

(19)
ČESKÁ
REPUBLIKA



ÚŘAD
PRŮMYSLOVÉHO
VLASTNICTVÍ

(21) Číslo přihlášky: 2023-287
(22) Přihlášeno: 28.07.2023
(40) Zveřejněno: 29.01.2025
(Věstník č. 5/2025)
(47) Uděleno: 18.12.2024
(24) Oznámení o udělení ve věstníku: 29.01.2025
(Věstník č. 5/2025)

C12N 15/63 (2006.01)
C12N 15/67 (2006.01)
C12N 15/29 (2006.01)
A01H 1/00 (2006.01)

(56) Relevantní dokumenty:

LI, Xiufang, et al. Overexpression of sugarcane ScDIR genes enhances drought tolerance in *Nicotiana benthamiana*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2022, Vol. 23, p. 5340, ISSN 1661-6596; ZHANG, Kaijing, et al. Genome-wide identification and expression analysis of eggplant DIR gene family in response to biotic and abiotic stresses. *Horticulturae*, 2022, Vol. 8, p. 732, ISSN 2311-7524; ZHAO, Jun, et al. A receptor-like kinase gene (GbRLK) from *Gossypium barbadense* enhances salinity and drought-stress tolerance in *Arabidopsis*. *BMC Plant Biology*, 2013, Vol. 13, p. 110, ISSN 1471-2229; MANTRI, Nitin L., et al. Transcriptional profiling of chickpea genes differentially regulated in response to high-salinity, cold and drought. *BMC Genomics*, 2007, Vol. 8, p. 303, ISSN 1471-2164.
US 2009089898 A1; WO 2007028165 A2.

(73) Majitel patentu:

Masarykova univerzita, Brno, Brno-město, CZ

(72) Původce:

Alesia Melnikava, M.Sc., Brno, Bohunice, CZ
Dominique Arnaud, Ph.D., Brno, Bohunice, CZ
Candelas Maria Paniague Correas, Ph.D., 29010
Málaga, ES
doc. RNDr. Jan Hejátko, Ph.D., Újezd u Brna, CZ
Grégory Mouille, Ph.D., 78026 Versailles, FR
Francois Perreau, Ph.D., 92370 Chaville, FR

(74) Zástupce:

HARBER IP s.r.o., Dukelských hrdinů 567/52,
170 00 Praha 7, Holešovice

(54) Název vynálezu:

**Způsob zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu,
rostliny odolné vůči stresu**

(57) Anotace:

Předkládané řešení poskytuje způsob zvýšení odolnosti rostlin vůči abiotickému stresu, zejména vůči suchu a zasolení půdy, při němž se zvýší exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu v rostlině. Rovněž poskytuje rostliny s takto zvýšenou expresí genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu.

Sekvence nukleotidů / aminokyselin dle ST.26:

<https://isdv.upv.gov.cz/doc/st26/PV2023-287.xml>

SHA-1: cc709cbc93bf482f8c0b52dfa112dc53393cef43

Způsob zvýšení odolnosti rostlin vůči stresu, rostliny odolné vůči stresu

Oblast techniky

5

Vynález se týká přípravy rostlin se zvýšenou odolností k abiotickému stresu, zejména vůči suchu a/nebo zasolení půdy.

10 Dosavadní stav techniky

Sucho je jedním z nejvýznamnějších a nejzávažnějších stresových faktorů rostlin a díky probíhající klimatické změně se frekvence období sucha v mnoha oblastech zvyšují (Vicente-Serrano, S. M., *et al.* (2015). *Remote Sens-Basel* 7, 4391-4423; Santos, M. J., *et al.* (2010). *Environ Manage* 45, 239-249). Kromě vlivu na samotné rostliny má sucho také významný socioekonomický dopad. Události způsobené suchem ve východní Africe v roce 1984 mají na svědomí úmrtí asi 450 000 lidí v Súdánu a Etiopii. Extrémní sucho v Somálsku a Etiopii v roce 2011 vyvolalo migraci asi 380 000 uprchlíků do okolních zemí a potřebu humanitární pomoci pro deset miliónů lidí. Vážné důsledky sucha však nejsou zaznamenány pouze v Africe. V roce 2008 došlo k celosvětové potravinové krizi způsobené částečně suchem a v roce 2012 sucho významně ovlivnilo zemědělské výnosy v USA, což je země, která vyváží 53 % světové produkce kukuřice a 43 % světové produkce sóji. Předpokládá se, že se do roku 2050 sníží vlivem sucha výnosy významných plodin o více než 50 % a do roku 2100 až o 90 %. V roce 2015 Česká republika zaznamenala jedno z nejhroších období sucha v historii, což vedlo k významným důsledkům týkajících se výnosů plodin, ale také divoké přírody.

Zasolení půdy je dalším ze stresů se zásadním dopadem na rostlinnou produkci. Zasolení půdy má dva zásadní mechanismy svého působení na růst a produkci rostlin. Za prvé, dochází ke zvýšení osmotického potenciálu prostředí, což znesnadňuje příjem vody rostlinou. Zasolení tedy způsobuje velmi podobné efekty jako sucho a často je tento typ stresu používán v modelových situacích jako imitace sucha. Za druhé, po příjmu zvýšeného množství solí transpiračním proudem dochází k poškození buněk listů.

Opatření zmírňující sucho lze rozdělit do tří skupin, i) navýšení dodávek vody, ii) snížení spotřeby vody a iii) minimalizace dopadů sucha. Pro dosažení maximálního efektu je ideální kombinace všech tří typů opatření. V případě ochrany zemědělské produkce je jednou z velmi efektivních možností šlechtění rostlin se zvýšenou odolností k suchu, které umožní jak snížení náročnosti zemědělské produkce na vodu (opatření typu ii), tak snížení dopadů sucha (opatření typu iii).

40

Podstata vynálezu

Předmětem předkládaného vynálezu je způsob zvýšení odolnosti rostlin vůči abiotickému stresu, zejména vůči suchu a zasolení půdy, jehož podstata spočívá v tom, že se zvýší exprese genu DIR13 nebo jeho orthologu nebo jeho homologu v rostlině.

Gen *DIR13* (také nazývaný *AtDIR13*) se vyskytuje u huseníčku rolního (*Arabidopsis thaliana*).

50 Homologem se rozumí gen v jiné rostlině, který je odvozen od genu společného (ancestrálního) pro tento homologní gen a pro gen *DIR13* huseníčku rolního.

Orthologem se rozumí gen v jiné rostlině, který je odvozen od genu společného (ancestrálního) pro tento homologní gen a pro gen *DIR13* huseníčku rolního. Orthologní gen se vyvinul speciací a obvykle si drží v průběhu evoluce stejnou funkci.

55

DIR proteiny vykazují vysokou míru konzervovanosti, umožňující identifikovat orthology, tedy proteiny se stejnou funkcí a to jak u dvouděložných, tak u jednoděložných rostlin včetně významných plodin jako jsou rýže, kukuřice, pšenice, ječmen nebo bavlník (Corbin, C., *et al.* 5 (2018). *Plant Mol Biol* **97**, 73-101).

S výhodou se v předkládaném vynálezu jedná o zvýšení odolnosti brukvovitých rostlin, a o zvýšení exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo homologu v brukvovité rostlině. Brukvovité rostliny zahrnují hospodářsky významné plodiny, jako je brukev olejná nebo řepka 10 olejka.

Expresi genu lze obecně zvýšit vložением dalších kopií genu, s výhodou pod kontrolou promotorů zvyšujících míru exprese dle potřeby, a/nebo aplikací aktivátorů exprese, zejména aktivátorů transkripce, daného genu na rostlinu. 15

Například lze zvýšit expresi genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu v rostlině postupem, kdy se nejprve amplifikují kódující a/nebo genomové sekvence genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu pomocí primerů, které nasedají na 5' a 3' konec kódující sekvence a které mohou obsahovat obecně známé adaptorové sekvence pro usnadnění klonování, např. 20 pomocí Gateway nebo LIC; následně se klonují kódující a/nebo genomové sekvence genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu do vektoru s vhodnou expresní kazetou obsahující silný konstitutivně aktivní promotor, např. CaMV 35S nebo RPS5A, nebo promotor umožňující chemicky regulovanou expresi transgenů, např. dexamethasonem indukovatelný systém pOp6-LhG4 nebo estradiolem indukovatelné systémy založené na *XVE* promotoru; a nakonec se 25 uvedený vektor transformuje do rostliny.

Ve výhodném provedení se v postupu podle vynálezu zvýší exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu v rostlině, a současně nebo následně se aplikuje na rostlinu alespoň jeden exogenní cytokinin. 30

V dalším výhodném provedení se v postupu podle vynálezu zvýší exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu v rostlině, a současně se v rostlině zvýší exprese genů pro biosyntézu endogenních cytokininů, jako je *IPT* nebo *LOG*, nebo sníží exprese genů pro degradaci cytokininů, např. *CKX*. 35

Rostliny se zvýšenou expresí genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu mohou být vhodné i pro dosažení antivirových a/nebo antikarcinogenních účinků kvůli zvýšenému množství endogenních lignanů a/nebo neolignanů. 40

Předmětem předkládaného vynálezu je dále rostlina se zvýšenou odolností vůči abiotickému stresu, zejména vůči suchu a zasolení půdy, která obsahuje vložené další kopie genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu pro zvýšení produkce proteinu kódovaného tímto genem. 45

Dirigent proteiny (DIR), pojmenované podle latinského termínu „dirigere“, tedy „řídít“ nebo „vést“, byly poprvé popsány u zlatého deště (*Forsythia* sp.) před více než dvěma desetiletími jako proteiny zodpovědné za zprostředkování stereoselektivní tvorby lignanu (+)-pinoresinolu ze dvou koniferyl alkoholových radikálů (Davin, L. B., *et al.* (1997). *Science* **275**, 362-366; Gang, D. R., *et al.* (1999). *Chemistry & Biology* **6**, 143-151). Od té doby byly v celé rostlinné říši 50 identifikovány různé proteiny DIR a proteiny podobné DIR s výjimkou řas a sinic, což naznačuje, že DIR se vyskytují téměř u všech cévnatých druhů rostlin včetně lišejníků, kapradin, nahosemenných rostlin a krytosemenných rostlin (Ralph, S., *et al.* (2006). *Plant Molecular Biology* **60**, 21-40; Ralph, S. G., *et al.* (2007). *Phytochemistry* **68**, 1975-1991; Wu, R. H., *et al.* (2009). *Progress in Natural Science* **19**, 347-352; Li, Q., *et al.* (2014). *BMC Genomics* **15**, 388).

Rodina DIR proteinů u *Arabidopsis* (AtDIR) zahrnuje 26 členů s většinou neznámými biochemickými funkcemi (10). DIR5 a DIR6, oba patřící do podrodiny DIR-a, se účastní biosyntézy (-)-pinoresinolu. Podle fylogenetické analýzy je DIR13 nejbližším paralogem DIR5, DIR6 a DIR12, ale postrádá konzervované zbytky nezbytné pro tvorbu (-)-pinoresinolu (Paniagua, C., *et al.* (2017). *J Exp Bot* **68**, 3287-3301; Kim, K. W., *et al.* (2012). *J Biol Chem* **287**, 33957-33972). DIR13 a jeho homology a orthology u různých rostlin zvyšuje tvorbu lignanů a neolignanů a rovněž produkci ROS při odpovědi na abiotický stres.

Ligniny a lignany jsou produkty metabolismu fenyylpropanoidů. Tato metabolická dráha vede k produkci monolignolů (koniferyl, sinapyl a *p*-kumaryl alkoholy), které jsou prekurzory v biosyntéze lignanu i ligninu (Buchanan, B. B., *et al.* (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists). Termín lignan zahrnuje třídu dimerních fenyylpropanoidů (C₆C₃) spojených vazbou 8-8', zatímco alternativně vázané dimery jsou známy jako neolignany (Buchanan, B. B., *et al.* (2000). *Biochemistry & molecular biology of plants*. Rockville, Md.: American Society of Plant Physiologists). Lignany a neolignany jsou poměrně rozšířené, napříč rostlinnou říší bylo popsáno 23 typů lignanů a neolignanů (Teponno, R. B., *et al.* (2016). *Nat Prod Rep* **33**, 1044-1092). Biosyntéza lignanů a neolignanů začíná syntézou fenyllalaninu, prekurzorem koniferyl alkoholu (Hao, Z., *et al.* (2014). *Crit Rev Biochem Mol Biol* **49**, 212-241; Barros, J., *et al.* (2015). *Ann Bot* **115**, 1053-1074). Dimerizace/vazba dvou radikálů koniferyl alkoholu vedoucí k (+/-)-pinoresinolu je zprostředkována oxidázami, jako jsou peroxidázy nebo lakázy, s pomocí DIR, které zajišťují stereoselektivitu dimerizace koniferylalkoholu (Davin, L. B., *et al.* (1997). *Science* **275**, 362-366; Halls, S. C., *et al.* (2002). *Biochemistry* **41**, 9455-9461; Halls, S. C., *et al.* (2004). *Biochemistry* **43**, 2587-2595). Role DIR proteinů je v tomto procesu zásadní, protože optická aktivita je určující pro vlastnosti většiny lignanů (Akiyama, K., *et al.* (2007). *Biosci Biotechnol Biochem* **71**, 1745-1751; Akiyama, K., *et al.* (2009). *Biosci Biotechnol Biochem* **73**, 129-133). Pinoresinol může být převeden na jiné typy lignanů včetně piperitolu, laciresinolu, sesaminu, secoisolaresinolu a jejich glukosidů (Dinkova-Kostova, A. T., *et al.* (1996). *J Biol Chem* **271**, 29473-29482; Satake, H., *et al.* (2015). *Metabolites* **5**, 270-290).

Lignany a neolignany hrají důležitou roli v obraně rostlin, kde působí jako biologická zbraň proti patogenům (Davin, L. B., *et al.* (2008). *Nat Prod Rep* **25**, 1015-1090; Davin, L. B., *et al.* (2005). *Current opinion in biotechnology* **16**, 398-406). Lignany jsou schopny inhibovat enzymy extracelulárních hub, celulózu, polygalakturonázu, glukosidázu a lakázu (MacRae, W. D., *et al.* (1984). *Phytochemistry* **23**, 1207-1220). Dále bylo předpovězeno, že lignany by mohly bránit poškození rostlin tím, že narušují endokrinní systém herbivorních larev hmyzu (Harmatha, J., *et al.* (2003). *Phytochemistry Reviews* **2**, 321-330). Lignany by mohly být také použity jako léky a chemopreventivní látky v konvenční medicíně. Například podofylotoxin (pocházející z *Podophyllum peltatum*) má antivirové vlastnosti a jeho derivát (etopophos) našel uplatnění v chemoterapii rakoviny (Davin, L. B., *et al.* (2008). *Nat Prod Rep* **25**, 1015-1090). Kromě toho by lignany mohly sloužit jako zásobárna monolignolů pro lignifikaci. Zvýšení exprese genů pro syntézu lignanu bylo pozorováno během xylogeneze v lignifikovaných tkáních borovice přímořské (Villalobos, D. P., *et al.* (2012). *BMC Plant Biol* **12**, 100) a lnu (Huis, R., *et al.* (2012). *Plant Physiol* **158**, 1893-1915). U lnu byla také pomocí imunoznačení odhalena přítomnost lignanů v jeho sekundárních buněčných stěnách (Attoumbre, J., *et al.* (2010). *Phytochemistry* **71**, 1979-1987). Bylo také prokázáno, že narušení funkce PINORESINOL REDUKTÁZY 1 (PrR1), která katalyzuje přeměnu pinoresinolu na lacinoresinol, vede ke snížení obsahu ligninu a změně distribuce ligninu ve stonku květenství *Arabidopsis* (Ruprecht, C., *et al.* (2011). *Front Plant Sci* **2**, 23; Zhao, Q., *et al.* (2015). *Phytochemistry* **112**, 170-178).

Předkládaný vynález dovoluje získat hospodářsky významné plodiny s odolností k zasolení, suchu a/nebo dalším typům stresového působení.

Objasnění výkresů

5 Obrázek 1. Promotor *DIR13* je aktivní brzy po vyklíčení a dominantně v kořeni. (A – C) Aktivita promotoru *AtDIR13* detekovaná pomocí fluorescence GFP (zelený signál) u 3 dny starých klíčnicích rostlin *Arabidopsis* nesoucích *pDIR13::NLS-3xGFP* konstrukt. Aktivita *pDIR13* je detekovatelná zejména v kořeni (A). Fluorescenční signál byl také detekován v apikálním meristému prýtu (B) a v kořenových vláscích (C). Signál plazmatické membrány díky barvení propidium iodidem (PI) je zobrazen purpurově. Měřítko představuje 50 μ m.

10 Obrázek 2. Promotor *DIR13* je aktivní ve všech kořenových pletivech a laterálních kořenových primordiích; exprese *DIR13* je regulována cytokininy. (A) Reprezentativní snímky 7 dní (7 DAG) starých semenáčků a příčné optické řezy kořenovými buňkami exprimujícími *pDIR13::NLS-3xGFP*. Fluorescenční GFP signál (zeleně) byl detekován ve všech buněčných typech kořene *Arabidopsis* (1 až 3, na obrázku vpravo). Měřítko představuje 50 μ m. ep, epidermis; en, endodermis; co, cortex; pe, pericykl. (B) Aktivita promotoru *DIR13* v primordiích laterálních kořenů (lateral root primordia, LRP) v 9 dní starých (9 DAG) semenáčcích. Měřítko představuje 20 μ m. Signál plazmatické membrány po barvení PI je v (A) i (B) zobrazen purpurově. (C) Hladina exprese *DIR13* je postupně indukována cytokininem. Exprese *DIR13* byla analyzována pomocí RT-qPCR u 11denních semenáčků po působení cytokininem (5 μ M 6-benzylaminopurinem, BAP) a kontrolou (0,1 % DMSO) po dobu 0, 0,5, 1, 3 a 5 hodin. Hladiny transkripce byly normalizovány na referenční gen *EF-la*, znázorněn je relativní poměr exprese *DIR13/EF-la*. Zobrazený je reprezentativní výsledek opakovaného měření; chybové úsečky označují +/- SE (n=3). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi působením BAP a kontrolou na základě dvoufaktorové analýzy rozptylu (two-way ANOVA) následované Tukeyho HSD testem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (D) Exprese *DIR13* je regulována transkripčními faktory ARR typu B. Hladina exprese *DIR13* byla zkoumána pomocí RT-qPCR u dvojitéch mutantů *arr1,10*, *arr1,12* a *arr10,12* po ošetření 5 μ M BAP a v kontrole (0,1 % DMSO) po dobu 1 hodiny. Hladiny transkripce byly normalizovány na referenční gen *EF-la* a je ukázán relativní poměr exprese *DIR13/EF-la*. Data zobrazují výsledek reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n=3). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly mezi BAP a kontrolou na základě dvoufaktorové ANOVA následované Tukeyho HSD testem (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (E) Promotor *DIR13* je aktivován cytokininem v kořenovém apikálním meristému. Reprezentativní snímky 5 dnů starých semenáčků exprimujícími *pDIR13::NLS-3xGFP* po 24 hodinách ošetření 5 μ m BAP a v kontrole (0,1 % DMSO). Signál plazmatické membrány z barvení PI je zobrazen purpurově a GFP zeleně. Měřítko představuje 50 μ m. (F) Počet fluorescenčních jader na kořen v kořenovém apikálním meristému (RAM) 5 dnů starých semenáčků exprimujícími *pDIR13::NLS-3xGFP* po 4 a 24 hodinách ošetření BAP a v kontrole (0,1 % DMSO). Data jsou uvedena jako průměr +/- SE (n > 10). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly mezi BAP a kontrolou na základě analýzy smíšeným Poissonovým modelem (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$). (G) Intenzita fluorescence jednotlivých jader po 4 h a 24 h ošetření BAP a kontrolní (DMSO) byla kvantifikována v RAM. Výsledky jsou průměry +/- SE (n > 10). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly mezi BAP a kontrolní léčbou na základě jednocestné ANOVA následované Dunnettovým HSD testem (** $P < 0,01$, *** $P < 0,001$).

45 Obrázek 3. *DIR13* lokalizuje do endodermis kořene *Arabidopsis* a periferních buněk primordií laterálních kořenů. (A až C) Protein *DIR13* lokalizuje do endodermálních buněk diferenciační zóny kořene. Reprezentativní snímky 7 dní starých semenáčků exprimujícími *pDIR13:DIR13::mCherry*. (A) – jedna vrstva, (B) projekce (Z-stack) konfokálních řezů a (C) příčný optický řez kořenem z obr. (B). (D, E) Působení 5 μ m BAP zvyšuje množství *DIR13* a posouvá jeho lokalizaci blíže ke kořenovému apikálnímu meristému (naznačeno šipkami). Reprezentativní projekce konfokálních snímků 7 dnů starých semenáčků po 24 hodinovém působení 5 μ m BAP a kontrolou (0,1 % DMSO). (F až I) *DIR13* je detekován v periferních buňkách primordií laterálních kořenů (lateral root primordia, LRP) i již vynořeného laterálního kořene (emerged lateral root, ELR). Reprezentativní konfokální snímky 9ti denních semenáčků v

různých fázích vývoje LR od LRP (F) po ELR (G až I). Kořeny byly obarveny Calcofluor White, buněčná stěna je zobrazena modře, signál mCherry je zobrazen červeně. Měřítka představuje 50 μm v (A až C) a (F až I) a 100 μm v (D, E). en, endodermis.

5 Obrázek 4. DIR13 není vyžadován pro normální morfologii a funkci Caspariho proužků. (A až F) Autofluorescenční vizualizace ligninu po projasnění kořenů 7denního *WT Col-0* (A, D), *35S:DIR13 #8* (B), *dir13-5* (C), *esb1-1* (E), a *caspl-1;3-1* (F) a jejich detailní snímky (1 až 6) zobrazené v tomto pořadí v červeně přerušovaných obdélnících. (G až H; J až O) Penetrace propidium jodidu (PI) u 5denního *WT Col-0* (G, J, M), *dir13-5* (H, L), *35S:DIR13 #8* (K) *esb1-1* (N) a *caspl-1;3-1* (O). Hvězdičky označují 15. pro (G, H) a 19. pro (J až O) endodermální buňku od počátku ranné diferenciační zóny kořene. Počátek ranné diferenciační zóny je definován jako zóna, kde byla pozorována délka endodermální buňky větší než dvojnásobek její šířky. Měřítka představuje 50 μm v (A až O) a 20 μm v (1 až 6). ep, epidermis; ct, kůra; en, endodermis; st, stěla. (I) Kvantifikace penetrace PI do stěly kvantifikovaná jako počet endodermálních buněk od první plně expandované buňky v *WT Col-0*, *35S:DIR13 #8*, *dir13-5*, *esb1-1* a *caspl-1;3-1*. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n \geq 10). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při P < 0,05 mezi *WT Col-0* a mutantními genotypy na základě jednofaktorové analýzy rozptylu (one-way ANOVA) následované Dunnettovým HSD testem (**p < 0,01, ***p < 0,001).

20 Obrázek 5. Schéma genového konstruktů pro přípravu linií s nadměrnou expresí *DIR13*. Kódující sekvence *DIR13* (zelený obdélník) byla vložena pod kontrolu silného konstitutivního promotoru 35S RNA tabákové mozaiky (CaMV 35S, bílá šipka). Místa nasedání primerů použitých pro amplifikaci kódující sekvence *DIR13* jsou znázorněna šedými šipkami pod sekvencí *DIR13*.

25 Obrázek 6. Molekulární charakterizace linií nadměrně exprimujících *DIR13* a mutantních linií s defektem v expresi *DIR13*. (A) Exprese *DIR13* v liniích nesoucích *35S::DIR13* konstrukt byla analyzována pomocí RT-qPCR v kořenech 11 dnů starých semenáčků. Hladiny transkripce byly normalizovány na referenční gen *EF-la* a byl kvantifikován relativní poměr exprese *DIR13/EF-la*. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n = 3). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při P < 0,05 mezi *WT Col-0* a nadměrně exprimujícími liniemi na základě jednofaktorové ANOVA a Tukeyho HSD testu (*p < 0,05, ***p < 0,001). (B) Schémata představující strukturu genu *DIR13* a polohu insercí T-DNA (horní panel) a sgRNA (spodní panel) v *DIR13*. Modré šipky označují polohy primerů použitých pro RT-qPCR a semikvantitativní RT-PCR amplifikaci *DIR13*. (C) Úroveň exprese *DIR13* byla testována v dostupných T-DNA inserčních mutantech pomocí RT-qPCR v kořenech 11 dnů starých semenáčků. Hladiny transkripce byly normalizovány na referenční gen *EF-la* a je ukázán relativní poměr exprese *DIR13/EF-la*. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n \geq 3). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi *WT Col-0* a mutantními liniemi na základě jednofaktorové ANOVA následované Tukeyho HSD testem (***p < 0,001). (D) Semikvantitativní RT-PCR gelová elektroforéza ukazuje nepřítomnost *DIR13* transkriptů v *dir13-4* a *dir13-5* mutantních liniích. *EF-la* byl použit jako kontrola. (E) Hladiny exprese nejbližších homologů *DIR13* nejsou ovlivněny nadměrnou expresí *DIR13* nebo knock-out mutací *dir13-5*. Hladiny exprese *DIR6*, *DIR10 (ESB1)*, *DIR13* a *DIR14* byly kvantifikovány pomocí RT-qPCR v kořenech 11 dnů starých semenáčků na pozadí *WT Col-0*, *35S::DIR13* a *dir13-5*. Úroveň transkripce byly normalizovány na referenční gen *EF-la* a jsou uvedeny relativní poměry exprese *EF-la* k úrovni exprese daného genu. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n = 4). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi různými genotypy na základě dvoufaktorové ANOVA následované Tukeyho HSD testem (***p < 0,001). (F) Porovnání primární délky kořene (v cm) u semenáčků nadměrně exprimujících *WT Col-0* a *DIR13*. Klíčící rostliny byly skenovány po 9, 11 a 15 dnech kultivace na vertikálně orientovaných Petriho miskách pomocí stolního skeneru (Epson Perfection V700) a délka kořenů byla měřena ručně pomocí Image J 1,53 m. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n \geq 30). Hvězdičky označují

statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi *WT Col-0* a *35S::DIR13* na základě analýzy mixed model ANOVA následovaného Dunnettovým HSD testem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$). (G) Porovnání primární délky kořene (v cm) u klíčnicích rostlin *WT Col-0* a rostlin deficientních v *DIR13*. Klíčnicí rostliny byly skenovány po 9, 11 a 15 dnech kultivace na vertikálně orientovaných Petriho miskách pomocí stolního skeneru (Epson Perfection V700) a délka kořenů byla měřena ručně pomocí Image J 1,53 m. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, ($n \geq 30$). Na základě analýzy smíšeného modelu následované Dunnettovým HSD testem nebyly nalezeny žádné statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi *WT Col-0* a *dir13-4* nebo *dir13-5*.

Obrázek 7. HPLC-MS/MS analýza lignanů a neolignanů v liniích s nadměrnou expresí *DIR13* a *dir13-5* mutantních liniích.

(A) Nadměrná exprese *DIR13* vede k akumulaci některých lignanů a neolignanů v kořenech rostlin. Metabolity byly extrahovány z 10 dnů starých *WT Col-0*, *35S:DIR13 #6*, *#8* kořenů a detekovány pomocí HPLC-MS/MS. Data jsou uvedena jako relativní k obsahu těchto látek v rostlinách standardního typu (*WT Col-0*) a jsou průměrem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, ($n = 5$). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi *WT Col-0* a *35S:DIR13 #6*, *#8* na základě dvoufaktorové ANOVA následované Dunnettovým HSD testem. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$). Molekulová hmotnost (m/z) a předpokládaná identita sloučenin se zvýšenou koncentrací v liniích s nadměrnou expresí *DIR13*: (1) m/z 556.24 Neolignan, MNH4+; (2) m/z 583.16 Neolignan, MH+; (3a) m/z 480.16 Matairesinol-cysteine, MH+; (3b) m/z 359.14 Matairesinol (fragment), MH+; (4) m/z 355.11 Lignan, MH+; (5) m/z 343.11 Lignan or neolignan, MH+; (6) m/z 373.13 Lignan or neolignan, MH+; (7) m/z 512.15 Lignan, MH+/MNH4+; (8) m/z 343.11 Lignan, MH+. Sloučeniny se sníženou koncentrací v liniích s nadměrnou expresí *DIR13*: (1) m/z 540.24; Lariciresinol 4-O-glucoside, MNH4+; (2) m/z 373.14 Syringin, MH+.

(B) Změny v obsahu endogenních hladin lignany a neolignanů u mutantů *dir13-5* ve srovnání s *WT Col-0*. Metabolity byly extrahovány z kořenů 10 dnů starých klíčnicích rostlin *WT Col-0* a *dir13-5* a detekovány pomocí HPLC-MS/MS. Data jsou uvedena jako relativní k *WT Col-0* a jsou průměrem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, ($n = 6$). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi *WT Col-0* a *dir13-5* na základě vícenásobného Mann-Whitneyho testu. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). Molekulová hmotnost (m/z) a předpokládaná identita sloučenin se zvýšenou koncentrací v mutantní linii *dir13-5*: (1) m/z 1027,5499; (2) m/z 967,5295; (3) m/z 824,5453; (4) m/z 1072,2485; (5) m/z 905,4538; (6) m/z 277,1826. Molekulová hmotnost (m/z) a předpokládaná identita sloučenin se sníženou koncentrací v mutantní linii *dir13-5*: (1) m/z 469,081, G(8-O-4)FA Sulfate, Lignan nebo neolignan; (2) m/z 505,1358 Lignan nebo neolignan; (3) m/z 827,4372; (4) m/z 389,1247, ether kyseliny guaiacylglycerol-beta-ferulová, Lignan nebo neolignan; (5) m/z 755,452; (6) m/z 725,4405; (7) m/z 775,2468 Lignan nebo neolignan; (8) m/z 551,1775, beta-D-Glucopyranoside, 2-methoxy-4-[tetrahydro-3a,6a-dihydroxy-4-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1H,3H-furo[3,4-c]furan-1-yl]phenyl, Lignan or neolignan; (9) m/z 493,1182.

Obrázek 8. Nadměrná exprese *DIR13* zvyšuje toleranci rostlin vůči zasolení. (A, B) Rychlosti klíčení semen transgenních rostlin *35S:DIR13 #6*, *35S:DIR13 #8* (A) a *dir13-5* (B) po působení solným stresem. Rychlost klíčení byla zaznamenávána po dobu 7 dnů po stratifikaci v přítomnosti 150 mM NaCl. Zobrazená data jsou průměry tří nezávislých experiment, chybové úsečky označují +/- SE, ($n \geq 100$). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při $p < 0,05$ mezi *WT Col-0* a *35S:DIR13* (A) a mezi *WT Col-0* a *dir13-5* (B) na základě analýzy dvoufaktorovou ANOVA a Dunnettovým HSD testem (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$). (C, D) Nadměrná exprese *DIR13* podporuje růst laterálních kořenů v přítomnosti soli. Průměrný počet emergovaných postranních kořenů (C) a jejich celková délka na klíčnicí rostlinu (D) byly měřeny 9 dní po přenosu klíčnicích rostlin na medium se 150 mM NaCl. Petriho misky byly naskenovány pomocí stolního skeneru (Epson Perfection V700) a měření bylo provedeno ručně pomocí Image

J 1.53. Zobrazená data jsou průměry reprezentativního experimentu +/- SE, (n ≥ 38). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi WT Col-0 a 35S:DIR13 na základě analýzy pomocí mixed-model ANOVA následovaného Tukeyho HSD testem (*p < 0,05, **p < 0,01). Čísla v obdélnících ukazují relativní rozdíl k WT Col-0 v procentech. (E, F) Deficience v DIR13 zvyšuje citlivost růstu laterálních kořenů na zasolení. Průměrný počet postranních kořenů (E) a jejich celková délka na klíčnicí rostlinu (F) byly měřeny 9 dní po přenosu klíčnicích rostlin WT Col-0 a dir13-5 na médium se 150 mM NaCl. Petriho misky byly naskenovány pomocí stolního skeneru (Epson Perfection V700) a měření délky byla provedena ručně pomocí Image J 1.53m. Zobrazená data představují průměry reprezentativního experimentu +/- SE, (n ≥ 40). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi WT Col-0 a dir13-5 na základě analýzy mixed-model ANOVA následovaného Sidakovým HSD testem (*p < 0,05, **p < 0,01). Čísla v obdélnících ukazují relativní rozdíl vůči WT Col-0 v procentech. (G, H) Fenotypy 8 týdnů starých rostlin WT Col-0 a 35S:DIR13 #8 rostoucích v podmínkách krátkého dne po 4 týdnech progresivního ošetření solí (aplikace zvyšujících se koncentrací NaCl každý týden – 100, 150, 200, a 300 mM, v daném pořadí). Měřítka je 1 cm. (I) Kvantifikace základního fluorescenčního poměru (Fv/Fm) u transgenních rostlin WT Col-0 a 35S:DIR13 #8 po 23 dnech aplikace progresivního solného stresu. Data jsou průměry reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n ≥ 5). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi WT Col-0 a 35S:DIR13 #8 na základě dvoufaktorové ANOVA následované Sidakovým HSD testem (**p < 0,01).

Obrázek 9. Nadměrná exprese DIR13 zvyšuje toleranci rostlin k suchu. (A) Fenotyp 8 týdnů starých rostlin Col-0 WT a 35S:DIR13 #8 rostoucích za normálních podmínek krátkého dne. Měřítka představuje 1 cm. (B) Reprezentativní snímek fenotypu regenerujících rostlin po 5 dnech opětovného zavlažování 8 týdnů starých rostlin Col-0 WT a 35S:DIR13 #8 vystavených stresu ze sucha. (C, D) Procento zvadlých rostlin (C) bylo vypočteno 3 týdny po ukončení závlivky, procento regenerovaných rostlin (D) bylo vypočteno 5 dní po obnovení zavlažování. Zobrazená data jsou průměrem tří nezávislých experimentů. Chybové úsečky označují +/- SE, (n = 45). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi Col-0 WT a 35S:DIR13 #8 na základě analýzy jednofaktorovou ANOVA a Dunnettovým HSD testem (*p < 0,05). (E, F) Plocha rostlinné růžice (v mm²) (E) a účinnost maximálního kvantového výtěžku (Fv/Fm) fotosystému II (F) byly kvantifikovány u Col-0 WT a 35S:DIR13 #8 během fáze stresu regenerace. Zobrazená data jsou výsledkem reprezentativního experimentu. Chybové úsečky označují +/- SE, (n = 13). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi Col-0 WT a 35S:DIR13 #8 na základě jednofaktorové ANOVA následované Dunnettovým HSD testem (*p < 0,05, **p < 0,01).

Obrázek 10. Nadměrnou exprese DIR13 zvyšuje akumulaci reaktivních forem kyslíku v kořenových buňkách v odpovědi na stres zasolením. (A) Produkce reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) analyzovaná pomocí fluorescenčního barviva H2DCFDA u 7 dnů starých semenáčků Col-0 WT, 35S:DIR13 #8 a dir13-5 za kontrolních podmínek (0 mM NaCl, 0,1 % DMSO), po 30 minutách působení 150 mM NaCl, po působení 5 μM BAP po dobu 2 hodin a působení BAP po dobu 2 hodin s následnou 30 minutovou aplikací 150 mM

NaCl. Na obrázku jsou reprezentativní konfokální snímky, signál specifický pro H2DCFDA je zobrazen zeleně. Měřítka představuje 20 μm. (B) Pozorování produkce ROS bylo provedeno v diferenciační zóně kořene, schematicky označeného zeleným čtvercem. (C) Kvantifikace H2DCFDA fluorescence po 30 minutách působení 0- nebo 150-mM solným roztokem a 5 μM BAP nebo 5 μM BAP plus 150 mM NaCl v Col-0 WT, 35S:DIR13 #8 a dir13-5. Data ukazují medián a horní a dolní kvartily tří nezávislých experimentů (n ≥ 20). Hvězdičky označují statisticky významné rozdíly při p < 0,05 mezi Col-0 WT 35S:DIR13 #8 a dir13-5 na základě analýzy mixed-model ANOVA následované Tukeyho HSD testem. (*p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001).

55

Příklady uskutečnění vynálezu

Příklad 1: *AtDIR13* je exprimován ve všech buněčných typech kořene a je indukován cytokininy

5 Pro určení časoprostorové lokalizace exprese *DIR13* jsme vytvořili genový konstrukt obsahující transkripční fúzi promotoru genu (*pDIR13*) se sekvencí kódující jaderný lokalizační signál a tři kopie zeleného fluoreskujícího proteinu (green fluorescent protein, GFP; *pDIR13-NLS-3xGFP*). Tento konstrukt jsme pomocí *Agrobacterium tumefaciens* transformovali do *Arabidopsis thaliana* a seletovali jsme stabilní, jednokopiové T3 homozygotní linie, které byly použity pro následující

10 analýzy. Pozorováním semenáčků transgenních linií *Arabidopsis* nesoucích *pDIR13-NLS-3xGFP* jsme zjistili, že fúzní promotor *pDIR13* je aktivní především v kořeni a to od raného vývojového stadia (1 den po vyklíčení, 1 DAG, obr. 1A), velmi slabá aktivita byla detekovatelná v apikálním meristému prýtu (shoot apical meristem, SAM, obr. 1B). Aktivita *pDIR13* je detekovatelná v

15 oblastech tzv. transienční zóny směrem ke spojenci s prýtem (root-shoot junction) ve všech kořenových buněčných typech včetně kořenových vlásků (obr. 1C, 2A). Později (7 DAG) byla aktivita *pDIR13* sledována také v primordiích laterálních kořenů (obr. 2B).

Dříve bylo předpokládáno, že *DIR13* by mohl být přímým cílem cytokinové signální dráhy, konkrétně cytokininy aktivovaného transkripčního faktoru ARR1 (Taniguchi, M., *et al.* (2007). *Plant Cell Physiol* **48**, 263-277; Bhargava, A., *et al.* (2013). *Plant Physiology* **162**, 272-294).

20 Pomocí RT-qPCR kvantifikace exprese *DIR13* v kořenech *Arabidopsis* standardního typu (*WT Col-0*) jsme prokázali schopnost exogenních cytokininů (5 μ m BAP) zvýšit expresi *DIR13* (obr. 2C). V souladu s tím jsme pozorovali snížení exprese *DIR13* v mutantech s defektem v cytokinové signální dráze (mutanti v genech *ARR* geny typu B, obr. 2D). Tyto výsledky byly

25 potvrzeny časoprostorovou analýzou exprese *DIR13* pomocí linie nesoucí *pDIR13-NLS-3xGFP*, kde jsme zjistili, že cytokininy jsou schopny aktivovat *pDIR13* v kořenové meristematické zóně, kde je za normálních podmínek exprese *DIR13* detekována pouze velmi slabě (obr. 2E až G).

Příklad 2: *DIR13* lokalizuje do buněčné stěny endodermis ale není zásadní pro tvorbu Caspariho

30 proužků

Připravili jsme linie nesoucí translační fúzi kódující sekvence *DIR13* s červeně fluoreskujícím proteinem mCherry pod transkripční kontrolou nativního promotoru *DIR13* (*pDIR13:DIR13-mCherry*). S využitím této linie jsme zjistili, že *DIR13* lokalizuje do buněčné stěny endodermis

35 diferenační zóny kořene (obr. 3A, B) v oblasti tzv. Caspariho proužků (obr. 3C). V souladu s inducibilitou promotoru *DIR13* cytokininy (viz výše) jsme pozorovali zesílení signálu *DIR13-mCherry* v endodermis kořene po působení 5 μ m BAP (obr. 3D, E). Lokalizace *DIR13* byla pozorována také na periférii primordií laterálních kořenů (obr. 3F až I).

40 Ve světle pozorování lokalizace proteinu *DIR13* do oblasti Caspariho proužků se naše studie zaměřila na zkoumání dopadu nadměrné exprese i deficiencie *DIR13* na vývoj a organizaci Caspariho proužků. Pro posouzení struktury CS jsme provedli experimenty s vizualizací autofluorescence ligninu (obr. 4A až F) a histologického barvení bazickým fuchsinem (data nejsou uvedena). Jak v případě mutanta deficientního v *DIR13* (*dir13-5*) tak v případě linie se

45 zvýšenou expresí *DIR13* (*35S:DIR13 #8*) jsme nepozorovali žádné viditelné změny ve struktuře Caspariho proužků. Jako pozitivní kontrolu jsme použili mutanty *esb1-1* a *caspl-1;3-1*, u nichž byla dříve popsána ztráta dobře organizované struktury Caspariho proužků (Hosmani, P. S., *et al.* (2013). *Proc Natl Acad Sci USA* **110**, 14498-14503). Dále jsme provedli barvení propidium jodidem (PI) jakožto funkční test potenciálního zpoždění v tvorbě účinné apoplastické bariéry. V

50 případě *dir13-5* došlo k vytvoření Caspariho proužků o dvě buňky výše směrem ke spojenci s prýtem a tedy o něco později ve srovnání s *WT Col-0* (obr. 4G až I). Toto zpoždění však nevedlo k viditelným, změnám v organizaci nebo narušení morfologie Caspariho proužků. To naznačuje pouze slabý efekt ve srovnání s mutanty *caspl-1;3-1* nebo *esb1-1*, kteří v tvorbě Caspariho proužků vykazují zpoždění více než 15 buněk (obr. 4I až O).

55

Příklad 3: Příprava a molekulární charakterizace linií deficientních pro *DIR13* a linií se zvýšenou expresí *DIR13*

5 Abychom prozkoumali funkční význam *DIR13* v růstu a vývoji rostlin, vytvořili jsme stabilní transgenní linie s nadměrnou expresí *DIR13* v genetickém pozadí standardního typu (WT Col-0).

Kódující sekvence (CDS) genu *DIR13* byla amplifikována pomocí PCR z gDNA s primery obsahujícími adaptorová místa pro zavedení požadovaného fragmentu do vektoru pPLV26 LIC obsahujícím expresní kazetu s 35S promotorem viru kvěťákové mozaiky, umožňující silnou konstitutivní genovou expresi (obr. 5). Pro amplifikaci kódující sekvence *DIR13* byly použity primery

Pr1-Fw 5-3:
 (5'-TAGTTGGAATAGGTTTCATGGCAAACCAAATCTACATAATCTCCTTGATC-3', SEQ
 15 ID NO: 1) a

Pr2-Rw 5-3:
 (AGTATGGAGTTGGGTTTCCTAATAGTAACATTCATAGAGTTTAATATCCATTTTGACA
 CG, SEQ ID NO: 2).

20 Výsledné plazmidy byly transformovány do buněk *Escherichia coli* DH5a a dále do elektrokompetentních *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 obsahujících pomocný plazmid pGreen pSOUP (Hellens, R., *et al.* (2000). *Trends Plant Sci* **5**, 446-451) za použití standardních protokolů a nanoseny na LB destičky s kanamycinem (50 µg/ml antibiotika). Transgenní rostliny
 25 byly získány pomocí „floral dip“ protokolu (Zhang, X., *et al.* (2006). *Nat Protoc* **1**, 641-646).

Pro přípravu linií s nadměrnou produkcí *DIR13* a/nebo jeho orthologů v různých plodinách je možno použít i jiné promotory umožňující silnou konstitutivní nadexpresi dané sekvence [např. RPS5A (Moore, I., *et al.* (2006). *Plant J* **45**, 651-683), PD7 (Jiang, P., *et al.* (2018). *BMC Biotechnol* **18**, 59) a jiné, všeobecně známé a používané promotory]. Alternativně lze použít také systémy pro chemicky regulovanou expresi transgenů, např. dexamethasonem indukovatelný systém pOp6-LhG4 (Samalova, M., *et al.* (2005). *Plant J* **41**, 919-935; Craft, J., *et al.* (2005). *Plant J* **41**, 899-918) nebo estradiolem indukovatelné systémy založené na *XVE* promotoru (Zuo, J., *et al.* (2000). *Plant J* **24**, 265-273; Brand, L., *et al.* (2006). *Plant Physiol* **141**, 1194-1204).

35 Pro další výzkum byly vybrány T3 homozygotní linie *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* s vysokou úrovní exprese (33ti, resp. 85ti násobný nárůst exprese *DIR13* oproti WT Col-0, obr. 6A). Tři nezávislé mutanti s inzercí T-DNA v *DIR13*, *dir13-1*, *dir13-2* a *dir13-3* mají inzerční mutace lokalizované v 3'UTR a promotorových oblastech (obr. 6B nahoře). Pomocí analýz RT-qPCR byla u mutantů *dir13-1*, *dir13-2* a *dir13-3* stále detekovatelná zbytková úroveň exprese *DIR13*, což naznačuje, že jde o knock-down (nikoliv knock-out) mutanty (obr. 6C). K vytvoření knock-out mutantů zcela deficientního v *DIR13* jsme použili systém pro úpravu genomu CRISPR-Cas9 se dvěma sgRNA, umožňující vznik delece mezi nukleotidy 128 a 1036 kódující sekvence *DIR13* (obr. 6B dole). Získali jsme dvě nezávislé linie, které byly pojmenovány *dir13-4* a *dir13-5*,
 45 produkující žádný nebo zkrácený transkript *DIR13*. Absence transkriptu *DIR13* v homozygotních mutantech *dir13-4* a *dir13-5* byla potvrzena semikvantitativní RT-PCR (obr. 6D). Abychom vyloučili možnou funkční redundanci v rámci *DIR* rodiny, ověřili jsme hladinu exprese nejbližších homologů *DIR13*, genů *DIR6*, *DIR10/ESB1* a *DIR14* a to jak v liniích s nadměrnou expresí *DIR13* (*35S:DIR13*), tak i u mutantní linie *dir13-5*. Výsledky RT-qPCR neukázaly
 50 žádnou změnu úrovně exprese pro tyto geny (obr. 6E). *DIR5* a *DIR12* nebyly zahrnuty do tohoto experimentu, protože nejsou exprimovány v kořeni rostlin (Kim, K. W., *et al.* (2012). *J Biol Chem* **287**, 33957-33972; Yonekura-Sakakibara, K., *et al.* (2021). *Plant Cell* **33**, 129-152).

Příklad 4: Zvýšená exprese *AtDIR13* vede ke zvýšení endogenních hladin lignanů a neolignanů

Z rostlin standardního typu (*WT Col-0*) i z linií se zvýšenou expresí *DIR13* (*35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8*) a mutantů deficientních v expresi *DIR13* (*dir13-5*) byly dle protokolu Routaboul *et al.* (Routaboul, J. M., *et al.* (2006). *Planta* **224**, 96-107) s určitými úpravami izolovány fenolické sloučeniny a následně použity pro analýzu pomocí HPLC-MS/MS. Pomocí této metody jsme zjistili, že v liniích se zvýšenou expresí *DIR13* dochází ke zvýšení produkce celé řady lignanů a neolignanů (reprezentují 8 z 11 sloučenin s nejvyšší mírou nárůstu u *DIR13 OE* oproti *WT Col-0*, obr. 7A). Oproti tomu v případě linie deficientní v produkci *DIR13* došlo ke snížení produkce endogenních lignanů (obr. 7B).

Příklad 5: Rostliny se zvýšenou expresí *AtDIR13* vykazují zvýšení odolnosti k zasolení a suchu

Vzhledem k tomu, že dirigent geny jsou asociovány s odpovědí na (a)biotické stresové odpovědi [viz kapitola *Současný stav techniky* a (Paniagua, C., *et al.* (2017). *J Exp Bot* **68**, 3287-3301)], rozhodli jsme se otestovat případnou změnu citlivosti rostlin se zvýšenou expresí *DIR13* (*35S:DIR13*) a mutantů deficientních v expresi *DIR13* (*dir13-5*) k abiotickým stresům ve srovnání s rostlinami standardního typu (*WT Col-0*).

Rychlost klíčení *WT Col-0*, *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* byla měřena denně po dobu 1 týdne v přítomnosti 0 až 150 mM NaCl. Za kontrolních podmínek (0 mM NaCl) se klíčení transgenních semen významně nelišilo od *WT Col-0* (data neukázána), ale se zvýšením koncentrací soli bylo klíčení u všech testovaných linií inhibováno. Rychlosti klíčení linií *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* byla významně vyšší než u *WT Col-0*, přičemž nejvýraznější rozdíl byl pozorován při 150 mM NaCl (obr. 8A). Naproti tomu klíčení semen mutantu *dir13-5* bylo citlivější na NaCl při koncentraci 150 mM, zatímco za kontrolních podmínek a s 50 a 100 mM NaCl byla rychlost klíčení jak mutantů, tak *WT Col-0* srovnatelná (obr. 8B). Dále jsme zkoumali účinky ošetření solí na růst kořenů. Semena *WT Col-0*, *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* a *dir13-5* byla pěstována za normálních podmínek po dobu 5 dnů. Poté byly klíčící rostliny přeneseny na Petriho misky obsahující médium s 0 nebo 150 mM NaCl a kultivovány po dobu dalších 7 dnů. Ve srovnání s kontrolou, přítomnost 150 mM NaCl významně snížilo délku primárního kořene i počet laterálních kořenů ve všech testovaných liniích. Ve srovnání s *WT Col-0* byl primární kořen u linií *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* o 27 %, resp. 13 % delší, zatímco linie *dir13-5* měla kořen na médiu s NaCl o 18 % kratší než *WT Col-0* (data neukázána). Kromě toho měly linie *35S:DIR13 #6* a *35S:DIR13 #8* ve srovnání s *WT Col-0* za podmínek solného stresu vyšší počet laterálních kořenů a jejich délka byla také větší (obr. 8C, D). Naproti tomu mutantní linie *dir13-5* vykazovala snížený počet laterálních kořenů, které byly kratší (obr. 8E, F).

Dále jsme testovali vliv exprese *DIR13* na odpověď na solný stres u rostlin rostoucích v půdě. 4 týdny staré rostliny *WT Col-0* a *35S:DIR13 #8* pěstované za normálních podmínek (bez stresu zasolením) byly po dobu dalších 4 týdnů zalévány každých 7 dní zvyšujícími se koncentracemi soli (100, 150, 200 a 300 mM NaCl), jako kontrola byla použita závlhka čistou vodou. V nepřítomnosti stresu byl růst a vývoj jak *WT Col-0*, tak *35S:DIR13 #8* normální (data neprezentována). Rostlinám standardního typu (*WT Col-0*) za podmínek zasolení začaly žloutnout listy. Oproti tomu rostliny *35S:DIR13 #8* měly listy stále zelené (Obr. 8G, H). Vizualní fenotyp žloutnutí listů byl kvantifikován pomocí měření podíl variabilní (F_v) a maximální (F_m) fluorescence (F_v/F_m) fotosystému II a tedy účinnosti fotosyntézy (Garcia, A., *et al.* (2023). *New Phytol* **237**, 60-77). Tento parametr byl za podmínek solného stresu u *35S:DIR13 #8* ve srovnání s rostlinami standardního typu výrazně vyšší (obr. 8I). Po ošetření solným stresem přežily téměř všechny rostliny *35S:DIR13 #8*, zatímco přežilo pouze 44 % *WT Col-0* (data nejsou uvedena). Rostliny *dir13-5* nevykazovaly ve srovnání s *WT Col-0* statisticky významný rozdíl v toleranci soli (data nejsou uvedena).

Výše uvedená zjištění jasně ukazují, že nadměrná exprese *DIR13* podporuje toleranci vůči stresu zasolením během klíčení semen, růstu kořenů a efektivity fotosyntézy.

5 Analyzovali jsme také vliv exprese *DIR13* na toleranci k suchu. Čtyři týdny staré rostliny pěstované v půdě za podmínek krátkého dne byly vystaveny 3 týdny trvajícím suchu. Po tomto období byly rostliny znovu zalaty a po dobu dalších 5 dní následovala fáze zotavení (obr. 9A, B). Rostliny *35S:DIR13* vykazovaly vyšší odolnost vůči vysychání, jak bylo prokázáno nižším procentem zvadlých rostlin i vyšší mírou přežití ve srovnání s *Col-0 WT* během fáze zotavení (obr. 9C, D). Abychom získali více informací o stresové adaptaci rostlin se zvýšenou expresí *DIR13*, použili jsme platformu pro automatickou fenotypizaci (PlantScreen™ SC Root System) pro sledování studovaných genotypů během experimentu se stresem ze sucha. Rostliny *35S:DIR13 #8* vykazovaly vyšší úroveň tolerance vůči stresu, jak naznačuje větší plocha jejich rozet během fáze stresu suchem ve srovnání s rostlinami *Col-0 WT*. Tento rozdíl byl ještě nápadnější během fáze obnovy, kdy rostliny *35S:DIR13 #8* vykazovaly vyšší rychlost růstu prýtu (obr. 9E). Navíc byla zjištěna vyšší efektivita (maximální kvantový výtěžek) fotosystému II u rostlin *35S:DIR13 #8* během fáze obnovy, což ukazuje na produktivnější fotosyntézu (obr. 9F).

Tato data společně naznačují, že *DIR13* pozitivně reguluje aklimatizaci na abiotické stresy a může hrát důležitou roli v reakcích rostlin na environmentální výkyvy.

20

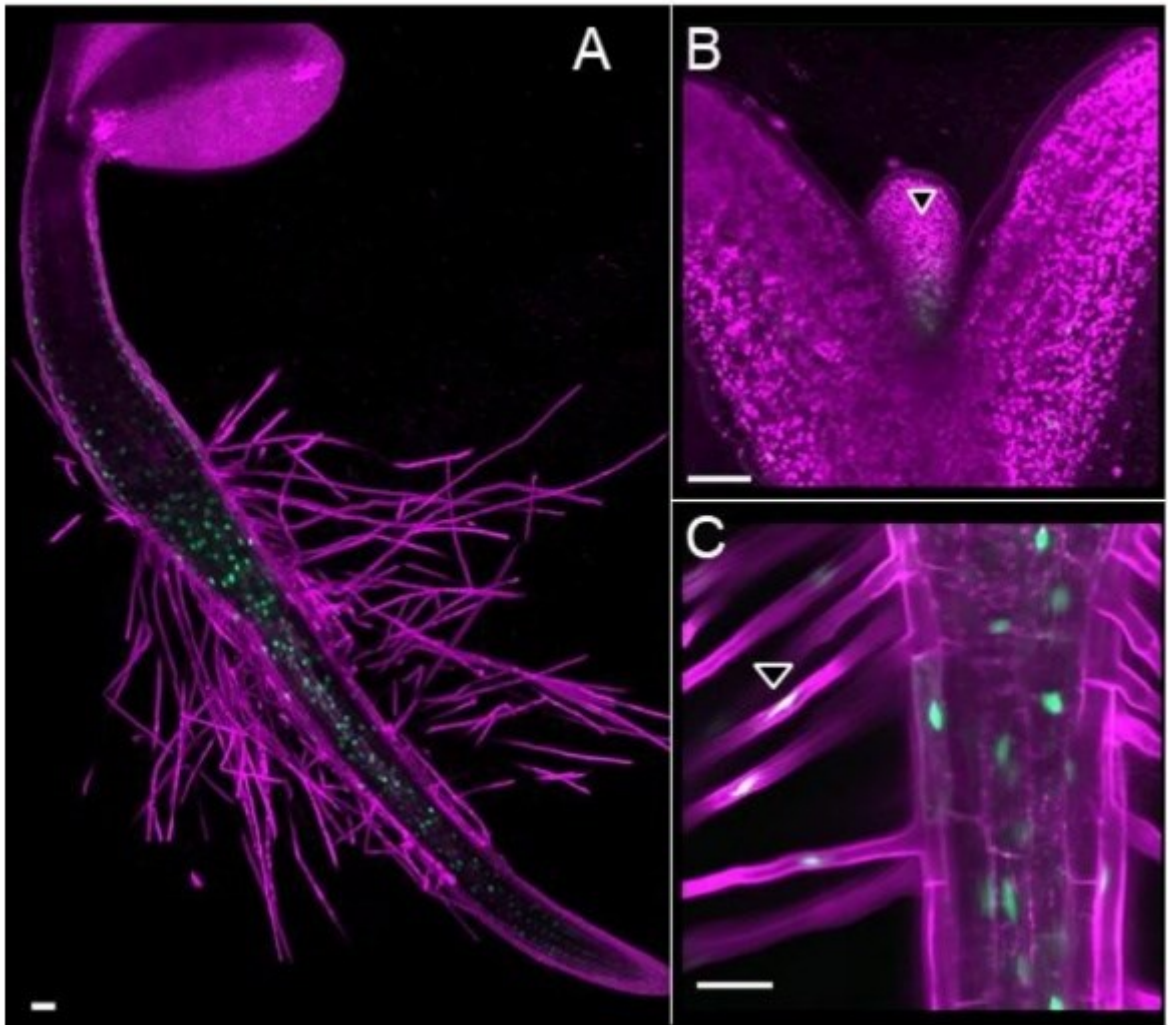
Příklad 6: Zvýšená exprese *DIR13* zvyšuje schopnost rostlin odpovídat na suchu

Stres zasolením spouští akumulaci intracelulárních reaktivních forem kyslíku (reactive oxygen species, ROS) (Das, K., *et al.* (2014). *Front Env Sci-Switz* **2**). Ke zkoumání úrovně produkce ROS v rostlinách mutantů s nadměrnou expresí *DIR13* a *dir13-5* po aplikaci solného stresu jsme použili obecný senzor ROS, 2',7'-dichlorodihydrofluorescein-diacetát (H2DCFDA), tvořící vysoce fluorescenční 2',7' sloučeninu dichlorfluorescein [DCF; (Ubezio, P., *et al.* (1994). *Free Radical Bio Med* **16**, 509-516)]. Analyzovali jsme produkci ROS v kořenech vystavených zasolení v epidermálních a kortikálních buňkách diferenciační zóny a prostřednictvím kvantifikace DCF signálu v kořenech vystavených stresu zasolením a kontrolních kořenech (obr. 10A, B). Vzhledem k tomu, že exprese *DIR13* je indukovatelná a dříve bylo popsáno, že nadprodukce endogenních cytokininů zvyšuje akumulaci ROS v odpovědi na stres zasolením v kořenech i prýtech (Wang, Y., *et al.* (2015). *Front Plant Sci* **6**, 1004), zkoumali jsme také možný vliv exogenní aplikace BAP na produkci ROS ať již v přítomnosti nebo nepřítomnosti 150 mM NaCl. Zjistili jsme, že i v kontrolních podmínkách byla bazální úroveň produkce ROS významně vyšší u semenáčků se zvýšenou produkcí *DIR13* (*35S:DIR13*) a naopak nižší u mutantů *dir13-5* ve srovnání s *Col-0 WT*. Aplikace 150 mM NaCl zvýšila hladiny ROS ve všech testovaných genotypech, ale mnohem více v kořenech *35S:DIR13* (obr. 10C). Bazální hladina produkce ROS po kvantifikaci fluorescenčního signálu v případě exogenního ošetření BAP byla na stejné úrovni pro *Col-0 WT* a *dir13-5*, ale v případě *35S:DIR13* jsme pozorovali 2,5krát vyšší změnu. Konečně kombinace hormonálního působení se solným stresem vedla ke stejnému zvýšení úrovně tvorby ROS v *Col-0 WT* a *dir13-5*, jako bylo prokázáno pouze u stresu zasolením, ale bylo podstatně vyšší v případě kořenů *35S:DIR13* (obr. 10C).

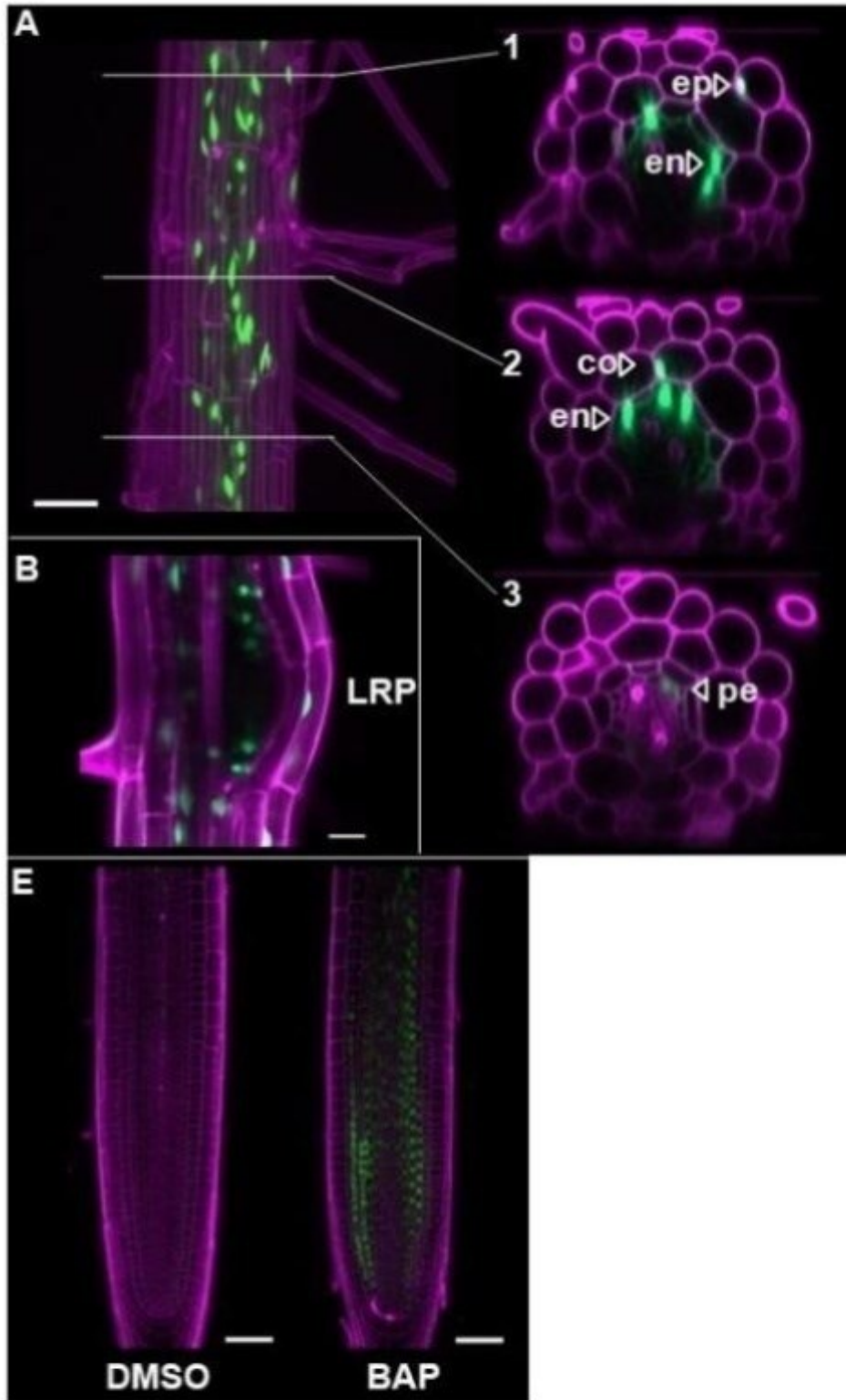
45 Závěrem lze tedy shrnout, že nadměrná exprese *DIR13* zvyšuje schopnost rostlin reagovat na stres produkcí ROS a tento typ odpovědi je pozitivně regulován cytokininy.

PATENTOVÉ NÁROKY

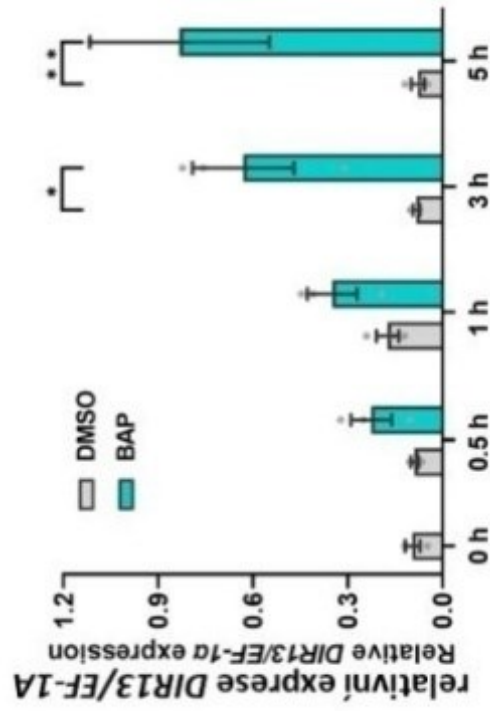
1. Způsob zvýšení odolnosti rostlin vůči abiotickému stresu, zejména vůči suchu a zasolení půdy, **vyznačující se tím**, že se zvýší exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu v rostlině, přičemž exprese genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu se zvýší vložením dalších kopií genu do rostliny, s výhodou pod kontrolou promotorů zvyšujících míru exprese, a/nebo aplikací aktivátorů exprese, zejména aktivátorů transkripce, daného genu na rostlinu; a/nebo se exprese genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu v rostlině zvýší postupem, kdy se nejprve amplifikují kódující a/nebo genomové sekvence genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu pomocí primerů, které nasedají na 5' a 3' konec kódující sekvence; následně se klonují kódující a/nebo genomové sekvence genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu do vektoru s vhodnou expresní kazetou obsahující silný konstitutivně aktivní promotor, s výhodou CaMV 35S nebo RPS5A, nebo promotor umožňující chemicky regulovanou expresi transgenů, s výhodou dexamethasonem indukovatelný systém pOp6-LhG4 nebo estradiolem indukovatelné systémy založené na *XVE* promotoru; a nakonec se uvedený vektor transformuje do rostliny.
2. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se současně se zvýšením exprese genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu, nebo následně, aplikuje na rostlinu alespoň jeden exogenní cytokinin.
3. Způsob podle nároku 1, **vyznačující se tím**, že se současně se zvýšením exprese genu *DIR13* nebo jeho homologu nebo orthologu v rostlině zvýší exprese alespoň jednoho genu pro biosyntézu endogenních cytokininů, s výhodou *IPT* nebo *LOG*, nebo sníží exprese genů pro degradaci cytokininů, s výhodou *CKX*.
4. Způsob podle kteréhokoliv z nároků 1 až 3, **vyznačující se tím**, že rostlinou je brukvovitá rostlina.
5. Rostlina se zvýšenou odolností vůči abiotickému stresu, zejména vůči suchu a zasolení půdy, **vyznačující se tím**, že obsahuje vložené další kopie genu *DIR13* nebo jeho orthologu nebo jeho homologu pro zvýšení produkce proteinu kódovaného tímto genem.
6. Rostlina podle nároku 5, **vyznačující se tím**, že rostlinou je brukvovitá rostlina.



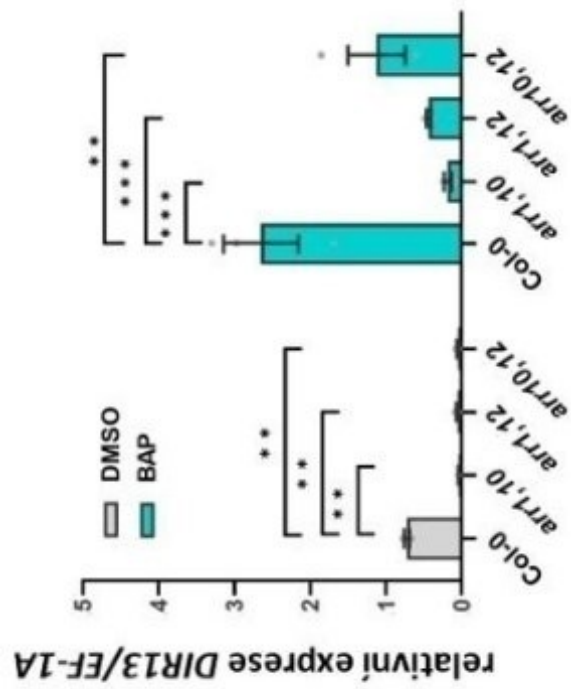
Obr. 1



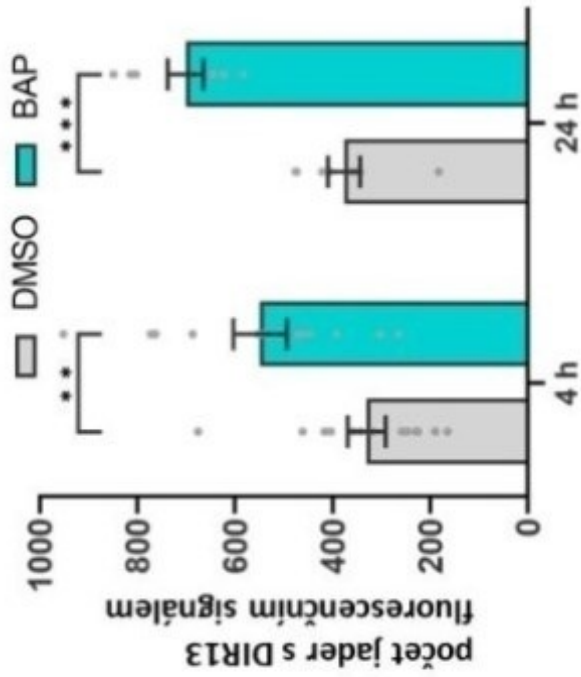
Obr. 2



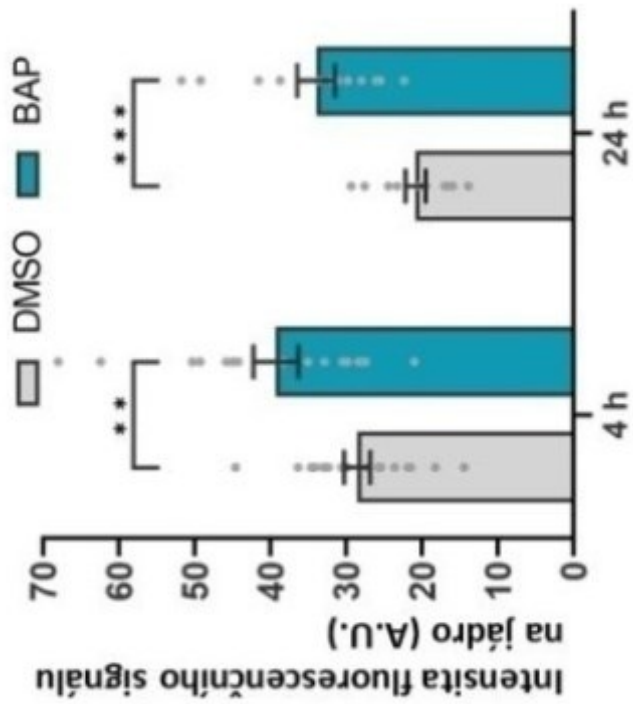
Obr. 2C



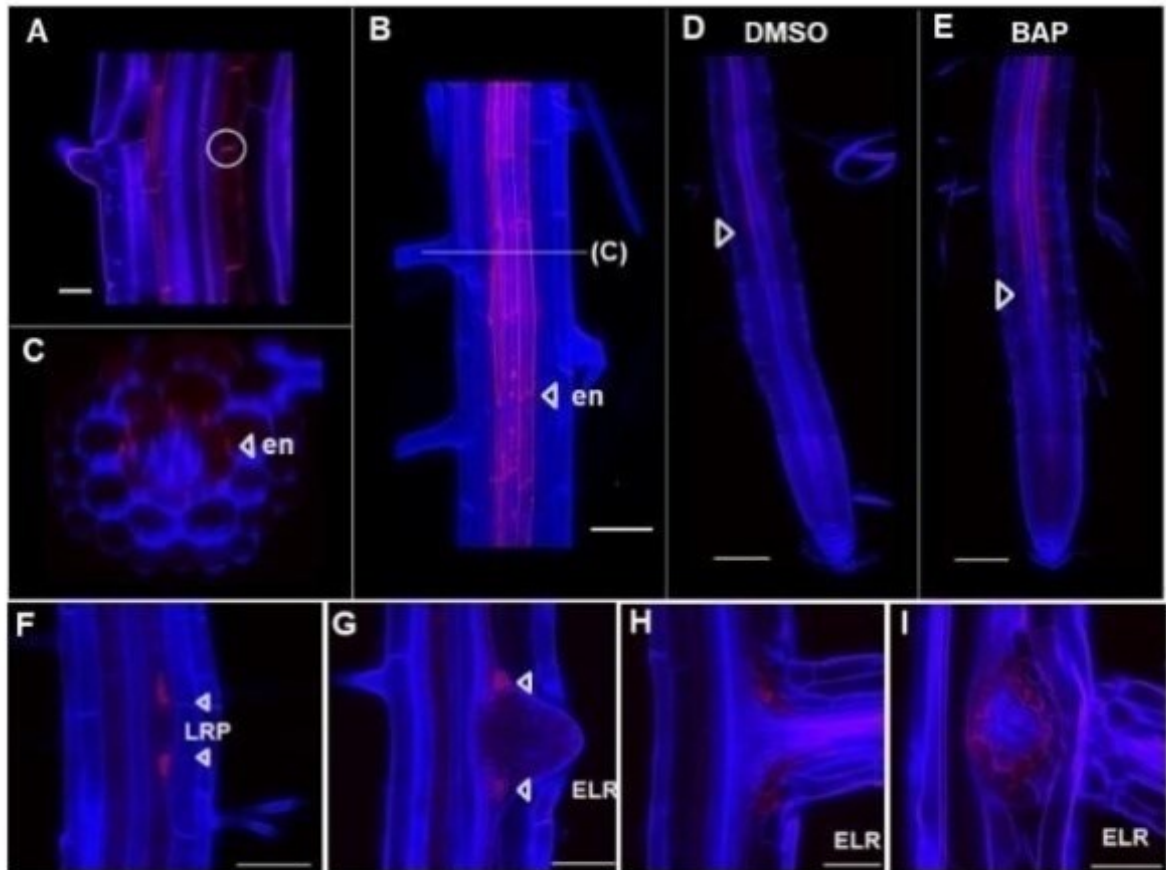
Obr. 2D



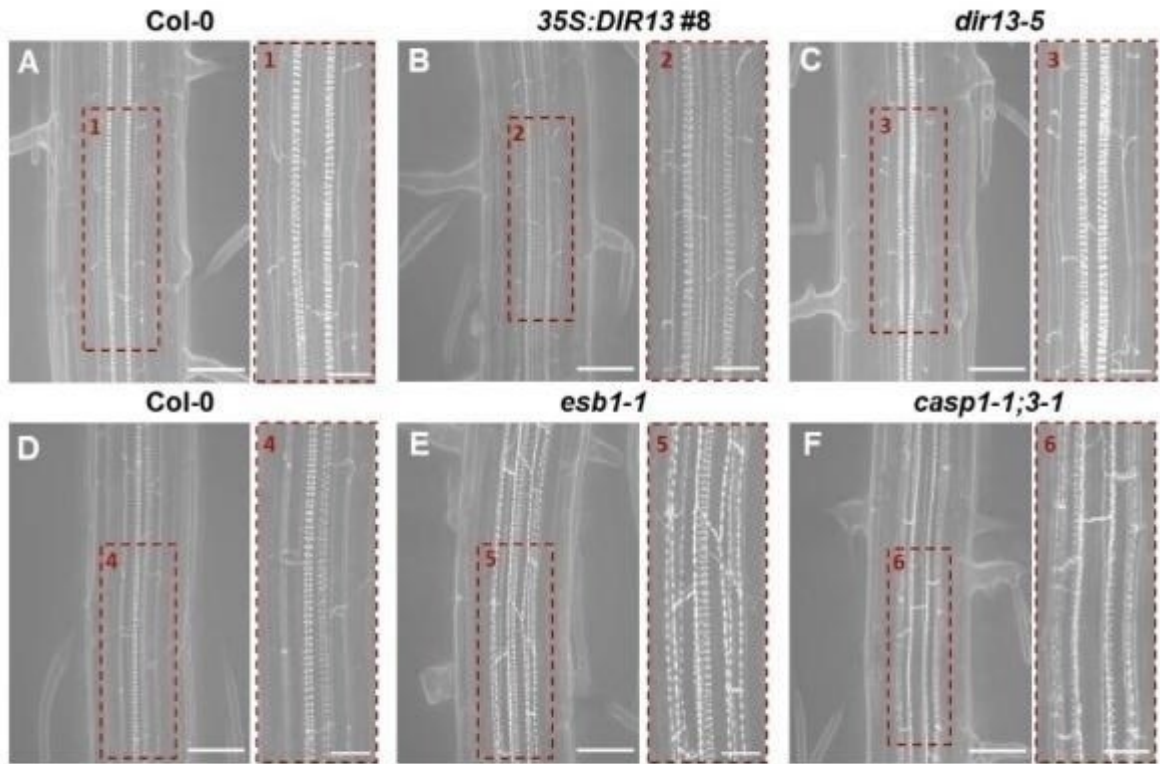
Obr. 2F



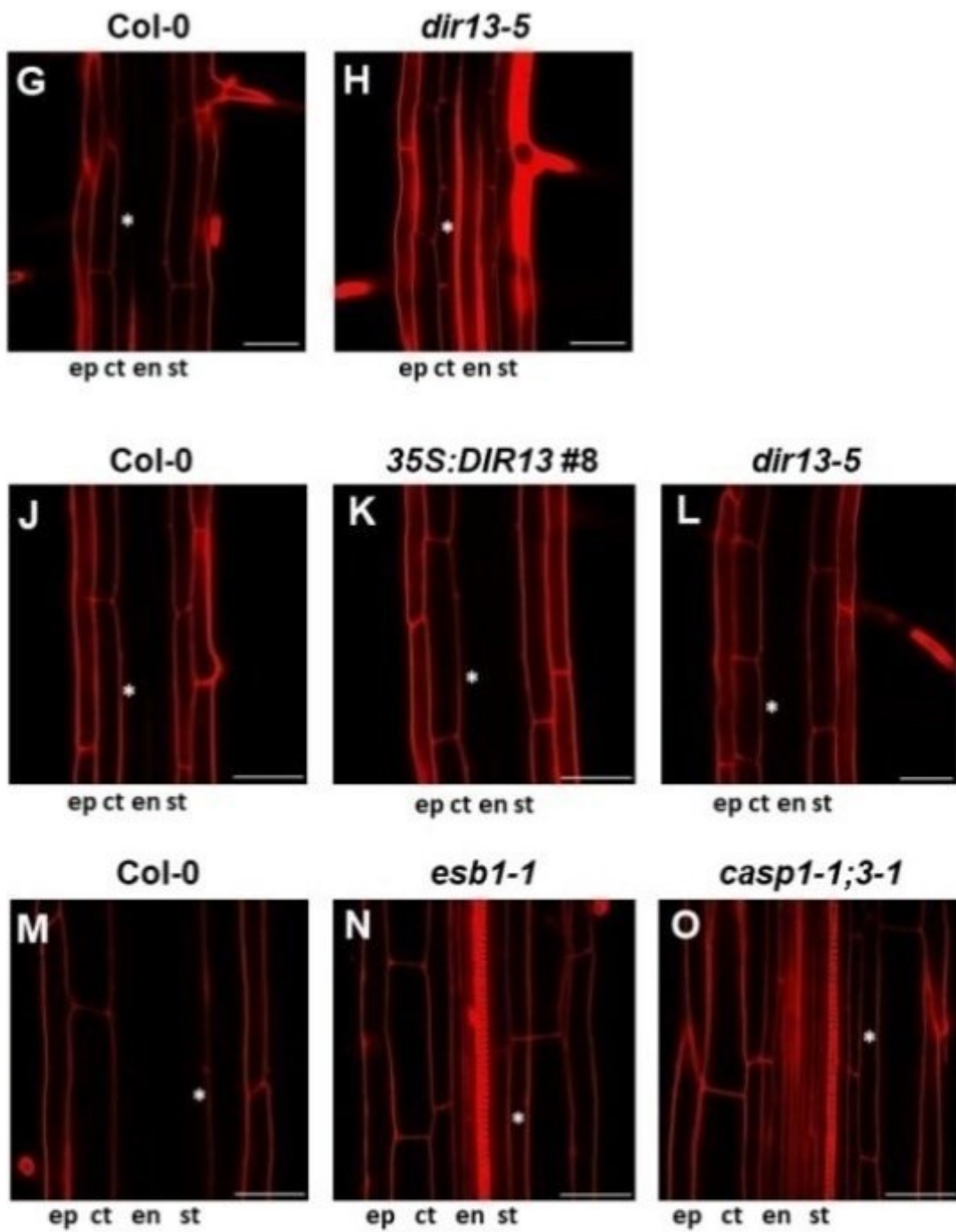
Obr. 2G



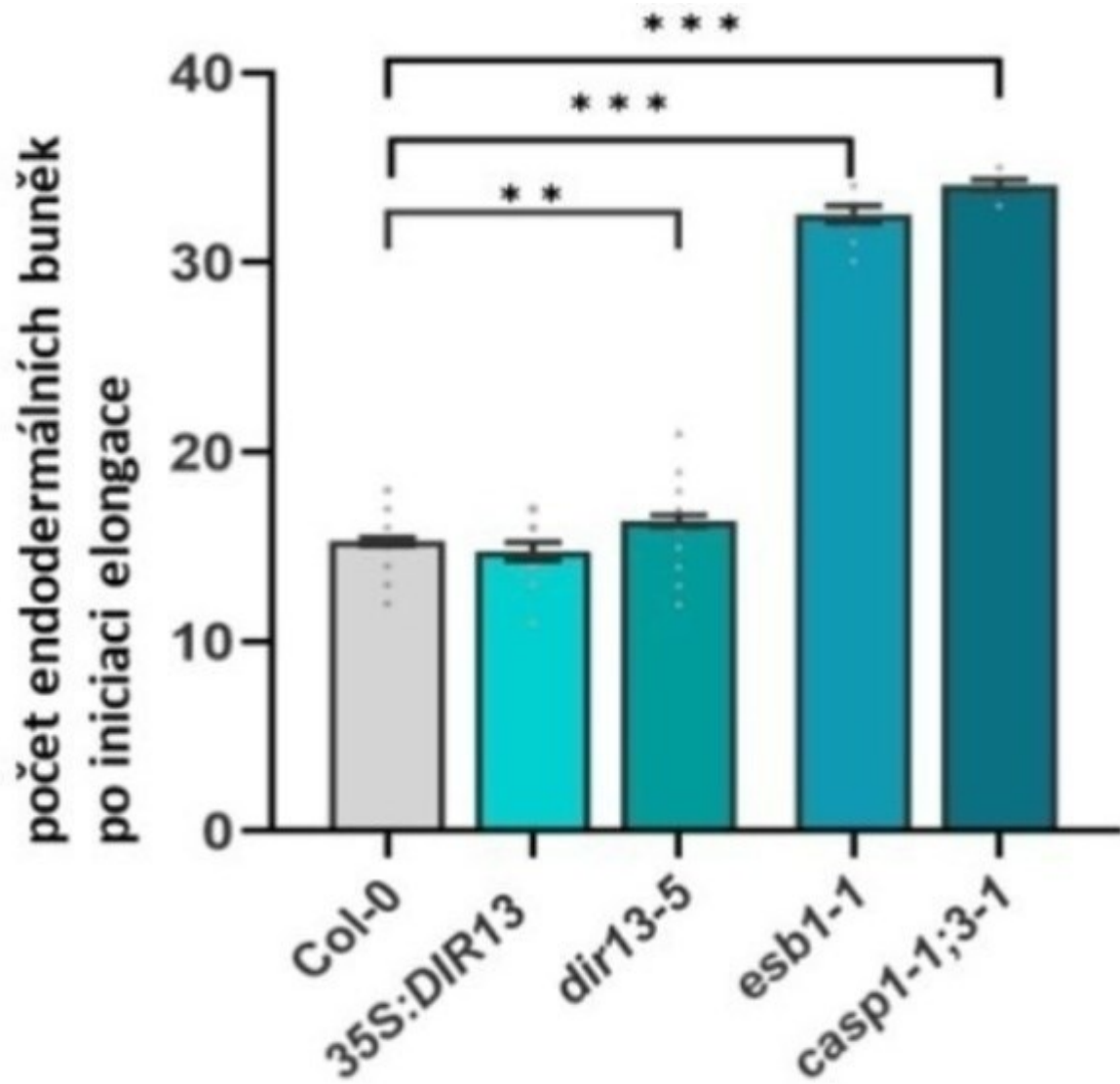
Obr. 3



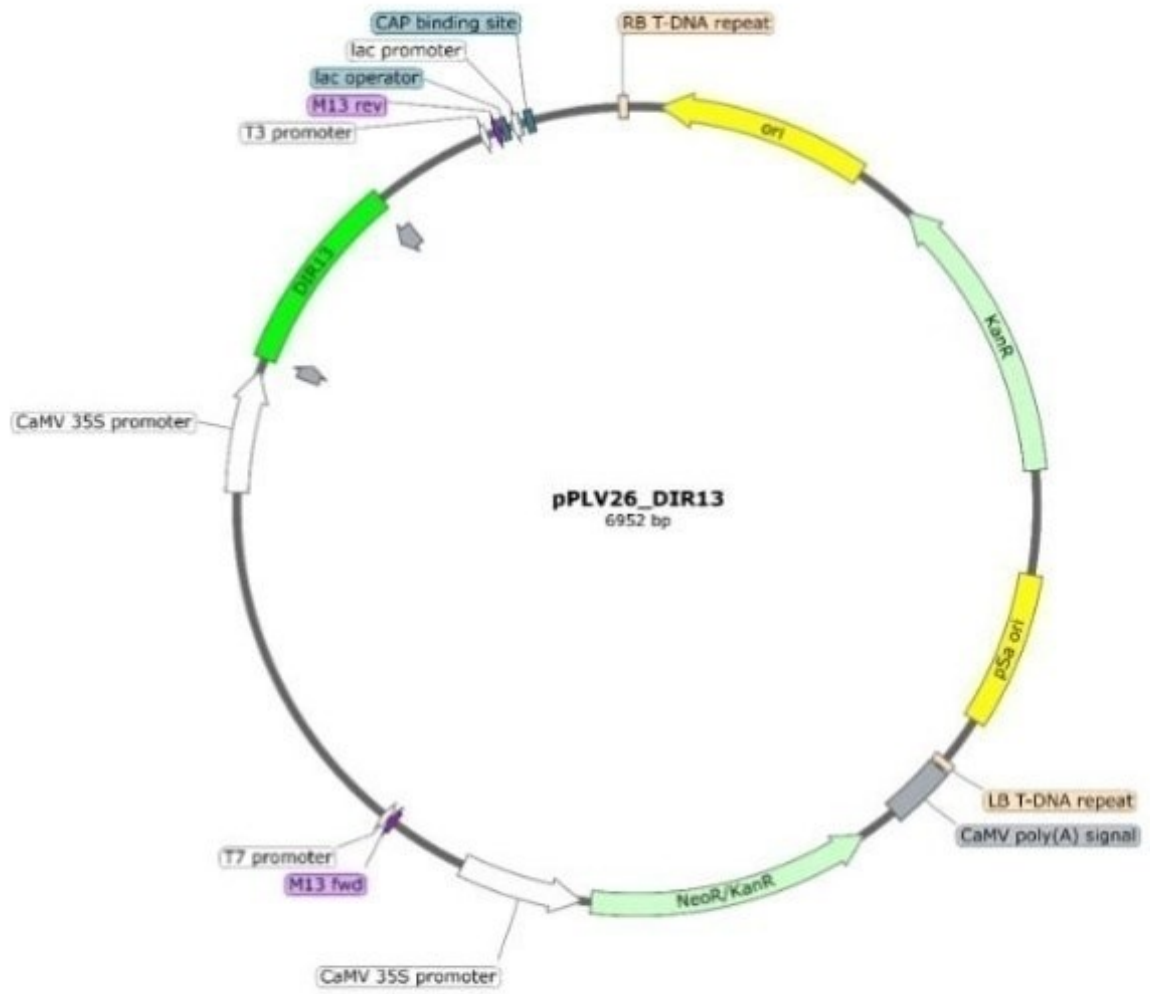
Obr. 4



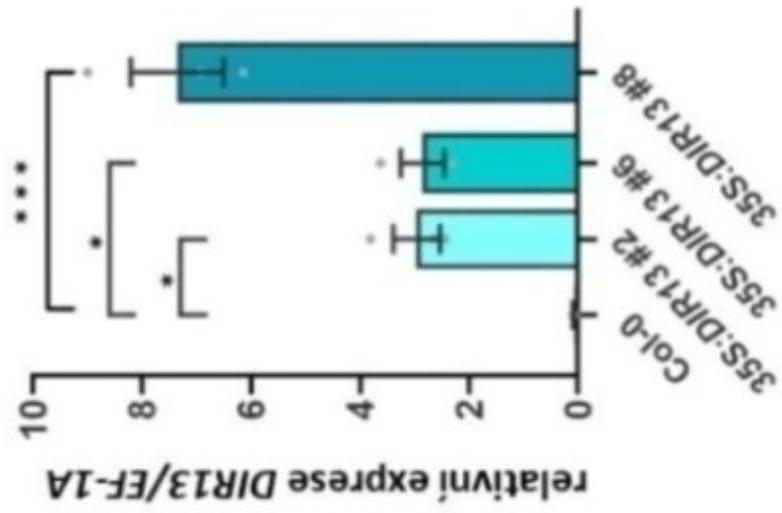
Obr. 4 (pokračování)



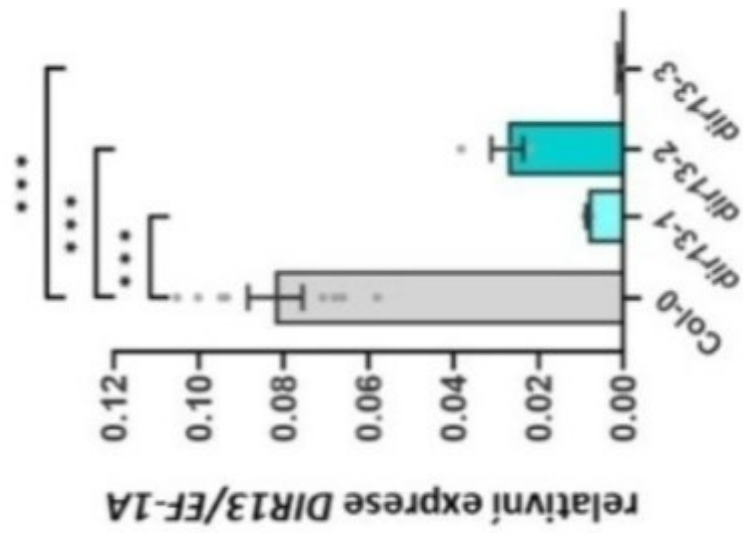
Obr. 4 (pokračování)



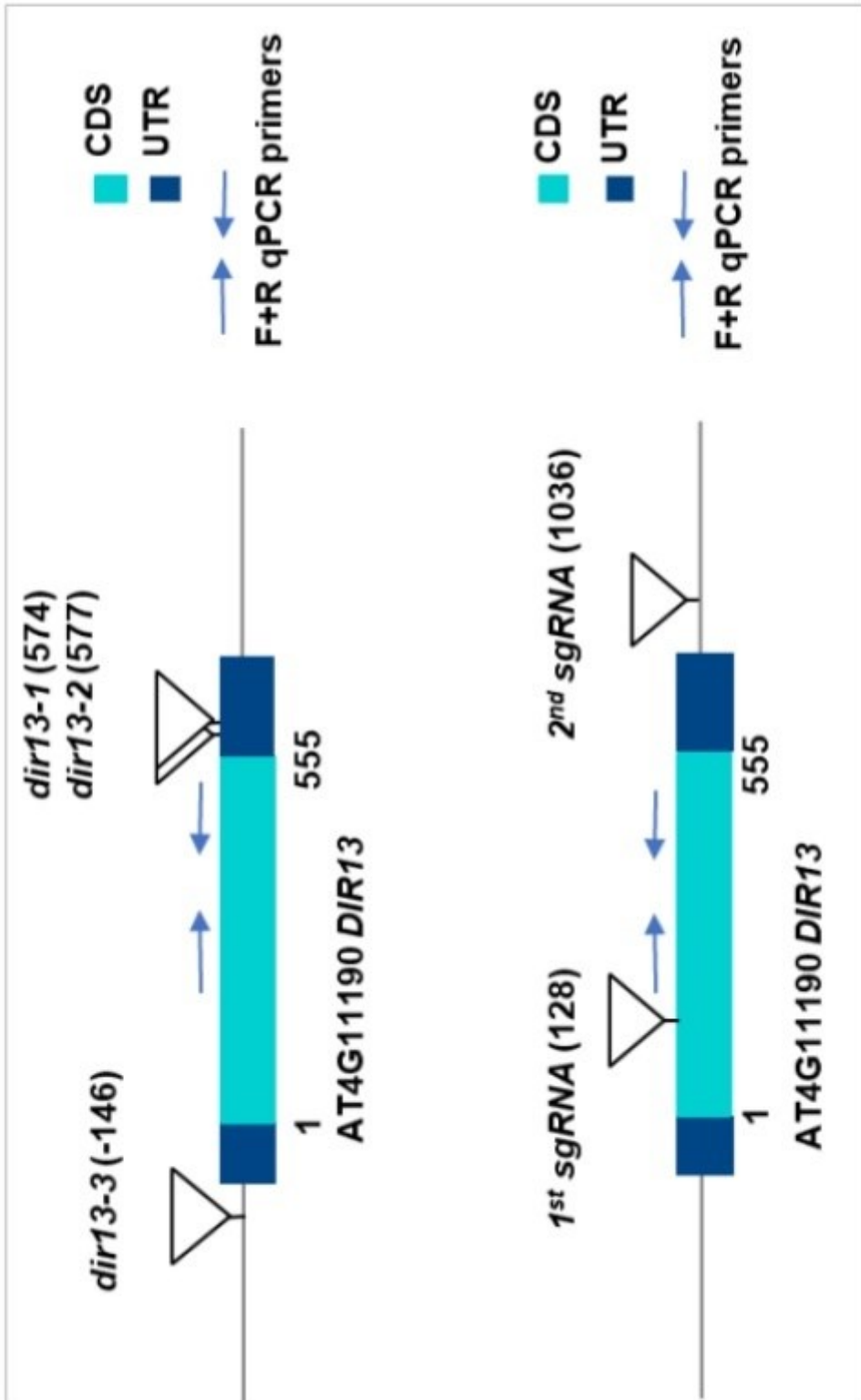
Obr. 5



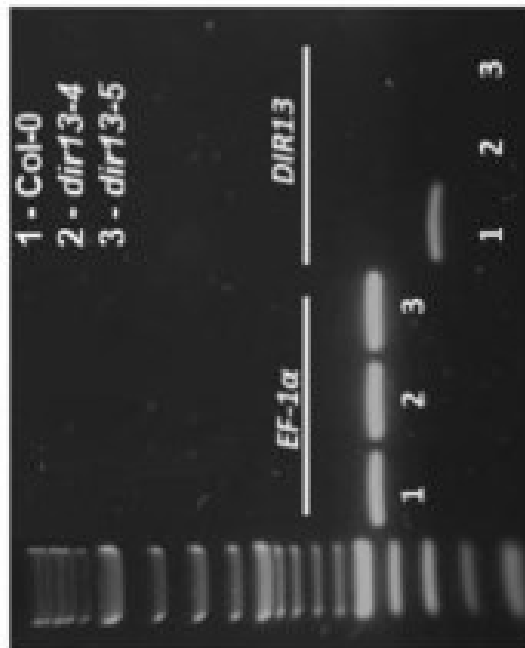
Obr. 6A



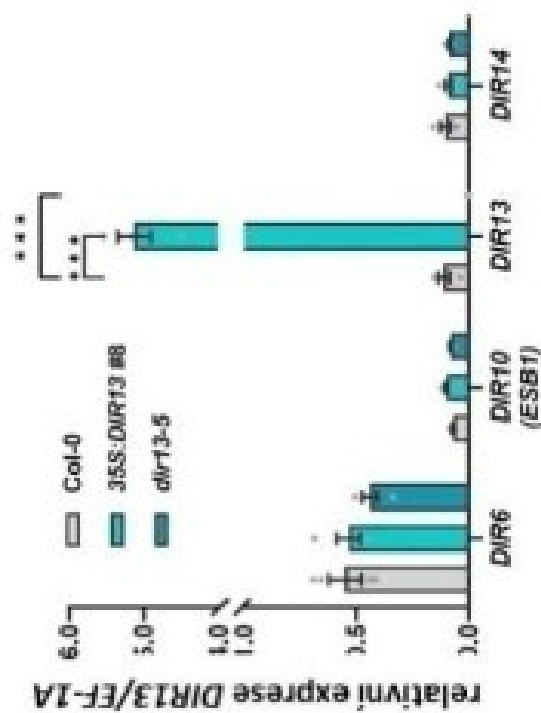
Obr. 6C



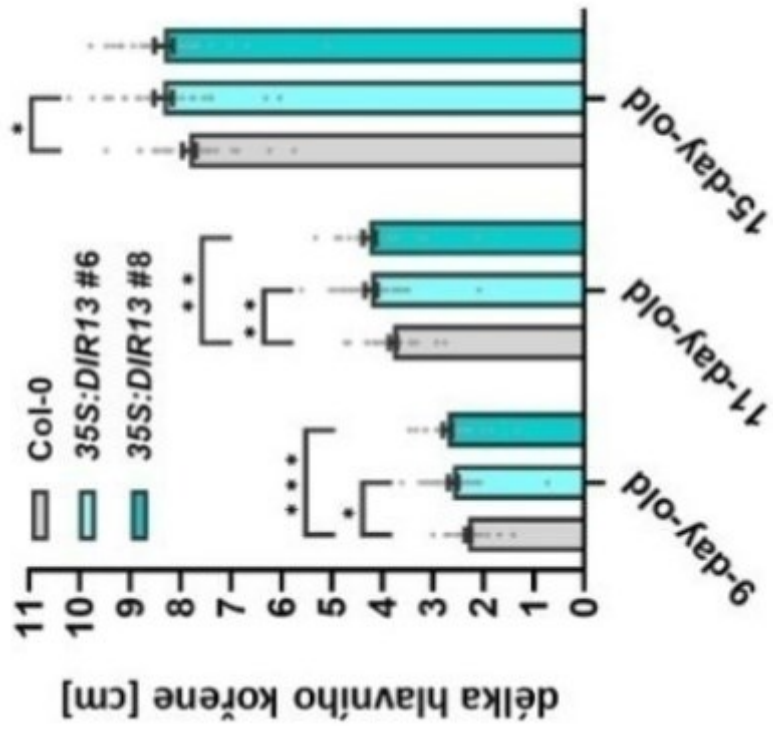
Obr. 6 B (pokračování)



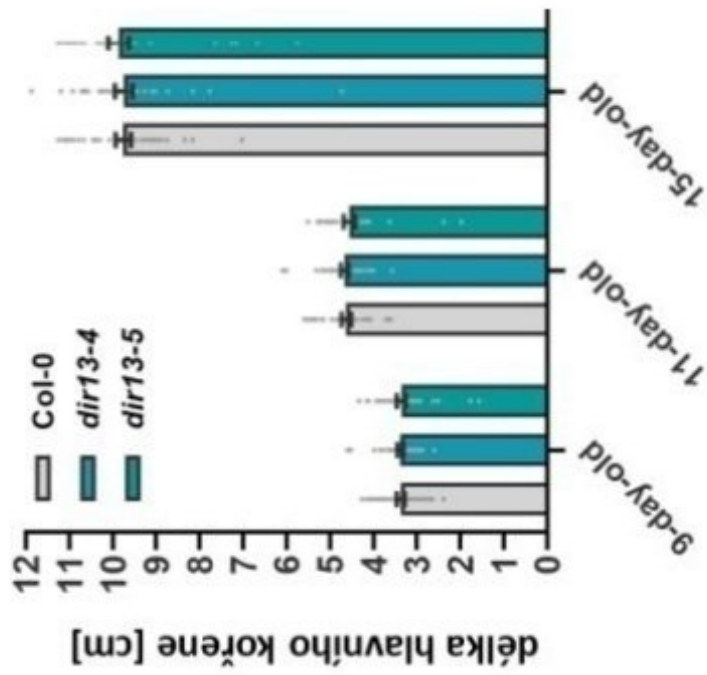
Obr. 6D



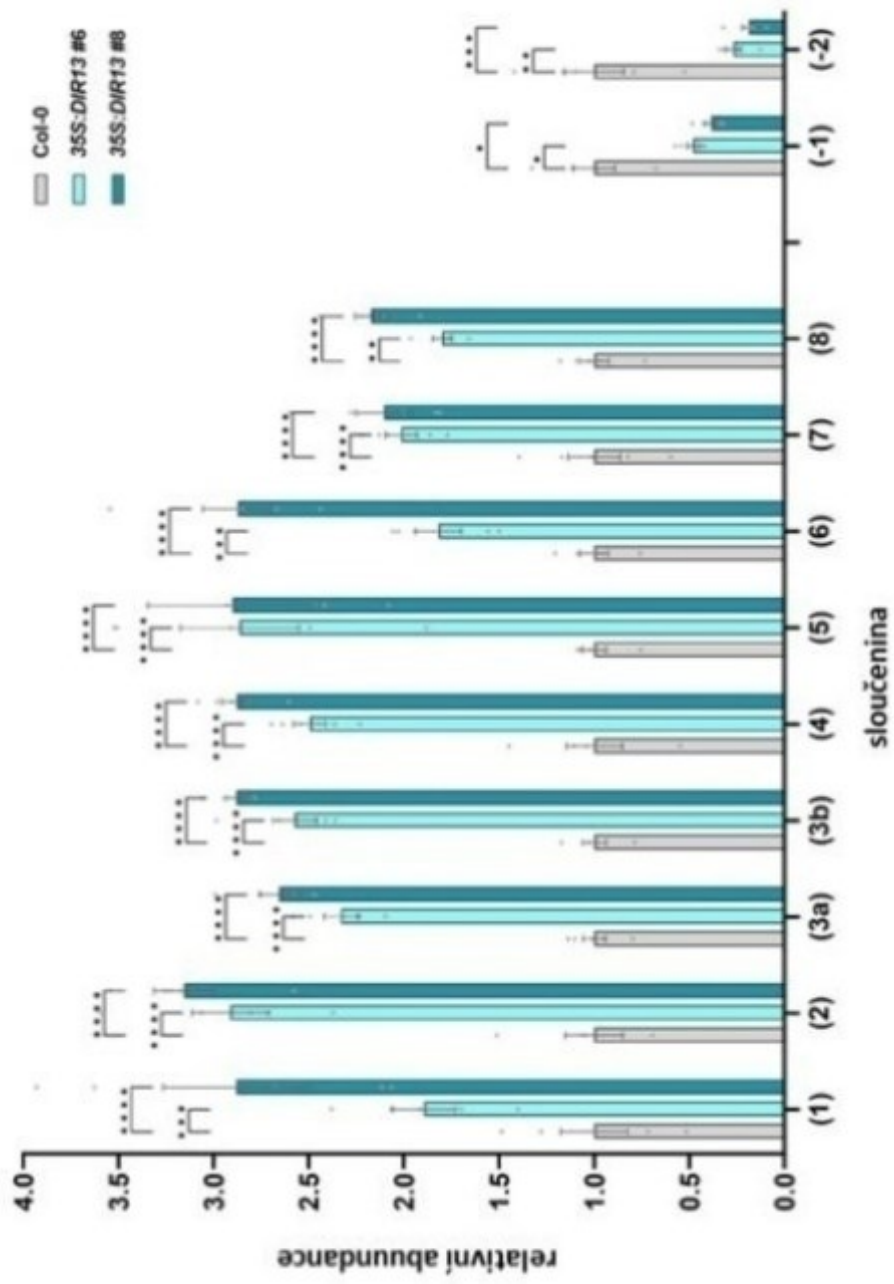
Obr. 6E



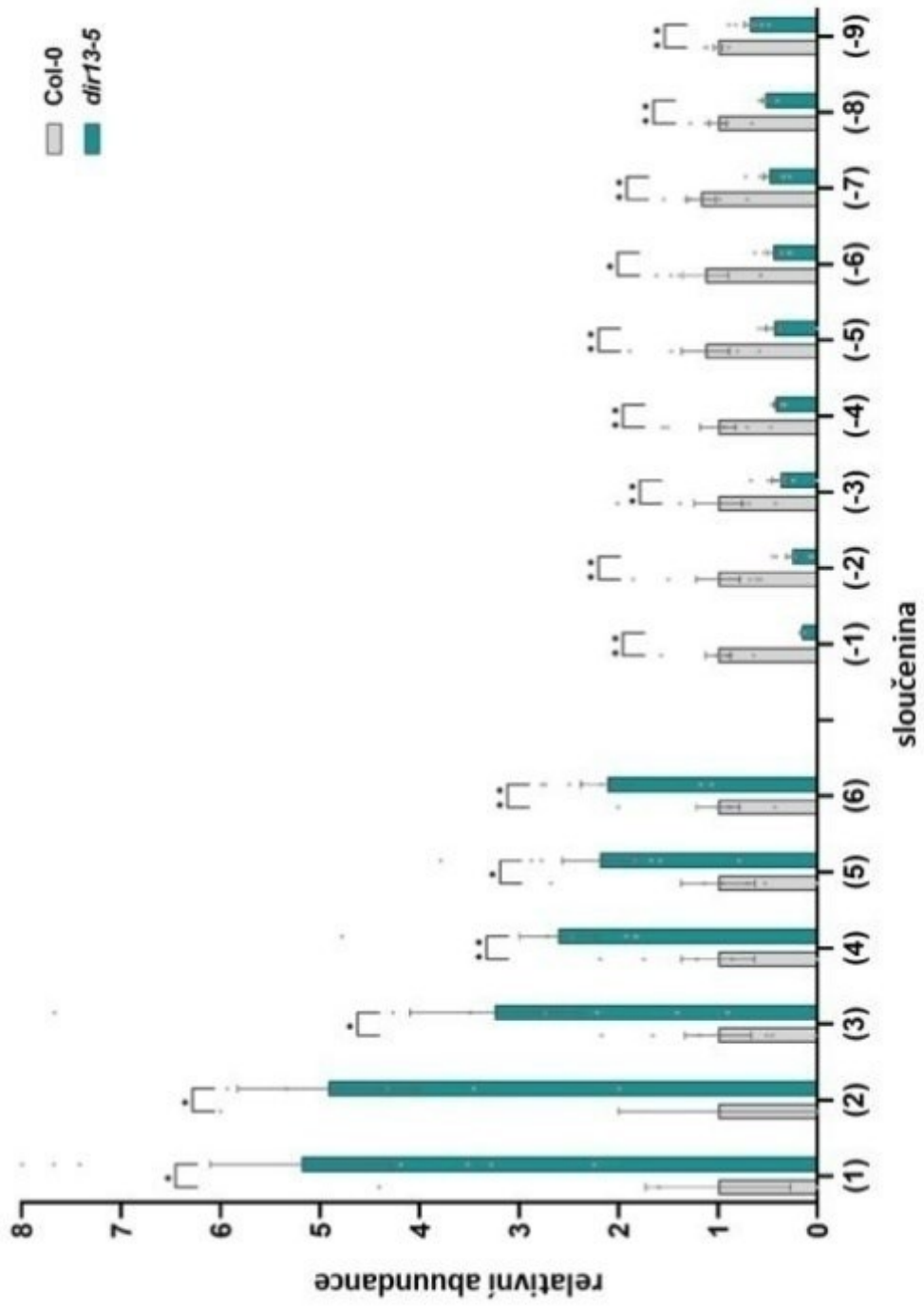
Obr. 6F



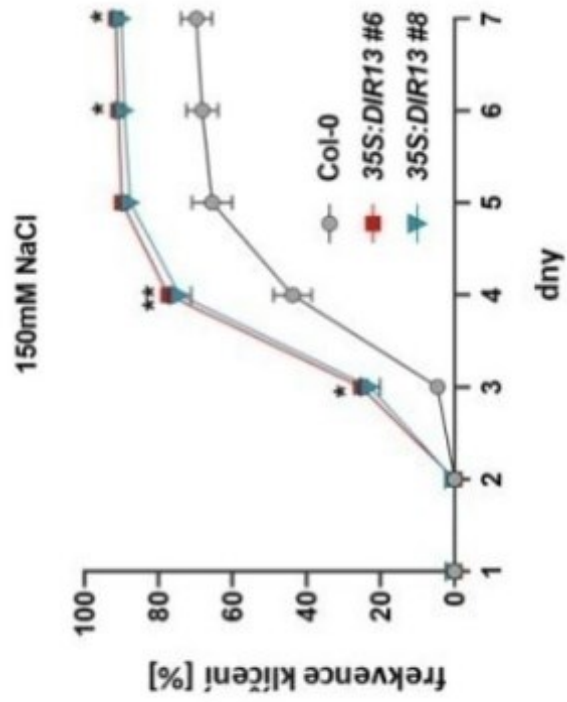
Obr. 6G



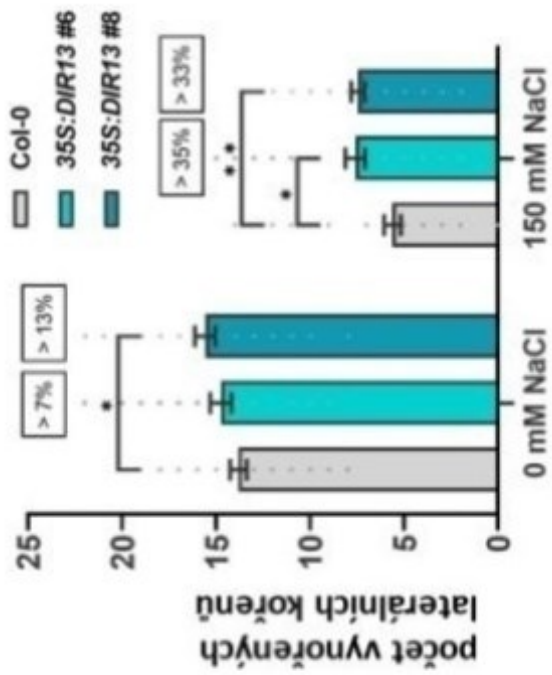
Obr. 7A



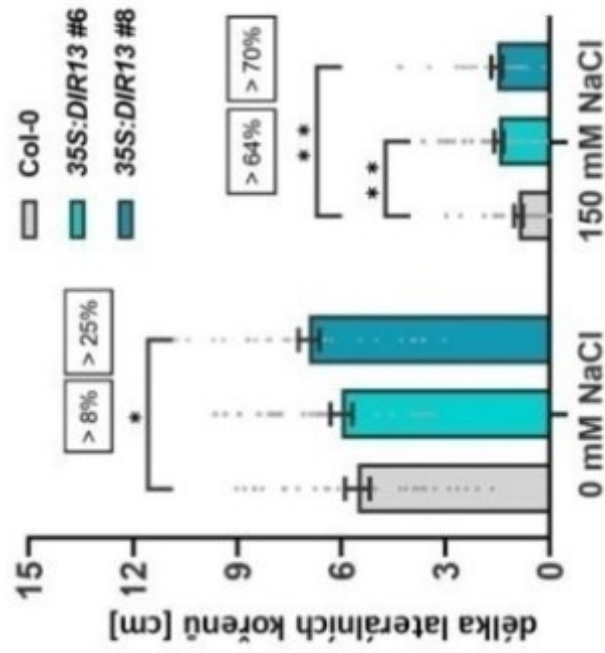
Obr. 7B



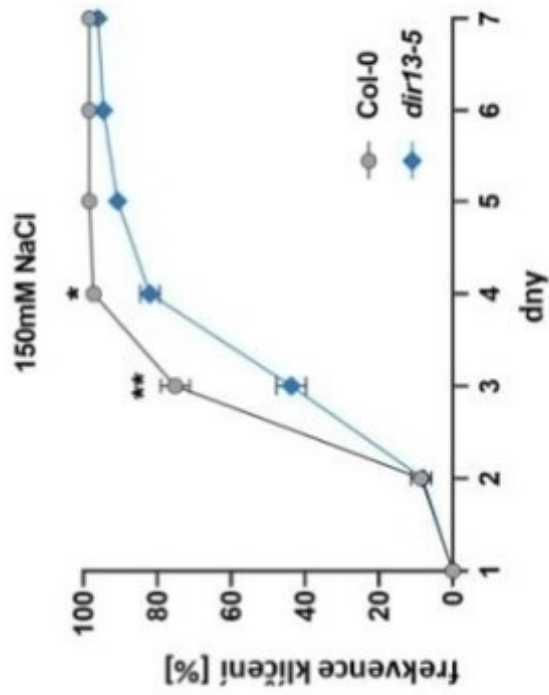
Obr. 8A



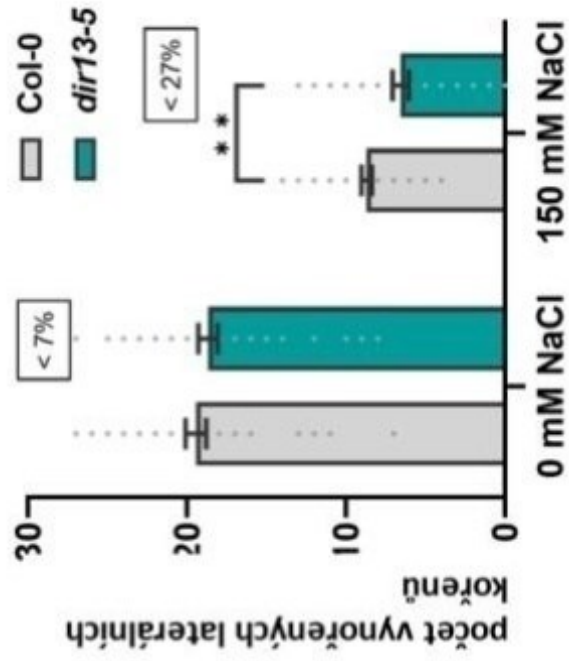
Obr. 8B



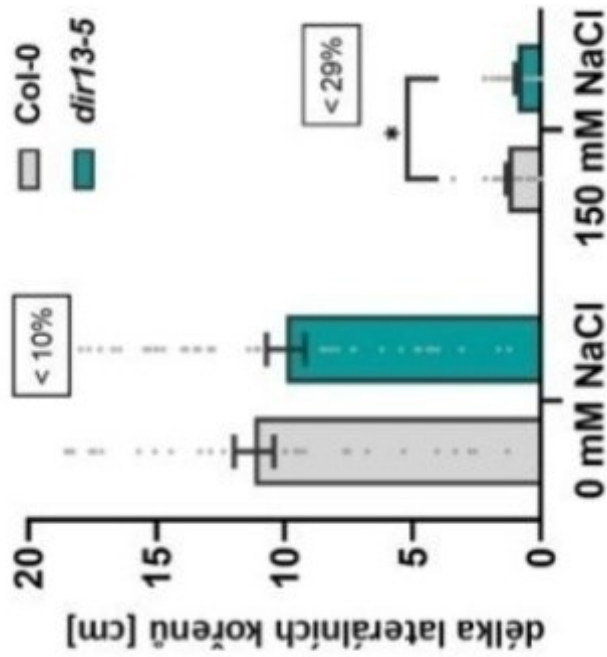
Obr. 8C



Obr. 8D



Obr. 8E



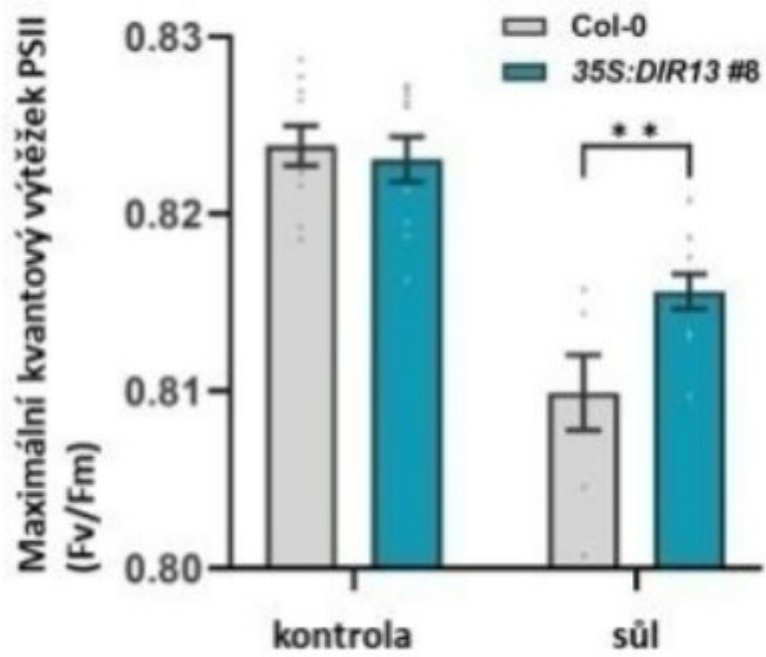
Obr. 8F



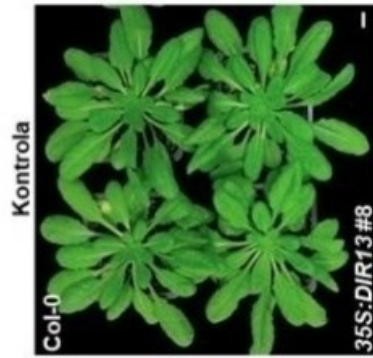
Obr. 8G



Obr. 8H



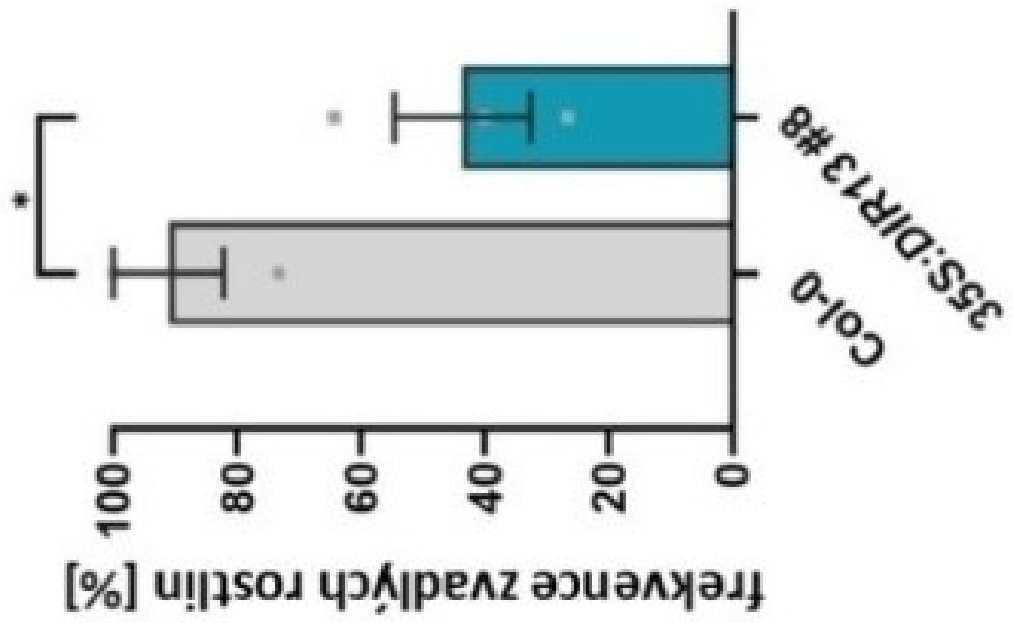
Obr. 8I



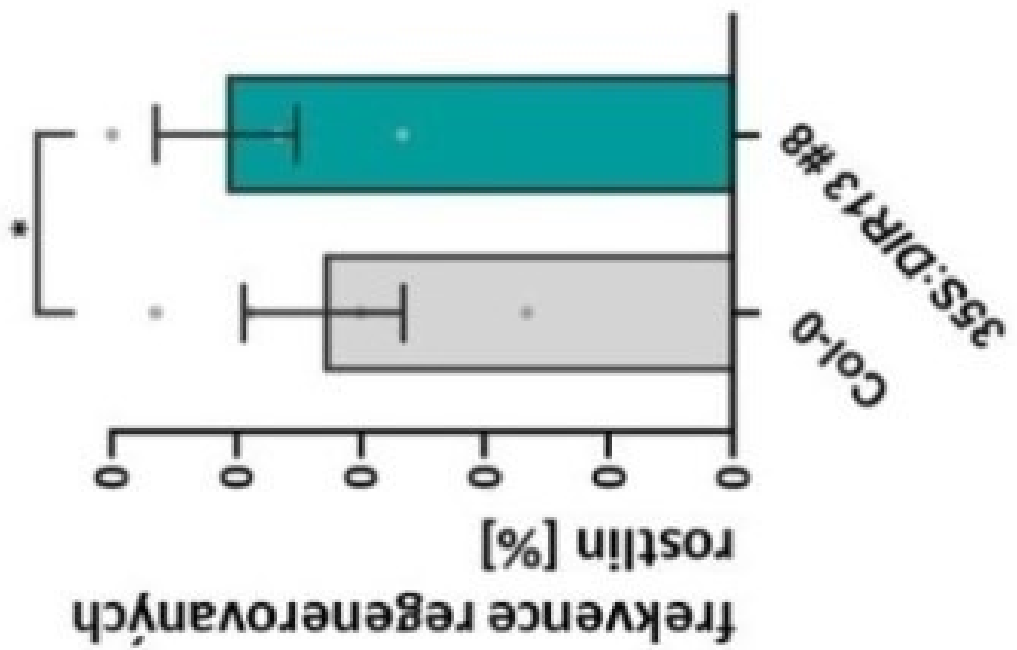
Obr. 9A



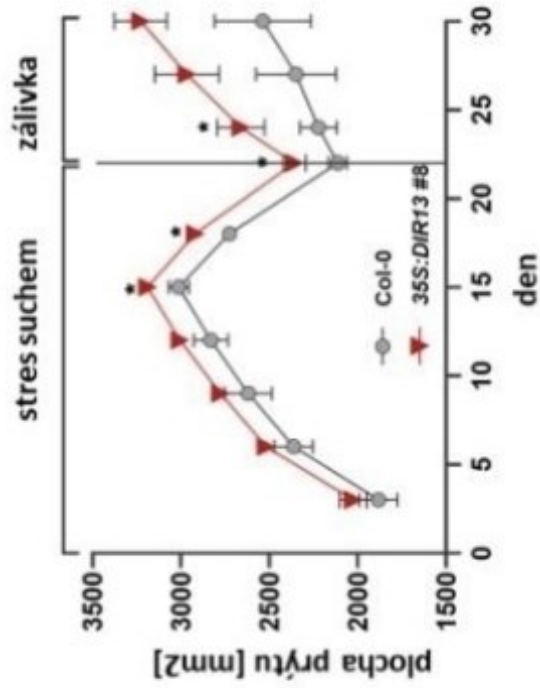
Obr. 9 D



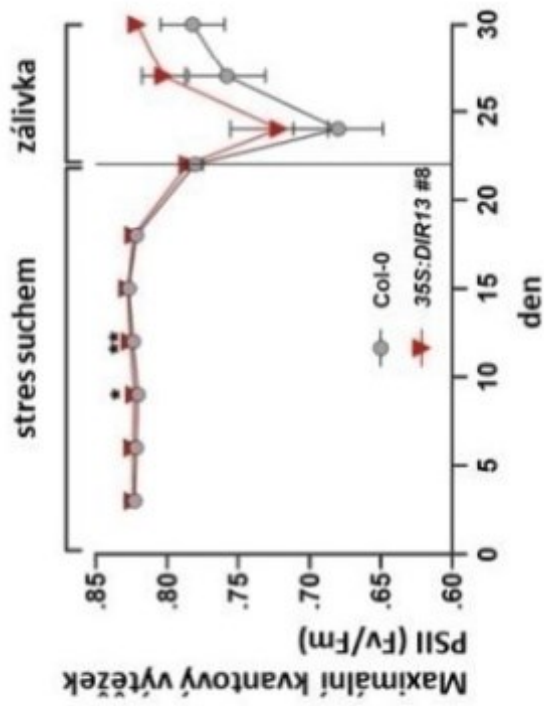
Obr. 9B



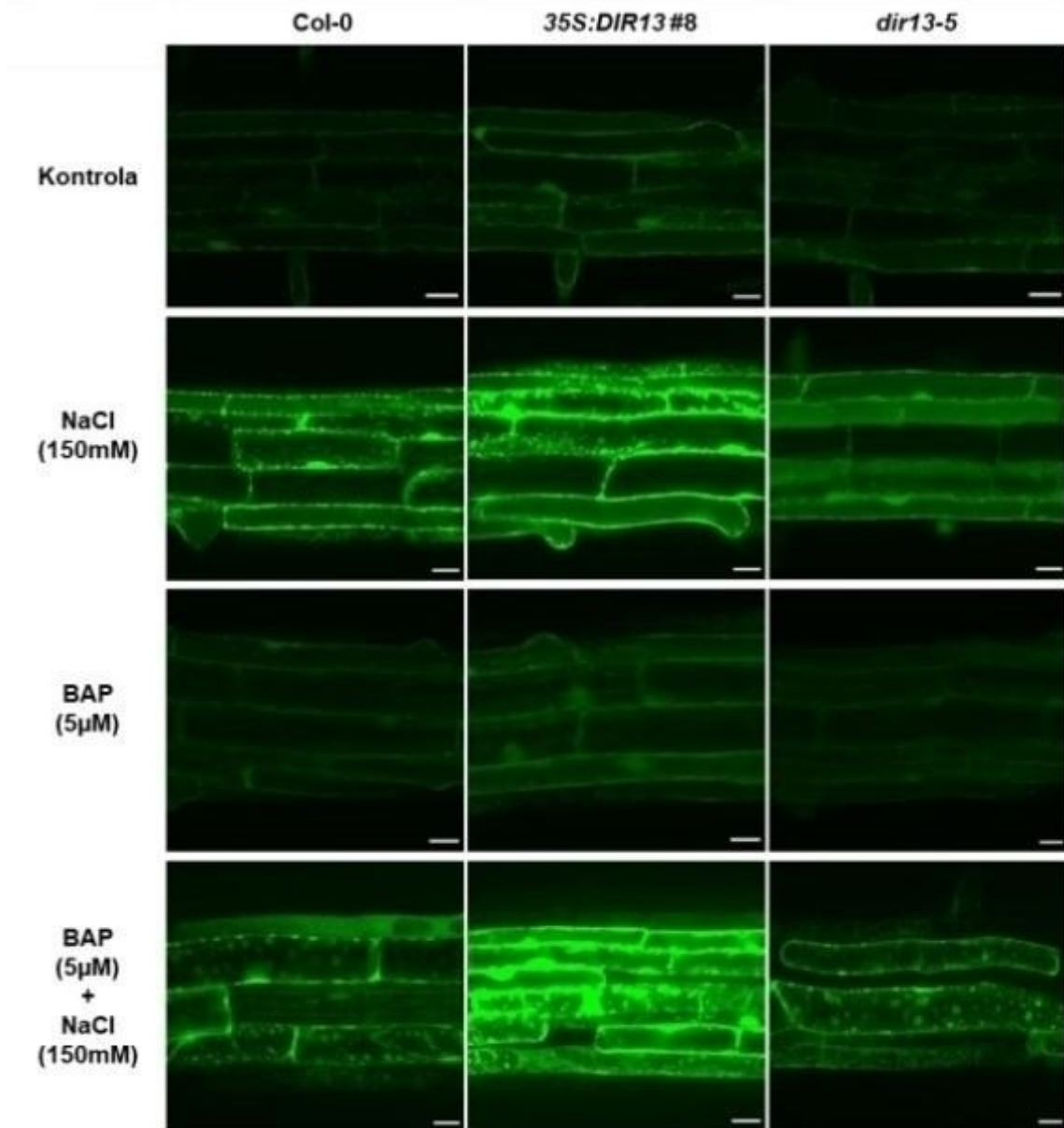
Obr. 9C



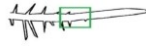
Obr. 9E



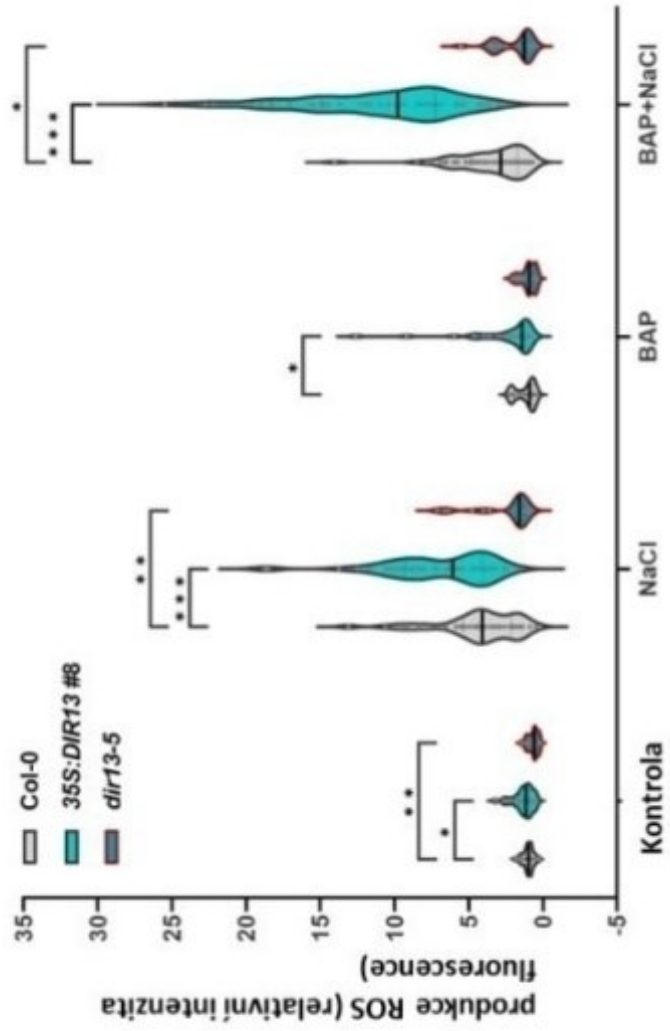
Obr. 9F



Obr. 10A



Obr. 10B



Obr. 10C