

Univerzita Palackého v Olomouci

Diplomová práce

Olomouc 2022

Bc. Hana Křižňanská

Univerzita Palackého v Olomouci
Přírodovědecká fakulta
Katedra buněčné biologie a genetiky



**Selekce a analýza fluorescenčních
markerových linií ječmene setého
(*Hordeum vulgare*)**

Diplomová práce

Bc. Hana Křižňanská

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Molekulární a buněčná biologie

Forma studia: Prezenční

Olomouc 2022

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Kaduchová

Bibliografické údaje

Jméno a příjmení autora: Hana Křižňanská

Název práce: Selekce a analýza fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*)

Typ práce: Diplomová

Pracoviště: Ústav experimentální botaniky, v.v.i., Akademie věd ČR, Olomouc

Vedoucí práce: Mgr. Kateřina Kaduchová

Rok obhajoby práce: 2022

Klíčová slova: ječmen, fluorescenční protein, fluorescenční markerová linie, T-DNA

Počet stran: 69

Počet příloh: 0

Jazyk: Český

Souhrn:

V této diplomové práci jsem se zaměřila na selekci a charakterizaci fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*), oblíbeného modelové organismu pro studium obilovin.

Teoretická část je věnována charakteristice ječmene setého (*Hordeum vulgare*) a jeho genomu, dále popisu principu transformace rostlin se zaměřením na obiloviny, a na závěr translačně-fúzním fluorescenčním markerovým rostlinným liniím a jejich výhodám a omezením vyplývající z použití fluorescenčních proteinů.

V rámci experimentální části byla provedena selekce transgenních rostlin regenerujících z embryonálního kalusu ječmene setého po transformaci nezralých embryí ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*, jejich genotypizace a následně charakterizace vybraných fluorescenčních markerových linií ječmene setého pomocí segreganční analýzy a mikroskopie. U vybrané rostliny linie RFP-CEHN3/S2-1 byla zamapována pozice vložení T-DNA do genomu této rostliny pomocí metody inverzní PCR a následné bioinformatické analýzy.

Bibliographical identification

Author's first name and surname: Hana Křižňanská

Title: Selection and analysis of fluorescent marker lines of barley (*Hordeum vulgare*)

Type of thesis: Master

Department: Institute of Experimental Botany of the Czech Academy of Sciences, Olomouc

Supervisor: Mgr. Kateřina Kaduchová

The year of presentation: 2022

Keywords: barley, fluorescent protein, fluorescent marker line, T-DNA

Number of pages: 69

Number of appendices: 0

Language: Czech

Summary

In this master's thesis, I focused on the selection and characterization of the fluorescent marker lines of barley (*Hordeum vulgare*), a popular model organism for the study of cereals.

The theoretical part is devoted to the characteristics of barley (*Hordeum vulgare*) and its genome, the description of the principle of plant transformation with a focus on cereals, and finally translational-fusion fluorescent marker plant lines and their advantages and limitations resulting from the use of fluorescent proteins.

In the experimental part, the selection of transgenic plants regenerating from the embryonic callus of barley after the transformation of immature barley embryos using *Agrobacterium tumefaciens* was done followed by their genotyping and subsequent characterization of the selected fluorescent barley marker lines using segregation analysis and microscopy. In the selected plant of the RFP-CEHN3/S2-1 line, the position of T-DNA insertion into the genome of this plant was mapped using the inverse PCR method and the subsequent bioinformatics analysis.

Podklad pro zadání DIPLOMOVÉ práce studenta

Jméno a příjmení: **Hana KRIŽŇANSKÁ**
Osobní číslo: **R200529**
Adresa: **Hlavní třída 380/33, Havířov – Město, 73601 Havířov 1, Česká republika**
Téma práce: **Selekce a analýza fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*)**
Téma práce anglicky: **Selection and analysis of fluorescent marker lines of barley (*Hordeum vulgare*)**
Vedoucí práce: **Mgr. Kateřina Lahnerová**
Katedra buněčné biologie a genetiky

Zásady pro vypracování:

1. Sepsání rešerše na téma diplomové práce (charakterizace ječmene setého, využití fluorescenčních markerových linií při studiu *in vivo* dynamiky značených proteinů v rostlinných buňkách, výhody použití markerových linií v porovnání s analýzou fixovaných vzorků).
2. Selekcce transgenických rostlin regenerujících z embryonálního kalusu ječmene setého po transformaci nezralých embryí ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Screening a charakterizace regenerantů transgenických rostlin fluorescenčních markerových linií.

Seznam doporučené literatury:

DeBlasio, S.L., Sylvester, A.W., Jackson, D. (2010): Illuminating plant biology: using fluorescent proteins for high-throughput analysis of protein localization and function in plants. *Briefings in functional genomics*, 9, 2, 129-138. doi: 10.1093/bfpg/elp060. Epub 2010 Jan 21. PMID: 20093306.
Marthe, C., Kumlehn, J., Hensel, G. (2015): Barley (*Hordeum vulgare* L.). Transformation Using Immature Embryos. *Methods in Molecular Biology*;1223:71-83. doi: 10.1007/978-1-4939-1695-5_6. PMID: 25300832.
Pecinka, A., Chevalier, C., Colas, I., Kalantidis, K., Varotto, S., Krugman, T., Michailidis, C., Vallés, M.P., Muñoz, A., Pradillo, M. (2020): Chromatin dynamics during interphase and cell division: similarities and differences between model and crop plants. *Journal of Experimental Botany*; 17;71(17):5205-5222. doi: 10.1093/jxb/erz457. PMID: 31626285.
Dumur, T., Duncan, S., Graumann, K., Dasset, S., Randall, R.S., Scheid, O.M., Prodanov, D., Tatout, C., Baroux, C. (2019): Probing the 3D architecture of the plant nucleus with microscopy approaches: challenges and solutions. *Nucleus*.;10(1):181-212. doi: 10.1080/19491034.2019.1644592. Erratum in: *Nucleus*. 2019 Sep 18;1. PMID: 31362571; PMCID: PMC6682351.

Podpis vedoucího práce:

Datum:

Podpis vedoucího pracoviště:

Datum:

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně s použitím níže uvedených zdrojů a pod odborným vedením Mgr. Kateřiny Kaduchové.

V Olomouci dne

.....

Hana Křižňanská

Poděkování

Ráda bych poděkovala své vedoucí Mgr. Kateřině Kaduchové za její čas, odborné vedení, trpělivost, nesmírnou vstřícnost a cenné rady, které mi věnovala během práce na této diplomové práci. Dále děkuji celému vědeckému týmu doc. Mgr. Aleše Pečinky Ph.D. za trpělivost a poskytnutí cenných informací během mé práce v laboratoři. Poděkování patří také mé rodině a přátelům za jejich vytrvalou podporu po celou dobu mého studia.

Obsah

Seznam symbolů a zkratek.....	viii
Seznam obrázků.....	ix
Seznam grafů.....	x
Seznam tabulek	xi
1 Úvod.....	1
2 Cíle práce.....	2
3 Literární přehled	3
3.1 Ječmen setý (<i>Hordeum vulgare</i>)	3
3.2 Transformace.....	5
3.2.1 Transformační techniky	5
3.2.2 Princip transformace	6
3.3 Fluorescenční markerové linie	8
3.3.1 Fluorescenční proteiny	8
3.3.2 Translačně-fúzní fluorescenční markerové rostlinné linie.....	9
3.3.3 Výhody a nevýhody použití fluorescenčních markerových proteinů	10
4 Materiál a metody.....	12
4.1 Biologický materiál.....	12
4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky.....	13
4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení	17
4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy	19
4.4.1 Transformace a selekce transgenních rostlin ječmene.....	19
4.4.2 Genotypování regenerantů na přítomnost <i>hpt</i> selekčního genu, měření ploidie transgenních rostlin	20
4.4.3 Segregační analýza.....	22
4.4.4 Fluorescenční detekce specifity lokalizace RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene	24

4.4.5	Inverzní PCR.....	24
4.4.6	Klonování specifických PCR produktů do plazmidu pJET1.2 a sekvenační ověření.....	28
5	Výsledky	31
5.1	Transformace a selekce transgenních rostlin ječmene	31
5.2	Genotypování regenerantů na přítomnost <i>hpt</i> selekčního genu	31
5.3	Analýza ploidie	32
5.4	Segregační analýza.....	32
5.5	Fluorescenční detekce specifity lokalizace RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene	35
5.6	Inverzní PCR.....	35
6	Diskuze.....	43
7	Závěr.....	47
8	Literatura	48

Seznam symbolů a zkratek

bp	<i>base pair</i>
cv.	<i>cultivated variety</i> (kultivar)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
dNTP	deoxynukleotid trifosfát
Gb	<i>giga base pair</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i> (zelený fluorescenční protein)
<i>hpt</i>	gen pro hygromycin fosfotransferázu
kb	<i>kilo base pair</i>
LB	<i>left border</i>
Mb	<i>mega base pair</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (polymerázová řetězová reakce)
RB	<i>right border</i>
RFP	red fluorescent protein (červený fluorescenční protein)
T-DNA	<i>transferred DNA</i> (transgenní DNA)
Ti	<i>tumor inducing</i>
T _m	<i>melting temperature</i>
WT	<i>wild-type</i> (standartní typ)
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i> (žlutý fluorescenční protein)

Seznam obrázků

Obrázek 1: Princip inverzní PCR.....	25
Obrázek 2: Genotypování regenerovaných rostlin potenciálně exprimujících RFP-CENH3 fúzní protein na přítomnost <i>hpt</i> selekčního genu.	31
Obrázek 3: Kořenové špičky rostlin transgenních linií podrobených segregací analýze.	34
Obrázek 4: Fluorescenční detekce lokalizace fúzního proteinu RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene u transgenního (A) a WT (B) vzorku.	35
Obrázek 5: Linearizovaná a cirkularizovaná molekula expresního vektoru RFP-CENH3.	36
Obrázek 6: Identifikace specifických produktů inverzní PCR reakce.....	37
Obrázek 7: Colony PCR vybraných transformovaných kolonií <i>E. coli</i> , kmen STBL2 na přítomnost zaklonovaného fragmentu o zájmové velikosti (1 000 bp).....	37
Obrázek 8: BLAST sekvence proti klonovacímu vektoru pJET1.2.	38
Obrázek 9: Struktura sekvenčního readu linie RFP-CENH3/S2-1 a schématický náčrt sekvenčního readu linie RFP-CENH3/S2-1.....	38
Obrázek 10: Výsledek BLAST ENSEMBL sekvenčního readu proti referenční sekvenci MorexV3_pseudomolecules_assembly.	39
Obrázek 11: Zamapovaná pozice vložení T-DNA do oblasti dlouhého ramene chromozomu 2H ječmene setého u linie RFP-CENH3/S2-1.....	39
Obrázek 12: Vizualizace struktury T-DNA integrované do genomu ječmene a pozice jejího vložení určené programem BLAST ENSEMBL.	40
Obrázek 13: Vizualizaci pozice specifických primerů navržených do oblasti RB pro finální ověření pozice inserce T-DNA do genomu linie RFP-CENH3/S2-1.	41
Obrázek 14: Profily elektroforeticky separovaných PCR produktů amplifikace genomické DNA WT ječmene setého a transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1.....	42

Seznam grafů

Graf 1: Stanovení ploidie transgenních linií ječmene setého cv. Golden Promise..... 32

Seznam tabulek

Tabulka 1: Seznam transgenních linií ječmene setého	12
Tabulka 2: Seznam použitých oligonukleotidů.....	Chyba! Záložka není definována.
Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro detekci <i>hpt</i> selekčního genu.....	21
Tabulka 4: Podmínky PCR reakce pro detekci <i>hpt</i> selekčního genu.....	21
Tabulka 5: Segregační (mendelistický) čtverec znázorňující segregaci alel při křížení dvou jedinců heterozygotních v jednom genu (jedna kopie T-DNA).....	22
Tabulka 6: Segregační (mendelistický) čtverec znázorňující segregaci alel při křížení dvou jedinců heterozygotních ve dvou genech (dvě kopie T-DNA)	23
Tabulka 7: Složení restriční reakce.....	26
Tabulka 8: Složení ligační směsi	27
Tabulka 9: Složení inverzní PCR reakce	27
Tabulka 10: Podmínky inverzní PCR reakce.....	27
Tabulka 11: Složení reakční směsi colony PCR.....	29
Tabulka 12: Podmínky colony PCR	29
Tabulka 13: Segregační analýza vybraných markerových linií.....	33
Tabulka 14: Kombinace specifických primerů navržených do oblasti RB pro finální ověření pozice inserce T-DNA do genomu linie RFP-CENH3/S2-1	41

1 Úvod

Ječmen setý (*Hordeum vulgare*) patří mezi oblíbené modelové organismy využívající se při studiu obilovin. Jeho hlavními výhodami jsou znalost jeho genomické sekvence včetně anotovaných genů, diploidní genom, dostupnost transformovatelných genotypů, a v neposlední řadě jeho hospodářský význam, který umožňuje aplikovat výsledky ve šlechtitelství. I přes narůstající oblíbenost využívání ječmene jako modelové obilniny je dostupné pouze omezené množství nástrojů, pomocí kterých by bylo možné detailněji studovat biologické pochody *in vivo* (např. markerové linie, mutantní linie atd.).

Translačně fúzní fluorescenční markerové linie jsou univerzálním nástrojem umožňujícím nedestruktivně sledovat expresi a lokalizaci fluorescenčně značených proteinů v živých rostlinách. Tyto linie exprimují translačně-fúzní heterologní protein sestávající z fluorescenčního proteinu a proteinu, jehož lokalizace má být sledována. Genetická informace pro translačně-fúzní markerový protein je naklonována do bakteriálního vektoru, který je následně transformován do rostliny. U obilovin se nejčastěji využívá *Agrobacterium tumefaciens* řízená transformace a následná regenerace transgenních rostlin z kalusových kultur. Pozice vložení cizorodé transgenní DNA (tzv. T-DNA) pomocí *A. tumefaciens* do genomu je náhodná, může být vložena jak do negenové oblasti, tak přímo do genu. V tom případě dochází často k narušení funkce genu. Z toho důvodu je důležité znát přesnou pozici vložení T-DNA do genomu spolu s obecnou charakterizací linie, aby se vyloučil případný negativní vliv T-DNA na fenotyp a fyziologii transgenní rostliny.

2 Cíle práce

1. Sepsání rešerše na téma diplomové práce (charakterizace ječmene setého, využití fluorescenčních markerových linií při studiu *in vivo* dynamiky značených proteinů v rostlinných buňkách, výhody použití markerových linií v porovnání s analýzou fixovaných vzorků).
2. Selektce transgenních rostlin regenerujících z embryonálního kalusu ječmene setého po transformaci nezralých embryí ječmene pomocí *Agrobacterium tumefaciens*.
3. Screening a charakterizace regenerantů transgenních rostlin fluorescenčních markerových linií.

3 Literární přehled

3.1 Ječmen setý (*Hordeum vulgare*)

Ječmen setý je samosprašná jednoletá obilnina patřící do čeledi *Poaceae* (lipnicovité) náležící do skupiny jednoděložných rostlin (*Monocots*). Ječmen je plodinou pěstovanou v různých klimatických podmínkách, byl jako jedna z prvních plodin domestikován člověkem před 10 000 lety v oblasti Úrodného půlměsíce na Blízkém východě (Purugganan *et* Fuller, 2009). Za jeho předka je považován ječmen planý (*Hordeum spontaneum*), který je původním druhem v této oblasti (Beneš *et al.*, 2011). Dle databáze odrůd Ústředního kontrolního a zkušebního ústavu zemědělského Ministerstva zemědělství ČR je v České republice registrováno 185 odrůd ječmene setého, a to jak ozimové, tak jařinové varianty. Ozimové varianty, jako je například Maris Otter a Babylone, bývají zasazeny v zimě a sklizeny začátkem léta. Tyto varianty vyžadují vernalizaci pro to, aby mohly vykvést (Kling *et al.*, 2004). Jarní ječmen, jako je např. cv. Golden Promise, Morex nebo Betzes (ÚKZÚZ, 2021), je zasazen na jaře a sklizen v pozdním létě nebo začátkem podzimu. Pěstují se převážně na územích s mírnou zimou. Hlavní nevýhodou jařin v porovnání s ozimy je mělký kořenový systém a náročnost na půdu s velkým obsahem živin (Diviš *et al.*, 2010).

Z hlediska morfologie je rostlina ječmene tvořena nadzemní částí tvořenou jednotlivými dutými stébly vysokými 80–130 cm, která jsou rozdělena na 5–7 článků, každé stéblo je kryto střídavými jednoduchými úzkými listy se souběžnou žilnatinou. Primární kořen zaniká v časných vývojových fázích a je nahrazen svazčítým kořenovým systémem. Květenstvím ječmene je lichoklas složený z jednotlivých klásků, který lze rozdělit podle uspořádání na dvouřadý, čtyřřadý nebo šestiřadý. Osiny jsou dlouhé 0,5–8 cm. Plodem ječmene je obilka (Zimolka *et al.*, 2006).

Dostupná data z roku 2019 uvádí množství celosvětové produkce ječmene na 158 979 610 milionů tun. Ječmen je v celosvětovém žebříku produkce obilnin považován za čtvrtou nejdůležitější obilninu po pšenici, rýži a kukuřici (FAOSTAT, 2021). Hlavním významem ječmene jako plodiny je především jeho využití jako krmivo pro hospodářská zvířata. V lidské společnosti zaujal své místo hlavně ve sladovnictví k výrobě piva a destilovaných alkoholických nápojů. V posledních letech je ječmen používán k výrobě biopaliv (Tricase *et al.*, 2018). Díky vysokému obsahu β -glukanů,

vitaminů a antioxidantů jsou produkty zhotovené z ječmene široce používány v medicínském průmyslu či jako doplňky stravy (Newman *et* Newman, 2006).

Rod *Hordeum* je rovněž oblíbeným modelovým organismem v genetice a to především díky diploidnímu genomu, samoopylení, transformovatelným kultivarům, velké velikosti chromozomů a vysokému stupni genetické variability (Kleinhof *et* Graner, 2001).

Genom ječmene setého

Velikost jaderného genomu ječmene byla určena na $1C = 5,2$ Gb. Celý genom byl osekvenován v roce 2012 v rámci projektu International Barley Genome Sequencing Consortium. Genom ječmene, stejně jako genomy ostatních významných obilnin, je charakteristický nadbytkem repetitivních sekvencí. Skládá se z 84 % z mobilních genetických elementů a jiných repetitivních (International Barley Genome Sequencing Consortium, 2012). Nejčastěji zastoupenými mobilními elementy v genomu ječmene jsou retrotranspozony, konkrétně retrotranspozony *Gypsy* a *Copia* ze skupiny LTR retrotranspozonů. Z DNA transpozonů je nejvýznamněji zastoupena skupina *CACTA*. Tyto mobilní elementy mají délku od 2 kb do 30 kb (Wicker *et al.*, 2017).

Pro rod *Hordeum* je charakteristické základní chromozomové číslo $x = 7$. Na základě počtu chromozomů lze ječmeny rozdělit na diploidní ($2n = 2x = 14$), tetraploidní ($2n = 4x = 28$) a výjimečně i hexaploidní ($2n = 6x = 42$) (Von Bothmer *et* Komatsuda, 2011). Průměrná velikost chromozomů ječmene dosahuje hodnoty v rozmezí 6–8 μ m. Sedm párů jaderných chromozomů bylo původně označeno arabskými číslicemi 1–7. V současnosti jejich označení vychází z homologie s chromozomy ostatních členů rodiny *Triticeae*. Každému z chromozomů bylo přiřazeno číslo chromozomu rodiny *Triticeae* na základě homologie s daným chromozomem. Nově se ječmenné chromozomy označují arabskou číslicí a písmenem „H“, to znamená, že chromozomy 1, 2, 3, 4, 5, 6, a 7 jsou značeny 7H, 2H, 3H, 4H, 1H, 6H, a 5H (Granner *et al.*, 2011). V interfázních jádrech zaujímají chromozomy charakteristickou Rablovu konfiguraci, při které telomery a centromery lokalizují na protilehlých pólech jádra (Mascher *et al.*, 2017).

Chloroplastový genom ječmene setého tvoří jeden chromozom o délce 137 kb (Niwa *et al.*, 1996). Mitochondriální genom představuje taktéž jeden cirkulární chromozom o délce 525 kb (Hisano *et al.*, 2016).

Kultivar Golden Promise

Kultivar Golden Promise (GP) je evropská jarní odrůda ječmene setého charakteristická dvouřadým uspořádáním klásků v lichoklasu. Jedná se o mutanta, který vznikl z kultivaru Maythrope po ozáření paprsky gamma (Walia *et al.*, 2007).

V minulosti se používal hlavně ve sladovnictví a na výrobu whiskey (Schreiber *et al.*, 2020). V současnosti je kultivar Golden Promise hojně využíván ve vědě díky zvýšené efektivitě transformovatelnosti této odrůdy v porovnání s odrůdami jinými, což vede k zisku většího množství transgenních rostlin (Murray *et al.*, 2004; Lim *et al.*, 2018). V roce 2020 byla vypracována referenční genomová sekvence tohoto kultivaru, tato skutečnost do budoucna umožňuje rozsáhlé využití ječmene setého cv. Golden Promise pro technologii CRISPR-Cas9 k cílené mutagenезi jeho genomu (Schreiber *et al.*, 2020).

3.2 Transformace

3.2.1 Transformační techniky

Transformací v molekulární biologii chápeme proces přenosu a včlenění cizorodé neboli transgenní sekvence DNA (T-DNA) do buněk a následně pak do genomu organismu. Počáteční pokusy transformace rostlin byly prováděny především pomocí mikroprojektilových technik neboli *particle bombardment*. Principem těchto technik je obalení cizorodé DNA mikroskopickými částicemi a následné vstřelení těchto částic do živých buněk (Klein *et al.*, 1987). Účinnost většiny transformací s použitím mikroprojektilového přenosu je pod 3 % (Thomas *et al.*, 2011). Technika *particle bombardment* je využívána i dnes pro ozimové varianty ječmene setého a pšenice, které mají nízkou transformovatelnost pomocí *Agrobacterium tumefaciens* (Lazzeri *et al.*, 2009).

V posledních desetiletích je hojně rozšířená transformace prostřednictvím bakterie *Agrobacterium tumefaciens* (Marthe *et al.*, 2015). *A. tumefaciens* je půdní fytopatogenní bakterie způsobující boulovitost kořenů (Hull *et al.*, 2021), nicméně je schopná infikovat rovněž prokaryota, houbové organismy včetně kvasinek a člověka (Gelvin, 2003). V porovnání s mikroprojektilovými technikami byl prokázán nárůst účinnosti transformace na 25 % (Marthe *et al.*, 2015), exprese transgenů je navíc stabilní napříč generacemi a dochází méně často k umlčování transgenů, který se v genomu vyskytuje

v menším počtu kopií (Travella *et al.*, 2005). Tato metoda je relativně levná a nenáročná na provedení (Hwang *et al.*, 2017). Mezi nejčastější kmeny *A. tumefaciens* využívané k transformaci patří kmeny AGL0, AGL1, a LBA4404 (Thomas *et al.*, 2011).

Pro transformaci ječmene setého pomocí *Agrobacteria* jsou nejčastěji využívány tkáňové kultury odvozené ze zralých nebo nezralých ječmenných embryí, embryonálních prašnickových kultur nebo izolovaných vajíček (*ovules*). Pro v dnešní době nejčastěji využívanou *A. tumefaciens* řízenou transformační techniku nezralých embryí je preferován kultivar Golden Promise, vyznačující se vyšší transformační účinností a schopností efektivnější regenerace kalusových kultur (Marthe *et al.*, 2015). Hlavním omezením této metody je omezená schopnost kalusů úspěšně regenerovat v rostlinu (Bartlett *et al.*, 2008).

3.2.2 Princip transformace

Během infekce přenáší *Agrobacterium* do rostlinných buněk část plazmidu indukujícího nádory, neboli Ti (*tumor inducing*) plazmidu, který se stabilně integruje do genomu rostliny (Chilton *et al.*, 1977). Právě tohoto principu (stabilní integrace do genomu recipienta) je využito při procesu transformace, při které dochází k přenosu zájmové sekvence určené k integraci do recipientního genomu prostřednictvím jejího spojení s plazmidem obsahujícím upravenou sekvenci původního Ti plazmidu. T-DNA (*transferred DNA*) je část Ti plazmidu, která je exogenně přenášena do genomu recipientní buňky, může dosahovat velikosti 15–30 kb (Hull *et al.*, 2021), a je zpravidla ohraničena dvěma přímými nedokonalými repetitivními sekvencemi dlouhými 25 bp, nazvanými jako *left border* (LB) a *right border* (RB), mezi kterými se nachází sekvence přenášená do recipientního genomu (Windels *et al.*, 2008). Tyto hraniční sekvence jsou rozpoznány bakteriálními endonukleázami VirD1/VirD2, které vytvoří jedno nebo dvouvláknový zlom, čímž danou oblast mezi LB a RB z plazmidu vyštěpí. Do genomu recipientní buňky je obvykle přenesena pouze sekvence ležící mezi LB a RB, přičemž může dojít k částečné změně sekvence a struktury genomické DNA recipienta v místě vložení T-DNA (Gelvin, 2003; 2021).

Během přenosu T-DNA jsou rostliny infikovány *A. tumefaciens* přes narušenou buněčnou stěnu. Během řízené transformace je buněčná stěna permeabilizována působením vakua a detergentů (Shrawat *et al.*, 2007). Poté, co se T-DNA dostane do buňky, dochází

ke vstupu T-DNA do jádra skrz jaderný pór (Tzfira *et al.*, 2005). Vložení do genomu je zprostředkováno proteiny transportovanými z *A. tumefaciens*, a sice VirD2 a VirE2, anebo proteiny buňky (Hwang *et al.*, 2017). Místo vložení T-DNA do genomu je náhodné (Tzfira *et al.*, 2004), nicméně se T-DNA s preferencí integruje do transkripčně aktivních oblastí genomu. Tato skutečnost zvyšuje účinnost transformací obilovin, jelikož 75–90 % jejich genomu je složeno z repetitivních sekvencí, které neobsahují geny (Shrawat *et al.*, 2007). V průběhu přenosu T-DNA může být do hostitelského genomu vložena více než jedna kopie T-DNA (Windels *et al.*, 2008).

K selekci transgenních rostlin je zapotřebí, aby klonováním sestavený plazmid obsahoval v rámci T-DNA kromě zájmové sekvence a genů, umožňujících transgenozí, také vhodný selekční marker. Přítomnost selekčního markeru umožňuje identifikovat a selektovat buňky, které T-DNA exprimují. Nejčastěji rozšířenými selekčními markery jsou geny udílející rezistenci k antibiotikům. Jsou zpravidla umístěny pod regulaci konstitutivními promotory zajišťujícími vysokou úroveň exprese v rámci všech buněk a tkání organismu (Berg *et Beachy*, 2008). U jednoděložných rostlin se využívají především konstitutivní promotory *35S Cauliflower mosaic virus (CaMV 35S)*, kukuřičný ubiquitinový (*ZmUbi-1*) (Marthe *et al.*, 2015) nebo *Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV)* (Stavolone *et al.*, 2003) regulující expresi genu pro hygromycin fosfotransferázu, která zajišťuje rezistenci k antibiotiku hygromycinu B, inhibujícího proteosyntézu (Miki *et McHugh*, 2004). *In vitro* selekce založená na rezistenci k hygromycinu B, obsaženém v kultivačním médiu, minimalizuje frekvenci falešně pozitivních regenerantů (Marthe *et al.*, 2015).

Transformace organismů, speciálně rostlin, má širokou oblast využití. Tato technika umožňuje vložit zájmový gen do již existujícího genomu, který zůstává jinak nezměněn (Ziemienowicz, 2014). Transformace je například používána pro produkci modifikovaných proteinů (rekombinantní protilátky) nebo látek využívaných v medicínském průmyslu jako jsou antikoagulanty či interferony (Daniell *et al.*, 2001). Transgenní rostliny mohou sloužit jako biosenzory pro fytořemediaci, detekující přítomnost toxických látek v prostředí, případně detoxikovat kontaminovanou půdu či vodu (Cherian *et Oliveira*, 2005). Transformace rostlinám poskytuje nové znaky rezistence proti škůdcům, herbicidům, zvýšenou toleranci k biotickému a abiotickému stresu (Ziemienowicz, 2014). Speciálně u zemědělských plodin je snaha docílit vyššího výnosu úrody nebo optimálních výživových hodnot (Huang *et al.*, 2002). Konkrétně

u ječmene se jedná právě o úpravu výživových hodnot, kvalitu sladu, rezistenci ke škůdcům a onemocněním, toleranci k solím vyskytujícím se v půdě a produkci látek používaných v medicínském průmyslu (Thomas *et al.*, 2011). Transformace rostlin poskytuje nástroj pro sledování a studium jejich fyziologie, genetiky, patologie a molekulární a buněčné biologie (Hraška *et al.*, 2006).

3.3 Fluorescenční markerové linie

3.3.1 Fluorescenční proteiny

Fluorescenční proteiny patří do skupiny strukturně homologních proteinů, do které jsou řazeny na základě přítomnosti tří aminokyselin polypeptidového řetězce, díky kterým jsou schopny tvořit chromofor emitující fluorescenční záření o viditelné vlnové délce (Chudakov *et al.*, 2010). Prvním objeveným fluorescenčním proteinem byl aequorin extrahovaný na počátku 60. let 20. století z medúzy *Aequorea victoria*, žijící v Tichém oceánu. Následně byl z *A. victoria* izolován zelený fluorescenční protein (*green fluorescent protein* = GFP) (Shimomura *et al.*, 1962). Osamu Shimomura byl spolu s Roger Y. Tsien a Martin Chalfie oceněn v roce 2008 Nobelovou cenou za chemii za objev a výzkum zeleného fluorescenčního proteinu (GFP) (Nobel Prize, 2022).

Samotný GFP protein je složen z 238 aminokyselin, jeho molekulová hmotnost je 27 kDa. Strukturou proteinu je beta-barel tvořený 11 beta-skládanými listy a jedním alfa helixem. Chromofor je situován do nitra molekuly proteinu a je posttranslačně modifikován na aminokyselinových pozicích 65–67 (Chudakov *et al.*, 2010). Molekula GFP absorbuje modré světlo při hlavním excitačním maximu o vlnové délce 395 nm a vedlejším excitačním maximu 470 nm, na základě Stokesova posunu emituje zelené světlo při emisním maximu 509 nm (Chalfie *et al.*, 1994). Molekula GFP je stabilní do teploty 65 °C v rozmezí pH hodnot od 5,5 do 12 (Haseloff *et al.*, 1999). GFP není toxický pro živé organismy, a proto je hodně využíván jako fluorescenční marker pro vizualizaci jím značených proteinů (Chalfie *et al.*, 1994).

V současnosti existuje široká škála odlišných barevných variant fluorescenčních proteinů, které téměř kopírují spektrum viditelného světla (Kremers *et al.*, 2011). Tyto varianty byly odvozeny modifikací buď přímo z GFP (*A. victoria*) nebo byly získány a odvozeny z dalších mořských živočichů. Fluorescenční proteiny se vyskytují jako monomery, dimery nebo tetramery. Jednotlivé podjednotky spolu mohou interagovat v důsledku

oligomezirace, což může negativně ovlivnit jejich funkci (Chudakov *et al.*, 2010). Cílem je tudíž vytvořit řízenou mutagenézí monomerní fluorescenční proteiny s modifikovanými postranními aminokyselinovými řetězci, které kladně ovlivní jejich vlastnosti (termostabilita, vyšší intenzita fluorescence při nižším stupni excitace atd.) (Kremers *et al.*, 2011).

Fluorescenční proteiny mají široké využití v různých odvětvích. Možným využitím jsou metody FACS (*fluorescence-activated cell sorting technology*) v použití pro průtokovou cytometrii (Galbraith *et al.*, 1983; Zhang *et al.*, 2005) a techniky úbytku fluorescence FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*) (Crowell *et al.*, 2009; Ketelaar *et al.*, 2004) a k ní doplňková technika FLIP (*fluorescence loss in photobleaching*) (Ishikawa-Ankerhold *et al.*, 2012).

3.3.2 Translačně-fúzní fluorescenční markerové rostlinné linie

Principem translační fúze je vznik hybridní polypeptidové molekuly sestávající ze dvou proteinů, jejich genetická informace je zapsaná v rámci jednoho otevřeného čtecího rámce (ORF), exprimovaná pod kontrolou jednoho promotoru a translatována za vzniku jednoho fúzního proteinu. Typickým příkladem translačních fúzí jsou fúze fluorescenčních markerových proteinů (GFP) se zájmovými geny, jejichž lokalizace v rámci organismu má být sledována (Wu *et al.*, 2013). Sekvence fluorescenčního proteinu může být v DNA umístěna na 5' nebo 3' konec zájmového genu, v důsledku čehož je možné vytvořit buď N'-terminálně nebo C'-terminálně značené fúzní proteiny (Cutler *et al.*, 2000; Huh *et al.*, 2003; DeBlasio *et al.*, 2010), které obecně nazýváme jako fluorescenční markerové proteiny (Lippincott-Schwartz *et Patterson*, 2003).

Fluorescenční markerové proteiny mají široké spektrum využití. Umožňují sledování lokalizace a dynamiky proteinů *in vivo* pomocí fluorescenční mikroskopie (DeBlasio *et al.*, 2010), dále zviditelnění subcelulárních buněčných kompartmentů (Chalfie *et al.*, 1994) nebo značení cytoskeletu a buněčných organel (Haseloff *et al.*, 1999). Příkladem studia dynamiky subcelulárních struktur *in vivo* je fúze jedné z histonových variant s GFP, pomocí které je možné efektivně značit strukturu chromatinu (resp. jader nebo chromozomů), což umožňuje sledování buněčného dělení (Hutter *et al.*, 2012).

Fluorescenční proteiny markerových linií patří do skupiny dominantních markerů, fluorescenční signál lze tudíž detekovat jak u heterozygotních, tak homozygotních

transgenních T1 rostlin (Kumlehn *et al.*, 2006). Dědičnost transgenu ve většině případů podléhá Mendlovým zákonům dědičnosti (Low *et al.*, 2018).

3.3.3 Výhody a nevýhody použití fluorescenčních markerových proteinů

Výhody použití fluorescenčních markerových proteinů

Hlavní výhodou použití fluorescenčních markerových proteinů je možnost mikroskopické analýzy biologického materiálu *in vivo* v reálném čase při vysokém rozlišení a po relativně dlouhou dobu (Berg *et Beachy*, 2008). Použití fluorescenčních proteinů pro zobrazovací metody nevyžaduje přidání vnějších barviv nebo substrátů. Je to neinvazivní způsob pozorování lokalizace a dynamiky proteinů, což je jednou z hlavních předností této techniky (Tanz *et al.*, 2013). *In vitro* zobrazovací metody vyžadují přidání vnějších barviv a fixaci vzorku, což dostatečně neodráží komplexní dynamiku prostředí uvnitř buňky. Značení proteinů pomocí specifických protilátek, při kterém protilátky rozeznávají daný protein ve tkáni nebo pletivu (technika *whole-mount* imunodetekce), nemusí být dostatečně specifické, je časově náročné a velmi pracné. Problémem imunodetekce je především odlišení proteinů strukturně se lišících pouze v několika aminokyselinách (Tanz *et al.*, 2013).

Omezení použití fluorescenčních markerových proteinů

Hlavním omezením fluorescenční detekce proteinů u rostlinných vzorků je autofluorescence některých buněčných struktur, zejména buněčných stěn a plastidů (Berg *et Beachy*, 2008; Dumur *et al.*, 2019). Nejčastějším zdrojem autofluorescence je lignin, složka buněčných stěn, která emituje světlo v rozmezí vlnových délek 440–540 nm, což odpovídá vlnovým délkám zeleného světla. Signály fluorescenčních proteinů, jejichž excitační a emisní spektra se nachází v rozpětí těchto hodnot (např. GFP, CFP), mohou být tudíž obtížně detekovány. Dalším zdrojem autofluorescence je chlorofyl, fotosyntetické barvivo obsažené v chloroplastech, které emituje světlo o vlnové délce 680 nm, což odpovídá vlnovým délkám červeného světla. Autofluorescence chlorofylu se může překrývat se signály červených fluorescenčních proteinů (RFP) (Berg *et Beachy*, 2008).

Problematická může být rovněž detekce proteinů exprimovaných pod slabými endogenními promotory. Nízká intenzita emitovaného signálu může být pod detekčním limitem méně citlivých mikroskopů (DeBlasio *et al.*, 2010). Overexprese proteinu značeného fluorescenčním proteinem ze silného promotoru může naopak vést k umlčení transgenu. Umlčování genu v rostlinných buňkách je častější, pokud jsou transgeny přítomny ve více kopiích (Lisenbee *et al.*, 2003).

Důležitým negativním aspektem detekce fluorescenčního signálu v živých buňkách je fototoxicita laserového záření používaná pro excitaci fluoroforu. Záření o vysoké intenzitě blíží se ultrafialovému spektru je pro živé buňky škodlivé, jelikož způsobuje poškození DNA. Dochází také k *photobleachingu* neboli vysvěcování fluorescence chromoforu doprovázeného vznikem vysoce reaktivních volných radikálů. Pokaždé, když je vzorek osvícen, část fluoroforu je nenávratně zničena. Fluorescenční proteiny však bývají méně fototoxické v porovnání s chemickými fluorescenčními barvivy. Prostorová struktura β -barelu fluorescenčního proteinu zabraňuje během *photobleachingu* šíření volných radikálů dále do buňky (Ettinger *et Wittmann*, 2014).

4 Materiál a metody

4.1 Biologický materiál

V rámci této diplomové práce bylo analyzováno 6 fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare* cv. Golden Promise), vytvořených Mgr. Kateřinou Kaduchovou v rámci její doktorské práce. Seznam použitých linií je uveden v Tabulce 1.

Tabulka 1: Seznam transgenních linií ječmene setého

Označení linie
CFP-H2B/S3-3
CFP-H2B/S4-2
RFP-CENH3/S2-1
RFP-CENH3/S2-5
YFP-FIB/S2-2
YFP-FIB/S4-1

Transgenní T1 rostliny byly vytvořeny pomocí *Agrobacterium tumefaciens* cv. AGL1 řízené transformace nezralých ječmenných embryí (*H. vulgare* cv. Golden Promise) (Marthe *et al.* 2015).

Sekvenační ověření konstruktů fluorescenčních markerových linií a inverzní PCR analýzy bylo provedeno za použití *Escherichia coli* cv. STBL2. Sekvenace vzorků byla provedena firmou SeqMe s.r.o..

4.2 Použité chemikálie, soupravy a roztoky

Použité chemikálie

- Agaróza (VWR International, kat. č. 0710-500G)
- 6-benzylaminopurin (BAP) (Duchefa, kat. č. B0904.0005)
- B5 vitamíny (Duchefa, kat. č. G0415.0100)
- Casein hydrolyzát (Duchefa, kat. č. C1301.0250)
- Cefotaxim (Duchefa, kat. č. C0111.0001)
- 4',6'-diamidino-2'-fenyldiol, DAPI ($1 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Sigma-Aldrich, kat. č. 10236276001)
- Dicamba (Sigma-Aldrich, kat. č. D5417-100MG)
- dNTPs ($10 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R0192)
- DreamTaq Green Buffer (10x) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0714)
- DreamTaq Green DNA polymerase ($5 \text{ U}\cdot\mu\text{l}^{-1}$) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EP0714)
- EDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. E5134-250G)
- Ethanol (96%) (Lach-ner, kat. č. 20025-A96)
- Ethidium bromid (Sigma-Aldrich, kat. č. E8751-5G)
- Formaldehyd (36,5–38% v H_2O) (Sigma-Aldrich, kat. č. F8775)
- GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, kat. č. SM1331)
- Chlorid draselný (Duchefa, kat. č. P0515.1000)
- Chlorid hořečnatý (Sigma-Aldrich, kat. č. M8266)
- Chlorid sodný (Duchefa, kat. č. S0520.1000)
- Chlornan sodný (Supelco, kat. č. 1056142500)
- Hygromycin B ($50 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Roche, kat. č. 10843555001)
- Isopropanol (Lach-ner, kat. č. 20037-AT0)
- Karbenicilin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) (Merck, kat. č. 69101-3)
- Kvasnicový extrakt (Sigma-Aldrich, kat. č. Y1000-500G)
- L-glutamin (Duchefa, kat. č. G0708.0100)
- L-prolin (Duchefa, kat. č. P0717.0100)
- Maltóza (Roth, kat. č. 8951.3)
- Murashige & Skoog médium (Duchefa, kat. č. M0221.0050)
- Myoinositol (Duchefa, kat. č. I0609.0100)
- NaFeEDTA (Sigma-Aldrich, kat. č. E6760-100G)

- Phusion Green HF buffer (5x) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F537S)
- Phusion Green Hot Start High-Fidelity DNA polymerase (2 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. F537S)
- Phytoagar (Duchefa Biochemie, kat. č. P1003.1000)
- Síran měďnatý (CuSO₄·5H₂O) (Sigma-Aldrich, kat. č. C3036-250G)
- Spermin tetrahydrochlorid (Sigma-Aldrich, kat. č. S2876-5G)
- T4 DNA ligase (5 U·μl⁻¹) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. EL0011)
- T4 DNA ligase buffer (Thermo Fisher Scientific, kat. č. B69)
- Tango pufr (10x) (Fermentas, kat. č. BY5)
- Thiamin (Sigma-Aldrich, kat. č. 47858)
- Timentin (Duchefa, kat. č. T-104-10)
- Tris (VWR International, kat. č. 28808.294)
- Triton (Sigma-Aldrich, kat. č. X100-5ML)
- TriTrack DNA Loading Dye (6x) (Thermo Fisher Scientific, kat. č. R1161)
- Trypton (Duchefa, kat. č. T1332.0100)
- Tween 20 (Sigma-Aldrich, kat. č. P9416-100ML)
- VectaShield (Vector Laboratories, kat. č. H-1200-10)
- *Xba*I restrikční endonukleáza (10 U·μl⁻¹) (Fermentas, kat. č. ER0681)

Použité soupravy

- CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K1231)
- GeneJET gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific, kat. č. K0691)
- NucleoSpin Plant II (Macherey-Nagel, kat. č. 740770.250)
- QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen, kat. č. 27106)
- QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, kat. č. 28106)
- QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen, kat. č. 28704)

Použité oligonukleotidy

Použité oligonukleotidy byly navrženy pomocí programu Primer 3 (verze 4.1.0). Jejich seznam je uveden v Tabulce 2.

Tabulka 2: Seznam použitých oligonukleotidů

Název	Sekvence (5' → 3')	Použití	T _m
KL018	GACGTCTGTCGAGAAGTTTCTG	detekce <i>htp</i> genu	57 °C
KL019	CGAGTACTTCTACACAGCCATC	detekce <i>hpt</i> genu	57 °C
KL037	AGCTGTTTCCTGTGTGAAATTG	RB primer	58 °C
KL038	ACCATGATTACGCCAAGCTATC	RB primer	58 °C
KL044	ATGACACCGCATCGACGCATG	ověření pozice T-DNA v genomu	62 °C
KL045	GTTCGCAAGACGGTCCGAATG		62 °C
KL046	ACTCACAAACAGGTCGGTCA		58 °C
KL059	GTCACGCTGCACCAACTTTT		59 °C
KL060	GCTTGCGTAATCATGGTCA		59 °C
KL061	GCTTGCGTAATCATGGTCA		59 °C
KL062	GACAGGATATATTGGCGGGTAAACC		62 °C

Použité roztoky a jejich příprava

- 1% agarózový gel: Navážit 1 g agarózy, přidat ke 100 ml 1x TAE puftru. Roztok rozvařit v mikrovlnné troubě, dokud roztok nebude čirý. Do mírně vychladlého roztoku přidat 1 µl ethidium bromidu, roztok promíchat a vlít do elektroforetické komory.
- CIM (selekční indukční médium): Navážit 15 g maltózy, 2,15 g Murashige & Skoog média, 500 mg casein hydrolyzát, 345 mg prolinu, 125 mg myoinositolu. Automatickou pipetou přidat 500 µl 2,5 mg·ml⁻¹ dicamba, 500 µl 1 mg·ml⁻¹ thiaminu, 500 µl 5 mmol·l⁻¹ CuSO₄·5H₂O, 500 µl 50 mg·ml⁻¹ cefotaximu, 500 µl 150 mg·ml⁻¹ timentinu. Doplnit vodou do 250 ml. Upravit pH roztoku na hodnotu 5,8. Sterilizovat filtrací. Přidat 500 µl hygromycinu. Přidat 250 ml 0,6% roztoku phytoagaru. Nalít do připravených Petriho misek.
- Edwards puftr: Smíchat 20 ml 1 mol·l⁻¹ Tris (pH 8), 5 ml 5 mol·l⁻¹ NaCl, 5 ml 0,5 mol·l⁻¹ EDTA a 5 ml 10% SDS, doplnit do 100 ml vodou.
- Formaldehyd 4%: Smíchat 6 ml 37% formaldehydu a 50 ml Tris puftru.

- Hypochlorid sodný 5%: Smíchat 20 ml 12% NaOCl s 78 ml vody. Automatickou pipetou přidat 200 μ l Tween 20.
- K4N (regenerační) médium: Smíchat 25 ml 20x K4N macro minerálů, 50 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ maltózy, 2 ml $0,25 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ L-glumatinu, 500 μ l 1 000x K micro minerálů, 500 μ l NaFeEDTA, 500 μ l 1000x B5 vitamínů, 112,5 μ l $1 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ 6-BAP, 490 μ l $5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ $\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ a 500 μ l timetinu. Doplnit vodou do 250 ml. Upravit pH roztoku na hodnotu 5,8. Sterilizovat filtrací. Přidat 250 μ l hygromycinu. Přidat 250 ml 0,6% roztoku phytoagaru. Nalít do připravených Petriho misek.
- LB médium (tekuté): Smíchat 10 g tryptonu, 10 g NaCl a 5 g kvasnicového extraktu, doplnit do 950 ml vodou. Autoklávovat.
- LB médium (tuhé): Smíchat 10 g tryptonu, 10 g NaCl, 5 g kvasnicového extraktu a 20 g agaru, doplnit do 100 ml vodou. Autoklávovat.
- LB01: 363,4 mg $15 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, 148,9 mg $2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Na_2EDTA , 34,8 mg $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ spermin tetrahydrochloridu, 1,193 g $80 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ KCl, 233,8 mg $20 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 200 μ l 0,1% tritonu. Doplnit vodou do 200 ml. Upravit pH roztoku na hodnotu 7,5. Sterilizovat filtrací přes filtr s velikostí pórů 0,22 μ m, uchovávat při $-20 \text{ }^\circ\text{C}$.
- 1x TAE (Tris-acetát-EDTA): Smíchat 20 ml 50x TAE s 980 ml destilované vody.
- Tris pufr: Smíchat 25 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris, 2,5 ml $0,5 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ MgCl_2 , 21,25 ml $1 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ NaCl, 2,5 ml 10% tritonu, doplnit vodou do 250 ml.

4.3 Seznam použitých přístrojů a zařízení

Použité přístroje

- Analytické váhy (Santorius)
- Binokulární lupa VisiScope 350 (VWR)
- Cytometr CyFlow Space (Sysmex)
- Elektroforetická komora (Cleaver Scientific)
- Epifluorescenční mikroskop AxioImager Z2 (Zeiss) vybavený konfokálním modulem DSD2, monochromatickou kamerou Zyla 4.2 a programem IQ3 program (vše Andor)
- Fluorescenční mikroskop Olympus IX81 (Olympus)
- Fotoaparát AF-S Micro (Nikon)
- Fytotronová komora (Weiss Gallenkamp)
- Chlazená centrifuga Jouan CR4i (Thermo Fisher Scientific)
- Konfokální mikroskop Leica TCS SP8 STED3X (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), vybavený HC PL APO CS2 20x/0,75 DRY objektivem, HC PL APO CS2 63x/1.40 Oil objektivem, hybridními detektory (HyD), a softwarem Leica Application Suite X (LAS-X), verze 3.5.5 s Leica Lightning module (Leica, Buffalo Grove, IL, USA).
- Laboratorní digestoř M1800 (Merci)
- Laminární box Aeolus H (Telstar)
- Laminární box MSC-Advantage™ (Thermo Fisher Scientific)
- Lednice (Gorenje)
- Magnetická míchačka Multipoint HP (Variomag)
- Mikrovlnná trouba (Zanussi)
- Minicentrifuga MYfuge (Benchmark Scientific)
- Minicentrifuga stolní MicroStar17R (VWR)
- Minirotátor Bio RS-24 (Biosan Ltd.)
- Nanodrop One/OneC Microvolume UV-Vis spektrofotometr (Thermo Fisher Scientific)
- pH metr do laboratoře (Inolab)
- Počítačová sestava (IntelCore)
- Sada automatických pipet Nichipet EXII (Nichiryo)
- Skleněné kuličky (Carl Roth, kat. č. A555.1)

- Stolní inkubovaná třepačka MaxQ 4000 (Thermo Fisher Scientific)
- Termoblok (VWR)
- Termocykler C1000 Touch (BioRad)
- Termostat B120 (Biological Thermostat)
- TissueLyser MM301 (Retch)
- Třepačka (Heidolph Instruments GmbH)
- UV transiluminátor (Syngene)
- Vodní lázeň (Memmert)
- Výrobek ledu (Brema IceMakers)
- Výrobek vakua (KNF)
- Zdroj napětí k elektroforéze (Clever Scientific)

Použité programy

- Ensembl Plants release 51 (EMBL-EBI)
- GeneSnap verze 7.12.06 (Syngene)
- ImageJ (Java)
- Primer 3 verze 4.1.0 (Elixir)
- Snapgene Viewer verze 5.3.2 (GSL Biotech)

4.4 Použité experimentální a vyhodnocovací postupy

4.4.1 Transformace a selekce transgenních rostlin ječmene

Sterilizace semen

Semena ječmene setého cv. Golden Promise byla vyloupána z klasu, nasypána do 15ml plastové zkumavky se šroubovacím víčkem, zalita 10 ml 70% ethanolu a promíchávána točením na minirotátoru po dobu 3 min. Po odlití ethanolu byla semena propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Následně bylo přidáno 10 ml 5% roztoku hypochloridu, zkumavka byla opět umístěna do minirotátoru a promíchávána točením 15 min. Roztok hypochloridu byl odlit a semena byla pětkrát propláchnuta sterilní destilovanou vodou. Takto vysterilizovaná semena byla použita k dalším analýzám. Postup sterilizace semen byl totožný jak pro přípravu semen obsahujících nezralá embrya určená k transformaci, tak zralá semena transgenních rostlin určená k charakterizaci.

Transformace embryí ječmene setého

Transformace nezralých embryí ječmene setého cv. Golden Promise pomocí *Agrobacterium tumefaciens* byla provedena vedoucí diplomové práce podle upraveného protokolu Marthe *et al.*, 2015.

Selekce transgenních rostlin regenerujících z embryonálního kalusu ječmene setého

Embrya ječmene po transformaci *A. tumefaciens* byla přenesena ve sterilním prostředí na misky s indukčním CIM médiem s obsahem antibiotika hygromycinu o koncentraci 50 mg·ml⁻¹. Kvalita a prostorová orientace embrya byla kontrolována pod binokulární lupou. Misky byly následně překryty parafilmem a umístěny do inkubátoru do tmy na 24 °C na 14 dní. Po uplynutí této doby byly kalusy přeneseny ve sterilním prostředí na misky s čerstvým CIM médiem a umístěny do inkubátoru do tmy na 24 °C na 14 dní. Poté byly kalusy přeneseny na regenerační médium K4N s přídavkem hygromycinu o koncentraci 50 mg·ml⁻¹ a umístěny do inkubátoru se světly na 24 °C na 14 dní. Po uplynutí této doby byly vybrané zelenající se kalusy přeneseny ve sterilním prostředí na misky s čerstvým K4N médiem bez obsahu hygromycinu a byly umístěny do inkubátoru se světly na 24 °C na 14 dní. Poté byly rostliny s vytvořenými kořeny přeneseny do rašelinových jiffů do plastového skleničku ve fytotronové komoře.

Úspěšnost transformace byla potvrzena genotypováním regenerovaných rostlin. Později byly pozitivní transgenní rostliny přesazeny do plastových květináčů se substrátem míchaným s pískem (poměr 3:1) a zajištěny přidáním růstové podpěry.

4.4.2 Genotypování regenerantů na přítomnost *hpt* selekčního genu, měření ploidie transgenních rostlin

Izolace genomické DNA

Izolace DNA podle protokolu Edwards *et al.*, 1991 je rychlá a spolehlivá metoda izolace rostlinné DNA. Dostupný protokol byl upraven dle potřeb laboratoře. Přibližně 0,5 cm² listu byl odebrán do 1,2ml mikrozkušavky se skleněnými kuličkami o průměru 1,25–1,65 mm. Mikrozkušavky uzavřené víčky byly zmrazeny v tekutém dusíku a následně homogenizovány při frekvenci 30/s v TissueLyseru po dobu 60 s. K homogenizovanému pletivu bylo přidáno 100 µl Edwards pufru, směs byla promíchána na vortexu a následně byly mikrozkušavky centrifugovány při 2 250 x g po 20 min při 20 °C. Do nových mikrozkušavek bylo přeneseno 80 µl supernatantu a přidáno 80 µl isopropanolu. Směs byla promíchána na vortexu. Mikrozkušavky byly centrifugovány při 2 250 x g po 10 min při 20 °C. Supernatant byl odlit, k peletu bylo přidáno 80 µl 70% ethanolu a směs byla promíchána na vortexu. Mikrozkušavky byly opět centrifugovány za stejných podmínek, následně byl supernatant vylit do odpadu, zkkušavky s usazeným peletem obsahujícím DNA byly umístěny dnem vzhůru do termostatu při 37 °C po 30 min až 1 hod, čímž došlo k úplnému odpaření zbylého ethanolu. DNA byla rozpuštěna v 50 µl TE pufru.

PCR genotypování přítomnosti selekčního *hpt* genu

Pro genotypování byly použity vzorky rostlin ječmene setého cv. Golden Promise, regenerované po transformaci *A. tumefaciens* podle protokolu uvedeného výše. Cílem bylo vyhodnotit úspěšnost transformace a přítomnost selekčního genu *hpt* (gen pro hygromycin fosfotransferázu) v genomu transformovaných rostlin, a tím pádem i přítomnost vložené T-DNA. Pro genotypování pomocí primerů KL018 a KL019 byla jako templátová DNA použita DNA izolovaná pomocí protokolu Edwards *et al.*, 1991.

PCR reakční směs byla připravena podle Tabulky 3. V Tabulce 4 jsou uvedeny podmínky PCR reakce.

PCR produkty byly separovány v 1% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). Specifické PCR produkty byly detekovány pomocí UV transiluminátoru, gel byl zdokumentován pomocí programu GeneSnap.

Tabulka 3: Složení PCR reakční směsi pro detekci *hpt* selekčního genu

Složka	Počáteční koncentrace	Finální koncentrace	Objem 1 reakci [μ l]
DreamTaq reakční pufr	10x	1x	2
dNTPs	2 mmol·l ⁻¹	200 μ mol·l ⁻¹	2
primer KL018	10 μ mol·l ⁻¹	0,5 μ mol·l ⁻¹	1
primer KL019	10 μ mol·l ⁻¹	0,5 μ mol·l ⁻¹	1
DreamTaq polymeráza	5 U· μ l ⁻¹	0,02 U· μ l ⁻¹	0,1
deionizovaná voda	-	-	14,9
templátová DNA	-	-	1

Tabulka 4: Podmínky PCR reakce pro detekci *hpt* selekčního genu

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
amplifikace	95 °C	30 s	35
nasedání primerů	57 °C	30 s	
extenze	72 °C	30 s	
závěrečná extenze	72 °C	2 min	1
dokončení reakce	4 °C	∞	

Měření ploidie

U všech *hpt* pozitivních zregenerovaných rostlin byla ověřena jejich ploidie z důvodu vyloučení polyploidizačních událostí, ke kterým může během regenerace z kalusových kultur docházet. Přibližně 1 cm² listu transgenních rostlin ječmene byl pomocí žiletky rozsekán v 500 μ l pufru LB01, homogenát byl přefiltrován přes nylonový filtr o velikosti pórů 50 μ m a obarven roztokem fluorescenčního barviva DAPI. Jako standard pro měření

ploidie byla použita netransgenní odrůda ječmene cv. Golden Promise ($2n = 2x$). Porovnáním pozice jednotlivých histogramových peaků standardu a analyzovaného vzorku byla určena ploidie transgenních rostlin.

4.4.3 Segregační analýza

Dědičnost alel odpovídá třetímu Mendelovu zákonu o nezávislé kombinovatelnosti alel. Segregační analýza je statistickou metodou, při které je na základě frekvence výskytu fenotypu hodnocen počet kopií určitého genu v genomu, vzájemná lokalizace dvou a více genů na jednotlivých chromozomech nebo počet homozygotní/heterozygotních jedinců v populaci pro daný fenotypový znak. Metodika transformačních technik neposkytuje kontrolu jak nad počtem kopií transgenů, které jsou vloženy do genomu rostlin, tak nad místem vložení těchto kopií. V rámci genomu rostlin se tak transgeny vkládají čistě náhodně. V následující generaci potomků označenou jako T2 lze pozorovat různé genotypové a fenotypové štěpné poměry v závislosti na umístění a počtu kopií transgenů v genomu. Z fenotypů potomků lze určit genotyp mateřské rostliny. V Tabulce 5 je znázorněn příklad segregace alel při křížení dvou jedinců heterozygotních v jednom genu. V Tabulce 6 je znázorněn příklad segregace alel při křížení dvou jedinců heterozygotních ve dvou genech.

Tabulka 5: Segregační (mendelistický) čtverec znázorňující segregaci alel při křížení dvou jedinců heterozygotních v jednom genu (jedna kopie T-DNA)

Alely	A	a
A	AA	Aa
a	Aa	aa

Legenda: Zeleně alely v T1 generaci: A, a; fialově genotypy v T2 generaci

Genotypový štěpný poměr v T2 generaci: (AA: 2 Aa: aa) = 1:2:1 = 25 % dominantních homozygotů, 50 % heterozygotů a 25 % recesivních homozygotů

Fenotypový štěpný poměr v T2 generaci: (AA : 2 Aa: aa) = 3:1 = 25 % dominantních homozygotů, 50 % heterozygotů a 25 % recesivních homozygotů; 75 % jedinců s požadovaným fenotypem (fluorescenční signál) : 25 % jedinců bez fenotypu (bez fluorescenčního signálu).

Tabulka 6: Segregační (mendelistický) čtverec znázorňující segregaci alel při křížení dvou jedinců heterozygotních ve dvou genech (dvě kopie T-DNA)

Alely	AB	Ab	aB	ab
AB	AABB	AABb	aABB	aABb
Ab	AABb	AAbb	aABb	aAbb
aB	AaBB	AaBb	aaBB	aaBb
ab	AaBb	Aabb	aaBb	aabb

Zeleně alely v T1 generaci: A, a - jedna kopie genu, B, b - druhá kopie genu; fialové genotypy v T2 generaci.

Genotypový štěpný poměr v T2 generaci: 4:2:2:2:2:1:1:1:1

Fenotypový štěpný poměr v T2 generaci: 9 : 3 : 3 : 1 = 9 dominantních homozygotů v obou znacích, 3 jedinci s dominantním fenotypem v jednom znaku a recesivním ve druhém znaku (Aabb, AAbb), 3 jedinci s recesivním fenotypem v jednom znaku a dominantním ve druhém znaku = 15:1; 93,75 % jedinců s požadovaným fenotypem (fluorescenční signál) : 6,25 % jedinců bez fenotypu (bez fluorescenčního signálu).

Pro segregační analýzu byla semena vybraných T1 rostlin transgenních fluorescenčních linií sterilizována podle výše zmíněného protokolu. Semena (T2 generace) byla umístěna na filtrační papír do skleněných Petriho misek. Následně byly misky vloženy do lednice (4 °C) na 48 hod k chladové stratifikaci. Poté byly misky přeneseny do termostatu (24°C) na 48 hod, během kterých došlo k naklíčení semen. Po naklíčení byla u každého jednotlivého semene odříznuta kořenová špička a umístěna do kapky vody na podložní sklíčko, na kterém byla horizontálně přilepena oboustranná páska. Preparát byl překryt krycím sklíčkem, čímž vznikla komůrka, díky které bylo možno špičky pozorovat bez jejich porušení. Přítomnost signálu fluorescenčních markerových proteinů v buňkách kořene byla u jednotlivých klíčících rostlin zjištěna pomocí fluorescenčního mikroskopu Olympus IX81. Reprezentativní fotografie byly pořízeny pomocí konfokálního mikroskopu Leica TCS SP8 STED3X (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany), vybavený HC PL APO CS2 20x/0,75 DRY objektivem, hybridními detektory (HyD), a softwarem Leica Application Suite X (LAS-X), verze 3.5.5 s Leica Lightning module (Leica, Buffalo Grove, IL, USA).

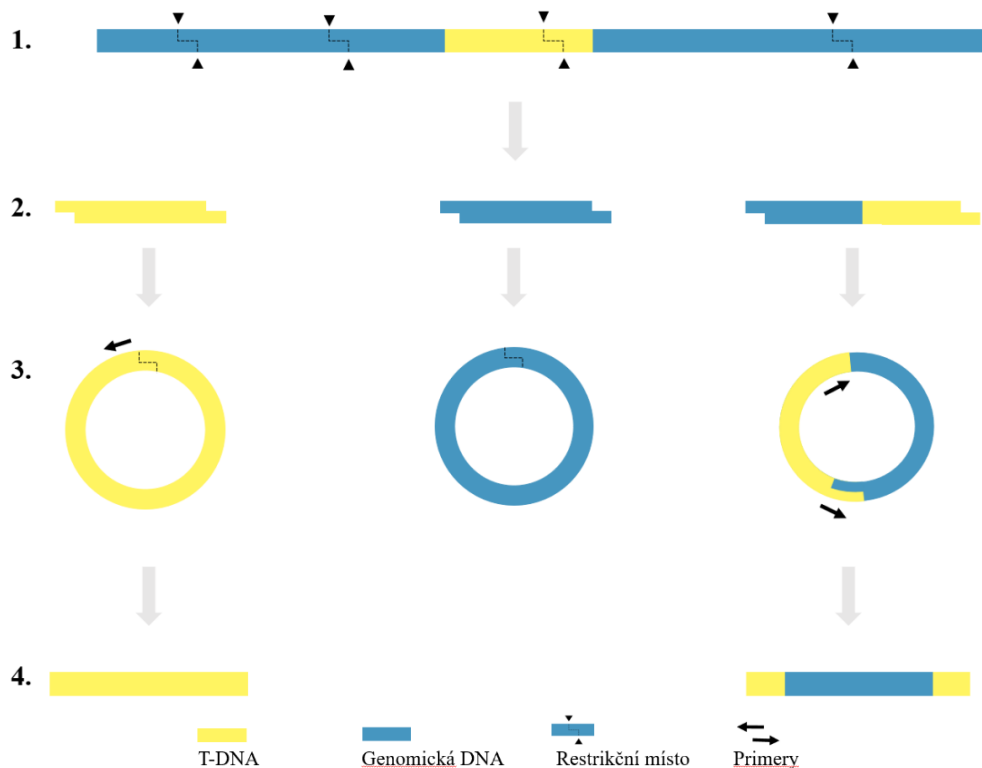
4.4.4 Fluorescenční detekce specifity lokalizace RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene

Z transgenických rostlin ječmene byly odebrány 1 cm² listů, které byly nastříhány a umístěny do kádinky. K listům byl přidán fixační roztok 4% formaldehydu v Tris pufru, ve kterém byly vzorky umístěny po dobu 30 min, kádinky byly po doby fixace na ledu v digestoři a zakryty alobalem. Následně byly kádinky přeneseny do exikátoru napojeného na vakuovou vývěvu, krycí alobal byl odstraněn a vzorky listů byly fixovány po dobu 10 min při pokojové teplotě a tlaku 500 mbar. Listy byly dvakrát opláchnuty v Tris pufru po dobu 10 min. Následně byly pomocí žiletky rozsekány ve 300 μ l LB01 pufru, homogenát byl přefiltrován před nylonový filtr s velikostí pórů 50 μ m. 10 μ l filtrátu obsahujícího jádra bylo nanášeno na podložní mikroskopické sklíčko a ponecháno při pokojové teplotě do zaschnutí. Vzorek na podložním skle byl zakápnut 5 μ l VectaShield s barvivem DAPI o koncentraci 1 μ g·ml⁻¹ a překryt krycím sklem. Preparáty byly mikroskopovány epifluorescenčním mikroskopem AxioImager Z2 (Zeiss), vybavený konfokálním modulem DSD2, monochromatickou kamerou Zyla 4.2 a programem IQ3 program (vše Andor), přes filtry cDAPI (excitační maximum při 359 nm, emisní maximum detekovaného signálu 465 nm) a cRFP (excitační maximum při 558 nm, emisní maximum detekovaného signálu 583 nm) při zvětšení objektivu 20x a objektivu 63x s použitím imerzního oleje. Jako negativní kontrola byl použit vzorek WT ječmene cv. Golden Promise. V průběhu mikroskopování byly pořízeny fotky jader buněk ječmene setého vypovídající o lokalizaci RFP-CENH3 translačně-fúzního proteinu.

4.4.5 Inverzní PCR

Tato metoda je využívána pro detekci neznámé sekvence DNA, která je ohraničena námi známými sekvencemi (zde známá sekvence T-DNA, jejíž pozice v rámci genomické DNA je neznámá). Pro digesci je vybrána restriční endonukleáza s vysokou specifitou štěpení, nízkou frekvencí výskytu rekogničního místa (zpravidla rozeznává alespoň 6 bp palindromickou sekvenci) a tvořící po štěpení vzájemně komplementární lepivé konce fragmentu. Rekogniční místo vybrané restriční endonukleázy se ideálně nachází ve známé sekvenci unikátně, nicméně v rámci neznámé sekvence se rekogničních míst vyskytuje i přes specifitu vybraného enzymu mnoho (přesná pozice štěpení je neznámá).

Po naštěpení vzorku dochází ke vzniku tří frakcí DNA molekul ohraničených lepivými konci: i) se známou sekvencí (v případě výskytu více než jednoho unikátního restrikčního místa ve známé sekvenci), ii) s neznámou sekvencí a iii) s částečně známou sekvencí na jednom konci molekuly. Následně jsou všechny molekuly vzniklé restrikcí ligovány za vzniku kruhových molekul. V předposledním kroku je provedena amplifikace pomocí primerů navržených tak, aby byly komplementární ke známé sekvenci a zároveň byly orientovány svými 3' konci ven ze známé sekvence (směřují od sebe). Během PCR reakce dochází k amplifikaci a linearizaci vznikajících molekul (Clark *et* Pazdernik, 2016), které jsou následně rozseparovány v agarózovém gelu. Cílem je detekovat specifický band (PCR produkt), k jehož vzniku bude docházet pouze při analýze vzorků T-DNA linie, a bude nepřítomný v kontrolním *wild-type* vzorku. Tento specifický band je v posledním kroku analýzy vyříznut z gelu, reisolován a použit pro sekvenační analýzu a finální mapování v rámci genomu. Zjednodušený princip inverzní PCR je zobrazen na Obrázku 1.



Obrázek 1: Princip inverzní PCR

V prvním kroku je lineární molekula genomické DNA (modře) obsahující T-DNA (žlutě) naštěpena restrikční endonukleázou *Xba*I tvořící lepivé konce, vznikají tři frakce lineárních molekul (krok 2, zleva: molekula se známou sekvencí, molekula s neznámou sekvencí, molekula s částečně známou sekvencí na jednom konci molekuly). Ve třetím kroku jsou všechny molekuly zligovány. Zligované molekuly slouží jako templát pro PCR reakci (krok 4), při které dojde k amplifikaci molekul pomocí primerů specifických pro LB a RB oblast T-DNA a vzniku lineárních molekul.

Inverzní PCR pro zjištění pozice vložení T-DNA molekuly do genomické DNA byla provedena na vzorku DNA transgenní rostliny ječmene setého cv. Golden Promise RFP-CENH3/S2-1. Byla použita genomická DNA izolovaná z transgenních T1 rostlin a kontrolních WT (*wild-type*) rostlin ječmene pomocí NucleoSpin Plant II kitu (Macherey-Nagel). Vstupní množství materiálu pro izolaci DNA (čerstvé listy) bylo 80 mg. Postup byl proveden podle návodu výrobce. DNA byla rozpuštěna v 100 µl PE pufru, který je součástí kitu.

Restrikční štěpení a ligace fragmentů

Genomická DNA z transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1 a WT rostliny byla v prvním kroku naštěpena pomocí restrikční endonukleázy *Xba*I. Složení restrikční směsi je uvedeno v Tabulce 7. Restrikční reakce byla inkubována při 37 °C v termobloku přes noc.

Tabulka 7: Složení restrikční reakce

Složka	Objem pro 1 reakci [µl]
Tango pufr	4
endonukleáza <i>Xba</i> I	2
DNA	50 ng
deionizovaná voda	doplnit do 40 µl

Po uplynutí doby inkubace byla provedena tepelná inaktivace restrikční endonukleázy v restrikční směsi při 65 °C po dobu 20 min. Celý objem reakce byl přečištěn pomocí QIAquick PCR Purification Kitu (Qiagen), koncentrace DNA byla změřena přístrojem Nanodrop.

Následně byla provedena intramolekulární ligace restrikčních fragmentů, složení ligační směsi je uvedeno v Tabulce 8. Do reakce bylo použito 100 ng DNA restrikční směsi. Celkový objem ligační reakce byl 50 µl. Ligační reakce byla inkubována při teplotě 15 °C po dobu 6 hod.

Tabulka 8: Složení ligační směsi

Složka	Objem pro 1 reakci [μl]
reakční pufr	5
T4 DNA ligáza	2,5
DNA	100 ng
deionizovaná voda	doplnit do 50 μl

Inverzní PCR

Pro inverzní PCR byla jako templátová DNA použita DNA z ligační směsi z předchozího kroku, tvořená intramolekulárně zligovanými kruhovými molekulami. Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 9. Podmínky inverzní PCR reakce jsou uvedeny v Tabulce 10.

Tabulka 9: Složení inverzní PCR reakce

Složka	Počáteční koncentrace	Finální koncentrace	Objem pro 1 reakci [μl]
Phusion reakční pufr	10x	1x	10
dNTPs	10 mmol·μl ⁻¹	200 μmol·μl ⁻¹	1
primer KL037	10 μmol·μl ⁻¹	0,5 μmol·μl ⁻¹	1
primer KL038	10 μmol·μl ⁻¹	0,5 μmol·μl ⁻¹	1
Phusion polymeráza	2 U·μl ⁻¹	0,02 U·μl ⁻¹	0,5
deionizovaná voda	-	-	35,5
templátová DNA			1 μl

Tabulka 10: Podmínky inverzní PCR reakce

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	98 °C	30 s	1
amplifikace	98 °C	10 s	38
nasedání primerů	58 °C	20 s	
extenze	72 °C	30 s	
závěrečná extenze	72 °C	2 min	1
dokončení reakce	4 °C	∞	

PCR produkty vzniklé po amplifikaci byly separovány v 1–1,5% agarózovém gelu s ethidium bromidem. Jako marker molekulové hmotnosti byl použit GeneRuler 1 kb Plus (Thermo Fisher Scientific). Specifické PCR produkty vizualizované po separaci v agarózovém gelu, vyskytující se u T-DNA linie a nepřítomné u WT rostliny, byly na UV transiluminátoru vyříznuty z gelu a vloženy do 2ml mikrozkušavek. Izolace DNA fragmentu z gelu byla provedena podle návodu výrobce GeneJET gel extraction kit (Thermo Fisher Scientific). DNA byla rozpuštěna v 30 μ l TE pufru.

4.4.6 Klonování specifických PCR produktů do plazmidu pJET1.2 a sekvenační ověření

Specifické PCR produkty reisolované z gelu byly zaklonovány do plazmidu pJET1.2 podle návodu výrobce CloneJET PCR Cloning Kit (Thermo Fisher Scientific), Blunt-End protokol.

Transformace *Escherichia coli* cv. STBL2 kompetentních bakterií

K 100 μ l alikvótu zamražených chemicky kompetentních bakteriálních buněk STBL2 byl přidán celý objem klonovací reakce. Buňky byly inkubovány 30 min na ledu. Následně byl proveden heat-shock při 42 °C ve vodní lázni na 45 s, následovalo prudké ochlazení ponořením zkumavky do ledu na 2 min. Ke STBL2 buňkám bylo přidáno 800 μ l LB média. Směs byla inkubována ve stolní třepačce 1 hod při 37 °C a otáčkách 300 otáček/min. Po uplynutí této doby byly zkumavky centrifugovány 1 min při 6000 otáček/min/RT. Po centrifugaci byl supernatant odlit do odpadu, k peletu buněk bylo přidáno 100 μ l čerstvého LB média, ve kterém byly buňky rozsuspendovány a následně rozetřeny pomocí bakteriální hokejky na Petriho misky s LB médiem obsahujícím antibiotikum karbenilicin (100 mg·ml⁻¹). Misky byly inkubovány při 37 °C přes noc, následně byly překryty parafilmem a uchovávány při 4 °C v lednici do doby detekce úspěšnosti transformace pomocí colony PCR.

Colony PCR

Složení reakční směsi je uvedeno v Tabulce 11. Pro amplifikaci byly použity primery KL037 a KL038. Jako templát pro colony PCR byly použity vybrané bakteriální kolonie

narostlé na Petriho miskách, ze kterých byly odebrány vzorky pomocí odpíchnutí sterilní špičkou. Colony PCR byla provedena dle podmínek, které jsou uvedeny v Tabulce 12.

Tabulka 11: Složení reakční směsi colony PCR

Složka	Počáteční koncentrace	Finální koncentrace	Objem 1 reakci [μl]
DreamTaq reakční pufr	10x	1x	2,5
dNTPs	2 mmol·l ⁻¹	200 μmol·l ⁻¹	2,5
primer KL037	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
primer KL038	10 μmol·l ⁻¹	0,5 μmol·l ⁻¹	1,25
DreamTaq polymeráza	5 U·μl ⁻¹	0,02 U·μl ⁻¹	0,125
deionizovaná voda	-	-	17,375

Tabulka 12: Podmínky colony PCR

Proces	Teplota	Čas	Počet cyklů
počáteční denaturace	95 °C	3 min	1
amplifikace	95 °C	30 s	26
nasedání primerů	58 °C	30 s	
extenze	72 °C	30 s	
závěrečná extenze	72 °C	2 min	1
dokončení reakce	4 °C	∞	

Izolace plazmidu

Před izolací plazmidu byly vybrány pozitivně testované kolonie transformovaných *E. coli* cv. STBL2 namnoženy v tekutém LB médiu obsahujícím antibiotikum. Vybrané kolonie byly odpíchnuty sterilní špičkou, která byla vhozena do skleněné zkumavky s 5 ml tekutého LB média s přídatkem karbenicilinu (100 mg·ml⁻¹). Zkumavky byly inkubovány přes noc při 37 °C. Následně byla bakteriální kultura centrifugována 1 min při 6000 otáček/min/RT, po odlití supernatantu byl zbylý pelet obsahující bakteriální buňky použit pro izolaci plazmidu.

Izolace plazmidu byla provedena dle návodu výrobce QIAprep Spin Miniprep Kit (Qiagen). Plazmidová DNA byla rozpuštěna v 30 μl destilované vody. Následně byla

změřena koncentrace DNA ve vzorcích pomocí Nanodropu. Vzorčky plazmidů byly osekvenovány firmou SeqMe s.r.o.. Sekvenační data získaná od firmy SeqMe s.r.o. byla bioinformaticky zpracována pomocí programu BLAST a SnapGene.

PCR ověření pozice vložení T-DNA do genomu

Závěrečné ověření pozice vložení T-DNA do genomu ječmene určené sekvenací, spojené s výběrem primerů určených ke genotypování T2 generace transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1, bylo provedeno PCR reakcí s primery KL044 až KL062. Složení PCR reakční směsi je uvedeno v Tabulce 3, sekvence primerů v Tabulce 2 a podmínky reakce jsou uvedeny v Tabulce 4. Délky výsledných PCR produktů detekovaných po elektroforetické separaci byly porovnány s očekávanými délkami produktů určenými v programu SnapGene.

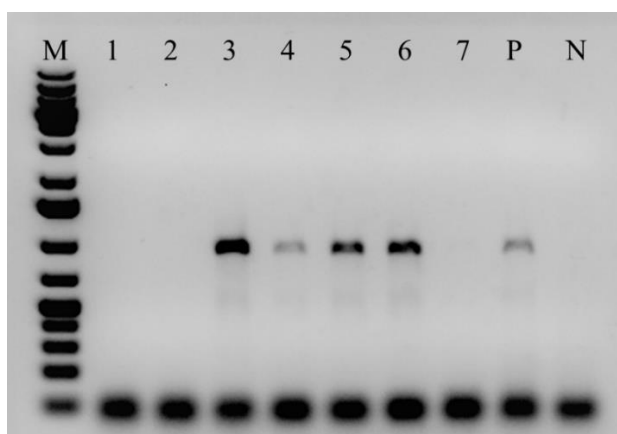
5 Výsledky

5.1 Transformace a selekce transgenních rostlin ječmene

Transformace byla provedena vedoucí diplomové práce. V rámci diplomové práce byla úspěšně provedena regenerace a selekce transgenních rostlin odvozených z embryonálního kalusu ječmene setého. Regenerované rostliny tvořící kořeny a listy byly po přenesení do rašelinových jiffů podrobeny genotypování na přítomnost *hpt* selekčního genu vyskytujícího se u transgenních rostlin.

5.2 Genotypování regenerantů na přítomnost *hpt* selekčního genu

V rámci mé diplomové práce bylo nejprve provedeno genotypování 25 regenerovaných rostlin ječmene setého cv. Golden Promise po transformaci *Agrobacterium tumefaciens* na přítomnost *hpt* selekčního genu, rostliny genotypované jako *hpt* pozitivní obsahují ve svém genomu kazetu obsahující kromě selekčního genu rovněž gen pro zájmový fúzní protein RFP-CENH3. Ke genotypování byla použita genomická DNA izolována metodou Edwards *et al.*, 1991. Délka výsledného PCR produktu amplifikovaného primery KL018 a KL019 byla 953 bp. PCR produkty vzniklé po amplifikaci byly elektroforeticky separovány v 1% agarózovém gelu obsahujícím ethidium bromid, který byl následně zdokumentován na UV transiluminátoru (Obrázek 2).

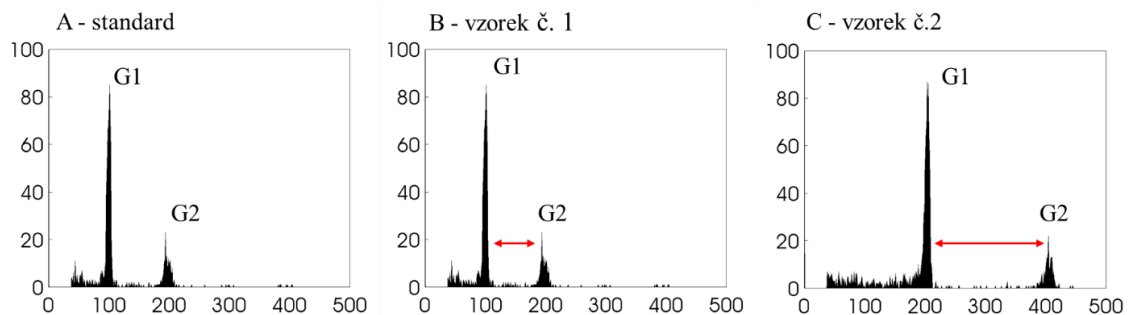


Obrázek 2: Genotypování regenerovaných rostlin potenciálně exprimujících RFP-CENH3 fúzní protein na přítomnost *hpt* selekčního genu.

1–7- rostliny regenerované po transformaci, vzorky 3,4,5,6 - pozitivně testované rostliny nesoucí *hpt* gen, pozitivní kontrola (P) - transgenní rostlina s *hpt* genem, negativní kontrola (N) - WT rostlina ječmene setého cv. Golden Promise, marker molekulové hmotnosti (M) - GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

5.3 Analýza ploidie

U všech linií ječmene získaných po transformaci ječmenných embryí byla provedena analýza ploidie za pomoci průtokového cytometru. Buněčná jádra izolovaná ze vzorků listů jednotlivých transgenních linií ječmene byla obarvena pomocí barviva DAPI a analyzována za použití standardu o známé ploidi (standard = diploidní WT rostlina ječmene setého cv. Golden Promise). Výsledky měření ploidie v podobě histogramových peaků jsou znázorněny v Grafu 1. Část A znázorňuje diploidní standard WT ječmen setý cv. Golden Promise. Část B znázorňuje vzorek č. 1, u něhož se pozice peaku shoduje s pozicí peaku standardu vzorku A, tudíž se jedná o diploidní rostlinu. Počet chromozomů odpovídá číslu 14. Pozice peaku vzorku č. 2, zobrazeném v části C, odpovídá dvojnásobku obsahu DNA standardu vzorku A, tudíž vzorek č. 2 pochází z tetraploidní rostliny. Počet chromozomů u tetraploidní rostliny je 28, tedy dvojnásobný oproti diploidnímu standardu. Na všech grafech lze pozorovat výrazný peak typický pro jádra v G1 fázi ($2n = 2x$) i druhý menší peak pro jádra v G2 fázi ($2n = 4x$), což odpovídá standardním hodnotám analyzovaných vzorků ječmene, jelikož většina ječmenných buněk se v listech nachází v G1 fázi buněčného cyklu.



Graf 1: Stanovení ploidie transgenních linií ječmene setého cv. Golden Promise

A: standard - diploidní standard, WT ječmen setý cv. Golden Promise ($2n = 2x = 14$). B: vzorek č.1 - diploidní vzorek č.1 ($2n = 2x = 14$), C: vzorek č. 2 - tetraploidní vzorek č.2 ($2n = 4x = 28$). Šipka vyznačuje rozdíl vzdáleností mezi peaky.

5.4 Segregační analýza

Na základě segregačního poměru výskytu fluorescenčního signálu translačně-fúzních markerových proteinů byl odhadnut počet kopií T-DNA inzertů nacházejících se u transgenních rostlin, jejichž seznam je uvedený v Tabulce 1. V rámci T2 generace rostlin byla očekávána přítomnost 75 % rostlin exprimujících fluorescenční signál

(50 % heterozygotní a 25 % homozygotních rostlin) a 25 % rostlin bez fluorescenčního signálu v případě, že T1 mateřská rostlina má ve svém genomu pouze 1 T-DNA inzerci. Analýze bylo podrobena 6 fluorescenčních markerových linií, včetně linie RFP-CENH3/S2-1, která byla později charakterizována z hlediska přesného místa vložení T-DNA do genomu. Jako negativní kontrola byla použita WT rostlina ječmene setého cv. Golden Promise.

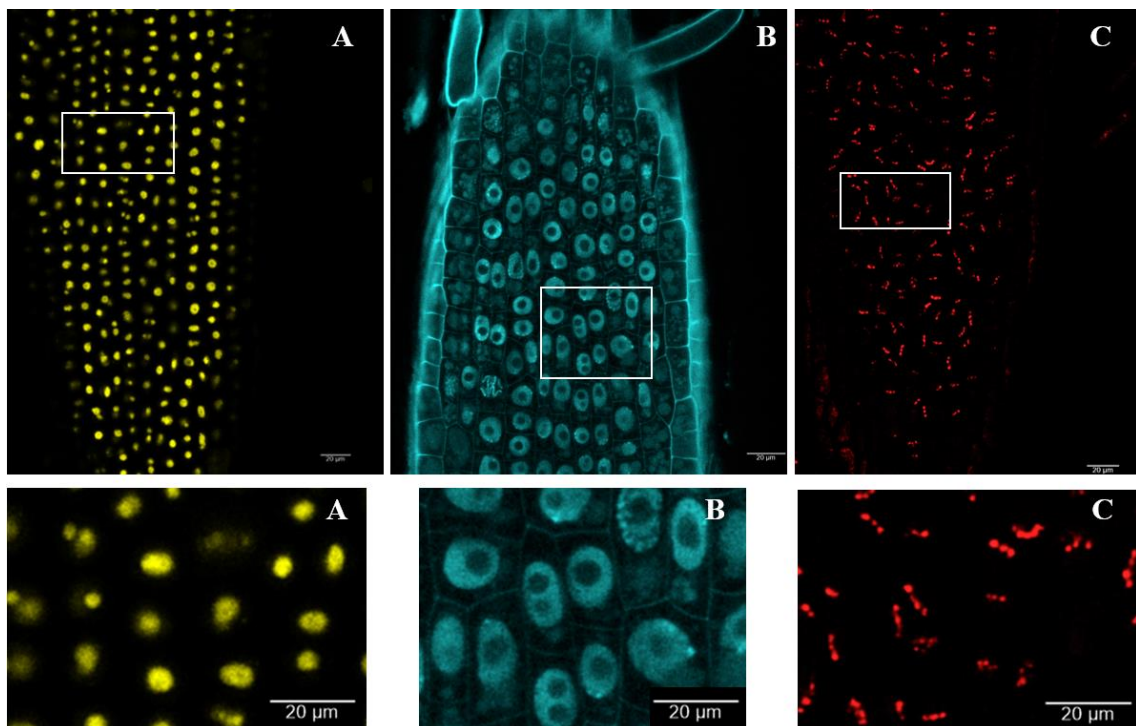
Na základě procentuálního zastoupení pozitivních rostlin s fluorescenčním signálem a negativních rostlin bez signálu byl stanoven možný počet T-DNA kopií v genomu. Údaje jsou uvedeny v Tabulce 13. Pro linii YFP-FIB/S2-2 bylo na přítomnost fluorescenčního signálu pozitivně testováno 96 % rostlin T2 generace, což odpovídá možným 2 nebo 3 kopiím T-DNA v genomu. Pro linii YFP-FIB/S4-1 bylo pozitivně testováno 93 % rostlin, což odpovídá možným 2 kopiím T-DNA v genomu. U linií CFP-H2B/S4-2 a CFP-H2B/S3-3 bylo pozitivních 60 % a 74 % rostlin, což odpovídá 1 kopii T-DNA v genomu. U linií RFP-CENH3/S2-1 a RFP-CENH3/S2-5 bylo hodnoceno pouze 14 T2 rostlin, ze kterých bylo pozitivních 92 % a 100 %, což odpovídá možným 2 respektive 4 kopiím T-DNA v genomu. Tato hodnota je ale značně zkreslena nízkým počtem analyzovaných rostlin.

Tabulka 13: Segregační analýza vybraných markerových linií

Linie	Generace	Počet semen	Nevyklíčená semena	Vyklíčená semena	Klíčivost	Rostliny s fluorescencí	Fluorescence rostlin [%]	Možný počet T-DNA kopií
YFP-FIB/S2-2	T2	60	5	55	92 %	53	96 %	2, 3
YFP-FIB/S4-1	T2	60	19	41	68 %	38	93 %	2
CFP-H2B/S4-2	T2	60	7	53	88 %	32	60 %	1
CFP-H2B/S3-3	T2	73	11	62	85 %	46	74 %	1
RFP-CENH3/S2-1	T2	14	1	13	93 %	12	92 %	2
RFP-CENH3/S2-5	T2	14	1	13	93 %	13	100 %	4
WT GP	T2	20	4	16	80 %	0	0 %	0

Výsledný segregační poměr daný procentem na fluorescenční signál pozitivních a negativních rostlin byl ovlivněn klíčivostí semen, která nadhodnotila (respektive podhodnotila) jeho přesnou hodnotu. Nejnižší procentuální klíčivost ze všech

analyzovaných linií byla stanovena u linie YFP-FIB/S4-1, a to 68 %. Všechny uvedené mateřské linie byly určeny jako heterozygotní, jelikož se jednalo o rostliny T1 generace získané z regenerantů po transformaci *A. tumefaciens*. Hodnota 100 % rostlin s fluorescenčním signálem u linie RFP-CENH3/S2-5 byla dosažena z důvodu analýzy omezeného počtu semen, a to pouze 14 semen. Získaná data pro linii RFP-CENH3/S2-5 (rovněž linii RFP-CENH3/S2-1) jsou pouze počáteční a budou postupně doplňována výsledky segregačních analýz dalších semen těchto rostlin. Fotky pořízené během analýzy jsou uvedeny na Obrázku 3.



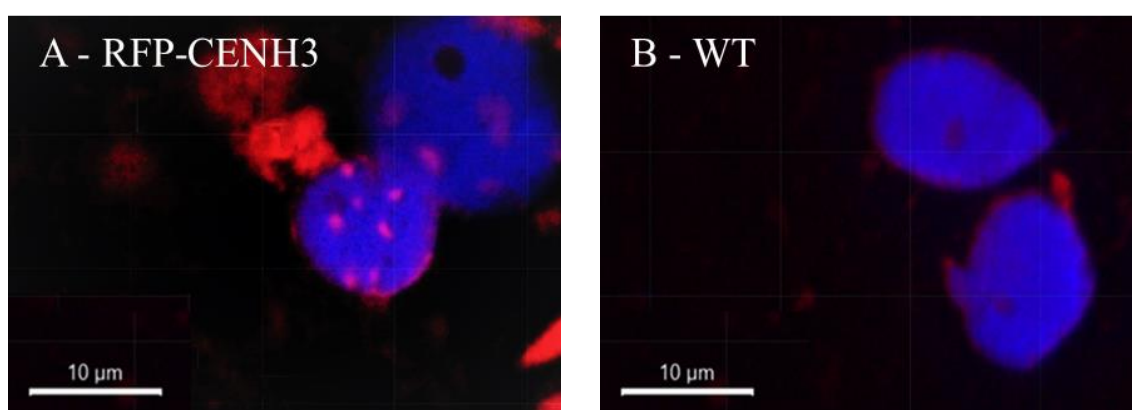
Obrázek 3: Kořenové špičky rostlin transgenických linií podrobených segregační analýze.

A: Kořenová špička YFP-FIB/S2-2 (nahore). Detail buněk kořenové špičky (dole). Žlutě značen protein fibrilarin. B: Kořenová špička rostliny linie CFP-H2B/S4-2. Detail buněk kořenové špičky (dole). Modře značen protein histon H2B. C: Kořenová špička linie RFP-CENH3/S2-1 (nahore). Detail buněk kořenové špička linie RFP-CENH3 (dole). Červeně značen centromerický histon H3.

V rámci diplomové práce byla k podrobné charakterizaci vybrána linie RFP-CENH3/S2-1, u které jsou očekávány 2 inserce T-DNA na základě přibližného segregačního poměru.

5.5 Fluorescenční detekce specifity lokalizace RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene

Kromě základního screeningu uříznutých kořenových špiček markerových linií byla provedena izolace jader linie RFP-CENH3/S2-1, která byla podrobena detekci fluorescenčního RFP signálu na fluorescenčním mikroskopu, jako kontrola byl použit WT vzorek ječmene cv. Golden Promise, u kterého nebyla očekávána přítomnost RFP signálu (Obrázek 4). U většiny jader byl detekován RFP signál, který byl jasně lokalizovaný do bodových struktur charakterizujících centromery. Počet jednotlivých bodových centromerických signálů v jádře se pohyboval v rozmezí 7 až 14.



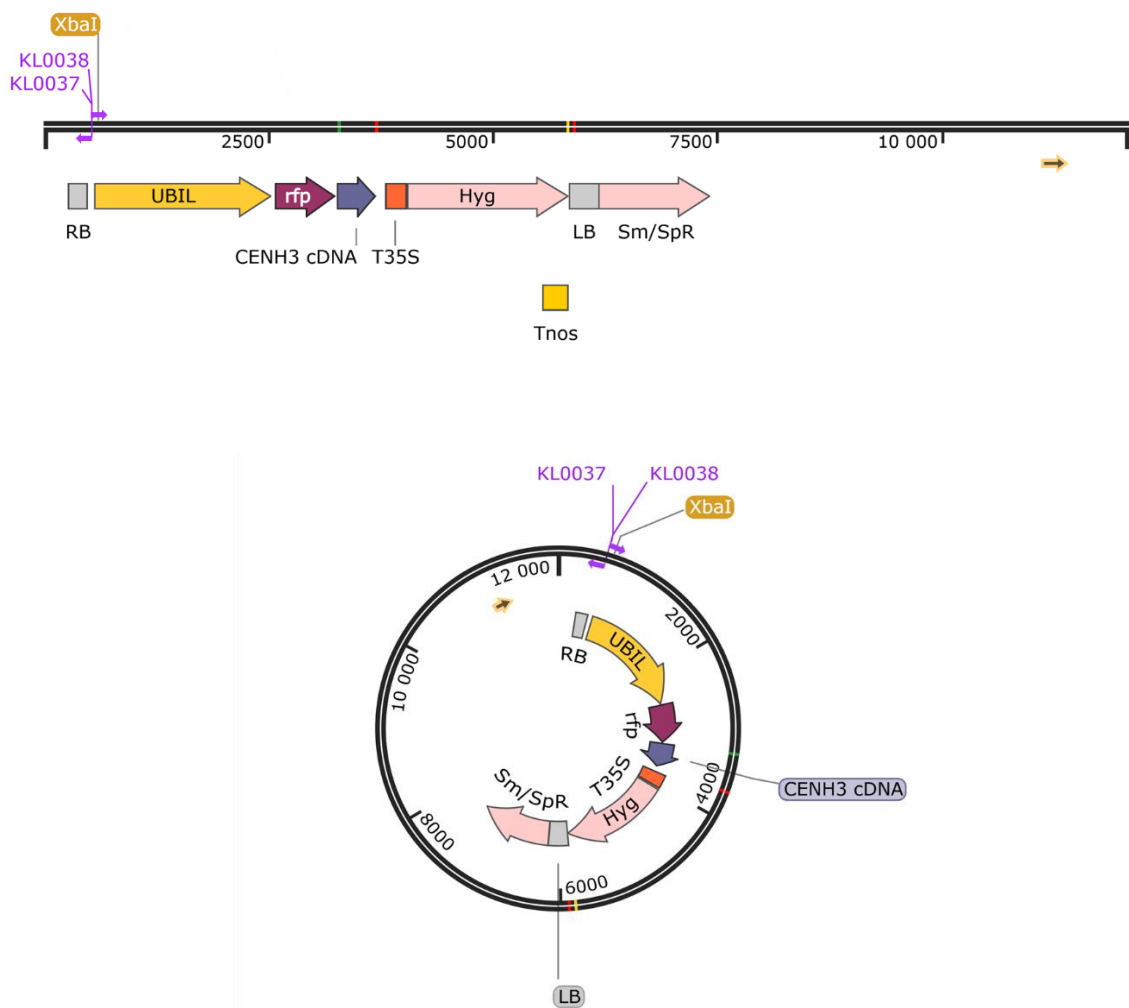
Obrázek 4: Fluorescenční detekce lokalizace fúzního proteinu RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene u transgenního (A) a WT (B) vzorku.

Jádra barvená pomocí DAPI jsou na fotce znázorněna modře. A - jádra transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1 s centromerickou lokalizací fúzního fluorescenčního proteinu RFP-CENH3 (červená), B - WT vzorek ječmen setý cv. Golden Promise. Pozorováno při zvětšení objektivu 63x s použitím imerzního oleje.

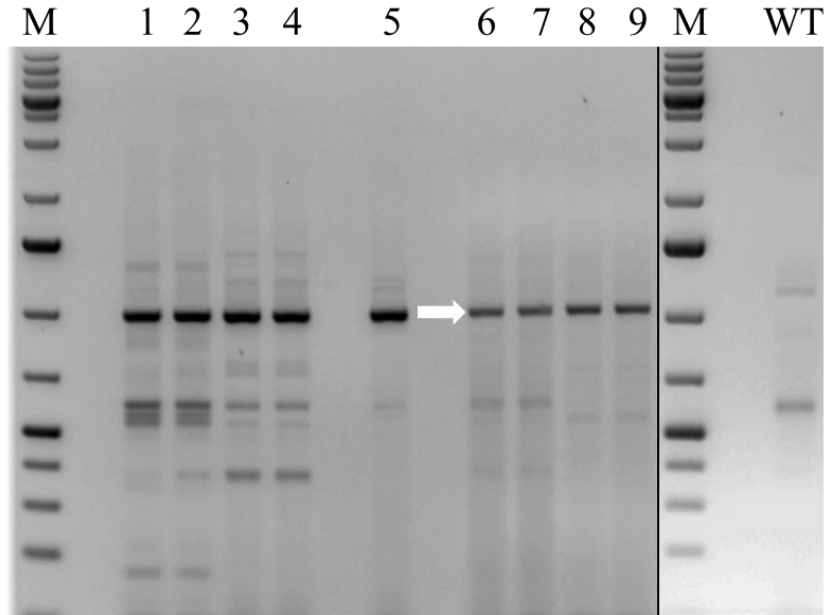
5.6 Inverzní PCR

Zamapování místa inserce T-DNA do genomu ječmene bylo provedeno u vybrané transgenní linie RFP-CENH3/S2-1. Během analýz byl jako negativní kontrola použit vzorek WT ječmene setého cv. Golden Promise. Restrikce genomické DNA byla provedena enzymem *Xba*I s jedinečným restrikčním místem (TCTAGA) v oblasti *right border* (RB) T-DNA. Naštěpené molekuly DNA byly zligovány pomocí T4 ligázy do kruhových molekul, na kterých byla provedena amplifikace (inverzní PCR) pomocí dvojice primerů KL037 a KL038 komplementárních se známou sekvencí kazety, která se vyskytuje v zájmové frakci kruhových DNA molekul (Obrázek 5). Po elektroforetické separaci byl identifikován specifický produkt inverzní PCR o přibližné velikosti 1 000 bp

(vyznačen na Obrázku 6 šipkou), k jehož vzniku docházelo pouze při amplifikaci DNA transgenního RFP-CENH3/S2-1 vzorku. Tento PCR produkt byl následně zaklonován do plazmidu pJET1.2 a transformován do kompetentních bakterií *E. coli* kmen STBL2. Pozitivita kolonií na přítomnost zaklonovaného fragmentu o zájmové velikosti (1 000 bp) narostlých na miskách s LB médiem obsahujícím selekční antibiotikum karbenicilin ($100 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$), byla potvrzena pomocí colony PCR (Obrázek 7) s dvojicí primerů KL037 a KL038. Colony PCR ověřený plazmid byl rozmnožen v tekuté kultuře a po izolaci odeslán k sekvenaci SeqMe s.r.o.. K sekvenování byly použity primery KL037 a KL038 navržené na T-DNA v oblasti RB.

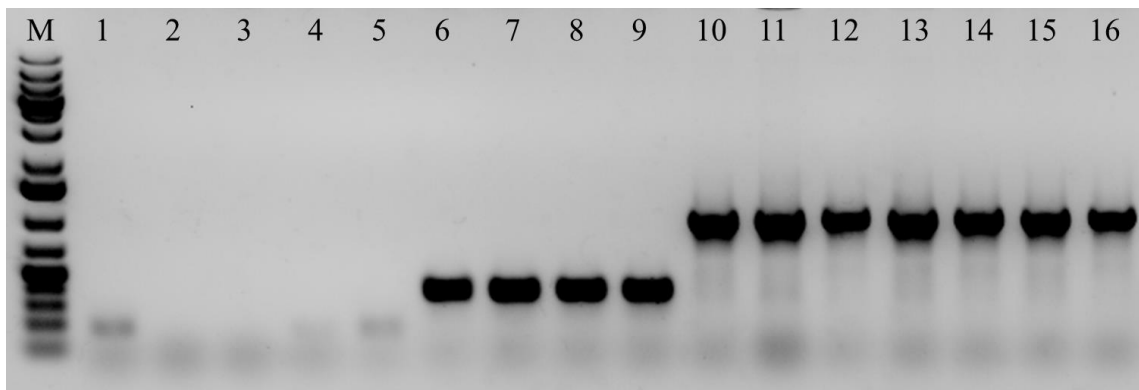


Obrázek 5: Linearizovaná a cirkularizovaná molekula expresního vektoru RFP-CENH3. RB - right border, UBIL - kukuřičný ubiquitinový promotor (*ZmUbi-1*), rfp - gen pro RFP (červený fluorescenční protein), *CENH3* cDNA - gen kódující histon CENH3, *T35S* - Cauliflower Mosaic Virus (*CaMV*) 35S terminátor, Hyg - gen pro hygromycin fosfotransferázu), *Tnos* - terminátor NO-syntázy, LB - left border, Sm/Sp^R - gen pro (rezistence k streptomycinu/spectinomycinu). Žlutě vyznačeno unikátní restrikční místo enzymu *Xba*I. Fialově vyznačeny primery KL037 orientovaný do RB oblasti a KL038 orientovaný do UBIL oblasti.



Obrázek 6: Identifikace specifických produktů inverzní PCR reakce.

Vzorky 6–9 - produkty inverzní PCR reakce linie RFP-CENH3/S2-1; WT - WT ječmen setý cv. Golden Promise, marker molekulové hmotnosti (M) - GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

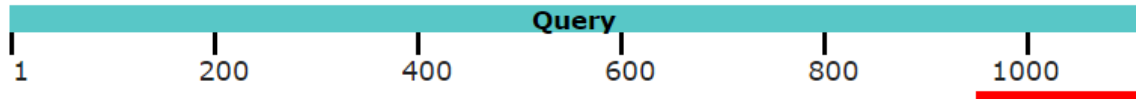


Obrázek 7: Colony PCR vybraných transformovaných kolonií *E. coli*, kmen STBL2 na přítomnost zaklonovaného fragmentu o zájmové velikosti (1 000 bp).

1–16 - kolonie testované na přítomnost zaklonovaného fragmentu, vzorky 10–16 - pozitivně testované kolonie nesoucí fragment o zájmové velikosti 1 000 bp, marker molekulové hmotnosti (M) - GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific).

K zamapování sekvence do genomu byly použity programy SnapGene a BLAST ENSEMBL. Nejdříve byla sekvence sekvenačního readu porovnána se sekvencí kazety v plasmidu v programu BLAST. Takto byl identifikován úsek známé sekvence plasmidu o délce 160 bp nacházejícího se na konci sekvenačního readu. Výsledek BLAST analýzy je zobrazen na Obrázku 8. Proti referenční sekvenci genomu ječmene pak byl alignován

sekvenační read bez této známé sekvence plazmidu. Struktura sekvenačního readu je zobrazena na Obrázku 9.



Obrázek 8: BLAST sekvence proti klonovacímu vektoru pJET1.2.

Modře znázorněn sekvenační read, červeně sekvence plazmidu pJET1.2 přiřazena v programu BLAST.

```
GCAGTGCAGCGTGACCCGGTCGTGCCCTCTCTAGAGATAATGAGCATTGCATGTC
TAWGTTAGACCTTTTGAAGAGGAGATAAAACAGAGGCGGGAACCGCTCCAAAG
TTGCAGGGAAAGGGGAAGGAGATAAAGTGTGTGCGTGCAAATTGATTCCACCCA
AACCTTTCCTACTACGGATCCTCTCTTAATAGTACGGCGTTCCTACGACTCAAAGACA
GGGAATTGTAGAGGACACCGTGCTTCTGTTCCATGGAGGGTGCCGAATCGTCTTGT
GTCGCTGACCTGTATTATCTAAAAGCTTAATGCACATGATTAGTCCTTTACGGTACT
GTCATCAATCACAAAATTACTTAGGCATGAATATGCCCTAACACTGGCCCTCTGCC
AACAGATGGTGCTCCAGCGCCCGCTCGAACACCAACACACGTGTCGACGCGGGTTG
CACCTCCGCCATGACATCATCGTAGTGCGCATGAGCCTGCTCCATGGCAAAGCTGG
CGTGCCAGGCACATGCGTTCGATGCGGTGTCATCGTTCGTCGAGATGTGAAGC
AAGCTAGCCGGAAGGTGACCTCGATTTCGCTCGCACGACGGCTTTGCGAGGCGAC
GGCAAGGGCGGCCACCTCGTGCTTCATCTGTGTGAAAATGCTCTCCCATAGAGTTTT
GCTGCTTACATTCAATTGCGATGCGGTGCAAGGGAGGAGGATGGGAAGCGGCTTGTG
TTGTGGCATGGAGTTAGCTGGATTTGGCTGCCTTAAATAGTGGATTCCGGTGAGGC
CACACGTCTATGCGGACGCCGACATGGATTTCTCGTTCGGCGAGCCTGCTTAATG
ACGACACAAACTGATAGTTTAAACTGAAGGCGGAAACGACAATCTGATCCAA
GCTCAAGCTAAGCTTGGGCCCGAGCGGATAACAATTTACACAGGAAACAGCTATC
TTGCTGAAAAACTCGAGCCATCCGGAAGATCTGGCGGCCGCTCTCCCTATAGTGAG
TCGTATTACCCGGATGGATATGGTGTTCAGGCACAAGTGTAAAGCAGTTGATT
ATCACTATGATGAAAAACAATGAATGGAACCTGCTCCAGTTAAA
```



Obrázek 9: Struktura sekvenačního readu linie RFP-CENH3/S2-1 a schématický náčrt sekvenačního readu linie RFP-CENH3/S2-1

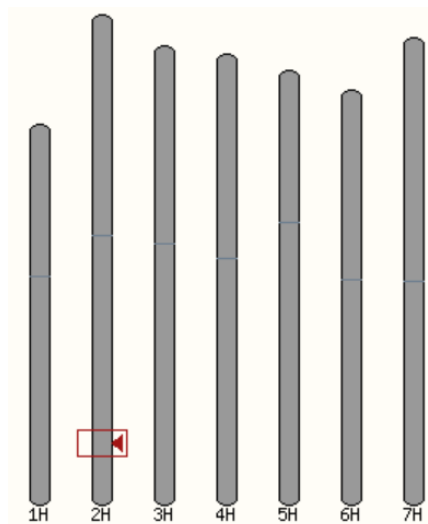
Modře zvýrazněn sekvenační read, červeně sekvence plazmidu pJET1.2 přiřazena v programu BLAST. Šedě zvýrazněny sekvence o změněné struktuře ohraničující vloženou T-DNA.

Sekvenační data upravená a zpracovaná v programu SnapGene byla následně přiřazena pomocí programu BLAST ENSEMBL k referenční sekvenci MorexV3_pseudomolecules_assembly (Howe *et al.*, 2020). Výsledek BLAST analýzy je zobrazen na Obrázku 10. Na základě výsledků programu BLAST se podařilo

lokalizovat T-DNA inzerci linie RFP-CENH3/S2-1 na dlouhé rameno chromozomu 2 (2H) do pozice 581 861 240 až 581 867 140 bp, T-DNA je orientována ve směru 5′–3′ forwardového vlákna DNA. Vizualizace pozice vložení T-DNA na chromozom 2 v genomu ječmene je znázorněna na Obrázku 11.

Genomic Location	Overlapping Gene(s)	Orientation	Length	Score	E-val	%ID
2H:581867141-581867923 [Sequence]		Forward	783 [Sequence]	771	0.0	99.6 [Alignment]
2H:581856531-581856848 [Sequence]		Forward	318 [Sequence]	278	2.9e-154	96.9 [Alignment]
3H:403151187-403151506 [Sequence]		Forward	320 [Sequence]	268	2.7e-148	95.9 [Alignment]
2H:80043597-80043914 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	262	1e-144	95.6 [Alignment]
2H:362806945-362807262 [Sequence]		Forward	318 [Sequence]	262	1e-144	95.6 [Alignment]
6H:126402513-126402830 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	258	2.5e-142	95.3 [Alignment]
2H:80033117-80033434 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	258	2.5e-142	95.3 [Alignment]
3H:378419509-378419826 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	258	2.5e-142	95.3 [Alignment]
6H:457442289-457442601 [Sequence]		Reverse	313 [Sequence]	257	9.9e-142	95.5 [Alignment]
2H:166947811-166948128 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	254	6.1e-140	95.0 [Alignment]
2H:362817508-362817825 [Sequence]		Forward	318 [Sequence]	254	6.1e-140	95.0 [Alignment]
4H:546586362-546586679 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	254	6.1e-140	95.0 [Alignment]
7H:210410830-210411147 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	254	6.1e-140	95.0 [Alignment]
1H:360448013-360448326 [Sequence]		Reverse	314 [Sequence]	250	1.5e-137	94.9 [Alignment]
4H:175144055-175144372 [Sequence]	HORVU.MOREX.r3.4HG0359890	Reverse	318 [Sequence]	250	1.5e-137	94.7 [Alignment]
4H:302841740-302842057 [Sequence]		Forward	318 [Sequence]	250	1.5e-137	94.7 [Alignment]
3H:550444499-550444816 [Sequence]		Reverse	318 [Sequence]	250	1.5e-137	94.7 [Alignment]
6H:457431691-457432003 [Sequence]		Reverse	313 [Sequence]	249	5.9e-137	94.9 [Alignment]
6H:137404627-137404942 [Sequence]		Forward	316 [Sequence]	248	2.3e-136	94.6 [Alignment]
1H:291870521-291870836 [Sequence]		Forward	316 [Sequence]	248	2.3e-136	94.6 [Alignment]
5H:507138559-507138876 [Sequence]		Forward	318 [Sequence]	246	3.6e-135	94.3 [Alignment]

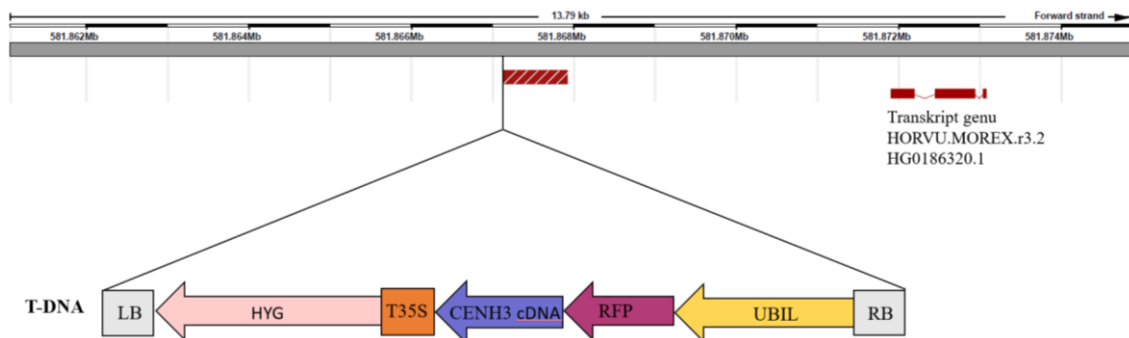
Obrázek 10: Výsledek BLAST ENSEMBL sekvenčního readu proti referenční sekvenci MorexV3_pseudomolecules_assembly.



Obrázek 11: Zamapovaná pozice vložení T-DNA do oblasti dlouhého ramene chromozomu 2H ječmene setého u linie RFP-CENH3/S2-1.

Pozice vložení je označena červeným ukazatelem.

Při bližší analýze bylo zjištěno, že T-DNA molekula je u linie RFP-CENH3/S2-1 vložena do nekódující oblasti genomu. Nejbližším genem nacházejícím se v oblasti vložené T-DNA je gen HORVU.MOREX.r3.2HG0186320.1, anotovaný do pozice 581 871 912 – 581 873 079 bp (reverse orientace 3' – 5'). Je tedy vzdálen 4 772 bp od místa zamapování rozhraní T-DNA sekvence a sekvence genomické DNA. Tento gen je složen ze tří exonů a má jediný transkript o délce 813 bp. Obrázek 12 naznačuje sktrukturu DNA transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1 s reálnou pozicí T-DNA sekvence na chromozomu 2H referenční sekvence.



Obrázek 12: Vizualizace struktury T-DNA integrované do genomu ječmene a pozice jejího vložení určené programem BLAST ENSEMBL.

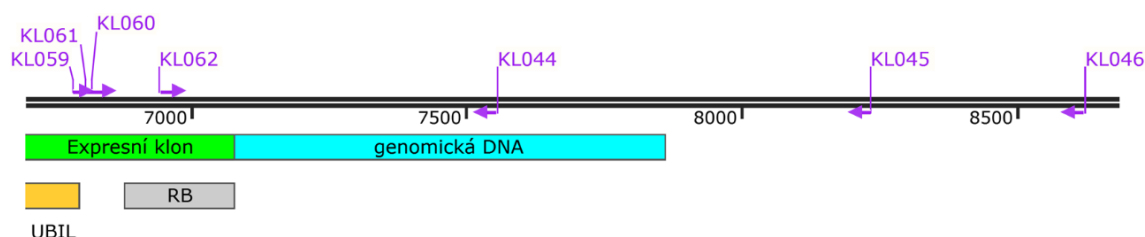
Černobílé měřítko naznačuje reálnou vzdálenost na chromozomu 2H, forward vlákna referenční sekvence MorexV3_pseudomolecules_assembly. Genomická DNA ječmene (šedá). V pravé části obrázku je viditelná pozice transkriptu nejbliže se nacházejícího genu HORVU.MOREX.r3.2HG0186320.1 (červeně).

PCR ověření pozice vložení T-DNA do genomu

Finální ověření pozice vložení T-DNA do genomu transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1 bylo potvrzeno zpětnou amplifikací určené oblasti pomocí PCR. Z důvodu nedostatečné specifity primerové dvojice KL037 a KL038 navržené do oblasti RB s použitím programu Primer3 a BLAST, byly navrženy nové varianty specifických primerů označených jako KL044 až KL062, opět lokalizujících do oblasti RB. Pozice nasedání těchto primerů v rámci T-DNA a genomické DNA je znázorněna na Obrázku 13. Amplifikace byla postupně provedena všemi možnými vzájemnými kombinacemi za účelem nalezení nejvíce specifické primerové dvojice. Všech 12 různých možných kombinací dvojic primerů je uvedeno v Tabulce 14. Primery byly testovány jak na vzorku transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1, tak na WT vzorku.

Tabulka 14: Kombinace specifických primerů navržených do oblasti RB pro finální ověření pozice inserce T-DNA do genomu linie RFP-CENH3/S2-1.

Označení kombinace	Forward primer	Reverse primer	Očekávaná délka produktů [bp]
1	KL044	KL059	770
2		KL060	736
3		KL061	748
4		KL062	614
5	KL045	KL059	1 451
6		KL060	1 415
7		KL061	1 427
8		KL062	1 293
9	KL046	KL059	1 840
10		KL060	1 804
11		KL061	1 816
12		KL062	1 682

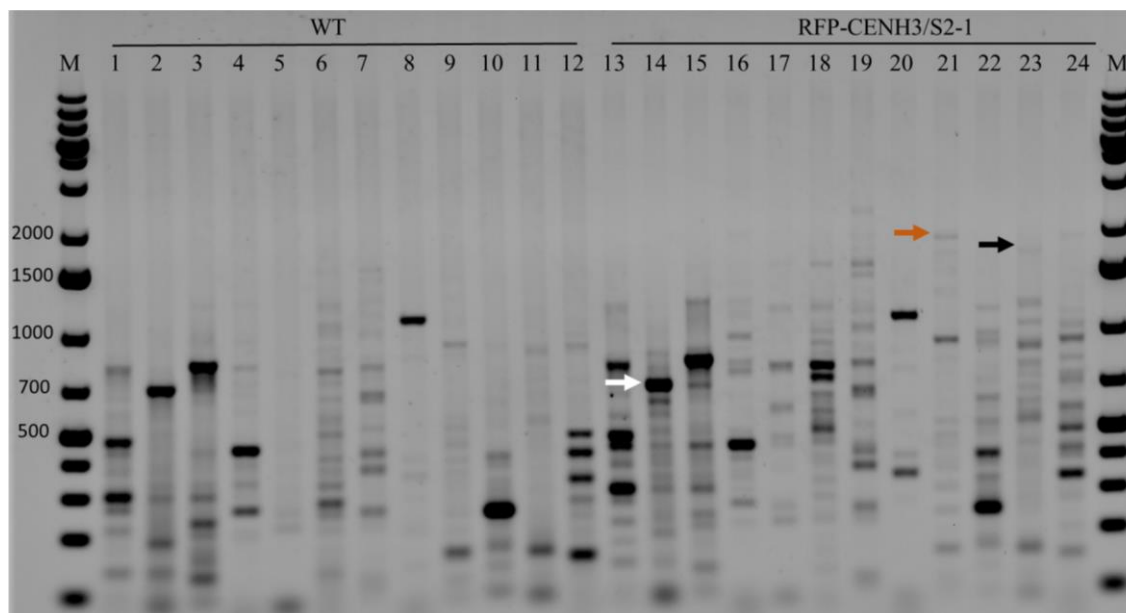


Obrázek 13: Vizualizaci pozice specifických primerů navržených do oblasti RB pro finální ověření pozice inserce T-DNA do genomu linie RFP-CENH3/S2-1.

RB - right border, UBIL - kukuřičný ubiquitinový promotor (*ZmUbi-1*), genomické DNA modře. Primery KL044–KL062 fialově, šipka značí směr orientace primeru.

I přes ověření specifity jedinečnosti nasedání navržených primerů KL044–KL062 pomocí programu BLAST ENSEMBL oproti genomu ječmene (0–1 shod v rámci genomu), byly tyto primery schopny kromě specifické amplifikace DNA, izolované z transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1, nespécificky amplifikovat rovněž DNA WT kontrolní rostliny. Během amplifikace docházelo u všech primerových dvojic ke vzniku nespécifických produktů o různé velikosti (Obrázek 14). Jako nejvíce specifické (tj. tvořící PCR produkt o očekávané velikosti, který se nachází pouze při amplifikaci DNA transgenní linie), byly určeny primerové dvojice č. 2 (vzorek 14), č. 9 (vzorek 21) a č. 11 (vzorek 23).

U vzorku 14 docházelo ke tvorbě specifického produktu o očekávané délce 736 bp, jak lze vidět na Obrázku 14 (bílá šipka). Kombinace primerů č. 9 u vzorku 21 tvořila specifický produkt o očekávané délce 1 840 bp (Obrázek 14, oranžová šipka). Kombinace primerů č. 11 u vzorku 23 tvořila specifický produkt o očekávané délce 1 816 bp (Obrázek 14, černá šipka). Na základě porovnání přítomnosti (resp. nepřítomnosti) charakteristických bandů u vzorků transgenní linie RFP-CENH3/S2-1 a WT rostliny ječmene setého byla potvrzena pozice T-DNA v rámci genomu této transgenní linie.



Obrázek 14: Profily elektroforeticky separovaných PCR produktů amplifikace genomické DNA WT ječmene setého a transgenní rostliny RFP-CENH3/S2-1.

1–12 - amplifikace WT vzorku ječmene setého cv. Golden Promise, 13–24 - amplifikace rostliny RFP-CENH3/S2-1, marker molekulové hmotnosti (M) - GeneRuler 1 kb Plus DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific). Pro amplifikaci byly použity primery uvedené v Tabulce 12.

V rámci diplomové práce se podařilo vyselektovat transgenní rostliny ječmene získané po *Agrobacterium tumefaciens* řízené transformaci nezralých ječmenných embryí. U transgenních linií byl odhadnut očekávaný počet T-DNA inzercí v genomu, ověřena přítomnost fluorescenčního signálu a rovněž ploidie. U vyselektované linie RFP-CENH3/S2-1 se podařilo zamapovat přesnou pozici vložení T-DNA do genomu. T-DNA je vložena na dlouhé rameno chromozomu 2 (2H) do nukleotidové pozice 581 861 240 až 581 867 140 bp, a to v orientaci 5'–3' forwardového vlákna DNA.

6 Diskuze

V rámci mé diplomové práce jsem se zabývala selekcí a analýzou fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*). Fluorescenční markerové linie se hojně využívají i u dalších modelových organismů, jako je např. *Arabidopsis thaliana*. Tyto linie slouží k vizualizaci buněčných kompartmentů *in vivo* (Nagano *et al.*, 2020) a umožňují porozumět dynamice exprese proteinů, jejich funkci a vzájemným interakcím (Wu *et al.*, 2013).

Transformace nezralých embryí a selekce regenerujících rostlin ječmene na médiu obsahujícím selekční antibiotikum hygromycin nemají absolutní míru účinnosti. Na selekčních médiích regenerovaly jak transgenní rostliny, nesoucí ve svém genomu *hpt* gen, tak i netransgenní rostliny, které tento gen neobsahovaly. Tato skutečnost je dána několika příčinami. Používaná koncentrace hygromycinu v selekčních médiích není pro většinu netransgenních rostlin plně letální, ale výrazně redukuje jejich růst v porovnání s transgenními rostlinami, u kterých není narušena translace, a tím i syntéza polypeptidů (Borovinskaya *et al.*, 2008). Již na základě fenotypu bylo možné některé transgenní *hpt+* rostliny odlišit od netransgenních. Tyto rostliny měly díky získané rezistenci dobře vyvinutý kořenový systém a základy listů. Naopak netransgenní rostliny byly často malé, nažloutlé, bez výrazných kořenů. U části regenerujících rostlin však nebylo možné na základě fenotypu odhadnout, zda jsou či nejsou transgenní. Do této kategorie spadaly jak transgenní *hpt+* rostliny, které kvůli stresu způsobenému po regeneraci z kalusu nebo jinému vývojovému problému byly fenotypově podobné netransgenním rostlinám, tak netransgenní rostliny, které byly schopny obejít hygromycinovou selekci. Kromě toho dochází také k lokálnímu snížení koncentrace hygromycinu v médiu v důsledku rostlin, které jej absorbují (Ee *et al.*, 2014). Tím je umožněna regenerace netransgenních rostlin v jejich okolí. Je obecně známo, že v rámci kalusu dochází k transgenní události jen v určitém počtu buněk v rámci malého úseku kalusu, zbytek buněk kalusu zůstává netransgenní. Na základě toho mohou vznikat chimérické rostliny, které jsou složeny jak z buněk obsahující *hpt* gen, tak z netransgenních buněk (Wang *et al.*, 2008; Faize *et al.*, 2010). Vzhledem k těmto skutečnostem bylo nutné provést genotypování na přítomnost *hpt* genu u všech regenerovaných rostlin.

Během transformace a regenerace z kalusové kultury dochází častěji ke změnám ploidie rostlin. Důvodem jsou stresové podmínky, které každá rostlina podstupuje během samotného procesu transformace, jako je např. vystavení působení vakua (Vyroubalová *et al.*, 2011) nebo během samotné regenerace z kalusové kultury (Choi *et al.*, 2000). Tento stres dokonce může vyvolat albinismus (úplný nebo částečný) způsobený ztrátou chloroplastů (Cho *et al.*, 1998; Holme *et al.*, 2008). V rámci selekce regenerujících rostlin fluorescenčních linií ječmene setého byl identifikován jediný vzorek se změnou ploidie (Graf 1, vzorek č. 2), který byl tetraploidní. Byly však pozorovány regenerující rostliny ječmene s albinismem. Rostliny s úplným albinismem po přenosu z regeneračního média do substrátu odumřely, jelikož jim chyběly chloroplasty s chlorofylem, který zajišťuje syntézu cukrů během fotosyntézy. Rostliny s částečným albinismem byly schopny po přenosu do půdy růstu, ten byl však v porovnání s nealbinickými rostlinami pomalejší.

Segregační analýza byla provedena na šesti vybraných markerových liniích ječmene. Optimální počet rostlin potřebných k přesnému, nezkreslenému stanovení segregačního poměru se pohybuje v rozmezí 50–100 kusů (Dai *et al.*, 2001; German *et al.*, 2003). Z důvodu omezené pěstební plochy pracoviště (fytotronové komory, skleníky) nemohl být vysazen potřebný počet rostlin najednou, jelikož by část rostlin musela být zlikvidována. Tato skutečnost by tedy vedla ke ztrátě velkého množství vzácného rostlinného materiálu. Postupně bylo vysazováno 10–20 rostlin (T2 generace) jednotlivých linií, které byly podrobeny genotypování a detekci fluorescenčního signálu, z nich bylo vždy minimálně pět rostlin přemnoženo do další generace (T3 generace), ve které bude opět probíhat analýza segregace za účelem nalezení homozygotních rostlin. Počáteční data pro linie RFP-CENH3/S2-1 a RFP-CENH3/S2-5, získána během mé diplomové práce budou postupně doplňována výsledky segregačních analýz dalších semen T2 generace, dokud nebude naplněn počet 50–100 zanalyzovaných rostlin.

Při analýze přítomnosti fluorescenčního signálu fúzního proteinu RFP-CENH3 se počet fluorescenčních centromerických signálů v jádře nerovnal vždy číslu 14, odpovídajícímu diploidnímu počtu chromozomů (a centromer) u ječmene setého cv. Golden Promise ($2n = 14$), ale pohyboval se v rozmezí hodnot 7–14 centromerických signálů na jádro. Jelikož bylo průtokovou cytometrií ověřeno, že se jedná o diploidní rostlinu, pozorování naznačují, že centromery jednotlivých chromozomů pravděpodobně vzájemně kolokalizují (Schubert *et al.*, 2014).

K analýze přítomnosti fluorescenčního signálu v izolovaných jádrech byly jako zdrojový materiál použity listy rostlin ječmene, ve kterých se nachází velké množství chloroplastů obsahujících chlorofyl. Autofluorescence chlorofylu se může překrývat se signály fluorescenčních proteinů, především těch emitujících záření v červené oblasti světla (RFP) (Berg *et al.*, 2008). Především na Obrázku 4, část A je autofluorescence chlorofylu a zbytků rostlinných tkání na pozadí zřejmá. Oproti listům se v kořenovém meristému nachází jen velmi malé množství plastidů majících autofluorescenci, nejproblematictější strukturou interferující s detekovaným signálem fluorescenčních proteinů je zde buněčná stěna obsahující lignin (DeBlasio *et al.*, 2010). Lignin absorbuje a emituje záření při stejných vlnových délkách jako CFP protein. Proto je možné při mikroskopické analýze CFP-H2B linie (Obrázek 3B) sledovat i signál buněčných stěn, který je však při stejných podmínkách mikroskopie možné sledovat i u *wild-type* vzorku (nejedná se tady o nespecifickou lokalizaci CFP-H2B fúzního proteinu).

Inverzní PCR je jednou z nejčastěji používaných metod určení přesné pozice vložení T-DNA do rostlinného genomu (Kim *et al.*, 2010). Rutinně je využívána především u *A. thaliana* vzhledem k malé velikosti genomu (157 Mb) (Bennet *et al.*, 2003). U obilovin, jejichž genom je mnohonásobně větší (*Oriza sativa* 430 Mb (Eckardt, 2000), *Zea mays* 2,4 Gb (Brenchley *et al.*, 2012), *Hordeum vulgare* 5,1 Gb (The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2010), *Triticum aestivum* 17 Gb (Haberer *et al.*, 2005), je potřeba provést optimalizaci této techniky vzhledem k velké komplexitě genomu obilovin a vysokému počtu repetitivních sekvencí v něm (Mascher *et al.*, 2017; The International Barley Genome Sequencing Consortium, 2010; Wicker *et al.*, 2017). Je tedy obtížné najít unikátní sekvence primerů, které by byly specifické pro konkrétní genomovou oblast. I přes navržení takovýchto primerů je specifita reálného genomu menší než očekávaná. V rámci mé diplomové práce bylo navrženo více kombinací primerů na různá místa T-DNA, ať už v oblasti *left border* nebo *right border* T-DNA. Primery navržené na *left border* nefungovaly pro ověření pozice T-DNA z důvodu nedostatečné specifity. Zároveň byla očekávaná délka PCR produktů příliš velká pro následné zaklonování do plazmidu a sekvenování (více než 5 kb), docházelo ke vzniku malého množství těchto dlouhých PCR produktů na úkor nespecifické amplifikace kratších PCR produktů, a tudíž nebyly po elektroforetické separaci detekovány v dostatečném množství kopií. Primery, navržené na oblast T-DNA *right border*, byly specifičtější, očekávaná délka PCR produktů navržených primerů byla

rovněž menší v porovnání s primery navrženými na *left border*. Při návrhu specifických primerů pro inverzní PCR bylo potřeba tyto primery navrhovat pouze do oblasti *right border*, a ne sousední oblasti kazety, ve které se nachází kukuřičný ubiquitinový promotor. Kvůli částečné homologii jeho sekvence s endogenním ječmenným ubiquitinovým promotorem docházelo při zkušební amplifikaci ke vzniku velkého množství nespecifických PCR produktů (Christensen *et* Quail, 1996).

Z důvodu technické nemožnosti navrhnout dostatečně specifické primery pro finální ověření pozice T-DNA v genomu, které by nedávaly vzniknout PCR produktu při amplifikaci WT genomické DNA, se většina PCR produktů vyskytuje jak u transgenní rostliny, tak u WT rostliny použité jako negativní kontrola. Tato shoda je dána tím, že pro charakterizaci pozice vložení T-DNA byla jako zdrojová rostlina použita rostlina T1 generace, která je pro vloženou T-DNA vždy heterozygotní (jedna alela je transgenní, jelikož se do ní během transformace pomocí *A. tumefaciens* vložila T-DNA, druhá alela zůstala během transformace nezměněná, a je shodná s WT alelou).

Charakterizace vyselektovaných transgenních rostlinných linií je nedílnou součástí jejich tvorby. Před samotnou analýzou biologických procesů, ke kterým byla daná linie vytvořena, je potřeba vyloučit případný negativní vliv T-DNA inserce vložené do genomu, která může významně ovlivňovat celkovou fyziologii rostliny, a tedy i získaných výsledků.

7 Závěr

Tato diplomová práce pod vedením Mgr. Kateřiny Kaduchové byla zaměřena na selekci a analýzu fluorescenčních markerových linií ječmene setého (*Hordeum vulgare*).

Počátečním krokem práce s markerovými liniemi byla transformace nezralých embryí ječmene setého cv. Golden Promise pomocí *Agrobacterium tumefaciens* nesoucí T-DNA a selekce transgenních rostlin regenerujících z embryonálního kalusu ječmene setého na médiích obsahující antibiotikum hygromycin. Tito regeneranti byli genotypováni pomocí PCR reakce na přítomnost selekčního genu po hygromycin fosfotrasferázu, a tím byla potvrzena přítomnost minimálně jedné kopie T-DNA v genomu.

U šesti vybraných linií byl na základě počtu rostlin T2 generace obsahující signál daného fluorescenčního fúzního proteinu stanoven segreganční poměr určující počet kopií T-DNA vložených do genomu T1 rostlin. Všechny mateřské (T1) rostliny byly heterozygotní a počet T-DNA kopií se pohyboval od jedné do čtyř.

K bližší charakterizaci byla vybraná linie RFP-CENH3/S2-1. Provedením fluorescenční detekce specifity lokalizace RFP-CENH3 v izolovaných jádrech ječmene byl zjištěn počet centromerických signálů, který se pohybuje v rozmezí 7–14 v závislosti na míře kolokalizace centromer, analýzou ploidie bylo ověřeno, že se jedná o diploidní rostlinu. U této linie byla pomocí metody inverzní PCR, následného sekvenačního ověření a závěrečné bioinformatické analýzy sekvenačního readu, určena pozice vložení T-DNA do genomu rostliny. T-DNA sekvence byla vložena do pozice 581 861 240 až 581 867 140 bp na dlouhém rameni chromozomu 2H. Toto zjištění bylo ověřeno pomocí PCR reakce se specificky navrženými primery, z nichž tři dvojice primerů amplifikovaly specifické produkty o očekávané délce, které se nevyskytovaly u *wild-type* vzorku.

8 Literatura

Bartlett J. G., Alves S. C., Smedley M., Snape J. W., Harwood, W. A. (2008): High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods*, 4: 22.

Beneš J., Šálková T., Vaněček Z. (2011): Původ a nejstarší historie ječmene setého (*Hordeum vulgare*) na Předním východě: pohled archeobotaniky. *Kvasný Průmysl*, 57: 121–126.

Bennett M. D., Leitch I. J., Price H. J., Johnston J. S. (2003): Comparisons with *Caenorhabditis* (~100 Mb) and *Drosophila* (~175 Mb) using flow cytometry show genome size in *Arabidopsis* to be ~157 Mb and thus ~25 % larger than the *Arabidopsis* genome initiative estimate of ~125 Mb. *Annals of Botany*, 91: 547–557.

Berg R. H., Beachy R. N. (2008): Fluorescent protein applications in plants. *Methods in Cell Biology*, 85: 153–177.

Borovinskaya M. A., Shoji S., Fredrick K., Cate J. H. D. (2008): Structural basis for hygromycin B inhibition of protein biosynthesis. *RNA*, 14: 1590–1599.

Brenchley R., Spannagl M., Pfeifer M., Barker G. L. A., D'Amore R., Allen A. M., McKenzie N., Kramer M., Kerhornou A., Bolser D., Kay S., Waite D., Trick M., Bancroft I., Gu Y., Huo N., Luo M. Ch., Sehgal S., Gill B., Kianian S., Anderson O., Kersey P., Dvorak J., McCombie W. R., Hall A., Mayer K. F. X., Edwards K. J., Bevan M. W., Hall N. (2012): Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491: 705–710.

Clark D. P., Pazdernik N. J. (2016): DNA synthesis *in vivo* and *in vitro*. In: Clark D. P., Pazdernik N. J. (eds.): *Biotechnology*, pp. 97–130, Elsevier, Amsterdam, Nizozemsko.

Crowell E. F., Bischoff V., Desprez T., Rolland A., Stierhof Y. D., Schumacher K., Gonneau M., Höfte H., Vernhettes S. (2009): Pausing of Golgi bodies on microtubules regulates secretion of cellulose synthase complexes in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 21: 1141–1154.

Cutler S. R., Ehrhardt D. W., Griffiths J. S., Somerville C. R. (2000): Random GFP::cDNA fusions enable visualization of subcellular structures in cells of *Arabidopsis* at a high frequency. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97: 3718–3723.

- Dai S., Zheng P., Marmey P., Zhang S., Tian W., Chen S., Beachy R. N., Fauquet C. (2001): Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, 7: 25–33.
- Daniell H., Streatfield S. J., Wycoff K. (2001): Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 219–226.
- DeBlasio S. L., Sylvester A. W., Jackson D. (2010): Illuminating plant biology: using fluorescent proteins for high-throughput analysis of protein localization and function in plants. *Briefings in functional genomics*, 9: 129–138.
- Diviš J., Jůza J., Moudrý J., Vondrys J., Bárta J., Štěrbá Z. (2010): Pěstování rostlin, Jihočeská Univerzita v Českých Budějovicích, Zemědělská fakulta.
- Dumur T., Duncan S., Graumann K., Desset S., Randall R. S., Mittelsten Scheid O., Bass H. W., Prodanov D., Tatout C., Baroux C. (2019): Probing the 3D architecture of the plant nucleus with microscopy approaches: challenges and solutions. *Nucleus*, 10: 181–212.
- Eckardt N. A. (2000): Sequencing the rice genome. *The Plant Cell*, 12: 2011–2017.
- 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.
- Ee S.F., Khairunnisa M. B., Zeti-Azura M. H., Noor Azmi S., Zamri Z. (2014): Effective hygromycin concentration for selection of *Agrobacterium*-mediated transgenic *Arabidopsis thaliana*. *Malaysian Applied Biology*, 43: 119–123.
- Ettinger A., Wittmann T. (2014): Fluorescence live cell imaging. In: Waters J. C., Wittman T. (eds.): *Quantitative Imaging in Cell Biology*, pp. 77–94, Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Faize M., Faize L., Burgos L. (2010): Using quantitative real-time PCR to detect chimeras in transgenic tobacco and apricot and to monitor their dissociation. *BMC Biotechnology*, 10, 53.
- Galbraith D. W., Harkins K. R., Maddox J. M., Ayres N. M., Sharma D. P., Firoozabady E. (1983): Rapid flow cytometric analysis of the cell cycle in intact plant tissues. *Science*, 220: 1049–1051.

- Gelvin S. B. (2003): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: the biology behind the “gene-jockeying” tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67: 16–37.
- Gelvin S. B. (2021): Plant DNA repair and *Agrobacterium* T-DNA integration. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(8458): 1–16.
- German M. A., Kandel-Kfir M., Swarzburg D., Matsevitz T., Granot D. (2003): A rapid method for the analysis of zygosity in transgenic plants. *Plant Science*, 164: 183–187.
- Granner A., Kilian A., Kleinhofs A. (2011): Barley genome organization, mapping, and synteny. In: Steven E. Ullrich (ed.): *Barley: production, improvement, and uses*, pp. 63–84, Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Haberer G., Young S., Bharti A. K., Gundlach H., Raymond C., Fuks G., Butler E., Wing R. A., Rounsley S., Birren B., Nusbaum C., Mayer K. F., Messing J. (2005): Structure and architecture of the maize genome. *Plant Physiology*, 139: 1612–1624.
- Haseloff J., Dormand E. L., Brand A. H. (1999): Live imaging with green fluorescent protein. In: Paddock S. W. (eds.): *Confocal microscopy methods and protocols*, pp. 241–259. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Hisano H., Tsujimura M., Yoshida H., Terachi T., Sato K. (2016): Mitochondrial genome sequences from wild and cultivated barley (*Hordeum vulgare*). *BMC Genomics*, 17(824): 1–12.
- Holme I. B., Brinch-Pedersen H., Lange M., Holm P. B. (2008): Transformation of different barley (*Hordeum vulgare* L.) cultivars by *Agrobacterium tumefaciens* infection of in vitro cultured ovules. *Plant Cell Reports*, 27: 1833–1840.
- Howe K. L., Contreras-Moreira, B., De Silva, N., Maslen, G., Akanni, W., Allen, J., Alvarez-Jarreta, J., Barba, M., Bolser, D. M., Cambell, L., Carbajo, M., Chakiachvili, M., Christensen, M., Cummins, C., Cuzick, A., Davis, P., Fexova, S., Gall, A., George, N., Gil, L., Gupta P., Hammond-Kosack K. E., Haskell E., Hunt S. E., Jaiswal P., Janacek S. H., Kersey P. J., Langridge N., Maheswari U., Maurel T., McDowall M. D., Moore B., Muffato M., Naamati G., Naithani S., Olson A., Papatheodorou I., Patricio M., Paulini M., Pedro H., Perry E., Preece J., Rosello M., Russell M., Sitnik V., Staines D. M., Stein J., Tello-Ruiz M. K., Trevanion S. J., Urban M., Wei S., Ware D., Williams G., Yates A. D., Flicek P. (2020): Ensembl Genomes 2020 - enabling non-vertebrate genomic research. *Nucleic Acids Research*, 48: 689–695.

- Hraška M., Rakouský S., Čurn V. (2006): Green fluorescent protein as a vital marker for non-destructive detection of transformation events in transgenic plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86: 303–318.
- Huang J., Pray C., Rozelle S. (2002): Enhancing the crops to feed the poor. *Nature*, 418: 678–684.
- Huh W. K., Falvo J. V., Gerke L. C., Carroll A. S., Howson R. W., Weissman J. S., O’Shea, E. K. (2003): Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature*, 425: 686–691.
- Hull R., Head G., Tzotzos G. T. (2021): Chapter 2 - Technologies for crop improvement. In: Hull R., Head G., Tzotzos G. T. (eds.): *Genetically modified plants (Second Edition)*, pp. 35–81, Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Hutter H. (2012): Fluorescent protein methods: strategies and applications. *Methods in Cell Biology*, 107: 67–92.
- Hwang H. H., Yu M., Lai E. M. (2017): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: biology and applications. *The Arabidopsis Book*, 15: 1–31.
- Chalfie M., Tu Y., Euskirchen G. (1994): Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802–805.
- Cherian S., Oliveira M. M. (2005): Transgenic plants in phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science & Technology*, 39: 9377–9390.
- Chilton M. D., Drummond M. H., Merlo D. J., Sciaky D., Montoya A. L., Gordon M. P., Nester E. W. (1977): Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis. *Cell*, 11: 263–271.
- Cho M.-J., Jiang W., Lemaux P. G. (1998): Transformation of recalcitrant barley cultivars through improvement of regenerability and decreased albinism. *Plant Science*, 138: 229–244.
- Choi H. W., Lemaux P.G., Cho M. J. (2000) : Increased chromosomal variation in transgenic versus nontransgenic barley (*Hordeum vulgare* L.) plants. *Crop Science*, 40: 524–533.

- Christensen A.H., Quail P.H. (1996): Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5: 213–218.
- Chudakov D. M., Matz M. V., Lukyanov S., Lukyanov K. A. (2010): Fluorescent proteins and their applications in imaging living cells and tissues. *Physiological Reviews*, 90: 1103–1163.
- International Barley Genome Sequencing Consortium (2012): A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*, 491: 711–716.
- Ishikawa-Ankerhold H. C., Ankerhold R., Drummen G. P. (2012): Advanced fluorescence microscopy techniques--FRAP, FLIP, FLAP, FRET and FLIM. *Molecules*, 17: 4047– 4132.
- Ketelaar T., Anthony R. G., Hussey P. J. (2004): Green fluorescent protein-mTalin causes defects in actin organization and cell expansion in *Arabidopsis* and inhibits actin depolymerizing factor's actin depolymerizing activity *in vitro*. *Plant Physiology*, 136: 3990–3998.
- Kim S. R., Jeon J. S., An G. (2010): Development of an efficient inverse PCR method for isolating gene tags from T-DNA insertional mutants in rice. *Plant Reverse Genetics*, 678: 139–146.
- Klein T. M., Wolf E. D., Wu R., Sanford J. C. (1987): High-velocity microprojectiles for delivering nucleic-acids into living cells. *Nature*, 327: 70–73.
- Kleinhofs A., Graner A. (2001): An integrated map of the barley genome. In: Phillips R.L., Vasil I.K. (eds.): *DNA-based markers in plants. Advances in Cellular and Molecular Biology of Plants*, pp. 187–199, Springer, Berlin, Germany.
- Kling J. G., Hayes P. M., Ullrich S. E. (2004): BARLEY | Genetics and Breeding. In: Colin Wrigley, Harold Corke, Charles E. Walker (eds.): *Encyclopedia of Grain Science*, pp. 27–38. Academic Press, Cambridge, Massachusetts.
- Kremers G. J., Gilbert S. G., Cranfill P. J., Davidson M. W., Piston D. W. (2011): Fluorescent proteins at a glance. *Journal of Cell Science*, 124: 157–160.
- Kumlehn J., Serazetdinova L., Hensel G., Becker D., Loerz H. (2006): Genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.) via infection of androgenetic pollen cultures with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Biotechnology Journal*, 4: 251–261.

- Lazzeri P. A., Jones H. D. (2009): Transgenic Wheat, Barley and Oats: Production and Characterization. In: Jones H. D., Shewry P. R. (eds.): Transgenic Wheat, Barley and Oats. Humana Press, Totowa, New Jersey.
- Lim W. L., Collins H. M., Singh R. R., Kibble N. A. J., Yap K., Taylor J., Fincher G. B., Burton R. A. (2018): Method for hull-less barley transformation and manipulation of grain mixed-linkage beta-glucan. *Journal of Integrative Plant Biology*, 60: 382–396.
- Lippincott-Schwartz J., Patterson G. H. (2003): Development and use of fluorescent protein markers in living cells. *Science*, 300: 87–91.
- Lisenbee C. S., Karnik S. K., Trelease R. N. (2003): Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic*, 4: 491–501.
- Low L. Y., Yang S. K., Kok D. X. A., Ong-Abdullah J., Tan N. P., Lai, K. S. (2018): Transgenic plants: gene constructs, vector and transformation method. In: Çelik Ö. (ed.): *New Visions in Plant Science*, pp. 41–61, IntechOpen, London, United Kingdom.
- Marthe C., Kumlehn J., Hensel G. (2015): Barley (*Hordeum vulgare* L.) transformation using immature embryos. *Methods in Molecular Biology*, 1223: 71–83.
- Mascher M., Gundlach H., Himmelbach A., Beier S., Twardziok O. S., Wicker T., Radchuk V., Dockter C., Hedley P. E., Russell J., Bayer M., Ramsay L., Liu H., Haberer G., Zhang X. Q., Zhang Q., Barrero R. A., Li L., Taudien S., Groth M., Felder M., Hastie A., Šimková H., Staňková H., Vrána J., Chan S., Muñoz-Amatriaín M., Ounit R., Wanamaker S., Bolser D., Colmsee C., Schmutzer T., Aliyeva-Schnorr L., Grasso S., Tanskanen J., Chailyan A., Sampath D., Heavens D., Clissold L., Cao S., Chapman B., Dai F., Han Y., Li H., Li X., Lin C., McCooke J. K., Tan C., Wang P., Wang S., Yin S., Zhou G., Poland J. A., Bellgard M. I., Borisjuk L., Houben A., Doležel J., Ayling S., Lonardi S., Kersey P., Langridge P., Muehlbauer G. J., Clark M. D., Caccamo M., Schulman A. H., Mayer K. F. X., Platzer M., Close T. J., Scholz U., Hansson M., Zhang G., Braumann I., Spannagl M., Li C., Waugh R., Stein N. (2017): A chromosome conformation capture ordered sequence of the barley genome. *Nature*, 544: 427–433.
- Miki B., McHugh S. (2004): Selectable marker genes in transgenic plants: application, alternatives and biosafety. *Journal of Biotechnology*, 107: 193–232.

- Murray F., Brettell R., Matthews P., Bishop D., Jacobsen J. (2004): Comparison of *Agrobacterium*-mediated transformation of four barley cultivars using the GFP and GUS reporter genes. *Plant Cell Reports*, 22: 397–402.
- Nagano M., Ueda H., Fukao Y., Kawai-Yamada M., Hara-Nishimura I. (2020): Generation of *Arabidopsis* lines with a red fluorescent marker for endoplasmic reticulum using a tail-anchored protein cytochrome b5-B. *Plant Signaling & Behavior*, 15(9): 1–5.
- Newman C. W., Newman, R. K. (2006): A brief history of barley foods. *Cereal Foods World*, 51: 4–7.
- Niwa T., Kanno A., Tsutsumi N., Hirai A. (1996): Detailed mapping of the chloroplast genome of barley, *Hordeum vulgare* L.. *Genes & Genetic Systems*, 71: 175–180.
- Purugganan M., Fuller D. (2009): The nature of selection during plant domestication. *Nature*, 457: 843–848.
- Shimomura O., Johnson F. H., Saiga Y. (1962): Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusa, *Aequorea*. *Journal of Cellular Physiology*, 59: 223–239.
- Shrawat A. K., Becker D., Lörz H. (2007): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of barley (*Hordeum vulgare* L.). *Plant Science*, 172: 281–290.
- Schreiber M., Mascher M., Wright J., Padmarasu S., Himmelbach A., Heavens D., Milne L., Clavijo B. J., Stein N., Waugh R. (2020): A genome assembly of the barley ‘transformation reference’ cultivar Golden Promise. *G3 Genes|Genomes|Genetics*, 10: 1823–1827.
- Schubert V., Rudnik R., Schubert I. (2014): Chromatin associations in *Arabidopsis* interphase nuclei. *Frontiers in Genetics*, 5: 1–11.
- Stavolone L., Kononova M., Pauli S., Ragozzino A., de Haan P., Milligan S., Lawton K., Hohn T. (2003): Cestrum yellow leaf curling virus (CmYLCV) promoter: a new strong constitutive promoter for heterologous gene expression in a wide variety of crops. *Plant Molecular Biology*, 53: 663–673.
- Tanz S. K., Castleden I., Small I. D., Millar A. H. (2013): Fluorescent protein tagging as a tool to define the subcellular distribution of proteins in plants. *Frontiers in Plant Science*, 4: 1–9.

- Thomas W. T. B., Hayes P. M., Dahleen L. S. (2011): Application of molecular genetics and transformation to barley improvement. In: Steven E. Ullrich (ed.): Barley: production, improvement, and uses, pp. 122–143, Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Travella S., Ross S. M., Harden J., Everett C., Snape J. W., Harwood W. A. (2005): A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and *Agrobacterium*-mediated techniques. *Plant Cell Reports*, 23: 780–789.
- Tricase C., Amicarelli V., Lamonaca E., Rana R. L. (2018): Economic analysis of the barley market and related uses. In: Tadele Z. (ed.): Grasses as food and feed, pp. 25–46, IntechOpen, London, United Kingdom.
- Tzfira T., Lacroix B., Citovsky V. (2005): Nuclear import of *Agrobacterium* T-DNA. In: Tzfira T., Citovsky V. (eds.): Nuclear import and export in plants and animals. Molecular Biology Intelligence Unit. pp. 83–99. Springer, Boston, USA.
- Tzfira, T., Li J., Lacroix B., Citovsky V. (2004): *Agrobacterium* T-DNA integration: molecules and models. *Trends in Genetics*, 20: 375–383.
- Von Bothmer R., Komatsuda T. (2011): Barley origin and related species. In: Steven E. Ullrich (ed.): Barley: production, improvement, and uses, pp. 14–62, Wiley-Blackwell, New Jersey.
- Vyroubalová Š., Šmehilová M., Galuszka P., Ohnoutková L. (2011): Genetic transformation of barley: limiting factors. *Biologia Plantarum*, 55: 213–224.
- Walia H., Wilson C., Condamine P., Ismail A. M., Xu J., Cui X., Close T. J. (2007): Array-based genotyping and expression analysis of barley cv. Maythorpe and Golden Promise. *BMC Genomics*, 8: 87.
- Wang W., Wang C., Huang B. L., Huang B. (2008): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lesquerella fendleri* L., a potential new oil crop with rich lesquerolic acid. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92: 165–171.
- Wicker T., Schulman A.H., Tanskanen J., Spannagl M., Twardziok S., Mascher M., Springer N. M., Li Q., Waugh R., Li C., Zhang G, Stein N., Mayer K. F. X., Gundlach H. (2017): The repetitive landscape of the 5100 Mbp barley genome. *Mobile DNA*, 8: 22.

Windels P., De Buck S., Depicker A. (2008): *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: patterns of T-DNA integration into the host genome. In: Tzfira T., Citovsky V. (eds.): *Agrobacterium: from biology to biotechnology*, pp. 441–481, Springer, New York, USA.

Wu Q., Luo A., Zadrozny T., Sylvester A., Jackson D. (2013): Fluorescent protein marker lines in maize: generation and applications. *The International Journal of Developmental Biology*, 57: 535–543.

Zhang C., Gong F. C., Lambert G. M., Galbraith D. W. (2005): Cell type-specific characterization of nuclear DNA contents within complex tissues and organs. *Plant Methods*, 1: 7.

Ziemienowicz A. (2014): *Agrobacterium*-mediated plant transformation: Factors, applications and recent advances. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 3: 95–102.

Zimolka J. a kol. (2006): *Ječmen - formy a užitkové směry v České republice*. Profi Press s. r. o., Praha.

Internetové zdroje

Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAOSTAT statistical database. [online] [navštíveno 12.12.2021] Dostupné z <http://www.fao.org/faostat/en/#home>

The Nobel Prize in Chemistry 2008. [online] [navštíveno 5.1.2022] Dostupné z <https://www.nobelprize.org/prizes/chemistry/2008/summary/>

Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský [online] [navštíveno 17.12.2021] Dostupné z <https://eagri.cz/public/app/sok/odrudyNouQF.do>