

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



**Příprava linií ječmene *Hordeum vulgare* s umlčeným
genem pro cytokininový receptor HvHK3**

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Autor:	Bc. Kateřina Střelcová
Studijní program:	N1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok:	2017

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

V Olomouci dne

Poděkování

Ráda bych s obrovským respektem poděkovala vedoucí mé diplomové práce Mgr. Márii Škrabišové, PhD., za odborné vedení při vypracování diplomové práce, cenné rady, trpělivost a v neposlední řadě za poskytnutí příjemného pracovního prostředí. Hlavně bych jí ale ráda poděkovala za obrovské úsilí, které vynaložila, aby diplomovou práci se mnou dokončila. Chtěla bych poděkovat i doc. Mgr. Petru Galuszkovi, Ph.D, který mou práci v laboratoři zaštiťoval v posledních měsících studia. Mé poděkování si zaslouží celý kolektiv Oddělení molekulární biologie a především ti, kteří mi věnovali svůj čas i přes jejich vlastní nabitý pracovní program. Zvláštní poděkování patří Mgr. Kataríně Holubové, PhD., která mě naučila metodiku transformace ječmene, i Cintii Marchetti, MSc., která mě při této metodě vedla na konci a kdykoliv jsem ji žádala o pomoc, vždy mi pomohla s úsměvem. Mezi další lidi, kteří nešetřili svou ochotou a kterým bych ráda poděkovala je Mgr. Vendul Florová, která mi pomohla s problémy při izolaci RNA, Mgr. Petra Hloušková, která mi ukázala, jak postupovat při qPCR a pomohla mi s jejím vyhodnocením, a Mgr. Tomáš Hluska, který se podílel na opravě mé diplomové práce. Mé velké díky patří také Mgr. Janě Čížkové, PhD. z Ústavu experimentální biologie za pomoc při selekci diploidních a tetraploidních rostlin.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Bc. Kateřina Střelcová
Název práce	Příprava linií ječmene <i>Hordeum vulgare</i> s umlčeným genem pro cytokininový receptor HvHK3
Typ práce	Diplomová
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D.
Rok obhajoby práce	2017
Abstrakt	<p>Cytokinininy jsou rostlinné hormony, které hrají zásadní roli během celého životního cyklu rostliny. Za fyziologických podmínek jsou hladiny aktivních forem udržovány pomocí regulace enzymů metabolismu cytokininů. Během působení stresu, ať už biotického nebo abiotického, se navíc k regulaci aktivních forem přidává i modulace na úrovni percepce. V dřívějších pracích zabývajících se přípravou transgenních rostlin ječmene (<i>Hordeum vulgare</i>) overexprimujících gen <i>cytokinin dehydrogenasy 1</i> z <i>Arabidopsis thaliana</i> (enzym degradace cytokininů) bylo zjištěno, že je percepce cytokininů modulována na úrovni transkriptu a to konkrétně u genu pro cytokininový receptor <i>HvHK3</i>. Ten je analogem pro gen <i>histidin kinasy 3</i> z <i>Arabidopsis thaliana</i>, který, jak bylo zjištěno, hraje hlavní roli v cytokinin-zprostředkovaném procesu prodloužení životaschopnosti listu. Příprava mutanta ječmene s umlčeným genem <i>HvHK3</i> by tak přispěla k objasnění funkce receptoru <i>HvHK3</i> v regulaci signalizace cytokininů. Náplní teoretické části této diplomové práce je vypracovat rešerši na téma porovnání dostupných molekulárně-biologických metod pro umlčování genů v ječmeni. Cílem experimentální části pak je připravit linii ječmene s umlčeným genem <i>HvHK3</i> pomocí technologie RNA interference.</p>
Klíčová slova	Cytokinininy, <i>Hordeum vulgare</i> , receptor cytokininů <i>HvHK3</i> , umlčování genů pomocí RNAi, transformace ječmene pomocí <i>Agrobacterium tumefaciens</i>
Počet stran	82
Počet příloh	1

Jazyk

Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Bc. Kateřina Střelcová
Title	Preparation of barley <i>Hordeum vulgare</i> lines with silenced gene for cytokinin receptor HvHK3
Type of thesis	Diploma thesis
Department	Department of biochemistry
Supervisor	Mgr. Mária Škrabišová, Ph.D
The year of presentation	2017
Abstract	<p>Cytokinins are phytohormones, which have essential role during the whole life cycle of plants. Under physiological conditions the levels of active forms are maintained through regulation of cytokinin metabolism. Under stress conditions, whether biotic or abiotic, regulation of active forms is mediated by modulation on the level of perception. In earlier works on the subject of preparation of transgenic line of barley (<i>Hordeum vulgare</i>) overexpressing <i>cytokinin dehydrogenase 1</i> gene from <i>Arabidopsis thaliana</i> (cytokinin degradation enzyme), it was ascertained that the perception of cytokinins is modulated on the level of transcription, particularly concerning the cytokinin receptor gene <i>HvHK3</i>. The receptor is an analogue of <i>histidine kinase 3</i> from <i>Arabidopsis thaliana</i> which is essential for leaf's life-lengthening process mediated by cytokinins. Preparation of barley mutant with silenced <i>HvHK3</i> gene would contribute to elucidation of the HvHK3 receptor function in regulating cytokinin signaling. The purpose of the theoretical part of this diploma thesis is to compare standing molecular-biological methods for gene silencing in barley. The aim of the experimental part of this diploma thesis is to prepare a mutant line of barley with silenced HvHK3 gene using RNA interference technology.</p>
Keywords	Cytokinins, cytokinin receptor HvHK3, <i>Hordeum vulgare</i> , RNAi gene silencing, transformation by <i>Agrobacterium tumefaciens</i>

Number of pages	82
Number of appendices	1
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	3
2.1	Metody umlčení genové exprese	3
2.1.1	Transkripční genové umlčování	3
2.1.2	Post-transkripční genové umlčování	4
2.1.2.1	Mechanismus a typy RNA umlčování	5
2.1.2.2	Technologie RNA umlčování využívané u rostlin	8
2.2	Metody editování genomu	10
2.2.1	Meganukleasy	12
2.2.2	Nukleasy s motivem zinkových prstů	12
2.2.3	TALE nukleasy	14
2.2.4	CRISPR/Cas9 systém	15
2.3	Využití metod editování genomu u rostlin	17
2.4	Cytokininy	17
2.4.1	Receptory, percepce a transdukce cytokininového signálu	18
2.4.1.1	Receptory cytokininů v modelových rostlinách	20
2.4.1.2	Receptor HvHK3	22
2.5	Navržení strategie pro umlčení <i>HvHK3</i> v ječmeni	24
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	27
3.1	Materiál	27
3.1.1	Biologický materiál a enzymy	27
3.1.2	Primery	29
3.1.3	Chemikálie	30
3.1.4	Média a roztoky	31
3.1.5	Kity	33
3.1.6	Přístrojové vybavení	33
3.1.7	Programy	34
3.2	Metody	35
3.2.1	Kultivace bakterií	35
3.2.2	Izolace plasmidové DNA	35

3.2.3	Purifikace DNA	36
3.2.4	PCR	36
3.2.5	Klonování do vektoru pDrive	38
3.2.6	Transformace <i>E. coli</i> teplotním šokem	39
3.2.7	Transformace <i>A. tumefaciens</i> elektroporací	39
3.2.8	Restrikce DNA	39
3.2.9	Ligace	40
3.2.10	Agarosová elektroforéza	40
3.2.11	Sekvence DNA	41
3.2.12	LR Rekombinace	41
3.2.13	Transformace ječmene	41
3.2.14	Měření polyploidie	43
3.2.15	Izolace genomové DNA	43
3.2.16	Sběr a příprava rostlinného materiálu	44
3.2.17	Izolace RNA	44
3.2.18	Ošetření RNA DNAsou	45
3.2.19	Přečištění RNA pomocí magnetických kuliček	45
3.2.20	Reverzní transkripce	45
3.2.21	Real-time qPCR	46
4	VÝSLEDKY A DISKUZE	47
4.1	Ověření PCR produktu pro HvHK3	47
4.2	Ověření klonování do vektoru pDrive restrikční analýzou a sekvenací	48
4.3	Ověření klonování do vektoru pEntr1A restrikční analýzou	50
4.4	Ověření rekombinace do vektoru pBract207 restrikční analýzou	52
4.4.1	Ověření rekombinace do vektoru pBract207 pomocí PCR	54
4.5	Ověření transformace <i>A. tumefaciens</i> restrikční analýzou a sekvenací	55
4.6	Transformace a regenerace ječmene <i>Hordeum vulgare</i>	56
4.7	Ověření transformace ječmene	57
4.8	Stanovení polyploidie transgenních rostlin	58
4.9	Stanovení fenotypu transgenních rostlin	59
4.10	Real-time qPCR	61

5	ZÁVĚR	63
6	LITERATURA	65
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK	77
8	PŘÍLOHY	80

Cíle práce

- Vypracování literární rešerše na téma metody umlčení genové exprese, metody editování genomu, cytokininy, percepce cytokininového signálu, cytokininové receptory a receptor HvHK3.
- Navržení strategie pro umlčení *HvHK3*.
- Příprava binárního vektoru pro umlčení *HvHK3* metodou RNAi.
- Transformace agrobakteria *Agrobacterium tumefaciens* připraveným binárním vektorem.
- Transformace ječmene *Hordeum vulgare* pomocí agrobakteria: izolace a transformace embryí ječmene, selekce transgenních kalusů, regenerace transgenních rostlin.
- Ověření transgenních linií ječmene s umlčeným genem pro *HvHK3*: ověření transgenních rostlin pomocí PCR, stanovení ploidie.
- Stanovení fenotypu transgenních rostlin, stanovení míry exprese *HvHK3* pomocí real-time qPCR.

1 ÚVOD

Díky Projektu lidského genomu (Lander *et al.*, 2001) byl rozluštěn genetický kód člověka a před vědci ležela ještě větší výzva v podobě určení funkce desítek tisíc neznámých genů (Birney *et al.*, 2007), jejichž znalost by mohla pomoci při léčbě různých onemocnění. V jiné oblasti výzkumu se vědci zabývali problémem, jak by bylo možné geneticky modifikovat kulturní plodiny, aby měly větší výnosy a byly odolnější v měnícím se prostředí. S tímto cílem se začaly sekvencovat také genomy rostlin a určovat funkce jejich neznámých genů. Díky těmto dvěma výzkumným oblastem se začaly prudce vyvíjet metody pro genetické modifikace organismů.

Stanovením funkce neznámých genů se zabývá reverzní genetika, která využívá řadu metod, jimiž lze ovlivnit normální expresi genu a následně pozorovat změnu fenotypu. Nejstarší využívaná metoda homologní rekombinace se dnes využívá omezeně pro svou neefektivnost, možný mutagenní efekt, náhodnou integraci a zejména časovou náročnost výzkumu. Další přístup umožňující umlčení genu s využitím interference RNA je dodnes hojně používaná metoda, nicméně při této metodě nemusí docházet ke stoprocentnímu umlčení genu, takže výsledný fenotyp nemusí plně vypovídat o funkci genu. Jsou proto vyvíjeny novější a efektivnější metody editování genomu, například ZFNs (zinc-finger nucleases, nukleasy s motivem zinkových prstů), TALENs (transcription activator-like effector nucleases, nukleasy na bázi transkripčního efektoru podobného aktivátoru) nebo CRISPR/Cas9 systém (clustered regularly interspaced short palindromic repeats with associated protein 9, systém klastrů pravidelně rozmístěných krátkých repetitiv s asociovaným proteinem 9), které využívají kombinaci DNA-vazebné domény specifické pro požadovanou sekvenci a štěpící domény vytvářející dvouřetězcové zlomy DNA s následnou indukci přirozených opravných mechanismů DNA, což umožňuje úplné vyřazení genu z funkce.

Rostlinné hormony cytokininy jsou esenciální pro vývoj rostliny. Podílí se na celé řadě klíčových procesů u rostlin, mezi něž se řadí i odpověď na biotický nebo abiotický stres. Transgenní rostliny ječmene (*Hordeum vulgare*) nadexprimující *cytokinin dehydrogenasu 1* pod kořenově specifickým promotorem β -glukosidasy se projeví fenotypem tolerantnějším vůči suchu (Pospíšilová *et al.*, 2016). Analýza transkriptomu následně ukázala sníženou expresi genu *HvHK3* kódujícího cytokininový receptor (Vojta *et al.*, 2016). Vznikl tak zájem zjistit, jaký fenotyp by měly transgenní rostliny

ječmene s cíleně umlčeným genem *HvHK3*, čehož se dá docílit s využitím metod RNA umlčování nebo editace genomu.

V posledních letech se v našem podnebném pásmu potýkáme se změnami klimatických podmínek, jejichž projevem jsou v letních měsících zvýšené teploty sahající k extrémům a delší a častější období sucha. U kulturních plodin, kterým takovéto podmínky nevyhovují, dochází často ke ztrátám na výnosech. Proto se výzkum zaměřil na přípravu transgenních rostlin, které by vůči extrémnějším podmínkám byly odolnější. Do takového výzkumu lze zahrnout i přípravu transgenního ječmene, který by byl odolnější vůči stresu suchem.

Pro přípravu mutantní rostliny ječmene s umlčeným cytokininovým receptorem *HvHK3* byla zvolena metoda RNA interference s využitím RNA vlásenky hpRNA (hairpin RNA). K tomuto účelu bylo nutné připravit binární vektor nesoucí umlčovací kazetu, která v transgenním ječmeni utvoří vlásenku a iniciuje mechanismus RNA umlčení. Očekávaný fenotyp mutantu *hvhk3* by měl vykazovat zvýšenou toleranci vůči stresu suchem, stejně jako v případě mutantů *Arabidopsis thaliana* s nefunkčním genem *ahk3* nebo *ahk2* (Tran *et al.*, 2007). Tato práce by tak mohla stát na počátku vývoje transgenních linií ječmene, u kterých by nedocházelo ke ztrátám na výnosech vlivem nedostatku vody.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

2.1 Metody umlčení genové exprese

S rozvojem metod pro genetické modifikace rostlin na konci minulého století vznikl zájem zjistit, proč se mnohé transgenní rostliny po vložení transgenu nechovají podle očekávání. Bylo zjištěno, že aktivita genu není dána pouze silným promotorem řídícím transkripci, ale také epigenetickými mechanismy, které ovlivňují expresi a mohou zablokovat transkripci nebo akumulaci mRNA (messenger RNA), což vede naopak k umlčení genu (Stam *et al.*, 1997).

Významným průlomem při zkoumání umlčení genové exprese byl experiment s transgenním tabákem, u kterého došlo k vzájemné interakci dvou homologních promotorů, což vedlo k metylaci DNA a tím k umlčení genu (Matzke *et al.*, 1989). Tento fenomén byl pojmenován jako umlčení genů závislé na homologii (HDGS, homology-dependent gene silencing). HDGS se dá rozdělit na dva základní typy podle toho, na jaké úrovni expresi genu ovlivňuje. První typ se nazývá transkripční genové umlčování (TGS, transcription gene silencing) a je spojeno s umlčováním na úrovni transkripce metylací promotoru a remodelací chromatinu. Druhý typ nazývaný post-transkripční genové umlčování (PTGS, post-transcription gene silencing) je spojen s degradací mRNA (Jauvion *et al.*, 2012). Díky tomu je možné pomocí Northern blot analýzy cytoplazmatické RNA spojené s kontinuální transkripcí nebo RNAsovou protekční analýzou stanovit, o jaký typ HDGS se jedná. TGS se projevuje metylací v oblasti promotoru, zatímco PTGS souvisí s metylací sekvence kódující oblasti. Umlčení genu na úrovni transkripce je mitoticky i meioticky dědičné, post-transkripční genové umlčování je meioticky reversibilní.

2.1.1 Transkripční genové umlčování

Pro potlačení transkripce DNA jsou známy 3 základní mechanismy podle charakteru zdroje, který je vyvolává: methylace DNA řízená RNA, metylace DNA nezávislá na malých RNA a úprava chromatinu (Cokus *et al.*, 2008). Nejvíce prozkoumaný je mechanismus methylace DNA řízený malými RNA, který byl poprvé objeven při studiu replikace viroidu vřetenovitosti hlíz bramboru u transgenních rostlin tabáku po vložení cDNA (komplementární DNA) viroidu do jaderného genomu (Wassenegger *et al.*, 1994). Po autonomní replikaci viroidní RNA došlo k metylaci specifické sekvence

cDNA. Později bylo zjištěno, že methylace promotoru cDNA souvisela s vytvořením dvouvláknové RNA, která byla enzymem rozštěpena na malé RNA (Mette *et al.*, 2000). Právě malá interferenční mikro RNA (miRNA) je zodpovědná za metylaci promotoru cílového genu a klíčová při transkripčním genovém umlčování (Cokus *et al.*, 2008). Tento proces je mechanicky propojen s PTGS (Sijen *et al.*, 2001).

U TGS se rozlišuje mezi *cis* nebo *trans* inaktivací. Za *cis* inaktivaci je považován proces, při kterém je transgen integrován do místa, které je hypermethylováno a umlčeno, nebo s takovou sekvencí sousedí. Methylace se v takovém případě může rozšířit i na sekvenci transgenů a umlčet je (Prols a Meyer, 1992). K *cis* inaktivaci ale může také dojít, pokud je více kopií transgenů inkorporováno na hypometylované místo chromozomu. Tomuto procesu se říká umlčování genu vyvolané opakováním (RIGS, repeat-induced gene silencing) a je spojeno se změnami v uspořádání chromatinu. Mezi počtem kopií a mírou exprese genu byla zjištěna nepřímá úměra. Čím více kopií genu je inkorporováno, tím spíše dojde k jeho umlčení (Assaad *et al.*, 1993).

K *trans* inaktivaci dochází, pokud je umlčení doposud aktivního genu vyvoláno transgenem s homologní sekvencí (Matzke *et al.*, 1989), transgenem řízeným stejným promotorem nebo dsRNA (dvouřetězcová RNA) obsahující sekvenci promotoru (Mette *et al.*, 2000). Ve všech případech dochází k *de novo* methylaci a umlčení transgenů. TGS *trans* inaktivace může být zprostředkována také viry. Konkrétně virus mozaiky kvěťáku (CaMV) může způsobit umlčení transgenů na úrovni transkripce, pokud jsou exprimovány pod kontrolou promotoru *CaMV 35S* (Al-Kaff *et al.*, 1998).

2.1.2 Post-transkripční genové umlčování

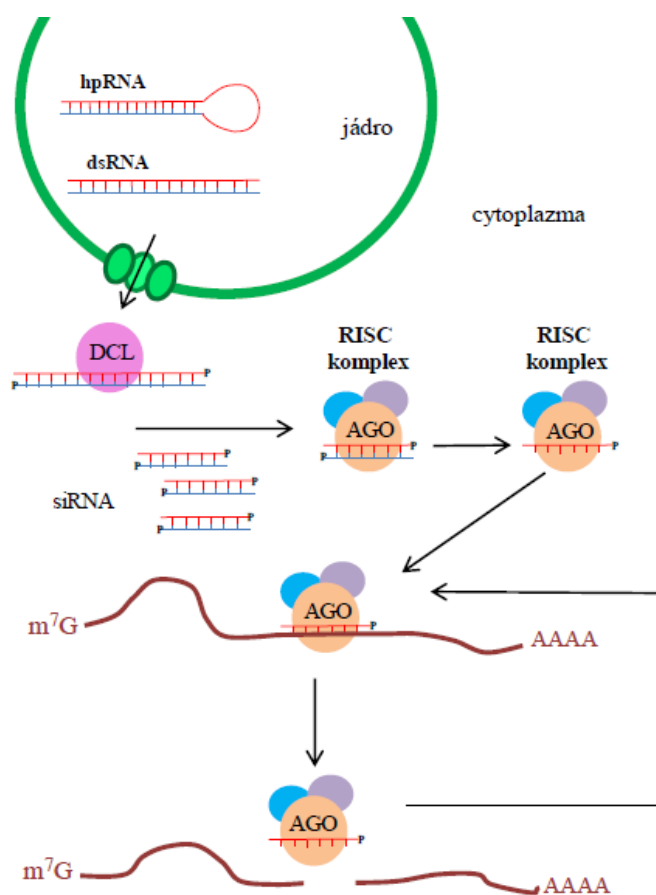
Umlčování genů může být označeno za post-transkripční, pokud nedochází k akumulaci transkribované RNA i přestože transkripce probíhá kontinuálně (Vaucheret *et al.*, 2001). PTGS výrazně snižuje množství nahromaděné mRNA v cytoplasmě bez současného ovlivnění transkripce (Decarvalho *et al.*, 1992; Vanblockland *et al.*, 1994), neboť výsledkem mechanismu PTGS je degradace množství homologních RNA, což bylo poprvé pozorováno u rostlin po zavedení kopie endogenního genu a odpovídající cDNA pod kontrolou exogenního promotoru (Napoli *et al.*, 1990; Smith *et al.*, 1990).

Stejně jako TGS, i PTGS se dá rozdělit podle toho, zda se jedná o *cis* nebo *trans* inaktivaci. O *cis* inaktivaci se jedná v případě, že dojde k degradaci pouze RNA, která

pochází z umlčovacího zdroje. Pokud ale dojde k degradaci homologní RNA k RNA transkribované ze zdroje umlčení, mluvíme o *trans* inaktivaci. Při kombinaci obou případů, tedy při degradaci RNA transkribované z umlčovacího zdroje a všech homologních RNA, dochází simultánně k *cis* a *trans* inaktivaci.

2.1.2.1 Mechanismus a typy RNA umlčování

RNA umlčování patří mezi velmi konzervované mechanismy eukaryot. Může být vyvoláno dvouřetězcovou molekulou RNA (dsRNA) nebo RNA vlásenkou (hpRNA). Celému procesu, při kterém se nekódující molekula RNA váže na homologní mRNA a iniciuje její degradaci, se říká interference RNA (RNAi, RNA interference) (Obr. 1).



Obrázek. 1: Schéma procesu interference RNA. hpRNA nebo dsRNA je exportována z jádra do cytoplazmy, kde je zpracována DCL proteinem na malé interferenční siRNA, které jsou rozpoznány a navázány na RISC komplex, jehož součástí je i endonukleasa AGO štěpící siRNA na dva samostatné řetězce. Řídící řetězec navádí RISC komplex k cílové mRNA, která je rozštěpena a následně degradována. RISC komplex aktivovaný řídicím řetězcem je schopný vazby k další homologní mRNA.

dsRNA nebo hpRNA je v cytoplasmě zpracována na menší dvouřetězcovou siRNA (small interfering RNA, malá interferující RNA) o velikosti 22 nukleotidů enzymem z rodiny RNAs III se specifitou pro dsRNA, který se nazývá Dicer nebo DCL (Dicer-like protein, protein podobný Diceru) (Bernstein *et al.*, 2001). siRNA je následně rozpoznána umlčovacím komplexem indukovaným RNA (RISC, RNA-induced silencing complex) (Martinez *et al.*, 2002), jehož součástí je i endonukleasa z rodiny argonaut proteinů, AGO2 (Liu *et al.*, 2004). Právě AGO2 je zodpovědný za štěpící aktivitu RISC komplexu a rozštěpení dvouvláknové siRNA za tvorby jednovláknového řídicího antisense vlákna, které pak slouží k navedení RICS komplexu k cílové homologní mRNA. Aby došlo úspěšně ke štěpení RNA, řídicí vlákno musí být zcela komplementární k cílové mRNA (Martinez *et al.*, 2002). Součástí AGO2 je tzv. PIWI doména podobná RNase H, která katalyzuje vazbu řídicího vlákna na 5'-konci (Parker *et al.*, 2005) a PAZ doména, která pak zprostředkovává vazbu na 3'-konci (Ma *et al.*, 2005). mRNA je rozštěpena mezi 10. a 11. bází od 5'-konce řídicího vlákna (Elbashir *et al.*, 2001), což následně vede k degradaci naštěpené mRNA buněčnými exonukleasami (Orban a Izaurralde, 2005). Po aktivaci RISC komplexu po navázání siRNA může dojít k několika cyklům štěpení mRNA, což umožňuje účinné umlčení cílového genu (Hutvagner a Zamore, 2002).

Podle zdroje dsRNA nebo hpRNA a cíle siRNA se RNA umlčování rozdělilo do 4 překrývajících se, ale funkčně odlišných drah: dráha miRNA (microRNA), dráha tasiRNA (trans-acting small interfering RNA, malá interferenční RNA působící v *trans* inaktivaci), dráha DNA methylace řízené RNA (RdDM, RNA-directed DNA methylation) a dráha exogenního RNA umlčování (Baulcombe, 2004; Eamens *et al.*, 2008). S rozlišením jednotlivých drah souvisí vývoj mnoha komponent podílejících se na mechanismu umlčení. Například u modelového organismu *Arabidopsis thaliana* můžeme najít čtyři různé DCL, šest RNA-dependentních RNA polymeras (RDRs, RNA-dependent RNA polymerases) nebo deset AGOs.

miRNA se podobají siRNA, ale jejich původ vychází z MIR genů (Bartel, 2009), které jsou transkribovány RNA polymerasou II za tvorby primárního transkriptu miRNA (pri-miRNA) složeného do vlásenky, která v místě tvorby dvouřetězcové struktury nemusí být zcela komplementární. Pri-miRNA je ještě v jádře zpracována pomocí DCL1 s asistencí proteinu DRB1 (dsRNA binding protein 1, protein vázající dvouřetězcovou RNA 1) nebo HYL1 na prekurzorovou pre-miRNA (Kurihara *et al.*, 2004; Kurihara *et al.*, 2006; Eamens *et al.*, 2009). DCL1 dále zpracovává

prekurzorovou molekulu miRNA na nedokonale spárovaný RNA duplex o 21 nukleotidech složený z řídicího vlákna miRNA a doprovodného vlákna. RNA methylasa HUA ENHANCER1 (HEN1) methyluje 2'-hydroxylovou skupinu na 3'-konci duplexu, což pravděpodobně slouží k ochraně duplexu před degradací (Li *et al.*, 2005). Duplex je následně transportován do cytosolu, kde se napojí na AGO protein a utvoří RISC komplex. Rostlinné řídicí řetězce miRNA se s vysokou komplementaritou vážou na cílovou mRNA. Oproti tomu miRNA u živočichů jsou cíleny na sekvenci 3'-UTR oblasti genu (untranslated region, nepřekládaná oblast genu), ke které nejsou zcela komplementární (Millar a Waterhouse, 2005). Hlavní význam miRNA je ovlivňování vývoje rostliny skrze kontrolu exprese regulačních genů.

tasiRNA patří mezi malé RNA transkribované RNA polymerasou II z oblasti TAS genů (Vazquez *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2005; Peragine *et al.*, 2004). Tvorba tasiRNA je iniciována specifickými miRNA o velikosti přesně 22 nukleotidů, které štěpí TAS RNA prekurzor. Naštěpené fragmenty TAS transkriptu jsou přeměněny RDR6 na dlouhé molekuly dsRNA dále zpracovávané DCL4 na siRNA o 21 nukleotidech (Xie *et al.*, 2005; Yoshikawa *et al.*, 2005; Cuperus *et al.*, 2010). Stejně jako u miRNA, tasiRNA jsou methylovány HEN1 a dále interagují s AGO1 nebo AGO7, aby mohlo dojít k řízené degradaci cílové mRNA (Li *et al.*, 2005). U *Arabidopsis thaliana* bylo prokázáno, že se tasiRNA podílejí na regulaci faktorů auxinové odpovědi účastnících se přechodu rostliny z juvenilního do reprodukčního období (Fahlgren *et al.*, 2006). U mnoha rostlinných druhů byly popsány tzv. fázové siRNA, neboli phasiRNA, které jsou biogenezi shodné s tasiRNA (Johnson *et al.*, 2009; Creasey *et al.*, 2014; Fei *et al.*, 2013). Templátem pro jejich tvorbu může být RNA transposonů, genů kódující proteiny, nebo repetitivních úseků DNA. Přestože jejich funkce prozatím nebyla plně objasněna, phasiRNA odvozené od genů rezistence vůči nemocem složených z repetitivních úseků bohatých na leucin se podílejí na kontrole exprese obranných genů hrajících roli při dynamické odpovědi na stres (Zhai *et al.*, 2011; Shivaprasad *et al.*, 2012).

Dráha DNA metylace řízená RNA je specifická pouze pro rostliny. Jejím výsledkem je *de novo* metylace a TGS, které je řízeno siRNA o 24 nukleotidech (Feng *et al.*, 2010; Haag *et al.*, 2011; Zhang *et al.*, 2013). Na biogenezi těchto siRNA se podílí RNA polymerasa IV, RDR2, DCL3, HEN1 a AGO4. AGO4-siRNA komplex interaguje s dlouhou molekulou RNA přepsanou z cílové DNA pomocí RNA polymerasy V, aby mohla být do procesu zapojena methylasa DRM2 (domains rearranged methylase 2,

methyltransferasa 2 s uspořádanými doménami) katalyzující přímou *de novo* metylaci cytosinů cílové DNA (Ye *et al.*, 2012; Nuthikattu *et al.*, 2013). Hlavním smyslem procesu RdDM je umlčování transpozonů a repetice DNA a udržování stabilního genomu.

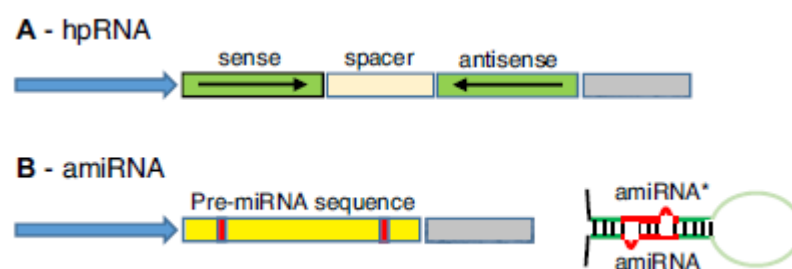
Poslední z drah je u RNA umlčování vyvolaná exogenní sense RNA nebo viry, tzv. VIGS (virus induced gene silencing). Jak bylo zjištěno, umlčení vyvolané exogenní nukleovou kyselinou je velmi podobné dráze RdDM a procesům týkajících se zpracování endogenních siRNA. PTGS vyvolané sense transgenem se podobá tasiRNA umlčování, neboť se ho účastní RDR6, DCL4 a AGO1 (de Alba *et al.*, 2013). Obecně je infekce rostliny jakýmkoliv virem spojována s hromaděním malých RNA, které jsou produkovány z dsRNA viru stejným procesem, jakým jsou zpracovány siRNA (Ding a Voinnet, 2007; Wang *et al.*, 2012). Virální RNA je tak zároveň spouštěčem i cílem umlčovacího procesu, který se u rostlin vyskytuje jako přirozená antivirální obrana (Waterhouse *et al.*, 2001). U RNA virů dochází ke zpracování siRNA nejčastěji DCL4, méně často pak DCL2. V souvislosti se studii, které ukazují, že je pro akumulaci virálních siRNA zapotřebí hostitelská RDR se předpokládá, že biogeneze těchto siRNA probíhá podobně jako u endogenních tasiRNA (Moissiard *et al.*, 2006; Molnar *et al.*, 2005; Diaz-Perdon *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2010). U DNA virů se na umlčovacím procesu podílí DCL3 za tvorby siRNA o 24 nukleotidech, což vede k umlčování RdDM, které se může projevit jak na úrovni transkripční tak post-transkripční. (Rodriguez-Negrete *et al.*, 2009; Yadav *et al.*, 2011). Aby byly viry schopné reagovat na obranný mechanismus rostlin, vyvinuly si taktiku pro potlačení RNA umlčování (Burgyan a Havelda, 2011; Hohn *et al.*, 2011). Různé přístupy mohou inhibovat RNA umlčování v různých krocích drah. Například viry jsou schopné indukovat degradaci AGO proteinu, nebo vázat siRNA tak, aby bylo zabráněno tvorbě RISC komplexu (Itaya *et al.*, 2007; Wang *et al.*, 2004).

2.1.2.2 Technologie RNA umlčování využívané u rostlin

Vedle výše uvedených metod byly dále vyvinuty technologie indukující PTGS s využitím umělých tasiRNA (Gutierrez-Nava *et al.*, 2008), transgenů se dvěma tandemovými repeticemi cílové sekvence (Wang a Waterhouse, 2000), transgenu složeného z obrácené repetice sekvence 3' UTR oblasti (Brummell *et al.*, 2003) nebo transgenu bez transkripčního terminátoru (Nicholson a Srivastava, 2009). V dnešní době

se ale z RNA technologií cíleného umlčení genové exprese využívají především vlásenková hpRNA (hairpin RNA) a amiRNA (artificial miRNA, syntetická miRNA) (obr. 2).

Poprvé byla hpRNA indukující interferenci RNA úspěšně použita v roce 1998 a od té doby se hpRNA široce využívá jako prostředek cíleného RNA umlčování (Waterhouse *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2000; Watson *et al.*, 2005). Typický konstrukt pro hpRNA se skládá ze sense a antisense sekvencí části cílové mRNA, které jsou od sebe odděleny nekomplementárním sekvencí. Tato oddělovací sekvence slouží především ke stabilizaci konstruktů při klonování v bakteriích, neboť konstrukty složené z obrácených repetit jsou v bakteriích velmi nestabilní. Kromě toho bylo prokázáno, že využití intronu zvyšuje účinnost samotného umlčení (Smith *et al.*, 2000a). Sense a antisense sekvence jsou k sobě komplementární a vytvářejí dsRNA, která je primárně zpracována DCL4, ale z části se účastní i DCL2 a DCL3. Výsledkem je akumulace množství siRNA o 21 nukleotidech a v malém zastoupení i výskyt siRNA o 22 a 24 nukleotidech (Wang *et al.*, 2008). Obvykle jsou připravovány hpRNA cílící na sekvenci mRNA. Ovšem i s použitím hpRNA se zacílením na sekvenci intronu bylo docíleno účinného umlčení, což naznačuje, že umlčení vyvolané hpRNA z části probíhá v jádře (Hoffer *et al.*, 2011). Pro přípravu hpRNA bylo vyvinuto několik klonovacích vektorů usnadňujících jejich přípravu, jako například vektory pHannibal nebo pHellsgate (Helliwell a Waterhouse, 2005; Wesley *et al.*, 2001).



Obrázek 2: Schéma struktur hpRNA a amiRNA nejčastěji používaných k cílenému umlčení genové exprese. (A) hpRNA složená z promotoru (modře), sense a antisense vlákna se sekvencí cílové mRNA (zeleně), oddělovací sekvence, kterou nejčastěji bývá intron (béžově), a terminátoru (šedě), (B) amiRNA složená z promotoru (modře), prekurzorové miRNA sekvence (žlutě) s úseky odpovídající cílové mRNA (červeně), a terminátoru (šedě), schéma znázorňuje i amiRNA složenou do vlásenkové smyčky s řídicím vláknem (amiRNA) a doprovodným vláknem (amiRNA*) (převzato a upraveno z Guo *et al.*, 2016).

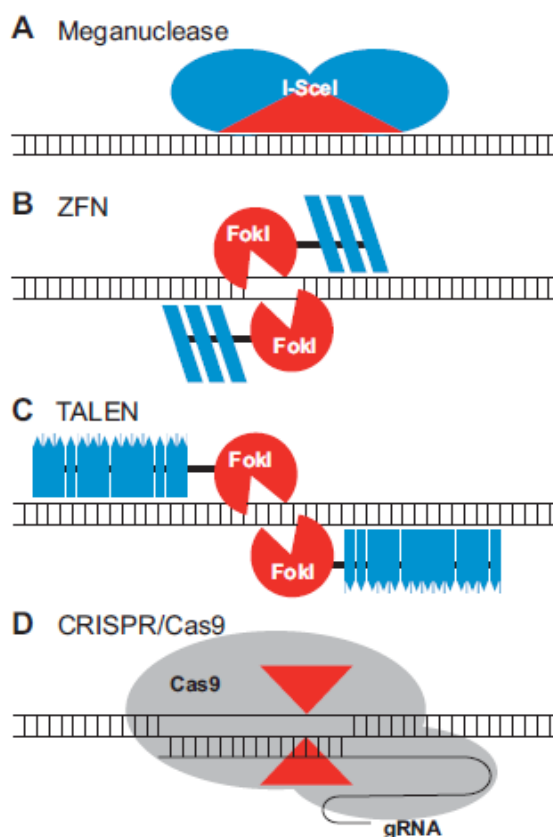
Alternativní postup RNA umlčování využívá uměle připravené miRNA, neboli amiRNA. Konstrukt amiRNA je připravený nahrazením řídicího vlákna původní miRNA sekvencí komplementární k cílové mRNA a doprovodného vlákna původní miRNA sekvencí navrženou tak, aby byla zachována původní přirozená struktura vlásečkové smyčky (Schwab *et al.*, 2006). AmiRNA umlčení probíhá stejně jako u endogenní dráhy miRNA. Příprava konstrukt amiRNA je oproti hpRNA jednodušší. Navíc umlčování probíhá za účasti pouze jednoho typu malé RNA o velikosti 21 nukleotidů, čím je podstatně snížena pravděpodobnost off-target efektu. Nevýhodou ovšem je nutnost pečlivého výběru sekvence, ze které bude konstrukt složen, aby došlo ke správné kooperaci s AGO proteinem.

2.2 Metody editování genomu

Zvýšená efektivita novějších metod editování genomu je dána umožněním modifikace genomu na přesně požadovaném místě. Tím je zvýšena přesnost oprav nebo vložení transgenní DNA, toxicita buněk je omezena a reprodukovatelnost zaručena (Voytas a Gao, 2014). Tyto metody využívají programovatelné místně specifické nukleasy (SSNs, site-specific nucleases) složené ze sekvenčně specifické vazebné DNA domény sfúzované s nespecifickým DNA štěpným modulem (Urnov *et al.*, 2010).

Syntetické nukleasy jsou schopné vytvářet dvouřetězcové zlomy (DSBs, double-strand breaks) na specifických místech, což následně v těchto místech stimuluje buněčné opravné mechanismy DNA jako je homologii řízená oprava (HDR, homology directed repair) nebo nehomologní spojování konců (NHEJ, non-homologous end joining) (Wyman a Kanaar, 2006). Většina DSBs bývá opravena mechanismem NHEJ, při kterém bývají na místě zlomu zavedeny různé mutace vedoucí k narušení čtecího rámce. Proto se metody editování genomu využívají především v reverzní genetice k úplnému vyřazení genu z provozu (Bortesi a Fischer, 2015; Paul a Qi, 2016). Při opravě pomocí HDR mohou být ale využity pro množství genetických modifikací zahrnující inserce, delece nebo opravy škodlivých mutací. K opravě mechanismem HDR může dojít v případě, že je k dispozici homologní chromosom nebo jiná homologní DNA, která může sloužit jako templát. Tyto opravy mají velký potenciál v přesně cílených genetických modifikacích, nicméně v dnešní době jsou velmi málo účinné (Schiml *et al.*, 2014; Schiml a Puchta, 2016).

Metody editování genomu již byly úspěšně použity u buněčných kultur (Porteus a Baltimore, 2003), rostlin (Lloyd *et al.*, 2005) celých zvířat (Urnov *et al.*, 2005) a také u člověka (Christian *et al.*, 2010). V současnosti jsou používány 4 základní druhy nukleas: meganukleasy (Smith *et al.*, 2006), nukleasy s motivem zinkových prstů (Kim *et al.*, 1996), TALE nukleasy (Boch *et al.*, 2009) a nukleasy systému CRISPR/Cas9 (Ishino *et al.*, 1987) (Obr. 3).



Obrázek 3: schéma čtyř základních druhů sekvenčně specifických nukleas, (A) meganukleasa, I-SceI je vázáno na cílovou DNA, katalytická doména zodpovědná za sekvenční specifitu je zobrazena červeně, (B) dimer nukleas s motivem zinkových prstů, modře jsou zobrazeny domény zodpovědná za vazbu na specifickou sekvenci, červeně jsou zobrazeny domény restriční endonukleasy FokI zodpovědné za štěpení DNA, (C) dimer TALENs, modře jsou zobrazeny domény zodpovědná za vazbu na specifickou sekvenci, červeně jsou zobrazeny domény restriční endonukleasy FokI zodpovědné za štěpení DNA, (D) CRISPR/Cas9 systém rozpoznávající cílovou sekvenci díky řídicí RNA, červeně jsou zobrazeny dvě domény proteinu Cas9 s nucleasovou aktivitou štěpící DNA, (převzato z Voytas a Gao, 2014).

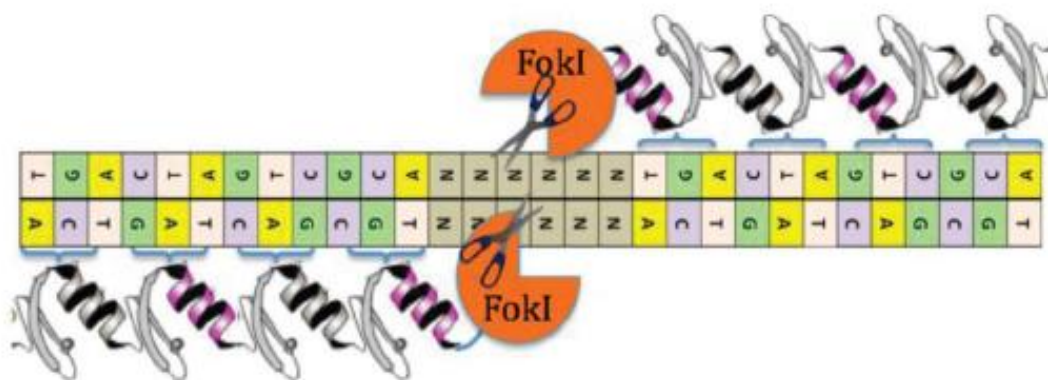
2.2.1 Meganukleasy

Meganukleasy patří do třídy enzymů, která byla poprvé objevena u kvasinek (Jacquier a Dujon, 1985). Jsou vysoce sekvenčně specifické a výkonné při vytváření dvouřetězcových zlomů a následné stimulaci opravy nejčastěji homologní rekombinací (Donoho *et al.*, 1998, Szczepek *et al.*, 2007). Rozpoznávají dlouhé sekvence DNA (14 – 40 bp) díky čemuž jsou pro buňky méně toxické než ZFN. Jejich nomenklatura se podobá té pro restriční endonukleasy, ale využívá předpony podle toho, zda jsou kódovány v intronu (I), inteinu (PI) nebo samostatně (F) (Roberts *et al.*, 2003). Meganukleasy se dělí do pěti rodin podle sekvence a strukturního motivu: LAGLIDADG, GIY-YIG, HNH, His-Cys box a PD-(D/E)XK (Orlowski *et al.*, 2007; Zhao *et al.*, 2007), přičemž enzymová rodina s motivem LAGLIDADG je z nich nejvíce prozkoumaná a zástupce lze nalézt ve všech taxonomických říších (Grishin *et al.*, 2010). Jedná se o enzymy katalyzující laterální přenos jejich kódujícího intronu/inteinu díky štěpení homologní alely, která tento intron/intein postrádá, a indukci opravy homologní rekombinací využívající jako templát alelu obsahující intron/intein (Thierry a Dujon, 1992). Mohou vykazovat dvojí aktivitu a to jako RNA maturasy usnadňující sestřih vlastního intronu/inteinu, nebo jako vysoce specifické endonukleasy štěpící spojení exon-exon v místě jejich intronu. Proto mohou být využity ke genetickým modifikacím DNA v oblasti jejich cílové sekvence (Choulika *et al.*, 1995). LAGLIDADG meganukleasy se mohou vyskytovat ve formě homodimeru se zacílením na palindromatické nebo pseudopalindromatické DNA sekvence nebo ve formě monomeru se dvěma subdoménami cílící na nepalindromatické sekvence. Každý monomer nebo subdoména obsahují kopii LAGLIDADG motivu s konzervovanou předposlední kyselou aminokyselinou podílející se na tvorbě aktivního místa (Heath *et al.*, 1997). Nevýhodou jejich využití je nízká pravděpodobnost nalezení štěpícího místa v sekvenci genu určeného k modifikaci, neboť jich je známo málo. Příprava meganukleas, které by rozpoznávaly nové místa, není jednoduchá a často vede ke snížení katalytické aktivity (Smith *et al.*, 2006).

2.2.2 Nukleasy s motivem zinkových prstů

Zinkové prsty jsou skupinou proteinů (ZFPs, zinc-finger proteins) s řadou důležitých funkcí v buňce jako je regulace transkripce, regulace apoptózy, proteinových interakcí, vazba RNA a především DNA. Dělí se podle počtu a pořadí cysteinových a

histidinových reziduí, které vážou zinek do sekundární struktury (Klug a Schwabe, 1995; Mackay a Crossley, 1998). Nejprozkoumanější je C2H2 DNA vazebný motiv u eukaryot složený z 30 aminokyselin se dvěma konzervovanými cysteiny a dvěma konzervovanými histidiny vázající jediný ion zinku v tetraedrickém uspořádání (Pabo *et al.*, 2001). C2H2 ZFP mají konzervovanou sekundární strukturu dvou β listů a jednoho α helixu (Beerli a Barbas, 2002). Některá rezidua na povrchu α helixu jsou schopna rozpoznat sekvenci DNA o 3 párech bazí. Těto vlastnosti je využíváno při syntéze nukleas s motivem zinkových prstů, které se obvykle skládají ze 4-6 ZFPs sfúzovaných s restriční endonukleasou typu II FokI, která má fyzicky oddělenou vazebnou a štěpící aktivitu (Li *et al.*, 1992) (Obr. 4). Štěpící aktivita tohoto enzymu není závislá na specifické sekvenci (Kim *et al.*, 1996), nicméně pro rozštěpení DNA je nutná přítomnost dvou jednotek. Proto při navrhování ZFNs je nutné navrhnout dvě monomerní jednotky těchto nukleas, které rozpoznávají cílovou sekvenci ve správné vzdálenosti a orientaci aby došlo k vytvoření DSB (Smith *et al.*, 2000b).

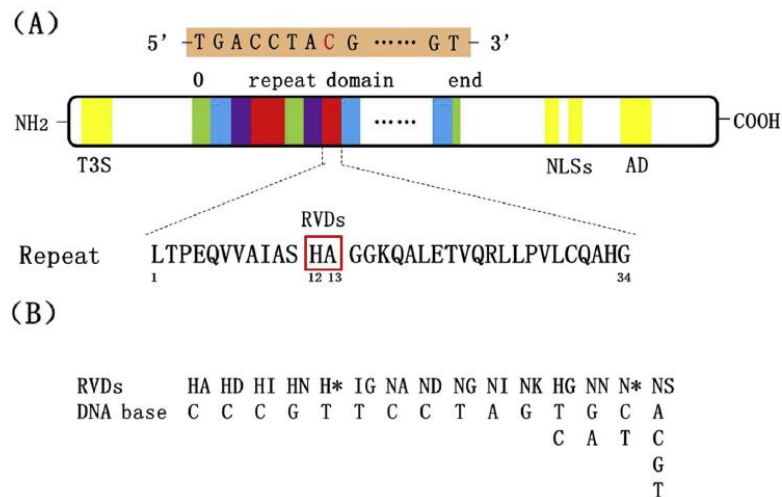


Obrázek 4: Schéma dvou monomerních jednotek ZFN složených ze čtyř ZFP rozpoznávající proti sobě specifickou sekvenci DNA. Díky přesné vzdálenosti dochází k dimerizaci endonukleas FokI, které poté fungují jako molekulární nůžky indukující DSB (převzato a upraveno Abdallah *et al.*, 2015).

2.2.3 TALE nukleasy

TALEs je zkratka pro transkripční efekторы podobné aktivátorům (transcriptional activator-like effectors). TAL efekторы jsou heterogenní transkripční faktory produkované gram-negativními patogenními bakteriemi rodu *Xanthomonas*, které jimi infikují rostlinné buňky (Nissan *et al.*, 2012). Jakmile se efekторы dostanou do jádra hostitelské buňky, mohou se vázat na cílovou sekvenci DNA a ovlivňovat expresi (Szurek *et al.*, 2002).

Analýza známých TALEs odhalila, že se tyto proteiny skládají ze shodných repetice o 30 – 42 aminokyselinách (průměrně 34 AMK), které se mohou opakovat v počtu 1,5 – 33,5 (Boch a Bonas, 2010). Mají na C-konci jaderný lokalizační signál (NLS, nuclear localization signal), kyselou transkripční aktivační doménu (AD, activation domain) a na N-konci sekreční a translokační signál typu III (T3S, type III translocation signal) (Schornack *et al.*, 2006; Bogdanove *et al.*, 2010). Jedná se o proteiny s přizpůsobivou DNA-vazebnou doménou (Romer *et al.*, 2007). Právě díky repetícím se od ostatních DNA vazebných faktorů odlišují. Jedna repetice je považována za monomerní jednotku TALE, která je schopná rozpoznat specificky jeden nukleotid DNA. Sekvence repetice je velmi konzervovaná až na aminokyseliny vyskytující se na 12. a 13. pozici označované jako variabilní direzidua repetice (RVDs, repeat variable diresidues). Tyto variabilní rezidua jsou zodpovědné za vazebnou specifitu nukleotidu repetice (Boch *et al.*, 2009) (obr. 5). Některé repetice nemusí rozpoznávat specifický nukleotid (Moscou a Bogdanove, 2009). Změny v aminokyselinovém složení repetice jinde než na pozici 12 a 13 mají málokdy vliv na vazebnou specifitu (Morbitzer *et al.*, 2010). Díky rozluštění kódu, podle kterého variabilní direzidua rozpoznávají určitý nukleotid, jsou dnes vyvíjeny metody genetických modifikací založené na TAL efektorech, které mohou být přirozené nebo syntetické. Pro umlčení genové exprese mohou být použity TALEs, vázající se na DNA v místě počátku transkripce, sfúzované s transkripčním represorem KRAB (Krüppel-associated box) (Margolin *et al.*, 1994; Cong *et al.*, 2012). Rozdílem oproti využití RNAi ke genovému umlčení je ten, že KRAB-TALEs zabraňuje expresi genu již na úrovni transkripce. K úplnému vyřazení genu z provozu se pak využívají TALEs sfúzované s FokI nukleasou (TALENs) stejně jako u ZFNs.



Obrázek 5: Model TALE vázající DNA, (A) Schéma TALE s T3S na N- konci, AD a NLS na C- konci, uprostřed slouženou z repetice rozpoznávající specifickou sekvenci, každá repetice je složená ze 34 aminokyselin, z toho na 12. a 13. pozici obsahuje variabilní direzidua (RVDs) (červený rámeček) zodpovědné za rozeznání specifického nukleotidu DNA, (B) kód, podle kterého RVDs rozpoznávají určitý nukleotid, hvězdička (*) označuje místo, kde chybí RVD v pozici 13., aminokyseliny i nukleotidy jsou zapsány pomocí mezinárodně používaných zkratk (převzato Zhang *et al.*, 2014).

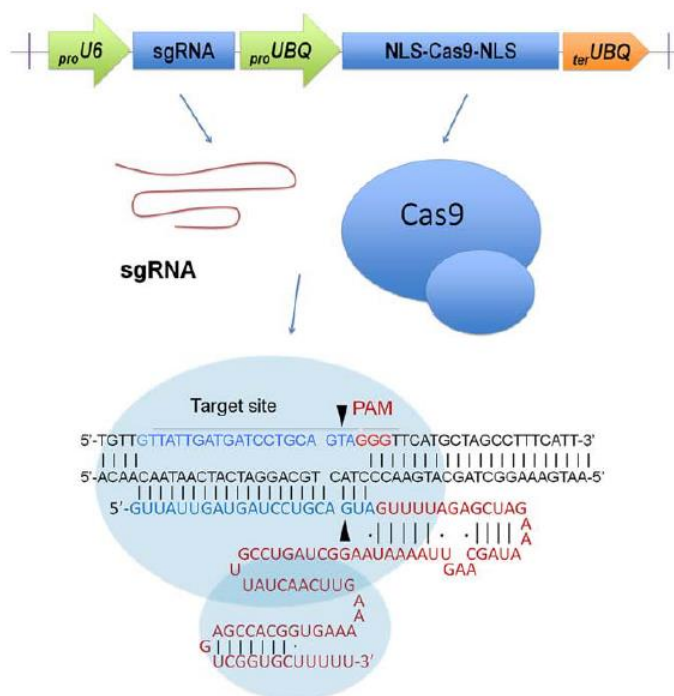
Je třeba si uvědomit, že je nutné navrhnout dvě TALE nukleasy, které se musí navázat na DNA tak, aby došlo k dimerizaci FokI, tvorbě dvouřetězcového zlomu a indukci opravných mechanismů DNA (Christian *et al.*, 2010).

2.2.4 CRISPR/Cas9 systém

Nejnovější metoda užívání k editování genomu je založena na systému klastrů pravidelně rozmístěných krátkých repetice CRISPR (clustered regularly interspaced short palindromic repeats, klastr pravidelně rozmístěných krátkých repetice) s asociovaným proteinem 9 (Cas9). CRISPR-asociovaná nukleasa (Cas) se podílí na imunitní obraně bakterií a archeí, zajišťující rezistenci vůči cizí genetické informaci (Deveau *et al.*, 2010). Cas9 je endonukleasa pocházející z komplexu CRISPR-Cas9 typu II organismu *Streptococcus pyogenes*. V hostitelském jádře vytváří komplex se dvěma krátkými molekulami RNA, tzv. CRISPR RNA (crRNA) a transaktivací crRNA (transcrRNA, transactivating crRNA), které rozpoznávají cílové místo na chromosomální DNA a vedou nukleasu ke štěpení na obou řetězcích (Gasiunas *et al.*, 2012). Heteroduplex složený z crRNA-transcrRNA může být nahrazen jednou molekulou chimérické RNA nazývanou také řídicí RNA (sgRNA, single guide RNA), jejíž cílicí doména se musí

skládat nejméně z 15 komplementárních bází, u kterých musí dojít k přesnému párování s cílovou sekvencí. Zároveň musí být přítomna za cílovou sekvencí tzv. PAM (protospacer-associated motif, protospacer asociovaný motiv) sekvence 5'-NGG-3' nebo v ojedinělých případech 5'-NAG-3', přičemž N značí jakýkoliv nukleotid (Obr. 6) (Jinek *et al.*, 2012; Hsu *et al.*, 2013).

Expresní vektor využíváný pro CRISPR/Cas9 systém musí obsahovat Cas9 nukleasu, CRISPR mRNA a sgRNA (Nemudryi *et al.*, 2014). Místo Cas9 nukleasy, která vytváří dvouřetězcové zlomy může být použita Cas9 nukleasa HNH štěpící vazebné vlákno mRNA, nebo RuvC nukleasa, která štěpí komplementární vlákno mRNA. Pro zacílení konkrétních genů je potřeba navrhnout množství specifických sgRNA. V dnešní době bylo k tomuto účelu vyvinuto množství online softwarů usnadňujících navrhování sgRNA s velkou specifičností a vyhnutí se off-target efektů (Bae *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2015; Naito *et al.*, 2015; Parker *et al.*, 2015; Stemmer *et al.*, 2015).



Obrázek 6: Schéma exprese a vazby CRISPR/Cas9 systému. Expresce sgRNA a Cas9 nukleasy probíhá pod kontrolou dvou promotorů, v tomto případě zvlášť pod promotorem *U6* pro sgRNA a *UBQ* pro Cas9. Po transkripci je sgRNA poskládána do požadované struktury a s Cas9 vytvoří komplex, který navádí k cílové mRNA. Je schopna rozpoznat cílový gen díky komplementaritě nejméně 15 bází řídicího vlákna sgRNA a cílové sekvence nacházející se těsně před PAM sekvencí. Po vytvoření heteroduplexu RNA/DNA Cas9 iniciuje dvouřetězcový zlom 3 nukleotidy před PAM sekvencí (převzato a upraveno z Liu *et al.*, 2015).

2.3 Využití metod editování genomu u rostlin

Metody sloužící jako nástroj k editování genomu se používají mimo jiné k vylepšení vlastností důležitých kulturních plodin jako je ječmen (Wendt *et al.*, 2013), sója (Pham *et al.*, 2012), kukuřice (D'Halluin *et al.*, 2008), pšenice (Shan *et al.*, 2013), rýže nebo čirok (Jiang *et al.*, 2013). Stejně jako u využití RNA umlčovacích technologií, cílem využití metod editování genomu je v plodinách zvýšení obsahu důležitých živin nebo produkce sekundárních metabolitů, prodloužení skladovací doby, zlepšování výnosů, Zvýšení tolerance vůči abiotickému stresu, odolnosti proti škůdcům a herbicidům, nemocem a herbicidům.

Příkladů takového vylepšení plodin lze uvést několik. Některé rostliny obsahují fytáty, které omezují absorpci minerálních látek. Díky editaci genomu byl u kukuřice zmutován gen *IPK1* kódující inositol-1,3,4,5,6-pentakis-2-kinasu, která se podílí na posledním kroku biosyntézy fytátů (Shukla *et al.*, 2009). U sóji bylo kombinací mutací genů *FAD2* a *FAD3* dosaženo přípravy rostlin produkující semena se zvýšeným podílem mononenasycených mastných kyselin a sníženým obsahem kyseliny linolenové, díky čemuž je produkován zdravější sójový olej s delší dobou trvanlivosti (Pham *et al.*, 2012).

U tabáku, kukuřice a rýže byla využita homologní rekombinace k zanesení změn v aminokyselinové sekvenci acetolaktát syntasy (ALS). ALS je enzym účastnící se biosyntézy aminokyselin s rozvětveným řetězcem (Townsend *et al.*, 2009) a je inhibován některými herbicidy jako jsou imidazolinony nebo sulfonylmočovina. Po záměně některých AMK je tento enzym vůči herbicidům rezistentní a rostlina tak může růst i v jejich přítomnosti. Stejná strategie by mohla být použita pro přípravu rostlin rezistentních vůči herbicidu glyfosátu, který inhibuje správnou funkci enzymu 5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntasy (EPSPS).

2.4 Cytokininy

Cytokininy jsou rostlinné hormony hrající hlavní roli v mnohých fyziologických procesech, jako je regulace růstu kořenů a listů, vývoj chloroplastů, senescence listů, rezistence vůči patogenům a odpověď na stres. Z hlediska chemického složení se jedná o N^6 substituované deriváty adeninu. Charakter postranního řetězce určuje, zda se jedná o cytokininy isoprenoidní nebo aromatické (Mok a Mok, 2001).

Isoprenoidní i aromatické cytokininy se přirozeně vyskytují u rostlin. Typickými zástupci isoprenoidních cytokininů jsou N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin (iP), *trans*-zeatin (*tZ*), jeho izomer lišící se v poloze hydroxylové skupiny *cis*-zeatin (*cZ*) a také dihydrozeatin (DZ), jejichž obsah se liší v různých rostlinných druzích. Například iP a *tZ* převládají u *A. thaliana*, zatímco u rýže nebo kukuřice je charakteristický *cis*-zeatin (Veitch *et al.*, 2003; Izumi *et al.*, 1988). Aromatické cytokininy, jako například benzyladenin (BA), *ortho*-topolin (*oT*) nebo *meta*-topolin (*mT*) se vyskytují pouze u některých rostlinných druhů (Strnad, 1997). Všechny cytokininy přirozeně se vyskytující v rostlinách mohou být zastoupeny také ve formě nukleosidů, nukleotidů nebo glykosidů (Sakakibara, 2006). Byly připraveny i syntetické sloučeniny vykazující cytokininovou aktivitu, v přírodě ovšem nalezeny nebyly (Mok *et al.*, 1982).

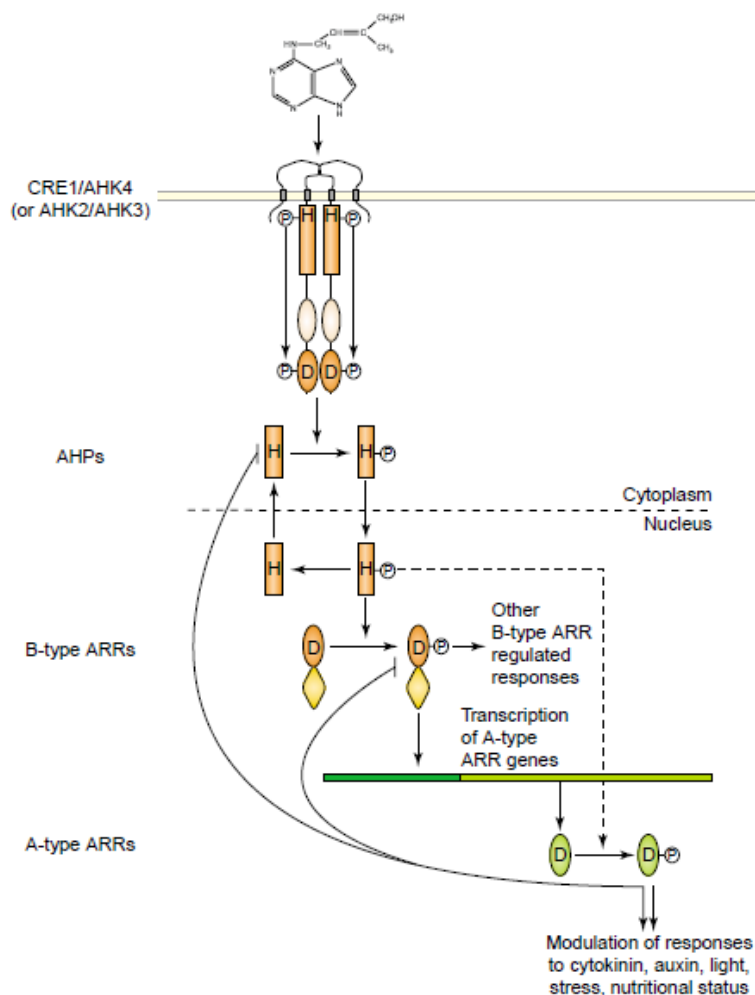
Po dlouhou dobu nebylo zcela jasné, jakým mechanismem jsou cytokininy schopné podílet se na regulaci celé řady důležitých procesů. Aby mohl být tento mechanismus objasněn, bylo nutné najít dráhy a komponenty podílející se na percepci a transdukci cytokininového signálu.

2.4.1 Receptory, percepcie a transdukce cytokininového signálu

V roce 2001 bylo zjištěno, že cytokininový signál je přijat a přenášen pomocí systému podobnému dvousložkové signální dráze, která byla již dlouhou dobu známá u prokaryot a nižších eukaryot (Hwang a Sheen, 2001). U dvousložkového systému je stimul přijat histidin kinasou, která autofosforyluje reziduum histidinu (His) v kinasové doméně. Signál je dále veden díky přenosu fosfo-skupiny na konzervované reziduum kyseliny asparagové (Asp) přijímací domény regulátoru odpovědi (Stock *et al.*, 2000; West a Stock, 2001). U eukaryot transdukce cytokininového signálu z histidin kinasy na regulátor odpovědi probíhá přes vícekrokový přenos fosfátové skupiny mezi His-Asp za účasti His fosfopřenašečového proteinu Hpt (His phosphotransfer protein) (obr. 7).

Jako první byl u modelové rostliny *A. thaliana* objeven receptor AHK4 (Arabidopsis histidin kinase 4), původně nezávisle izolovaný jako woodenleg 1 (WOL1) a cytokinin response 1 (CRE1) (Inoue *et al.*, 2001). Dalšími receptory z *A. thaliana* jsou AHK2 a AHK3. Zatímco AHK4 je exprimován především v kořenech, AHK2 a AHK3 můžeme nalézt ve všech hlavních orgánech (Inoue *et al.*, 2001; Mahonen *et al.*, 2000). Tyto tři receptory se skládají z dvou až tří transmembránových domén na N-konci, vysílací domény a dvou přijímacích domén (Yamada *et al.*, 2001).

Receptor lokalizovaný v membráně s extracelulární vazebnou doménou CHASE (cyclase/His kinase-associated sensing extracellular) rozpoznávající cytokininy musí po navázání ligandu vytvořit dimer, aby mohlo dojít k autofosforylaci histidinu v rámci cytoplazmatické vysílací domény. Následuje přenos fosfátové skupiny na asparagovou kyselinu přijímací domény na C-konci receptoru a z ní na Hpt, který dále fosforyluje a aktivuje regulátory odpovědi.



Obrázek 7: Schéma vedení cytokininového signálu fosforylační kaskádou přes cytokininový receptor AHK4/AHK2/AHK3 v modelové rostlině *Arabidopsis thaliana*. Vazbou ligandu je vyvolána dimerizace a autofosforylace. Fosfátová skupina je přenesena na AHP fosfopřenašečový protein, který je tímto aktivován a dále přenáší fosfátovou skupinu z cytoplazmy do jádra na regulátory odpovědi ARR typu B. ARR typu B řídí transkripci genů cytokininové odpovědi, mj. i regulátorů odpovědi typu A. ARR typu A mohou negativně nebo pozitivně regulovat odpověď na cytokininový signál nebo další signální dráhy interakcí s dalšími proteiny. H, reziduum histidinu; D reziduum aspartátu; P, fosfátová skupina (převzato a upraveno z Heyl a Schumling, 2003).

Na dalších krocích fosforylační dráhy se podílí pět autentických fosfopřenašečových proteinů AHPs (*Arabidopsis* His phosphotransfer proteins) a 23 regulátorů odpovědi ARR_s (*Arabidopsis* response regulators). AHPs (AHP1-AHP5) jsou vybaveny konzervovanými aminokyselinami potřebnými k přenosu fosfátu prostřednictvím konzervovaného His rezidua (Hutchison *et al.*, 2006). Pseudo HPT (AHP6) má nahrazený konzervovaný His (Mahonen *et al.*, 2006) a nemůže tedy přenášet signál. ARR_s se dají rozdělit podle sekvence kódující přijímací domény a struktury C-terminální domény na typ A, B, C a pseudo regulátory odpovědi (Kiba *et al.*, 2005; Schaller *et al.*, 2007). ARR_s typu A mají krátkou C-terminální doménu a exprese jejich genů je významně zvýšená v reakci na cytokininy (D'Agostino *et al.*, 2000). U ARR_s typu B je součástí C-konce DNA-vazebná doména a transkripční doména regulující transkripci genů aktivovaných cytokininy včetně ARR_s typu A (Mason *et al.*, 2004). Exprese ARR_s typu C není transkripčně regulována cytokininy. Všechny ARR_s obsahují konzervovaná rezidua AMK potřebná pro fosforylaci přijímací domény (Kiba *et al.*, 2005). Pseudo ARR_s tyto AMK postrádají a regulují cirkadiánní rytmus (McClung, 2006).

Receptory u ječmene nebyly doposud studovány. Studium cytokininových receptorů a dalších komponent signální fosforylační dráhy u rýže prokázalo, že na rozdíl od ostatních komponent signální dráhy cytokininů mají receptory evolučně zachovanou funkci a jsou si podobné u jednoděložných i dvouděložných rostlin (Tsai *et al.*, 2012).

2.4.1.1 Receptory cytokininů v modelových rostlinách

V genomu *A. thaliana* je kódováno celkem 6 neethylenových histidin kinas: CRE1/AHK4, AHK2, AHK3, AtHK1, CKI1 a CKI2/AHK5, přičemž AHK1 je potencionální osmosenzor (Tran *et al.*, 2007) a AtCKI1 a AtCKI2/AHK5 jsou histidin kinasy nezávislé na cytokininech a jsou nepřímo zapojeny do cytokininové signalizace (Kakimoto, 1996; Hejatko, 2009; Deng *et al.*, 2010). Receptory CRE1/AHK4, AHK2 a AHK3 mají vysoce homologní aminokyselinové sekvence. Extracelulární domény vázající cytokininy jsou identické z 60 % (Inoue *et al.*, 2001).

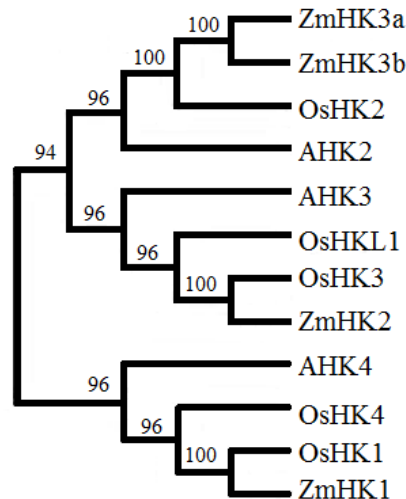
U receptorů AHK3 a CRE1/AHK4 byla zkoumána ligandová specifita kompetitivní vazebnou analýzou, kterou bylo zjištěno, že oba receptory mají nejvyšší afinitu pro tZ. Vyšší afinitu vykazoval pouze receptor CRE1/AHK4 pro iP. AHK3 vykazoval pro iP nižší afinitu v porovnání s CRE1/AHK4, zatímco pro všechny ostatní

cytokinininy vykazoval afinitu vyšší (Romanov *et al.*, 2005; Romanov a Lomin, 2009; Stolz *et al.*, 2011). Téměř pro všechny cytokinininy byla prokázána korelace mezi afinitou receptoru a schopností aktivovat expresi genů cytokininové odpovědi (Spichal *et al.*, 2004; Romanov *et al.*, 2006). Receptor AHK2 má vazebné vlastnosti přibližně stejné, jako receptor CRE1/AHK4 (Stolz *et al.*, 2011).

V práci Higuchi *et al.* (2004) jsou popsány mutantní rostliny *Arabidopsis thaliana* s narušenými geny pro jednotlivé receptory, díky čemuž byla odvozena funkce těchto receptorů. Bylo zjištěno, že receptory AHK2 a AHK3 jsou exprimovány především v nadzemních částech *Arabidopsis*, zatímco CRE1/AHK4 je exprimován hlavně v kořenech. Analýza jednotlivých mutantů *cre1*, *ahk2* a *ahk3* ukázala, že je rostlina schopná tvořit orgány bez jednoho receptoru. Zároveň bylo ale díky analýze všech tří kombinací dvojitých mutantů zjištěno, že jeden funkční receptor není dostačující pro tvorbu orgánů. U *cre1* mutanta došlo k výrazné kompromitaci tvorby kalusu. Proto se předpokládá, že CRE1 hraje důležitou roli při dediferenciaci. Zajímavostí je, že u trojitého mutanta bez jediného funkčního receptoru bylo vytvořeno embryo a vyrostla sazenice, což vede k zamyšlení, zda jsou cytokinininy opravdu klíčové pro vývoj rostliny, neboť zároveň nedošlo k indukci exprese genů cytokininové odpovědi.

V kukuřici se vyskytují orthologní formy cytokininových receptorů k těm v *Arabidopsis thaliana* (Yonekura-Sakakibara *et al.*, 2004), což naznačuje, že se tyto receptory rozdělily na tři isogeny ještě před rozdělením rostlin na jednoděložné a dvouděložné. ZmHK1 je orthologem CRE1/AHK4, ZmHK2 je orthologem AHK3 a ZmHK3 je orthologem AHK2. Ligandová specifita a lokalizace receptorů v kukuřici je téměř shodná jako pro jejich orthology v *Arabidopsis thaliana*.

U rýže byly identifikovány čtyři histidin kiny s funkcí cytokininových receptorů: OsHK1 – 4 (Du *et al.*, 2007). Tyto histidin kiny vykazují 50% - 62% identitu s receptory z huseníčku (Pareek *et al.*, 2006). Receptor OsHK1 je funkčním i strukturním orthologem CKII důležitým při megagametogenezi (Ito a Kurata, 2006). Histidin kinasa OsHKL1 pravděpodobně ztratila funkci cytokininového receptoru v rýži. Fylogenetická analýza prokázala shodu 1:1 mezi histidin kinasami z huseníčku, kukuřice a rýže (Obr. 8).



Obrázek 8: Fylogenetický strom histidin kinas z huseníčku, kukuřice a rýže sestrojený pomocí bootstrap testu v programu MEGA 3.1. Čísla u jednotlivých větví vyjadřují konfidenční hodnoty (převzato a upraveno Du *et al.*, 2007).

2.4.1.2 Receptor HvHK3

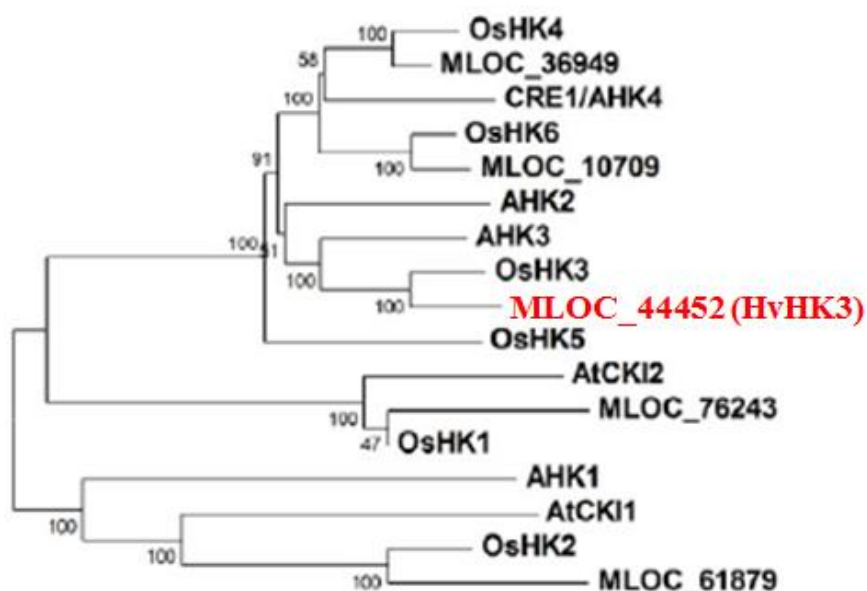
Ječmenný receptor HvHK3 je orthologem AHK3 z huseníčku, AHK2 žádného orthologa nemá, zatímco AHK4 má orthologní receptory v ječmeni rovnou dva (Obr. 9) (Tsai *et al.*, 2012).

Zatímco o receptoru HvHK3 toho není moc známo, v práci Kim *et al.* (2006) bylo prokázáno, že jeho ortholog AHK3 je zapojen v kontrole oddálení senescence listů díky specifické fosforylaci regulátoru odpovědi ARR2. Unikátní funkce tohoto receptoru byla prokázána díky přípravě mutanta *A. thaliana ore12-1*, u kterého byla pozorovány opožděné příznaky senescence jako je žloutnutí listů a změna jeho architektury listu. Mutace byla provedena v extracelulární doméně, u které se předpokládá, že je vazebným místem pro cytokininy. Konstitutivní cytokininová odpověď byla pravděpodobně způsobena konstitutivně aktivním stavem *ore12-1*, který byl strukturně upraven tak, aby připomínal AHK3 s navázaným cytokininem. Navíc oddálení senescence listů bylo značně omezené u mutanta s umlčeným receptorem AHK3, což přispělo k závěru, že právě tento receptor je za oddálení senescence listů zodpovědný.

Receptor HvHK3 je zmíněn v práci Pospisilova *et al.* (2016), která se zabývala přípravou transgenních rostlin ječmene s overexprimovaným genem *cytokinin dehydrogenasy 1 (AtCKX1)* pocházející z *A. thaliana* pod kontrolou kořenově specifického promotoru β -glykosidasy z kukuřice. U obou genotypů, *vAtCKX1*

s lokalizací proteinu CKX1 do vakuoly, i *cAtCKX1* s predikovanou lokalizací do cytosolu, byla prokázána zvýšená tolerance vůči stresu vyvolaného suchem. Hloubková analýza transkriptomu 6 týdnů starých kořenů po revitalizaci odhalila u obou genotypů sníženou expresi genu kódujícího jeden z cytokininových receptorů *HvHK3* (*MLOC_44452*).

Porovnání dat z analýzy transkriptomu a práce zabývající se studiem transgenních rostlin *A. thaliana* s umlčenými geny *ahk2* a *ahk3* (Tran *et al.*, 2007) přispělo k závěru, že obecný mechanismus zvýšené tolerance vůči suchu je spojen se sníženou citlivostí vůči cytokininům, čehož může být dosaženo vypnutím genů kódujících cytokininové receptory nebo zvýšenou expresí genu *CKX* (Vojta *et al.*, 2016). Jako logický důsledek vznikl zájem připravit transgenní rostliny ječmene s umlčeným genem pro cytokininový receptor *HvHK3*, aby mohl být zkoumán jeho vliv na případný fenotyp rostlin ječmene.

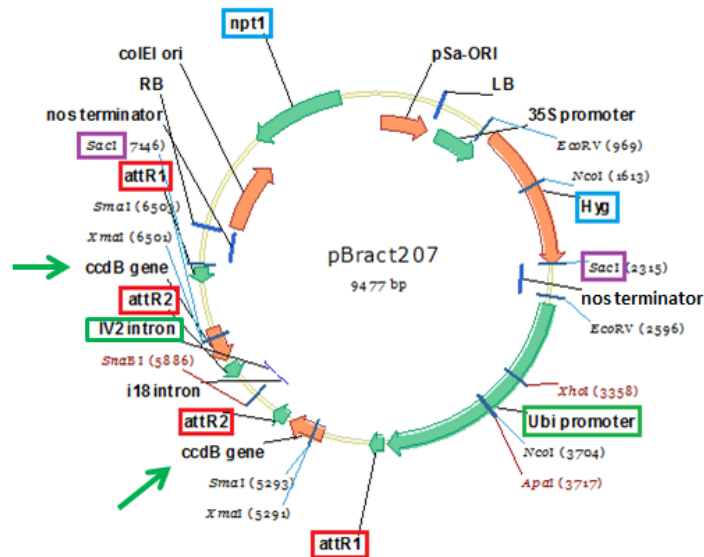


Obrázek 9: Fylogenetický strom zobrazující vztahy mezi histidin kinasami podílejících se na percepci cytokininového signálu z *Arabidopsis thaliana* (AHK), rýže (OsHK) a ječmene (MLOC_). AHK1 je potenciální osmosenzor, AtCKI1 a AtCKI2 jsou histidin kinasy nezávislé na cytokininech a jsou nepřímo zapojeny do cytokininové signalizace (Převzato a upraveno Vojta *et al.*, 2016).

2.5 Navržení strategie pro umlčení *HvHK3* v ječmeni

Pro umlčení funkce ječmenného cytokininového receptoru *HvHK3* byla vybrána metoda interference RNA s použitím vlásenky hpRNA. K transformaci ječmene za účelem umlčení jeho *HvHK3* genu byl vybrán binární vektor pBract207 (Obr. 10) z John Innes centra (Norwich, Velká Británie), který obsahuje tzv. umlčovací kazetu se dvěma rekombinačními místy. Po rekombinaci fragmentu se sekvencí homologní k části genu, který má být umlčen, do obou rekombinačních míst je umlčovací kazeta v transgenním ječmeni schopna tvořit hpRNA. Při výběru sekvence daného genu, která byla použita pro umlčení, bylo nutné řídit se několika pravidly. Doporučená ideální délka této sekvence je 300 – 800 bp (Helliwell *et al.*, 2005). Ovšem vlásenka by se měla vytvořit i při velikosti sekvence v rozmezí 100 – 1000 bp. V případě receptoru *HvHK3* bylo navíc třeba dodržet pravidlo 18 nukleotidů, kterými se vybraná sekvence lišila od sekvencí dalších dvou cytokininových receptorů, které jsou v ječmenném genomu kódovány a jejichž sekvence může být podobná. V opačném případě by mohlo docházet k umlčení všech receptorů, což není cílem této práce.

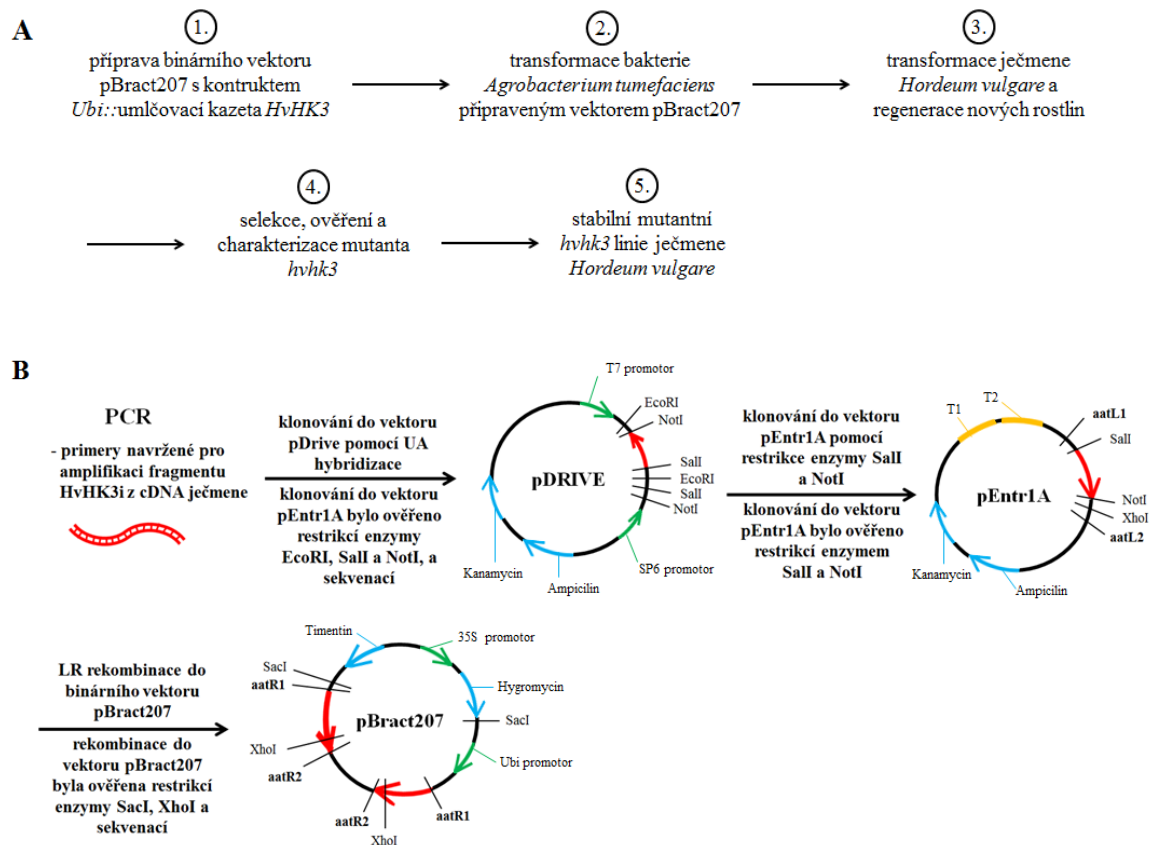
Sekvence všech tří receptorů byly získány z databáze NCBI a veškerá práce týkající se jejich sekvence probíhala v programu BioEdit verze 7.2.5.0 (Hall, 1999). Sekvence (dále jako sekvence/fragment *HvHK3i*) byla vybrána tak, že byla složena ze 187 bp na 3'-konci kódující sekvence genu a 101 bp 3'-UTR oblasti. Pro amplifikaci této sekvence z cDNA ječmene musely být navrženy primery *HvHK3i_fw* s přidaným restričníím místem pro endonukleasu *SalI* a *HvHK3i_rev* s přidaným restričníím místem pro endonukleasu *NotI* (Tab. 1). Restričníí místa byla k sekvencím primerů přidána, aby byla usnadněna práce s klonováním fragmentu. Zároveň musela být dodržena podmínka, že v sekvenci fragmentu se restričníí místa pro tyto endonukleasy nevyskytují. Primery byly navrženy s pomocí on-line aplikace biokalkulátoru firmy Metabion (<http://www.metabion.com/>) tak, aby měly velikost ~ 20 bp, obsah GC byl do 50 %, teplota tání (T_m) byla maximálně 58 °C a zároveň se jejich T_m nelišila o více než 2 °C.



Obrázek. 10: Binární vektor pBract207; v červených rámečcích jsou znázorněny rekombinační místa attR1 a attR2, mezi které byly rekombinací vneseny fragmenty o požadované sekvenci, zprostředkovávající samotné umlčení genu; zelené šipky ukazují selekční *ccdB* gen, který je při rekombinaci nahrazen fragmenty *HvHK3i* a není poté pro bakterie letální; v zelených rámečcích se nachází IV2 intron a ubikvitinový promotor z kukuřice, pod kterým probíhá exprese umlčovací kazety. Primery na ubikvitinový promotor a IV2 intron sloužily k ověření rekombinace; K ověření rekombinace dále sloužila restrikční místa pro SacI, označená fialovými rámečky. Modrými rámečky jsou označeny geny zodpovědné za rezistenci transformantů vůči timentinu a hygromycinu.

Postup přípravy mutantní linie *hvhk3* dokumentuje obrázek č. 11A. Nejprve bylo nutné připravit binární vektor pBract207 s konstruktem *Ubi::* umlčovací kazeta *HvHK3*, kterým byly transformovány bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmene AGL1. S využitím těchto bakterií pak byla transformována nezralá embrya ječmene. Byla nutná selekce regenerovaných rostlin, jejich ověření a charakterizace, aby bylo možné stanovit, že byla připravena mutantní linie *hvhk3* s umlčeným cytokininovým receptorem HvHK3.

Strategie klonování a příprava binárního vektoru (Obr. 11B) se skládala z následujících kroků. Sekvence *HvHK3i* byla amplifikována pomocí PCR se specifickými primery ze zrna ječmene. S použitím UA hybridizace byla zaklonována nejdříve do vektoru pDrive, následně pomocí restrikce nukleasami SalI a NotI překlonována do vektoru pEntr1A, a nakonec s využitím LR rekombinace do vektoru pBract207. Všechny kroky klonování byly ověřeny restrikční analýzou. V případě klonování do vektorů pDrive a pBract207 byla přítomnost sekvence *HvHK3i* ověřena navíc sekvenací.



Obrázek 11: (A) Schéma postupu přípravy mutantní linie ječmene *hvhk3* s umlčeným cytokininovým receptorem *HvHK3*. (B) Schéma strategie klonování a přípravy binárního vektoru pBract207 pro umlčení cytokininového receptoru *HvHK3*. K umlčení receptoru *HvHK3* byla vybrána sekvence z genu *HvHK3* o velikosti 288 bp, která byla amplifikována z cDNA zrna ječmene s pomocí speciálně navržných primerů. Sekvence *HvHK3i* byla pomocí UA hybridizace zaklonována do vektoru pDrive. Pro klonování sekvence do vektoru pEntr1A byla využita restrikce endonukleasami Sall a NotI. Pro přípravu binárního vektoru pBract207 byla použita LR rekombinace. Sekvence *HvHK3i* je ve vektorech znázorněna červeně. Zeleně jsou znázorněny promotory, modře geny rezistence vůči antibiotikům. Oranžově jsou znázorněny transkripční terminační sekvence.

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál

3.1.1 Biologický materiál a enzymy

Agrobacterium tumefaciens AGL1

dNTP Mix firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

GeneRuller™ 1 kb DNA ladder firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

GeneRuller™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Chemicky kompetentní *E. coli* TOP10

Ječmen *Hordeum vulgare*, kultivar Golden Promise (John Innes centra, Norwich, Velká Británie)

LR klonasa II (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Phusion® High-Fidelity DNA polymerasa a 5x phusion HF pufr (New England BioLabs, MA, USA)

Proteinasa K (Invitrogen, Life Technologies, Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Pufr 10x CutSmart (New England BioLabs, MA, USA)

Pufr 10x EcoRI (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa EcoRI-HF (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa NotI (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa SacI-HF (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa Sall (New England BioLabs, MA, USA)

Restrikční endonukleasa XhoI (New England BioLabs, MA, USA)

RevertAid H Minus M-MULV reverzní transkriptasa a 5x RT pufr (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

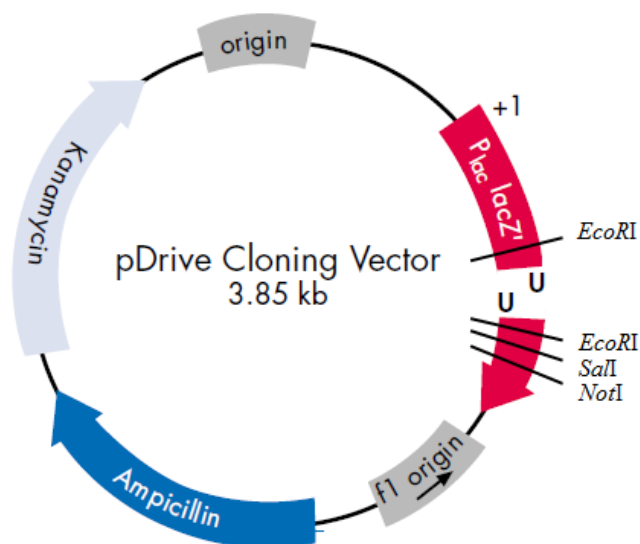
T4 DNA ligasa a 10x pufr firmy Life Technologies (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)

Taq DNA polymerasa a 10x PCR pufr (Šmehilová, 2004)

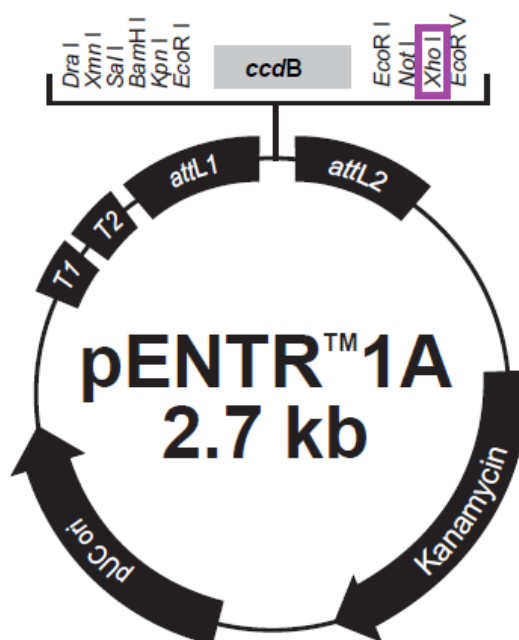
Vektor pBract207 (John Innes centra, Norwich, Velká Británie)

Vektor pDrive (Obr. 12) firmy Qiagen (Hilden, Německo)

Vektor pEntr1A (Obr. 13) firmy Invitrogen, Life Technologies (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)



Obrázek 12: Schéma vektoru pDrive. „U“ značí konce linearizovaného vektoru s přesahujícími uridiny pro UA hybridizaci s fragmentem s přesahujícími adenosiny. V okolí těchto konců se nachází multiklonovací místo rozpoznávané restrikčními endonukleasami včetně EcoRI na obou koncích a na jednom konci SalI a NotI. Červená šipka značí gen *LacZ*. Součástí vektoru jsou geny zodpovědné za rezistenci vůči kanamycinu a ampicilinu.



Obrázek 13: Vektor pEntr1A; fialovým rámečkem je označeno restrikční místo enzymu XhoI, které je součástí multiklonovacího místa. Jeho součástí je také selekční *ccdB* gen, který je pro bakterie letální, ovšem při klonování do tohoto místa je nahrazen fragmentem *HvHK3i* a není poté pro transformované bakterie nadále letální. Po stranách multiklonovacího místa se nacházejí rekombinační místa attL1 a attL2. Vektor obsahuje také gen pro rezistenci vůči kanamycinu, T1 a T2 jsou transkripční terminační sekvence, chránící před expresí klonovaného genu, díky čemuž je omezená případná toxicita.

3.1.2 Primery

Primery byly rozpuštěny v nuclease-free vodě aby byla koncentrace zásobního roztoku primerů 100 μ M. Ze zásobního roztoku byly před PCR primery naředěny 10x resp. 20x na koncentraci 10 μ M resp. 5 μ M. Seznam všech použitých primerů, jejich sekvence i teploty tání (T_m) jsou přehledně uvedeny v Tab. 1.

Většina primerů byla připravena firmou Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) s výjimkou primerů ACT, které byly připraveny firmou Metabion international AG (Mnichov, Německo).

Tab. 1: Přehled použitých primerů, jejich sekvencí ve směru 5' - 3' a jejich teplot tání. U primerů HvHK3i jsou malými písmeny vyznačena přidaná místa pro restriční endonukleasy a tři nukleotidy na 5' – konci.

Název	Sekvence	T_m [°C]
HvHK3i_fw	5' - taagtcgacTCCACCAGAATGTGCTAAC - 3'	55
HvHK3i_rev	5' - ttagcggccgcTACTCTTGGGAGCACTGC - 3'	56
Ubi_fw	5' - TGCTCACCTGTTGTTTGGTGTTA - 3'	64
IV2_fw	5' - GCTTCTACCTTTGATATATATAATAATT -	59
Hygro_fw	5' - GAATTCAGCGAGAGCCTGAC - 3'	59
Hygro_rev	5' - GAATTCAGCGAGAGCCTGAC - 3'	59
HvHK4-1_fw	5' - GCGACCTATGAAGAGTGTATGAAATC - 3'	65
HvHK4-1_rev	5' - CCACTAATCTGGAGACTGCTTGGT - 3'	65
HvHK4-2_fw	5' - AGGTGGAGTGCGTGGAGAGT - 3'	63
HvHK4-2_rev	5' - TCCATTAGACAGAGATCAAACCTTGTGT - 3'	64
HvHK3_fw	5' - TCCACCAGAATGTGCTAACGTT - 3'	60
HvHK3_rev	5' - GTGCTCATATGTTGCCTGGATAAC - 3'	64
HvAKT_fw	5' - TTGACCTCCAAAGGAAGCTTTCT - 3'	61
HvAKT_rev	5' - GGTGCACCTGGCTGTTGA - 3'	58
HvEF2_fw	5' - CCGCACTGTCATGAGCAAGT - 3'	60
HvEF2_rev	5' - GGGCGAGCTTCGATGTAAAG - 3'	60

3.1.3 Chemikálie

Acetosyringon (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Agar pro bakterie (Himedia, Bombaj, Indie)
Agarosa (Amresco, Solon, OH, USA)
Bromfenolová modř (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Biotin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Dicamba (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Dimethylsulfoxid (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Dodecylsíran sodný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Dusičnan amonný (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Ethanol 96% (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Ethidium bromid (NeoLab, Heidelberg, Německo)
Ethylendiamintetraoctová kyselina (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Fytigel (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Glycerol (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Hydroxid draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Hydroxid sodný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Hygromycin B (Roche, Praha, Česká Republika)
Chlorid draselný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Chlorid hořečnatý (Promega, WI, USA)
Chlorid sodný (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Chlornan sodný (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Chloroform (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Isopropanol (MACH Chemikálie, Ostrava-Hrušov, Česká Republika)
Kanamycin monosulfát (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Kasein hydrolyzát (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Kvasničný extrakt (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Kyselina L-glutamová (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Kyselina octová (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Kyselina chlorovodíková (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Maltosa (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)

Mannitol (Penta, Chrudim, Česká Republika)
MS basal salt mix (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
MS basal salt mix bez NH_4NO_3 (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Myo-inositol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Octan draselný (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Polyethylenglykol (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Prolin (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Nuclease free voda (Qiagen, Hilden, Německo)
Sacharosa (Lach-Ner, Neratovice, Česká Republika)
Síran hořečnatý (Penta, Chrudim, Česká Republika)
Thiamin HCl (Fluka, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Timentin (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Trans-zeatin (Olchemim, Olomouc, Česká Republika)
Tris (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)
Trypton (Duchefa, Haarlem, Nizozemsko)
Xylencyanolová FF modř (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA)

3.1.4 Média a roztoky

1% (w/v) agarosový gel:

1 g agarosa, 100 ml 1x TAE pufr

10x PCR pufr:

100mM Tris/HCl, 500mM KCl, 20mM $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 g/l Triton™ X-100; pH = 9,0

DNA-nanášecí pufr:

500 mg/l bromfenolová modř, 500 mg/l xylencyanol FF modř, 10 g/l SDS, 25% (v/v) glycerol

Extrakční pufr pro izolaci gDNA:

200 mM Tris/HCl, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0,5 % SDS, pH = 7,5

Kalus-indukční médium:

4,3 g/l MS basal salt base, 30 g/l maltosa, 1,0 g/l kasein hydrolyzát, 350 mg/l myo-inositol, 690 mg/l prolin, 1,0 mg/l thiamin HCl, 2,5 mg/l dicamba, 3,5 g/l fytigel, 50 mg/l hygromycin, 160 mg/l timentin, pH = 5,8

LB agar:

10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, 15 g/l agar pro bakterie; pH = 7,0

LB médium:

10 g/l trypton, 5 g/l kvasničný extrakt, 10 g/l NaCl, pH = 7,0

MGL agar:

2,5 g/l kvasničný extrakt, 5 g/l trypton, 5g/l NaCl, 1 g/l L-glutamová kyselina, 5 g/l mannitol, 250 mg/l K₂HPO₄, 100 mg/l MgSO₄·7H₂O, 10 µl biotin (zásobní roztok 0,1 mg/l), 15 g/l agar pro kultivaci bakterií; pH = 7,0

MGL médium:

2,5 g/l kvasničný extrakt, 5 g/l trypton, 5g/l NaCl, 1 g/l L-glutamová kyselina, 5 g/l mannitol, 250 mg/l K₂HPO₄, 100 mg/l MgSO₄·7H₂O, 10 µl biotin (zásobní roztok 0,1 mg/l); pH = 7,0

Otto 1

0.1 M kyselina citrónová, 0.5% (v/v) Tween 20

Otto 2

0.4 M Na₂HPO₄

Regenerační médium:

2,7 g/l MS basal salt base (bez NH₄NO₃), 20 g/l maltosa, 165 mg/l NH₄NO₃, 750 mg/l glutamin, 100 mg/l myo-inositol, 0,4 mg/l thiamin HCl, 3,5 g/l fytigel, 50 mg/l hygromycin, 160 mg/l timentin, pH = 5,8

Roztok P1:

50 mM Tris/HCl, 10 mM EDTA; pH = 8,0; 0,1 mg/ml RNasa A

Roztok P2:

0,2 M NaOH, 1% SDS

Roztok P3:

3 M octan draselný; pH = 5,5

SOC médium:

2 % trypton, 0,5% kvasničný extrakt, 10 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄, 20 mM glukosa

TAE pufr:

70mM Tris/CH₃COOH, 1mM EDTA; pH = 8,0

Tranzitní médium:

2,7 g/l MS basal salt base (bez NH₄NO₃), 20 g/l maltosa, 165 mg/l NH₄NO₃, 750 mg/l glutamin, 100 mg/l myo-inositol, 690 mg/l prolin, 0,4 mg/l thiamin HCl, 2,5 mg/l

2,4-dichlorofenoxyoctová kyselina, 0,1 mg/l 6-benzylaminopurin, 3,5 g/l fytigel, 50 mg/l hygromycin, 160 mg/l timentin, pH = 5,8

3.1.5 Kity

Kit Wizard® SV gel and PCR clean-up system (Promega, WI, USA)

Magnetické kuličky Agen®Court RNAClean® XP (Beckman Coulter, Brea, CA, USA)

RNAqueous® kit (Life Technologies, Praha, ČR)

TRI Reagent® kit (Life Technologies, Praha, ČR)

TURBO DNA-free™ kit (Life Technologies, Praha, ČR)

3.1.6 Přístrojové vybavení

Analytické váhy 5034/120 (Nahita-Auxilab, Berian, Španělsko)

Automatické pipety Eppendorf (Hamburk, Německo)

Centrifuga 5417R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Centrifuga 5427R (Eppendorf AG, Hamburg, Německo)

Centrifuga Hettich mikro 120 (Hettich LT, Massachusetts, USA)

Centrifuga Micro 1730R (Labogene™, Lyngø, Dánsko)

Centrifuga NF 400 (Merci s.r.o., Brno, Česká Republika)

Digestoř Forlab (BLOCK, Valašské Meziříčí, ČR)

Digitální váhy PFB (Kern & Sohn, GmbH, Balingen, Německo)

Dokumentační systém Gel Doc™ EZ (Bio-Rad, Kalifornie, USA)

Elektroforetická komůrka Agagel Standart (Biometra, Goettingen, Německo)

Elektromagnetická míchačka RH basic 2 IKAMAG® (IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Německo)

Elektronické váhy PK-352 (Denver Instrument, New York, USA)

Elektroporátor ECM399 (BTX, USA)

Fytkomora E-41L2 (Perry, IA, USA)

Inkubátor Incubat 85 (Melag, Berlin, Německo)

Inkubátor POLL-Ltd (POLL Lab, Bielsko-Biala, Polsko)

Inkubátor SI-900R (Jeia Tech, Soul, Korea)

Konfokální mikroskop Zeiss LSM710 s přidavným piezzo-stolkem (Zeiss, Oberkochen, Německo), Zeiss ZEN software

Kulový mlýnek MM400 (Retsch GmbH, Verder international B.V., Vleuten, Nizozemsko)

Laminární box Polaris 72 (Adaye Danesh Afarin – ADACo, Teherán, Irán)
Laminární box FlowFAST H (Faster S.r.l., Cornaredo, Itálie)
Laminární box SCS 2-6118 (Merci s.r.o., Brno, Česká Republika)
Magnetické míchačky RH basic (IKA, Staufen, Německo)
Parní autokláv Sterivap HP IL (BMT Medical Technology s.r.o. Brno, Česká Republika)
pH metr 3503 Bench (Jenway – Bibby Scientific Limited, Staffordshire, UK)
Průtokový cytometr CyFlow (Sysmex-Partec, Görlitz, Německo)
Růstová komora MLR-352-PE (Panasonic Healthcare Holdings Co., Ltd., Tokyo, Japonsko)
Spektrofotometr NanoDrop Lite (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA)
Termocykler StepOnePlus (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, ČR)
Termocykler T-Gradient (Biometra, Goettingen, Německo)
Termocykler T-personal (Biometra, Goettingen, Německo)
Termocykler ViiA 7 (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, ČR)
Termoblok CHB-202 (Alpha Laboratories Ltd., Eastleigh, Hampshire, UK)
Termoblok MC-01-N (Major Science, Saratoga, USA)
Transiluminátor UVT-20S (Herolab, Wieslach, Německo)
Vortex MS3 digital (IKA, Staufen, Německo)
Vortex VSM-3 (Shelton Scientific, Shelton, CT, USA)
Zdroj napětí pro elektroforézu MS300V (Major Science, Saratoga, CA, USA)

3.1.7 Programy

Bioedit verze 7.2.5.0 (Hall, 1999)
Image LabTM Software verze 5.1 (Bio-Rad, Kalifornie, USA)
pDraw32 verze 1.1.0.132 (AcaClone Software)
StepOneTM softwar (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, ČR)
ViiATM 7Software (Applied Biosystems, Life Technologies, Praha, ČR)

3.2 Metody

3.2.1 Kultivace bakterií

Aby byla zachována podmínka sterility, byly všechny kultury roztírány na misky a inokulovány do médií v laminárním boxu. Kultury *Escherichia coli* byly kultivovány na pevném LB médiu pod selekčním tlakem kanamycinu (100 mg/l) při teplotě 37 °C přes noc. Při inokulaci do tekutého LB média byly navíc umístěny na třepačku při 180 rpm. Kultury *Agrobacterium tumefaciens* byly kultivovány na pevném MGL médiu pod selekčním tlakem kanamycinu (100 mg/l) a zároveň rifampicinu (50 mg/l) při 28 °C po dobu dvou až tří dnů. V případě inokulace do tekutého MGL média byly navíc umístěny na třepačku při 180 rpm přes noc.

3.2.2 Izolace plasmidové DNA

Plasmidová DNA byla izolována z bakterií *E. coli* a *A. tumefaciens* podle stejného postupu. 1,5 ml bakteriální kultury inkubované přes noc bylo převedeno do 1,5 ml mikrozkuhavky a centrifugováno při 5000 g po dobu 2 minut. Supernatant byl odlit, zatímco bakteriální pelet byl resuspendován pomocí vortexu v 0,3 ml roztoku P1. K suspenzi bylo přidáno 0,3 ml roztoku P2 a obsah mikrozkuhavky byl promíchán několikerým převrácením následovaným inkubací při laboratorní teplotě po dobu 5 minut. Dále bylo ke směsi přidáno 0,3 ml roztoku P3 a mikrozkuhavka byla promíchána několikerým převrácením a inkubována 5 minut na ledě. Následovala centrifugace při 14000 g po dobu 10 minut. Supernatant byl pro účely další práce převeden do nové mikrozkuhavky a bylo k němu přidáno 0,6 ml isopropanolu. Směs byla opět centrifugována při 14000 g po dobu 10 minut a supernatant byl odlit. Vzniklý pelet DNA byl promyt 0,5 ml 70% ethanolu vychlazeného na – 20°C. Následovala centrifugace při 14000 g po dobu 5 minut a supernatant byl odstraněn. Zbytky ethanolu byly ještě jednou zcentrifugovány a odpipetovány a takto promytý pelet DNA byl ponechán v digestoři po dobu minimálně 20 minut, aby se vysušil. DNA byla pipetováním rozpuštěna v 20 – 40 µl nuclease-free vodě. Takto připravená plasmidová DNA byla uchována v mrazáku při teplotě -20°C.

3.2.3 Purifikace DNA

K přečištění DNA byl použit laboratorní kit firmy Promega, který je vhodný pro purifikaci DNA po PCR, po izolaci plasmidové DNA i po vyříznutí DNA z gelu. Při každé purifikaci bylo postupováno dle návodu dodaného výrobcem.

3.2.4 PCR

Polymerasová řetězová reakce byla využita pro amplifikaci požadované sekvence s pomocí navržených primerů HvHK3i_fw a HvHK3i_rev z cDNA zrna ječmene. PCR reakce probíhaly v 200 μ l mikrozkušavkách se složením popsáním v Tab. 2. Podmínky v termocykleru byly nastaveny pro všechny reakce stejně (Tab. 3). Při amplifikaci požadované sekvence z cDNA ze zrna před klonováním bylo před závěrečnou elongací do reakce přidáno 0,5 μ l *Taq* polymerasy, která přidává na 3' konec PCR produktu přesahující adenosin.

Tab. 2: Složení reakční směsi pro PCR pro amplifikaci sekvence genu vybrané pro RNAi.

Složka	Koncentrace	Objem [μ l]	Výsledná koncentrace
Templátová DNA	2 ng/ μ l; 20 ng/ μ l	2,50	0,2 ng/ μ l; 2,0 ng/ μ l
primer fw	5 μ M	2,50	0,5 μ M
primer rev	5 μ M	2,50	0,5 μ M
dNTP	10 mM	0,50	0,2 mM
Phusion HF pufr	5x	5,00	1x
Phusion HF polymerasa	2 U/l	0,25	5 U/ml
ddH ₂ O	-	11,75	-
celkem		25,00	

Tab. 3: Podmínky PCR pro amplifikaci sekvence genu vybrané pro RNAi.

Krok	Teplota [$^{\circ}$ C]	Čas
1. Počáteční denaturace	98	30 s
2. Denaturace	98	5 s
3. Hybridizace primerů	T _m	10 s
4. Elongace	72	15 s
5. Závěrečná elongace	72	5 min
6. Ochlazení	10	2 min

Kroky 2-4 byly opakovány 25x

Pro ověření úspěšné LR rekombinace do obou rekombinačních míst vektoru pBract207 byla nastavena PCR reakce s kombinacemi primerů Ubi_fw s HvHK3i_rev a IV2_fw s HvHK3i_fw. Reakce byly nastaveny podle Tab. 4 a podmínky v termocykleru podle Tab. 5.

Tab. 4: Složení reakční směsi pro PCR pro ověření rekombinace a přítomnost požadované sekvence v obou místech umlčovací kazety vektoru pBract207.

Složka	Koncentrace	Objem [μl]	Výsledná koncentrace
Templát DNA	~ 0,3-0,5 μg/μl	1,00	~ 0,30-0,50 μg
primer fw	10 μM	1,00	0,50 μM
primer rev	10 μM	1,00	0,50 μM
dNTP	10 mM	0,50	0,25 mM
Phusion HF pufr	5x	4,00	1x
Phusion HF polymerasa	2 U/l	0,10	1 U/ml
ddH ₂ O	-	12,40	-
celkem		20,00	

Tab. 5: Podmínky PCR pro úspěšné rekombinace.

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	98	2 min
2. Denaturace	98	30 s
3. Hybridizace primerů	T _m	15 s
4. Elongace	72	20 s
5. Závěrečná elongace	72	5 min
6. Ochlazení	10	2 min

Kroky 2-4 byly opakovány 34x

Pro ověření úspěšné transformace ječmene byla PCR analýze podrobena genomová DNA z listů regenerovaných rostlin. K tomuto účelu byly použity primery Hygro_fw s Hygro_rev, díky kterým je amplifikována část sekvence genu *hpt* o velikosti 557 bp. Gen *hpt* je součástí vektoru pBract207 a užívá se k selekci transformantů. Dále byly použity primery Ubi_fw s HvHK3i_rev a IV2_fw s HvHK3i_fw pro ověření přítomnosti obou částí umlčovací kazety. Složení reakční směsi je ukázáno v Tab. 6 a podmínky v termocycleru byly nastaveny dle Tab. 7.

Tab. 6: Složení reakční směsi pro PCR pro ověření transformace ječmene.

Složka	Koncentrace	Objem [μl]	Výsledná koncentrace
Templát DNA	0,1 – 0,2 μg/μl	2,00	20 – 40 ng
primer fw	10 μM	0,10	0,10 μM
primer rev	10 μM	0,10	0,10 μM
dNTP	10 mM	0,10	0,10 mM
PCR pufr	5x	2,00	1x
MgCl ₂	25 mM	1,00	2,50 mM
Taq DNA polymerasa	-	0,10	-
ddH ₂ O	-	5,60	-
celkem		10,00	

Tab. 7: Podmínky PCR pro ověření transformace ječmene.

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	95	2 min
2. Denaturace	95	30 s
3. Hybridizace primerů	T_m	15 s
4. Elongace	72	20 s
5. Závěrečná elongace	72	5 min
6. Ochlazení	10	2 min

Kroky 2-4 byly opakovány 34x

3.2.5 Klonování do vektoru pDrive

Produkt PCR byl purifikován pomocí kitu Wizard SV gel and PCR clean-up system firmy Promega dle protokolu dodaného výrobcem a následně zaklonován do vektoru pDrive nastavením reakce podle Tab. 8. Reakce byla inkubována při 16 °C po dobu 30 minut. Po inkubaci byla reakční směs transformována do chemokompetentních buňek *E. coli* TOP10.

Vektor pDrive je výrobcem dodáván v linearizované formě s přesahujícími uridiny na koncích, díky čemuž dochází k hybridizaci s PCR produktem s přesahujícími adenosiny. Vektor je navržen tak, že umožňuje selekci transformantů pomocí rezistence vůči kanamycinu nebo ampicilinu a také tzv. blue/white screening, které funguje na principu narušení genu *LacZ* po ligaci požadovaného fragmentu. Gen *LacZ* kóduje β -galaktosidasu, která je schopná hydrolyzovat X-Gal za tvorby modrého produktu 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl. Proto kolonie, u kterých byla transformace úspěšná, mají barvu bílou, zatímco netransformované bakterie jsou modré. Společně s X-Gal se do kultivačního média přidává IPTG indukující *LacZ* operon. V okolí klonovacího místa se také nachází rozpoznávací místa mnoha restrikčních endonukleas pro jednoduché klonování do dalších vektorů.

Tab. 8: Složení reakční směsi pro zaklonování PCR produktu do vektoru pDrive s využitím UA klonování.

Složka	koncentrace	Objem [μ l]	Výsledná koncentrace
Vektor pDrive	50 ng/ μ l	1	5 ng/ μ l
Produkt PCR	-	4	~ 2 ng/ μ l
Ligation Master Mix	2x	5	1x
celkem	10		

3.2.6 Transformace *E. coli* teplotním šokem

K transformaci teplotním šokem byly použity chemicky kompetentní buňky *E. coli* TOP10. 50 μ l těchto buněk bylo ponecháno na ledu, aby roztály. Poté k nim byly přidány 2 μ l plasmidové DNA a obsah byl opatrně promíchán špičkou. Směs byla inkubována po dobu 30 minut na ledě. Dalším krokem bylo vystavení buněk teplotnímu šoku při 42 °C v termobloku po dobu 30 sekund. Následně byla směs prudce ochlazená na ledu po dobu 2 minut. Ke směsi bylo přidáno 250 μ l SOC média a následovala inkubace na třepačce při 37 °C, 180 rpm a po dobu minimálně 1 hodiny.

Transformované buňky byly rozetřeny na misky s LB médiem a antibiotikem kanamycinem o koncentraci 100 mg/l. Médium pro buňky transformované vektorem pDrive obsahovalo navíc X-Gal a IPTG. Narostlé kolonie byly druhý den inokulovány do tekutého LB média s kanamycinem o koncentraci 100 mg/l. Z tekuté kultury pak byla vyizolována plasmidová DNA sloužící pro ověření transformace restrikcí nebo sekvenací, nebo pro účely dalšího klonování.

3.2.7 Transformace *A. tumefaciens* elektroporací

Pro elektroporaci byl použit kmen *A. tumefaciens* AGL1 vhodný k následné transformaci ječmene. 1 μ l purifikované plasmidové DNA z *E. coli* po rekombinaci byl smíchán s 50 μ l elektrokompetentních buněk a směs byla napipetována do předem vychlazených elektroporačních kyvet. Elektroporace probíhala při 1800 V po dobu 3 ms. Ihned po elektroporaci bylo k buňkám přidáno 250 μ l MGL média a směs byla inkubována při 28 °C při 180 rpm po dobu 2 hodin. Poté byla kultura přenesena na misky s MGL médiem s kanamycinem (100 mg/l) a rifampicinem (50 mg/l) a misky byly inkubovány při 28 °C po dobu dvou dní.

3.2.8 Restrikce DNA

Po izolaci plasmidové DNA byla pro ověření jednotlivých kroků provedena restrikce s využitím restrikčních endonukleas. V případě ověřování ligace požadované sekvence do vektoru pDrive a následné transformace byla použita restrikční endonukleasa EcoRI a kombinace restrikčních endonukleas SalI a NotI. Pro klonování do vektoru pEntr1A i následné ověření byla také použita kombinace enzymů SalI a NotI. Pro ověření rekombinace do vektoru pBract207 byly použity endonukleasy XhoI a SacI a stejné enzymy byly použity i pro ověření transformace *A. tumefaciens*. Reakce byla vždy

nastavena do celkového objemu 10 μ l tak, aby v reakci byl přítomen 1 μ g plasmidové DNA a 0,5 μ l každého enzymu. Pufr byl zvolen dle doporučení výrobce. Restrikce probíhala při 37 °C po dobu minimálně 2 hodiny.

3.2.9 Ligace

Ligační reakce byla nastavena s purifikovaným fragmentem pEntr1A naštěpeným restrikními endonukleasami SalI a NotI a fragmentem s požadovanou sekvencí vybranou pro RNAi štěpenou stejnými enzymy. Reakce byla nastavena dle Tab. 9. Poté byla ligační směs inkubována při 16 °C přes noc. Druhý den musela být ligasa inaktivována při 70 °C po dobu 10 minut.

Tab. 9: Složení reakční směsi pro ligaci fragmentu o požadované sekvenci do naštěpeného vektoru pEntr1A.

Složka	Objem [μ l]
T4 DNA ligasa	1
10x pufr pro T4 DNA ligasu	2
PEG	2
Plasmid:insert	1:1 (mol:mol)
ddH ₂ O	Doplnění do objemu 20 μ l

3.2.10 Agarosová elektroforéza

Pro analýzu velikosti fragmentů DNA byla použita agarosová elektroforéza. Podle očekávané velikosti fragmentů byla použita koncentrace agarosy v rozmezí 1 -2 %. Přibližně 100 ml připraveného roztoku agarosy v 1x TAE pufru o teplotě 65°C bylo nalito do předem připravené komůrky. Vizualizace DNA byla umožněna díky přidání 7 μ l ethidium bromidu (5g/l) do gelu. Gel byl ponechán ke ztuhnutí po dobu 30 minut. Následně byl přenesen do elektroforetické komůrky, kde byl zalit 1x TAE puftrem tak, aby byl ponořen. Následně byl do první jamky napipetován standard molekulových velikostí (GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder nebo GeneRuler™ 1 kb DNA ladder) a do dalších jamek vzorky smíchané s nanášecím puftrem. Elektroforéza probíhala 30 minut při 120 V. Po separaci byla DNA vizualizována pomocí fotodokumentačního systému firmy Bio-Rad a zpracována pomocí programu ImageLab.

3.2.11 Sekvenace DNA

Pro ověření ligace požadovaného fragmentu do vektoru pDrive byl vzorek osekvenován. K tomuto účelu byly využity služby firmy SEQme. Vzorek byl připraven podle doporučení firmy. Výsledky sekvenace byly vyhodnoceny porovnáním s očekávanou sekvencí v programu BioEdit verze 7.2.5.0 (Hall, 1999).

3.2.12 LR Rekombinace

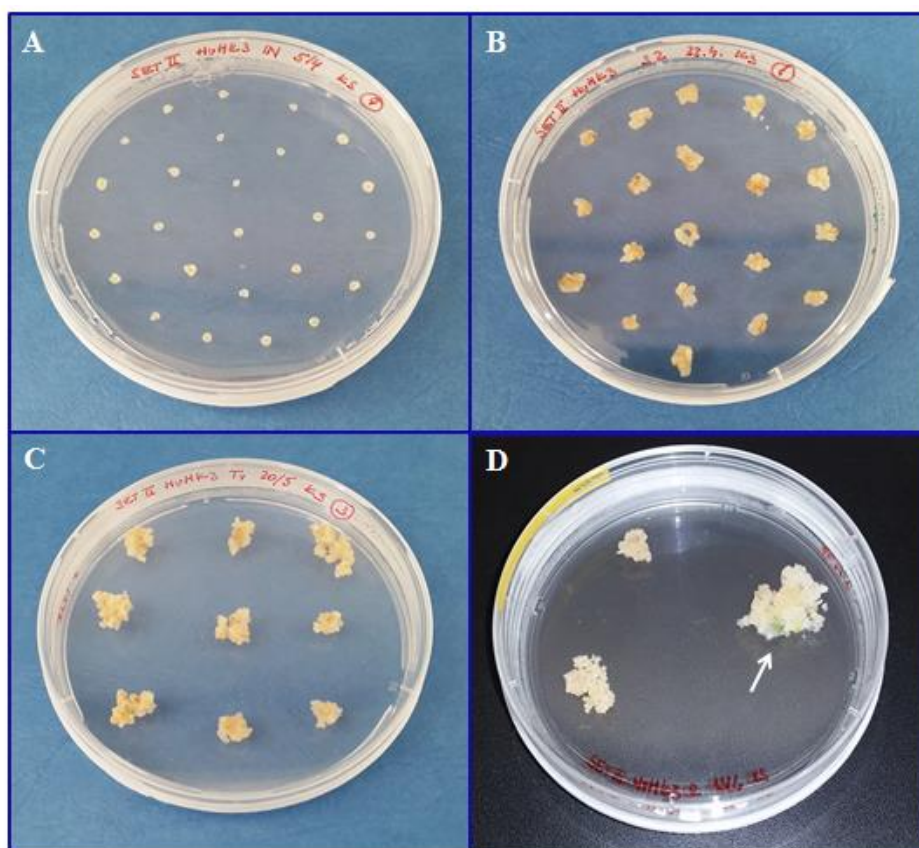
Pro přípravu binárního vektoru pBract207 vhodného k umlčování genů pomocí RNA interference byla připravena reakční směs smícháním 6 μl pEntr1A (o koncentraci 102 ng/ μl) se zaklonovaným fragmentem, 1 μl pBract207 (o koncentraci 150 ng/ μl) a 1 μl TE pufru o pH 8. Ke směsi byly přidány 2 μl LR klonasy II, směs byla promíchána na vortexu, lehce centrifugována a inkubována přes noc při 25 °C. Druhý den byla reakce inaktivována přidáním 1 μl Proteinasy K a inkubací při 37 °C po dobu 10 minut.

3.2.13 Transformace ječmene

Jarní kultivar Golden Promise ječmene *Hordeum vulgare* byl transformován podle dříve publikovaného protokolu (Harwood *et al.*, 2009) Před samotnou transformací bylo nutné připravit standardní inokulum z kultury *A. tumefaciens* nesoucí binární vektor pBract207 s konstruktem *Ubi::umlčovací kazeta HvHK3*. Jedna kolonie byla použita k inokulaci 10 ml MGL média se kanamycinem 50 mg/l a rifampicinem 25 mg/l a kultura byla inkubována 40 hodin při 28 °C a 180 rpm. Kultura byla smíchána v poměru 1:1 s 30% glycerolem a byla rozdělena po 400 μl do mikrozkušavek.

Embrya byla izolována z nezralých zrn ječmene, když dosáhla velikosti 1,5 – 2 mm. Zrna byla nejprve sterilizována 30 sekund v 70% ethanolu, 3x promyta sterilní vodou, 4 minuty v 50% (v/v) roztoku chlornanu sodného a opět 4x promyta sterilní vodou. Veškerá následující práce byla prováděna za sterilních podmínek v laminárním boxu. Ze sterilizovaných zrn byla pomocí pinzet s ostrými hroty a stereoskopu izolována embrya, kterým byla odstraněna embryonální osa. Embrya byla položena skutelem dolů na kalus-indukční médium bez antibiotik. Embrya byla inkubována přes noc ve tmě při 24 °C. Zároveň byla ze standardního inokula připravena kultura *A. tumefaciens*. Standardní inokulum bylo přidáno k 10 ml MGL média bez antibiotik a inkubováno 15 hodin při 28 °C a 180 rpm. Další den bylo na embrya naneseno 750 μl kultury *A. tumefaciens* a embrya byla s kulturou inkubována 5 minut. Kultura byla slita, embrya

byla vysušena o čisté pevné médium a přesazeny na misky s kalus-indukčním médiem obsahující 0,3 mM acetosyringon skutelem nahoru (Obr. 14A). Po třech dnech byla embrya přenesena na kalus-indukční médium s antibiotiky timentinem a hygromycinem, na kterém byla inkubována celkem 6 týdnů ve tmě při 24 °C, přičemž byla každé dva týdny přesazována vždy na čerstvé médium (Obr. 14B). Vzniklé kalusy byly přeneseny na transitní médium s antibiotiky a inkubovány v polosvětle (zajištěno vožením do papírových obálek při 24 °C; Obr. 14C). Zelenající se kalusy byly přeneseny po dvou týdnech na regenerační médium s antibiotiky v hlubokých Petriho miskách a od této doby byly inkubovány ve fytokomoře při konstantní teplotě 24 °C za periody 16 hodin den/ 8 hodin noc; 160 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (Obr 14D).



Obrázek 14: Fotografie transformace a regenerace embryí, (A) nezralá embrya zbavená embryonální osy a infikovaná *A. tumefaciens*; (B) infikovaná embrya rostoucí již 4. týden na kalus-indukčním médiu; (C) embrya po 6 týdnech od infikování rostoucí na tranzitním médiu; (D) Embrya po 8 týdnech od inokulace regenerují na regeneračním médiu, šipka označuje místo, na kterém je kalus nazelenalý a pučí z něj nová rostlina

Regenerující rostlinky byly přeneseny do Erlenmayerovy baňky s kalus-indukčním médiem s antibiotiky, ale neobsahujícím růstové regulátory a kořínky byly opatrně zatlačeny do média. Rostliny, které si v médiu s hygromycinem jsou schopné vytvořit kořenový systém, jsou obvykle vyselektovány jako transgenní. Přibližně po třech týdnech byly rostliny přesazeny do rašelinových disků a inkubovány ve fytotronu s fotoperiodou 16 hodin den/ 8 hodin noc při konstantní teplotě 24 °C. Nakonec byly rostliny přesazeny do směsi hlíny s perlitem a pěstovány ve fytotronu za stejných podmínek až do stádia mléčné zralosti zrn. Poté byly přemístěny do skleníku až do stádia senescence. Kontrolní rostliny prošly stejným procesem regenerace, ale oproti transgenním rostlinám nebyly ko-kultivovány s kulturou *A. tumefaciens*, ani inkubovány na miskách s kalus-indukčním médiem s acetosyringonem.

3.2.14 Měření polyploidie

Polyploidie transgenních rostlin byla proměřována pod vedením Mgr. Jany Čížkové, PhD. z Ústavu experimentální botaniky. Kousek čerstvého listu byl rozsekán pomocí žiletky v 800 µl extrakčního pufru Otto 1. Automatickou pipetou, na níž byla špička s ustříhnutým koncem, byl vzorek nasán a přefiltrován přes nylonové sítko. Ke vzorku bylo dvakrát přidáno 800 µl pufru Otto 2 a 10 µl fluorescenční barvy DAPI. U takto připraveného vzorku byla stanovena polyploidie pomocí průtokové cytometrie.

3.2.15 Izolace genomové DNA

Genomová DNA byla izolována podle protokolu Edward *et al.* (1991). Homogenizované listy byly smíchány s extrakčním pufrem obsahujícím RNasu a důsledně promíchány na vortexu. Vzorky byly inkubovány při laboratorní teplotě po dobu minimálně 1 hodiny. Poté byly centrifugovány při 15000 g po dobu 5 minut. 300 µl supernatantu bylo přeneseno do nových mikrozkušavek a byl k němu přidán stejný objem isopropanolu. Vzorky byly promíchány několikerým převrácením a inkubovány 2 minuty při laboratorní teplotě. Následně byly centrifugovány při 15000 g po dobu 5 minut. Vzniklý pelet byl vysušen a bylo k němu přidáno 100 µl TE pufru o pH 8. Vzorky byly inkubovány přes noc při 4 °C a další den byly vzorky genomové DNA přeneseny do čistých mikrozkušavek. Vzorky byly uchovávány při -20°C.

3.2.16 Sběr a příprava rostlinného materiálu

Rostlinný materiál (listy a klasy) byl sbírán z rostlin po třech měsících od přesazení rostlin do rašelinových disků. Z jednotlivých rostlin bylo odebíráno po deseti mladých listech a pěti klasech, které byly okamžitě uchovávány v tekutém dusíku, aby nedocházelo k degradaci důležitých biomakromolekul. Vzorky z jednotlivých rostlin byly ručně homogenizovány v tekutém dusíku. Takto homogenizované vzorky byly uchovávány při - 80 °C a následně použity pro izolaci RNA.

3.2.17 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byl použit kit RNAqueous®-Micro. U některých vzorků zrn ječmene se nepodařilo získat dostatečné množství RNA, v takovém případě byl použit kit TRI Reagent®. Listy a zrna transgenních rostlin ječmene byly pomocí třecí misky s tloučkem nadrceny v tekutém dusíku.

Pro izolaci pomocí kitu RNAqueous®-Micro bylo odváženo 100 mg nadrceného rostlinného materiálu do 1,5 ml mikrozkušavky. Ke vzorku byl přidán 1 ml lyzačního roztoku. Ke vzorkům zrn bylo navíc přidáno 100 µl Plant RNA Aid. Směs byla promíchána na vortexu a 5 minut inkubována při laboratorní teplotě. Následně byla centrifugována při 16000 g po dobu 10 minut při teplotě 4 °C. Supernatant byl převeden do 2 ml mikrozkušavky a byl k němu přidán 64% ethanol o stejném objemu. 700 µl připraveného lyzátu bylo napipetováno do kolonky s filtrem a centrifugováno při 12000 g po dobu 2 minut při 4 °C. Vzorek byl nanášen do kolonky s filtrem do doby, než byl takto zpracován celý lyzáat. Tekutina ve sběrné zkumavce byla odstraněna. Vzorek imobilizovaný na membráně/filtrech byl nejprve promyt 700 µl promývacího roztoku 1 a následně 2x 500 µl promývacím roztokem 2 za stejného nastavení centrifugace. Promývací roztoky ze sběrné zkumavky byly odstraněny. Filtr byl umístěn do nové 1,5 ml mikrozkušavky a RNA byla z filtru eluována pomocí elučního roztoku přehřátého na 80 °C nejprve o objemu 60 µl a následně 40 µl. Centrifugace probíhala při 12000 g po dobu 2 minut při laboratorní teplotě.

V případě izolace pomocí kitu TRI Reagent® bylo ke 100 mg rostlinného materiálu přidán 1 ml roztoku TriReagent. Vzorek byl promíchán na vortexu a inkubován 5 minut při laboratorní teplotě. Následovala centrifugace při 12000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Supernatant byl převeden do nových mikrozkušavek a bylo k němu přidáno 200 µl chloroformu. Směs byla promíchána několikerým převrácením

po dobu 15 sekund a centrifugována při 12000 g po dobu 15 minut při 4 °C. Vrchní vodná fáze byla přenesena do nové mikrozkuhavky a bylo k ní přidáno 500 µl isopropanolu. Směs byla inkubována po dobu 10 minut při laboratorní teplotě a poté centrifugována při 12000 g po dobu 10 minut při 4 °C. Vzniklý pelet byl promyt 1 ml 75% ethanolu při centrifugaci při 7500 g po dobu 5 minut při 4 °C. Ethanol byl z mikrozkuhavky odpipetován. Pelet byl ponechán k vyschnutí po dobu 20 minut v digestoři a následně rozpuštěn ve 100 µl nuclease-free vody.

3.2.18 Ošetření RNA DNasou

Vyizolovaná RNA byla ošetřena kitem TURBO DNA-free™ za účelem odstranění kontaminující genomické DNA. Ke 40 µl RNA bylo přidáno 5 µl 10x Turbo DNase pufru a 3 µl Turbo DNasy. Reakce byla inkubována při 37 °C po dobu 45 minut. Poté byly k reakci přidány další 2 µl Turbo DNasy a reakce byla inkubována při 37 °C po dalších 45 minut.

3.2.19 Přečištění RNA pomocí magnetických kuliček

Pro přečištění RNA od DNasy a zbytků degradované genomové DNA byly použity paramagnetické kuličky Agen®court RNAClean® XP. V 0,2 ml mikrozkuhavce bylo smícháno 50 µl RNA, 25 µl magnetických kuliček a 20 µl isopropanolu. Pipetováním byl obsah promíchán a následně byl inkubován po dobu 10 minut při laboratorní teplotě. Následně byla mikrozkuhavka umístěna na magnet, na kterém byla inkubována po dobu 5 minut při pokojové teplotě. Supernatant byl odpipetován a magnetické kuličky byly 3x promyty 100 µl 70% ethanolu. Mikrozkuhavka byla sundána z magnetu a ponechána k vysušení v digestoři po dobu maximálně 10 minut. Magnetické kuličky byly rozpuštěny v 50 µl nuclease-free vody, inkubovány 10 minut při laboratorní teplotě, a mikrozkuhavka byla opět umístěna na magnet a ponechána na něm po dobu 5 minut při laboratorní teplotě. Supernatant byl přepipetován do nových mikrozkuhovek.

3.2.20 Reverzní transkripce

Přečištěná RNA byla přepsána do cDNA pomocí H minus M-MuLV reverzní transkriptasy. Nejprve byla připravena směs 1 µl 100µM oligo(dT)₁₈ a 12 µl RNA tak, aby v reakci bylo 500 ng RNA. Tato směs byla inkubována 5 minut při 65 °C a přenesena na led. Do reakce bylo přidáno 4 µl 5x RT pufru, 2 µl dNTP mixu a 1 µl H

minus M-MuLV reverzní transkriptasy. Reakce byla inkubována 1 hodinu při 42 °C a následně 10 minut při 70 °C, aby byla inaktivována reverzní transkriptasa.

3.2.21 Real-time qPCR

Jako templát bylo použito osm vzorků cDNA z listů rostlin *hvhk3* transgenní linie V1 a čtyři vzorky cDNA z listů kontrolních rostlin WT. Sledována byla exprese genu pro cytokininový receptor *HvHK3* a dále pak dva orthology *AHK4* z *Arabidopsis* - *HvHK4-1*, *HvHK4-2*. Jako endogenní kontrola byly použity geny *HvAKT* a *HvEF2*. Všechny vzorky byly měřeny ve třech technických replikátech.

1,25 µl cDNA bylo smícháno s 2,5 µl fluorescenční barvy SYBR® Green, 0,1 µl referenční barvy ROX, směsí primerů o finální koncentraci 30 nM a doplněno ddH₂O na objem 5 µl. K RT-PCR byly použity 384-jamkové destičky. Všechny reakce probíhaly za podmínek uvedených v Tab. 10.

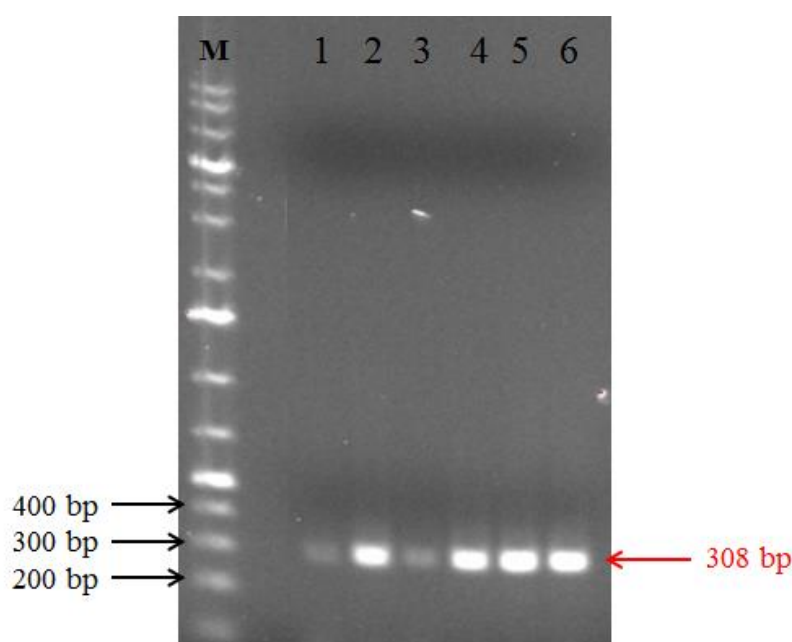
Tab. 10: Podmínky RT-PCR pro relativní kvantifikaci exprese genů ječmenných cytokininových receptorů.

Krok	Teplota [°C]	Čas
1. Počáteční denaturace	95	2 min.
2. Denaturace	95	15s
3. Hybridizace primerů	60	1 min.
Kroky 2-3 byly opakovány 40x		

4 VÝSLEDKY A DISKUZE

4.1 Ověření PCR produktu pro HvHK3

Před samotným klonováním byla ověřena funkčnost primerů a amplifikace požadované sekvence z nejlepšího zdroje. Jako zdroj amplifikace byly vybrány cDNA z listu, kořene a zrna ječmene v koncentracích 2 ng/μl a 20 ng/μl. Amplifikace fragmentu o velikosti 308 bp probíhala u všech vzorků. U vzorků o nižší koncentraci došlo k amplifikaci menšího množství PCR produktu. U vzorků o vyšší koncentraci bylo množství PCR produktu vyšší (Obr. 15) a pro účely klonování byla nakonec vybrána cDNA ze zrna ječmene o koncentraci 20 ng/μl (Obr. 15, vzorek 6).



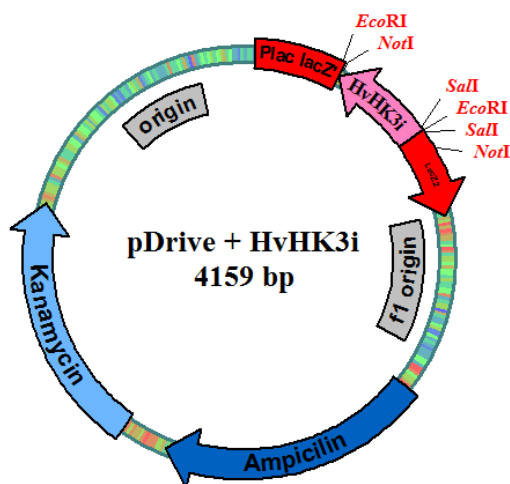
Obrázek 15: Fotografie agarosového gelu pro ověření klonování do vektoru pDrive. (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas; (1 – 3) vzorky cDNA o koncentraci 2 ng/μl v pořadí kořen, list a zrno; (4 – 6) vzorky cDNA o koncentraci 20 ng/μl v pořadí kořen, list a zrno. Amplifikace fragmentu HvHK3i o velikosti 308 bp byla potvrzena u všech vzorků. Intenzita fluorescence jednotlivých separovaných fragmentů je přímo úměrná množství PCR produktu.

4.2 Ověření klonování do vektoru pDrive restriční analýzou a sekvenací

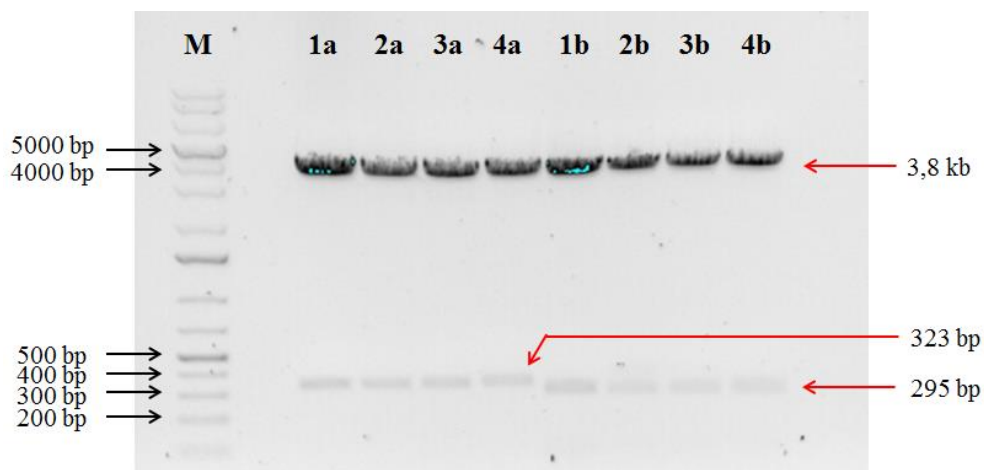
Součástí vektoru pDrive je restriční místo pro EcoRI po obou stranách klonovacího místa. Zároveň vektor na jedné straně klonovacího místa obsahuje sekvenci rozpoznávanou enzymem SalI a na straně druhé obsahuje sekvenci rozpoznávanou enzymem NotI. Nicméně tato místa by měla být po úspěšném vklonování fragmentu přítomna ve vektoru 2x, neboť do něj byla zanesena společně s fragmentem díky amplifikaci fragmentu HvHK3i pomocí PCR a navržením primerů se sekvencemi rozpoznávanými těmito enzymy (Obr. 16).

Pro ověření zaklonování sekvence *HvHK3i* do vektoru pDrive byla zvolena restrikce enzymem EcoRI a kombinace enzymů SalI a NotI. Po restrikci enzymy SalI a NotI měl výsledný fragment velikost 295 bp a po restrikci EcoRI 323 bp. Vektor pDrive má velikost 3,8 kb. Pokud by byl vektor pDrive prázdný, čili bez fragmentu HvHK3i, byl by v obou případech na gelu vidět pouze fragment linearizovaného vektoru o velikosti přibližně 3,8 kb a fragment menší než 100 bp. Restrikce byla provedena u plasmidových DNA pocházejících ze 4 různých kolonií. Výsledek restrikce byl vizualizován pomocí agarosové elektroforézy a bylo zjištěno, že u všech 4 kolonií byla potvrzena úspěšná transformace vektorem pDrive se zaligovanou sekvencí HvHK3i (Obr. 17). DNA z těchto kolonií byla následně použita pro další klonování.

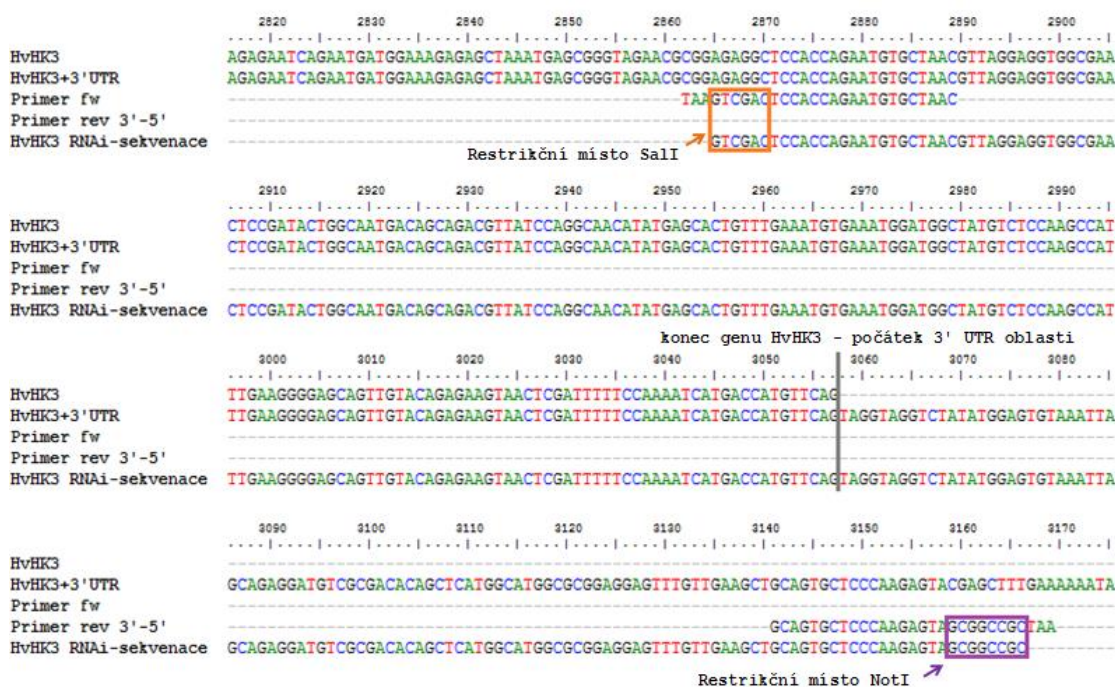
Pro ověření zaklonování správné sekvence fragmentu HvHK3i byly vzorky plasmidové DNA z kolonií 3 a 4 odeslány na sekvenaci (Obr. 18). U obou vzorků byla prokázána přítomnost požadované sekvence odpovídající vybranému úseku genu *HvHK3* se zaneseným restričním místem pro SalI a NotI. V obou případech byla sekvence do vektoru pDrive vložena v obráceném směru (Obr. 16), což díky následnému klonování pomocí restričních míst SalI a NotI nezpůsobilo žádné komplikace. Plasmidová DNA z kolonií 3 a 4 byla následně použita pro další klonování.



Obrázek 16: Schéma vektoru pDrive se zaklonovaným fragmentem HvHK3i v obráceném směru. Fragment *HvHK3i* byl zaklonován do multiklonovacího místa díky čemuž došlo k narušení genu *LacZ* značeného červenou šipkou. Součástí vektoru jsou geny umožňující selekci transformovaných kolonií antibiotiky ampicilinem a kanamycinem. Červeně jsou znázorněny restrikční místa pro restrikční endonukleasy použité k ověření klonování do vektoru pDrive. Černé šipky ukazují restrikční endonukleasy *SalI* a *NotI*, které byly do vektoru zaneseny společně s fragmentem *HvHK3i*. Schématický obrázek vektoru byl sestaven pomocí programu pDraw32 (verze 1.1.0.132).



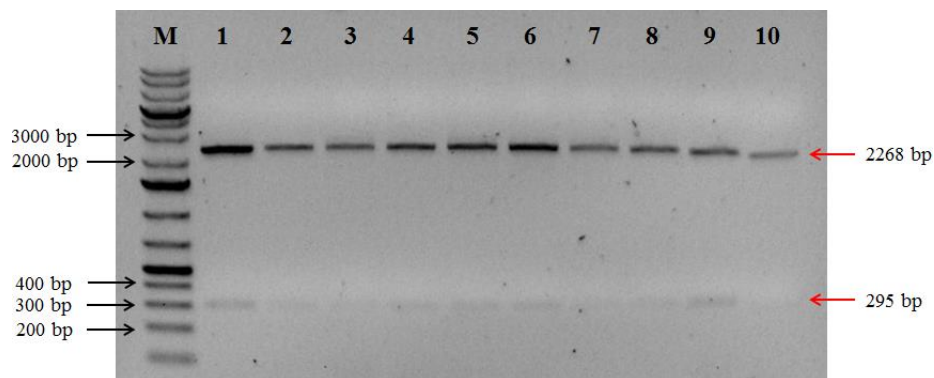
Obrázek 17: Fotografie agarosového gelu pro ověření klonování do vektoru pDrive. (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas; (1a – 4a) vzorky plasmidové DNA ze čtyř různých kolonií podrobené restrikční analýze enzymem *EcoRI*, je možno pozorovat separované fragmenty o velikosti 3,8 kb odpovídající linearizovanému vektoru pDrive, a 323 bp odpovídající fragmentu *HvHK3i*, (1b-4b) vzorky plasmidové DNA ze čtyř různých kolonií podrobené restrikční analýze kombinací enzymů *SalI* a *NotI*, je možno pozorovat separované fragmenty o velikosti odpovídající linearizovanému vektoru pDrive, a 295 bp odpovídající fragmentu *HvHK3i*. V případě neúspěšného klonování by byl na gelu vidět fragment o velikosti přibližně 3,8 kb odpovídající linearizovanému fragmentu, a fragmenty menší než 100 bp. U všech čtyř kolonií byla potvrzena úspěšná transformace vektorem pDrive se zaklonovaným fragmentem *HvHK3i*.



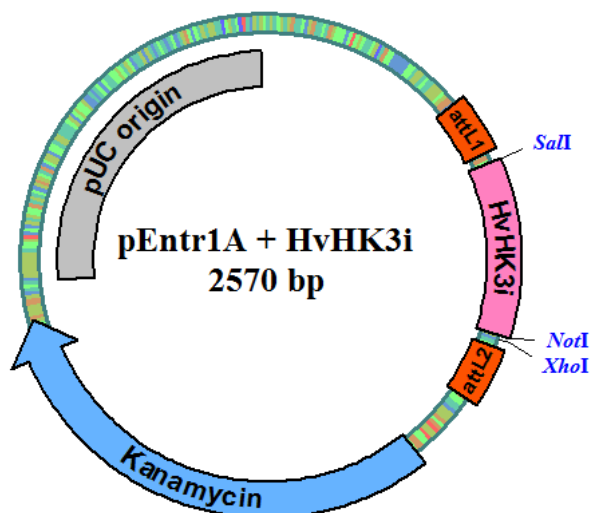
Obrázek 18: Porovnání sekvencí genu *HvHK3*, jeho 3'-UTR oblasti, primerů použitých pro amplifikaci úseku pro RNA interferenci a výsledku sekvencování získaného amplikonu. Srovnání sekvencí bylo vytvořeno pomocí programu ClustalW. Oranžově je vyznačeno přidané restriční místo pro SalI, fialově je vyznačeno přidané restriční místo pro NotI, šedě je vyznačeno místo, kde končí gen *HvHK3* a začíná 3'-UTR oblast.

4.3 Ověření klonování do vektoru pEntr1A restriční analýzou

K ověření překlónování fragmentu HvHK3i z vektoru pDrive do vektoru pEntr1A a správné transformace byla zvolena restriktce restričními endonukleasami SalI a NotI za vzniku fragmentů o velikosti 295 bp a 2275 bp (Obr. 19). V případě neúspěšného klonování by došlo ke vzniku fragmentu o velikosti 2268 bp odpovídající linearizovanému vektoru pEntr1A, a fragmentu o velikosti 449 bp odpovídající sekvenci štěpené pomocí restričních endonukleas SalI a NotI. Separace fragmentů byla provedena agarosovou elektroforézou. Restriční analýze byly podrobeny plasmidové DNA z 10 různých kolonií a u všech byla prokázána přítomnost požadovaného fragmentu HvHK3i zaligovaného do vektoru pEntr1A. Schéma vektoru pEntr1A s fragmentem HvHK3i je vidět na Obr. 20.



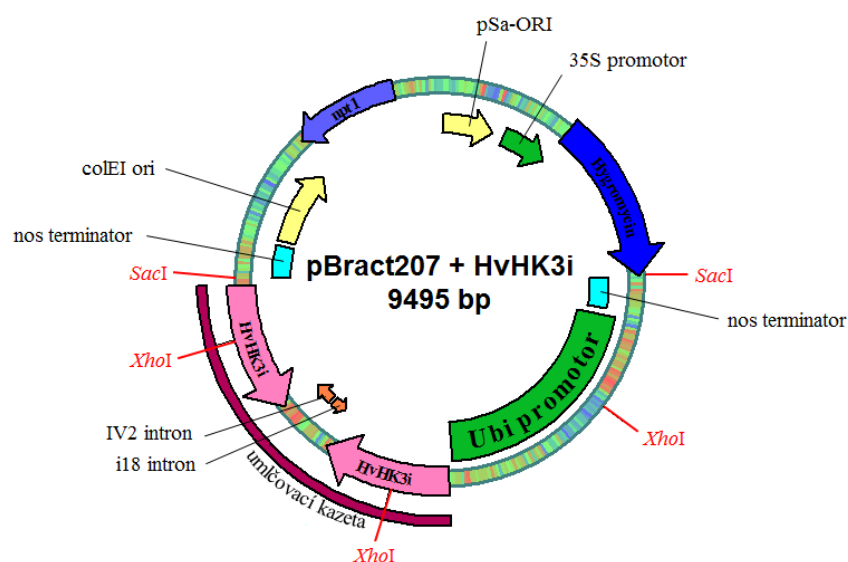
Obrázek 19: Fotografie agarosového gelu pro ověření klonování do vektoru pEntr1A. (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas; (1-10) vzorky plasmidové DNA z 10 různých kolonií vystaveny restriční analýze kombinací enzymů *SalI* a *NotI*. U všech vzorků došlo k separaci fragmentů o velikosti 295 bp odpovídající sekvenci *HvHK3i* a 2275 bp odpovídající linearizovanému vektoru pEntr1A. V případě, že by fragment do vektoru zaklonován nebyl, na gelu by bylo možné pozorovat fragment o velikosti 2265 bp odpovídající prázdnému linearizovanému vektoru, a fragment o velikosti 449 bp odpovídající sekvenci z vektoru pEntr1A po restriční enzymy *SalI* a *NotI*. U všech deseti kolonií bylo potvrzeno úspěšné klonování fragmentu *HvHK3i* do vektoru pEntr1A.



Obrázek 20: Schéma vektoru pEntr1A se zaklonovaným fragmentem *HvHK3i*. Fragment *HvHK3i* byl zaklonován do multiklonovacího místa mezi rekombinační místa *attL1* a *attL2* značené oranžovými rámečky. Součástí vektoru je gen umožňující selekci transformovaných kolonií kanamycinem. Modře jsou znázorněny restriční místa pro restriční endonukleasy použité ke klonování i k ověření klonování do vektoru pEntr1A. Enzym *XhoI* byl použit k ověření rekombinace pBract207 v dalším kroku klonování. Schématický obrázek vektoru byl sestaven pomocí programu pDraw32 (verze 1.1.0.132).

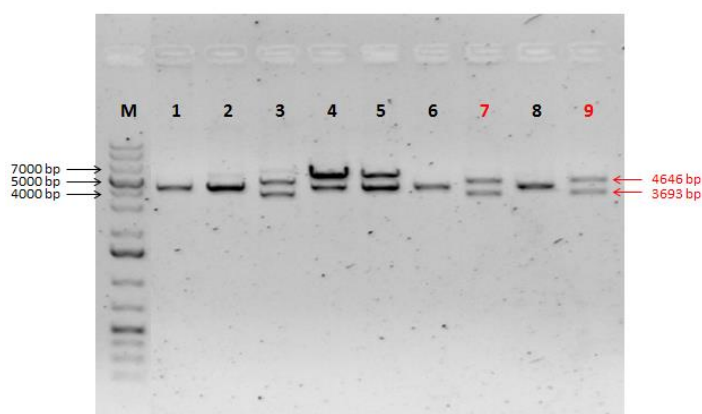
4.4 Ověření rekombinace do vektoru pBract207 restriční analýzou

Pro ověření úspěšné rekombinace byla zvolena restriční analýza pomocí enzymu *SacI* a také *XhoI*. Binární vektor pBract207 má ve své sekvenci přítomny dvě restriční místa pro endonukleasu *SacI*. Pokud by nedošlo k rekombinaci, fragmenty po štěpení by měly velikost 4646 bp a 4831 bp. Po úspěšné rekombinaci by ale druhý fragment měl velikost 3693 bp. Protože při této restrikcii by mohlo jít poměrně špatně rozeznat, zda došlo k rekombinaci pouze do jednoho místa nebo do obou z důvodu malého rozdílu ve velikosti výsledných fragmentů, byla provedena také analýza s využitím restriční endonukleasy *XhoI*. Vektor pBract207 obsahuje jednu palindromickou sekvenci rozpoznávanou enzymem *XhoI*. Ovšem pokud by došlo k úspěšné rekombinaci do obou rekombinačních míst, byly by společně se sekvencí *HvHK3i* přeneseny z vektoru pEntr1A do vektoru pBract207 další dvě restriční místa pro *XhoI* a výsledná velikost fragmentů po restrikcii by byla 6112 bp, 1714 bp a 513 bp (Obr. 21). Pokud by došlo k rekombinaci pouze jednoho fragmentu *HvHK3i*, na gelu by bylo možné pozorovat dva fragmenty. A pokud by rekombinace byla zcela neúspěšná, na gelu by byl pouze jeden fragment o velikosti 9477 bp odpovídající linearizovanému vektoru pBract207.

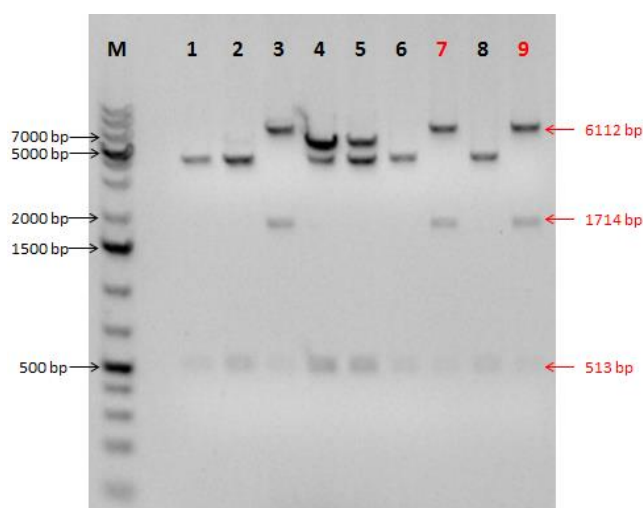


Obrázek 21: Schéma binárního vektoru pBract207 se zaklonovaným fragmentem *HvHK3i* do obou rekombinačních míst. Fragment *HvHK3i* byl s využitím LR rekombinace dvakrát vložen (protisměrně) do binárního vektoru pBract207, aby utvořil umlčovací kazetu. Mezi oběma fragmenty se nachází introny (oranžové šipky) umožňující poskládání kazety do hpRNA. Součástí vektoru jsou geny (modré šipky) umožňující selekci transformovaných embryí ječmene pomocí hygromycinu a timentinu. K expresi umlčovací kazety v cílovém organismu dochází pod kontrolou ubikvitinového promotoru. Červeně jsou znázorněny restriční místa pro restriční endonukleasy *SacI* a *XhoI* použité úspěšné rekombinace do vektoru pBract207. Schématický obrázek vektoru byl sestaven pomocí programu pDraw32 (verze 1.1.0.132).

Restrikční analýze byly podrobeny plasmidové DNA z 9 různých kolonií *E. coli* narostlých po transformaci vektorem po rekombinaci. K separaci fragmentů byla využita agarosová elektroforéza. Po vizualizaci fragmentů bylo vyhodnoceno, že úspěšná rekombinace a transformace byla dosažena u kolonie 7 a 9 (Obr. 22 a 23). Plasmidová DNA z těchto kolonií byla následně ověřena pomocí PCR, bylo stoprocentně jisté, že vektor obsahuje požadovanou sekvenci v obou rekombinačních místech, neboť příprava insertu v obou místech je pro funkci zásadní.



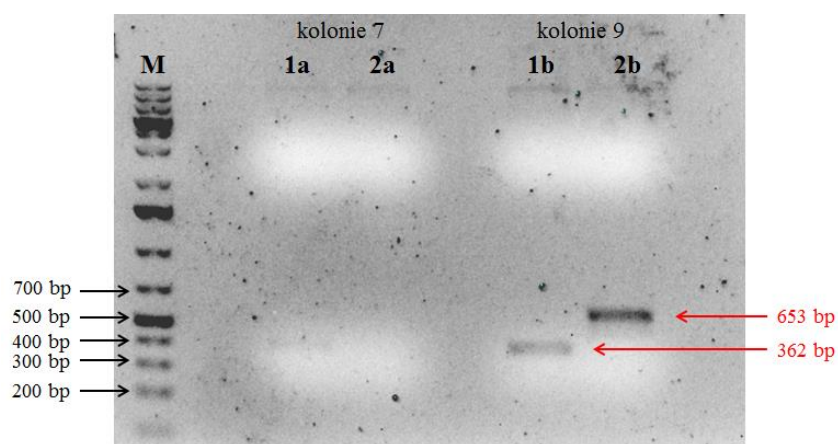
Obrázek 22: Fotografie agarosového gelu pro ověření Gateway rekombinace do binárního vektoru pBract207, (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas; (1-9) vzorky podrobené restrikční analýze enzymem SacI; po restrikci vznikají 2 fragmenty o velikosti 4646 bp a 3693 bp. Úspěšná rekombinace byla potvrzena u vzorků 7 a 9



Obrázek 23: Fotografie agarosového gelu pro ověření Gateway rekombinace do binárního vektoru pBract207, (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder firmy Fermentas; (1-9) vzorky podrobené restrikční analýze enzymem XhoI; po restrikci vznikají 3 fragmenty o velikosti 6112 bp, 1714 bp a 513 bp. Úspěšná rekombinace byla potvrzena u vzorků 7 a 9.

4.4.1 Ověření rekombinace do vektoru pBract207 pomocí PCR

Plasmidová DNA z kolonií 7 a 9 byla použita pro ověření pomocí PCR. Pro obě kolonie byly nastaveny dvě reakce, které ověřovaly přítomnost požadované sekvence zvlášť. Pro toto ověření byla použita kombinace primerů pro ubikvitinový promotor Ubi_fw s primerem HvHK3i_rev a pro IV2 intron primery IV2_fw a HvHK3i_fw. Po amplifikaci s použitím těchto primerů by výsledné amplikony měly mít velikost 449 bp a 653 bp (Obr. 24). Amplifikace proběhla úspěšně pouze u plasmidové DNA z kolonie 9. Po dvojitém ověření kolonie 9 mohla být použita pro transformaci *A. tumefaciens*.



Obrázek 24: Fotografie agarosového gelu pro ověření Gateway rekombinace kolonií 7 a 9. (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder; (1a a 2a) U vzorků plasmidové DNA z kolonie 7 nedošlo k amplifikaci fragmentů (1b) fragment o velikosti 362 bp vzniklý po amplifikaci primery Ubi_fw a HvHK3i_rev; (2b) fragment o velikosti 653 bp vzniklý po amplifikaci primery HvHK3i_fw a IV2_fw. U kolonie 9 byla potvrzena úspěšná rekombinace.

4.5 Ověření transformace *A. tumefaciens* restriční analýzou a sekvenací

Pro ověření úspěšné transformace *Agrobacteria* byla zvolena restriční analýza opět pomocí SacI a XhoI. Pro získání dostatečného množství DNA je nutné ji transformovat do *E. coli* a teprve plasmidová DNA z *E. coli* může být podrobena restriční analýze. K tomuto účelu byly použity plasmidové DNA z pěti různých kolonií *A. tumefaciens* a následně po každé transformaci byly vybrány 2 kolonie *E. coli* jejichž plasmidová DNA byla podrobena restriční analýze. Analýza prokázala, že transformace *A. tumefaciens* proběhla úspěšně u všech pěti kolonií. Pro ověření vnesení správné sekvence do obou rekombinačních míst binárního vektoru, byly vzorky zaslány na sekvenaci. K tomuto účelu byl pBract207 z vybrané kolonie *E. coli* číslo 8 štěpen restričním enzymem VspI, který jej štěpí na 4 fragmenty.

Fragmenty byly separovány pomocí agarosové elektroforézy a 2 fragmenty nesoucí rekombinační místa byly z gelu vyříznuty, purifikovány a použity k sekvenaci. Výsledky byly vyhodnoceny s pomocí programu BioEdit s využitím funkce ClustalW Multiple alignment (Obr. 25). Díky sekvenaci bylo ověřeno, že došlo k rekombinaci požadované sekvence v obou místech a připravený konstrukt mohl být použit pro transformaci ječmene.

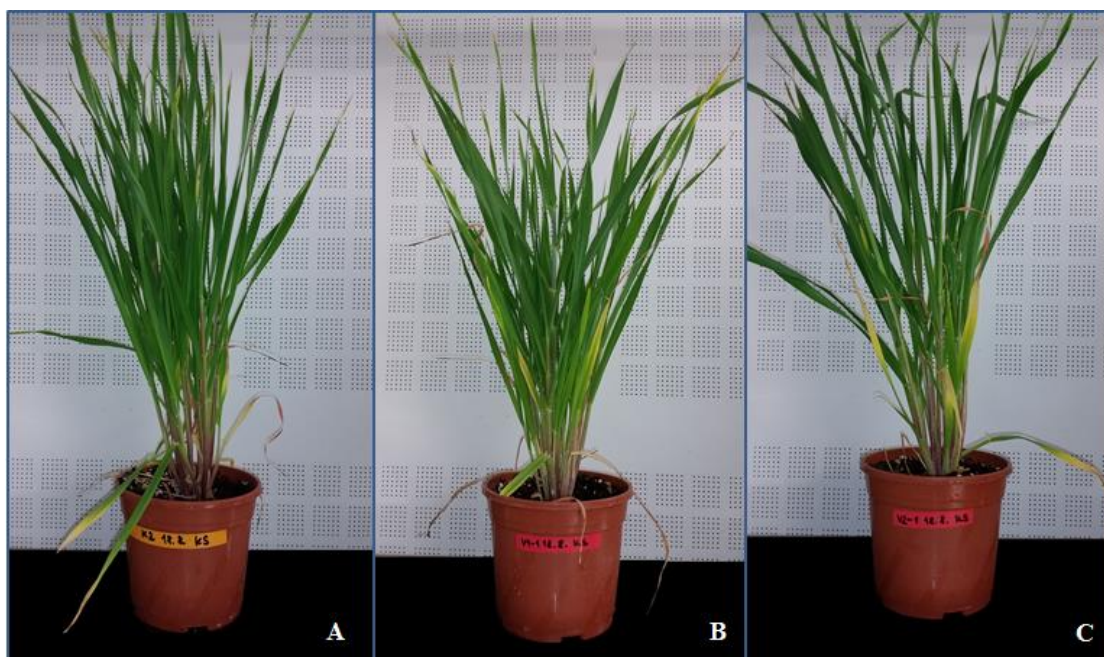


Obrázek 25: Porovnání sekvencí pomocí ClustalW navrženého primeru použitého pro sekvenaci (oranžově), sekvenci 187 párů bazí od stop kodonu genu *HvHK3* se 101 bp 3'-UTR oblasti, odsekvenovaného fragmentu 1 a odsekvenovaného fragmentu 2, modrá čára označuje konec sekvence 187 bp od stop kodonu genu *HvHK3* se 101 bp 3'-UTR použité k rekombinaci. Sekvenace prokázala přítomnost požadovaných sekvencí na obou rekombinačních místech.

4.6 Transformace a regenerace ječmene *Hordeum vulgare*

Pouze u dvou embryí došlo k regeneraci transgenních rostlin, které byly označeny jako V1 a V2. Z prvního kalusu bylo regenerováno 8 rostlin (značení V1-1 – V1-8) a z druhého kalusu byly regenerovány 3 rostliny (značení V2-1 – V2-3). Obvykle se z každého transformovaného kalusu regeneruje pouze jedna rostlina, neboť všechny ostatní mají stejný genom. Ovšem pro malý počet regenerujících kalusů byla práce provedena se všemi rostlinami. Kontrolní rostliny byly celkem 4 s označením K1 – K4. T0 generace rostlin jednotlivých genotypů je vidět na Obr. 26. U těchto rostlin nebyl pozorován výrazný rozdíl v růstu ani rychlosti vývoje. U T0 generace není vhodné provádět fenotypizaci, neboť při procesu regenerace může dojít k významnému časovému posunu vývoje jednotlivých rostlin.

Malá úspěšnost transformace mohla být dána špatně vybranými zrny pro izolaci embryí. Tato metoda je velmi citlivá na výběr zrn pro izolaci embryí o určitém stáří a v některých případech jde těžko odhadnout. Také je nutné, aby rostliny, ze kterých jsou zrna sbírána, byly naprosto zdravé. Celý proces transformace, selekce a regenerace nových rostlin je náchylný na kontaminaci. Při práci je nutné důsledně dbát na pečlivost a sterilitu.



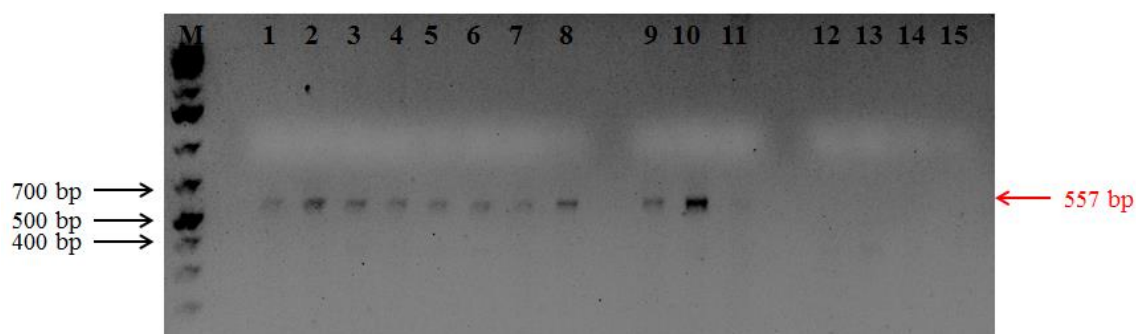
Obrázek 26: Fotografie zregenerovaných rostlin ječmene (T0 generace) po dvou měsících od přesazení do směsi hlíny s perlitem. (A) kontrolní rostlina WT (K2), (B) transgenní rostlina *hvhk3* zregenerovaná z prvního kalusu (V1-1), (C) transgenní rostlina *hvhk3* zregenerovaná z druhého kalusu (V2-1).

4.7 Ověření transformace ječmene

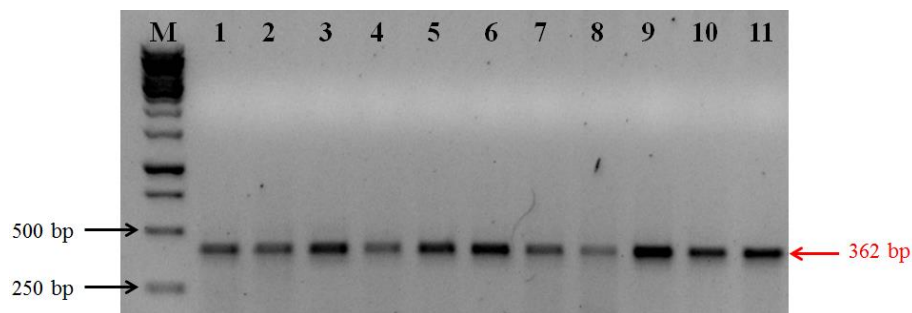
Jakmile byly regenerované rostliny přesazeny do rašelinových disků a měly dostatečně velké listy, mohly být použity pro izolaci genomové DNA a ověření úspěšné transformace ječmene. Pro ověření byla použita PCR s primery Ubi_fw a HvHK3i_rev amplifikující sekvenci o velikosti 362 bp, a IV2_fw a HvHK3i_fw amplifikující sekvenci o velikosti 653 bp. Mimo těchto kombinací primerů byly použity primery hygro_fw a hygro_rev (velikost amplikonu 557 bp) pro ověření přítomnosti genu *hpt*, který je součástí vektoru pBract207. Tento gen je označován jako selekční marker a je zodpovědný za rezistenci transformovaných rostlin vůči hygromycinu.

U diploidních i tetraploidních rostlin byla prokázána úspěšná transformace. Pomocí PCR byla prokázána přítomnost selekčního markeru ve všech rostlinách mimo kontrolních (Obr. 27). Také první část umlčovací kazety byla pomocí Ubi_fw a HvHK3i_rev ověřena (Obr. 28). Druhá část umlčovací kazety se nepodařilo prokázat s použitím primerů IV2_fw a HvHK3i_fw ani při vyzkoušení jiných kombinací primerů, nastavení jiných podmínek PCR jako je změna počtu cyklů, přidání DMSO do reakce nebo změna množství templátu.

V případě nepřítomnosti druhé části umlčovací kazety se zaklonovanou sekvencí nedojde v ječmeni k tvorbě hpRNA. Ovšem i přítomnost pouze jedné homologní sekvence (první část umlčovací kazety) může vyvolat umlčovací proces, ovšem s nižší účinností.



Obrázek 27: Fotografie agarosového gelu pro ověření transformace ječmene pomocí PCR s použitím primerů na selekční marker gen *hpt*. Výsledný amplikon o velikosti 557 odpovídá velikosti separovaného fragmentu u vzorků 1 - 11. (M) standard GeneRuler™ 1 kb plus DNA ladder, (1-8) amplifikace probíhala z gDNA rostlin V1-1 – V1-8, (9-11) amplifikace probíhala z gDNA rostlin V2-1 – V2-3, (12-15) amplifikace probíhala z gDNA kontrolních rostlin. Přítomnost selekčního markeru byla prokázána u rostlin V1-1 – V1-8 i V2-1 – V2-3 a byla u nich potvrzena úspěšná transformace. U kontrolních rostlin k amplifikaci fragmentu nedošlo.

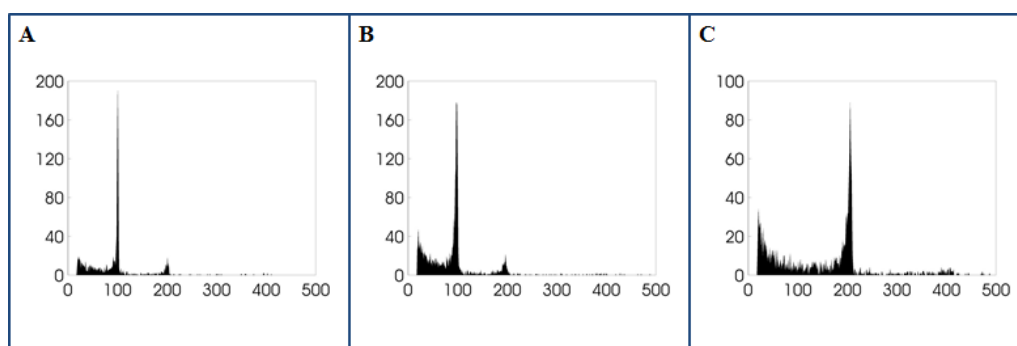


Obrázek 28: Fotografie agarosového gelu pro ověření transformace ječmene pomocí PCR s použitím primerů Ubi_fw a HvHK3i_rev, výsledný amplikon o velikosti 362 bp odpovídá velikosti separovaného fragmentu u vzorků 1-11. (M) standard GeneRuler™ 1 kb DNA ladder, (1-8) amplifikace probíhala z gDNA rostlin V1-1 – V1-8, (9-11) amplifikace probíhala z gDNA rostlin V2-1 – V2-3. Přítomnost první části umlčovací kazety byla prokázána u rostlin V1-1 – V1-8 i V2-1 – V2-3.

4.8 Stanovení polyploidie transgenních rostlin

Pokud se v organismu chromozomy nacházejí ve dvou kopiích, hovoříme o diploidních organismech. Pokud jsou ovšem chromozomy přítomny ve více kopiích, mluvíme o polyploidních organismech. Stanovení polyploidie transgenních rostlin je důležité, neboť u polyploidních rostlin dochází k řadě změn souvisejících s jejich morfologií i fyziologií (Levin, 1983; Segraves a Thompson, 1999; Beaulieu *et al.*, 2008)

Výstupem z průtokového cytometru jsou histogramy, podle kterých se dá rozeznat, zda jsou rostliny diploidní nebo polyploidní vzhledem ke srovnání s diploidní kontrolní rostlinou (Obr. 29). Díky této analýze bylo zjištěno, že rostliny V1 pocházející z prvního kalusu jsou diploidní, zatímco rostliny V2 jsou tetraploidní.



Obrázek 29: Přehled histogramů z analýzy polyploidie transgenních rostlin ječmene průtokovým cytometrem. Histogram znázorňuje počet měřených částic k intenzitě fluorescence. (A) Histogram z analýzy diploidní kontrolní WT rostliny. Nejvíce částic bylo proměřeno s intenzitou fluorescence 100. (B) Histogram z analýzy *hvhk3* mutantních rostlin V1. Histogram se podobá histogramu kontrolní rostliny, nejvíce částic bylo změřeno s intenzitou fluorescence 100. Rostliny V1 jsou diploidní. (C) Histogram z analýzy *hvhk3* mutantních rostlin V2. Nejvíce částic bylo proměřeno s intenzitou fluorescence 200. Rostliny V2 jsou tetraploidní.

4.9 Stanovení fenotypu transgenních rostlin

U T0 generace transgenních rostlin byl sledován fenotyp nadzemní části a byl počítán počet klasů a výška rostlin. Výsledky byly srovnávány mezi transgenními rostlinami *hvhk3* linie V1 (8 rostlin) a V2 (3 rostliny) a kontrolními rostlinami WT (K - 4 rostliny). U jednotlivých rostlin byly spočítány všechny klasy a následně byl spočítán průměr pro rostliny *hvhk3* linie V1, V2 a kontrolní rostliny WT. Výška byla měřena jako vzdálenost od počátku stébla po vrchol klasu pro všechny rostliny shodně. U jednotlivých rostlin bylo vybráno deset nejstarších stébel, u kterých byla výška měřena, aby byly výsledky porovnatelné. Následně byla data z deseti stébel zprůměrována pro jednotlivé rostliny a hodnoty pak byly srovnány s průměrnou hodnotou výšky všech kontrolních rostlin (Tab. 11). Statistický význam dosažených výsledků byl vyhodnocen pomocí t-testu.

I když na první pohled probíhal vývoj rostlin přibližně stejnou rychlostí (Obr. 21), u *hvhk3* linie V1 se polovina rostlin významně lišila průměrnou výškou, která byla vyšší v porovnání s kontrolními rostlinami WT. Vyšší průměrná výška byla stanovena také u všech rostlin *hvhk3* linie V2. Zatímco pro linii V1 se průměrná hodnota počtu klasů statisticky významně nelišila, u linie V2 byla průměrná hodnota počtu klasů téměř o polovinu nižší v porovnání s kontrolními rostlinami WT.

Při stanovení fenotypu bylo nutno zohlednit malý počet rostlin. Navíc rostliny T0 generace mohou regenerovat v různých časových intervalech od samotné transformace a jsou stresovány průběžným odběrem vzorků, což se odráží ve statistických ukazatelích. Proto se odchylky ve fenotypu a odlišná rychlost vývoje u těchto rostlin nedají přesně určit a přesnější výsledky poskytne v budoucnu analýza T1 generace (Mičúchová, 2015).

Tab. 11: Porovnání průměrné výšky rostlin a průměrného počtu klasů u *hvhk3* mutantních linií ječmene T0 generace vůči WT kontrole. SD je směrodatná odchylka spočítaná pro průměrnou výšku nebo počet klasů jednotlivých rostlin. Výsledky byly statisticky vyhodnoceny pomocí t-testu. Zelené stínování označuje statisticky významné výsledky u rostlin s vyšší průměrnou výškou nebo nižším počtem klasů v porovnání s kontrolními rostlinami WT. Intenzita stínování je přímo úměrná statisticky významnému rozdílu.

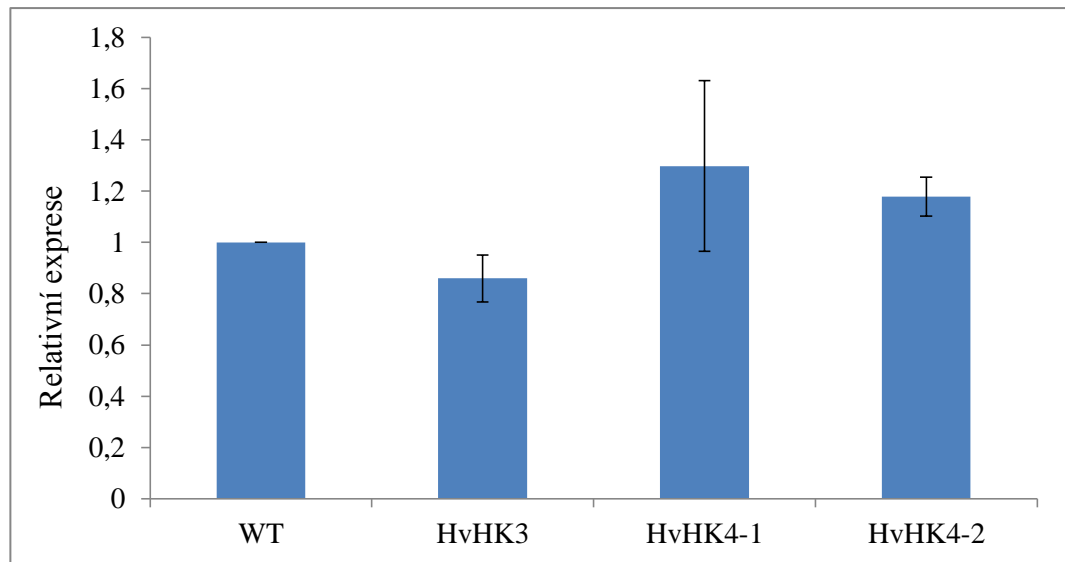
Rostlina	Průměrná výška rostlin [cm]	Průměrná výška linie	SD	p-hodnota	Počet klasů	Průměrný počet klasů	SD	p-hodnota
V1-1	61,55		3,87	0,911	69			
V1-2	66,39		2,49	1,387E-04	67			
V1-3	71,5		1,71	9,949E-14	50			
V1-4	68,2		3,18	4,284E-05	43			
V1-5	59,56	64,96	2,66	0,058	63	55,75	10,12	0,445
V1-6	63,67		4,77	0,256	54			
V1-7	64,81		2,66	0,009	43			
V1-8	64,01		3,84	0,117	57			
V2-1	65,6		2,02	2,040E-04	41			
V2-2	68,7	66,35	2,23	9,176E-08	43	35,00	12,17	0,046
V2-3	64,76		3,28	0,024	21			
K1	56,49		2,98		73			
K2	63,54		2,93		55			
K3	64,18	61,70	3,50		57	60,25	8,54	
K4	62,62		2,54		56			

4.10 Real-time qPCR

Z dat získaných v real-time qPCR byla relativně kvantifikována míra exprese genů cytokininových receptorů v *hvhk3* transgenních rostlinách linie V1 vztažená ke kontrolním vzorkům. Hodnoty C_T amplifikačních křivek byly normalizovány k C_T hodnotám amplifikačních křivek referenčních genů *HvAKT* a *HvEF2*. K vyhodnocení relativní exprese byla využita Pfafflova metoda (Pfaffl, 2001). Relativní exprese jednotlivých genů cytokininových receptorů byla spočítána jako geometrický průměr relativní exprese vztažené k expresi *HvAKT* a *HvEF2* a dále byly spočítány průměrné hodnoty relativní exprese jednotlivých genů pro celou linii V1, směrodatné odchylky a střední chyby průměru, které byly použity ke stanovení chybových úseček v grafu (Obr. 30). Kompletní soubor dat je uveden v příloze v Tab 12.

U připravené *hvhk3* transgenní linie V1 došlo ke snížení průměrné relativní exprese genu *HvHK3* oproti kontrolním rostlinám o 14 %, což odpovídá výsledku analýzy prováděné u T0 generace a významnější snížení exprese genu *HvHK3* se dá očekávat u T1 nebo až u T2 generace (Rahman *et al.*, 2014).

V ječmeni se nacházejí další dva predikované cytokininové receptory, které jsou orthologní k receptoru AHK4 z *Arabidopsis thaliana* (viz. kapitola 2.4.1.1). Pro tyto receptory byly v této diplomové práci zavedeny pracovní názvy HvHK4-1 a HvHK4-2. Díky specifickým primerům pro tyto receptory bylo možné stanovit i expresi genů, které je kódují, a zjistit případnou modulaci jejich exprese u mutantní linie. U těchto receptorů došlo naopak ke zvýšení exprese a to přesněji u HvHK4-1 přibližně o 30 % a u HvHK4-2 o 18 %. Možným vysvětlením zvýšené exprese těchto dvou genů cytokininových receptorů by mohla být snaha o zastoupení ve funkci za receptor HvHK3. Aby bylo možné vytvořit si ucelenější obrázek o důležitosti funkce cytokininového receptoru HvHK3 a také stanovit fenotyp mutantních rostlin *hvhk3*, je nutné podrobnějšímu zkoumání podrobit transgenní rostliny T1, ale hlavně homozygotní T2 generace.



Obrázek 30: Relativní exprese genů pro cytokinové receptory *HvHK3*, *HvHK4-1* a *HvHK4-2* u V1 transgenické linie *hvhk3* ječmene v T0 generaci. Průměrná relativní exprese cytokininových receptorů u kontrolních rostlin (WT) je rovna jedné. Míra exprese cytokininových receptorů u *hvhk3* transgenické linie V1 je vztažena k průměrné relativní expresi genů cytokininových receptorů u WT.

5 ZÁVĚR

V této práci jsem navázala na články publikované v průběhu minulého roku: Pospíšilová *et al.*, 2016; Vojta *et al.*, 2016. V první práci (Pospíšilová *et al.*, 2016) se autoři zabývali přípravou transgenních rostlin ječmene (*Hordeum vulgare* L.) nadexprimující enzym katalyzující degradaci cytokininů, cytokinin dehydrogenasu 1, pod kontrolou kořenově specifického promotoru β -glukosidasy. Připravené mutantní rostliny ječmene vykazovaly zvýšenou toleranci vůči stresu, což souhlasí s předchozími studii, které prokázaly, že zvýšené tolerance vůči suchu se dá dosáhnout snížením obsahu cytokininů v kořenech vlivem nadexprese enzymů z rodiny cytokinin dehydrogenas, díky čemuž dojde ke změně morfologie kořenového systému (Werner *et al.*, 2001; Macková *et al.*, 2013). Druhá práce (Vojta *et al.*, 2016) se zabývala studiem těchto mutantních rostlin a analýzou jejich transkriptomu, při které bylo zjištěno, že gen pro cytokininový receptor *HvHK3* má v mutantních rostlinách ječmene sníženou expresi. Kromě sníženého obsahu cytokininů v kořenech díky nadexpresi CKX1 tedy mohla být zvýšená tolerance vůči suchu způsobena také sníženou citlivostí vůči cytokininům díky snížené expresi genu pro cytokininový receptor *HvHK3*. Vznikla tak otázka, jak významný dopad může mít samotné umlčení genu *HvHK3* na toleranci vůči suchu. Mutantní linie ječmene *hvhk3* by poskytla ideální nástroj pro další výzkum v této oblasti a její příprava byla proto cílem této práce.

V diplomové práci byla zpracována literární rešerše na téma metody umlčení genové exprese, metody editace genomu, cytokininy, percepce a transdukce cytokininového signálu, receptory cytokininů v modelových rostlinách a receptor *HvHK3*. K umlčení receptoru byla vybrána metoda RNA umlčování s použitím hpRNA vlásenky. K tomuto účelu je vyvinut binární vektor pBract207, jehož součástí je tzv. umlčovací kazeta. Před samotnou prací byla navržena strategie přípravy tohoto binárního vektoru. Vybraná sekvence *HvHK3i* vhodná pro přípravu binárního vektoru a umlčení genu *HvHK3* byla amplifikována z cDNA zrna ječmene pomocí speciálně navržených primerů. Klonování sekvence *HvHK3i* do vektoru pDrive bylo provedeno s využitím UA hybridizace. Dále byl fragment *HvHK3i* z vektoru pDrive klonován do vektoru pEntr1A pomocí restrikce SalI a NotI, a nakonec bylo využito LR rekombinace k zaklonování sekvence *HvHK3i* dvou rekombinačních míst binárního vektoru pBract207, ve kterém 2 vložené fragmenty *HvHK3i* utvořily umlčovací kazetu. Všechny kroky klonování byly ověřeny pomocí restrikční analýzy a v případě klonování do

vektoru pDrive a pBract207 také pomocí sekvenace. Binárním vektorem byly transformovány bakterie *Agrobacterium tumefaciens* kmene AGL1 vhodného k transformaci ječmene. Sekvenace plasmidové DNA z úspěšně transformovaných kolonií *A. tumefaciens* prokázala, že fragmenty *HvHK3i* o správné sekvenci byly do umlčovací kazety vloženy ve správném směru, a tudíž byl binární vektor pBract207 úspěšně připraven k transformaci ječmene.

Příprava transgenních linií ječmene zahrnovala izolaci nezralých embryí ječmene a jejich transformace pomocí *Agrobacteria tumefaciens* nesoucí binární vektor pBract207 (nesoucím umlčovací kazetu *HvHK3* pod *Ubi* promotorem), selekci transgenních kalusů, regeneraci transgenních rostlin a jejich selekci. Pomocí ověření selekčního markeru *hpt* byla potvrzena úspěšná transformace linie V1 a V2. U těchto transgenních linií byla taktéž pomocí PCR potvrzena přítomnost první části umlčovací kazety. Z těchto dvou linií byla vyselektována diploidní linie V1, linie V2 byla tetraploidní. U diploidní linie V1 byla analýzou fenotypu stanovena vyšší průměrná výška při porovnání s kontrolními rostlinami. Real-time PCR analýza T0 generace rostlin *hvhk3* transgenní linie V1 prokázala snížení exprese genu cytokininového receptoru HvHK3 o 14 %. Tento výsledek odpovídá faktu, že analýza byla prováděna u transgenních rostlin T0 generace. V případě, že transformace bude stabilní a bude přenesena do T1 a potažmo homozygotní T2 generace, dá se očekávat zásadní snížení exprese genu kódující tento receptor. Závěrem veškerých výsledků získaných v této práci je, že byla úspěšně připravena mutantní linie ječmene *hvhk3* s částečně umlčeným cytokininovým receptorem HvHK3 v T0 generaci, připravena pro další výzkum.

6 LITERATURA

- Abdallah N. A., Prakash C. S., McHughen A. G. (2015): Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* **6**, 183-205.
- Allen E., Xie Z. X., Gustafson A. M., Carrington J. C. (2005): microRNA-directed phasing during *trans*-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**, 207-221.
- Al-Kaff N. S., Covey S. N., Kreike M. M., Page A. M., Pinder R., Dále P. J. (1998): Transcriptional and posttranscriptional plant gene silencing in response to a pathogen. *Science* **279**, 2113-2115.
- Assaad F. F., Tucker K. L., Signer E. R. (1993): Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Molecular Biology* **22**, 1067-1085.
- Bae S., Park J., Kim J. S. (2014): Cas-OFFinder: a fast versatile algorithm that searches for potential off-target sites of Cas9 RNA-guided endonucleases. *Bioinformatics* **30**, 1473-1475.
- Bartel D. P. (2009): MicroRNAs: Target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215-233.
- Baulcombe D. (2004): RNA silencing in plants. *Nature* **431**, 356-363.
- Beaulieu J. M., Leitch I. J., Patel S., Pendharkar A., Knight C. A. (2008): Genome size is a strong predictor of cell size and stomatal density in angiosperms. *New Phytologist* **179**, 975-986.
- Beerli R. R., Barbas C. F. (2002): Engineering polydactyl zinc-finger transcription factors. *Nature Biotechnology* **20**, 135-141.
- Bernstein E., Caudy A. A., Hammond S. M., Hannon G. J. (2001): Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* **409**, 363-366.
- Birney E., Stamatoyannopoulos J. A., Dutta A., Guigo R., Gingeras T. R., Margulies E. H., Weng Z. P., Snyder M., Dermitzakis E. T., Thurman R. E., Kuehn M. S., *et al.* (2007): Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799-816.
- Bogdanove A. J., Schornack S., Lahaye T. (2010): TAL effectors: finding plant genes for disease and defence. *Current opinion in plant biology* **12**, 394-401.
- Boch J., Bonas U. (2010): *Xanthomonas* AvrBs3 family-type III effector: discovery and function. *Annual Review of Phytopathology* **48**, 419-436.
- Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. (2009): Breaking the code of DNA binding specificity of TAL-type III effectors. *Science* **326**, 1509-1512.
- Bortesi L., Fischer R. (2015): The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. *Biotechnology Advances* **33**, 41-52.
- Brummell D. A., Balint-Kurti P. J., Harpster M. H., Palys J. M., Oeller P. W., Gutterson N. (2003): Inverted repeat of a heterologous 3'-untranslated region for high-efficiency, high-throughput gene silencing. *Plant Journal* **33**, 793-800.
- Burgyan J., Havelda Z. (2011): Viral suppressors of RNA silencing. *Trends in Plant Science* **16**, 265-272.
- Cokus S. J., Feng S. H., Zhang X. Y., Chen Z. G., Merriman B., Haudenschild C. D., Pradhan S., Nelson S. F., Pellegrini M., Jacobsen S. E. (2008): Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature* **452**, 215-219.
- Cong L., Zhou R. H., Kuo Y. C., Cunniff M., Zhang F. (2012): Comprehensive interrogation of natural TALE DNA-binding modules and transcriptional. *Nature Communications* **3**, 968.

- Creasey K. M., Zhai J. X., Borges F., Van Ex F., Regulski M., Meyers B. C., Martinenssen R. A. (2014): miRNAs trigger widespread epigenetically activated siRNAs from transposons in *Arabidopsis*. *Nature* **508**, 411-415.
- Cuperus J. T., Carbonell A., Fahlgren N., Garcia-Ruiz H., Burke R. T., Takeda A., Sullivan C. M., Gilbert S. D., Montgomery T. A., Carrington J. C. (2010): Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. *Nature Structural & Molecular Biology* **17**, 997-U111.
- D'Agostino I. B., Deruere J., Kieber J. J. (2000): Characterization of the response of the *Arabidopsis* response regulator gene family to cytokinin. *Plant Physiology* **124**, 1706-1717.
- De Alba A. E. M., Elvira-Matlot E., Vaucheret H. (2013): Gene silencing in plants: A diversity of pathways. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* **1829**, 1300-1308.
- Decarvalho F., Gheysen G., Kushnir S., Vanmontagu M., Inze D., Castresana C. (1992): Suppression of beta-1,3-glucanase transgene expression in homozygous plants. *EMBO Journal* **11**, 2595-2602.
- Deng Y., Dong H. L., Mu J. Y., Ren B., Zheng B. L., Ji Z. D., Yang W. C., Liang Y., Zuo J. R. (2010): *Arabidopsis* histidine kinase CKII acts upstream of HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEINS to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *Plant Cell* **22** 1232-1248.
- Deveau H., Garneau J. E., Moineau S. (2010): CRISPR/Cas system and its role in phage-bacteria interactions. *Annual Review of Microbiology* **64**, 475-493.
- Diaz-Perdon J.A., Li F., Li W.X., Ding S. W. (2007): Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in *Arabidopsis* is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* **19**, 2053-2063.
- Ding S. W., Voinnet O. (2007): Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* **130**, 413-426.
- D'Halluin K., Vanderstraeten C., Stals E., Cornelissen M., Ruiter R. (2008): Homologous recombination: a basis for targeted genome optimization in crop species such as maize. *Plant Biotechnology Journal* **6**, 93-102.
- Donoho G., Jasin M., Berg P. (1998): Analysis of gene targeting and intrachromosomal homologous recombination stimulated by genomic double-strand breaks in mouse embryonic stem cells. *Molecular and Cellular Biology* **18**, 4070-4078.
- Du L. M., Jiao F. C., Chu J., Jin G. L., Chen M., Wu P. (2007): The two-component signal system in rice (*Oryza sativa* L.): A genome-wide study of cytokinin signal perception and transduction. *Genomics* **89**, 697-707.
- Eamens A. L., Smith N. A., Curtin S. J., Wang M. B., Waterhouse P. M. (2009): The *Arabidopsis thaliana* double-stranded RNA binding protein DRB1 directs guide strand selection from microRNA duplexes. *RNA-A Publication of the RNA Society* **15**, 2219-2235.
- Eamens A., Wang M. B., Smith N. A., Waterhouse P. M. (2008): RNA silencing in plants: Yesterday, today and tomorrow. *Plant Physiology* **147**, 456-468.
- Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991): A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Research* **19**, 1349-1349.
- Elbashir S. M., Lendeckel W., Tuschl T. (2001): RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes & Development* **15**, 188-200.
- Fahlgren N., Montgomery T. A., Howell M. D., Allen E., Dvorak S. K., Alexander A. L., Carrington J. C. (2006): Regulation of AUXIN RESPONSE FACTOR3 by TAS3 ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. *Current Biology* **16**, 939-944.
- Fei Q. L., Yia R., Meyers B. C. (2013): Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* **25**, 2400-2415.

- Feng S. H., Jacobsen S. E., Reik W. (2010): Epigenetic reprogramming in plant and animal development. *Science* **330**, 622-627.
- Gasiunas G., Barrangou R., Horvath P., Siksnyš V. (2012): Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 2579-2586.
- Grishin A., Fonfara I., Alexeevski A., Spirn S., Zanegina O., Karyagina A., Alexeyevsky D., Wende W. (2010): Identification of conserved features of LAGLIDADG homing endonucleases. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology* **8**, 453-469.
- Guo Q. G., Lie Q., Smith N. A., Liang G. L., Wang M. B. (2016): RNA silencing in plants: Mechanism, technologies and applications in horticultural crops. *Current Genomics* **17**, 476-489.
- Gutierrez-Nava M. D., Aukerman M. J., Sakai H., Tingey S. V., Williams R. W. (2008): Artificial transacting siRNAs confer consistent and effective gene silencing. *Plant Physiology* **147**, 543-551.
- Haag J. R., Pikaard C. S. (2011): Multisubunit RNA polymerase IV and V: purveyors of non-coding RNA for plant gene silencing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **12**, 483-492.
- Hall T. A. (1999): BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**, 95-98.
- Harwood W. A., Bartlett J., Alves S., Perry M., Smedley M., Leyland N., Snape J. W. (2009): Barley transformation using *Agrobacterium*-mediated techniques. In: *Methods in Molecular Biology, Transgenic Wheat, Barley and Oats* 478. (Jones H. D., Shewry P. R., eds.), 137-147.
- Heath P. J., Stephens K. M., Monnat R. J., Stoddard B. L. (1997): The structure of I-CreI, a group I intron-encoded homing endonuclease. *Nature Structural Biology* **4**, 468-476.
- Hejatko J., Ryu H., Kim G. T., Dobsova R., Choi S., Choi S. M., Soucek P., Horak J., Pekarova B., Palme K., Brzobohaty B., Hwang I. (2009): The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and *Arabidopsis* HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *Plant Cell* **21**, 2008-2021.
- Helliwell C. A., Waterhouse P. M. (2005): Constructs and methods for hairpin RNA-mediated gene silencing in plants. *RNA Interference* **392**, 24-35.
- Heyl A., Schmulling T. (2003): Cytokinin signal perception and transduction. *Current Opinion in Plant Biology* **6**, 480-488.
- Higuchi M., Pischke M. S., Mahonen A. P., Miyawaki K., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Shinozaki K., Kato T., Tabata S., Helariutta Y., Sussman M. R., Kakimoto T. (2004): *In planta* functions of the *Arabidopsis* cytokinin receptor family. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**, 8821-8826.
- Hoffer P., Ivashuta S., Pontes O., Vitins A., Pikaard C., Mroczka A., Wagner N., Voelker T. (2011): Posttranscriptional gene silencing in nuclei. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 409-414.
- Hohn T., Vazquez F. (2011): RNA silencing pathways of plants: Silencing and its suppression by plant DNA viruses. *Biochimica et Biophysica Acta- Gene Regulatory Mechanisms* **1809**, 588-600.
- Hsu P. D., Scott D.A., Weinstein J. A., Ran F. A., Konermann S., Agarwala V., Li Y. Q., Fine E. J., Wu X. B., Shalem O., Cradick T. J., Marraffini L. A., Bao G., Zhang F. (2013): DNA targeting specificity of RNA-guided Cas9 nucleases. *Nature Biotechnology* **31**, 827-832.

- Hutchison C. E., Li J., Argueso C., Gonzalez M., Lee E., Lewis M. W., Maxwell B. B., Perdue T. D., Schaller G. E., Alonso J. M., Ecker J. R., Kieber J. J. (2006): The *Arabidopsis* histidine phosphotransfer proteins are redundant positive regulators of cytokinin signaling. *Plant Cell* **18**, 3073-3087.
- Hutvagner G., Zamore P. D. (2002): A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* **297**, 2056-2060.
- Hwang I., Sheen J. (2001): Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature* **413**, 383-389.
- Choulika A., Perrin A., Dujon B., Nicolas J. F. (1995): Induction of homologous recombination in mammalian chromosomes by using the I-SceI system of *Saccharomyces-cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **15**, 1968-1973.
- Christian M., Cermak T., Doyle E. L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A. J., Voytas D. F. (2010): Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics* **186**, 757-761.
- Inoue T., Higuchi M., Hashimoto Y., Seki M., Kobayashi M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K., Kakimoto T. (2001): Identification of CRE1 as a cytokinin receptor from *Arabidopsis*. *Nature* **409**, 1060-1063.
- Ishino Y., Shinagawa H., Makino K., Amemura M., Nakata A. (1987): Nucleotide-sequence of the *IAP* gene, responsible for alkaline-phosphatase isoenzyme conversion in *Escherichia-coli*, and identification of the gene-product. *Journal of Bacteriology* **169**, 5429-5433.
- Itaya A., Zhong X. H., Bundschuh R., Qi Y. J., Wang Y., Takeda R., Harris A. R., Molina C., Nelson R. S., Ding B. (2007): A structured viroid RNA serves as a substrate for dicer-like cleavage to produce biologically active small RNAs but is resistant to RNA-induced silencing complex-mediated degradation. *Journal of Virology* **81**, 2980-2994.
- Ito Y., Kurata N. (2006): Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene* **382**, 57-65.
- Izumi K., Nakagawa S., Kobayashi M., Oshio H., Sakurai A., Takahashi N. (1988): Levels of IAA, cytokinins, ABA and ethylene in rice plants as affected by a gibberellin biosynthesis inhibitor, uniconazole-P. *Plant and Cell Physiology* **29**, 97-104.
- Jacquier A., Dujon B. (1985): An intron-encoded protein is active in a gene conversion process that spreads an intron into a mitochondrial gene. *Cell* **41**, 383-394.
- Jauvion V., Rivard M., Bouteiller N., Elmayan T., Vaucheret H. (2012): RDR2 partially antagonizes the production of RDR6-dependent siRNA in sense transgene-mediated PTGS. *Plos One* **7**.
- Jiang W. Z., Zhou H. B., Bi H. H., Fromm M., Yang B., Weeks D. P. (2013): Demonstration of CRISPR/Cas9/sgRNA-mediated targeted gene modification in *Arabidopsis*, tobacco, sorghum and rice. *Nucleic Acids Research* **41**, e188.
- Jinek M., Chylinski K., Fonfara I., Hauer M., Doudna J. A., Charpentier E. (2012): A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science* **337**, 816-821.
- Johnson C., Kasprzewska A., Tennessen K., Fernandes J., Nan G. L., Walbot V., Sundaresan V., Vance V., Bowman L. H. (2009): Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Research* **19**, 1429-1440.
- Kakimoto T. (1996): CKII, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science* **274**, 982-985.

- Kiba T., Naitou T., Koizumi N., Yamashino T., Sakakibara H., Mizuno T. (2005): Combinatorial microarray analysis revealing Arabidopsis genes implicated in cytokinin responses through the His -> Asp phosphorelay circuitry. *Plant and Cell Physiology* **46**, 339-355.
- Kim H. J., Ryu H., Hong S. H., Woo H. R., Lim P. O., Lee I. C., Sheen J., Nam H. G., Hwang I. (2006): Cytokinin-mediated control of leaf longevity by AHK3 through phosphorylation of ARR2 in *Arabidopsis*.
- Kim Y. G., Cha J., Chandrasegaran S. (1996): Hybrid restriction enzymes: Zinc finger fusion to FokI cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **93**, 1156-1160.
- Klug A., Schwabe J. W. R. (1995): Protein motifs .5. zinc fingers. *FASEB Journal* **9**, 597-604.
- Kurihara Y., Takashi Y., Watanabe Y. (2006): The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA-A Publication of the RNA Society* **12**, 206-212.
- Kurihara Y., Watanabe Y. (2004): *Arabidopsis* micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 12753-12758.
- Lander E. S., Linton L. M., Birren B., Nusbaum C., Zody M. C., Baldwin J., Devon K., Dewar K., Doyle M., FitzHugh W., et al. (2001): Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Levin D. A. (1983): Polyploidy and novelty in flowering plants. *American Naturalist* **122**, 1-25.
- Li J. J., Yang Z. Y., Yu B., Liu J., Chen X. M. (2005): Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in *Arabidopsis* **15**, 1501-1507.
- Li L., Wu L. P., Chandrasegaran S. (1992): Functional domains in Fok-I restriction endonuclease. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **89**, 4275-4279.
- Liu H. L., Wei Z., Dominguez A., Li Y. D., Wang X. W., Qi L. S. (2015): CRISPR-ERA: a comprehensive design tool for CRISPR-mediated gene editing, repression and activation. *Bioinformatics* **31**, 3676-3678.
- Liu J. D., Carmell M. A., Rivas F. V., Marsden C. G., Thomson J. M., Song J. J., Hammond S. M., Joshua-Tor L., Hannon G. J. (2004): Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* **305**, 1437-1441.
- Lloyd A., Plaisier C. L., Carroll D., Drews G. N. (2005): Targeted mutagenesis using zinc-finger nucleases in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **102**, 2232-2237.
- Mackay J. P., Crossley M. (1998): Zinc fingers are sticking together. *Trends in Biochemical Science* **23**, 1-4.
- Mackova H., Hronkova M., Dobra J., Tureckova V., Novak O., Lubovska Z., Motyka V., Haisel D., Hajek T., Prasil I. T., Gaudinova A., Storchova H., Ge E., Werner T., Schmulling T., Vankova R. (2013): Enhanced drought and heat stress tolerance of tobacco plants with ectopically enhanced cytokinin oxidase/dehydrogenase gene expression. *Journal of Experimental Botany* **64**, 2805-2815.
- Ma J. B., Yuan Y. R., Meister G., Pei Y., Tuschl T., Patel D. J. (2005): Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* **434**, 666-670.
- Mahonen A. P., Bonke M., Kauppinen L., Riikonen M., Benfey P. N., Helariutta Y. (2000): A novel two-component hybrid molecule regulates vascular morphogenesis of the *Arabidopsis* root. *Genes & Development* **14**, 2938-2943.

- Mahonen A. P., Higuchi M., Tormakangas K., Miyawaki K., Pischke M. S., Sussman M. R., Helariutta Y., Kakimoto T. (2006): Cytokinins regulate a bidirectional phosphorelay network in *Arabidopsis*. *Current Biology* **16**, 1116-1122.
- Margolin J. F., Friedman J. R., Meyer W. K. H., Vissing H., Thiesen H. J., Rauscher F. J. (1994): Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 4509-4513.
- Martinez J., Patkaniowska A., Urlaub H., Luhrmann R., Tuschl T. (2002): Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell* **110**, 563-574.
- Mason M.G., Li J., Mathews D. E., Kieber J. J., Schaller G. E. (2004): Type-B response regulators display overlapping expression patterns in *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **135**, 927-937.
- Matzke M. A., Primig M., Trnovsky J., Matzke A. J. M. (1989): Reversible methylation and inactivation of marker genes in sequentially transformed tobacco plants. *Embo Journal* **8**, 643-649.
- McClung C. R. (2006): Plant circadian rhythms. *Plant Cell* **18**, 792-803.
- Metabion international AG: <http://www.metabion.com> (13. 10. 2015).
- Mette M. F., Aufsatz W., van der Winden J., Matzke M. A., Matzke A. J. M. (2000): Transcriptional silencing and promoter methylation triggered by double-stranded RNA. *EMBO Journal* **19**, 5194-5201.
- Mičúchová A. (2015): *Molekulární farmačení: využití rostlinné biotechnologie pro heterologní expresi LL-37*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká Republika.
- Millar A. A., Waterhouse P. M. (2005): Plant and animal microRNAs: similarities and differences. *Functional & Integrative Genomics* **5**, 129-135.
- Moissiard G., Voinnet O. (2006): RNA silencing of host transcripts by cauliflower mosaic virus requires coordinated action of the four *Arabidopsis* Dicer-like proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **103**, 19593-19598.
- Mok M. C., Mok D. W. S., Armstrong D. J., Shudo K., Isogai Y., Okamoto T. (1982): Cytokinin activity of N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea (thidiazuron). *Phytochemistry* **21**, 1509-1511.
- Mok D.W.S., Mok M.C. (2001): Cytokinin metabolism and action. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **52**, 89-118.
- Molnar A., Csorba T., Lakatos L., Varallyay E., Lacomme C., Burgyan J. (2005): Plant virus-derived small interfering RNAs originate predominantly from highly structured single-stranded viral RNAs. *Journal of Virology* **79**, 7812-7818.
- Morbitzer R., Romer P., Boch J., Lahaye T. (2010): Regulation of selected genome loci using *de novo*-engineered transcription aktivátor-like effector (TALE)-type transcription factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 21617-21622.
- Moscou M. J., Bogdanove A. J. (2009): A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors. *Science* **326**, 1501-1501.
- Naito Y., Hino K., Bono H., Ui-Tei K. (2015): CRISPRdirect: software for designing CRISPR/Cas guide RNA with reduces off-target sites. *Bioinformatics* **31**, 1120-1123.
- Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990): Introduction of a chimeric chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes *in trans*. *Plant Cell* **2**, 279-289.
- Nemudryi A. A., Valetdinova K. R., Medvedev S. P., Zakian S. M. (2014): TALEN and CRISPR/Cas genome editing systems: Tools of discovery. *ACTA Naturae* **6**, 19-40.

- Nicholson S. J., Srivastava V. (2009): Transgene constructs lacking transcription termination signal induce efficient silencing of endogenous targets in *Arabidopsis*. *Molecular Genetics and Genomics* **282**, 319-328.
- Nissan G., Manulis-Sasson S., Chalupowicz L., Teper D., Yeheskel A., Pasmanik-Chor M., Sessa G., Barash I. (2012): The type III effector HsvG of the gall-forming *Pantoea agglomerans* mediates expression of the host gene HSVGT. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 231-240.
- Nuthikattu S., McCue A. D., Panda K., Fultz D., DeFraia C., Thomas E. N., Slotkin R. K. (2013): The initiation of epigenetic silencing of active transposable element *sis* triggered by RDR6 and 21-22 nucleotide small interfering RNAs. *Plant Physiology* **162**, 116-131.
- Orban T. I., Izaurralde E. (2005): Decay of mRNAs targeted by RISC requires XRN1, the Ski complex, and the exosome. *RNA-A Publication of the RNA Society* **11**, 459-469.
- Orlowski J., Boniecki M., Bujnicki J. M. (2007): I-Ssp6803I: the first homing endonuclease from the PD-(D/E)XK superfamily exhibits an unusual mode of DNA recognition. *Bioinformatics* **23**, 527-530.
- Pabo C. O., Peisach E., Grant R. A. (2001): Design and selection of novel Cys(2)His(2) zinc finger proteins. *Annual Review of Biochemistry* **70**, 313-340.
- Pareek A., Singh A., Kumar M., Kushwaha H. R., Lynn A. M., Singla-Pareek S. L. (2006): Whole-genome analysis of *Oryza sativa* reveals similar architecture of two-component signaling machinery with *Arabidopsis*. *Plant Physiology* **142**, 380-397.
- Parker J. S., Roe S. M., Barford D. (2005): Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* **434**, 663-666.
- Parker J., Bae S., Kim J.S. (2015): Cas-designer: a web-based tool for choice of CRISPR-Cas9 target sites. *Bioinformatics* **31**, 4014-4016.
- Paul J. W., Qi Y. P. (2016): CRISPR/Cas9 for plant genome editing: Accomplishments, problems and prospects. *Plant Cell Reports* **35**, 1417-1427.
- Peragine A., Yoshikawa M., Wu G., Albrecht H. L., Poethig R. S. (2004): SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **18**, 2368-2379.
- Pfaffl M. W. (2001): A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research* **29**, e45.
- Pham A. T., Shannon J. G., Bilyeu K. D. (2012): Combinations of mutant FAD2 and FAD3 genes to produce high oleic acid and low linolenic acid soybean oil. *Theoretical and Applied Genetics* **125**, 503-515.
- Porteus M. H., Baltimore D. (2003): Chimeric nucleases stimulate gene targeting in human cells. *Science* **300**, 763-763.
- Pospisilova H., Jiskrova E., Vojta P., Mrizova K., Kokas F., Cudejkova M. M., Bergougnoux V., Plihal O., Klimesova J., Novak O., Dzurova L., Frebort I., Galuszka P. (2016): Transgenic barely overexpressing a cytokinin dehydrogenase gene shows greater tolerance to drought stress. *New Biotechnology* **33**, 692-705.
- Prols F., Meyer P. (1992): The methylation patterns of chromosomal integration regions influence gene activity of transferred DNA in *Petunia hybrida*. *Plant Journal* **9**, 465-475.
- Rahman J., Sanan-Mishra N., Mukherjee S. K. (2014): MYMIV-AC2 protein suppresses hairpin-induced gene silencing in *Nicotiana tabacum* cv. *Xanthi*. *Plant Biotechnology Reports* **8**, 337-347.

- Roberts R. J., Belfort M., Bestor T., Bhagwat A. S., Bickle T. A., Bitinaite J., Blumenthal R. M., Degtyarev S. K., Dryden D. T. F., Dybvig K., Firman K., Gromova E. S., Gumpport R. I., Halford S. E., Hattman S., Heitman J., Hornby D. P., Janulaitis A., Jeltsch A., Josephsen J., Kiss A., Klaenhammer T. R., Kobayashi I., Kong H. M., Kruger D. H., Lacks S., Marinus M. G., Miyahara M., Morgan R. D., Murray N. E., Nagaraja V., Piekarowicz A., Pingoud A., Raleigh E., Rao D. N., Reich N., Repin V. E., Selker E. U., Shaw P. C., Stein D. C., Stoddard B. L., Szybalski W., Trautner T. A., Van Etten J. L., Vitor J. M. B., Wilson G.G., Xu S. Y. (2003): A nomenclature for restriction enzymes, DNA methyltransferases, homing endonucleases and their genes. *Nucleic Acids Research* **31**, 1805-1812.
- Rodriguez-Negrete E. A., Carrillo-Tripp J., Rivera-Bustamante R. F. (2009): RNA silencing against Germinivirus: Complementary action of posttranscriptional gene silencing and transcriptional gene silencing in host recovery. *Journal of Virology* **83**, 1332-1340.
- Romanov, G.A., Lomin, S.N., 2009. Hormone-binding assay using living bacteria expressing eukaryotic receptors. In: *Methods in Molecular Biology, Plant hormones: Methods and protocols*. 495. (Cutler, S., Bonetta, D. eds.), Humana Press, New York, 111-120.
- Romanov G. A., Lomin S. N., Schmulling T. (2006): Biochemical characteristics and ligand-binding properties of *Arabidopsis* cytokinin receptor AHK3 compared to CRE1/AHK4 as revealed by a direct binding assay. *Journal of Experimental Botany* **57**, 4051-4058.
- Romanov G. A., Spichal L., Lomin S. N., Strnad M., Schmulling T. (2005): A live cell hormone-binding assay on transgenic bacteria expressing a eukaryotic receptor protein. *Analytical Biochemistry* **347**, 129-134.
- Romer P., Hahn S., Jordan T., Strauss T., Bonas U., Lahaye T. (2007): Plant pathogen recognition mediated by promoter activation of the pepper Bs3 resistance gene. *Science* **318**, 645-648.
- Sakakibara H. (2006): Cytokinins: Activity, biosynthesis, and translocation. *Annual Reviews in Plant Biology* **57**, 431-449.
- Segraves K. A., Thompson J. N. (1999): Plant polyploidy and pollination: Floral traits and insect visits to diploid and tetraploid *Heuchera grossulariifolia* **53**, 1114-1127.
- Shan Q., Wang Y., Chen K., Liang Z., Li J., Zhang Y., Zhang K., Liu J., Voytas D. F., Zheng X., Zhang Y., Gao C. (2013): Rapid and efficient gene modification in rice and *Brachypodium* using TALENs. *Molecular Plant* **6**, 1365-1368.
- Shivaprasad P. V., Chen H. M., Patel K., Bond D. M., Santos B. A. C. M., Baulcombe D. C. (2012): A microRNA superfamily regulates nucleotide binding site-leucine-rich repeats and other mRNAs. *Plant Cell* **24**, 859-874.
- Shukla V. K., Doyon Y., Miller J. C., DeKolver R. C., Moehle E. A., Worden S. E., Mitchell J. C., Arnold N. L., Gopalan S., Meng X. D., Choi V. M., Rock J. M., Wu Y. Y., Katibah G. E., Zhifang G., McCaskill D., Simpson M. A., Blakeslee B., Greenwalt S. A., Butler H. J., Hinkley S. J., Zhang L., Rebar E. J., Gregory P. D., Urnov F. D. (2009): Precise genome modification in the crop species *Zea mays* using zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 437-441.
- Schaller G. E., Doi K., Hwang I., Kieber J. J., Khurana J. P., Kurata N., Mizuno T., Pareek A., Shiu S. H., Wu P., Yip W. K. (2007): Nomenclature for two-component signaling elements of rice. *Plant Physiology* **143**, 555-557.
- Schornack S., Meyer A., Romer P., Jordan T., Lahaye T. (2006): Gene-for-gene-mediated recognition of nuclear-targeted AvrBs3-like bacterial effector proteins. *Journal of Plant Physiology* **163**, 256-272.
- Schiml S., Fauser F., Puchta H. (2014): The CRISPR/Cas system can be used as nuclease for *in planta* gene targeting and as paired nickases for directed mutagenesis in *Arabidopsis* resulting in heritable progeny. *Plant Journal* **80**, 1139-1150.

- Schimpl S., Puchta H. (2016): Revolutionizing plant biology: Multiple ways of genome engineering by CRISPR/Cas. *Plant Methods* **12**, 8.
- Schwab R., Ossowski S., Riester M., Warthmann N., Weigel D. (2006): Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in *Arabidopsis*. *Plant Cell* **18**, 1121-1133.
- Sijen T., Vijn I., Rebocho A., van Blokland R., Roelofs D., Mol J. N. M., Kooter J. M. (2001): Transcriptional and posttranscriptional gene silencing are mechanistically related. *Current Biology* **11**, 436-440.
- Smith C. J. S., Watson C. F., Bird C. R., Ray J., Schuch W., Grierson D. (1990): Expression of a truncated tomato polygalacturonase gene inhibits expression of the endogenous gene in transgenic plants. *Molecular & General Genetics* **224**, 477-481.
- Smith J., Bibikova M., Whitby F. G., Reddy A. R., Chandrasegaran S., Carroll D. (2000b): Requirements for double-strand cleavage by chimeric restriction enzymes with zinc finger DNA-recognition domains. *Nucleic Acids Research* **28**, 3361-3369.
- Smith J., Grizot S., Arnould S., Duclert A., Epinat J. C., Chames P., Prieto J., Redondo P., Blanco F. J., Bravo J., Montoya G., Paques F., Duchateau P. (2006): A combinatorial approach to create artificial homin endonucleases cleaving chosen sequences. *Nucleic Acids Research* **34**, e149.
- Smith N. A., Singh S. P., Wang M. B., Stoutjesdijk P. A., Green A. G., Waterhouse P. M. (2000a): Gene expression – Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* **407**, 319-320.
- Spichal L., Rakova N. Y., Riefler M., Mizuno T., Romanov G. A., Strnad M., Schmulling T. (2004): Two cytokinin receptors of *Arabidopsis thaliana*, CRE1/AHK4 and AHK3, differ in their ligand specificity in a bacterial assay. *Plant and Cell Physiology* **45**, 1299-1305.
- Stam M., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1997): The silence of genes in transgenic plants. *Annals of Botany* **79**, 3-12.
- Stemmer M., Thumberger T., Keyser M. D., Wittbrodt J., Mateo J. L. (2015): CCTop: an intuitive, flexible and reliable CRISPR/Cas9 target prediction tool. *PLOS One* **10**, e0124633.
- Stock A. M., Robinson V. L., Goudreau P. N. (2000): Two-component signal transduction. *Annual Review of Biochemistry* **69**, 183-215.
- Stolz A., Riefler M., Lomin S. N., Achazi K., Romanov G. A., Schmulling T. (2011): The specificity of cytokinin signalling in *Arabidopsis thaliana* is mediated by differing ligand affinities and expression profiles of the receptors. *Plant Journal* **67**, 157-168.
- Strnad M. (1997): The aromatic cytokinins. *Physiologia Plantarum* **101**, 674-688.
- Szcepek M., Brondani V., Buchel J., Serrano L., Segal D. J., Cathomen T. (2007): Structure-based redesign of the dimerization interface reduces the toxicity of zinc-finger nucleases. *Nature Biotechnology* **25**, 786-793.
- Szurek B., Rossier O., Hause G., Bonas U. (2002): Type III-dependent translocation of the *Xanthomonas* AvrBs3 protein into the plant cell. *Molecular Biology* **46**, 13-23.
- Šmehilová M. (2004): *Purifikace a využití termostabilní DNA-polymerasy exprimované v Escherichia coli*. Bakalářská práce, UP Olomouc, Česká Republika.
- Thierry A., Dujon B. (1992): Nested chromosomal fragmentation in yeast using the meganuclease I-Sce-I- A new method for physical mapping of eukaryotic genomes. *Nucleic Acids Research* **20**, 5625-5631.
- Townsend J. A., Wright D. A., Winfrey R. J., Fu F. L., Maeder M. L., Joung J. K., Voytas D. F. (2009): High-frequency modification of plant genes using engineered zinc-finger nucleases. *Nature* **459**, 442-445.

- Tran L. S. P., Urao T., Qin F., Maruyama K., Kakimoto T., Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. (2007): Functional analysis of AHK1/ATHK1 and cytokinin receptor histidine kinases in response to abscisic acid, drought, and salt stress in *Arabidopsis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 20623-20628.
- Tsai Y. C., Weir N. R., Hill K., Zhang W. J., Kim H. J., Shu S. H., Schaller G. E., Kieber J. J. (2012): Characterization of genes involved in cytokinin signaling and metabolism from rice. *Plant Physiology* **158**, 1666-1684.
- Urnov F. D., Miller J. C., Lee Y. L., Beausejour C. M., Rock J. M., Augustus S., Jamieson A. C., Porteus M. H., Gregory P. D., Holmes M. C. (2005): Highly efficient endogenous human gene correction using designed zinc-finger nucleases. *Nature* **435**, 646-651.
- Urnov F. D., Rebar E. J., Holmes M. C., Zhang H. S., Gregory P. D. (2010): Genome editing with engineered zinc finger nucleases. *Nature Reviews Genetics* **11**, 636-646.
- Vanbolkland R., Vandergeest N., Mol J. N. M., Kooter J. M. (1994): Transgene-mediated suppression of chalcone synthase expression in *Petunia-hybrida* results from an increase in RNA turnover. *Plant Journal* **6**, 861-877.
- Vaucheret H., Beclin C., Fagard M. (2001): Post-transcriptional gene silencing in plants. *Journal of Cell Science* **114**, 3083-3091.
- Vazquez F., Vaucheret H., Rajagopalan R., Lepers C., Gascioli V., Mallory A. C., Hilbert J. L., Bartel D. P., Crete P. (2004): Endogenous *trans*-acting siRNAs regulate the accumulation of *Arabidopsis* mRNAs. *Molecular Cell* **16**, 69-79.
- Veach Y. K., Martin R. C., Mok D. W. S., Malbeck J., Vankova R., Mok M. C. (2003): O-glucosylation of cis-zeatin in maize. Characterization of genes, Enzymes, and endogenous cytokinins. *Plant Physiology* **131**, 1374-1380.
- Vojta P., Kokas F., Husickova A., Gruz J., Bergougnot V., Marchetti C. F., Jiskrova E., Jezilova E., Mik V., Ikeda Y., Galuszka P. (2016): Whole transcriptome analysis of transgenic barely with altered cytokinin homeostasis and increased tolerance to drought stress. *New Biotechnology* **33**, 676-691.
- Voytas D. F., Gao C. X. (2014): Precision genome engineering and agriculture: Opportunities and regulatory challenges. *PLOS Biology* **12**, e1001877.
- Wang M. B., Abbott D. C., Waterhouse P. M. (2000): A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barely. *Molecular Plant Pathology* **1**, 347-356.
- Wang M. B., Bian X. Y., Wu L. M., Liu L. X., Smith N. A., Isenegger D., Wu R. M., Masuta C., Vance V. B., Watson J. M., Rezaian A., Dennis E. S., Waterhouse P. M. (2004): On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **101**, 3275-3280.
- Wang M. B., Helliwell C. A., Wu L. M., Waterhouse P. M., Peacock W. J., Dennis E. S. (2008): Hairpin RNAs derived from RNA polymerase II and polymerase III promoter-directed transgenes are processed differently in plants. *RNA-A Publication of the RNA Society* **14**, 903-913.
- Wang M. B., Masuta C., Smith N. A., Shimura H. (2012): RNA silencing and Plant Viral Diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **25**, 1275-1285.
- Wang M. B., Waterhouse P. M. (2000): High-efficiency silencing of a beta-glucuronidase gene in rice is correlated with repetitive transgene structure but is independent of DNA methylation. *Plant Molecular Biology* **43**, 67-82.

- Wang X. B., Wu Q. F., Ito T., Cillo F., Li W. X., Chen X. M., Yu J. L., Ding S. W. (2010): RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **107**, 484-489.
- Wassenegger M., Heimes S., Riedel L., Sanger H. L. (1994): RNA-directed de-novo methylation of genomic sequences in plants. *Cell* **76**, 567-576.
- Waterhouse P. M., Graham H. W., Wang M. B. (1998): Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**, 13959-13964.
- Waterhouse P. M., Wang M. B., Lough T. (2001): Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature* **411**, 834-842.
- Watson J. M., Fusaro A. F., Wang M. B., Waterhouse P. M. (2005): RNA silencing platforms in plants. *Febs Letters* **579**, 5982-5987.
- Wendt T., Holm P. B., Starker C. G., Christian M., Voytas D. F., Brinch-Pedersen H., Holme I. B. (2013): TAL effector nucleases induce mutations at a pre-selected location in the genome of primary barely transformants. *Plant Molecular Biology* **83**, 279-285.
- Werner T., Motyka V., Strnad M., Schmulling T. (2001): Regulation of plant growth by cytokinin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **98**, 10487-10492.
- Wesley S. V., Helliwell C. A., Smith N. A., Wang M. B., Rouse D. T., Liu Q., Gooding P. S., Singh S. P., Abbott D., Stoutjesdijk P. A., Robinson S. P., Gleave A. P., Green A. G., Waterhouse P. M. (2001): Construct design for efficient, effective and high-throughput gene silencing in plants. *Plant Journal* **27**, 581-590.
- West A. H., Stock A. M. (2001): Histidine kinases and response regulator proteins in two-component signaling systems. *Trends in Biochemical Sciences* **26**, 369-376.
- Wyman C., Kanaar R. (2006): DNA double-strand break repair: All's well that ends well. *Annual Review of Genetics* **40**, 363-383.
- Xie Z. X., Allen E., Wilken A., Carrington J. C. (2005): DICER-LIKE 4 functions in *trans*-acting small interfering RNA biogenesis and vegetative phase change in *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Science of the United States of America* **102**, 12984-12989.
- Yadav R. K., Chattopadhyay D. (2011): Enhanced viral intergenic region-specific short interfering RNA accumulation and DNA methylation correlates with resistance against a Geminivirus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **24**, 1189-1197.
- Yamada H., Suzuki T., Terada K., Takei K., Ishikawa K., Miwa K., Yamashino T., Mizuno T. (2001): The *Arabidopsis* AHK4 histidine kinase is a cytokinin-binding receptor that transduces cytokinin signals across the membrane. *Plant and Cell Physiology* **42**, 1017-1023.
- Ye R. Q., Wang W., Iki T., Liu C., Wu Y., Ishikawa M., Zhou X. P., Qi Y. J. (2012): Cytoplasmic assembly and selective nuclear import of *Arabidopsis* ARGONAUTE4/siRNA complexes. *Molecular Cell* **46**, 859-870.
- Yonekura-Sakakibara K., Kojima M., Yamaya T., Sakakibara H. (2004): Molecular characterization of cytokinin-responsive histidine kinases in maize. Differential ligand preferences and response to *cis*-zeatin. *Plant Physiology* **134**, 1654-1661.
- Yoshikawa M., Peragine A., Park M. Y., Poethig R. S. (2005): A pathway for the biogenesis of *trans*-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes & Development* **19**, 2164-2175.

- Zhai J. X., Jeong D. H., De Paoli E., Park S., Rosen B. D., Li Y. P., Gonzales A. J., Yan Z., Kitto S. L., Grusak M. A., Jackson S. A., Stacey G., Cook D. R., Grenn P. J., Sherrier D. J., Meyers B. C. (2011): MicroRNAs as master regulators of the plant NB-LRR defense gene family via the production of phased, *trans*-acting siRNAs. *Genes & Development* **25**, 2540-2553.
- Zhang H., He X. J., Zhu J. K. (2013): RNA-directed DNA methylation in plants: Where to start? *RNA Biology* **10**, 1593-1596.
- Zhang M. J., Wanf F., Li S. F., Wang Y., Bai Y., Xu X.Q. (2014): TALE: A tale of genome editing. *Progress in Biophysics & Molecular Biology* **114**, 25-32.
- Zhao L., Bonocora R. P., Shub D. A., Stoddard B. L. (2007): The restriction fold turns to the dark side: a bacterial homing endonuclease with a PD-(D/E)-XK motif. *EMBO Journal* **26**, 2432-2442.
- Abdallah N. A., Prakash C. S., McHughen A. G. (2015): Genome editing for crop improvement: Challenges and opportunities. *GM Crops & Food-Biotechnology in Agriculture and the Food Chain* **6**, 183-205.

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AD	aktivační doména
AGO	endonukleasa z rodiny argonaut proteinů
AHK	Histidin kinasa z <i>A. thaliana</i>
<i>ahk</i>	mutanti <i>A. thaliana</i> s nefunkčním genem kódující <i>histidin kinasu</i>
AHPs	autentické fosfopřenašečové proteiny
ALS	acetoláktát syntasa
ARRs	regulátory odpovědi z <i>Arabidopsis thaliana</i>
Asp	kyselina asparagová
AtCKI	histidin kinasy nezávislé na cytokininech z <i>A. thaliana</i>
BA	benzyladenin
cDNA	komplementární DNA
CHASE doména	cyklasa/His kinasa asociovaná citlivá extracelulární doména
CKX	cytokinin dehydrogenasa
CRE1	cytokinin response 1
CRISPR	klastr pravidelně rozmístěných krátkých repetic
CRISPR/Cas9	klastr pravidelně rozmístěných krátkých repetic s asociovaným proteinem 9
crRNA	CRISPR RNA
<i>cZ</i>	<i>cis</i> -zeatin
DCL protein	protein podobný Diceru
DMSO	dimethylsulfoxid
DRB	protein vázající dvouřetězcovou RNA
DRM	methyltransferasa s uspořádanými doménami
dsRNA	dvouřetězcová RNA
DZ	dihydrozeatin
EPSPS	5-enolpyruvylšikimát-3-fosfát syntasa
<i>FAD</i>	gen kódující desaturasu mastných kyselin
HDGS	umlčení genů závislé na homologii
HEN1	RNA methylasa HUA ENHANCER1
His	histidin

hpRNA	vlásenka RNA (hairpin RNA)
Hpt	His fosfopřenašečový protein
<i>HvHK3</i>	gen kódující histidin kinasu 3 v ječmeni <i>H. vulgare</i>
<i>hvhk3</i>	mutantní rostliny s umlčeným cytokininovým receptorem HvHK3
iP	N ⁶ -(Δ^2 -isopentenyl)-adenin
<i>IPK1</i>	gen kódující inositol-1,3,4,5,6-pentakis-2-kinasu
IPTG	isopropyl β -D-1-thiogalactopyranosid
KRAB	transkripční represor Krüppel-asociovaný box
<i>mT</i>	<i>meta</i> -topolin
miRNA	mikro RNA
mRNA	messenger RNA
NLS	nukleární lokalizační signál
Ore12-1	vazebné místo histidin kinasy pro cytokininy
OsHK	histidin kinasa z rýže
<i>oT</i>	<i>ortho</i> -topolin
PAM	protospacer asociovaný motiv
phasiRNA	fázová siRNA
pre-miRNA	prekurzorová miRNA
pri-miRNA	primární transkript miRNA
PTGS	post-transkripční genové umlčování
RdDM	methylace DNA řízená RNA
RDR	RNA-dependentní RNA polymerasa
RIGS	umlčování genu vyvolané opakováním
RISC	umlčovací komplex indukovaný RNA
RNAi	RNA interference
RVDs	variabilní direzidua repetice
sgRNA	řídící RNA
siRNA	malá interferující RNA
T3S	translokační signál typu III
TALEs	transkripční efektory podobné aktivátorům
TALENs	nukleasy na bázi transkripčních efektorů podobných aktivátorům
tasiRNA	malá interferenční RNA působící v <i>trans</i> inaktivaci

TGS	transkripční genové umlčování
transcrRNA	transaktivací crRNA
<i>tZ</i>	<i>trans</i> -zeatin
UTR	nepřekládaná oblast genu
VIGS	umlčování genů vyvolané viry
v/v	objem na objem
WOL1	Woodenleg 1
WT	wild type
w/v	hmotnost na objem
ZFNs	nukleasy s motivem zinkových prstů
ZFPs	proteiny s motive zinkových prstů
ZmHK	histidin kinasa z kukuřice

8 PŘÍLOHY

Tab. 12: Přehled výsledků z analýzy real-time PCR vzorků listů z kontrolních rostlin a rostlin *hvhk3* transgenní linie V1. Naměřeny byly hodnoty C_T pro tři technické replikáty pro každý vzorek. Relativní exprese vztažená ke kontrolním genům byla vyhodnocena za použití Pffaflovy metody. Relativní exprese genů cytokininových receptorů byla spočítána jako geometrický průměr relativní exprese vztažené k expresi *HvAKT* a *HvEF2*. Dále byla spočítána průměrná relativní exprese jednotlivých cytokininových receptorů, směrodatná odchylka a střední chyba průměru.

Gen	Vzorek	C_T - Technický replikát 1	C_T - Technický replikát 2	C_T - Technický replikát 3	relativní exprese vztažená k <i>HvAct</i>	relativní exprese vztažená k <i>HvEF2</i>	relativní exprese	průměrná relativní exprese	SD	SEM
<i>HvAct</i>	K1	23,427	23,420	23,452						
	K2	24,326	24,001	24,134						
	K3	24,985	24,940	24,843						
	K4	25,378	25,605	25,292						
	V1-1	26,686	26,530	26,442						
	V1-2	23,903	23,622	23,776						
	V1-3	23,169	23,258	23,295						
	V1-4	23,512	23,551	23,454						
	V1-5	24,754	24,601	24,442						
	V1-6	23,976	23,986	24,939						
<i>HvEF2</i>	V1-7	24,158	24,059	24,163						
	V1-8	23,217	23,195	23,222						
	K1	19,395	19,417	19,414						
	K2	19,942	19,986	19,776						
	K3	20,848	20,875	20,790						
	K4	20,999	21,033	20,934						
	V1-1	22,085	22,159	22,036						
	V1-2	19,928	19,886	19,934						
V1-3	18,695	18,662	18,641							

	V1-4	19,126	19,103	19,112						
	V1-5	20,101	20,218	20,292						
	V1-6	20,053	20,079	20,172						
	V1-7	20,357	20,310	20,294						
	V1-8	19,376	19,525	19,473						
<i>HvHK3</i>	K1	20,952	20,870	20,918						
	K2	22,175	22,161	22,058	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	K3	22,351	22,324	22,532						
	K4	22,804	22,706	22,900						
	V1-1	23,969	24,010	23,999	1,110	1,087	1,098			
	V1-2	21,831	21,833	21,968	0,697	1,042	0,852			
	V1-3	20,536	20,703	20,881	1,090	0,986	1,036			
	V1-4	22,185	22,166	22,240	0,466	0,479	0,472	0,859	0,258	0,091
	V1-5	22,947	22,992	23,083	0,567	0,581	0,574			
	V1-6	21,916	21,839	21,936	0,995	1,168	1,078			
	V1-7	22,621	22,630	22,621	0,533	0,822	0,662			
	V1-8	21,009	21,016	20,976	0,871	1,392	1,101			
	<i>HVHK4-1</i>	K1	24,248	24,383	24,438					
K2		24,695	25,949	25,882	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
K3		24,414	24,647	24,757						
K4		24,760	25,025	25,284						
V1-1		25,377	25,597	24,393	3,556	3,485	3,520			
V1-2		24,182	24,352	24,393	0,906	1,354	1,108			
V1-3		23,560	23,562	23,556	1,058	0,957	1,006			
V1-4		24,678	25,044	24,958	0,504	0,518	0,511	1,298	0,942	0,333
V1-5		25,362	25,709	25,693	0,665	0,681	0,673			
V1-6		24,215	24,420	24,605	1,220	1,432	1,322			
V1-7		24,562	25,206	25,104	0,742	1,143	0,921			
V1-8		23,359	23,686	23,591	1,047	1,673	1,323			

<i>HvHK4-2</i>	K1	22,978	23,007	22,954						
	K2	22,656	22,724	22,608	1,000	1,000	1,000	1,000	0,000	0,000
	K3	23,686	23,751	23,841						
	K4	23,971	23,981	23,980						
	V1-1	24,768	24,893	24,714	1,549	1,517	1,533			
	V1-2	22,689	22,761	22,703	0,946	1,413	1,156			
	V1-3	21,764	21,798	22,249	1,128	1,020	1,073			
	V1-4	21,964	22,009	22,027	1,297	1,332	1,315	1,175	0,214	0,076
	V1-5	23,216	23,246	23,188	1,191	1,220	1,206			
	V1-6	23,082	23,091	23,002	1,081	1,268	1,171			
	V1-7	23,127	23,150	22,962	0,944	1,455	1,172			
	V1-8	22,905	22,773	22,685	0,613	0,980	0,775			