

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Molekulární a fenotypová charakterizace
transgenních linií ječmene s pozměněnou expresí
mitogenem aktivované proteinkinasy HvMPK6**

Bakalářská práce

Adéla Nyczová

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2019

Vedoucí práce: Ing. Pavel Křenek, Ph.D.

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracovala samostatně s použitím citované literatury pod vedením vedoucího práce Ing. Pavla Křenka, Ph.D.

V Olomouci dne:

Adéla Nyczová

Souhrn

Rostlinné mitogenem aktivované proteinkinasy (MAPKs) hrají klíčovou roli v signalizaci biotických stresů. V této práci byly analyzovány transgenní linie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise s RNA interferencí vůči HvMPK6 a s HvMPK6 nadprodukcí. Transgenní linie homozygotní v T-DNA inzerci byly vybrány pro experimenty na základě genotypování rostlin, kvantifikace množství T-DNA a stanovení míry exprese HvMPK6. V provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*) nebyl zjištěn rozdíl v infekční frekvenci u vybraných transgenních linií a rostlin divokého typu. HvMPK6 nadprodukční linie měly výrazně zvýšené množství klasů s redukováným počtem zrn ve srovnání s rostlinami divokého typu.

Summary

Plant mitogen activated protein kinases (MAPKs) play crucial role in biotic stress signalization. In this work, transgenic barley (*Hordeum vulgare*) lines of variety Golden Promise with RNA interference against *HvMPK6* and overexpression of *HvMPK6* - were analyzed. Transgenic lines with homozygous T-DNA insertion were selected for the experiments based on plant genotyping, quantification of T-DNA amount and determination of *HvMPK6* gene expression. No significant differences were observed in the infection frequency of barley leaf rust (*Puccinia hordei*) among selected transgenic lines and control wild type plants in the seedling resistance assay. However, the number of spikes with reduced number of seeds was highly increased in *HvMPK6* overexpression lines.

Poděkování

Děkuji Ing. Pavlu Křenkovi, Ph.D. za vložený čas, odborné vedení, věcné rady a ochotu při zpracování této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat členům oddělení buněčné biologie CRH za praktickou pomoc a trpělivost.

Obsah

Souhrn.....	ii
Summary.....	iii
Poděkování.....	iv
Obsah.....	v
Seznam obrázků	viii
Seznam tabulek	ix
1 ÚVOD.....	1
2 CÍLE PRÁCE.....	2
3 LITERÁRNÍ PŘEHLED	3
3.1 Rostlinné mitogenem aktivované proteinkinasy	3
3.2 Role rostlinných MAPK v imunitě spouštěné molekulárními vzory a efekty	4
3.2.1 Imunita spouštěná molekulárními vzory (PTI).....	4
3.2.2 Imunita spouštěná efekty (ETI)	6
3.3 Role rostlinných MAPKs v interakci hospodářských plodin s patogeny	6
3.3.1 Úloha MAPKs v biosyntéze ethylenu	6
3.3.2 Úloha MAPKs v biosyntéze a signalizaci kyseliny salicylové	7
3.3.3 Úloha MAPKs v biosyntéze a signalizaci kyseliny jasmonové.....	8
3.3.4 Úloha MAPKs v aktivaci obranných genů	8
3.3.5 MAPKs hospodářsky významných jednoděložných druhů rostlin	9
3.4 Metody studia funkce rostlinných genů pomocí transgenozy	10
3.4.1 RNAi technologie.....	10
3.4.2 CRISPR/Cas9 technologie.....	11
3.4.3 Nadprodukce genu (overexprese)	12
3.3.4 Příprava transgenního ječmene pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	12
4 MATERIÁL A METODY.....	14

4.1 Biologický materiál	14
4.2 Použité chemikálie a roztoky	14
4.2.1 Použité chemikálie.....	14
4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava	15
4.3 Použité přístroje a zařízení.....	16
4.4 Metody.....	16
4.4.1 <i>In vitro</i> test hygromycinové rezistence	16
4.4.2 Izolace DNA.....	17
4.2.2.1 Vysokokapacitní izolace DNA	17
4.4.3 Multiplex TaqMan kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)	18
4.4.4 Izolace RNA.....	20
4.4.5 Reverzní transkripce	21
4.4.6 RT-qPCR pro kvantifikaci exprese genů	21
4.4.7 Provokační zkouška rezistence vůči rzi ječné (<i>Puccinia hordei</i>)	23
5 VÝSLEDKY	24
5.1 Selektce transgenních linií ječmene.....	24
5.1.1 Selektce <i>HvMPK6_RNAi</i> linií v T1 generaci.....	24
5.1.2 Selektce <i>HvMPK6_RNAi</i> linií v T2 generaci.....	27
5.1.3 Analýza exprese <i>HvMPK6</i> u <i>HvMPK6_RNAi</i> linií v T1 generaci	31
5.1.4 Selektce <i>HvMPK6_OE</i> linií v T1 generaci.....	32
5.1.5 Selektce <i>HvMPK6_OE</i> linií v T2 generaci.....	33
5.1.6 Analýza exprese <i>HvMPK6</i> u <i>HvMPK6_OE</i> linií v T1 generaci	37
5.2 Stanovení množství klasů se standardním a sníženým počtem zrn u <i>HvMPK6_OE</i> linií ječmene.....	38
.....	40
5.2.1 Fenotypování transgenních rostlin ječmene v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (<i>Puccinia hordei</i>)	41
6 DISKUZE	43

7	ZÁVĚR.....	46
8	LITERATURA	47

Seznam obrázků

Obrázek 1 - Obecné schéma MAPK kaskád a buněčných odpovědí, které ovlivňují po rozpoznání mikrobiálních patogenů.

Obrázek 2 - Přehled rostlinné imunity.

Obrázek 3 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_RNAi* linií v T1 generaci.

Obrázek 4 - Odhad genotypu *HvMPK6_RNAi* transgenních rostlin v T1 generaci.

Obrázek 5 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_RNAi* linií v T2 generaci.

Obrázek 6 - Relativní množství T-DNA v T2 generaci potomstev *HvMPK6_RNAi* linií.

Obrázek 7 - Relativní množství *HvMPK6* transkriptu u T1 potomků *HvMPK6_RNAi* transgenních linií.

Obrázek 8 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_OE* linií v T1 generaci.

Obrázek 9 - Odhad genotypu *HvMPK6_OE* transgenních rostlin v T1 generaci.

Obrázek 10 – *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_OE* linií v T2 generaci.

Obrázek 11 - Relativní množství T-DNA v T2 generaci potomstev *HvMPK6_OE* linií.

Obrázek 12 - Relativní množství *HvMPK6* transkriptu u T1 potomků *HvMPK6_OE* transgenních linií.

Obrázek 13 - Fotografie rostliny z negativní sesterské linie (vlevo) a z *HvMPK6_OE* transgenní linie (vpravo).

Obrázek 14 - A) Průměrný počet standardních klasů, klasů se sníženým počtem zrn a průměrný celkový počet klasů u *HvMPK6_OE* transgenních a kontrolních rostlin. B) Průměrné procentuální zastoupení standardních klasů a klasů se sníženým počtem zrn u *HvMPK6_OE* transgenních a kontrolních rostlin.

Obrázek 15 - Procentuální zastoupení klasů se sníženým počtem zrn u *HvMPK6_OE* transgenních linií a jejich negativních sesterských linií.

Obrázek 16 - Průměrný počet kolonií rzi ječné na 1 cm² nakaženého listu T2 potomstev *HvMPK6* transgenních a negativních sesterských T1 rostlin.

Seznam tabulek

Tabulka 1 – Složení rekační směsi pro Multiplex TaqMan qPCR.

Tabulka 2 - Teplotní program Multiplex TaqMan qPCR reakce.

Tabulka 3 - Seznam primerů a fluorescenčních sond použitých při Multiplex TaqMan qPCR.

Tabulka 4 – Složení reakční směsi pro RT-qPCR.

Tabulka 5 - Teplotní program RT-qPCR.

Tabulka 6 - Seznam primerů pro RT-qPCR.

Tabulka 7 - Přehled potomků *HvMPK6_RNAi* linií analyzovaných v *in vitro* testu hygromycinové rezistence.

Tabulka 8 - Přehled potomků *HvMPK6_OE* linií analyzovaných v *in vitro* testu hygromycinové rezistence.

1 ÚVOD

Tato bakalářská práce se zabývá mitogenem aktivovanými proteinkinasami (MAPKs) ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a jejich rolí ve vývoji a imunitě ječmene. V teoretické části práce je věnována pozornost roli mitogenem aktivovaných proteinkinas v interakci hospodářských plodin s patogeny a dále metodám studia rostlinných genů pomocí transgenoze. V praktické části práce je prezentována selekce homozygotních *HvMPK6* RNA interferenčních a nadprodukcčních rostlin za použití molekulárních, fyziologických a genetických technik a kondicionálního fenotypování těchto vybraných linií především v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*).

Rostliny v průběhu svého života čelí útokům patogenů ze vzduchu i půdy. Díky jejich vrozeným mechanismům jsou schopny vyvinout adekvátní obrannou odpověď a proti těmto útokům se tak efektivně bránit (Jones *et* Dangl 2007). MAPKs hrají zásadní roli v signalizaci biotických i abiotických stresových stimulů, díky funkci jejich kaskád jakožto konzervovaných signalizačních modulů. Role těchto modulů ve stresové signalizaci spočívá v přenosu extracelulárního signálu z receptorů přes jednotlivé komponenty signálních kaskád až na specifické intracelulární substráty prostřednictvím reverzibilní fosforylace (Taj *et al.* 2010) Hlavními, a zároveň nejvíce prostudovanými, MAPKs zprostředkovávajícími přenos signálu po stimulaci patogeny jsou MPK3, MPK4 a MPK6 *Arabidopsis* (Colcombet *et* Hirt 2008). V rámci rostlinných MAPKs jsou nejvíce prostudovány MAPKs dvouděložných druhů rostlin, především *Arabidopsis* a tabáku (*Nicotiana benthamiana*). Oproti tomu MAPKs ekonomicky významných jednoděložných druhů rostlin jsou velmi málo prostudovány a bylo jich charakterizováno jen několik (Xiong *et* Yang 2003). V současné době vytváří rychlý růst lidské populace stále větší poptávku po rostlinných produktech. Růst, vývoj a výnos plodin jsou limitovány především biotickými a abiotickými stresy působícími na rostliny, nedostatkem orné půdy a změnami klimatu (Brown *et* Funk 2008, Lobell *et al.* 2008). Zlepšení odolnosti plodin vůči biotickým a abiotickým stresům, stejně jako zvýšení výtěžku, nabízejí biotechnologické metody, jako alternativa k časově náročnému a pracnému šlechtění (Sharma *et al.* 2002).

2 CÍLE PRÁCE

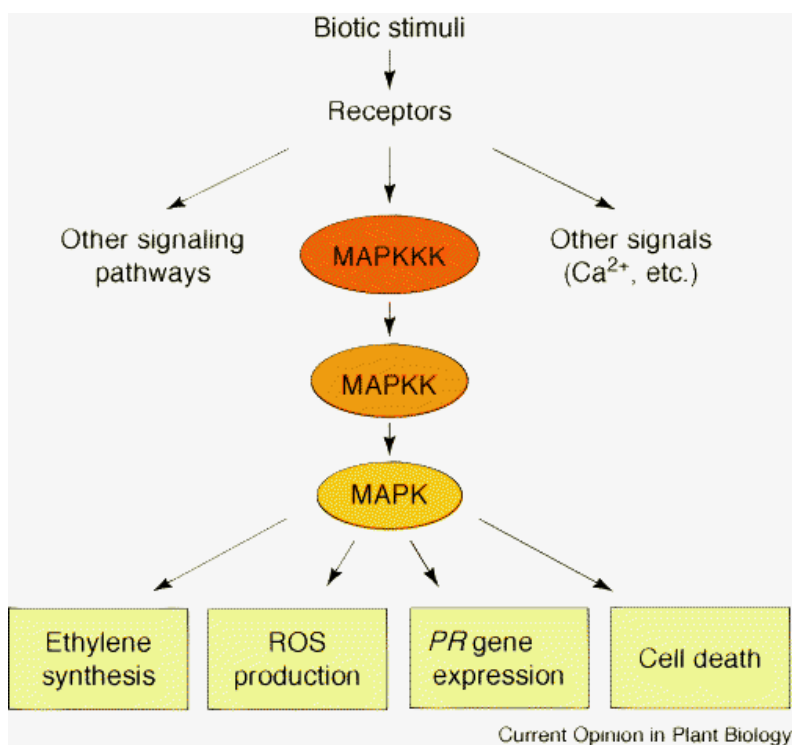
Cílem této bakalářské práce bylo:

- 1) Příprava literární rešerše na téma mitogenem aktivované proteinkinasy rostlin a jejich úloha v odpovědích rostlin na působení biotických stresů.
- 2) Výběr transgenních linií ječmene odrůdy Golden Promise se zvýšenou expresí *HvMPK6* genu a s umlčeným (knockdown) *HvMPK6* genem pro vlastní experimenty na základě genotypování rostlin, stanovení počtu kopií transgenů a kvantifikace úrovně exprese *HvMPK6*.
- 3) Stanovení distribuce počtu zrn v klasu u transgenních linií ječmene s overexpresí *HvMPK6*.
- 4) Kondicionální fenotypování vybraných transgenních linií ječmene především v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*).

3 LITERÁRNÍ PŘEHLED

3.1 Rostlinné mitogenem aktivované proteinkinasy

MAPK (mitogenem aktivované proteinkinasy) kaskády jsou konzervované signalizační moduly eukaryot, převádějící extracelulární signál z receptorů na buněčnou odpověď prostřednictvím fosforylace jejich substrátů. Rostlinné MAPKs hrají zásadní roli jak v signalizaci biotických a abiotických stresových stimulů, tak ve vývoji organismu (Taj *et al.* 2010). Tvoří je řada minimálně tří navzájem se fosforylujících kinas – MAPKKK (mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa), MAPKK (mitogenem aktivovaná proteinkinasa kinasa) a MAPK (obr. 1). MAPKKK a MAPKK jsou fosforylovány jednou na serin/threoninových aminokyselinových residuích, MAPK vyžadují k aktivaci dvojitou fosforylaci na threonin/tyrosinových residuích (Nakagami *et al.* 2005, Pedley *et al.* 2005, Šamajová *et al.* 2013).



Obrázek 1 - Obecné schéma MAPK kaskád a buněčných odpovědí, které ovlivňují po rozpoznání mikrobiálních patogenů. Převzato z Pedley *et al.* (2005).

MAPK jsou schopny fosforylovat řadu substrátů, včetně transkripčních faktorů. Specifita různých MAPK kaskád v jedné buňce je dána přítomností dokovacích domén v různých složkách MAPK modulů a scaffold proteinů, jejichž funkce spočívá ve shromáždění komponent MAPK kaskády a tím v usnadnění přenosu signálu (Brown *et al.* 2009, Morrison *et al.* 2003). Jedna z kaskád

řídících obranu rostlin před patogeny je MAPK kaskáda MEKK1-MAPKK4/MAPKK5-MAPK3/MAPK6-WRKY22/WRKY29, odpovídající u *Arabidopsis thaliana* na signál z flagelinového receptoru FLS2. Buněčná odpověď aktivovaná touto kaskádou zajišťuje obranu rostliny před houbovými i bakteriálními patogeny (Asai *et al.* 2002). Yang *et al.* (2001) identifikovali tabákovou MAPKK NtMEK2, která aktivuje WIPK a SIPK, tabákové ortology MAPK3 a MAPK6 *Arabidopsis*. NtMEK2 je ortologem MKK4 a MKK5 u *Arabidopsis* a MAPK kaskáda, které se účastní, pravděpodobně řídí obrannou odpověď proti houbovým patogenům u tabáku. MAPK kaskády se uplatňují také v odpovědi na abiotický stres. MPK4 a MPK6 z *Arabidopsis* jsou aktivovány chladem, solí, suchem, poraněním i dotykem (Ichimura *et al.* 2000). Bylo potvrzeno, že MAPK modul MAPKKK1-MAPKK1/MAPKK2-MAPK4/MAPK6 se účastní signalizace při stresu způsobeném chladem a zasolením (Teige *et al.* 2004).

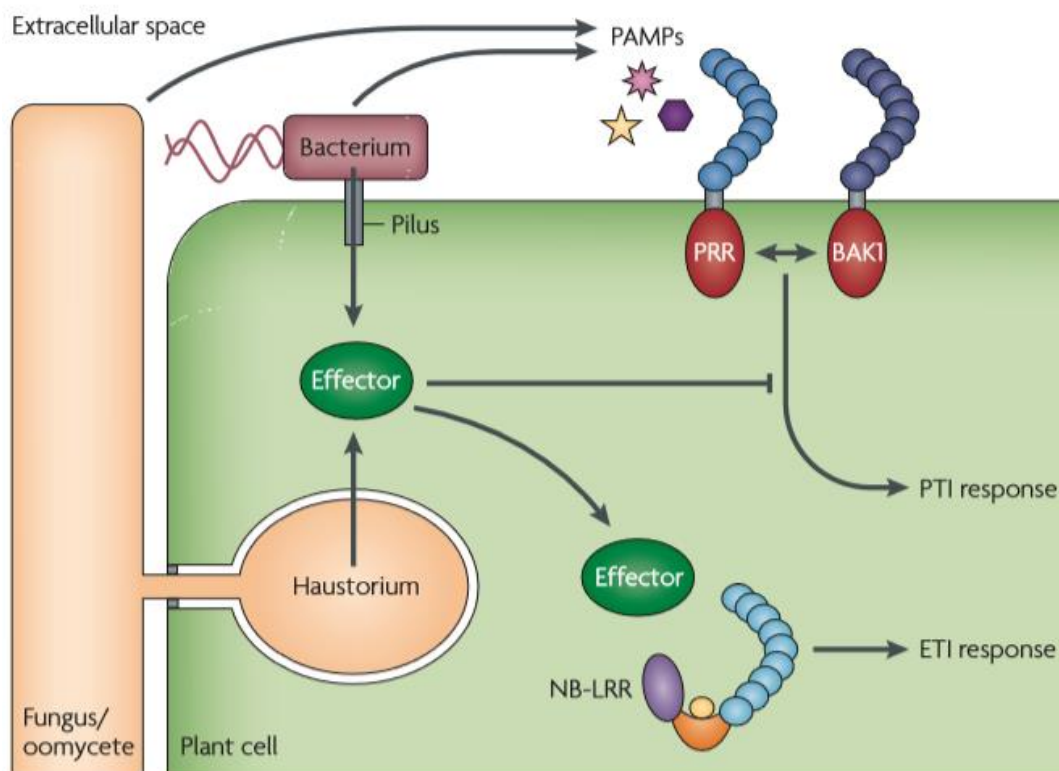
3.2 Role rostlinných MAPK v imunitě spouštěné molekulárními vzory a efekty

V průběhu svého života jsou rostliny ohroženy patogeny ve vzduchu i v půdě. Aby se mohly efektivně bránit, mají vyvinuty vrozené mechanismy, které jim umožňují rozpoznat potenciální nebezpečí a vyvinout adekvátní obrannou odpověď (Ausubel 2005, Jones *et Dangl* 2007).

3.2.1 Imunita spouštěná molekulárními vzory (PTI)

Prvotní obrana rostliny spočívá v zachycení molekulárních vzorů spojených s patogeny (PAMPs) vzory rozpoznávajícími receptory (PRRs) na povrchu buňky (Dodds *et Rathjen*, 2010, Křenek *et al.* 2015, Meng *et Zhang* 2013). Stimulace PRRs indukuje konvergentní intracelulární signální dráhy, které zahajují obranné odpovědi jako oxidativní vzplanutí, produkce ethylenu, exprese obranných genů a modifikace buněčné stěny. Takto zprostředkovaná imunita se nazývá PTI – imunita spouštěná molekulárními vzory. PTI obranné odpovědi jsou přechodné a nedochází při nich k HR (hypersenzitivní odpověď) buněčné smrti (Chisholm *et al.* 2006, Nurnberger *et al.* 2004). Rostlinné MAPKs přenášejí signál z PRRs k následným komponentám a hrají proto zásadní roli v signalizaci PTI (Chisholm *et al.* 2006). PRRs se obvykle skládají z extracelulární repetice bohaté na leucin (LRR) a intracelulární kinasové domény. Většina známých PRRs před spuštěním PTI interaguje s LRR receptorovou kinasou BAK1 (brassinosteroid insensitive 1-associated kinase 1) (obr. 2) (Chinchilla *et al.* 2007, Heese *et al.* 2007).

Výjimkou je chitinový receptor CERK1 (chitin elicitor receptor kinase 1) (Miya *et al.* 2007). BAK1 je součástí skupiny pěti somatických embryogenezních receptorových kinas (SERK) a je také označována jako SERK3. BAK1 nehraje přímou roli v percepci PAMPs, avšak tvoří s FLS2 heterodimerní komplex krátce po jeho stimulaci. Výsledkem této interakce je fosforylace obou proteinů (Schulze *et al.* 2010). V *Arabidopsis thaliana* byly identifikovány dvě MAPK kaskády, aktivované percepcí bakteriálního flagelinu flg22 receptorem FLS2. První kaskáda sestává z MEKK1-MKK4/MKK5-MPK3/MPK6 MAPK modulu, druhá z MAPK modulu MEKK1-MKK1/MKK1-MPK4 (Asai *et al.* 2002, Ichimura *et al.* 2006, Suarez-Rodriguez *et al.* 2007).



Obrázek 2 - Přehled rostlinné imunity. Molekuly uvolňované patogeny do extracelulárních prostor rostlinných pletiv (PAMPs) jsou rozpoznávány vzory rozpoznávajícími receptory na povrchu buňky (PRRs) a spouštějí imunitu spouštěnou molekulárními vzory (PTI). PRRs se obvykle skládají z repetice bohatých na leucin (LRR, tmavě modrá) a kinasové domény (červená). Pro zahájení signální dráhy interaguje většina PRRs s BAK1. Bakteriální patogeny vnašejí efektorové proteiny do buňky pomocí sekrečního pilusu III. typu, zatímco houby a oomycety využívají haustorií. Efektory jsou rozpoznávány intracelulárními receptory - nukleotidy vázajícími proteiny s repeticemi bohatými na leucin (NB-LRR), které indukují imunitu spouštěnou efekty (ETI). NB-LRR se skládají z karboxylové terminální LRR domény (světle modrá), centrální NB domény (oranžová), která váže ATP nebo ADP (žlutá) a TIR (amino-terminal Toll, interleukin-1 receptor, resistance protein) nebo vinuté cívky (fialová). Převzato z Dodds *et Rathjen* (2010).

3.2.2 Imunita spouštěná efektorů (ETI)

Některé patogeny dokáží působením virulentních molekul – efektorů – potlačit PTI u rostlin. Jako obrana se u rostlin vyvinul mechanismus rozpoznávání těchto efektorů intracelulárními receptory indukujícími imunitu spouštěnou efektorů (ETI). Jako tyto receptory slouží nukleotidy vázající proteiny s repetitivními bohatými na leucin (NB-LRR proteiny) (Chisholm *et al.* 2006, Jones *et al.* 2006) (obr. 2). V porovnání s PAMPs jsou efektorů velmi různorodé. Vysoká variabilita ETI receptorů existuje uvnitř i mezi druhy, zatímco funkce některých PRRs jsou shodné napříč čeleděmi. ETI je také kvalitativně silnější a rychlejší a často zahrnuje hypersenzitivní odpověď (Dodds *et al.* 2010). Fytopatogenní bakterie sekretují efektorů do cytoplasmu hostitelských buněk pomocí sekrečního systému III. typu (TTSS) (Cunnac *et al.* 2009). Houby a oomycety vytvářejí haustoria, prostřednictvím kterých jsou efektorů dopraveny do apoplastu hostitelských rostlin. Způsob vniku do hostitelských buněk a funkce většiny houbových efektorů je neznámá (Chisholm *et al.* 2006). Studie na tabáku (*Nicotiana benthamiana*) a rajčeti (*Solanum lycopersicum*) ukázaly MAPK kaskády jako základní složku ETI (Pedley *et al.* 2005). V tabáku byly popsány dvě MAPK kaskády aktivované signálem z NB-LRR proteinového receptoru. Jsou jimi MAPKKK α -MEK2-SIPK/WIPK a MAPKKK α -MEK1-SIPK/NTF6 (del Pozo *et al.* 2004).

3.3 Role rostlinných MAPKs v interakci hospodářských plodin s patogeny

V současné době jsou známy tři rostlinné MAPKs, které jsou aktivovány interakcí s patogeny – MPK3, MPK4 a MPK6. Tyto MAPKs jsou díky tomu zároveň třemi nejprostudovanějšími MAPKs. Ostatní MAPKs se také mohou podílet na signalizaci interakcí rostlin s patogeny, ale kvůli nedostatku vhodných nástrojů, jako jsou specifické protilátky k detekci malých množství proteinů nebo kinasových aktivit, byly pozorovány jen velmi vzácně (Colcombet *et al.* 2008).

3.3.1 Úloha MAPKs v biosyntéze ethylenu

Rostlinný plyný hormon ethylen hraje důležitou roli při zprostředkovávání rostlinných obranných odpovědí a rostliny ho při napadení patogeny produkují velké množství (Broekaert *et al.* 2006). Nedávné studie ukázaly, že tabákové MAPKs SIPK/Ntf4/WIPK

a *Arabidopsis* MAPKs MPK3/MPK6 mají klíčové role v regulaci patogeny indukované biosyntézy ethylenu (Han *et al.* 2010). Aktivace tabákových WIPK a SIPK indukuje vysoké hladiny ethylenu (Kim *et al.* 2003). Bylo analyzováno, že dvě isoformy ACS (ACC syntáza) I. typu – ACS2 a ACS6 v *Arabidopsis* jsou substráty MPK3 a MPK6. Fosforylace těchto MAPKs stabilizuje ACS proteiny, což vede ke zvýšení aktivity ACS a produkce ethylenu (Han *et al.* 2010, Liu *et al.* 2004). ACS je jedním ze dvou klíčových enzymů v biosyntéze ethylenu. Prvním krokem biosyntézy je přeměna S-adenosyl-methioninu (SAM) na ACC (1-aminocyklopropan-1-karboxylová kyselina) pomocí ACS a druhým oxidativní štěpení ACC na ethylen pomocí ACC oxidasy (ACO) (Wang *et al.* 2002). Fosforylace ACS6 pomocí MPK3 a MPK6 způsobuje negativní náboj na jejím C-konci, což snižuje úroveň degradace, a tak zvyšuje stabilitu ACS6 (Joo *et al.* 2008). MPK3 a MPK6 také ovlivňují expresi ACS2 a ACS6 genů skrz fosforylaci transkripčního faktoru WRKY33. WRKY33 je MPK3 a MPK6 fosforylován v reakci na infekci a váže se přímo na promotory ACS2 a ACS6, kde je potřebný pro jejich expresi (Li *et al.* 2012, Mao *et al.* 2011). Z těchto důvodů je regulace aktivity ACS pomocí MPK3 a MPK6 klíčová v ovlivňování kinetiky a síly produkce ethylenu při patogenní infekci (Meng *et al.* 2013).

3.3.2 Úloha MAPKs v biosyntéze a signalizaci kyseliny salicylové

Rostlinné hormony kyselina jasmonová (JA) a kyselina salicylová (SA) jsou důležitými složkami obranné signalizace rostlin (Broekaert *et al.* 2006). Biosyntéza těchto signálních hormonů spouštěná patogeny způsobuje aktivaci široké škály obranných genů, vedoucí k různým obranným odpovědím. Rostlinné MAPKs jsou zapojeny jak v regulaci biosyntézy těchto obranných hormonů, tak v signalizaci událostí po jejich rozpoznání (Meng *et al.* 2013).

SA je důležitým hormonem účastnícím se signalizace při obraně rostlin vůči patogenům, hlavně skrz následující komponenty NPR1 a tři transkripční faktory TGA2, TGA5 a TGA6 (Vlot *et al.* 2009). Spojitost mezi SA a MAPKs byla poprvé objevena při purifikaci a identifikaci tabákové SIPK (proteinkinasa indukovaná SA) (Zhang *et al.* 1997). Bylo zjištěno, že MPK3 a MPK6 v *Arabidopsis* jsou stěžejními složkami reakce na infekci zprostředkovanou SA. Po vystavení benzothiadiazolu (BTH), funkčnímu analogu SA, se v rostlinách akumulovala mRNA a inaktivní proteiny MPK3 a MPK6. Po vystavení patogenní infekci byla u rostlin ošetřených BTH pozorována zvýšená aktivita těchto MAPKs, což koreluje se zvýšenou expresí obranných genů

a vývojem získané rezistence (Beckers *et al.* 2009). Také exprese *MKK7* v *Arabidopsis* vede ke zvýšení hladiny SA, expresi *PR-1*, zvýšené rezistenci vůči biotrofním patogenům a indukci systémové získané rezistence (SAR). Umlčení *MKK7* zeslabuje rezistenci vůči biotrofním patogenům a také zabraňuje vývoji SAR (Zhang *et al.* 2007). Kaskáda MPK4 negativně reguluje signalizaci SA. Mutace v *MPK4* nebo předcházejících *MKK1/MKK2* a *MEKK1* vede k akumulaci SA, expresi *PR-1* a SAR (Kong *et al.* 2012, Petersen *et al.* 2000).

3.3.3 Úloha MAPKs v biosyntéze a signalizaci kyseliny jasmonové

Kyselina jasmonová (JA) je důležitým obranným hormonem, ovlivňujícím odpověď rostlin na patogenní infekci, útok herbivorů a mechanické poškození. Tyto stimuly indukují zvýšenou biosyntézu JA (Browse 2009, Gfeller *et al.* 2010).

MAPKs se uplatňují v regulaci jak biosyntézy JA, tak v signálních drahách, kterých se JA účastní. Bylo zjištěno, že tabákové WIPK a SIPK jsou potřebné k produkci JA indukované poraněním a útokem herbivorů a nadexprese WIPK způsobuje akumulaci JA (Seo *et al.* 1999, Seo *et al.* 2007, Wu *et al.* 2007). Je možné, že tyto dvě MAPKs jsou potřebné, ale ne dostačující k indukci syntézy JA. MPK6 v *Arabidopsis* (ortolog tabákové SIPK) je důležitým regulátorem signální dráhy JA (Takahashi *et al.* 2007). MPK6 spolu se svou MKK3 se účastní negativní regulace exprese *JINI/MYC2* a kořenového růstu závislých na JA (Petersen *et al.* 2000). Další MAPK účastníci se signální dráhy JA je MPK4. Rostliny s mutací v *MPK4* stále vykazovaly aktivaci obranných mechanismů závislých na SA, avšak nedošlo u nich k indukci JA obranných genů v odpovědi na působení JA. MPK4 pozitivně reguluje odpovědi indukované JA nezávisle na její negativní regulaci signalizace SA (Petersen *et al.* 2000).

3.3.4 Úloha MAPKs v aktivaci obranných genů

Aktivace tabákových WIPK/SIPK nebo MPK3/MPK6 v *Arabidopsis* indukuje mnoho genů souvisejících s obrannou odpovědí rostlin (Ishihama *et al.* 2011, Kim *et al.* 2004). Kromě regulace exprese obranných genů skrz ovlivnění biosyntézy a signalizace rostlinných hormonů mohou MAPKs aktivovat expresi obranných genů skrz přímou fosforylaci transkripčních faktorů (Meng *et al.* 2013).

V *Arabidopsis* MPK6 fosforyluje ERF104, člena skupiny ERF (ethylen response factor 104), který aktivuje obranné geny *PDF1.2a* a *PDF1.2b*. V odpovědi na flg22 je

interakce mezi MPK6 a ERF104 ztracena. Toto oddělení vyžaduje aktivitu MPK6, což naznačuje, že fosforylace ERF104 v odpovědi na flg22 vede k uvolnění ERF104 od MPK6 a aktivaci obranných genů (Bethke *et al.* 2009). Nedávno byl v *Arabidopsis* identifikován ERF6, nový substrát MPK3/MPK6. ERF6 je stabilizován fosforylací MPK3/MPK6, což vede k aktivaci exprese několika obranných genů, včetně *PDF1.1*, *PDF1.2a*, *PDF1.2b*, *HEL* a *ChiB* (Meng *et al.* 2013). MPK3 fosforyluje transkripční faktor VIP1, což vede relokizaci VIP1 z cytoplazmy do jádra, kde aktivuje gen související s patogenezí *PR1* (Djamei *et al.* 2007).

3.3.5 MAPKs hospodářsky významných jednoděložných druhů rostlin

Většina dosud známých MAPKs byla izolována z dvouděložných druhů rostlin, jako je *Arabidopsis* nebo tabák. MAPKs ekonomicky významných jednoděložných druhů bylo identifikováno a charakterizováno pouze několik (Xiong *et al.* 2003).

OsBWMK1 z rýže (*Oryza sativa*) je aktivována v listech v reakci na houbovou infekci *Magnaporthe grisea* (blast fungus infection) nebo poranění (He *et al.* 1999). V rýži byl také identifikován MAPK gen odpovídající na stres *OsMAPK5*, který je na úrovni mRNA aktivován různými biotickými a abiotickými stresory (Agrawal *et al.* 2002, Xiong *et al.* 2001). *OsMAPK5* gen, jeho protein a kinasová aktivita byly aktivovány také kyselinou abscisovou. Analýzy transgenních rostlin s nadexpresí nebo potlačenou expresí *OsMAPK5* ukázaly, že tato MAPK ovlivňuje odolnost proti chorobám i toleranci vůči abiotickému stresu. *OsMAPK5* je jednokopiový gen, avšak produkuje minimálně dva různě sestříhané transkripty. Transkript *OsMAPK5a* vykazuje kinasovou aktivitu, u transkriptu *OsMAPK5b* kinasová aktivita nebyla zjištěna a jeho funkce je neznámá. Bylo zjištěno, že *OsMAPK5* pozitivně reguluje toleranci vůči abiotickému stresu, avšak negativně ovlivňuje odolnost vůči patogenům (Xiong *et al.* 2003). MPK4 reguluje rezistenci rýže vůči bakteriální plísni způsobené *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Seo *et al.* 2011, Shen *et al.* 2010). Kaskády MPK4-MPK3 a MPK4-MPK6 rýže jsou aktivovány chitinem a spouštějí syntézu antimikrobních sloučenin (Kishi-Kaboshi *et al.* 2010). MPK6 rýže ovlivňuje rezistenci vůči bakteriálnímu pruhování rýže, způsobenému bakterií *Xoc* (*Xanthomonas oryzae* pv. *oryzicola*). MPK6 je fosforylována a aktivována MPK10.2. Gen pro MPK10.2 je transkripčně aktivován zvýšením obsahu SA po infekci *Xoc*. V odpovědi na abiotický stres způsobený suchem má však MPK6 opačný efekt a negativně ovlivňuje odolnost vůči tomuto stresu. MPK3

negativně reguluje obranu rýže proti některým patogenům jako *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, *Burkholderia glumae* a *Magnaporthe oryzae* a signální dráha MPKK10.2-MPK3 je aktivována zvýšením obsahu kyseliny abscisové (Ma *et al.* 2017, Seo *et al.* 2011, Xiong *et al.* 2003).

3.4 Metody studia funkce rostlinných genů pomocí transgenoz

Lidé jsou, ať už přímo či nepřímo, závislí na rostlinách a rostlinných produktech nejen kvůli základním potřebám jako jídlo, krmivo a přístřeší, ale také na rostlinných výrobcích včetně gumy, pryskyřice, oleje, vláknů, barviv, léčiv a fosilních paliv. Nedostatek orné půdy, biotické a abiotické stresy a změny klimatu jsou hlavními limitujícími faktory rostlinného růstu, vývoje a výnosu. Rychlý růst lidské populace způsobuje vyšší požadavky na rostlinnou produkci, což může vést až k budoucímu nedostatku a hladomoru (Brown *et al.* 2008, Lobell *et al.* 2008). Kvalita a množství rostlinných produktů byla a je zlepšována šlechtěním, které je však pracné a časově náročné. Biotechnologické metody nabízejí rychlé a signifikantní zlepšení odolnosti plodin vůči biotickým i abiotickým stresům, vyšší výtěžek a nutriční hodnoty (Sharma *et al.* 2002).

3.4.1 RNAi technologie

RNA interference (RNAi) byla identifikována jako přírodní mechanismus regulace genové exprese u vyšších organismů. Exprese jakéhokoliv genu může být explicitně snížena bez ovlivnění exprese ostatních genů s použitím RNAi technologie. Manipulace s novými RNAi dráhami, které generují malé molekuly RNA měnící expresi genů v plodinách, může vyprodukovat nové kvalitní znaky a lepší potenciál ochrany před biotickým a abiotickým stresem (Jagtap *et al.* 2011).

Funkce RNAi spočívá v umlčení specifických genů štěpením mRNA pomocí malých interferenčních RNA (siRNA) a mikro RNA (miRNA), což blokuje syntézu proteinů (Jagtap *et al.* 2011). Obecně procedura RNAi sestává z klonování a inserce zájmového genu do vhodného plazmidu za vytvoření rekombinantního plazmidu. Rekombinantní plazmid je transformován do odpovídajícího vektoru, např. *Agrobacterium*, který je vhodný pro transformaci rostliny. Existují i další metody, které je možno využít k transformaci, jako biolistická metoda nebo vakuová infiltrace (Shao *et al.* 2008). Proces RNA interference je iniciován 21–24 nukleotidů dlouhými siRNA, které jsou intracelulárně vytvořeny z dlouhých endogenních či exogenních dsRNA molekul naštipáním enzymem z rodiny ribonukleáz III, tzv. Dicer (Hamilton *et al.* 1999).

Tyto siRNA jsou poté inkorporovány do umlčujícího komplexu indukovaného RNA (RISC), který kromě siRNA obsahuje několik proteinů (Baumberger *et al.* Baulcombe 2005). RISC aktivovaný ATP rozvíjí vlákno dvouvláknové siRNA. Antisense vlákno je poté inkorporováno do nukleázového komplexu obsahujícího RISC za ztráty sense vlákna RNA helikázovou aktivitou (Kusaba 2004). RISC s antisense siRNA sekvencí poté napadne homologní transkript a rozštěpí mRNA či blokuje translaci, což vede k inhibici proteosyntézy (Bartel 2004).

3.4.2 CRISPR/Cas9 technologie

CRISPR (klastr pravidelně rozmístěných krátkých repetitivních sekvencí) je základní složkou systému adaptivní imunity u bakterií a archeí. Podobně jako RNAi dráhy u eukaryot, CRISPR systémy závisí na malých RNA, potřebných k detekci specifické nukleotidové sekvence a umlčení cizích nukleových kyselin, včetně virů a plazmidů (Weidenheft *et al.* 2012). CRISPR lokus obsahuje skupinu proteinů kódovaných geny *Cas* (CRISPR associated). *Cas* proteiny slouží k rozpoznání a rozštěpení cizího genetického materiálu (Bhaya *et al.* 2011). Imunita zprostředkovaná CRISPR/Cas funguje ve třech krocích. V první adaptivní fázi bakterie a archea nesoucí jeden či více CRISPR lokusů odpovídají na stimulaci viry a plasmidy integrací krátkých fragmentů cizí sekvence (spacerů) do CRISPR oblasti hostitelského chromozomu (Wiedenheft *et al.* 2012). Ve fázi exprese a interference dochází k transkripci na dlouhé pre-crRNA (precursor CRISPR RNA), obsahující repetitivní sekvence charakteristické pro hostitelský organismus, které jsou poté enzymaticky sestříhány za vzniku crRNA (CRISPR RNA). crRNA se mohou párováním bází spojit s komplementární protospacerovou sekvencí cílového viru či plazmidu (Deltcheva *et al.* 2011, Haurwitz *et al.* 2010). Toto rozpoznání cíle crRNA umožňuje umlčení cizích sekvencí *Cas* proteiny, které fungují v komplexu s crRNA (Brouns *et al.* 2008). CRISPR/Cas systémy II. typu zpracovávají pre-crRNA pomocí tracrRNA (trans-activating crRNA), komplementární k repetitivním sekvencím v pre-crRNA, ribonukleasou specifickou pro dvouvláknovou RNA – Rnázou III, za přítomnosti proteinu Cas9 (Deltcheva *et al.* 2011). Protein Cas9 je zároveň zodpovědný za crRNA navigované umlčení cizí DNA (Barrangou *et al.* 2007).

Princip CRISPR/Cas9 technologie spočívá ve vytvoření komplexu tracrRNA s crRNA za vzniku sgRNA (single guide RNA), která poté navádí Cas9 nukleázu na komplementární místo na molekule DNA. Toto komplementární místo je určeno

motivem přiléhajícím k protospaceru (PAM), který se nachází na nekomplementárním vlákně DNA. Cas9 obsahuje dvě domény – HNH a RuvC, z nichž každá štěpí jedno vlákno DNA. Doména HNH štěpí komplementární vlákno a doména RuvC nekomplementární vlákno. Cas9 endonukleáza může být naprogramována ke štěpení jakékoliv DNA sekvence pozměněním cílové sekvence chimerické sgRNA (Jinek *et al.* 2012).

3.4.3 Nadprodukce genu (overexpress)

Overexpress je alternativním přístupem při analýze funkce genů, komplementárním k umlčení genu. Overexpresí genu by mělo dojít k opačnému fenotypu než při umlčení genu, což umožňuje přesnější identifikaci jeho funkce. Nadexpress genu může být dosaženo použitím silného konstitutivního promotoru. Použití této metody často vytváří hypermorfní alely a výsledný fenotyp tudíž přesně odráží endogenní funkci genu (Zhang 2003).

3.3.4 Příprava transgenního ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*

Transformace rostlin pomocí *Agrobacterium tumefaciens* představuje základní výzkumný nástroj. Schopnost této bakterie přenést část své vlastní DNA do genomu hostitelské rostliny je vzácným příkladem přirozeně se vyskytujícího horizontálního přenosu genů a je základem jejího použití v transgenozí (Gelvin 2003). Tato schopnost závisí na specializovaném Ti (nádor indukujícím) plazmidu, který obsahuje dvě základní oblasti vyžadované k přenosu DNA do hostitelské buňky. Ti plazmid je důvodem virulence *Agrobacterium* a nevirulentní kmeny mohou přijetím Ti plazmidu virulenci získat (Lacroix *et al.* 2013). První oblastí je sama transferovaná DNA (T-DNA), ohraničená dvěma stejnými repetitivními sekvencemi, označovanými jako levá a pravá hranice (LB a RB). Tyto hranice jsou nezbytné pro definici funkčního T-DNA elementu, zatímco sekvence mezi nimi může být modifikována (Gelvin 2003). Druhou základní oblastí jsou geny virulence, ležící na sedmi hlavních lokusech, které kódují většinu bakteriálních proteinů způsobujících virulenci (Zupan *et al.* 1995). První úspěšné transformace ječmene bylo dosaženo použitím biolistické metody na nezralých embryích. Nezralá embrya byla použita také při prvních transformacích využívajících *Agrobacterium* a přestože byla transformace prováděna na alternativních pletivech, nezralá embrya zůstávají nejvíce používaným pletivem kvůli vysoké účinnosti

transformace. V porovnání s biolistickou metodou má metoda transformace pomocí *Agrobacterium* několik výhod, jako vyšší účinnost transformace, menší počet kopií transgenů a větší stabilita transgenů s nižší četností umlčování transgenů (Harwood *et al.* 2008). Transformace ječmene je velmi závislá na genotypu, nejvíce citlivým genotypem je jarní odrůda Golden Promise (Wang *et al.* 2001).

4 MATERIÁL A METODY

4.1 Biologický materiál

V bakalářské práci byly analyzovány *HvMPK6* RNAi a *HvMPK6* nadprodukční transgenní linie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise. Rostliny byly pěstovány nesterilně ve skleníku či fytotronu ve směsi substrátu Gramoflor a zahradnického substrátu, s přidavkem zahradnického perlitu.

4.2 Použité chemikálie a roztoky

4.2.1 Použité chemikálie

- 10x reakční pufr pro DNázu I s $MgCl_2$ (Thermo Scientific, kat. č. B43)
- 1-bromo-3-chlorpropan (BCP Phase Separation Reagent) (Molecular Research Center, kat. č. BP151)
- 2x Absolute qPCR ROX Mix (Thermo Scientific, kat. č. AB-1139/A)
- $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ EDTA pH 8.0 (Thermo Scientific, kat. č. R1021)
- Cetyltrimethylammonium Bromide BioChemica (Ctab) (ITW Reagents, kat. č. A0805)
- D(-)-sorbitol (Applichem, kat. č. A4992)
- Deoxyribonukleotidy (dNTPs) (Thermo Scientific)
- Disiřičitan sodný (SDS) (Applichem, kat. č. A2410)
- DNáza I (Thermo Scientific, kat. č. EN0521)
- Ethanol (Penta, kat. č. 71250-11000)
- Hygromycin B (Sigma-Aldrich, kat. č. 10843555001)
- Chlorid sodný (Sigma-Aldrich, kat. č. S3014)
- Chloroform (Sigma-Aldrich, kat. č. 32211-M), (Penta, kat. č. 602-006-00-4)
- Isopropanol (Penta, kat. č. 17510-11000)
- Milli-Q voda
- M-MLV RT 5x pufr (Promega, kat. č. M531A)
- M-MLV RT reverzní transkriptáza (Promega, kat. č. M170B)
- Power SYBR[®] Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, kat. č. 4367659)
- RNáza A (Promega, kat. č. A7973)
- Roztok EDTA pH 8.0 ($0,5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) (ITW Reagents, kat. č. A4892)

- rRNasin® Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Promega, kat. č. N251B)
- Sodná sůl N-lauroylsarkosinu (Appllichem, kat. č. A7402)
- TRI Reagent® (Sigma-Aldrich, kat. č. T9424)
- Tris-HCl (VWR, kat. č. 0234)

4.2.2 Použité roztoky a jejich příprava

1mol·l⁻¹ Tris-HCl:

158 g Tris-HCl, rozpustit v 1 l Milli-Q vody

Lyzační pufr:

0,2mol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (40 ml 1mol·l⁻¹ roztoku)

0,05mol·l⁻¹ EDTA, pH 8.0 (20 ml 0,5mol·l⁻¹ roztoku)

2mol·l⁻¹ NaCl (23 g)

2% Ctab, pH 7,5 (4 g)

doplnit na 200 ml Milli-Q vodou

Extrakční pufr:

100mmol·l⁻¹ Tris-HCl, pH 7,5 (20 ml 1mol·l⁻¹ roztoku)

5mmol·l⁻¹ EDTA, pH 8,0 (2 ml 0,5mol·l⁻¹ roztoku)

0,35mol·l⁻¹ Sorbitol, pH 7,5 (12,74 g)

doplnit na 200 ml Milli-Q vodou

5% Sarkosyl:

10 g sodné soli N-laurylkosinu, rozpustit ve 200 ml Milli-Q vody

Izolační pufr na 100 reakcí:

16,8 ml lyzačního pufu

16,8 ml extrakčního pufu

6,7 ml 5% sarkosylu

100 mg SDS

4.3 Použité přístroje a zařízení

- Digestoř (Merci)
- Flowbox (Merci)
- Hlubokomrazící box (Panasonic)
- Chladnička (Electrolux)
- Chlazená centrifuga 5810 R (Eppendorf)
- Chlazená mikrocentrifuga ScanSpeed 1730 MR (Labogene)
- Klimakomora AR-41L2 (Percival Scientific)
- Magnetická míchačka (Boeco)
- Milli-Q® Type 1 Ultrapure Water System (Merck)
- Minicentrifuga MyFuge Mini (Benchmark)
- Mrazící box (Schoeller)
- NanoDrop Lite Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific)
- Oscilační mlýn MM 400s (Retsch)
- StepOnePlus Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific)
- Stolní centrifuga Allegra 64R (Beckman Coulter)
- Termocyklér T100™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Váhy (Radwag, BEL Engineering)
- Vlhká komora (Percival Scientific)
- Vortex Genie 2 (Scientific Industries)
- Výrobník ledu AF80 (Scotsman-Frimont)

4.4 Metody

4.4.1 *In vitro* test hygromycinové rezistence

Nejdříve byl připraven roztok Hygromycinu B v Milli-Q vodě. Na 100 reakcí bylo smícháno 30 ml Milli-Q vody se 150 μ l Hygromycinu B. Poté bylo do 96jamkové mikrotitrační destičky pipetováno 300 μ l roztoku do každé jamky. Z testovaných rostlin byla nůžkami odstrížena část prvního listu ve vzdálenosti 1–2 cm od špičky listu a poté byla na voskové podložce průbojníkem o průměru 0,6 cm vykrojena špička. Špička byla pinzetou přenesena do jamky, spodní stranou listu nahoru. Nakonec byla destička

přiklopena víčkem, zalepena Micropore páskou a inkubována v klimakomoře při 21 °C a světelné intenzitě cca 180 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$, při fotoperiodě 16/8 (později změna světelné intenzity na cca 67 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ a ještě později změna teploty na 19 °C). Po cca 5–7 dnech (po snížení intenzity 7–9 dnech, po snížení teploty 8–11 dnech) byly destičky vyfoceny na černém podkladu.

4.4.2 Izolace DNA

Do 2ml plastových mikrozkušavek byly vloženy dvě kovové kuličky. Následně byl odstřižen poraněný konec 1. listu a odebrán segment v délce mikrozkušavky. Tento segment byl vložen do mikrozkušavky a ta ihned zmrazena v tekutém dusíku. Následně byly vzorky nadrceny v oscilačním mlýnku při frekvenci $27\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 1,5 min a opět přeneseny do tekutého dusíku. Zmražené vzorky byly skladovány v -80 °C do dalšího postupu. Ke vzorkům bylo přidáno 800 μl izolačního pufru a následně byly důkladně roztřepány, dokud nebyl jejich obsah homogenní. Poté byly inkubovány 1 hod a 20 min při 60 °C za občasného promíchání. Po ochlazení na pokojovou teplotu bylo přidáno 400 μl chloroformu, vzorky byly intenzivně protřepány po dobu 15 s a poté 4 min a 15 s ponechány v klidu na stole. Následně byly centrifugovány 15 min při 12000 rpm a 20 °C. Do nových mikrozkušavek bylo napipetováno 336 μl isopropanolu a po dokončení centrifugace 480 μl supernatantu. Zkušavky byly lehce promíchány několikerým překlopením a poté ponechány 10 min v klidu na stole. Následovala centrifugace po dobu 8 min při 12000 rpm a 20 °C. Poté byl odpipetován isopropanol a přidán 1 ml 70% ethanolu. Takto byly vzorky skladovány při 4 °C do dalšího postupu. Před dalším postupem byl odpipetován všechn ethanol, peleta byla vysušena v digestoři a dle velikosti rozpuštěna ve 30–50 μl Milli-Q vody s RNázou (konečná koncentrace 4 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.2.2.1 Vysokokapacitní izolace DNA

Vzorky byly odebírány na ledu do 1,2ml plastových mikrozkušavek, spojených do stripů po 8 kusech a uložených do plastových nosičů po 96 kusech. Do každé mikrozkušavky byly vloženy 2 kovové kuličky a poloviční množství materiálu získaného odstřížením segmentu nejmladšího plně vyvinutého listu od báze na délku mikrozkušavky. Tento materiál byl do mikrozkušavky nastříhán na několik dílů, mikrozkušavky byly uzavřeny víčky a celý nosič byl zamražen v tekutém dusíku. Vzorky byly nadrceny v oscilačním mlýnku při frekvenci $26\cdot\text{s}^{-1}$ po dobu 1 min a 20 s a opět uloženy do tekutého dusíku.

Takto byly vzorky skladovány v $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího postupu. Následně bylo přidáno 400 μl izolačního pufru dávkovací pipetou, vzorky byly protřepány, dokud nebyl jejich obsah homogenní a inkubovány 1 hod a 15 min při $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ ve stojanech za občasného promíchání. Po ukončení inkubace byly vzorky i se stojany zasypány ledem a takto chlazeny po dobu 15 min. Po zchlazení bylo přidáno 400 μl chloroformu dávkovací pipetou, vzorky byly intenzivně protřepány 15 s a ponechány v klidu na stole 2 min. Následovala centrifugace 30 min při 3220 g a pokojové teplotě. Mezitím bylo do nových mikrozkušavek napipetováno 200 μl isopropanolu dávkovací pipetou a po skončení centrifugace přidáno 250 μl supernatantu multikanálovou pipetou. Vzorky byly několikrát promíchány převrácením a poté ponechány 10 min v klidu na stole. Následně byly centrifugovány 30 min při 3220 g a pokojové teplotě. Po ukončení centrifugace byl odstraněn isopropanol a poté bylo k peletě přidáno 500 μl 70% ethanolu. Takto mohly být vzorky skladovány při $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ do dalšího postupu. Dále byly vzorky centrifugovány 30 min při 3220 g a pokojové teplotě, po ukončení byl supernatant slit, zbylý ethanol byl odpipetován a odpařen v digestoři dosucha. Nakonec byla vyizolovaná DNA rozpuštěna dle velikosti pelety ve 25–30 μl Milli-Q vody s RNázou (konečná koncentrace $4\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$).

4.4.3 Multiplex TaqMan kvantitativní polymerázová řetězová reakce (qPCR)

DNA vyizolovaná v předchozím kroku byla 50 x (později 150x) naředěna při klasické izolaci a 10x naředěna při vysokokapacitní izolaci DNA a zvortexována. Všechny primery (tab. 3) a fluorescenční sondy o zásobní koncentraci $100\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ byly 10x naředěny na koncentraci $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, primery zvortexovány a fluorescenční sondy pouze lehce proklepány. Poté byla připravena PCR reakční směs (tab. 1) a 7,5 μl této reakční směsi bylo napipetováno na dno jamky 96 jamkové destičky na ledu. Následně bylo na stěnu jamky napipetováno 2,5 μl naředěné DNA ve dvou technických replikátech. Po napipetování všech vzorků byla destička zalepena fólií, krátce zcentrifugována a vložena do termocykleru. Teplotní program PCR je uveden v tabulce 2.

Tabulka 9 – Složení rekační směsi pro Multiplex TaqMan qPCR.

	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem (1 reakce) [μl]
Pufr (Absolute qPCR ROX Mix)	2x	1x	5
Voda			1,3
HvCon2P sonda	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
HvCon2F1 primer	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
HvCon2R1 primer	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
HygP sonda	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
PHygF1 primer	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
PHygR1 primer	10 pmol·μl ⁻¹	200 fmol·μl ⁻¹	0,2
Vzorek			2,5
Celkový objem			10

Tabulka 10 - Teplotní program Multiplex TaqMan qPCR reakce

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
95	15 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Tabulka 11 - Seznam primerů a fluorescenčních sond použitých při Multiplex TaqMan qPCR

	Název	Sekvence 5'-3'
Primery	HvCon2F1	TGCTAACCGTGTGGCATCAC
	HvCon2R1	GGTACATAGTGCTGCTGCATCTG
	PHygF1	GCGGATTTTCGGCTCCAA
	PHygR1	CTCCAGTCAATGACCGCTGTT
Sondy	HvCon2P	VIC-CATGAGCGTGTGCGTGTCTGCG-TAMRA
	HygP	FAM-TCCTGACGGACAATGGCCGCA-TAMRA

4.4.4 Izolace RNA

Vzorky byly sesbírány obdobně, jako při izolaci DNA, zamraženy v tekutém dusíku a nadrceny v oscilačním mlýnku při frekvenci $27 \cdot s^{-1}$ po dobu 1,5 min. Po nadrcení byl ke vzorkům přidán 1 ml TRI Reagent a obsah byl třepáním zhomogenizován. Poté byly vzorky inkubovány 8 min při pokojové teplotě a centrifugovány 10 min při 12000 rpm a 4 °C. Mezitím bylo do nových mikrozumavek napipetováno 100 μ l BCP. Po ukončení centrifugace byly vzorky přeneseny do stojánku na ledu a 1 ml supernatantu byl přenesen do mikrozumavek s BCP. Následně byly vzorky 15 s důkladně protřepány a 4 min 15 s ponechány v klidu na stole. Poté byly vzorky centrifugovány 15 min při 12000 rpm a 4 °C. Do nových zkumavek bylo mezitím napipetováno 390 μ l chloroformu. Po ukončení centrifugace byly vzorky přeneseny na led a 390 μ l vrchní fáze bylo přeneseno do mikrozumavek s chloroformem. Vzorky byly opět 15 s důkladně protřepány a poté 3 min ponechány na stole. Následovala centrifugace 15 min při 12000 rpm a 4 °C. Mezitím bylo do nových mikrozumavek napipetováno 140 μ l isopropanolu a po skončení centrifugace přidáno 200 μ l supernatantu. Poté byly vzorky několikrát promíchány převrácením a ponechány 10 min odstát na stole a centrifugovány 9 min při 12000 rpm a 20 °C. Po skončení centrifugace byl odpipetován isopropanol a k peletě byl přidán 1 ml 75% ethanolu. Vzorky byly poté skladovány ve 4 °C do dalšího postupu. Následně byly vzorky centrifugovány 8 min při 7500 rpm a 20 °C. Po centrifugaci byl odpipetován ethanol, peleta byla v digestoři vysušena a poté rozpuštěna dle velikosti ve 40–50 μ l Milli-Q vody.

4.4.5 Reverzní transkripce

Proměřením 1,5 μl vyizolované RNA ve spektrofotometru Nanodrop byl stanoven její obsah ve vzorku. Následně byly hodnoty zapsány do vzorce v Microsoft Office Excel 2016 a byl vypočítán pipetovaný objem vzorků a Milli-Q vody tak, aby výsledný obsah RNA v mikrozkuhavce byl 2000 ng v objemu 16 μl roztoku. Do 0,2ml plastových mikrozkuhovek spojených do stripů po 8 kusech byla nejdříve napipetována Milli-Q voda dle tabulky, poté vzorek RNA a nakonec 4 μl premixu 1, obsahujícího 2 μl DNázy I a 2 μl 5x DNázového pufru. Výsledný objem vzorku činil 16 μl . Mikrozkuhavky byly poté inkubovány v termocykleru 40 min při teplotě bloku 37 °C a víčka 40 °C. Mezitím bylo do nových mikrozkuhovek napipetováno 4,5 μl premixu 2, který obsahoval 4 μl Milli-Q vody a 0,5 μl primeru. Po dokončení inkubace bylo do každé mikrozkuhavky přidáno 2 μl EDTA a poté byly vzorky inkubovány ještě 8 min při teplotě bloku 70 °C a víčka 72 °C s cílem inaktivace DNázy I. Následně bylo napipetováno 5,5 μl vzorku (500 ng RNA) do mikrozkuhovek s napipetovaným premixem 2. Vzorky byly inkubovány 5 min při teplotě bloku 70 °C a víčka 72 °C a po skončení inkubace neprodleně přeneseny na led, kde byly chlazeny po dobu 2–3 min. Po zchlazení bylo do mikrozkuhovek přidáno 10 μl premixu 3, který obsahoval 4 μl 5x M-MLV RT pufru, 1 μl deoxyribonukleotidů (dnTPs), 4,2 μl Milli-Q vody, 0,4 μl M-MLV RT reverzní transkriptázy a 0,4 μl RNasin® Plus RNázového inhibitoru. Vzorky byly poté inkubovány 2 hod při teplotě bloku 42 °C a víčka 44 °C a 10 min při teplotě bloku 70 °C a víčka 72 °C. Následně bylo do každé mikrozkuhavky přidáno 60 μl Milli-Q vody a vzorky byly zamrazeny v –80 °C do dalšího použití.

4.4.6 RT-qPCR pro kvantifikaci exprese genů

Nejdříve byly všechny zásobní primery o koncentraci 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (tab. 6) naředěny 10x na koncentraci 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a zvortexovány. Následně byly připraveny 2 premixy pro *HvMPK6* a referenční gen *HvMPK14*. Každý premix obsahoval 0,3 μl primeru F, 0,3 μl primeru R, 1,9 μl Milli-Q vody a 5 μl Power SYBR® Green PCR Master Mixu na 1 reakci (tab. 4). Poté bylo napipetováno 7,5 μl premixu na dno jamek 96 jamkové PCR destičky a 2,5 μl naředěného vzorku DNA na stěny jamek ve dvou technických replikátech pro *HvMPK6* i *HvMPK14*. Destička byla zalepena fólií, odstředěna a poté vložena do StepOnePlus Real-Time PCR Systems termocykleru (Thermo Fisher Scientific). PCR reakce probíhala dle teplotního programu v tabulce 5.

Tabulka 12 – Složení reakční směsi pro RT-qPCR.

	Koncentrace pracovního roztoku	Konečná koncentrace	Pipetovaný objem (1 reakce) [μl]
Power SYBR[®] Green PCR Master Mix			5
Voda			1,9
foward primer	10 μmol·l ⁻¹	300 nmol·l ⁻¹	0,3
reverse primer	10 μmol·l ⁻¹	300 nmol·l ⁻¹	0,3
Vzorek			2,5
Celkový objem			10

Tabulka 13 - Teplotní program RT-qPCR.

Teplota [°C]	Čas	Počet cyklů
95	10 min	1
95	15 s	40
60	1 min	

Tabulka 14 - Seznam primerů pro RT-qPCR.

Název	Sekvence 5'-3'
HvMPK6_F	ATTGGAACACCAAATGAGGCTG
HvMPK6_R	GCATGACGGGGAAGTTGGC
HvMPK14_F	CACAAAAGCCACGCAGAGA
HvMPK14_R	CCGAACCAACCACTTTACCA

4.4.7 Provokační zkouška rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*)

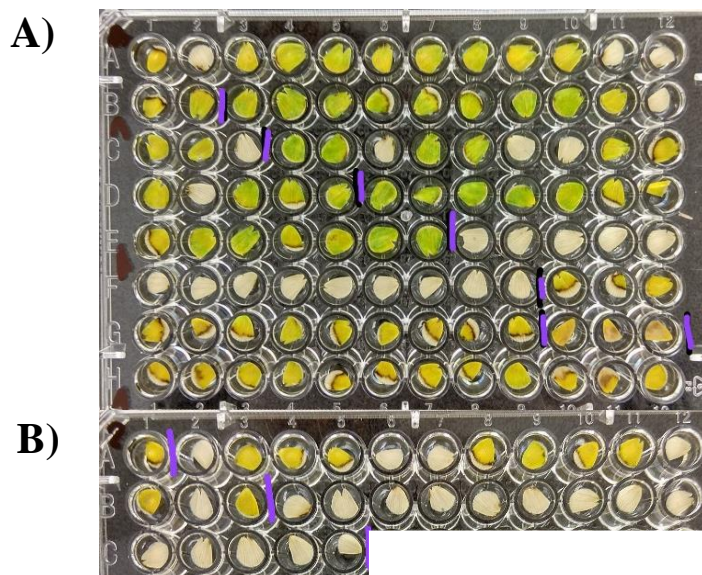
Rostliny byly pěstovány v boxech o rozměrech 37 x 39 cm ve dvou řadách, celkově box obsahoval 7–8 linií po 6–8 rostlinách. Rostliny byly pěstovány ve skleníku při teplotě 18–24 °C a fotoperiodě 16 hodin tma/8 hodin světlo. Před inokulací byly druhé listy 8–13 dní starých rostlin odstřiženy a první listy poté připevněny k půdě v horizontální poloze pomocí kancelářských sponek. Inokulum bylo připraveno smícháním 130–150 mg inertních výtrusů *Lycopodium* a 0,8–1,2 mg uredospor *Puccinia hordei*. Inokulum bylo rovnoměrně rozprášeno na rostliny v inokulační věži a box byl inkubován v kultivační komoře s tvorbou rosy ve tmě při 100% vlhkosti a 18 °C po dobu 11 hod. Po skončení inkubace byly listy uvolněny a boxy umístěny do skleníku. Po 9–11 dnech od inokulace byla spočítána infekční frekvence (IF) – počet kolonií *Puccinia hordei* na 1 cm². Pro každou rostlinu byla stanovena IF na dvou místech prvního listu a hodnoty IF z těchto měření byly zprůměrovány.

5 VÝSLEDKY

5.1 Selekce transgenních linií ječmene

5.1.1 Selekce *HvMPK6_RNAi* linií v T1 generaci

V *in vitro* testu hygromycinové rezistence (nepublikováno), prováděném na T1 generaci potomků transgenních linií ječmene s interferencí vůči *HvMPK6* (*HvMPK6_RNAi* linie), bylo analyzováno celkem 9 nezávislých transgenních linií (B1a, B1b, B2a, B2b, BI/1, BIII/1, BIV/2, BIV/3 a BIV/4), při průměrném počtu 12 rostlin na linii a 1 negativní kontrolní linie, konkrétně linie C, která byla získána regenerací z netransformovaného kalusu. Bylo testováno celkem 125 potomků těchto linií (obr. 3, tab. 7). Všichni analyzovaní potomci linie BI/1 a kontrolní linie C byli divokého typu. U potomstva linií B2b, BIII/1, BIV/2 a BIV/3 nedošlo k segregaci a u všech analyzovaných potomků se vyskytovala hygromycinová rezistence. U potomků linií B1a, B1b, B2a a BIV/4 byla



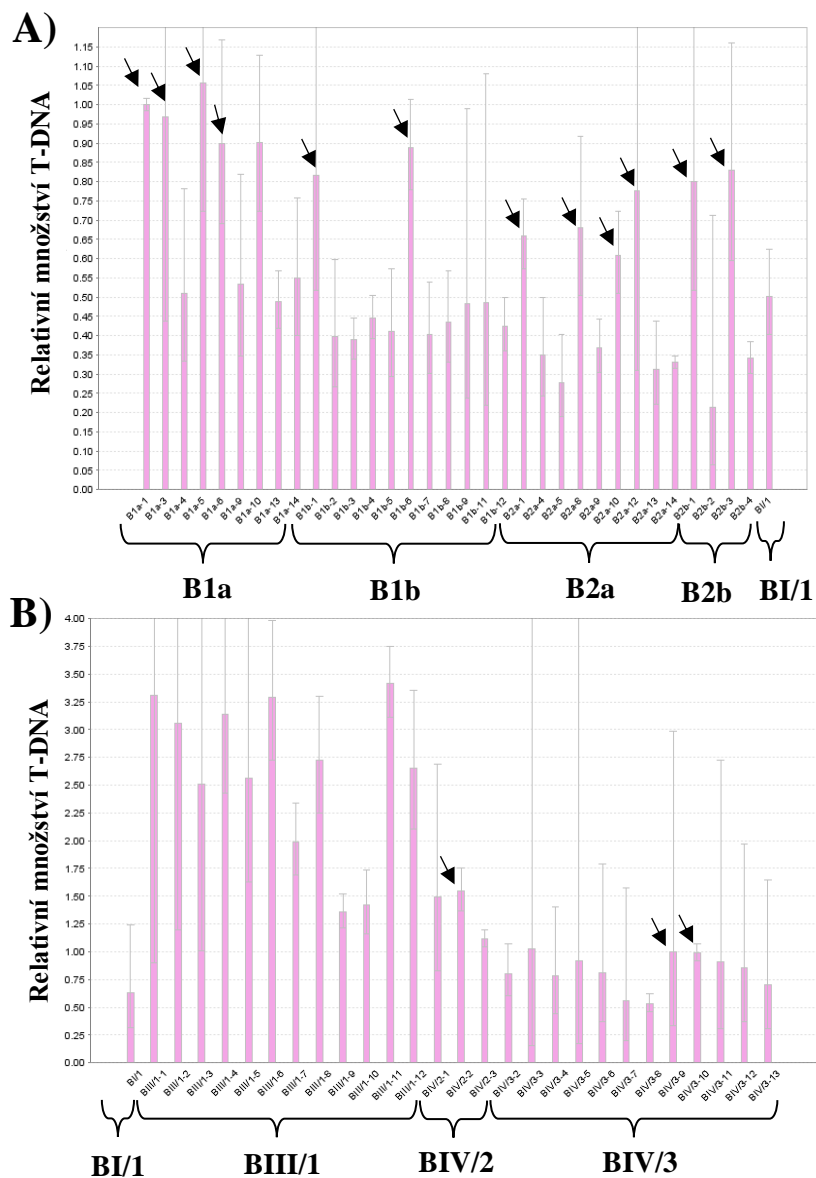
Obrázek 3 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_RNAi* linií v T1 generaci. Rostliny rezistentní vůči hygromycinu mají zelenou, žlutou nebo nekrotizující listovou špičku, rostliny náchylné vůči hygromycinu mají listovou špičku působením hygromycinu vybělenou. V jednotlivých jamkách jsou analyzovány odlišné genotypy. Rostliny (jejich listové špičky) jsou v jamkách číslovány od jedné vzestupně zleva doprava, přičemž jednotlivé linie jsou odděleny barevnými svislými čarami (Např. v jamce A1 v první destičce je vzorek rostliny č. 1 z linie B1a – B1a/1, v jamce A2 je vzorek rostliny č. 2 z linie B1a – B1a/2, atd.).

Legenda: **A) 1. destička:** jamky A1–B2: potomstvo B1a, rostliny 1–14; B3–C3: potomstvo B1b, rostliny 1–13; C4–D5: potomstvo B2a, rostliny 1–14; D6–E7: potomstvo B2b, rostliny 1–14; E8–F9: potomstvo BI/1, rostliny 1–14; F10–G9: potomstvo BIII/1, rostliny 1–12; G10–G12: potomstvo BIV/2, rostliny 1–3; H1–H12: potomstvo BIV/3, rostliny 1–12; **B) 2. destička:** jamka A1: potomstvo BIV/3, rostlina 13; A2–B3: potomstvo BIV/4, rostliny 1–14; B4–C5: potomstvo C, rostliny 1–14.

pozorována segregace. Většina potomků těchto linií byla rezistentní na hygromycin, avšak několik z nich bylo vyhodnoceno jako divoký typ (obr. 3, tab. 7).

Pro odhad množství inzerované T-DNA bylo T1 potomstvo *HvMPK6_RNAi* linií analyzováno pomocí Multiplex TaqMan qPCR. Metoda simultánně využívá dvou sond - HvCon2P k detekci referenčního endogenního genu *HvCon2* ječmene a HygP k detekci genu hygromycinové rezistence přítomném v T-DNA inzertu. Porovnáním C_t fluorescenčních signálů umožňuje určit relativní množství T-DNA v transgenních rostlinách. Pro vlastní analýzu bylo vybráno T1 potomstvo 8 nezávislých linií (B1a, B1b, B2a, B2b, BI/1, BIII/1, BIV/2 a BIV/3), analyzované pomocí hygromycinového testu (obr. 3, tab. 7). Tento test umožnil předvýběr transgenních potomků jednotlivých linií pro vlastní analýzu množství T-DNA, čímž se snížilo celkové množství potomků potřebné pro analýzu. Výsledky Multiplex TaqMan qPCR analýzy ukázaly, že mezi transgenními potomky obvykle docházelo k segregaci dvou kategorií množství T-DNA (obr. 4). Rostliny se základním množstvím T-DNA byly odhadnuty jako potenciální heterozygoti v T-DNA inzerci/inzercích, rostliny s dvojnásobným množstvím T-DNA jako potenciální homozygoti v T-DNA inzerci. Vzhledem k tomu, že nebyla k dispozici referenční rostlina s jednou T-DNA inzercí v heterozygotní sestavě verifikovaná pomocí Southern blotu, sloužila metoda pouze jako nástroj pro porovnání množství T-DNA v transgenních rostlinách v rámci jednotlivých linií. Nebylo tak možno odhadnout počet kopií T-DNA.

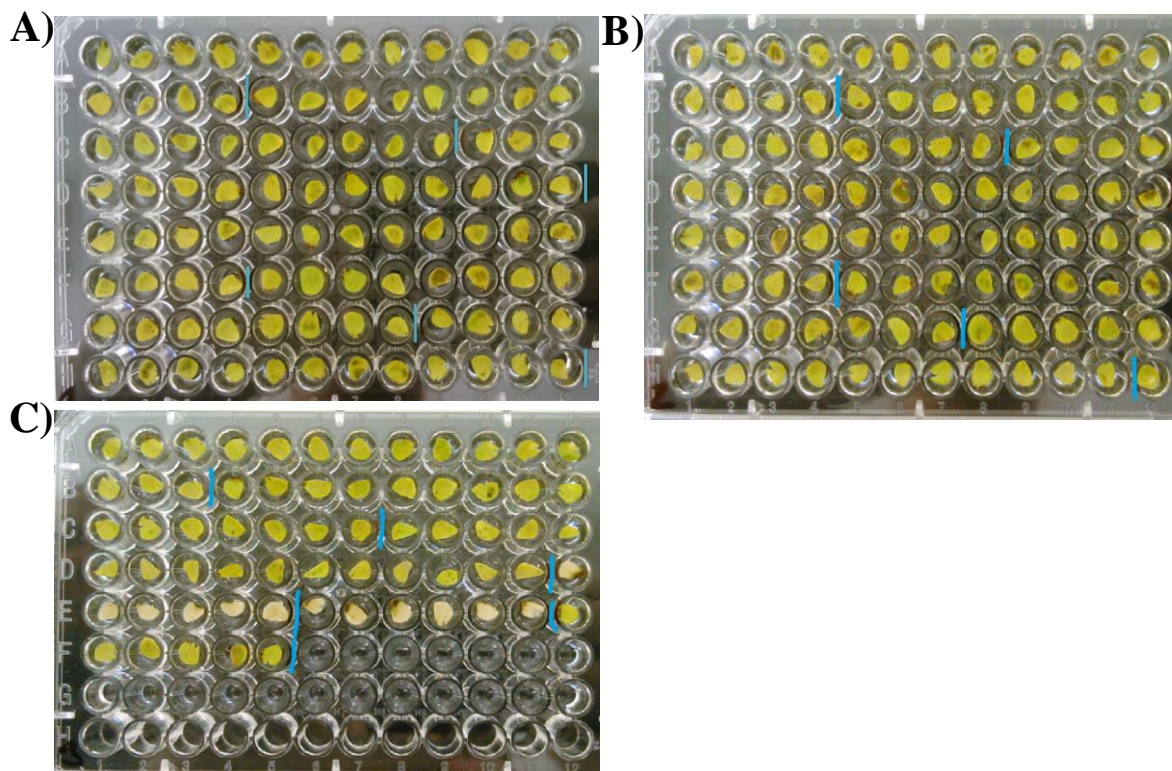
Pro kultivaci do další generace byly vybrány rostliny pozitivní v *in vitro* testu hygromycinové rezistence (obr. 3), které byly zároveň odhadnuty jako potenciální homozygoti v T-DNA inzerci (obr. 4). Konkrétně bylo vybráno 15 *HvMPK6_RNAi* rostlin T1 generace - B1a/1, B1a/3, B1a/5, B1a/6, B1b/1, B1b/6, B2a/1, B2a/8, B2a/10, B2a/12, B2b/1, B2b/3, BIV/3/9, BIV/3/10 a BIV/2/2 - a jejich tři negativní sesterské rostliny - B1a/2N, B2a/6N a BIV/3/12N.



Obrázek 4 - Odhad genotypu *HvMPK6_RNAi* transgenních rostlin v T1 generaci. Šípky označují potenciálně homozygotní rostliny vybrané ke kultivaci do další generace. Analyzovaná potomstva jednotlivých linií jsou označena svorkou s označením T1 rostliny. Pro každý genotyp byly analyzovány dva technické replikáty. Chybové úsečky označují dvojnásobek směrodatné odchylky relativního množství T-DNA.

5.1.2 Selektce *HvMPK6_RNAi* linií v T2 generaci

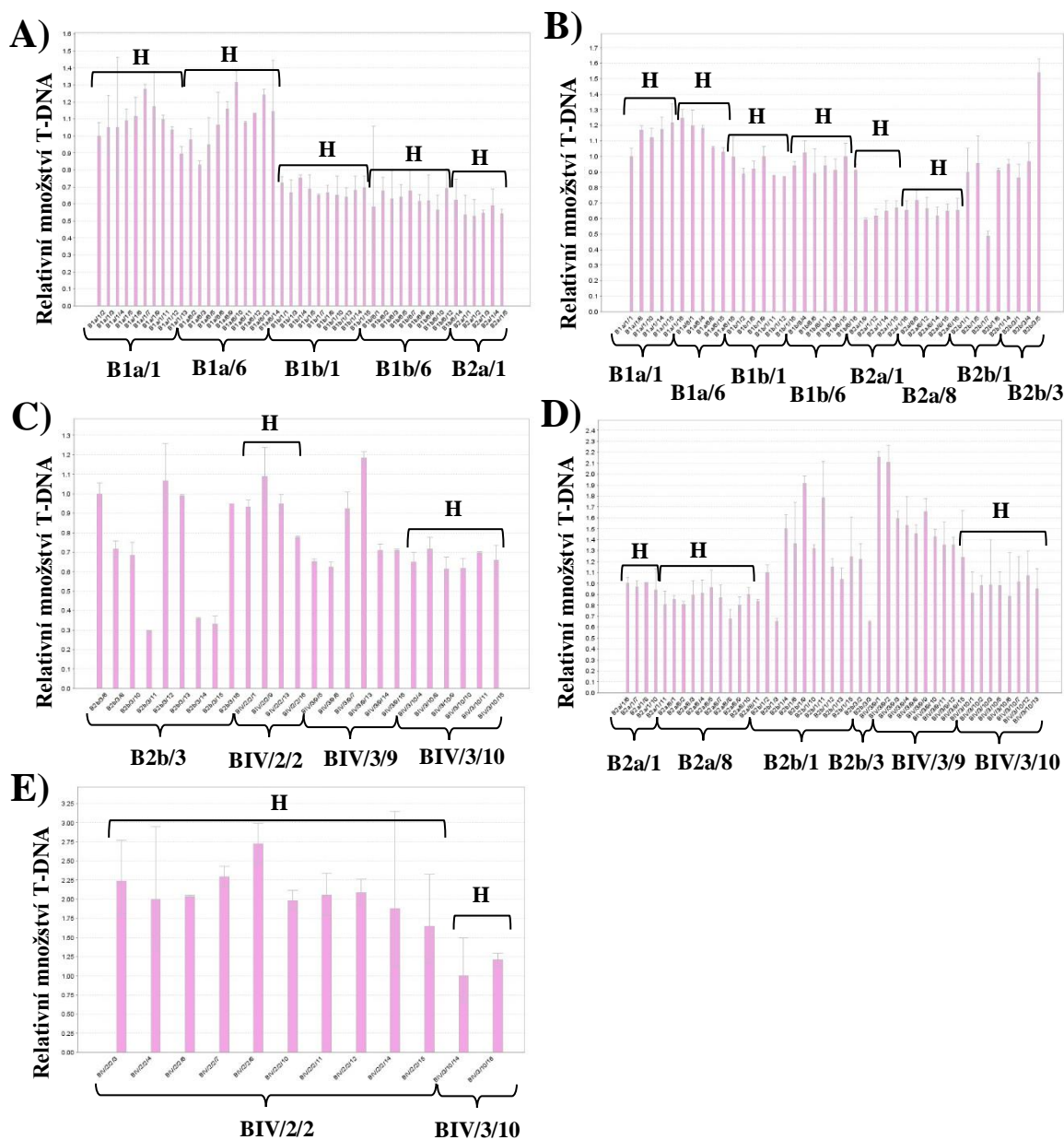
Pro analýzu T2 generace potomstva *HvMPK6_RNAi* linií v *in vitro* testu hygromycinové rezistence byli vybráni potomci segregujících i nesegregujících *HvMPK6_RNAi* linií, kteří byli rezistentní vůči hygromycinu a obsahovali dvojnásobné množství T-DNA (kapitola 5.1.1). Testováno bylo potomstvo celkem 15 T1 rostlin šesti nezávislých transgenních linií – B1a, B1b, B2a, B2b, BIV/2 a BIV/3. Konkrétně bylo testováno T2 potomstvo rostlin B1a/1, B1a/3, B1a/5, B1a/6, B1b/1, B1b/6, B2a/1, B2a/8, B2a/10, B2a/12, B2b/1, B2b/3, BIV/3/9, BIV/3/10, BIV/2/2 a tří negativních sesterských rostlin - B1a/2N, B2a/6N a BIV/3/12N (obr. 5, tab. 7). Celkově bylo analyzováno 257 potomků při průměrném počtu 16 potomků na T1 rostlinu. K segregaci nedošlo u žádného z testovaných T2 potomstev (obr. 5, tab. 7). Všichni testovaní potomci T1 rostlin byli uniformně rezistentní vůči hygromycinu, což naznačilo, že mateřské T1 rostliny byly homozygotní v T-DNA inzerci nebo obsahovaly více T-DNA inzercí. Potomci negativních sesterských rostlin B1a/2N a B2a/6N byli divokého typu, pouze potomci rostliny BIV/3/12N byli rezistentní vůči hygromycinu (obr. 5, tab. 7). Získané výsledky naznačily velkou spolehlivost odhadu množství T-DNA – potenciálních homozygotů u rostlin T1 generace pomocí Multiplex TaqMan qPCR (kapitola 5.1.1).



Obrázek 5 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6* RNAi linií v T2 generaci.

Legenda: **A) 1. destička:** jamky A1–B4: potomstvo B1a/1, rostliny 1–16; B5–C9: potomstvo B1a/3, rostliny 1-17; C10–D12: potomstvo B1a/5, rostliny 1–15; E1–F4: potomstvo B1a/6, rostliny 1–16; F5–G8: potomstvo B1b/1, rostliny 1–16; G9–H12: potomstvo B1b/6, rostliny 1–16; **B) 2. destička:** jamky A1–B4: potomstvo B2a/1, rostliny 1–16; B5–C8: potomstvo B2a/8, rostliny 1–16; C9–D12: potomstvo B2a/10, rostliny 1–16; E1–F4: potomstvo B2a/12, rostliny 1–16; F5–G7: potomstvo B2b/1, rostliny 1–15; G8–H11: potomstvo B2b/3, rostliny 1–16; H12: potomstvo BIV/3/9, rostlina 1; **C) 3. destička:** jamky A1–B3: potomstvo BIV/3/9, rostliny 2–16; B4–C7: potomstvo BIV/3/10, rostliny 1–16; C8–D11: potomstvo BIV/2/2, rostliny 1–16; D12–E5: potomstvo B1a/2N, rostliny 1–6; E6–E11: potomstvo B2a/6N, rostliny 1–6; E12–F5: potomstvo BIV/3/12N, rostliny 1–6.

Po ověření uniformity potomstev testovaných rostlin v rezistenci vůči hygromycinu byla provedena Multiplex TaqMan qPCR s cílem identifikace potomstev homozygotních v T-DNA inserci. Celkem 8 z testovaných 11 T1 rostlin (B1a/1, B1a/6, B1b/1, B1b/6, B2a/1, B2a/8, BIV/2/2, BIV/3/10) se ukázalo jako homozygotní v T-DNA inserci, jelikož relativní množství T-DNA bylo u všech jejich potomků přibližně stejné (obr. 6). Množství T-DNA u potomků zbývajících 3 rostlin (B2b/1, B2b/3, BIV/3/9) segregovalo a jedná se tedy pravděpodobně o heterozygotní jedince s větším množstvím T-DNA insercí (obr. 6). Celkově byli u pěti nezávislých transgenních linií (B1a, B1b, B2a, BIV/2 a BIV/3) identifikováni jedinci homozygotní v T-DNA inserci.



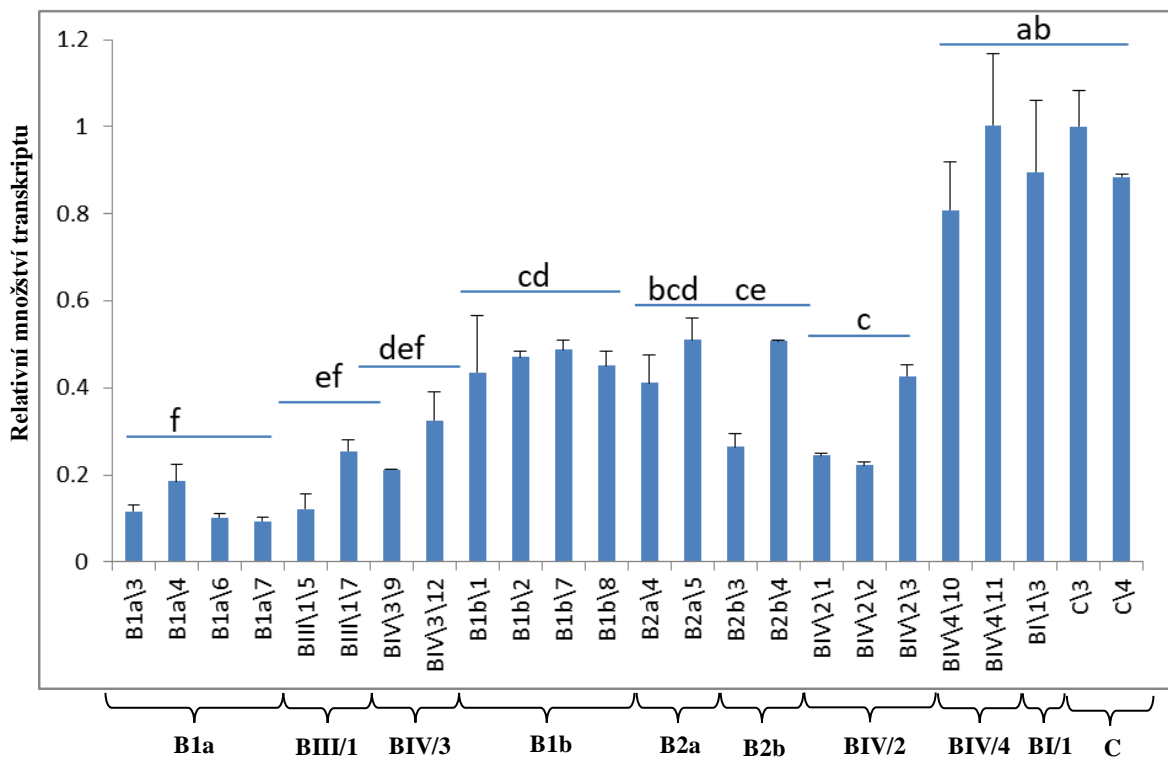
Obrázek 6 - Relativní množství T-DNA v T2 generaci potomstev *HvMPK6_RNAi* linií. Přibližně stejné množství T-DNA u všech potomků některých T1 rostlin (označeno svorkou s písmenem H) indikuje homozygotnost v T-DNA inserci. Analyzovaná potomstva jednotlivých rostlin jsou označena svorkou s označením T1 rostliny. Pro každý genotyp byly analyzovány dva technické replikáty. Chybové úsečky označují dvojnásobek směrodatné odchylky relativního množství T-DNA.

Tabulka 15 - Přehled potomků *HvMPK6_RNAi* linií analyzovaných v *in vitro* testu hygromycinové rezistence.

Linie – T0 rostlina/T1 rostlina	Generace potomstva	Počet analyzovaných potomků	Počet potomků s výskytem hygromycinové rezistence	Počet potomků divokého typu
B1a	T1	14	11	3
B1b	T1	13	11	2
B2a	T1	14	10	4
B2b	T1	14	14	0
BI/1	T1	14	0	14
BIII/1	T1	12	12	0
BIV/2	T1	3	3	0
BIV/3	T1	13	13	0
BIV/4	T1	14	9	5
C	T1	14	0	14
B1a/1	T2	16	16	0
B1a/3	T2	17	17	0
B1a/5	T2	15	15	0
B1a/6	T2	16	16	0
B1b/1	T2	16	16	0
B1b/6	T2	16	16	0
B2a/1	T2	16	16	0
B2a/8	T2	16	16	0
B2a/10	T2	16	16	0
B2a/12	T2	16	16	0
B2b/1	T2	15	15	0
B2b/3	T2	16	16	0
BIV/3/9	T2	16	16	0
BIV/3/10	T2	16	16	0
BIV/2/2	T2	16	16	0
B1a/2N	T2	6	0	6
B2a/6N	T2	6	0	6
BIV/3/12N	T2	6	6	0

5.1.3 Analýza exprese *HvMPK6* u *HvMPK6_RNAi* linií v T1 generaci

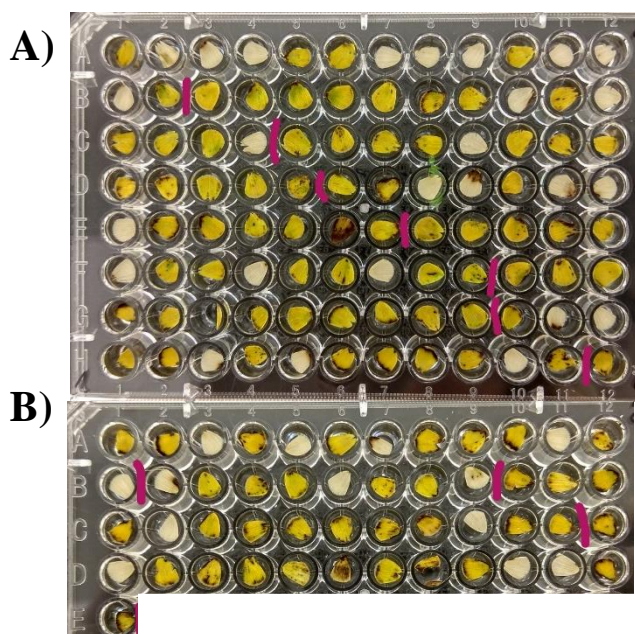
U vybraných T1 potomků *HvMPK6_RNAi* linií bylo zjištěno relativní množství mRNA transkriptu *HvMPK6* pomocí RT-qPCR. Celkem bylo analyzováno devět *HvMPK6_RNAi* linií (B1a, B1b, B2a, B2b, BI/1, BIII/1, BIV/2, BIV/3 a BIV/4) a 1 negativní sesterská linie C. U potomstva tří transgenních linií B1a, BIII/1 a BIV/3 bylo zjištěno zhruba třikrát až čtyřikrát menší relativní množství *HvMPK6* transkriptu než u kontrolní linie C. Potomstvo dalších čtyř transgenních linií (B1b, B2a, B2b a BIV/2) obsahovalo zhruba dvakrát menší množství *HvMPK6* transkriptu než kontrolní linie C a potomstvo dvou linií (BIV/4 a BI/1) obsahovalo přibližně stejné množství transkriptu *HvMPK6* jako kontrolní linie C (obr . 7).



Obrázek 7 - Relativní množství *HvMPK6* transkriptu u T1 potomků *HvMPK6_RNAi* transgenních linií. Analyzovaná potomstva jednotlivých linií jsou označena svorkou s označením linie. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky relativního množství *HvMPK6* transkriptu. Data byla vyhodnocena analýzou rozptylu (AR) s jednoduchým tříděním. Pro podrobnější vyhodnocení výsledků AR byla využita Tukeyho metoda ($\alpha=0,05$).

5.1.4 Selekcce *HvMPK6_OE* linií v T1 generaci

In vitro test hygromycinové rezistence byl proveden na T1 generaci potomků 11 nezávislých transgenních linií s nadprodukcí *HvMPK6* (*HvMPK6_OE* linií), při průměrném počtu 13 rostlin na linii. Konkrétně byly testovány linie A1a, A2a, A3b, A4a, A5a, A6a, AI/1, AII/1, AIII/1, AIV/1 a AIV/2. Pouze u potomků linie A6a nebyla pozorována segregace, u všech ostatních linií byl nejméně 1 testovaný potomek divokého typu (obr. 8, tab. 8).

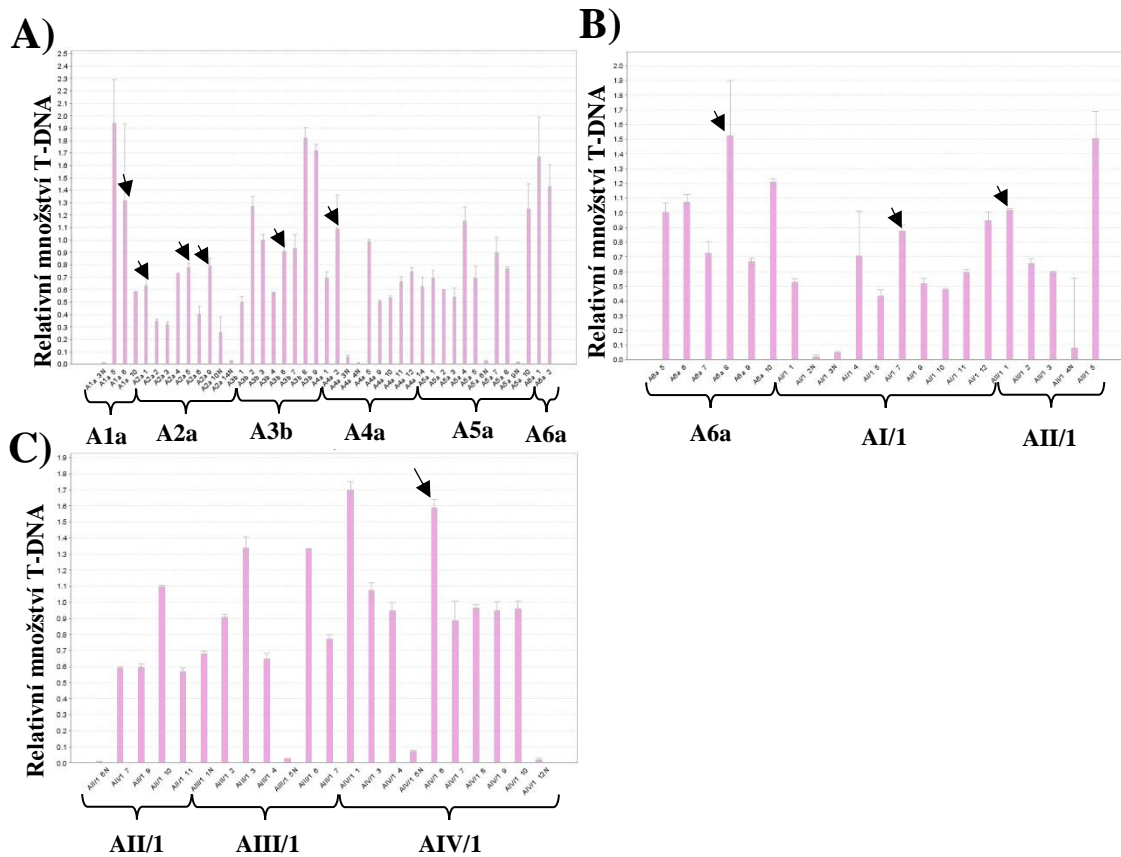


Obrázek 8 - *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_OE* linií v T1 generaci.

Legenda: **A) 1. destička:** jamky A1–B2: potomstvo A1a, rostliny 1–14; B3–C4: potomstvo A2a, rostliny 1–14; C5–D5: potomstvo A3b, rostliny 1–13; D6–E7: potomstvo A4a, rostliny 1–14; E8–F9: potomstvo A5a, rostliny 1–14; F10–G9: potomstvo A6a, rostliny 1–12; G10–H11: potomstvo AI/1, rostliny 1–14; H12: potomstvo AII/1, rostlina 1; **B) 2. destička:** jamky A1–B1: potomstvo AII/1, rostliny 2–14; B2–B9: potomstvo AIII/1, rostliny 1–8; B10–C11: potomstvo AIV/1, rostliny 1–14; C12–E1: potomstvo AIV/2, rostliny 1–14.

T1 potomci *HvMPK6_OE* linií, kteří se v *in vitro* testu hygromycinové rezistence ukázali jako rezistentní, byli analyzováni pro množství T-DNA pomocí Multiplex TaqMan qPCR (obr. 9, kapitola 5.1.1). Celkem bylo testováno 11 nezávislých linií z jejichž potomstva bylo na základě stanoveného množství T-DNA vybráno 12 *HvMPK6_OE* rostlin pro kultivaci do další generace. Vybrány byly rostliny A1a/1, A1a/6, A2a/1, A2a/5, A2a/9, A3b/6, A4a/2, A6a/8, AI/1/7, AII/1/1, AIV/1/6 a AIV/2/8 (obr. 9), a také jejich negativní

sesterské rostliny: A1a/3N, A2a/10N, A2a/14N, A4a/3N, A4a/4N, AI/1/2N, AII/1/4N,



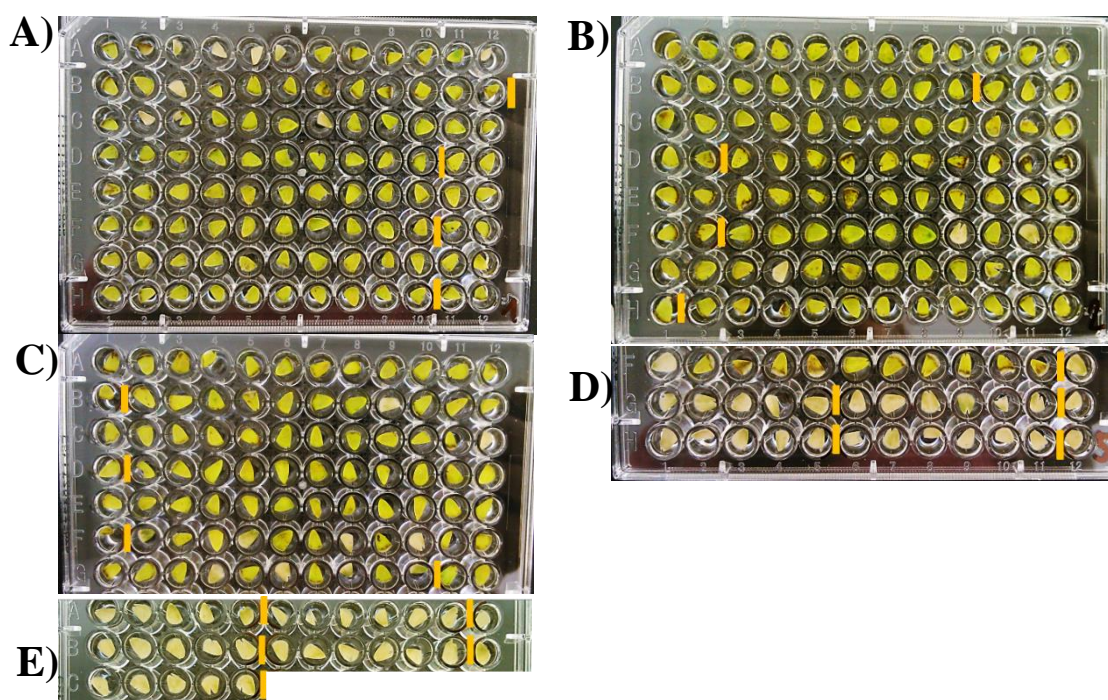
Obrázek 9 - Odhad genotypu *HvMPK6_OE* transgenních rostlin v T1 generaci. Šipky označují potenciálně homozygotní rostliny vybrané ke kultivaci do další generace. Analyzovaná potomstva jednotlivých linií jsou označena svorkou s označením mateřské T1 rostliny. Pro každý genotyp byly analyzovány dva technické replikáty. Chybové úsečky označují dvojnásobek směrodatné odchylky relativního množství T-DNA.

AIV/1/5N a AIV/2/11N (obr. 8).

5.1.5 Selektce *HvMPK6_OE* linií v T2 generaci

In vitro testu hygromycinové rezistence bylo testováno T2 potomstvo devíti nezávislých transgenních linií – A1a, A2a, A3b, A4a, A6a, AI/1, AII/1, AIV/1 a AIV/2. Konkrétně bylo testováno potomstvo dvanácti T1 rostlin A1a/1, A1a/6, A2a/1, A2a/5, A2a/9, A3b/6, A4a/2, A6a/8, AI/1/7, AII/1/1, AIV/1/6 a AIV/2/8 a devíti negativních sesterských rostlin A1a/3N, A2a/10N, A2a/14N, A4a/3N, A4a/4N, AI/1/2N, AII/1/4N, AIV/1/5N a AIV/2/11N (obr. 10, tab. 8). Celkem bylo analyzováno 305 potomků při průměrném počtu 21 potomků na T1 rostlinu. U testovaných T2 potomstev sedmi T1 rostlin A2a/1, A2a/5, A2a/9, A3b/6, A4a/2, AI/1/7 a AIV/1/6, nebyla pozorována segregace, všichni testovaní potomci byli rezistentní vůči hygromycinu, což naznačilo, že mateřské T1 rostliny byly homozygotní v T-DNA inserci nebo obsahovaly více

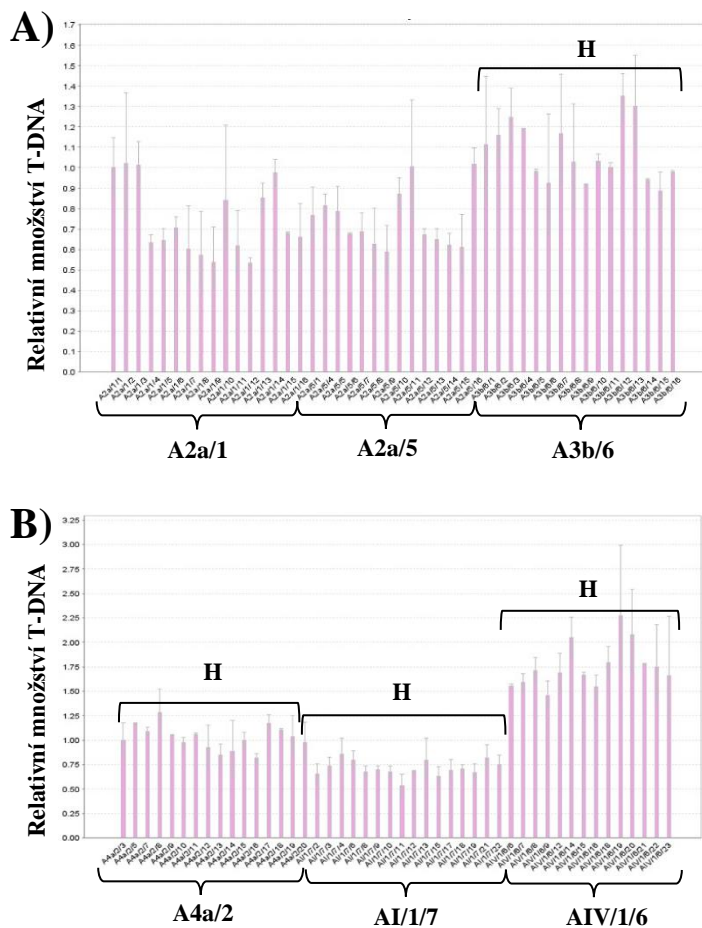
T-DNA inzercí. Testování T2 potomci T1 rostlin A1a/1, A1a/6, A6a/8, AII/1/1 a AIV/2/8 segregovali, jedná se tedy pravděpodobně o heterozygoty (obr. 10, tab. 8). Testování T2 potomci všech negativních T1 sesterských rostlin byli divokého typu (obr. 10, tab. 8). Na T2 potomcích, kteří v *in vitro* testu hygromycinové rezistence neselegovali byla provedena Multiplex TaqMan qPCR s cílem identifikace *HvMPK6_OE* linií homozygotních v T-DNA inzerci (obr. 11). Celkem bylo testováno T2 potomstvo šesti T1 rostlin – A2a/1, A2a/5, A3b/6, A4a/2, AI/1/7 a AIV/1/6. Relativní množství T-DNA bylo u testovaných T2 potomků čtyř T1 rostlin - A3b/6, A4a/2, AI/1/7 a AIV/1/6 přibližně stejné, ukázalo se tedy, že jde o homozygoty v T-DNA inzerci. Množství T-DNA u potomstva zbývajících dvou T1 rostlin A2a/1 a A2a/5 segregovalo a jedná se tedy pravděpodobně o heterozygotní jedince s větším množstvím



Obrázek 10 – *In vitro* test hygromycinové rezistence *HvMPK6_OE* linií v T2 generaci.

Legenda: **A) 1. destička:** jamky A1–B12: potomstvo A1a/1, rostliny 1–24; C1–D10: potomstvo A1a/6, rostliny 1–22; D11–F10: potomstvo A2a/1, rostliny 1–24; F11–H10: potomstvo A2a/5, rostliny 1–24; H11, H12: potomstvo A2a/9, rostliny 1 a 2; **B) 2. destička:** jamky A1–B9: potomstvo A2a/9, rostliny 3–24; B10–D2: potomstvo A3b/6, rostliny 1-17; D3–F2: potomstvo A4a/2, rostliny 1–24; F3–H1: potomstvo A6a/8, rostliny 1-23; H2–H12: potomstvo AI/1/7, rostliny 1–11; **C) 3. destička:** jamky A1–B1: potomstvo AI/1/7, rostliny 12-24; B2–D1: potomstvo AII/1/1, rostliny 1–24; D2–F1: potomstvo AIV/1/6, rostliny 1–24; F2–G10: potomstvo AIV/2/8, rostliny 1–21; **D) 4. destička:** F12–G5: potomstvo A1a/3N, rostliny 1–6; G6–G11: potomstvo A2a/10N, rostliny 1–6; G12–H5: potomstvo A2a/14N, rostliny 1–6; H6–H11: potomstvo A4a/3N, rostliny 1–6; H12: potomstvo A4a/4N, rostlina 1; **E) 5. destička:** jamky A1–A5: potomstvo A4a/4N, rostliny 2–6; A6–A11: potomstvo AI/1/2N, rostliny 1–6; A12–B5: potomstvo AII/1/4N, rostliny 1–6; B6–B11: potomstvo AIV/1/5N, rostliny 1–6; B12–C5: potomstvo AIV/2/11N, rostliny 1–6.

T-DNA inzercí (obr. 11). Jedinci homozygotní v T-DNA inzerci tak byli identifikováni u celkem čtyř nezávislých *HvMPK6_OE* transgenních linií – A3b, A4a, AI/1 a AIV/1.



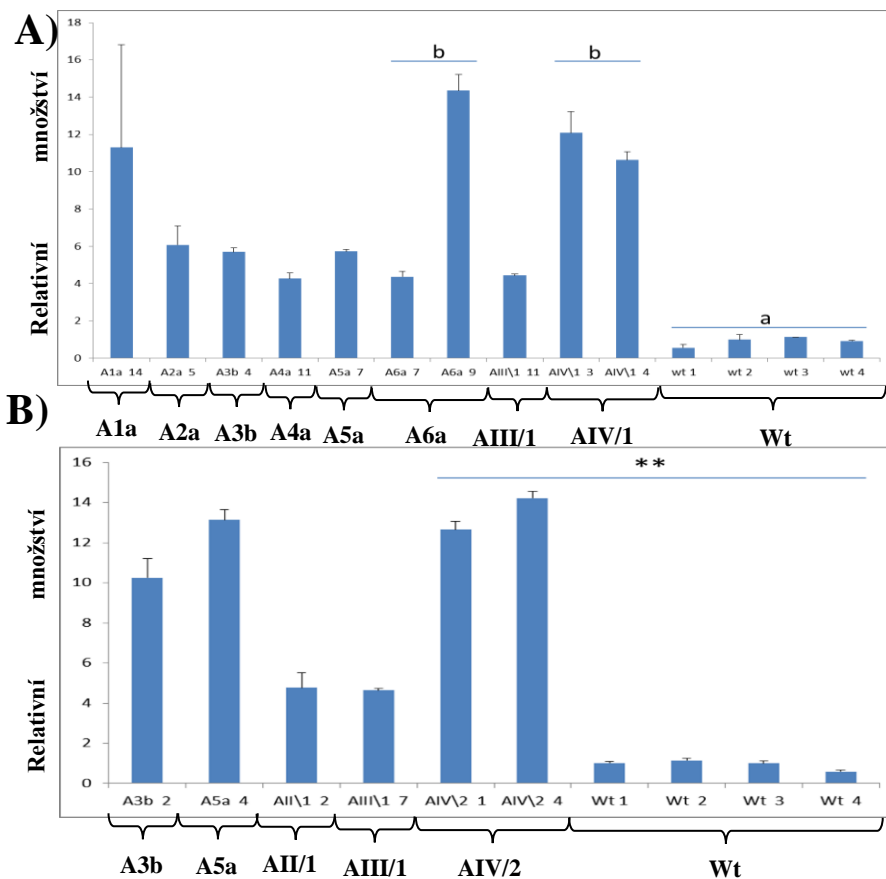
Obrázek 11 - Relativní množství T-DNA v T2 generaci potomstev *HvMPK6_OE* linií. Analyzovaná potomstva jednotlivých rostlin jsou označena svorkou s označením T1 rostliny. Přibližně stejné množství T-DNA u všech potomků některých T1 rostlin (označeno svorkou s písmenem H) indikuje homozygotnost v T-DNA inzerci. Pro každý genotyp byly analyzovány dva technické replikáty. Chybové úsečky označují dvojnásobek směrodatné odchylky relativního množství T-DNA.

Tabulka 16 - Přehled potomků *HvMPK6_OE* linií analyzovaných v *in vitro* testu hygromycinové rezistence.

Linie – T0 rostlina/T1 rostlina	Generace potomstva	Počet analyzovaných potomků	Počet potomků s výskytem hygromycinové rezistence	Počet potomků divokého typu
A1a	T1	14	5	9
A2a	T1	14	11	3
A3b	T1	13	12	1
A4a	T1	14	9	5
A5a	T1	14	11	3
A6a	T1	12	12	0
AI/1	T1	14	9	5
AII/1	T1	14	9	5
AIII/1	T1	8	5	3
AIV/1	T1	14	12	2
AIV/2	T1	14	11	3
A1a/1	T2	24	19	5
A1a/6	T2	22	21	1
A2a/1	T2	24	24	0
A2a/5	T2	24	24	0
A2a/9	T2	24	24	0
A3b/6	T2	17	17	0
A4a/2	T2	24	24	0
A6a/8	T2	23	21	2
AI/1/7	T2	24	24	0
AII/1/1	T2	24	22	2
AIV/1/6	T2	24	24	0
AIV/2/8	T2	21	16	5
A1a/3N	T2	6	0	6
A2a/10N	T2	6	0	6
A2a/14N	T2	6	0	6
A4a/3N	T2	6	0	6
A4a/4N	T2	6	0	6
AI/1/2N	T2	6	0	6
AII/1/4N	T2	6	0	6
AIV/1/5N	T2	6	0	6
AIV/2/11N	T2	6	0	6

5.1.6 Analýza exprese *HvMPK6* u *HvMPK6_OE* linií v T1 generaci

U T1 potomků vybraných *HvMPK6_OE* linií bylo analyzováno relativní množství mRNA transkriptu *HvMPK6* pomocí RT-qPCR. Celkem bylo analyzováno deset *HvMPK6_OE* linií - A1a, A2a, A3b, A4a, A5a, A6a, AII/1, AIII/1, AIV/1 a AIV/2 a čtyři kontrolní rostliny divokého typu - Wt1, Wt2, Wt3 a Wt4. U potomků čtyř transgenních linií - A2a, A4a, AII/1 a AIII/1 bylo zjištěno přibližně pětikrát až šestkrát větší množství transkriptu *HvMPK6* než u kontrolních rostlin. Potomci tří transgenních linií - A3b, A5a a A6a obsahovali zhruba šestkrát až dvanáctkrát větší množství transkriptu *HvMPK6* než kontrolní rostliny a potomci zbylých tří transgenních linií - A1a, AIV/1 a AIV/2 obsahovali přibližně jedenáctkrát až čtrnáctkrát větší množství *HvMPK6* transkriptu než kontrolní rostliny.



Obrázek 12 - Relativní množství *HvMPK6* transkriptu u T1 potomků *HvMPK6_OE* transgenních linií. Analyzovaná potomstva jednotlivých linií jsou označena svorkou s označením linie. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky relativního množství *HvMPK6* transkriptu. Data byla vyhodnocena analýzou rozptylu (AR) s jednoduchým tříděním, přičemž pro podrobnější vyhodnocení výsledků AR byla využita Tukeyho metoda ($\alpha=0,05$), nebo pomocí dvou výběrového studentova T-testu (B). ** - statisticky významný rozdíl pro $\alpha=0,01$.

5.2 Stanovení množství klasů se standardním a sníženým počtem zrn u *HvMPK6_OE* linií ječmene

V rámci fenotypování byly spočítány klasy u transgenních *HvMPK6_OE* rostlin v generaci T1 a T2. Analyzovaná T2 generace zahrnovala potomky *HvMPK6_OE* linií, jejichž charakterizace a selekce není v práci z důvodu velkého rozsahu prováděných analýz a zachování přehlednosti práce prezentována. U každé rostliny byl spočítán celkový počet klasů a poté klasů se sníženým počtem zrn. Limit pro určení, zda má klas standardní či snížený počet zrn byl nastaven na 15 zrn. Takto bylo hodnoceno celkem 91 *HvMPK6_OE* transgenních rostlin a 19 negativních sesterských rostlin z celkem 18 nezávislých transgenních linií.

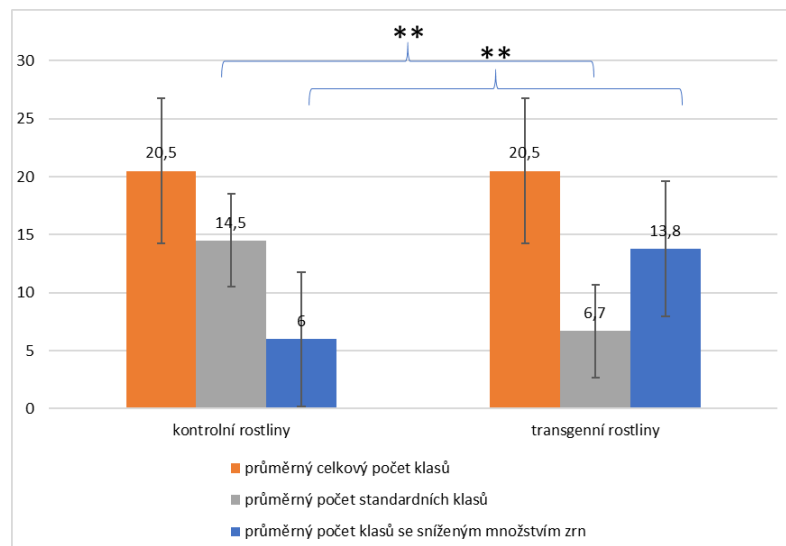
Transgenní rostliny vykazovaly výrazný fenotyp oproti negativním sesterským rostlinám v podobě výrazně zvýšeného množství klasů se sníženým počtem zrn při zachování stejného celkového průměrného počtu klasů (obr. 13). Byl vypočítán průměrný celkový počet klasů a průměrný počet klasů se sníženým počtem zrn zvlášť pro všechny transgenní a kontrolní rostliny. Celkový průměr počtu klasů byl jak pro transgenní rostliny, tak pro negativní sesterské rostliny 20,5 klasu. Průměrný počet klasů se sníženým počtem zrn byl u transgenních rostlin 13,8 klasu a u negativních sesterských rostlin 6 klasů. Následně byl dopočítán průměrný počet standardních klasů, tedy klasů s počtem zrn větším než 15, který u transgenních rostlin činil 6,7 klasu a u negativních sesterských rostlin 14,5 klasu (obr. 14A).

Z těchto hodnot bylo poté vypočteno průměrné procentuální zastoupení klasů se sníženým počtem zrn zvláště pro všechny transgenní rostliny a negativní sesterské rostliny. Zastoupení klasů se sníženým počtem zrn bylo u transgenních *HvMPK6_OE* rostlin 67 % a u negativních sesterských rostlin 29 % (obr. 14B). Dále bylo ještě vypočteno procentuální zastoupení klasů se sníženým počtem zrn pro jednotlivé *HvMPK6_OE* transgenní a negativní sesterské linie (obr. 15).

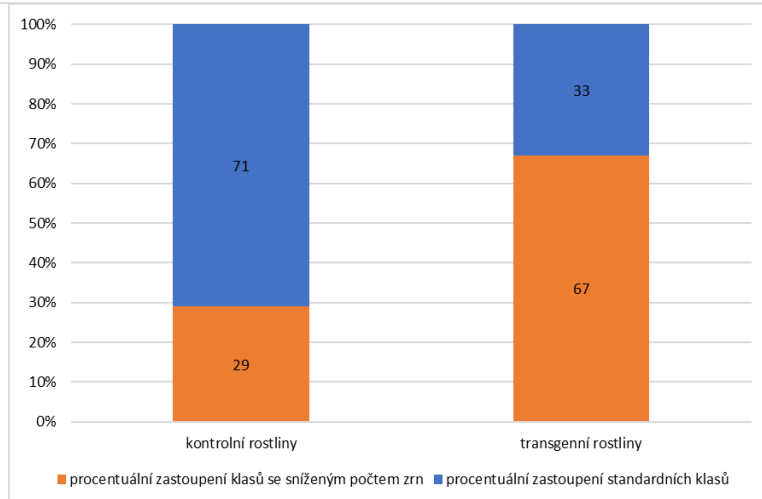


Obrázek 13 - Fotografie kontrolní rostliny divokého typu (negativní rostlina) (vlevo) a *HvMPK6_OE* transgenní rostliny (vpravo). Fialové hroty šipek označují klasy se standardním počtem zrn (počet zrn >15) a červené šipky označují klasy se sníženým počtem zrn (počet zrn <15).

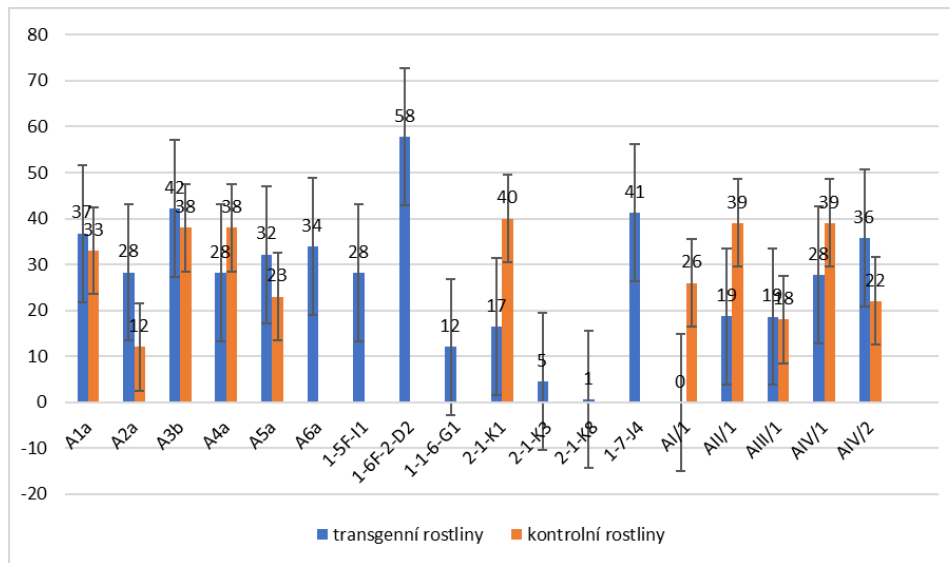
A)



B)



Obrázek 14 - A) Průměrný počet standardních klasů, klasů se sníženým počtem zrn a průměrný celkový počet klasů u *HvMPK6_OE* transgenních a kontrolních rostlin divokého typu. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky počtu klasů. Data byla vyhodnocena pomocí dvou výběrového studentova T-testu. *** - statisticky významný rozdíl pro $\alpha=0,01$. B) Průměrné procentuální zastoupení standardních klasů a klasů se sníženým počtem zrn u *HvMPK6_OE* transgenních a kontrolních rostlin divokého typu. Celkem bylo analyzováno 91 transgenních a 19 negativních sesterských rostlin.



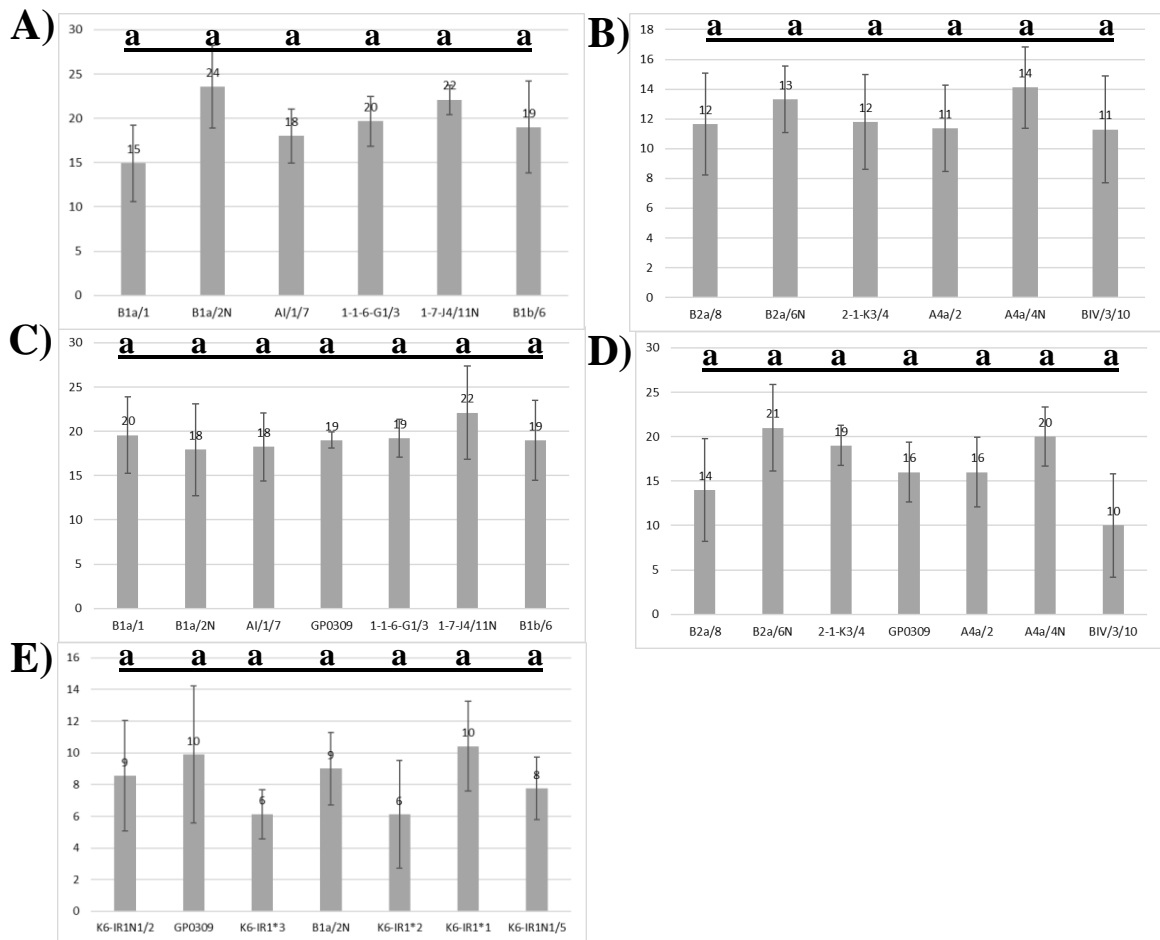
Obrázek 15 - Procentuální zastoupení klasů se sníženým počtem zrn u *HvMPK6_OE* transgenických linií a jejich negativních sesterských linií. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky průměrných zastoupení klasů se sníženým počtem zrn.

5.2.1 Fenotypování transgenických rostlin ječmene v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*)

V provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné bylo analyzováno potomstvo čtyř nezávislých *HvMPK6_RNAi* linií - B1a/1, B1b/6, B2a/8, BIV/3/10 a čtyř nezávislých *HvMPK6_OE* linií - AI/1/7, 1-1-6-G1/3, 2-1-K3/4, A4a/2. Konkrétně bylo testováno potomstvo T1 rostlin, které byly vyselektovány jako homozygotní v T-DNA inzerci a zároveň vykazovaly snížené - *HvMPK6_RNAi* rostliny B1a/1, B1b/6, B2a/8, BIV/3/10 nebo zvýšené - *HvMPK6_OE* rostliny AI/1/7, 1-1-6-G1/3, 2-1-K3/4, A4a/2 množství transkriptu *HvMPK6* (kapitola 5.1.3 a 5.1.6). Jako kontrolní bylo v experimentech použito potomstvo divokého typu rostlin - B1a/2N, B2a/6N, 1-7-J4/11N a A4a/4N odvozené ze čtyř transgenických linií - B1a, 1-7-J4, B2a a A4a. Selektce *HvMPK6_OE* transgenických rostlin 1-1-6-G1/3 a 2-1-K3/4 homozygotních v T-DNA inzerci a rostliny divokého typu 1-7-J4/11N není v práci prezentována z důvodu velkého rozsahu prováděných analýz a zachování přehlednosti práce.

Nebyl pozorován statisticky signifikantní rozdíl v naměřených hodnotách infekční frekvence (IF) mezi potomky *HvMPK6_RNAi*, *HvMPK6_OE* a z nich odvozených kontrolních rostlin divokého typu (Obr. 16). Experimenty byly realizovány ve čtyřech opakováních vždy ve dvou kultivačních boxech. Výsledky nebyly signifikantně rozdílné pro první (obr. 16A – box 1 a 16B – box 2), druhé (obr. 16C – box 1 a 16D – box 2) ani

v další dvě opakování experimentů (výsledky nejsou prezentovány). V pátém experimentu byly testovány *HvMPK6-RNAi* linie jejichž charakterizace není v práci prezentována – K6-IR1N1 a K6-IR1* (Obr. 16E). Ani u potomků těchto linií nebyl zaznamenán statisticky signifikantní rozdíl v hodnotě IF oproti kontrolním rostlinám divokého typu, avšak potomci linie K6-IR1* dosahovali relativně nízké hodnoty IF ve srovnání s kontrolními rostlinami a je možné, že při větším počtu analyzovaných rostlin by tento rozdíl byl signifikantní.



Obrázek 16 - Infekční frekvence *P. hordei* u potomků *HvMPK6_OE* (A4a/2, AI/1/7, 1-1-6-G1/3 a 2-1-K3/4), *HvMPK6_RNAi* (B1a/1, B1b/6, B2a/8 a BIV/3/10) a z nich odvozených kontrolních rostlin divokého typu (B1a/2N, 1-7-J4/11N, B2a/6N, A4a/4N a GP0309). Analyzováno bylo 7– 9 rostlin na linii. Chybové úsečky označují směrodatné odchylky infekční frekvence. Data byla vyhodnocena analýzou rozptylu s jednoduchým tříděním na hladině významnosti $\alpha = 0,05$. A) Experiment 1 box 1, B) Experiment 1 box 2, C) Experiment 2 box 1, D) Experiment 2 box 2, E) Experiment 5.

6 DISKUZE

Metoda *in vitro* testu hygromycinové rezistence se ukázala jako jednoduchý a spolehlivý nástroj k selekci transgenních a negativních rostlin (obr. 3 a 8), ale také k ověření homozygotnosti rostlin identifikovaných pomocí Multiplex TaqMan qPCR prostřednictvím analýzy segregace jejich potomků (obr. 5 a 10). V porovnání se Southern blotem umožňuje kombinace metod *in vitro* testu hygromycinové rezistence a Multiplex TaqMan qPCR rychlejší a efektivnější analýzu transgenních linií homozygotních v T-DNA inzerci. Zároveň je také možno analyzovat v jednom pokusu mnohem více vzorků (96 vzorků v destičce u *in vitro* testu hygromycinové rezistence i Multiplex TaqMan qPCR vs maximálně zhruba 9–14 vzorků u Southern blotu na jeden gel). *In vitro* test hygromycinové rezistence umožnil předvýběr transgenních T1 potomků *HvMPK6* transgenních linií, u kterých bylo poté zjišťováno relativní množství T-DNA pomocí Multiplex TaqMan qPCR, čímž se snížilo množství T1 potomků potřebné pro analýzu. Na základě výstupu Multiplex TaqMan qPCR byly vybrány potenciálně homozygotní rostliny v T-DNA inzerci pro kultivaci do další generace. Při analýze T2 potomstev pomocí *in vitro* testu hygromycinové rezistence byly poté na základě jejich segregace rozlišeny mateřské T1 rostliny potenciálně homozygotní a heterozygotní v T-DNA inzerci (vyštěpení negativních sesterských rostlin), čímž se opět snížilo množství T2 potomků potřebné pro Multiplex TaqMan qPCR analýzu. Na základě analýzy T2 potomstva byly vybrány T1 rostliny homozygotní v T-DNA inzerci pro kultivaci jejich potomků v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné. Pro přesnější stanovení počtu T-DNA inzercí – potvrzení přítomnosti jedné T-DNA inzerce - by bylo vhodné u vyselektovaných *HvMPK6* transgenních homozygotních linií ověřit počet T-DNA kopií pomocí Southern blotu.

Na základě *in vitro* testu hygromycinové rezistence a následné Multiplex TaqMan qPCR, prováděných na T1 potomstvu *HvMPK6_RNAi* linií, byli pro kultivaci do další generace vybráni T1 potomci sedmi *HvMPK6_RNAi* linií (B1a, B1b, B2a, B2b, BI/1, BIV/2 a BIV/3). V následujícím *in vitro* testu hygromycinové rezistence T2 potomstva nedošlo k segregaci v žádné z testovaných linií a mateřské rostliny byly proto považovány za potenciálně homozygotní v T-DNA inzerci. Na základě Multiplex TaqMan qPCR byly T1 rostliny celkem pěti *HvMPK6_RNAi* linií potvrzeny jako homozygotní v T-DNA inzerci (B1a, B1b, B2a, BIV/2 a BIV/3), jelikož všichni testovaní T2 potomci měli přibližně stejné relativní množství T-DNA. Relativní množství T-DNA

u T2 potomků zbývajících dvou *HvMPK6_RNAi* linií (B2b a BI/1) segregovalo a T1 rostliny těchto linií jsou tedy pravděpodobně heterozygotní s větším množstvím T-DNA inzercí (kapitola 5.1.2 a 5.1.1). T1 potomstvo devíti vybraných *HvMPK6_RNAi* linií bylo také podrobena analýze relativního množství mRNA transkriptu *HvMPK6* pomocí RT-qPCR. Pouze u potomstva dvou linií (BIV/4 a BI/1) bylo zjištěno přibližně stejné množství *HvMPK6* transkriptu jako u kontrolní linie C, potomstvo ostatních testovaných linií obsahovalo snížené množství *HvMPK6* transkriptu oproti kontrolní linii C (kapitola 5.1.3).

V případě *HvMPK6_OE* rostlin byly pro kultivaci do T2 generace vybrány T1 rostliny devíti *HvMPK6_OE* linií (A1a, A2a, A3b, A4a, A6a, AI/1, AII/1, AIV/1 a AIV/2). T2 potomstvo čtyř linií (A1a, A6a, AII/1 a AIV/2) segregovalo v *in vitro* testu hygromycinové rezistence a Multiplex TaqMan qPCR byla proto provedena na T2 potomcích pouze zbývajících pěti linií (A2a, A3b, A4a, AI/1 a AIV/1). U T2 potomků čtyř *HvMPK6_OE* linií (A3b, A4a, AI/1 a AIV/1) nedošlo k segregaci v relativním množství T-DNA a T1 rostliny těchto linií byly tudíž identifikovány jako homozygotní v T-DNA inzercí. Relativní množství T-DNA u T2 potomků *HvMPK6_OE* linie A2a segregovalo a testované T1 rostliny této linie byly tedy heterozygotní s větším množstvím T-DNA inzercí (kapitola 5.1.4 a 5.1.5). Na T1 potomstvu deseti *HvMPK6_OE* linií byla provedena analýza relativního množství mRNA transkriptu *HvMPK6*. Všechny testované rostliny vykazovaly zvýšené množství transkriptu *HvMPK6* oproti rostlinám divokého typu (kapitola 5.1.6).

Při fenotypování *HvMPK6_OE* rostlin v T1 generaci byl pozorován výrazný fenotyp v podobě velkého množství klasů se sníženým počtem zrn (obr. 13). Transgenní *HvMPK6_OE* rostliny měly průměrně 67 % klasů se sníženým počtem zrn, přičemž rostliny negativních sesterských linií jich měly průměrně pouze 29 % (kapitola 5.2, obr. 14). Tato pozorování naznačují, že gen *HvMPK6* hraje významnou roli v regulaci vývoje ječmene a významně ovlivňuje důležitý výnosotvorný prvek – počet zrn v klasu. *HvMPK6* pravděpodobně reguluje embryonální vývoj, což dokumentuje i funkce jejího ortologu *OsMPK6* u rýže (*Oryza sativa*) *OsMPK6* hraje klíčovou roli v rané embryogenezi, kdy knock-out mutace v *OsMPK6* genu způsobuje letální fenotyp (Yi *et al.* 2016). U analyzovaných *HvMPK6_OE* rostlin byl bohužel pozorován z hlediska tvorby výnosu, negativní efekt – snížení počtu zrn v klasech. Teoreticky by bylo možné očekávat opačný efekt u *HvMPK6_RNAi* linií, tj. zvýšení počtu zrn v klase, případně

zvýšení hmotnosti tisíce semen ječmene (HTS). Předběžná vizuální inspekce klasů *HvMPK6_RNAi* linií však ve srovnání s kontrolními rostlinami divokého typu výrazné rozdíly velikosti semen a počtu semen v klasu neukázala. Bylo by však vhodné analyzovat *HvMPK6_RNAi* linie v experimentech většího rozsahu, tak aby bylo možno spolehlivě stanovit HTS a počet zrn v klasech. Z časových důvodů nebyly tyto experimenty v rámci této práce realizovány. V průběhu ostatních experimentů nebyl u *HvMPK6_RNAi* rostlin pozorován výrazný makroskopický fenotyp, což může být způsobeno nedostatečně sníženou expresí *HvMPK6* a fenotyp by se výrazněji projevil u rostlin s vyřazeným *HvMPK6* genem technologií CRISPR/Cas9. V rámci fenotypování *HvMPK6* transgenních rostlin v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné nebyl pozorován významný rozdíl v náchylnosti *HvMPK6_RNAi*, *HvMPK6_OE* ani negativních kontrolních rostlin divokého typu.

7 ZÁVĚR

V teoretické části práce byla připravena literární rešerše na téma mitogenem aktivované proteinkinasy a jejich úloha v odpovědích rostlin na působení biotických stresů.

V praktické části práce byly vyselektovány homozygotní transgenní linie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) odrůdy Golden Promise s RNA interferencí vůči *HvMPK6* (*HvMPK6_RNAi*) a s *HvMPK6* nadprodukcí (*HvMPK6_OE*). Konkrétně bylo vyselektováno pět nezávislých *HvMPK6_RNAi* linií homozygotních v T-DNA inzerci a čtyř nezávislých *HvMPK6_OE* linií homozygotních v T-DNA inzerci. Linie byly vybrány efektivní kombinací *in vitro* testu hygromycinové rezistence a kvantifikace T-DNA pomocí Multiplex TaqMan qPCR. *HvMPK6_RNAi* linie vykazaly dvakrát až čtyřikrát nižší expresi *HvMPK6* než kontrolní rostliny divokého typu a *HvMPK6_OE* linie vykazaly pětikrát až čtrnáctkrát vyšší expresi *HvMPK6* než kontrolní rostliny divokého typu. U *HvMPK6_OE* nadprodukčních transgenních linií ječmene byla stanovena distribuce počtu zrn v klasu. Bylo zjištěno, že transgenní rostliny v průměru obsahovaly 67 % klasů se sníženým počtem zrn a kontrolní negativní sesterské rostliny v průměru pouze 29 % klasů se sníženým počtem zrn.

V rámci kondicionálního fenotypování v provokačních zkouškách rezistence vůči rzi ječné (*Puccinia hordei*) byly vybrané homozygotní transgenní *HvMPK6_RNAi* a *HvMPK6_OE* linie ječmene infikovány rzí ječnou a následně byla stanovena infekční frekvence *P. hordei* na infikovaných listech. Nebyl pozorován statisticky průkazný rozdíl v míře infekční frekvence mezi jednotlivými transgenními *HvMPK6_RNAi* a *HvMPK6_OE* liniemi a kontrolními rostlinami divokého typu.

8 LITERATURA

- Agrawal G. K., Rakwal R., and Iwahashi H. (2002): Isolation of novel rice (*Oryza sativa L.*) multiple stress responsive MAP kinase gene, *OsMSRMK2*, whose mRNA accumulates rapidly in response to environmental cues. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 294: 1009–1016.
- Asai T., Tena G., Plotnikova J., Willmann M. R., Chiu W. L. *et al.* (2002): MAP kinase signaling cascade in *Arabidopsis* innate immunity. *Nature* 415: 977–983
- Ausubel F. M. (2005): Are innate immune signaling pathways in plants and animals conserved? *Nature Immunology* 6: 973–979.
- Barrangou R., Fremaux C., Deveau H., Richards M., Boyaval P., *et al.* (2007): CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes. *Science* 315: 1709–1712.
- Bartel D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell* 116: 281–297.
- Baumberger N., Baulcombe D. C. (2005): *Arabidopsis* ARGONAUTE1 is an RNA slicer that selectively recruits microRNAs and short interfering RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 102: 11928–11933.
- Beckers G. J., Jaskiewicz M., Liu Y., Underwood W. R., He S. Y., *et al.* (2009): Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21: 944–953.
- Bethke G., Unthan T., Uhrig J. F., Poschl Y., Gust A. A., *et al.* (2009): Flg22 regulates the release of an ethylene response factor substrate from MAP kinase 6 in *Arabidopsis thaliana* via ethylene signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 106: 8067–8072.
- Bhaya D., Davison M., Barrangou R. (2011): CRISPR-Cas systems in bacteria and archaea: versatile small RNAs for adaptive defense and regulation. *Annual Review of Genetics* 45: 273–297.
- Broekaert W. F., Delauré S. L., De Bolle M. F. C., Cammue B. P. A. (2006): The role of ethylene in host-pathogen interactions. *Annual Review of Phytopathology* 44: 393–416.
- Brouns S. J., Jore M. M., Lundgren M., Westra E. R., Slijkhuis R. J. *et al.* (2008): Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes. *Science* 321: 960–964.
- Brown M. D., Sacks D. B. (2009): Protein scaffolds in MAP kinase signalling. *Cellular signalling* 21: 462–469.
- Brown M. E., Funk C. C. (2008): Climate: food security under climate change. *Science* 319: 580–581.
- Browse J. (2009): Jasmonate passes muster: a receptor and targets for the defense hormone. *Annual Review of Plant Biology* 60: 183–205.
- Colcombet J., Hirt H. (2008): *Arabidopsis* MAPKs: a complex signalling network involved in multiple biological processes. *Biochemical Journal* 413: 217–226.
- Cunnac S., Lindeberg M., Collmer A. (2009): *Pseudomonas syringae* type III secretion system effectors: repertoires in search of functions. *Current Opinion in Microbiology* 12: 53–60.
- del Pozo O., Pedley K. F., Martin G. B. (2004): MAPKKKa is a positive regulator of cell death associated with both plant immunity and disease. *The EMBO Journal* 23: 3072–3082.
- Deltcheva E., Chylinski K., Sharma C. M., Gonzales K., Chao Y. *et al.* (2011): CRISPR RNA maturation by trans-encoded small RNA and host factor RNase III. *Nature* 471: 602–607.

- 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.
- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16–37.
- Gfeller A., Liechti R., Farmer E. E. (2010): *Arabidopsis* jasmonate signaling pathway. *Science Signaling* 3: cm4.
- Hamilton A. J., Baulcombe D. C. (1999): A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950–952.
- Han L., Li G. J., Yang K. Y., Mao G., Wang R., *et al.* (2010): Mitogen-activated protein kinase 3 and 6 regulate *Botrytis cinerea*-induced ethylene production in *Arabidopsis*. *Plant Journal* 64: 114–127.
- Harwood W. A., Bartlett J. G., Alves S. C., Perry M., Smedley M. A. *et al.* (2008): Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques. *Transgenic Wheat, Barley and Oats*: 137–147.
- Haurwitz R. E., Jínek M., Wiedenheft B., Zhou K., Doudna J. A. (2010): Sequence and structure-specific RNA processing by a CRISPR endonuclease. *Science* 329: 1355–1358.
- He C., Fong S. H., Yang D., Wang, G. L. (1999): BWMK1, a novel MAP kinase induced by fungal infection and mechanical wounding in rice. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 12: 1064–1073.
- Heese A., Hann D. R., Gimenez-Ibanez S., Jones A. M., He K., *et al.* (2007): The receptor-like kinase SERK3/BAK1 is a central regulator of innate immunity in plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 12217–12222.
- Chinchilla D., Zipfel C., Robatzek S., Kemmerling B., Nürnberger T., *et al.* (2007): A flagellin-induced complex of the receptor FLS2 and BAK1 initiates plant defence. *Nature* 448: 497–500.
- Chisholm S. T., Coaker G., Day B., Staskawicz B. J. (2006): Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124: 803–14.
- Ichimura K., Casais C., Peck S. C., Shinozaki K., Shirasu K. (2006): MEKK1 is required for MPK4 activation and regulates tissuespecific and temperature-dependent cell death in *Arabidopsis*. *Journal of Biological Chemistry* 281: 36969–36976.
- Ichimura K., Mizoguchi T., Yoshida R., Yuasa T., Shinozaki K. (2000): Various abiotic stresses rapidly activate *Arabidopsis* MAP kinases ATMPK4 and ATMPK6. *The Plant Journal* 24: 655–665.
- Ishihama N., Yamada R., Yoshioka M., Katou S., Yoshioka H. (2011): Phosphorylation of the *Nicotiana benthamiana* WRKY8 transcription factor by MAPK functions in the defense response. *Plant Cell* 23: 1153–1170.
- Jagtap U. B., Gurav R. G., Bapat V. A. (2011): Role of RNA interference in plant improvement. *Naturwissenschaften* 98: 473–492.
- Jínek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A. *et al.* (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* 337: 816–821.
- Jones J. D. G., Dangl J. L. (2007): The plant immune system. *Nature* 444: 323–329.
- Joo S., Liu Y., Lueth A., Zhang S. (2008): MAPK phosphorylation-induced stabilization of ACS6 protein is mediated by the non-catalytic C-terminal domain, which also contains the cis-determinant for rapid degradation by the 26S proteasome pathway. *Plant Journal* 54: 129–140.

- Kim C. Y., Liu Y., Thorne E. T., Yang H., Fukushige H., *et al.* (2003): Activation of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase cascade induces the biosynthesis of ethylene in plants. *Plant Cell* 15: 2707–2718.
- Kim C. Y., Zhang S. (2004): Activation of a mitogen-activated protein kinase cascade induces WRKY family of transcription factors and defense genes in tobacco. *Plant Journal* 38: 142–151.
- Kishi-Kaboshi M., Okada K., Kurimoto L., Murakami S., Umezawa T., *et al.* (2010): A rice fungal MAMP responsive MAPK cascade regulates metabolic flow to antimicrobial metabolite synthesis. *Plant Journal* 63: 599–612.
- Kong Q., Qu N., Gao M., Zhang Z., Ding X., *et al.* (2012): The MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 kinase cascade negatively regulates immunity mediated by a mitogen-activated protein kinase kinase kinase in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 2225–2236.
- 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: 1–16.
- Kusaba M. (2004): RNA interference in crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 15: 139–143.
- Lacroix B., Citovsky V. (2013): The roles of bacterial and host plant factors in *Agrobacterium* mediated genetic transformation. *The International Journal of Developmental Biology* 57: 467–481.
- Li G., Meng X., Wang R., Mao G., Han L., *et al.* (2012): Dual-level regulation of ACC synthase activity by MPK3/MPK6 cascade and its downstream WRKY transcription factor during ethylene induction in *Arabidopsis*. *PLOS Genetics* 8: e1002767.
- Liu Y., Zhang S. (2004). Phosphorylation of 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid synthase by MPK6, a stress-responsive mitogen-activated protein kinase, induces ethylene biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 16: 3386–3399.
- Lobell D. B., Burke M. B., Tebaldi C., Mastrandrea M. D., Falcon W. P., *et al.* (2008): Prioritizing climate change adaptation needs for food security in 2030. *Science* 319: 607–610.
- Ma H., Chen J., Zhang Z., Ma L., Yang Z., *et al.* (2017): MAPK kinase 10.2 promotes disease resistance and drought tolerance by activating different MAPKs in rice. *Plant Journal* 92: 557–570.
- Mao G., Meng X., Liu Y., Zheng Z., Chen Z., *et al.* (2011): Phosphorylation of a WRKY transcription factor by two pathogen-responsive MAPKs drives phytoalexin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 1639–1653.
- Meng X., Xu J., He Y., Yang K-Y., Mordorski B., *et al.* (2013): Phosphorylation of an ERF transcription factor by *Arabidopsis* MPK3/MPK6 regulates plant defense gene induction and fungal resistance. *Plant Cell* 25: 1126–1142.
- Meng X., Zhang S. (2013): MAPK cascades in plant disease resistance signaling. *Annual Review of Phytopathology* 51: 245–266.
- Miya A., Albert P., Shinya T., Desaki Y., Ichimura K., *et al.* (2007): CERK1, a LysM receptor kinase, is essential for chitin elicitor signalling in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 104: 19613–19618.
- Morrison D. K., Davis R. J. (2003): Regulation of MAP kinase signaling modules by scaffold proteins in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 19: 91–118
- Nakagami H., Pitzschke A., Hirt H. (2005): Emerging MAP kinase pathways in plant stress signalling. *Trends in Plant Science* 10: 339–346.

- Nurnberger T., Brunner F., Kemmerling B., Piater, L. (2004): Innate immunity in plants and animals: striking similarities and obvious differences. *Immunological Reviews* 198: 249–266.
- Pedley K. F., Martin G. B., (2005): Role of mitogen-activated protein kinases in plant immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 8: 541–547.
- Petersen M., Brodersen P., Naested H., Andreasson E., Lindhart U., *et al.* (2000): *Arabidopsis* MAP kinase 4 negatively regulates systemic acquired resistance. *Cell* 103: 1111–1120.
- Seo S., Katou S., Seto H., Gomi K., Ohashi Y. (2007): The mitogen-activated protein kinases WIPK and SIPK regulate the levels of jasmonic and salicylic acids in wounded tobacco plants. *Plant Journal* 49: 899–909.
- Seo S., Sano H., Ohashi Y. (1999): Jasmonate-based wound signal transduction requires activation of WIPK, a tobacco mitogen-activated protein kinase. *Plant Cell* 11: 289–298.
- Seo Y. S., Chern M., Bartley L. E., Han M., Jung K-H., *et al.* (2011): Towards establishment of a rice stress response interactome. *PLOS Genetics* 7: e1002020.
- Shao Y., Zhu H. L., Tian H. Q., Wang X. G., Lin X. J., *et al.* (2008): Virus induced gene silencing in plant species. *Russian Journal of Plant Physiology* 55: 168–174.
- Sharma H. C., Crouch J. H., Sharma K. K., Seetharama N., Hash C. T. (2002): Applications of biotechnology for crop improvement: prospects and constraints. *Plant Science* 163: 381–395.
- Shen X., Yuan B., Liu H., Li X., Xu C., *et al.* (2010): Opposite functions of a rice mitogen-activated protein kinase during the process of resistance against *Xanthomonas oryzae*. *Plant Journal* 64: 86–99.
- Schulze B., *et al.* (2010): Rapid heteromerization and phosphorylation of ligand-activated plant transmembrane receptors and their associated kinase BAK1. *Journal of Biological Chemistry* 285: 9444–9451.
- Suarez-Rodriguez M. C., Adams-Phillips L., Liu Y., Wang H., Su S. H., *et al.* (2007): MEKK1 is required for flg22-induced MPK4 activation in *Arabidopsis* plants. *Plant Physiology* 143: 661–669.
- Šamajová O., Plíhal O., Al-Yousif M., Hirt H., Šamaj J. (2013): Improvement of stress tolerance in plants by genetic manipulation of mitogen-activated protein kinases. *Biotechnology Advances* 31: 118–128.
- Taj G., Agarwal P., Grant M., Kumar A. (2010): MAPK machinery in plants: recognition and response to different stresses through multiple signal transduction pathways. *Plant Signaling & Behavior* 5: 1370–1378.
- Takahashi F., Yoshida R., Ichimura K., Mizoguchi T., Seo S., *et al.* (2007): The mitogen-activated protein kinase cascade MKK3-MPK6 is an important part of the jasmonate signal transduction pathway in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 805–818.
- Teige M., Scheikl E., Eulgem T., Dóczi R., Ichimura K., *et al.* (2004): The MKK2 pathway mediates cold and salt stress signaling in *Arabidopsis*. *Molecular Cell* 15: 141–152.
- Vlot A. C., Dempsey D. A., Klessig D. F. (2009): Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology* 47: 177–206.
- Wang K. L., Li H., Ecker J. R. (2002): Ethylene biosynthesis and signaling networks. *Plant Cell* 14: 131–151.
- Wang M.-B., Abbott, D. C., Upadhyaya, N. M., Jacobsen, J. V., Waterhouse, P. M. (2001): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of an elite Australian barley cultivar with virus resistance and reporter genes. *Australian Journal of Plant Physiology* 28: 149–156.

- Wiedenheft B., Sternberg S. H., Doudna J. A. (2012): RNA-guided genetic silencing systems in bacteria and archaea. *Nature* 482: 331–338.
- Wu J., Hettenhausen C., Meldau S., Baldwin I. T. (2007): Herbivory rapidly activates MAPK signaling in attacked and unattacked leaf regions but not between leaves of *Nicotiana attenuata*. *Plant Cell* 19: 1096–1122.
- Xiong L., Lee M. W., Qi M., Yang, Y. (2001): Identification of defense-related rice genes by suppression subtractive hybridization and differential screening. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 685–692.
- Xiong, L., Yang, Y. (2003): Disease resistance and abiotic stress tolerance in rice are inversely modulated by an abscisic acid-inducible mitogen-activated protein kinase. *The Plant cell* 15: 745–759.
- Yang, K. Y., Liu, Y., Zhang, S. (2001): Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 98(2): 741–746.
- Yi J., Lee Y. S., Lee D. Y., Cho M. H., Jeon J. S., *et al.* (2016): OsMPK6 plays a critical role in cell differentiation during early embryogenesis in *Oryza sativa*. *Journal of Experimental Botany* 67: 2425–2437.
- Zhang S., Klessig D. F. (1997): Salicylic acid activates a 48kD MAP kinase in tobacco. *Plant Cell* 9: 809–824.
- Zhang X., Dai Y., Xiong Y., De Fraia C., Li J., *et al.* (2007): Overexpression of *Arabidopsis* MAP kinase kinase 7 leads to activation of plant basal and systemic acquired resistance. *Plant Journal* 52: 1066–1079.
- Zupan J. R., Zambryski P. (1995): Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Physiology* 107: 1041–1047.