

**UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI**

**Přírodovědecká fakulta**

**Laboratoř růstových regulátorů**



**Editace genu *Hverf* u jarního ječmene**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

<b>Autor:</b>	<b>Lucie Šidlíková</b>
<b>Studijní program:</b>	<b>B1501 Experimentální biologie</b>
<b>Studijní obor:</b>	<b>Experimentální biologie</b>
<b>Forma studia:</b>	<b>Prezenční</b>
<b>Vedoucí práce:</b>	<b>Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph. D.</b>
<b>Termín odevzdání práce:</b>	<b>2020</b>

## **Bibliografická identifikace**

Jméno a příjmení autora	Lucie Šidlíková
Název práce	Editace genu <i>Hverf</i> u jarního ječmene
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Laboratoř růstových regulátorů
Vedoucí práce	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2020
Abstrakt	<p>Transkripční faktory (TF) Ethylene Responsive Factors (ERF) regulují genovou expresi genů a zapojují se do růstu a vývoje rostliny. Tyto TF působí jako regulátory odezvy na biotické a abiotické stresy.</p> <p>V praktické části byla pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i> provedena transformace nezralých zygotických embryí jarního ječmene odrůdy Golden Promise. Metoda CRISPR/Cas byla použita pro vyvolání mutace genu <i>erf</i>. Pomocí PCR byla ověřena přítomnost transgenů u rostlin v T0 generaci.</p>
Klíčová slova	Jarní ječmen, transformace, CRISPR/Cas, <i>erf</i>
Počet stran	57
Počet příloh	0
Jazyk	Český

## **Bibliographical identification**

Author's first name and surname	Lucie Šidlíková
Title of thesis	Gene-editing of <i>Hverf</i> in spring barley
Typ of thesis	Bachelor
Departement	Laboratory of Growth Regulators
Supervisor	Ing. Ludmila Ohnoutková, Ph.D.
The year of presentatiton	2020
Abstract	<p>The transcription factors (TF) Ethylene Responsive factors (ERF) regulate the gene expression and they engage in the growth and development of a plant. These TF act as controllers of the response to biotic and abiotic stress.</p> <p>In the practical part a transformation of the immature zygotic embryos of <i>Hordeum</i> of the Golden Promise species has been performer using the <i>Agrobacterium tumefaciens</i>. The metod CRISPR/Cas has been used in order to provoke the mutation of the gene <i>erf</i>. Via PCR the presence of transgenes in the plans of T0 generation has been verified.</p>
Keywords	Barley, transformation, CRISPR/Cas, <i>erf</i>
Number of pages	57
Number of appendices	0
Language	Czech

Prohlašuji, že jsem předloženou bakalářskou práci vypracovala samostatně pod vedením  
Ing. Ludmily Ohnoutkové, Ph.D. a za použití literatury, která je uvedena v seznamu.

V Olomouci dne .....

.....

Lucie Šidlíková

### **Poděkování**

Chci poděkovat vedoucí mé bakalářské práce Ing. Ludmile Ohnoutkové, Ph.D. za odborné vedení, dohled a cenné rady při vypracovávání bakalářské práce. Děkuji také Mgr. Tomáši Vlčkovi, Ph.D. za pomoc během experimentální části práce.

# Obsah

Seznam zkratek .....	8
1 ÚVOD .....	11
2 CÍLE PRÁCE .....	12
3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY .....	13
3.1 Ječmen setý ( <i>Hordeum vulgare</i> ) .....	13
3.2 Genové inženýrství .....	14
3.2.1 Plazmidy .....	15
3.3 Transformace rostlin pomocí <i>A. tumefaciens</i> .....	16
3.4 Systém CRISPR/Cas9 .....	18
3.5 Transkripční faktory .....	23
3.5.1 Ethylene Response Factor (ERF) .....	24
4 MATERIÁL A METODY .....	27
4.1 Přístroje .....	27
4.2 Použité chemikálie a roztoky .....	27
4.3 Rostlinný materiál .....	29
4.4 Metody .....	30
4.4.1 Sterilizace a izolace nezralých zygotických embryí .....	30
4.4.2 Transformace <i>A. tumefaciens</i> , příprava inokula .....	30
4.4.3 Selektce transformovaných rostlin .....	31
4.4.4 Vektory .....	32
4.5 Kultivační média .....	34
4.5.1 Složení kultivačních medií .....	35
4.6 Izolace genomické DNA z listů rostlin .....	36
4.6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA ....	36
4.7 Polymerázová řetězová reakce .....	37
4.8 Analýza PCR produktů, elektroforéza .....	40

5 VÝSLEDKY .....	41
5.1 Transformace rostlin ječmene odrůdy Golden Promise.....	41
5.2 Izolace DNA.....	42
5.3 PCR analýza transgenních rostlin .....	43
5.3.1 Detekce genu <i>sgRNA</i> u rostlin T0 generace jarního ječmene.....	43
5.3.2 Detekce genu <i>Cas</i> u rostlin T0 generace jarního ječmene.....	44
5.3.3 Detekce genu <i>Hpt</i> u rostlin T0 generace jarního ječmene .....	46
6 DISKUZE .....	47
7 ZÁVĚR.....	49
Seznam použité literatury .....	50

## Seznam zkratek

2,4 -D	kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová
<i>A. tumefaciens</i>	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>
ABA	kyselina abscisová
AGL1	kmen <i>A. tumefaciens</i>
AP2/ ERF	APETELA2/ETHYLENE RESPONSE FACTOR
BAP	6-benzylaminopurin
bp	párů bází
CaMV (Cauliflower mosaic virus)	CaMV promotor
Cas	CRISPR asociovaná nukleáza
<i>cas</i> geny	CRISPR associated
CI	kalus indukční médium
<i>COR</i>	geny indukované chladem
CRISPR	krátké pravidelně rozmístěné palindromatické repetice
crRNA	CRISPR RNA
DBD (DNA binding domain)	doména vázající se na DNA
dCas	nuclease deficit Cas9
ddH <sub>2</sub> O	destilovaná voda
Dicamba	2-methoxy-3,6-dichlorobenzoová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
DREB	DEHYDRATATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING protein
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EB pufr	Edwardsovo extrakční činidlo
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
ERF	Ethylene Response Factor
ET	rostlinný hormon etylen
GMO	geneticky modifikovaný organismus
gRNA (guide RNA)	navádějící RNA
HDAC	histon deacetyláza
HLH	helix-loop-helix



<i>Hpt</i>	gen kódující hygromycin fosfotransferázu
HR	homologní rekombinace
HTH	helix-turn-helix
<i>KanR</i>	gen rezistence proti antibiotiku kanamycin
kb	Kilobáze
LB	levý okraj
miRNA	mikroRNA
mRNA (messenger RNA)	mediátorová RNA
MS médium	Murashige a Skoog – médium pro tkáňové kultury
NHEJ	nehomologní spojení konců
<i>Npt</i>	gen kódující neomycin fosfotransferázu
OD	optická denzita
ori	replikační počátek
PAM (protospacer adjacent motif)	motiv přiléhající k protospaceru
PCR	polymerázová řetězová reakce
pre-crRNA	prekursor CRISPR RNA
primer F	forward primer
primer R	reverse primer
RB	pravý okraj
RNA	ribonukleázová kyselina
RNáza	Ribonukleáza
rpm (revolution per minute)	otáčky za minutu
SDS	dodecylsírán sodný
sgRNA (single guide RNA)	navádějící RNA
TAE pufr	Tris-acetát-EDTA pufr
TALE	efektor transkripčních faktorů
TALLEN	nukleáza efektorů transkripčních faktorů
T-DNA	transferová DNA
TF	transkripční faktor
Ti plazmid	tumor indukující plazmid
tracrRNA	transaktivační crRNA
ubi	ubiquitinový promotor

<i>vir</i>	gen kódující protein odpovědný za virulenci
ZF	zinkový prst
ZFN	nukleáza zinkového prstu

# 1 ÚVOD

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) patří mezi nejvýznamnější a nejstarší hospodářské plodiny a zároveň patří mezi jednu z prvních domestikovaných a cíleně pěstovaných plodin. Díky výživově bohaté obilce je využíván pro krmné a potravinářské účely, především pro výrobu sladu. Z důvodu širokého využití této plodiny je nutno stále zlepšovat její vlastnosti. Mezi hlavní šlechtitelské cíle patří výnos, odolnost vůči poléhání a odolnost vůči biotickému i abiotickému stresu.

Zlepšovat vlastnosti rostlin nám mohou umožňovat metody genového inženýrství, díky kterým můžeme cíleně vnášet určitý úsek cizorodé DNA do hostitelského organismu. Pomocí těchto metod vzniká transgenní organismus s novými vlastnostmi, který je schopný např. odolávat biotickým, abiotickým stresům. Jedna z nepřímých metod transformace genů je metoda pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (*A. tumefaciens*). Tato bakterie má schopnost přenášet určitý úsek DNA (T-DNA) plazmidu indukujícího nádor do jádra infikovaných buněk, kde je včleněn do genomu hostitele.

Do růstu a vývoje rostlin jsou zapojené transkripční faktory Ethylene Response Factors (ERF), které regulují genovou expresi genů. Působí jako regulátory odezvy na biotické a abiotické stresy. Funkce těchto transkripčních faktorů nebyla dosud u rostlin zcela objasněna.

Vyvolání mutace regulačního genu *erf* pomocí programovatelných nukleáz CRISPR/Cas9 by pomohlo objasnit funkci tohoto genu. Mechanismus CRISPR/Cas9 byl poprvé objeven u bakterií a archeí. Jedná se o adaptivní imunitní systém vůči DNA či RNA virům, který je v posledních pěti letech intenzivně využíván k vyvolání cílených změn.

Cílem bakalářské práce je provést transformaci rostlin jarního ječmene odrůdy Golden Promise a pomocí technologie CRISPR/Cas vyvolat mutaci genu *erf*. Jedná se o gen, u kterého se předpokládá zapojení v regulaci zrání a klíčení semen. Transgenní rostliny budou použity k objasnění funkce tohoto genu exprimovaného v rané fázi klíčení.

## 2 CÍLE PRÁCE

Vypracovat literární rešerši na téma bakalářské práce.

Cílem bakalářské práce je provést transformaci rostlin jarního ječmene, u kterých bude pomocí technologie CRISPR/Cas, vyvolána mutace genu *erf*.

Připravit rostlinný materiál pro transformaci, odvodit *in vitro* kulturu.

Provést transformaci nezralých zygotických embryí jarního ječmene pomocí *A. tumefaciens*.

Během kultivace *in vitro* stimulovat indukci kalusu, provádět selekci a regeneraci rostlin.

Regenerované rostliny převést z *in vitro* do *in vivo* podmínek a pomocí metod molekulární biologie provést jejich genotypizaci.

## 3 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

### 3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) je samosprašná, jednoděložná, jednoletá obilnina patřící do řádu lipnicotvarých (*Poales*), čeledi lipnicovité (*Poaceae*) a rodu *Hordeum*. Rod *Hordeum* zahrnuje 32 druhů a 45 taxonů (Bothmer a kol., 1991). Jedním nich je ječmen setý (*Hordeum vulgare*), který je zástupcem kulturního druhu. Ječmen setý je diploidní ( $2n = 2x = 14$ ) rostlina s velikostí genomu 5,1 Gb a s velkými cytologickými odlišnými chromozomy (Gozukirmizi a Karlik, 2017; Kleinhofs a Graner, 2001). Ječmen dělíme podle uspořádání klasu na dvouřadý a šestiřadý a dle způsobu pěstování na jarní a ozimý. Rozdílem mezi těmito formami je výnos, který je u jarního ječmene o 30 % nižší (Špunar a kol., 2002). Ječmen je obilnina a je tedy hospodářsky i nutričně důležitou rostlinou světa. Ječmen se řadí na čtvrté místo v žebříku nejpěstovanějších plodin, po rýži, kukuřici a pšenici (FAO, 2019).

Jarní ječmen má dutý stonek (tzv. stéblo) se čtyřmi až osmi kolénky. Stéblo je 80 až 130 cm vysoké. Kořeny jsou velmi jemné, svazčité, rostoucí až do hloubky 30 cm. Z podzemních uzlů kořeny tvoří boční větve, tzv. odnože. Listy jsou střídavé, pravotočivé, umístěné ve dvou řadách nad sebou s malým jazýčkem a čárkovitou čepelí. Květenství je uspořádáno do klasu a plodem je obilka. Plně vyztálá obilka obsahuje až 14 % vody. Obilka je složena ze tří částí: obalu, endospermu a embrya. Ječmen jarní je málo náročný na teplotu a vláhu, ale velmi náročný na půdní podmínky s rozmezím pH 6,2 až 7,2. Vhodnou půdou pro pěstování je černozem a hnědozem. Vzhledem ke krátké vegetační době a slabému kořenovému systému citlivě reaguje na stresové podmínky (Zimolka, 2006).

Jarní ječmen je také důležitý modelový organismus jednoděložných rostlin, který je využíván pro vědecké účely. Prostřednictvím transgenozy jsou studovány funkce jednotlivých genů, intenzivně je využívána mutageneze.

## 3.2 Genové inženýrství

Genové inženýrství, genetické modifikace, je vědní obor zabývající se vývojem a aplikací vědeckých metod, které umožňují cílené vnesení určitého úseku cizorodé DNA do hostitelského organismu za účelem pozměnit jeho genetickou výbavu a vytvořit tak modifikované, životaschopné transgenní organismy (Somnath, 2016).

Účelem transgenozy je zlepšení vlastností daného organismu, např. odolností. Cílem transformace může být také produkce rekombinantních proteinů, vakcín, zvýšení esenciálních aminokyselin, nebo zvýšení obsahu určitých metabolitů. Prostřednictvím genového inženýrství můžeme zlepšovat agronomické vlastnosti hospodářských plodin, tak i zlepšovat nutriční hodnoty plodin (Ondřej a Drobník, 2002)

Výnos obilovin může být velmi výrazně snížen kvůli abiotickým a biotickým faktorům. Hospodářské plodiny mohou být vystaveny zvýšené salinitě či houbovým nebo bakteriálním patogenům (Butt a kol., 2018). Pro vznik geneticky modifikovaného organismu (GMO) vnášíme do vektoru zájmový gen, který nám zajistí požadovanou vlastnost u vybraného organismu (Ondřej a Drobník, 2002).

Celý proces je složen z několika na sebe navazujících kroků: tvorba konstruktů (rekombinantní DNA), transformace rostliny do genomu jedné buňky, regenerace rostliny. Rekombinantní DNA, která vzniká spojením DNA sekvencí z různých organismů, nejčastěji však z bakterie do rostliny. Rekombinantní plazmid se následně transformuje do hostitelského organismu. Organismus, který získal rekombinantní DNA označujeme jako transgenní neboli geneticky modifikovaný organismus (GMO) (Snustad a Simmons, 2017).

V České republice je nakládání s GMO řízené zákonem č. 78/2004 Sb. Za GMO považujeme organismus, který je schopný se rozmnožovat. Za účelem ochrany zdraví člověka a zvířat, životního prostředí a biologické rozmanitosti je nakládání s geneticky modifikovanými organismy a genetickými produkty umožněno pouze na základě těchto právních předpisů. Za genetický produkt je považováno vše, co obsahuje jeden a více GMO a bylo vyrobeno či jinak opatřeno bez ohledu na stupeň zpracování a je stanoveno k uvedení na trh (Ministerstvo životního prostředí, 2012).

### 3.2.1 Plazmidy

Pro přenos genetické informace mezi jednotlivými organismy se v genovém inženýrství využívají jako vektory–plazmidy. Jedná se o malé kruhové dvouvláknové molekuly DNA (Vondrejs, 2011). Přirozeně plazmidy mají bakterie nebo kvasinky (Del Solar a kol., 1998).

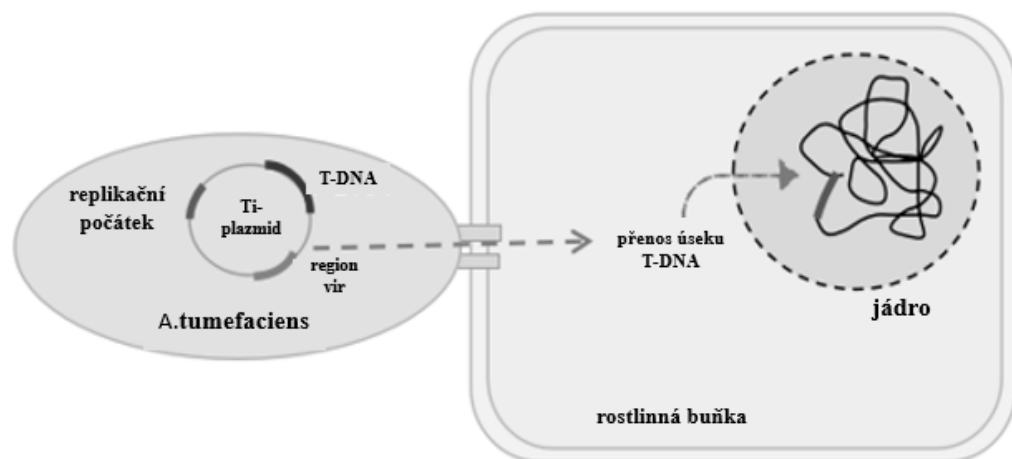
Každý plazmid musí obsahovat replikační počátek (*ori*), který zajišťuje autonomní replikaci. Jedná se o úsek DNA, bohatý na AT, který rozpozná enzym DNA polymeráza hostitelské buňky. Od tohoto místa začíná replikace. Transformace neproběhne u všech použitých buněk, proto je nutné použít selekční marker, který umožní rozlišit transgenní rostliny. Selekční marker je gen, vložený do transformovaného vektoru, kódující protein, který dává transgenní rostlině určitou výhodu, takže je transgenní rostlina schopna regenerovat na selekčním médiu na rozdíl od rostlin u kterých transformace neproběhla. Jako selekční markery se nejčastěji používají geny pro rezistenci k antibiotiku. Nejčastěji používaným selekčním markerem je *Hpt*, gen kódující hygromycin fosfotransferázu nebo *nptII* gen, který poskytuje transgenní rostlině rezistenci k neomycinu (Hiei Y. a kol., 2014).

Součástí plazmidu jsou unikátní místa v sekvenci DNA, která jsou rozpoznávána pomocí enzymů, restrikčních endonukleáz. Tato místa nazýváme restrikční místa a umožňují vložení cizí DNA. Pro vložení zájmového úseku DNA do plazmidu je nutné zájmovou DNA štěpit stejnou restrikční endonukleázou, která štěpí i restrikční místa plazmidu. Řetězce plazmidové a vkládané DNA se spojují na základě komplementarity bází. Pokud plazmidový vektor obsahuje gen, který chceme exprimovat musí plazmid obsahovat před zájmovým genem signální promotorové sekvence (promotor) pocházející z rostlin a terminační signály transkripce, které rozpozná RNA polymeráza. Pro integraci plazmidů do bakterií je využívána schopnost bakterií přijmout cizorodou DNA. Bakterie využívají pro vložení cizorodé DNA konjugaci, transdukci a transformaci (Brown, 2007; Low a kol., 2017).

### 3.3 Transformace rostlin pomocí *A. tumefaciens*

Transformace rostlin je proces vnášení cizorodého genetického materiálu do rostlinného genomu, může být provedena pomocí přímých nebo nepřímých metod. Mezi nejčastěji používané přímé metody patří mikroprojektilový přenos DNA (particle bombardment) a nepřímé metody transformace pomocí *A. tumefaciens*. Podstatou mikroprojektilovým přenosu je vysokorychlostní vstřelení plazmidové DNA do intaktní buňky. Velmi často jsou využívány mikročástice wolframu nebo zlata, na kterých je nukleová kyselina vysrážena pomocí  $\text{CaCl}_2$  a vpravena do buněk rostlin za přetlaku helia (Li a Gray, 2005; Ismagul a kol., 2018). Další účinnou metodou je elektroporace, která využívá pro přenos DNA do buňky elektrické pulsy, které vytvoří v membráně póry (Shigekawa a Dower, 1988).

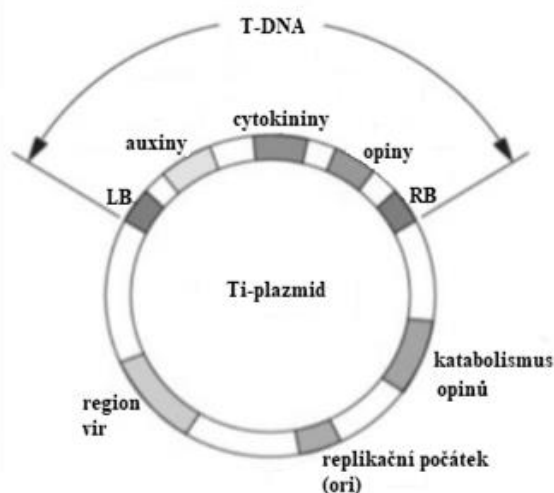
*A. tumefaciens* je gramnegativní, nefermentující, aerobní patogenní bakterii patřící do čeledi *Rhizobiaceae*. *A. tumefaciens* je tyčinkovitého tvaru velikosti od 0,6 do 3  $\mu\text{m}$ . Má jeden až šest bičíků rozmístěných na povrchu (peritricha). Existuje samostatně nebo v párech (Collins, 2001). Jedná se o bakterii, která způsobuje v případě poranění buněčné stěny tvorbu krčkových nádorů u dvouděložných rostlin. Během infekce dochází k přenosu transferové DNA (T-DNA), která je součástí velkého tumor indukujícího (Ti) plazmidu, do genomu rostlinné buňky (Gelvin, 2003) (obr. 1).



Obr. 1. Mechanismus transformace rostlin zprostředkované *A. tumefaciens* (převzato a upraveno podle Newell, 2000).



T-DNA obsahuje také geny kódující proteiny, které se podílí na biosyntéze rostlinných hormonů a opinů. Ti-plazmid obsahuje virulentní region *vir* o velikosti 30 kb. Oblast *vir* kóduje vir proteiny potřebné k vyštěpení, přenosu a začlenění T-DNA do genomu rostlinné buňky. Oblast *vir* není transferována do genomu hostitele (De la Riva, 1998; Li a Gray, 2005). Součástí T-DNA jsou geny kódující proteiny pro syntézu rostlinných hormonů a opinů (obr. 2.).



Obr. 2. Ti-plazmid a jeho části (převzato a upraveno podle Glick a kol., 2010).

Důležitou vlastností je totipotence rostlinných buněk. Jedná se o schopnost každé dílčí buňky se diferencovat v jakoukoli buňku dospělé rostliny. Jedna buňka může dát vznik nové rostlině (Pavlová, 2005).

Pro použití *A. tumefaciens* jako biotechnologického nástroje se používají kmeny bakterie s upraveným Ti-plazmidem. T-DNA je v rámci Ti-plazmidu vymezena okrajovými sekvencemi (LB a RB). Geny pro auxiny a cytokininy a biosyntézu opinů jsou z části T-DNA odstraněny. Na místo onkogenních genů je mezi okrajové sekvence vložen zájmový gen (Gelvin, 2003). Důležitou složkou je selekční marker, gen pro rezistenci k antibiotiku (kanamycin) nebo herbicidu, který umožňuje růst pouze transformovaných buněk. Do vektoru může být vložen reportérový gen kódující protein, jehož enzymatická aktivita umožňuje detekci úspěšné transformace. Nejčastěji používaným reportérovým genem je *gus* gen kódující enzym  $\beta$ -glukuronidázu nebo GFP (zelený fluorescentní protein) (Ondřej a Drobník, 2002).

Aby zájmový gen byl transkribován musí být před zájmovým genem promotor pocházející z rostlin, nejčastěji CaMV 35S (cauliflower mosaic virus, CaMV) nebo ubiquitinový promotor s terminační sekvencí, kterou rozpozná RNA polymeráza. Pro integraci plazmidů do bakterií je využívána schopnost bakterií přijmout cizorodou DNA.

Úsek T-DNA je během procesu transformace pomocí *A. tumefaciens* přenesen do genomu rostlinné buňky, které dodává nejčastěji pozitivní vlastnosti (odolnost vůči nepříznivým podmínkám, zaselování, suchu nebo odolnost vůči herbicidům) (Ondřej a Drobník, 2002).

První transgenní obilovinou připravenou pomocí mikroprojektilového přenosu byla pšenice (Vasil a kol., 1992). O dva roky byl později byl mikroprojektilovým přenosem připraven první transgenní ječmen (Wan a Lemaux, 1994). V roce 1997 byla provedena první transformace nezralých zygotických embryí ječmene pomocí *A. tumefaciens* (Tingay a kol., 1997). Transformace ječmene metodou *A. tumefaciens* je v současné době nejrozšířenější metodou a může být ovlivněna odrůdou, kultivačními podmínkami nebo výběrem zvoleného vektoru. Nejčastěji používanou odrůdou je Golden Promise (Ji a kol, 2013).

### 3.4 Systém CRISPR/Cas9

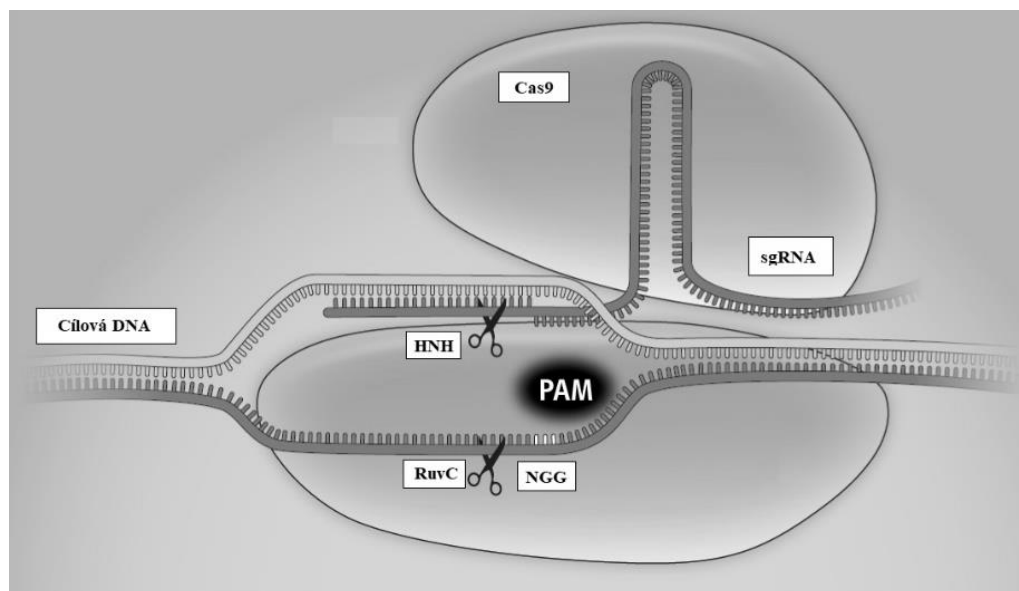
Genom jednotlivých organismů může být pozměněn různými metodami. Pomocí nových technologií můžeme vkládat nebo odstraňovat různě dlouhé sekvence genů v genomu (Abdallah a kol., 2015). Editaci nám umožňuje začlenění cizí DNA do genomu rostlinné buňky s následnou mutací genu. Pro editaci genomu využíváme místně specifické programovatelné nukleázy, kterými lze vytvářet různé druhy mutací. Mezi specifické programovatelné nukleázy patří systém CRISPR. U mnoha prokaryotických organismů byl objeven CRISPR lokus, který je složen z krátkých pravidelně rozmístěných palindromických repetitivních sekvencí (CRISPR), z anglického Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats, které jsou dlouhé 21 až 37 nukleotidů. Mezi těmito krátkými repetitivními sekvencemi se nachází variabilní sekvence nazývané spacers (cizorodé integrované fragmenty), získané od RNA nebo DNA virů, které jsou přibližně stejně dlouhé jako repetitivní sekvence. V roce 2002 byly nalezeny geny, které jsou v genomu asociovány s CRISPR repetitivními sekvencemi. Jedná se o *cas* geny (CRISPR associated), které obklopují repetitivní sekvence a jejich funkce je částečně spojená s CRISPR repetitivními sekvencemi (Jansen a kol., 2002).

Byly popsány tři hlavní typy CRISPR/Cas systému (I-III) (Makarova a kol., 2011b). V následujících letech bylo osekvenováno mnoho genomů a analyzován velký počet CRISPR lokusů různých typů, z tohoto důvodu bylo v roce 2015 zavedeno rozdělení do dvou tříd, několika typů a subtypů (Makarova a kol., 2015). K tomuto rozdělení byly o dva roky později přidány dva typy. V roce 2020 byl systém CRISPR/Cas rozdělen do dvou tříd. Do první třídy patří nejběžnější systém typu I a typu III, které jsou velmi často pozorovány u archeí. Třída I. je složena z vícepodjednotkové crRNA efektorovým komplexem a obsahuje typ I. a typ III CRISPR/Cas proteinů. Třída II. je složena z jediné podjednotky crRNA efektorového modulu, a to typem II, který je charakteristický proteinem Cas9. Nejlépe prostudovaný a používaný je typ II (obr. 3) (Makarova a kol., 2020).

Systém CRISPR/Cas je nový nástroj využívaný v genovém inženýrství, který využívá adaptivní imunity, která prokaryotickým organismům slouží jako ochrana před DNA a RNA virem při opakované infekci. Bakteriofág vnese svou DNA nebo RNA do prokaryotické buňky a tímto způsobem ji infikuje. Jedním ze způsobů, jak se bakteriální buňka může virové infekci bránit je systém CRISPR (Cong a kol., 2013; Barrangou a kol., 2007). CRISPR systém se skládá z genů kódující enzymy, nejčastěji nukleáz, které přerušují vazby mezi nukleotidy a helikáz, které štěpí vodíkové vazby mezi dvěma vlákny a tím vlákna rozdělují. Mezi tyto enzymy patří Cas1 a Cas2, které tvoří komplex. Cas1 má hlavně nukleázovou a integrázovou aktivitu. Cas1 se podílí na přerušování vazby mezi nukleotidy, vystřihováním určitého úseku virové DNA a může vkládat nové spacery do CRISPR systému (Wiedenheft a kol., 2009; Nuñez a kol., 2014). Cas2 patří mezi endoribunukleázy, které mají RNázovou i DNázovou aktivitu a dokážou přerušovat vazby ve virové RNA (Beloglazova a kol., 2008; Nam a kol., 2012).

Komplex CRISPR/Cas9 vzniká spojením sgRNA s proteinem Cas9. Vlastností nukleázy Cas9 je přítomnost PAM-vázací domény, díky které rozpozná sekvenci PAM (protospacer adjacent motif) na cílové DNA (Anders a kol., 2014; Jinek a kol., 2014). Komplex proteinu Cas9 a sgRNA se při nalezení sekvence PAM váže na cílovou dvouřetězovou DNA. Molekula sgRNA může být vyrobena *in vitro* z templátu DNA. Komplex štěpí cílovou DNA sekvenci o velikosti 23 bp, která je složena z protospaceru (20 bp) a PAM, který je rozpoznán enzymem Cas9. Cas9 nukleáza je složena ze dvou domén, HNH domény a RuvC domény. Tento enzym provádí dvouvláknové zlomy na

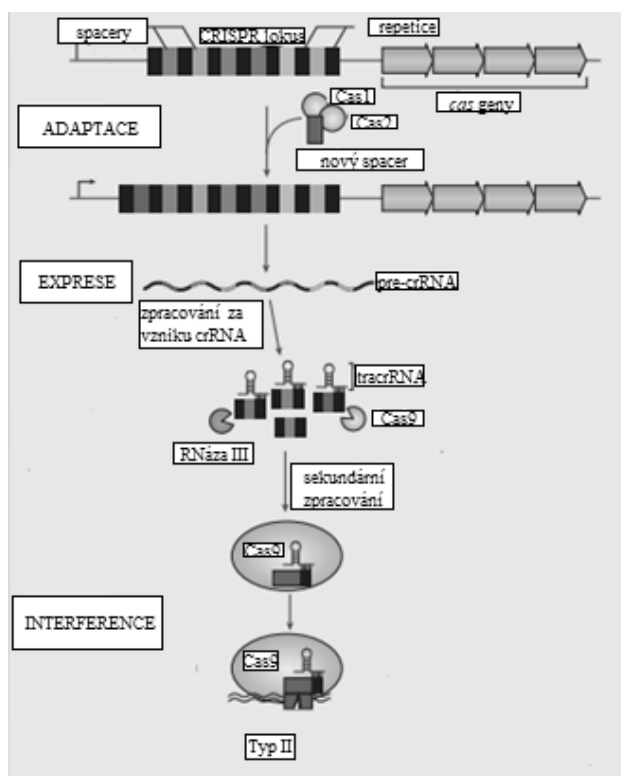
vláknech DNA (Jinek a kol., 2012). Doména HNH štěpí vlákno DNA komplementární k crRNA. Zatímco RuvC doména štěpí opačné vlákno dvouvláknové DNA. Cas9 nukleáza provádí vždy štěpení v místě, které je tři báze před PAM sekvencí. PAM sekvence může mít různé podoby podle CRISPR systému (Jinek a kol., 2012; Gasiunas a kol., 2012) (obr. 3). U *Streptococcus pyogenes* je motiv PAM sekvence NGG.



Obr. 3. Schéma editace genomu metodou CRISPR/Cas9 (převzato a upraveno podle Barrangou, 2014).

Mechanismus adaptivní imunity se skládá z adaptace, exprese a interference. Během adaptace je prokaryotní organismus napaden virem a dochází pomocí Cas proteinů k zabudování krátké sekvence (přibližně 20 bp), nazývané spacer DNA, do CRISPR oblastí genomu prokaryotického organismu. V případě opakovaného napadení prokaryotického organismu stejným virem během fáze exprese vzniká transkripce crRNA (CRISPR RNA) z pre-crRNA a syntetizují se Cas enzymy a vznikají nukleoproteinové komplexy Cas enzymů s crRNA. Poslední fází je interference, během které crRNA a Cas nukleáza jsou naváděny na invazivní vlákno DNA viru. U typu II CRISPR/Cas, molekula tracrRNA (transactivating crRNA) se naváže na CRISPR repetice, které jsou rozděleny pomocí enzymů Cas9 a RNázy III na malé fragmenty RNA. Každý z těchto segmentů obsahuje CRISPR sekvenci s navázanou tracrRNA a spacer z virového genomu. Technologie byla upravena spojením crRNA s tracrRNA do jedné molekuly chimérické sgRNA. Molekula sgRNA slouží jako naváděcí molekula na cílovou sekvenci DNA, která má být enzymem Cas9 rozštěpena (obr. 4) (Westra a kol., 2014; Jinek a kol., 2012; Deltcheva a kol., 2011).

Jak již bylo zmíněno, působením CRISPR/Cas systémů vznikají dvojitě zlomy na DNA, které jsou opravovány buněčnými mechanismy, čímž mohou vznikat různé mutace v DNA (Li a kol., 2013). Zlomy mohou být opraveny nehomologním spojením volných konců (NHEJ) či homologní rekombinací (HR). Opravný mechanismus nehomologním spojením volných konců může vést ke tvorbě mutací. Mutace mohou být zapříčiněné inzercí, substitucí nebo delecí požadovaného úseku. Mutace posunutím nebo vytvořením stop kodonu naruší čtecí rámec kódující sekvence a gen není exprimován (Sander a kol., 2014; Razzaq a kol., 2019). Další variantou použití CRISPR/Cas9 systému je umlčování či aktivace genů na transkripční úrovni. Systém využívá upraveného dCas9 (nuklease-deficient Cas9), který nese mutaci v doméně HNG i RuvC. Mutace mohou mít za následek deaktivaci nukleázové aktivity těchto domén za současného zachování DNA vazebných vlastností (Jinek a kol., 2012; Gasiunas a kol., 2012).



Obr. 4. Mechanismus systému CRISPR/Cas9, typ II. (převzato a upraveno z Westra a kol., 2014).

Pro editaci genomu kromě technologie CRISPR/Cas9 mohou být použité další typy specifických programovatelných endonukleáz, nukleázy zinkových prstů (ZFN) (Kim a kol., 1996) a transkripční aktivační efekторы (TALEN) (Kim a Kim, 2014). ZFN jsou endonukleázy skládající se ze dvou domén. Vazebná doména slouží k navázání na DNA. Restrikční doména slouží ke štěpení DNA za vzniku dvouvláknových zlomů DNA. Tato doména nemá specifickou sekvenci, proto je nutné nahradit vazebnou doménu vazebnými proteinovými komplexy. Vhodnými DNA vazebnými proteiny jsou Cys2-His2 zinkové prsty (ZF), které jsou schopné se vázat ke specifické sekvenci (Li a kol., 1992). ZF využívají restrikční enzym *FokI*, který obsahuje doménu pro vazbu a štěpení DNA. ZF jsou nejběžnějším DNA vazebným motivem u eukaryot. Každá jednotka ZF je tvořena  $\alpha$  – helixem a  $\beta$ -skládaným listem, mezi kterými se nachází zinečnatý kation. Technologii lze za přítomnosti vazebných motivů pro ZFN využít pro editaci jakéhokoliv genu. První úspěšná mutagenese rostlinného genomu metodou ZFN byla provedena na počátku 21. století u *Arabidopsis* (Lloyd a kol., 2005). Dále byla využita u tabáku i kukuřice (Townsend a kol., 2009).

Další technologií jsou efekторы transkripčních aktivátorů (TALE), které fungují jako transkripční faktory a vážou se na promotory genů rezistence a upravují expresi jednotlivých genů (Römer a kol., 2009). V TALE se často vyskytuje DBD (DNA binding domain), která je složena z homologních přímých repetit. Specifitu TALE určuje právě DBD. Technologie TALEN byla navržena připojením TALE ke štěpicí doméně *FokI*, stejně jako u ZFN. TALEN proteiny se skládají z domény pro sekreční signál typu III, která se nachází na N-konci. Na C-konci se nachází domény obsahující jaderný rozpoznávající signál, dále je přítomna aktivační doména a v neposlední řadě doména vážající se na DNA (Bogdanove a kol., 2011). Technologie TALEN byla použita k přípravě knock-out mutantů *Arabidopsis* a dále k získání rezistentní rýže k bakteriální infekci (Cermak a kol., 2011; Li a kol., 2012)

Díky jednoduchosti, účinnosti a rychlosti systému může být CRISPR využito pro tvorbu cílené mutace požadovaného genu téměř jakéhokoliv organismu. Pomocí této technologie je možné určit lokalizaci a funkci sekvencí DNA v genomu organismů (Minkenberg a kol., 2017; Duan a kol., 2016). Důležitým krokem technologie CRISPR/Cas9 je vytvoření jedinečné sgRNA expresní kazety. CRISPR systém v biotechnologiích má široké uplatnění hlavně u zemědělsky významných rostlin a plodin, jelikož při nestabilním nebo stresujícím prostředí, jako je salinita půdy, je nutné vytvořit

modifikované rostliny, které jsou schopny být adaptivnější vůči těmto podmínkám. Technologie byla využita jak u jednoděložných, tak dvouděložných rostlin. U rýže, která patří k velmi důležitým plodinám, byly získány delece bází, které zasáhly dva vzdálené lokusy na stejném chromozomu (Zhou a kol., 2014). Další modifikovanou rostlinou bylo rajče, u kterého bylo pozměněno 14 genů, jeden z nich zvyšoval produktivitu. U pšenice byl vyřazen gen *gasr7*, který ovlivňuje hmotnost zrna (Korotkova a kol., 2017).

### 3.5 Transkripční faktory

Velmi důležitou součástí, kterými rostlina během svého vývoje reaguje na abiotické nebo biotické stresy jsou transkripční faktory (TF), které se významným způsobem zapojují do procesu transkripce.

Během transkripce dochází k přepisu DNA do nukleotidové sekvence RNA. Na počátku transkripce dochází k rozvolňování dvoušroubovice DNA, kdy jeden z řetězců slouží jako templát pro syntézu RNA, která je určena komplementaritou bází. Volný ribonukleotid se páruje s deoxyribonukleotidem v DNA, poté je připojen k rostoucímu řetězci RNA. Přepis je uskutečněn pomocí RNA-polymeráz, enzymů, které přepisují DNA do RNA. Genová regulace je často regulována transkripční faktory (TF). TF jsou molekuly, které se váží na regulační sekvence a ovlivňují transkripci, ať už pozitivně (aktivátory) anebo negativně (represory) (Saleh a kol., 2013). Jsou schopné regulovat expresi genů – pro zvládnutí abiotického i biotického stresu u rostlin. TF pomáhají umístit enzym RNA–polymerázu na specifické místo v DNA, kde začíná transkripce (Alberts a kol., 2002)

Rostlinný genom obsahuje více genů pro TF než genomy jiných organismů, což rostlinám umožňuje rychlé přizpůsobení na měnící se podmínky v průběhu růstu (Pireyre a kol., 2015). Obsahují specifické funkční domény, primárně DNA-vazebnou doménu (DBD), která obsahuje sekvenční motiv, kterým se váže na DNA. Podle typu DBD existuje několik skupin TF, které mají základní motivy: helix-loop-helix (HLH), helix-turn-helix (HTH), zinc finger (ZF) a další unikátní domény transkripčních faktorů. Další doménou je aktivační doména, která slouží k interakci s dalšími TF. Některé TF mohou obsahovat ligand vazebnou doménu, která reaguje na vnější signály prostřednictvím interakce s hormony. TF rozdělujeme na obecné a specifické TF. Obecné jsou nutné pro iniciaci transkripce a zajišťují transkripci genu (Grünberg a kol., 2013; Sainsbury a kol.,

2015). Specifické TF jsou regulační proteiny, které zajišťují odpověď na vnější signály, rozpoznávají a váží se na specifické sekvence DNA (Allen a kol., 2015).

Transkripční faktory ovlivňují transkripci různými způsoby, dokáží přivolávat různé faktory remodelující chromatin, faktory modifikující chromatin (histon acetyltransferázy), přímo se vázat na enhancery (v případě aktivátorů jde o jejich rozpoznávané sekvence, tedy aktivátory zvyšují například frekvenci iniciace transkripce tím, že pomáhají tvorbě pre-iniciačního komplexu) nebo se vázat na silencery (vazebné sekvence represorů- molekuly, negativně ovlivňují genovou regulaci, tedy vypínají gen - potlačující transkripci; soutěží s vazebným místem pro aktivátor, přímo můžou ovlivňovat vytvořený pre-iniciační komplex aj.). Na konkrétní gen působí mnoho transkripčních faktorů a přes DNA-vazebnou doménu se váží na regulační sekvence na DNA (Alberts a kol., 2002).

### **3.5.1 Ethylene Response Factor (ERF)**

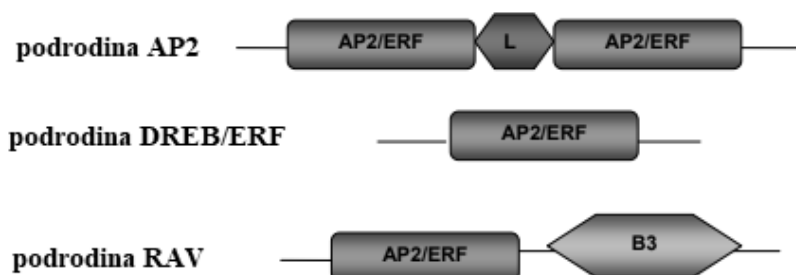
Rostliny musí během svého života odolávat nepříznivým podmínkám, které ovlivňují jejich existenci, růst či reprodukci. Mezi faktory abiotického stresu, které na rostlinu působí, patří vyšší koncentrace solí, extrémní teplota nebo nedostatek vody (Long a kol., 2019).

Mezi nejvýznamnější TF patří ERF z angl. ethylene response factor, který patří do rodiny TF AP2/ERF. Tyto TF se nachází jak v jednoděložných, tak dvouděložných rostlinách (Saleh a kol., 2013). Mnoho AP2/ERF faktorů jsou propojeny s fytohormony etylenem (ET) nebo kyselinou abscisovou (ABA) a pomáhají aktivovat geny na nich závislé i nezávislé (Xie a kol., 2019).

Rodina TF AP2/ERF je jedinečná pro rostliny a obsahuje konzervovanou doménu s 60 aminokyselinami, která tyto TF charakterizuje. Doména AP2/ERF byla původně studována a popsána u *Arabidopsis thaliana* a pojmenována APETELA2 (AP2)/ERF (Saleh a kol., 2013). U *Arabidopsis* jsou AP2/ERF definovány DNA-vazebnou doménou EREB z angl. Ethylene Responsive Element Binding Factor, která se skládá z 40–70 konzervovaných aminokyselin. Faktory rodiny AP2/ERF jsou podle vazebné domény rozděleny do čtyř podrodin: APETALA2 (AP2), RELATED TO ABSCISIC ACID INSENSITIVE3/VIVIPAROUS 1 (RAV), DEHYDRATATION-RESPONSIVE ELEMENT BINDING protein (DREB) (podskupina A1–A6) a ETHYLENE RESPONSIVE FACTOR (ERF) (podskupina V–X) (Xie a kol., 2019).



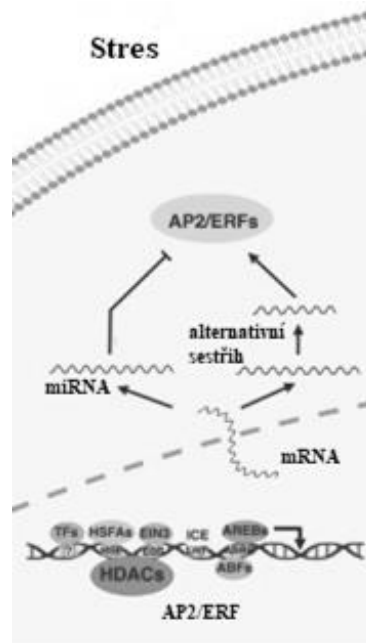
Členové podrodiny AP2 obsahují dvě domény AP2/ERF spojené linkerem o 25 aminokyselinách. Transkripční faktory RAV podrodiny obsahují jednu doménu AP2/ERF a doménu B3. Podrodiny DREB a ERF mají jednu doménu AP2/ERF (obr. 5).



Obr. 5. Struktura podrodin AP2, DREB, ERF a RAV (převzato a upraveno podle Saleh a kol., 2013).

Rodiny genů AP2/ERF jsou přítomny v rostlinách *Arabidopsis thaliana*, rýži, kukuřici i sóji. U ječmene jsou k dispozici omezené údaje o rodině genů AP2/ERF, jelikož výzkum nebyl příliš zaměřen na identifikaci a charakterizaci rodiny AP2/ERF (Guo a kol., 2016).

U mnohých cis-elementů bylo zjištěno, že jsou rozpoznány TF AP2/ERF. Velmi důležitým prvkem u *Arabidopsis* je prvek reagující na dehydrataci (DRE), který při suchu reguluje genovou expresi (Saleh a kol., 2013). Během stresu jsou geny AP2/ERF indukované přes cis-elementy v oblasti promotoru. Mimo toho je transkripce genu AP2/ERF regulována i histon deacetylázami (HDAC). Alternativní sestřih (splicing) pomáhá k vytvoření funkční AP2/ERF mRNA. Za normálních podmínek mají proteiny AP2/ERF negativní vliv na růst a vývoj rostliny, proto musí být eliminované. Jednou z možností je regulace pomocí microRNA, která má schopnost blokovat translaci mRNA pro AP2/ERF (AP2/ERF mRNA) (obr. 6). Mezi další možnosti regulace patří regulace pomocí protein kináz E3 ubiquitin ligáz a následná proteozomální degradace; fosforylace pomocí protein kináz (Xie a kol., 2019).



Obr. 6. Obecné regulační mechanismy transkripčních faktorů rodiny AP2/ERF (převzato a upraveno podle Xie a kol., 2019).

Členy podrodin DREB a ERF jsou proteiny vázající se na definované cis-regulační sekvence popsané v mnoha genech, jedná se o geny asociované s patogenezí (*PR*), geny indukované chladem (*COR*) nebo abundantní geny pozdní embryogeneze (*LEA*). Za normálních podmínek nejsou exprimované geny *CBF* ani *COR*. Ovšem během působení chladu (4 °C) exprese *CBF* genů je indukována velmi brzy, následovaná *CBF* regulovanými cílovými geny (Saleh a kol., 2013).

Ačkoli mnoho AP2/ERF hraje roli v stresově specifické regulační síti, schopnost AP2/ERF reagovat na více podmětů a regulovat více typů stresů jim dovoluje vytvořit komplexní regulační síť pro odpověď na stres. Při abiotickém stresu mohou být některé AP2/ERF indukovány rychle a nepřetržitě, jiné mohou reagovat na dlouhodobější stres, což indukuje jejich možné vzájemné ovlivňování jejich funkce. Avšak zatím není znám podrobný mechanismus, jakým odlišné formy AP2/ERF spolupracují anebo na sebe protichůdně působí (Xie a kol., 2019).

## **4 MATERIÁL A METODY**

### **4.1 Přístroje**

Analytické váhy, Bel-Engineering

Centrifuga 5418, Eppendorf

Centrifuga BR4i, Jouan

Elektroforetický napájecí zdroj PowerPac™ Baci, Bio-RAD

Elektroforetická komora Wide Mini-Sub Cell GT cell, Bio-RAD

Inkubator ES-20, Biosan

Laminární box-Gelaire flow general company

Magnetická míchačka, POLY VARIOMAG

Minicentrifuga M-6, Boeco

pH metr 526, Sigma-Aldrich

Předvážky BWL-51, Boeco

Spektrofotometr DS-11, DeNovix

Termoblok Bio TDB-100, Biosan

Termocycler T100™, Bio-RAD

UV-transiluminátor G: BOX iChemi XR UV/White Light, SYNGENE

### **4.2 Použité chemikálie a roztoky**

Agarosa UltraPure™ Agarose, ThermoFisher, Invitrogen (kat. č. 16500500)

Antibiotikum Hydromycin (50 mg/l), Duchefa (kat. č. H0192)

Antibiotikum Neomycin, Duchefa (kat. č. M0135)

Antibiotikum Timentin (160 mg/l), Duchefa (kat. č. T0190)

Deionizovaná voda pro PCR (Water PCR reagent), Sigma-Aldrich (kat. č. W1754)

DNA/RNA free H<sub>2</sub>O

Dusičnan amonný, Sigma-Aldrich (kat. č. A3795)

Ethanol 70% a 75%, Sigma-Aldrich (kat. č. 46139)

EDTA (Serva, kat. č. 39760)

Ethidium bromid 10 mg/ml, Sigma-Aldrich (kat. č. E1510)

Fytohormon Dicamba (2 mg/l), Sigma-Aldrich (kat. č. D5417)

Fytohormon 2,4 -D, Duchefa (kat. č. D0911)

Fytohormon BAP, Sigma-Aldrich (kat. č. B3408)

Glutamin, Duchefa (kat. č. 65763)

Hypochlorid sodný 6%

Kasein hydrolyzát, Duchefa (kat. č. C1301)  
Maltóza, Duchefa (kat. č. M0811)  
Marker molekulové hmotnosti HyperLadder™ 50–2000 bp (HyperLadder II), Bionline (kat. č. BIO 33054)  
Murashige and Skoog (MS) medium, Duchefa (kat. č. M0221, M0238)  
Myo-inositol, Duchefa (kat. č. I0609)  
NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>, Duchefa (kat. č. M02380050)  
PCR MasterMmix REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, Sigma-Aldrich (kat. č. R2523)  
Pentahydrát síranu měďnatého, Sigma – Aldrich (kat. č. C3036)  
Phytoagar, Duchefa (kat. č. P1003)  
Phytigel, Sigma-Aldrich (kat. č. P81695006)  
Prolin, Sigma-Aldrich (kat.č. P56071006)  
Thiamin HCl, Sigma-Aldrich (kat. č. T3902)

#### Primery, Generi Biotech

Cas9, Generi Biotech.

Forward primer 5 ' TTC GCT ACT GTT CGC AAG GT 3 '

Reverse primer 5 ' GGT GGA TGA GAG TAG CGT CG 3 '

Hyg/p204, Generi Biotech.

Forward primer 5 ' GAT TGC TGA TCC CCA TGT GT 3 '

Reverse primer 5 ' GCT GCT CCA TAC AAG CCA AC 3 '

PROTO CK 2, Generi Biotech.

Forward primer 3 'GAC CAA GCC CGT TAT TCT GA 3 '

Reverse primer 5 ' TGT GGA ATT GTG AGC GGA TA 3 '

#### **Roztoky**

Edwardsovo extrakční činidlo 100 ml: 20 ml 200 mM Tris HCl (pH 7,5), 5 ml 250 mM NaCl, 5 ml 25 mM EDTA 1 ml 0,5 % SDS, 70 ml destilované vody

50x TAE pufr: 50 mM EDTA, 2M Tris, 1M kyselina octová

### 4.3 Rostlinný materiál

Pro experimenty v rámci bakalářské práce byl použit jarní ječmen (*Hordeum vulgare*), odrůda Golden Promise. Golden Promise je starší odrůda dvouřadého sladovnického jarního ječmene, která byla vyšlechtěna v 60. letech 20. století ve Velké Británii. Jedná se o tzv. modelovou odrůdu, která se využívá pro genetickou transformaci. Izolovaná nezralá zygotická embrya v *in vitro* podmínkách vytváří embryogenní kalus, který se vyznačuje vysokou regenerační schopností. Odrůda má také dobré agronomické vlastnosti, mezi které patří rychlý růst nebo odolnost vůči vypadávání zrna. Velkou nevýhodou je náchylnost vůči padlí travnímu (*Erysiphe graminis* sp.*hordei*), patogen napadá především listy a stébla ječmene (Forster, 2001).

Donorové rostliny jarního ječmene odrůdy Golden Promise, ze kterých bylo izolováno pletivo pro transformaci byly pěstovány v zahradnickém substrátu (Rašelina Soběslav), ve fytotronu, při fotoperiodě 16 hod. světlo (intenzita osvětlení 400  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ ), teplota 18 °C, 8 hod. tma při teplotě 15 °C (obr. 7). Klasy, ze kterých byly izolovány nezralé obilky byly odříznuty při velikosti zygotických embryí 1,5 až 2 mm.



Obr. 7. Donorové rostlin jarního ječmene Golden Promise určené transformaci (foto autor).

## 4.4 Metody

### 4.4.1 Sterilizace a izolace nezralých zygotických embryí

Z klasu byly vyjmuty obilky, které byly zbaveny osin. Ovilky byly vloženy do Erlenmayerovy baňky 250 ml a umístěny na magnetickou míchačku a sterilizovány ve 100 ml 70% ethanolu po dobu 3 min., propláchnuty 100 ml sterilní vodou a sterilizovány 100 ml 6% hypochloridem sodným (NaClO) po dobu 6 minut. Po sterilizaci byly obilky promyty třikrát sterilní destilovanou vodou.

Ve flow-boxu, pod binokulární lupou byla provedena izolace nezralých zygotických embryí o velikosti 1,5 až 2 mm. Pomocí skalpelu a pinzety byly odstraněny části embrya (koleoptile a koleorhiza) a štítek embrya byl z obilky vyjmut a umístěn na kalus indukční médium (CI) v Petriho miskách.

Tab. 1. Postup sterilizace nezralých zygotických embryí

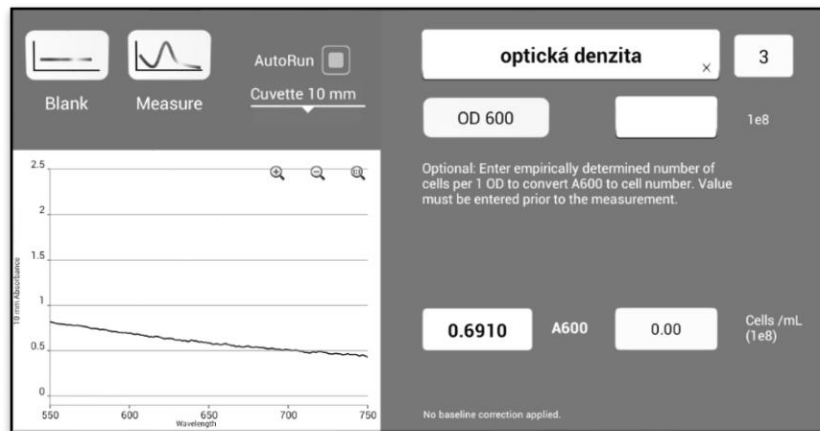
Použitá látka	Objem (ml)	Doba působení (min)	Opakování
Ethanol 70 %	100	3	1
Hypochlorid sodný 6 %	100	6	1
Sterilní dest. voda	100	4	3

### 4.4.2 Transformace *A. tumefaciens*, příprava inokula

Do kompetentních buněk *A. tumefaciens*, kmene AGL1 byl pomocí elektroporace transformován expresní vektor 188: pYLCRISPR\_Cas9\_Pubi-H a pomocný vektor pSoup. Do stejného typu buněk AGL1, jiného vzorku kompetentních buněk byl samostatně transformován druhý vektor 298: pBRAC214AS\_sgRNA, taktéž s pomocným vektorem pSoup, který zajišťuje replikaci. Transformované buňky byly kultivovány ve 2 ml SOC média a po 24 hodinové kultivaci při teplotě 28 °C byly rozetřeny a kultivovány na médiu LB, které obsahovalo antibiotikum Timentin, Kanamycin a Rifampicin. Z rostoucích kolonií byly připraveny glycerinové roztoky, které byly uchovány při -80 °C.

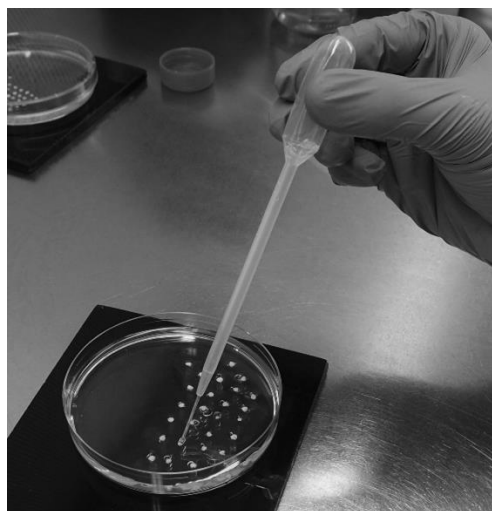
Inokulum určené pro transformaci bylo připraveno z 5 ml sterilního MG/L média ke kterému bylo přidáno 10 µl ze zásobního glycerinového roztoku zamraženého inokula. Bakterie byly kultivovány při teplotě 28 °C po dobu 24 hod na třepačce při otáčkách 180 rpm. Druhý den po kultivaci byla změřena optická denzita (OD) při vlnové délce

600 nm, která byla u vektoru pYLCRISPR\_Cas9\_Pubi-H 0,70 a u vektoru pBRACT214AS\_sgRNA 0,67 (obr. 8).



Obr. 8. Optická denzita (OD) kultivovaných buněk vektoru pBRACT214AS\_sgRNA měřená při vlnové délce 600 nm (foto autor).

Explantáty, které byly kultivovány na CI médiu 24 hod. předem byla aplikována agrobacteriální suspenze (obr. 9). Po jedné minutě působení byly explantáty přeneseny na nové CI médium, Petriho misky byly uzavřeny parafilmem a kultivovány při 23 °C ve tmě po dobu tří dnů.



Obr. 9. Aplikace agrobacteriální suspenze na explantáty jarního ječmene (foto autor).

#### 4.4.3 Selekcce transformovaných rostlin

Po třech dnech kultivace byly explantáty pasážovány na nové CI médium (selekce č. 1). Do média CI bylo přidáno antibiotikum Timentin o koncentraci 160 mg/l, zabraňující růst *A. tumefaciens* a selekční antibiotikum Hydromycin o koncentraci 50 mg/l, které dává

selekcí výhodu rostlinným buňkám, u nichž došlo k přenosu T-DNA. Po 14 dnech kultivace ve tmě byly explantáty přeneseny na nové CI médium (selekce č. 2) o stejné koncentraci antibiotik Hydromycinu i Timentinu jako při selekci č. 1. Po dalších 14 dnech byly explantáty pasážovány na nové CI médium (selekce č. 3) za stejných podmínek, které byly při první a druhé selekci. Dobře rostoucí kalusy byly po třech týdnech pasážovány na tranzientní (přechodné) médium, označené T, s obsahem fytohormonů 2,4-D a BAP a antibiotik Hydromycinu 30 mg/l a Timentinu o koncentraci 160 mg/l. Petriho misky s kalusy byly umístěny do kultivační komory s nízkou intenzitou osvětlení a 14 dní kultivovány při teplotě 24 °C. Postupně byly regenerující rostliny pasážovány na regenerační médium (označené R) bez růstových regulátorů do Erlenmayerových baněk a kultivovány na světle 14 dní při 24 °C (tab. 2). Dobře zakořeněné vitální rostliny byly přesazeny z Erlenmayerových baněk do rašelinových válečků (Jiffů) a postupně přesazeny do zeminy. U regenerovaných rostlin byla provedena genotypizace.

Tab. 2. Doba kultivace zygotických embryí v *in vitro* podmínkách

Podmínky	Indukční médium (CI)	Transientní médium (T)	Regenerační médium (R)
Doba kultivace	6 týdnů	2 týdny	4 týdny
Světelné podmínky	tma	pološero	světlo
Teplota (°C)	23	24	24

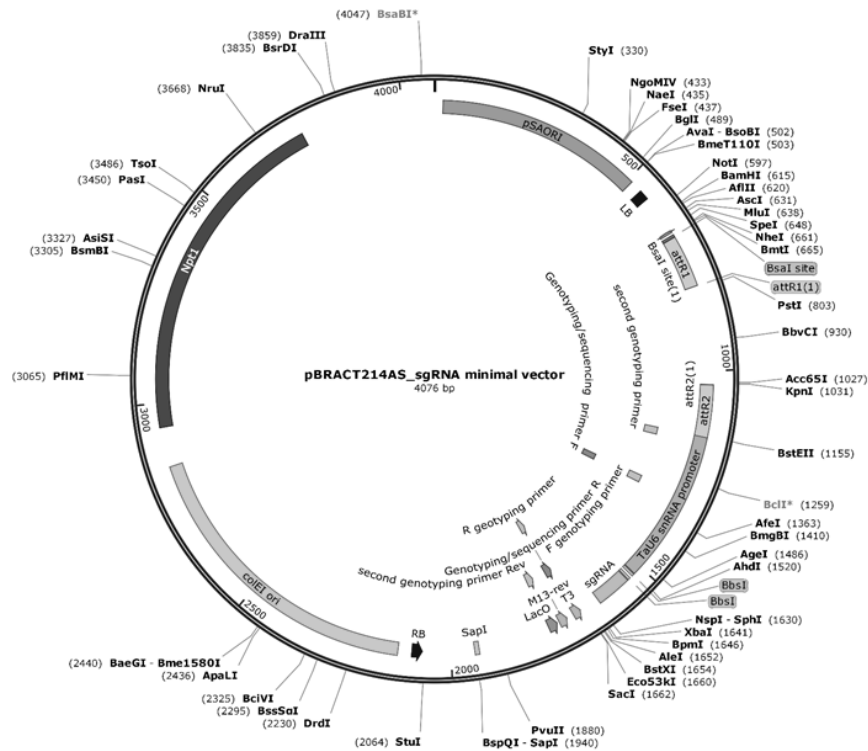
#### 4.4.4 Vektory

Nezralá zygotická embrya byla transformována dvěma vektory:

##### 1) 298: pBract214AS\_sgRNA

Vektor o velikosti 4076 bp obsahuje replikační počátek pSa-ORI, který je aktivní v *A. tumefaciens*. Replikační počátek v bakterii *E. coli* je označen CoIE1 ori. Dále obsahuje restriční místo pro vložení zájmového genu, selekcí marker a hraniční sekvence. Selekčním markerem pro rostlinu je gen *nptI*, který slouží pro syntézu neomycin fosfotransferázy II. Vektorový systém obsahuje promotor TaU6-snrRNA, který zajišťuje expresi sgRNA (obr. 10)

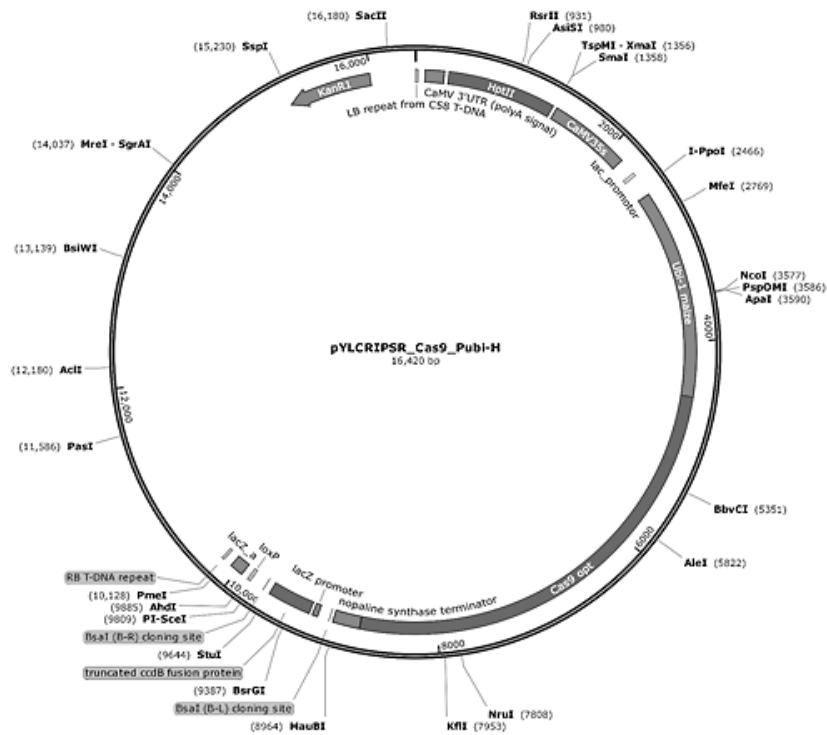




Obr. 10. Schéma vektoru pBRACT214AS\_sgRNA (4076 bp).

## 2) 188: pYLCRISPR\_Cas9

Vektor o velikosti 16420 bp obsahuje počátek replikace, restrikční místo pro zájmový gen, selekční marker, reportérový gen a hraniční sekvenci. Při levé sekvenci se nachází selekční marker *HptII* gen, který je pod CaMV 35S promotorem a poskytuje rostlině rezistenci na Hydromycin. *KanRI* slouží k bakteriální rezistenci. Zájmový gen *Cas9* je pod konstitutivním ubiquitinovým promotorem (Ubi-1 maize), zakončený terminační sekvencí nos (nopaline synthase terminator) (obr. 11)



Obr. 11. Schéma vektoru pYLCRISPR\_Cas9\_Pubi-H (16 420 bp).

## 4.5 Kultivační média

Kultivační média obsahují makroelementy, mikroelementy, vitamíny, podle typu média jsou přidávány fytohormony. Dále jsou složeny ze ztužovací gelové látky např. agar, agaróza, phytigel.

Kultivační média, které byly připravovány v rámci bakalářské práce byla rozdělena na dvě poloviny. Nejprve byl připraven phytigel, naváženo bylo 0,85 g na 250 ml média, přidáno bylo 125 ml deionizované vody a roztok byl autoklávován při 120 °C 20 min.

Druhá část média, složky kultivačního média byly postupně naváženy, napipetovány a doplněny deionizovanou vodou do 125 ml. Pomocí 1M NaOH bylo pH upraveno na 5,8. Ve flow-boxu bylo médium přefiltrováno pomocí podtlaku a ponecháno s vyautoklávovaným phytagelem ve vodní lázni při 60 °C. Phytigel a připravené médium bylo smícháno a přidána byla antibiotika. Do sterilní Petriho misky (9 cm) bylo nalito 25 ml média. Složení kalus indukčního média je uvedeno tab. 3., složení transientního média je uvedeno v tab. 4, složení regeneračního média je uvedeno v tab. 5.

#### 4.5.1 Složení kultivačních medií

Tab. 3. Složení kalus indukčního média (CI), MS (Murashige a Skoog, 1962)

<b>Složky</b>	<b>Množství na 1 l média</b>
MS médium (M0221)	4,3 g
Maltóza	30 g
Kasein hydrolyzát	1 g
Myo-inositol	350 mg
Prolin	690 mg
Thiamin HCl	4 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1,25 mg
Fytohormon Dicamba	2,5 mg
Antibiotikum Timentin	160 mg
Antibiotikum Hydromycin	50 mg

Tab. 4. Složení transientního média (T)

<b>Složky</b>	<b>Množství na 1 l média</b>
MS médium (M0238)	2,7 g
Maltóza	20 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165 mg
Myo-inositol	100 mg
Glutamin	750 mg
Thiamin HCl	4 mg
CuSO <sub>4</sub> · 5 H <sub>2</sub> O	1,25 mg
Fytohormon 2,4-D	2,5 mg
Fytohormon BAP	0,1 mg

Tab. 5. Složení regeneračního média (R)

<b>Složky</b>	<b>Množství na 1 l média</b>
MS médium (M0238)	2,7 g
Maltóza	20 g
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165 mg
Myo-inositol	100 mg
Glutamin	750 mg
Thiamin HCl	400 µl
Antibiotikum Timentin	160 mg
Antibiotikum Hydromycin	50 mg

## 4.6 Izolace genomické DNA z listů rostlin

Izolace genomické DNA byla provedena z mladých listů jarního ječmene T0 generace metodou Edwards a kol., 1991.

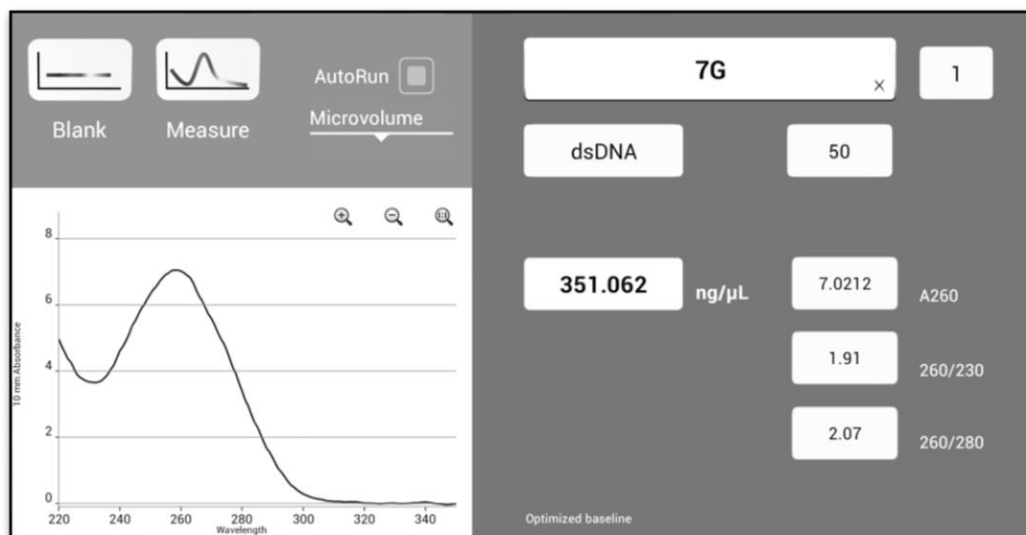
Mladý list o velikosti 3 cm byl vložen do mikrokumavky (Eppendorf) a zmrazen ponořením uzavřené mikrokumavky do tekutého dusíku. Následně byl macerován vychlazenou homogenizační tyčinkou. K homogenizovanému materiálu bylo přidáno 400  $\mu$ l extrakčního pufru (EB). Směs byla vortexována na stolní centrifuze 30 s. Extrakce probíhala 30–60 min. při laboratorní teplotě. Mikrokumavky obsahující vzorek byly centrifugovány při 11 000 rpm po dobu 2 min. Ze stočených zkumavek bylo přeneseno 300  $\mu$ l supernatantu do nové mikrokumavky. K supernatantu bylo přidáno 300  $\mu$ l vychlazeného izopropanolu. Směs byla pozvolně promíchána a dána na 20 minut do chladničky. Mikrokumavky byly po dobu 5 min centrifugovány při 13 000 rpm v chlazené centrifuze. Supernatant byl důkladně odstraněn a k peletu bylo přidáno 300  $\mu$ l 75% ethanolu. Vzorky byly centrifugovány při 5000 rpm po dobu 5 min. Supernatant byl odpipetován a pelet vysušen v laminárním boxu. Následně byla DNA rozpuštěna v 35–50  $\mu$ l DNA/RNA free H<sub>2</sub>O v závislosti na množství peletu. Vzorek byl uložen do chladničky (4 °C) na 24 hod. Další den byly mikrokumavky krátce vortexovány, centrifugovány při 10 000 rpm po dobu 30 s. Supernatant byl přenesen do nové mikrokumavky. Byla spektrofotometricky změřena koncentrace a čistota genomické DNA. Vzorky byly uchovány při teplotě -20 °C. Izolovaná DNA byla použita pro detekci přítomnosti T-DNA obsahující *sgRNA*, *Cas9* a *Hpt*.

### 4.6.1 Spektrofotometrické stanovení koncentrace a čistoty izolované DNA

Koncentrace a čistota izolované DNA byla měřena pomocí spektrofotometru. Principem je vyhodnocení absorbance světla při vlnové délce 260 nm a 280 nm z kapky vzorku.

Před měřením bylo provedeno stanovení nulové hodnoty, tzv. blank, jedná se o roztok, do kterého byla DNA eluována. Na čočku spektrofotometru byly nanесeny vždy 2  $\mu$ l vzorku extrahované DNA. Kapka vzorku je zadržována mezi dvěma rameny, kdy se z kapky stává sloupec kapaliny, na kterém probíhá měření.

Izolovaná DNA může být znečištěná organickými látkami i proteiny. Míru znečištění DNA určuje poměr absorbancí při 260 a 280 nm. Hodnota čisté DNA by se měla pohybovat okolo 1,8 –2 (obr. 12).



Obr. 12. Koncentrace DNA vzorku 7G (foto autor).

## 4.7 Polymerázová řetězová reakce

Detekce transgenů *sgRNA*, *Cas* a *Hpt* byla provedena pomocí polymerázové řetězové reakce (PCR).

Pro správný průběh PCR je potřeba: templátová DNA, směs všech čtyř deoxyribonukleotidů, termostabilní Taq DNA-polymeráza, 2 primery komplementární k 3'-koncovým sekvencím určeného úseku na obou vláknech templátové DNA, pufr pro DNA-polymerázu obsahující  $Mg^{2+}$  sloužící ke správné aktivitě enzymu.

Prvním krokem je denaturace templátu, při níž je DNA zahřáta na teplotu 95 °C. Dochází k rozvolnění vodíkových můstků mezi vlákny DNA. Dvouřetězcová (dsDNA) je rozpletena dvě jednořetězové DNA (ssDNA).

Následuje hybridizace primerů. Vzorek se ochladí na 57–58 °C (annealing). Primery, které jsou ve vzorku v nadbytku nasedají na specifická místa jednořetězcové DNA.

Posledním krokem je elongační (syntetická) fáze, při které je teplota zvýšena na 72 °C. Taq DNA-polymeráza se připojuje k jednomu konci každého primeru a syntetizuje vlákno komplementární k templátovému vláknu ve směru 5'–3'. Ze dvou vláken vznikají 4 vlákna molekuly DNA.

Tyto tři kroky se cyklicky opakují 25–40krát. Vytvořené produkty se nazývají amplikony. Jedná se o úseky DNA definované délkou, které slouží pro další molekulárně

biologické metody, například sekvencování nebo získání důkazů a identifikace osob v kriminalistice.

Pro PCR se používá mnoho druhů DNA-polymeráz. Mezi nejpoužívanější patří Taq DNA-polymeráza izolována z bakterie *Thermus aquaticus*, která má teplotní optimum při 72 °C. Tento enzym má pouze 5'–3' polymerázovou aktivitu a postrádá 3'–5' exonukleázovou aktivitu, nemá opravovací aktivitu.

### Pracovní postup

S jednotlivými vzorky bylo pracováno na ledě v laminárním boxu. Do reakce byl použit REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, který byl před použitím vortexován. Reakční směs byla připravena na objem 10 µl pro jeden vzorek. Do mikrozkušavky (Eppendorf) bylo přidáno 2,5 µl ddH<sub>2</sub>O, 5 µl REDTaq® ReadyMix™ PCR Reaction Mix, 0,25 µl primer forward (10 µM), 0,25 µl primer reverse (10 µM) a 2 µl izolované DNA (tab. 6). Mix byl mírně vortexován a centrifugován.

Negativní kontrola (C-) byla izolovaná z netransformované rostliny (WT). Jako pozitivní kontrola byl použit plazmid, kterým byly rostliny transformovány. Pro kontrolu reakce byly místo izolované DNA přidány 2 µl ddH<sub>2</sub>O. Připravené vzorky byly vortexovány a stočeny na stolní centrifuze a následně vloženy do termocycleru (T100 Thermal Cycler). Přítomnost genu *sgRNA*, *Cas* a *Hyg* v transgenních rostlinách byla zjišťována s použitím specifických primerů za použití různých programů, které jsou specifické pro daný gen (tab. 7; tab. 8; tab. 9).

Tab. 6: Složení PCR reakční směsi

Reakční směs	Mix 1 x 10 µl
ddH <sub>2</sub> O	2,5 µl
REDTaq ReadyMix	5 µl
Primer F	0,25 µl
Primer R	0,25 µl
DNA	2 µl
Celkem	10 µl

Tab. 7: Schéma programu pro detekci genu *sgRNA*, program PCR PROTO\_CK

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
1.	95 °C	3 min	1 x
2.	95 °C	20 s	38 x
	58 °C	30 s	
	72 °C	55 s	
3.	72 °C	5 min	1 x
4	12 °C	∞	-

Tab. 8: Schéma programu pro detekci genu *Cas9*, program CAS\_9

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
1.	95 °C	4 min	1 x
2.	95 °C	20 s	36 x
	58 °C	30 s	
	72 °C	1 min	
3.	72 °C	5 min	1 x
4	12 °C	∞	-

Tab. 9: Schéma programu pro detekci genu *Hpt*, program HYG\_204

Krok	Teplota	Čas	Počet opakování
1.	95 °C	4 min	1 x
2.	95 °C	20 s	37 x
	58 °C	30 s	
	72 °C	45 s	
3.	72 °C	5 min	1 x
4	12 °C	∞	-

## 4.8 Analýza PCR produktů, elektroforéza

Po amplifikaci úseku byly segmenty separovány v 1% agarózovém gelu. Gelová elektroforéza se používá pro rozdělení molekuly DNA na základě velikosti. Rychlost migrace závisí na tvaru molekuly a na poměru náboje k hmotě. Molekuly DNA nesou negativní náboj, proto v elektrickém poli putují od záporného pólu (anoda) k pozitivnímu pólu (katoda).

### Pracovní postup

Do 250 ml Erlenmayerovy baňky bylo dáno 0,8 g agarózy a 80 ml 1% TAE pufru. Agaróza byla rozpuštěna zahřátím v mikrovlnné troubě a po vychladnutí byly přidány 2  $\mu$ l fluorescenčního barviva ethidium bromidu (10 mg/l). Do elektroforetické vaničky s vloženým hřebínkem byl nalit připravený gel. Po ztuhnutí byl hřebínek vytáhnout a gel byl umístěn do elektroforetické vany. Gel byl zalit pufrům TAE tak, aby byl gel ponořen. Do jamek byly napipetovány produkty PCR reakce (9  $\mu$ l) a pro stanovení velikosti produktu byl použit i marker molekulové hmotnosti HyperLadder II (5  $\mu$ l). Elektroforetická komora byla připojena ke zdroji napětí PowerPac™ Basic a byla spuštěna separace, která trvala 45 min/ 120 V. Po ukončení elektroforetické separace byl gel umístěn do UV transiluminátoru (G:Box iChemi XR UV/White Light) a produkty byly zviditelněny v procházejícím UV světle. Pomocí programu GeneSnap byl pořízen záznam.



## 5 VÝSLEDKY

V rámci bakalářské práce bylo provedena transformaci jarního ječmene odrůdy Golden Promise prostřednictvím *A. tumefaciens* a pomocí technologie CRISPR/Cas měla být vyvolána mutace genu *erf*.

### 5.1 Transformace rostlin ječmene odrůdy Golden Promise

Nezralá zygotická embrya odrůdy Golden Promise byla izolována postupem uvedeným v experimentální části. Extirpovaná embrya byla transformována dvěma *A. tumefaciens* (AGL1) současně a každý obsahoval jeden expresní plazmid. Suspenze obou vektorů byly smíchány v poměru 1:1 a nakapány na štítky nezralých zygotických embryí.

Celkem bylo transformováno 39 extirpovaných embryí odrůdy Golden Promise (obr. 13). Explantáty byly pasážovány ve 14 denních intervalech na čerstvé CI-médium, celkem tři selekce pak následovala pasáž na T-médium a R-médium. Z transformovaných 39 kalusů regenerovalo 19 rostlin (48,7 %), z toho 13 zelených (33,3 %) a 6 albínů (15,4 %) (tab. 10). Každá ze zelených regenerovaných rostlin pocházela z jednoho embrya. Efektivita regenerace byla 48,7 %.

Tab. 10: Kultivace embryí na různých médiích v průběhu transformace

Odrůda	Počet izolovaných embryí	Počet embryí na CI médiu	Počet embryí na T-médiu	Počet embryí na R-médiu	Počet regenerovaných rostlin		
					Zelených	Albínů	Celkem
Golden Promise	39	35	30	30	13	6	19



Obr. 13: Transformovaná embrya odrůdy Golden Promise na CI médiu (Foto autor).

## 5.2 Izolace DNA

DNA byla izolována celkem z 13 regenerovaných zelených rostlin. Z každé rostliny byla DNA izolována ze dvou odnoží, které byly každá zvlášť označeny. U rostliny číslo 7 byla DNA izolována ze všech 8 odnoží. Celkový počet vzorků izolované DNA byl 32 (tab. 11; tab. 12).

Tab. 11. Označení rostlin, odnoží pro PCR analýzu

Rostlina č.	Označení odnožení		Rostlina č.	Označení odnožení	
1	1A	1B	8	8A	8B
2	2A	2B	9	9A	9B
3	3A	3B	10	10A	10B
4	4A	4B	11	11A	11B
5	5A	5B	12	12A	12B
6	6A	6B	13	13A	13B
7	7A	7B			

Tab. 12. Označení rostlin, odnoží pro PCR analýzu

Rostlina číslo	Počet odnoží, označení							
7	7A	7B	7C	7D	7E	7F	7G	7H

Koncentrace izolované DNA se pohybovala od 200 ng/ $\mu$ l do 1000 ng/ $\mu$ l. Koncentrované vzorky byly naředěny na 300 ng/ $\mu$ l.

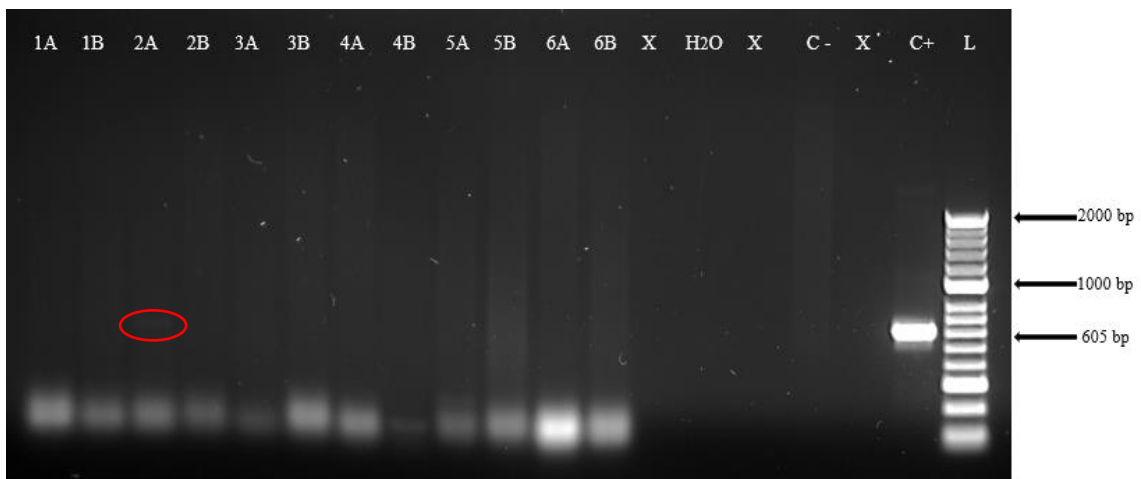
### 5.3 PCR analýza transgenních rostlin

Pomocí PCR byla vyhodnocena přítomnost genů *sgRNA*, *Cas* a *Hpt*, které jsou obsaženy ve vektorech:

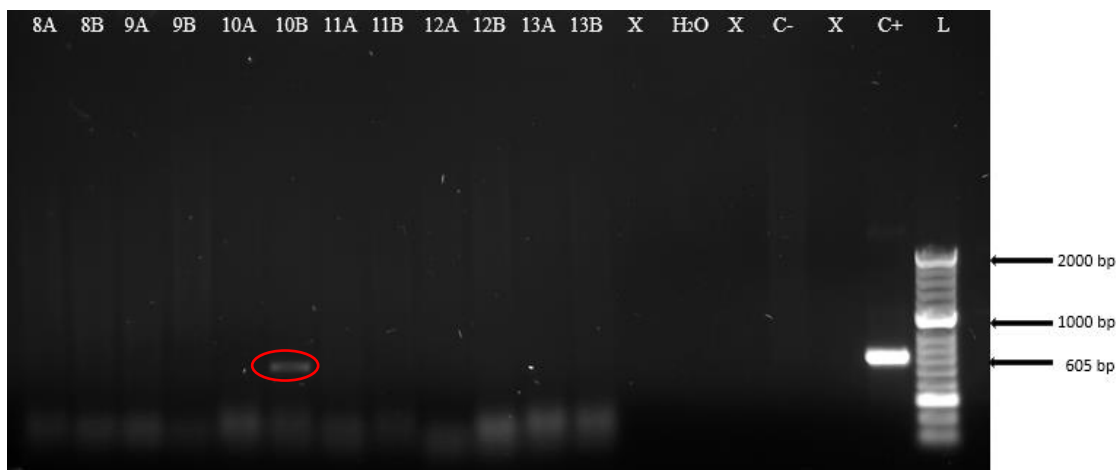
- 1) 298: pBract214AS\_sgRNA  
Detekovaný gen *sgRNA* (velikost fragmentu 605 bp)
- 2) 188: pYLCRISPR\_Cas9  
Detekovaný gen *Cas9* (velikost fragmentu 811 bp)  
Detekovaný gen *Hpt* (velikost fragmentu 275 bp)

#### 5.3.1 Detekce genu *sgRNA* u rostlin T0 generace jarního ječmene

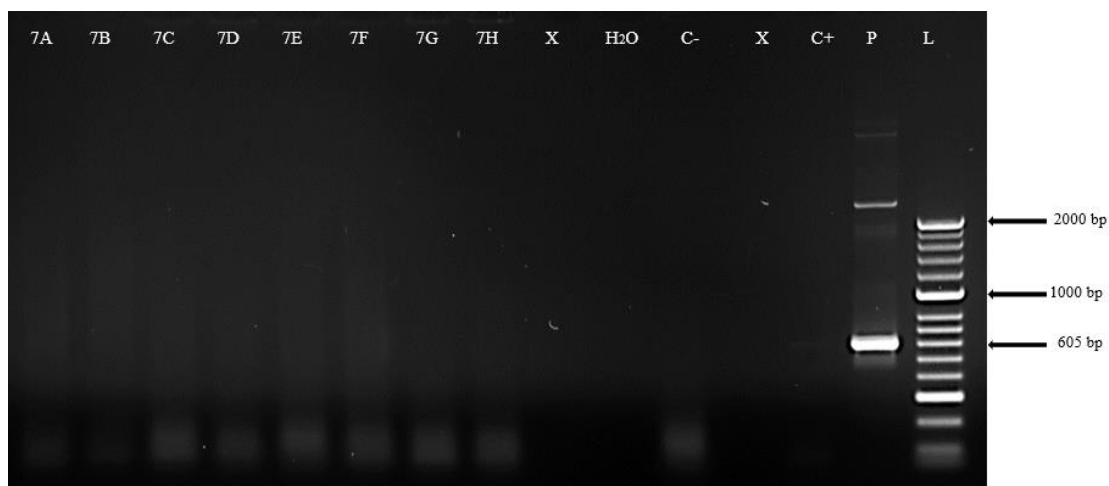
U 32 vzorků DNA pocházejících ze 13 rostlin byla provedena analýza přítomnosti genu *sgRNA*. Přítomnost genu *sgRNA* byla detekována u dvou rostlin, vždy u jedné ze dvou odnoží (obr. 14a; 14b; 14c).



Obr. 14a. Detekce úseku T-DNA obsahující U6-*sgRNA* kazetu u rostlin T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost amplikonu 605 bp). Dráhy 1A–6B: vzorky jarního ječmene, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).



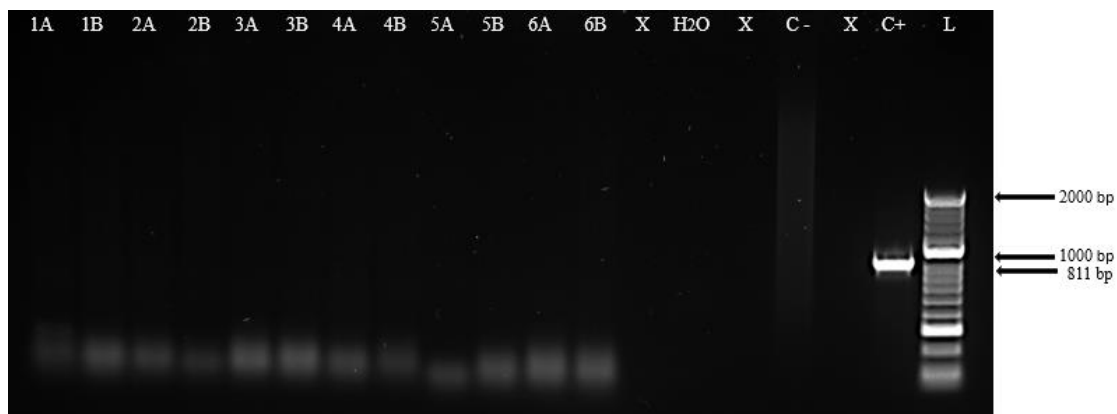
Obr. 14b. Detekce úseku T-DNA obsahující U6-*sgRNA* kazetu u rostlin T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 605 bp). Dráhy 8A–13B: vzorky jarního ječmene, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).



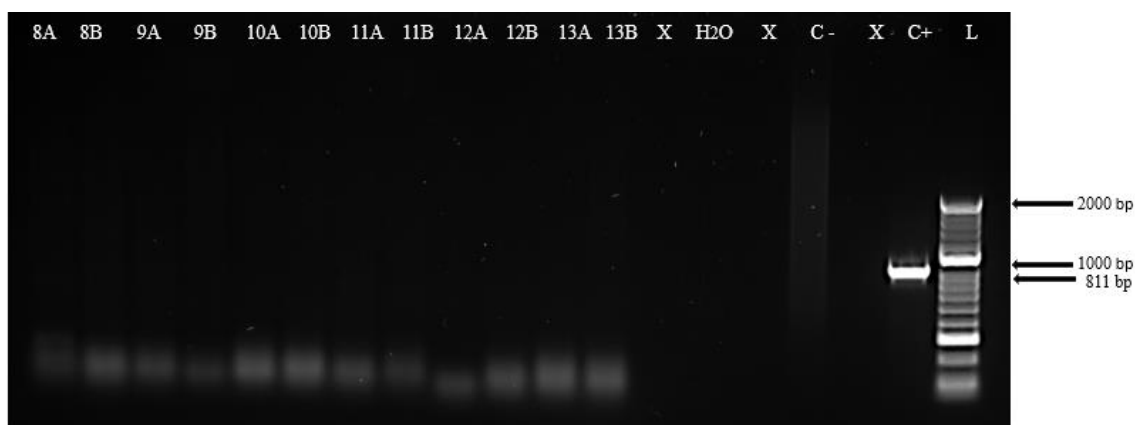
Obr. 14c. Detekce úseku T-DNA obsahující U6-*sgRNA* kazetu u rostliny číslo 7 T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 605 bp). Dráhy 7A–7H: odnože jarního ječmene pocházející z jedné rostliny, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).

### 5.3.2 Detekce genu *Cas* u rostlin T0 generace jarního ječmene

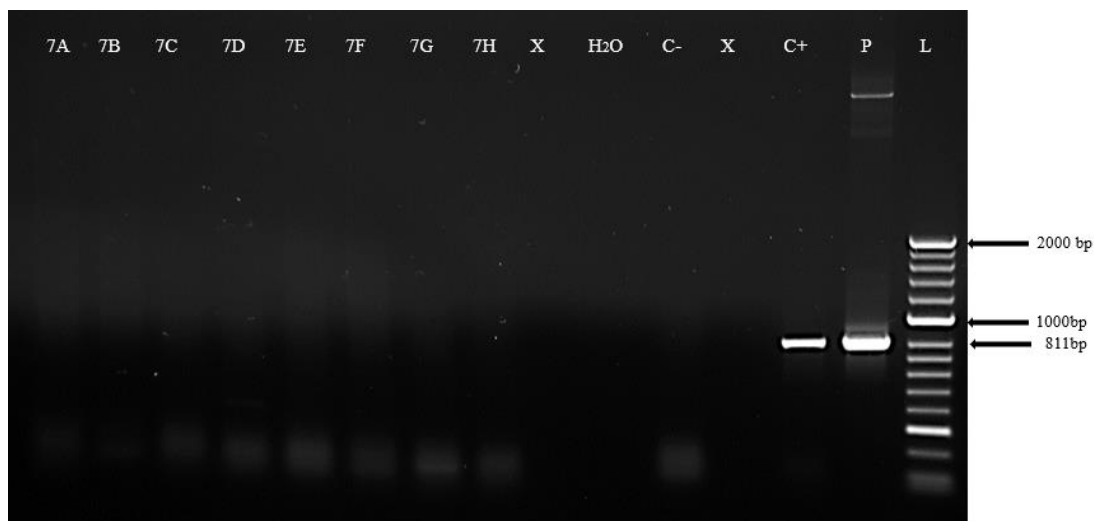
U stejných 32 odnoží pocházejících ze 13 rostlin byla také provedena analýza přítomnosti genu *Cas*. U žádné z rostlin nebyla ověřena přítomnost genu *Cas* (obr. 15a, 15b, 15c).



Obr. 15a. Detekce úseku T-DNA obsahující *Cas* u rostlin T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 811 bp). Dráhy 1A–6B: vzorky jarního ječmene, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).



Obr. 15b. Detekce úseku T-DNA obsahující *Cas* u rostlin T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 811 bp). Dráhy 8A–13B: vzorky jarního ječmene, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).



Obr. 15c. Detekce úseku T-DNA obsahující *Cas* u rostliny číslo 7 T0 generace jarního ječmene odrůdy Golden Promise (velikost ampliconu 811 bp). Dráhy 7A–7H: vzorky jarního ječmene, C- (negativní kontrola, netransformovaná rostlina), C+ (pozitivní kontrola, plazmid), H<sub>2</sub>O (voda), L (marker molekulové hmotnosti, Hyper Ladder II, velikost 2000 bp).

### 5.3.3 Detekce genu *Hpt* u rostlin T0 generace jarního ječmene

U stejných 32 odnoží pocházejících ze 13 rostlin byla provedena analýza přítomnosti selekčního genu *Hpt*. U žádné z rostlin nebyla potvrzena přítomnost genu *Hpt*.

Z výsledků PCR vyplývá, že žádná z 13 rostlin a jejich 32 odnoží společně neobsahovala geny *sgRNA* a *Cas*. Nemůžeme proto předpokládat, že došlo k transformaci obou plazmidů (pBract214AS\_*sgRNA*, pYLCRISPR\_*Cas9*) současně.

## 6 DISKUZE

Cílem práce bylo provést transformaci rostlin jarního ječmene u kterých měla být pomocí technologie CRISPR/Cas vyvolána mutace genu *erf*. Transformována byla nezralá zygotická embrya odrůdy Golden Promise, která představují ideální explantát pro regeneraci rostlin v *in vitro* podmínkách (Goedeke a kol., 2007). Explantáty byly transformovány pomocí *A. tumefaciens* současně dvěma expresními vektory. První z plazmidů, pBract214AS\_sgRNA, obsahoval gen *sgRNA*, který slouží k navádění enzymu Cas k cílové DNA. Druhý plazmid obsahoval gen *Cas*, pYLCRISPR\_Cas9, kódující endonukleázu, součástí plazmidu je také selekční gen *Hpt*, který slouží k selekci transformovaných buněk. Během kultivace *in vitro* byla indukce kalusu a regenerace rostlin stimulována růstovými hormony. V průběhu selekce byla do média přidávána antibiotika Hydromycin a Timentin.

Během procesu selekce se snižoval počet rostoucích kalusů z 39 na 30. Z těchto 30 kalusů regenerovalo 19 rostlin, z nichž bylo 13 zelených nezávislých transgenních linií a 6 albínů. Indukce kalusu a regenerace rostlin může být ovlivněna různými faktory. Transformační efektivitu může ovlivnit zvolená odrůda, typ zvoleného explantátu, kmen *A. tumefaciens*, provádění inokulace (Bartlett a kol., 2008). Efektivita transformace se většinou pohybuje od 3 do 10 %, to znamená že u 3 až 10 % rostlin je potvrzena přítomnost transgenu. (Harwood a kol., 2009)

V rámci bakalářské práce pouze 2 rostliny vykazovaly přítomnost genu *sgRNA*. V našem experimentu, efektivita transformace u plazmidu pBract214AS\_sgRNA byla 5,1 %. U druhého plazmidu, pYLCRISPR\_Cas9, který byl vnášen současně k transformaci genu nedošlo.

Nejvyšší popsaná úspěšnost transformace pomocí *A. tumefaciens* byla 86 % (Hensel a kol., 2009). Transformována byla také nezralá zygotická embrya odrůdy Golden Promise vektorem pSB187 se selekčním genem *Hpt* pod promotorem CaMV 35S a reportérovým genem *sgfp* řízeným ubiquitinový promotorem. Nízké procento efektivy transformace v našem experimentu mohlo být ovlivněno: transformací poškozeného explantátu, špatným provedením inokulace, zvoleným vektorem, typem promotoru, koncentrací selekčního antibiotika, nebo i podmínkami *in vitro* kultivace. U vektoru pYLCRISPR\_Cas9, který obsahuje selekční gen *Hpt*, nedošlo vůbec k vyselektování

transgenních rostlin, což může být způsobeno špatně zvolenou koncentrací antibiotika, případně také podmínkami kultivace.

Úspěšnost mutagenese metodou CRISPR/Cas je závislá na aktivitě dvou hlavních komponent sgRNA a Cas9. Pokud však regenerované rostliny neobsahují geny *sgRNA* a *Cas9* nemůže dojít k vyvolání mutace genu v požadovaném místě. V našem experimentu byly oba tyto geny transformovány každý v samostatném plazmidu. Expresi obou těchto genů je kontrolována promotory. Pro expresi *sgRNA* byl použit TaU6 promotor a pro expresi *Cas9* ubiquitinový promotor. Změna promotorů by mohla zajistit zvýšení efektivity transformace. Funkce promotorů mohla být také narušena metylací v jeho sekvenci, která způsobuje sktrukturální změny v genu nebo chromatidovou kondenzaci (Rajeewkumar a kol., 2015). Aktivita sgRNA by také mohla být zvýšena výběrem protospaceru, jeho délkou a strukturou, například použitím protospaceru s vyšším obsahem GC, který by na posledních čtyřech pozicích sekvence obsahoval purinové zbytky (Šlanhofová, 2020).

Další možností, jak zvýšit efektivitu transformace by mohla být transformace jedním kmenem *A. tumefaciens*, obsahující dva plazmidy s rozdílnými geny. Daley a kol. (1998) využil tento typ transformace u řepky a tabáku. Oba zájmové geny byly detekovány u 50% transgenních rostlin. Do poloviny těchto rostlin byly geny vloženy do rozdílných lokusů chromozomu.

Pro objasnění funkce genu *erf* a úspěšnost transformace by bylo do budoucna dobré optimalizovat podmínky transformace, zvýšit počet transformovaných embryí, optimalizovat podmínky selekce, případně použít jiný typ vektorů.



## 7 ZÁVĚR

V rámci bakalářské práce byla vypracována literární rešerše na téma genové inženýrství, transformace rostlin, CRISPR/Cas, transkripční faktory, podrodina ERF. Transkripční faktory ERF by měly regulovat expresi genů, které se zapojují v růstu a vývoji rostlin a mohou působit jako regulátoři při biotickém a abiotickém stresu u rostlin.

V experimentální části byla provedena transformace jarního ječmene odrůdy Golden Promise pomocí *A. tumefaciens*. Pro transformaci, vyvolání mutace genu *erf*, byly použity dva expresní vektory: pBRACT214AS\_sgRNA obsahující gen *sgRNA* a pYLCRISPR\_Cas9\_Pubi-H obsahující gen Cas9 a selekční gen *Hpt*.

Ze 39 transformovaných embryí regenerovalo celkem 19 rostlin z toho 13 rostlin zelených, nezávislých transgenních linií a 6 albínů. Pomocí PCR byla analyzována přítomnost transgenů *sgRNA*, *Cas*, *Hpt*. DNA byla izolována celkem ze 32 odnoží, z 13 rostlin.

Bylo zjištěno, že dvě rostliny č. 2 a 10, odnože 2A a 10B, obsahovaly jeden ze zájmových genů, *sgRNA*. Gen Cas nebyl detekován u žádné rostliny ani jejich odnoží. Z dosažených výsledků PCR vyplývá, že žádná ze 32 odnoží 13 rostlin společně neobsahovala geny *sgRNA* a *Cas*. Z tohoto důvodu nemůže dojít k vyvolání žádané mutace.

## Seznam použité literatury

- ABDALLAH N.A., PRAKASH C.S., MCHUGHEN A.G., 2015: Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities, *GM Crops and Food* **6** (4), 183–205.
- ALBERTS B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERTS, K., WALTER P., 2002: *Molecular Biology of the Cell* (4 vydání), Garland Science, New York.
- ALLEN B., TAATJES D., 2015: The Mediator complex: A central integrator of transcription, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (3), 155–166.
- ANDERS C., NIEWOEHNER O., DUERST A., JINEK M., 2014: Structural basis of PAM-dependent target DNA recognition by the Cas9 endonuclease, *Nature* **513** (7519), 569–573.
- BARRANGOU R., FREMAUX C., DEVEAU H., RICHARDS M., BOYAVAL P., MOINEAU S., ROMERO D. A., HORVATH P., 2007: CRISPR provides acquired resistance against viruses in prokaryotes, *Science* **315** (5819), 1709–1712.
- BARRANGOU R., 2014: Cas9 Targeting a CRISPR Revolution, *Science* **344** (6185), 707–708.
- BARTLETT J.G., ALVES S.C., SMEDLEY M., SNAPE J.W., HARWOOD W., 2008 : High-throughput Agrobacterium-mediated barley transformation, *Plant Meth.* **4** (1), 22.
- BELOGLAZOVA N., BROWN G., ZIMMERMAN M. D., PROUDFOOT M., MAKAROVA K. S., KUDRITSKA M., KOCHINYAN A., WANG S., CHRUSZCZ M., MINOR W., KOONIN E. V., EDWARDS A. M., SAVCHENKO A., YAKUNIN A. F., 2008: A novel family of sequencespecific endoribonucleases associated with the clustered regularly interspaced short palindromic repeats, *Biol. Chem.* **283**, 20361–20371.
- BOGDANOVA A. J., VOYTAS D. F., 2011: Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Research* **39** (17), 82.
- BOTHMER R., JACOBSEN N., BADEN C., JØRGENSEN R.B., LINDE-LAURSEN I., 1991: *An Ecogeographical Study of the Genus Hordeum. Systematic and Ecogeographic Studies of Crop Gene Pools*, 7.IBPGR, Rome.

- BROWN T. A., 2007 : Klonování genů a analýza DNA: úvod. Olomouc: Univerzita Palackého, ISBN 978-80-244-1719-6.
- BUTT H., JAMIL M., WANG J.Y., AL-BABILI S., MAHFOUZ M., 2018: Engineering plant architecture via CRISPR/Cas9-mediated alteration of strigolactone biosynthesis, *BMC Plant Biol.* **18**, 174.
- CERMAK T., DOYLE E. L., CHRISTIAN M., WANG L., ZHANG Y., SCHMIDT C., BALLER J. A., SOMIA N. V., BOGDANOVA A. J., VOYTAS D. F., 2011: Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting, *Nucleic Acids Research* **39** (12), 82.
- COLLINS A., 2001: *Soilborne Plant Pathogens. Agrobacterium tumefaciens*, Raleigh, North Carolina, U.S., NC State University, Department of Plant Pathology.
- CONG L., RAN A. F., COX D., LIN S., BARRETTO R., HABIB N., HSU P. D., WU X., JIANG W., MARRAFFINI L. A., ZHANG F., 2013: Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems, *Science* **339** (6121), 819–823.
- DALEY M., KNAUF V., SUMMERFELT K., TURNER J. C., 1998: Co-transformation with one *Agrobacterium tumefaciens* strain containing two binary plasmids as a method for producing marker-free transgenic plants, *Plant Cell Reports* **17**, 489–496.
- DE LA RIVA G. A., GONZÁLEZ-CABRERA J., VÁZQUEZ-PADRÓN R., AYRA-PARDO C., 1998: *Agrobacterium tumefaciens*: A natural tool for plant transformation, *Electronic Journal of Biotechnology* **3** (1), 25–48.
- DEL SOLAR G., GIRALDO R., RUIZ-ECHEVARRÍA M. J., ESPINOSA M., DÍAZ-OREJAS R., 1998: Replication and Control of Circular Bacterial Plasmids, *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **62**, 434–464.
- DELTCHEVA E., CHYLINSKI C., SHARMA C. M., GONZALES K., CHAO Y., PIRZADA A. Z., ECKERT M. R., VOGEL J., CHARPENTIER E., 2011: CRISPR RNA maturation by transcribed small RNA and host factor RNase III, *Nature* **471** (7340), 602–607.
- DUAN Y.B., LI J., QIN R. Y., XU R. F., LI H., YANG Y. C., 2016: Identification of a regulatory element responsible for salt induction of rice OsRAV2 through ex situ and in situ promoter analysis, *Plant Mol. Biol.* **90** (1–2), 49–62.

- EDWARDS K., JOHNSTONE C., THOMPSON C., 1991: A simple and rapid method for preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, *Nucleic Acids Res.* **19**, 1349.
- FORSTER B. P., 2001 : Mutation genetics of salt tolerance in barley: An assessment of Golden Promise and other semi-dwarf mutants, *Euphytica* **120**, 317–328.
- GASIUNAS G., BARRANGOU R., HORVATH P., SIKSNYS V., 2012: Cas9–crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109** (39), 2579–2586.
- GELVIN S. B., REAM W., MYSORE K. S., BASSUNER B., DENG X. B., DARBINIAN N. S., MOTCHOULSKI A., 1998 : Role of the *Agrobacterium tumefaciens* VirD2 protein in T-DNA transfer and integration, *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11** (7), 668–683.
- GLICK B. R., PASTERNAK, J. J., PATTEN, C. L., 2010: *Molecular Biotechnology: Principles and applications of recombinant DNA* (4 edition), ASM Press, Washington D. C., USA., 1000. ISBN 978-1-55581-498-4.
- GOEDEKE S., HENSEL G., KAPUSI E., GAHRTZ M., KUMLEHN J., 2007: Transgenic Barley in Fundamental Research and Biotechnology, *Transgenic Plant Journal* **1** (1), 104–117.
- GOZUKIRMIZI N., KARLIK E., 2017: Barley (*Hordeum vulgare* L.) Improvement Past, Present and Future. *Brewing Technology*, IntechOpen, 1–30.
- GRÜNBERG S., HAHN S., 2013: Structural insights into transcription initiation by RNA polymerase II. *Trends Biochem. Science* **38** (12), 603–611.
- GUO B., WEI Y., XU R., LIN S., LUAN H., LV CH., ZHANG X., SONG X., XU R., 2016: Genome-wide analysis of APETALA2/ethylene-responsive factor (AP2/ERF) Gene family in barley (*Hordeum vulgare* L.), *PLoS ONE* **11** (9), 1–17.
- HARWOOD W. A., BARTLETT J. G., ALVES S. C., PERRY M., SMEDLEY M. A., LEYL N., SNAPE J. W., 2009: Barley Transformation Using *Agrobacterium*-Mediated Techniques. *Transgenic Wheat, Barley and Oats. Methods in Molecular Biology (Methods and Protocols)* **478**, Humana Press, pp. 137 –147.
- HENSEL G., KASTNER CH., OLESZCZUK S., RIECHEN J., KUMLEHN J., 2009: *Agrobacterium* Mediated Gene Transfer to Cereal Crop Plants: Current Protocols for Barley, Wheat, Triticale, and Maize. *International Journal of Plant Genomics*, doi: 10.1155/2009/835608.

- HIEI Y., ISHIDA Y., KOMARI T., 2014: Progress of cereal transformation technology mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, *Front Plant Science* **5**, 628.
- ISMAGUL A., YANG N., MALTSEVA E., ISKAKOVA G., MAZONK I., SKIBA Y., BI H., ELIBY S., JATAYEV S., SHAVRUKOV Y., BORISJUK N., LANGRIDGE P., 2018: A biolistic method for highthroughput production of transgenic wheat plants with single gene insertions, *BMC Plant Biol.* **18**, 135.
- JANSEN R., EMBDEN J. D. A., GAASTRA W., SCHOULS L. M., 2002: Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes, *Molecular Microbiology* **43** (6), 1565–1575.
- JI Q., XU X., WANG K., 2013: Genetic transformation of major cereal crops, *Intern. journal Devel. Biol.* **57** (6–8), 495–508.
- JINEK M., CHYLINSKI K., FONFARA I., HAUER M., DOUDNA J., CHARPENTIER E., 2012: A Programmable Dual-RNA – Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, *Science* **337** (6096), 816–822.
- JINEK M., JIANG F., TAYLOR D.W, STERNBERG S.H, KAYA E., MA E., ANDERS C., HAUER M., ZHOU K., LIN S., KAPLAN M., AIAVARONE A.T., CHARPENTIER E., NOGALES E., DOUDNA J.A., 2014: Structures of Cas9 endonucleases reveal RNA-mediated conformational activation, *Science* **343** (6176), 1247997.
- KIM H., KIM J. S., 2014: A guide to genome engineering with programmable nucleases., *Nat Rev Genet* **15** (5), 321–334.
- KIM Y. G., CHA J., CHANDRASEGARAN S., 1996: Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to FokI cleavage domain, *Proc Natl Acad Science USA.* **93**, 1156–1160.
- KLEINHOF A., GRANER A.: 2001: An integrated map of the barley genome. *DNA – Based Markers in Plants*, Kluwer Academic Publishers, pp. 187–200.
- KOROTKOVA A.M., GERASIMOVA S.V., SHUMNY V.K., KHLESTKINA E.K., 2017: Crop genes modified using the CRISPR/Cas system, *Russ. J. Genet.: Appl. Res.* **7**(8), 822–832.
- LI J. F., NORVILLE J. E., AACH J., MCCORMACK M., ZHANG D., BUSH J., CHURCH G. M., SHEEN J., 2013: Multiplex and homologous recombination-mediated genome editing in *Arabidopsis* and *Nicotiana benthamiana* using guide RNA and Cas9., *Nature Biotechnology* **31**(8), 688–691.

- LIL., WU L. P., CHANDRASEGARAN S., 1992: Functional domains in FokI restriction endonuclease, *Proc Natl. Acad. Science USA* **89** (10), 4275–4279.
- LI Z.T., GRAY D.J., 2005 : Genetic engineering technologies (1 edition), *Plant development and biotechnology*, CRC Press, 358, pp. 241–250, ISBN: 0-8493-1614-6.
- LLOYD A., PLAISIER C.L., CARROLL D., DREWS G.N., 2005: Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*, *Proc Nat. Acad Sci USA* **102** (6), 2232–2237.
- LONG L., YANG W-W., LIAO P., GUO Y-W, KUMAR A., GAO W., 2019: Transcriptome analysis reveals differentially expressed ERF transcription factors associated with salt response in cotton, *Plant Science* **281**, 72–81.
- LOW L.Y., YANG S.K., KOK A., ABDULLAH J.O., TAN N.P., LAI K.S., 2017: *Transgenic Plants: Gene Constructs, Vector and Transformation Method*, *New Visions Plant Science*, pp. 5460.
- MAKAROVA K. S., ARAVIND L., WOLF Y. I., KOONIN E. V., 2011a: Unification of Cas protein families and a simple scenario for the origin and evolution of CRISPR-Cas systems, *Biology Direct* **6** (38), 1–27.
- MAKAROVA K. S., HAFT D. H., BARRANGOU R., BROUNS S. J. J., CHARPENTIER E., HORVATH P., MOINEAU S., MOJICA F. J. M., WOLF Y. I., YAKUNIN A. F., VAN DER OOST J., KOONIN E. V., 2011b: Evolution and classification of the CRISPR-Cas systems, *Nature Reviews. Microbiology* **9**, 467–477.
- MAKAROVA K. S., WOLF Y. I., ALKHNABASHI O. S., COSTA F., SHAH S. A., SAUNDERS S. J., KOONIN E. V., 2015: An updated evolutionary classification of CRISPR–Cas systems, *Nature Reviews Microbiology* **13** (11), 722–736.
- MAKAROVA K. S., WOLF Y. I., IRANZO J., SHMAKOV S. A, ALKHNABASHI O. S, BROUNS S. J., CHARPENTIER E., CHENG D. J. W., HAFT D. H., HORVATH P., MOINEAU S., 2020: Evolutionary classification of CRISPR-Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nature Reviews Microbiology* **18** (2), 67–83.
- MINISTERSTVO ŽIVOTNÍHO PROSTŘEDÍ. [cit. 12.06.2020] (Dostupné z: [https://www.mzp.cz/cz/geneticky\\_modifikovane\\_organismy](https://www.mzp.cz/cz/geneticky_modifikovane_organismy), staženo 12.6.2020).
- MINKENBERG B., XIE K., YANG Y., 2017: Discovery of rice essential genes by characterizing a CRISPR-edited mutation of closely related rice MAP kinase genes, *Plant journal* **89** (3), 636–648.

- NAM K., DING F., HAITJEMA C., HUANG, Q., DELISA M., KE A., 2012 : Double-stranded Endonuclease Activity in *Bacillus halodurans* Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-associated Cas2 Protein, *Journal of Biological Chemistry* **287** (43), 35943–35952.
- NEWELL C., 2000: Technologie transformace rostlin, *Molecular Biotechnology* **16** (1), 53-65.
- NUÑEZ J. K., KRANZUSCH P. J., NOESKE J., WRIGHT A. V., DAVIES C. W., DOUDNA J. A., 2014: Cas1-Cas2 komplex formation mediates spacer acquisition during CRISPR-Cas adaptive immunity, *Nat. Struct. Mol. Biol.* **21**, 528–534.
- ONDŘEJ M., DROBNÍK J., 2002 : Transgenoz rostlin, Academia, Praha, pp. 316.
- PAVLOVÁ L., 2005: Fyziologie rostlin, Karolinum, Praha, pp. 253, ISBN 80-246-0985-1.
- PIREYRE M., BUROW M., 2015: Regulation of MYB and bHLH transcription factors: a glance at the protein level, *Mol Plant.* **8** (3), 378–388.
- RAJEEVKUMAR S., ANUNANTHINI P., SATHISHKUMAR R., 2015: Epigenetic silencing in transgenic plants, *Frontiers in Plant Science* **6**.
- RAZZAQ A., SALEEM F., KANWAL M., MUSTAFA G., YOUSAF S., IMRAN ARSHAD, H. M., HAMEED M.K., KHAN M. S., JOYIA F.A., 2019: Modern Trends in Plant Genome Editing: An Inclusive Review of the CRISPR/Cas9 Toolbox, *International Journal Mol Science* **20** (16), 40–45.
- RÖMER P., RECHT S., LAHAYE T., 2009: A single plant resistance gene promoter engineered to recognize multiple TAL effectors from disparate pathogens, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 20526–20531.
- SAINSBURY S., BERNECKY C., CRAMER P., 2015: Structural basis of transcription initiation by RNA polymerase II, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **16** (3), 129–143.
- SALEH A., PAGÉS M., 2003: Plant AP2/ERF transcription factors, *Genetika* **35** (1), 37–50.
- SANDER J. D., JOUNG J. K., 2014: CRISPR-Cas systems for genome editing, regulation and targeting, *Nat. Biotechnol.* **32** (4), 347–355.

- SHIGEKAWA K., DOWER W. J., 1988: Electroporation of eukaryotes and prokaryotes, a general approach to the introduction of macromolecules into cells, *BioTechniques* **6** (8), 742–751.
- SNUSTAD D.P., SIMMONS M.J., 2017: *Genetika* (2. vydání), MUNI PRESS, Brno, Česká republika, ISBN 978-80-210-8613-5.
- SOMNATH D., 2016: *Basic Concept of Recombinant DNA Technology*, New Delhi: EduPedia Publications, 1–2.
- ŠLANHOFOVÁ H., 2020: Identifikace a charakterizace mutantních rostlin ječmene T1 generace v genu HvABC1, Olomouc, bakalářská práce, Univerzita Palackého, Přírodovědecká fakulta, Laboratoř růstových regulátorů, pp. 45.
- ŠPUNAR J., VACULOVÁ K., ŠPUNAROVÁ M., NESVADBA Z., 2002: Comparison of important parameters of spring and winter barley cultivated in sugar beet production area of Czech Republic, *Rostlinná Výroba* **48**, 237–242.
- TINGAY S., MCELROY D., KALLA R., FIEG S., WANG M., THORNTON S., BRETTELL R., 1997: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated barley transformation, *Plant journal* **11** (6): 1369–1376.
- TOWNSEND J. A., WRIGHT D. A., WINFREY R. J., FU F., MAEDER M. L., JOUNG J. K., VOYTAS D. F., 2009: High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases, *Nature* **459** (7245), 442–445.
- VASIL V., CASTILLO A.M., FROMM M.E., VASIL I.K., 1992: Herbicide Resistant Fertile Transgenic Wheat Plants Obtained by Microprojectile Bombardment of Regenerable Embryogenic Callus, *Nat Biotechnol.* **10**, 667–674.
- VONDREJS V., 2011: *Genové inženýrství IV.*, Karolinum, Praha, ISBN 978-80246-1919-4.
- WAN Y., LEMAUX P.G., 1994: Generation of large numbers of independently transformed fertile barely plants, *Plant Physiol.* **104**, 37–48.
- WESTRA E. R., BUCKLING A., FINERAN P. C., 2014: CRISPR–Cas systems: beyond adaptive immunity, *Nat. Rev. Microbiol.* **12** (5), 317–326.



WIEDENHEFT B., ZHOU K., JINEK M., COYLE S. M., MA W., DOUDNA J. A., 2009: Structural basis for DNase activity of a conserved protein implicated in CRISPR-mediated genome defense, *Structure* **17** (6), 904–912.

XIE Z., NOLAN T.M, JIANG H., YIN Y., 2019: AP2/ERF transcription factor regulatory networks in hormone and abiotic stress responses in Arabidopsis, *Frontiers in Plant Science* **10**, 1–17.

ZHOU H., LIU B., WEEKS D.P., SPALDING M.H., YANG B., 2014: Large chromosomal deletions and heritable small genetic changes induced by CRISPR/Cas9 in rice, *Nucleic Acids Res.* **42**, 10903–10914.

ZIMOLKA J., CERKAL R., DVOŘÁK J., EDLER S., EHRENBERGEROVÁ J., HŘIVNA L., KAMLER J., KLEM K., MILOTOVÁ J., MÍŠA P., PROCHÁZKOVÁ B., PSOTA V., RICHTER R., RYANT P., TICHÝ F., VACULOVÁ K., VÁŇOVÁ M., VEJRAŽKA K., 2006: Ječmen- formy a užitkové směry v České republice (1. vydání), Profi Press, s.r.o., Praha, pp. 11–35.

ZPRÁVA O CELOSVĚTOVÉ POPTÁVCE A DODÁVCE OBILNIN ORGANIZACE FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO) OF THE UNITED NATIONS (vydána 5.3. 2020): FAO Cereal Supply and Demand Brief. Dostupné z : <http://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en/>, staženo 14.6. 2020).