perception specificities. *Plant molecular biology* **64**, 539-547.
- Rodriguez M.C., Petersen M., Mundy J. (2010): Mitogen-activated protein kinase signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* **61**, 621-649.
- Seybold, H., Trempel, F., Ranf, S., Scheel, D., Romeis, T., & Lee, J. (2014). Ca²⁺ signalling in plant immune response: from pattern recognition receptors to Ca²⁺ decoding mechanisms. *New Phytologist*, **204**(4), 782-790.
- Shah S.A., Erdmann S., Mojica F.J., Garrett R.A. (2013); Protospacer recognition motifs: mixed identities and functional diversity. *RNA biology* **10**, 891-899.
- Shan L., He P., Li J., Heese A., Peck S.C., Nürnberger T., Martin G.B., Sheen J. (2008): Bacterial effectors target the common signaling partner BAK1 to disrupt multiple MAMP receptor-signaling complexes and impede plant immunity. *Cell host & microbe* **4**, 17-27.
- Shimizu T., Nakano T., Takamizawa D., Desaki Y., Ishii-Minami N., Nishizawa Y., Minami E., Okada K., Yamane H., Kaku HShibuya N. (2010): Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. *The Plant Journal* **64**, 204-214.
- Shiu S.H., Bleecker A.B. (2003): Expansion of the receptor-like kinase/Pelle gene family and

- receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant physiology* **132**, 530-543.
- Shiu S.H., Karlowski W.M., Pan R., Tzeng Y.H., Mayer K.F., Li W.H. (2004): Comparative analysis of the receptor-like kinase family in Arabidopsis and rice. *The plant cell* **16**, 1220-1234.
- Slaughter A., Daniel X., Flors V., Luna E., Hohn B., Mauch-Mani B. (2012): Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. *Plant physiology* **158**, 835-843.
- Song W.Y., Wang G.L., Chen L.L., Kim H.S., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zhai W.X., Zhu L.H., Fauquet C., Ronald P. (1995): A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistance gene, Xa21. *Science* **270**, 1804-1806.
- Staal J., Dixelius C. (2007): Tracing the ancient origins of plant innate immunity. *Trends in Plant Science* **12**, 334-342.
- Su T., Xu J., Li Y., Lei L., Zhao L., Yang H., Feng J., Liu G., Ren D. (2011): Glutathione-indole-3-acetonitrile is required for camalexin biosynthesis in Arabidopsis thaliana. *The Plant Cell* **23**, 364-380.
- Suarez-Rodriguez M.C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S.H., Jester P.J., Zhang S., Bent A.F., Krysan P.J. (2007): MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in Arabidopsis plants. *Plant physiology* **143**, 661-669.
- Sun T., Nitta Y., Zhang Q., Wu D., Tian H., Lee J. S., Zhang Y. (2018): Antagonistic interactions between two MAP kinase cascades in plant development and immune signaling. *EMBO reports* **19**.
- Sun X., Cao Y., Yang Z., Xu C., Li X., Wang S., Zhang, Q. (2004): Xa26, a gene conferring resistance to Xanthomonas oryzae pv. oryzae in rice, encodes an LRR receptor kinase-like protein. *The Plant Journal* **37**, 517-527.
- Sun Y., Li L., Macho A.P., Han Z., Hu Z., Zipfel C., Zhou J.M., Chai, J. (2013): Structural basis for flg22-induced activation of the Arabidopsis FLS2-BAK1 immune complex. *Science* **342**, 624-628.
- Swarts D.C., Mosterd C., Van Passel M.W., Brouns S.J. (2012): CRISPR interference directs strand specific spacer acquisition. *PloS one* **7**.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., Yonezawa M., Maruyama K., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in Arabidopsis. *The Plant Cell* **19**, 805-818.
- Taka R., Isogai A., Takayama S., Che F.S. (2008): Analysis of flagellin perception mediated by flg22 receptor OsFLS2 in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **21**, 1635-1642.
- Tena G., Boudsocq M., Sheen J. (2011): Protein kinase signaling networks in plant innate immunity. *Current opinion in plant biology* **14**, 519-529.
- Thomma B.P., Nürnberger T., Joosten, M.H. (2011): Of PAMPs and effectors: the blurred PTI-ETI dichotomy. *The plant cell* **23**, 4-15.
- Thordal-Christensen H. (2003): Fresh insights into processes of nonhost resistance. *Current opinion in plant biology* **6**, 351-357.
- Townsend J.A., Wright D.A., Winfrey R.J., Fu F., Maeder M.L., Joung J.K., Voytas D.F. (2009): High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 442-445.
- Wan J., Tanaka K., Zhang X.C., Son G.H., Brechenmacher L., Nguyen T.H.N., Stacey G. (2012): LYK4, a lysin motif receptor-like kinase, is important for chitin signaling and plant innate immunity in Arabidopsis. *Plant physiology* **160**, 396-406.
- Wang G., Ellendorff U., Kemp B., Mansfield J.W., Forsyth A., Mitchell K., Bastas K., Liu C.M., Woods-Tör A., Zipfel C., De Wit P.J., Jones J.D., Tör M., Thomma B.P. (2008): A genome-wide functional investigation into the roles of receptor-like proteins in Arabidopsis. *Plant physiology* **147**, 503-517.
- Wang Y.A.N., Bouwmeester K., Van de Mortel J.E., Shan W., Govers F. (2013): A novel Arabidopsis-oomycete pathosystem: differential interactions with Pythium capsici reveal a role for camalexin, indole glucosinolates and salicylic acid in defence. *Plant, cell & environment* **36**, 1192-1203.

- Wang Y., Cheng X., Shan Q., Zhang Y., Liu J., Gao C., Qiu J.L. (2014): Simultaneous editing of three homoeoalleles in hexaploid bread wheat confers heritable resistance to powdery mildew. *Nature biotechnology* **32**, 947.
- Whitham. (1995): The product of the tobacco mosaic-virus resistance gene-n-similarity to toll and the interleukin-1 receptor . *Cell* **81**, 466-466.
- Wolfe S.A., Nekludova L., Pabo C.O. (2000): DNA recognition by Cys2His2 zinc finger proteins. *Annual review of biophysics and biomolecular structure* **29**, 183-212.
- Xie K., Yang Y. (2013): RNA-guided genome editing in plants using a CRISPR-Cas system. *Molecular plant* **6**, 1975-1983.
- Xu R.F., Li H., Qin R.Y., Li J., Qiu C.H., Yang Y.C., Ma H., Li L., Wei P.C., Yang J.B. (2015): Generation of inheritable and “transgene clean” targeted genome-modified rice in later generations using the CRISPR/Cas9 system. *Scientific reports* **5**, 11491.
- Yamada K., Yamaguchi K., Shirakawa T., Nakagami H., Mine A., Ishikawa K., Fujiwara M., Narusaka M., Narusaka Y., Ichimura K., Kobayashi Y., Matsui H., Nomura Y., Nomoto M., Tada Y., Fukao Y., Fukamizo T., Tsuda K., Shirasu K., Shibuya N., Kawasaki T. (2016): The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation. *The EMBO journal* **35**, 2468-2483.
- Yang B., Sugio A., White, F.F. (2006): Os8N3 is a host disease-susceptibility gene for bacterial blight of rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 10503-10508.
- Yi J., Lee Y.S., Lee D.Y., Cho M.H., Jeon J.S., An G. (2016): OsMPK6 plays a critical role in cell differentiation during early embryogenesis in *Oryza sativa*. *Journal of experimental botany* **67**, 2425-2437.
- Yin H., Kanasty R.L., Eltoukhy A.A., Vegas A.J., Dorkin J.R., Anderson D.G. (2014): Non-viral vectors for gene-based therapy. *Nature Reviews Genetics* **15**, 541-555.
- Zhang H., Zhang J., Wei P., Zhang B., Gou F., Feng Z., Mao Y., Yang L., Zhang H., Xu N., Zhu J.K. (2014): The CRISPR/Cas9 system produces specific and homozygous targeted gene editing in rice in one generation. *Plant biotechnology journal* **12**, 797-807.
- Zhou H., Liu B., Weeks D.P., Spalding M.H., Yang, B. (2014): Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice. *Nucleic acids research* **42**, 10903-10914.
- Zhu J., Song N., Sun S., Yang W., Zhao H., Song W., Lai, J. (2016): Efficiency and inheritance of targeted mutagenesis in maize using CRISPR-Cas9. *Journal of Genetics and Genomics* **43**, 25-36.
- Zipfel C., Kunze G., Chinchilla D., Caniard A., Jones J.D., Boller T., Felix G. (2006): Perception of the bacterial PAMP EF-Tu by the receptor EFR restricts Agrobacterium-mediated transformation. *Cell* **125**, 749-760.

8 SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BAK1 - brassinosteroidní insenzitivní 1 (BRI1) kináza

BCP - 1-bromo-3-chloropropan

BIK1 - botrytis-indukovaná kináza 1

cDNA - komplementární DNA

CERK1 - CHITIN ELICITOR RECEPTOR KINASE 1

CRISPR-Cas - segmenty nahromaděných pravidelně rozmístěných krátkých palindromických repetit

CTAB - cetyltrimetylamoniumbromid

DAMP - s poškozením asociované molekulární vzory

ddH₂O - dvakrát destilovaná voda

DNA - deoxyribonukleová kyselina

dNTPs - deoxynukleotidový mix

EDTA - kyselina ethylendiamintetraoctová

ETI - imunita spouštěná efekty

F- přední primer

FLS2- FLAGELLIN-SENSITIVE 2

gRNA - vodící RNA

HR - hypersenzitivní reakce

JA - kyselin jasmonová

MAPK - mitogenem-aktivované protein kináza

MAMP - s mikroby asociované molekulární vzory

NB-LRR – typ receptoru obsahující nukleotid-vázající doménu a opakující se sekvence bohatou na leucin

NO - oxid dusnatý

PAMP - patogeny asociované molekulární vzory

PCR – polymerázová řetězová reakce

PTI - imunita spouštěná vzorci

qRT-PCR - kvantitativní polymerázové řetězové reakce

R - zadní primer

RLK - kináza podobná receptorům

RLP - protein podobný receptorům

RNA - ribonukleová kyselina

ROS – reaktivní formy kyslíku

PRR - receptory pro rozpoznávání speciálních vzorů

TAE - TRIS-acetátový pufr

TALEN – efektorové nukleázy podobné transkripčním aktivátorům

TF - transkripční faktor

TRIS - tris(hydroxymethyl)aminomethan

WT – rostlina divokého typu

ZFN - nukleázy s doménami se zinkovými prsty